

УДК: 57.085.2

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.2.298

ПОЛУЧЕНИЕ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА С ПРИМЕНЕНИЕМ ГОТОВЫХ СРЕД НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ПРЕДПРИЯТИЯ «ПАНЭКО»

Хоменко В.А.¹ – уч. мастер каф. физиологии человека и животных (ORCID 0009-0006-8235-2035); **Бородина С.В.**¹ – асс. каф. физиологии человека и животных (ORCID 0009-0009-5022-5244); **Светлик М.В.**^{1,2} – канд. биол. наук, доц. каф. физиологии человека и животных, доц. каф. медицинской и биологической кибернетики (ORCID 0000-0003-0990-2580); **Томова Т.А.**^{1,3} – канд. биол. наук, доц. каф. физиологии человека и животных, доц. каф. биологии (ORCID 0000-0003-2435-2003); **Мошкина М.В.**¹ – асс. каф. физиологии человека и животных (ORCID 0009-0002-4455-0541).

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет»

³ФГБОУ ВО «Томский государственный педагогический университет»

eskovata77@mail.ru

Ключевые слова: Экстракорпоральное оплодотворение, культуральные среды, ооцит-кумулюсный комплекс, эмбрионы, крупный рогатый скот.

Key words: In vitro fertilization, culture medium, cumulus-oocyte complex, embryos, cattle.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке Гранта № 075-15-2022-1152 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках реализации федерального проекта "Передовые инженерные школы" государственной программы Российской Федерации "Научно-технологическое развитие Российской Федерации" (Постановление № 619 от 8 апреля 2022 г.).

Поступила: 13.05.2024

Принята к публикации: 10.06.2024

Опубликована онлайн: 28.06.2024



РЕФЕРАТ

Развитие и широкое практическое применение технологии получения эмбрионов in vitro позволит восполнять поголовье стада в короткие сроки, сохранять и тиражировать ценные генотипы, а также создавать новые генотипы методом геномного редактирования. На племенное животноводство возлагаются задачи в достаточно короткие сроки обеспечить сельские хозяйства высокоценным стадом, на аграриев возлагается – восполнение поголовья стада в короткие сроки, что возможно только при активном внедрении вспомогательных репродуктивных технологий, таких как получение эмбрионов in vitro (IVP технология). Использование в технологии культуральных

сред отечественного производства обеспечит большую доступность, снижение экономических затрат и скорейшее развитие селекционной работы в России. Целью работы явилась оценка результативности применения IVP-технологии при использовании культуральных сред отечественного производителя НПП «ПанЭко» (Россия) для получения эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro*. В основу собственного протокола получения эмбрионов крупного рогатого скота легли протоколы производителей культуральных сред НПП «ПанЭко» и IVF Bioscience (Великобритания). Таким образом, впервые используя линейку сред отечественного производителя «ПанЭко» в условиях инкубации при температуре от плюс 38,6 °C до плюс 38,9 °C, содержании CO₂ 6,2-6,8 % и неконтролируемой влажности, на 6-8 сутки, через 140-182 часов от момента оплодотворения было получено 30,4 % эмбрионов на стадии бластоцисты по отношению к общему количеству оплодотворенных ооцитов, достигших стадии 2-4 бластомеров.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Ожидаемый глобальный рост численности населения Земли на 11 % будет способствовать увеличению мирового потребления мяса к 2030 г. на 14 % (ежегодный средний темп роста – 5,7 %), что обуславливает на сегодняшний день потребность в высококачественном маточном поголовье и ремонтном молодняке [1]. На племенное животноводство возлагаются задачи в достаточно короткие сроки обеспечить сельские хозяйства высокоценным стадом, на аграриев возлагается – восполнение поголовья стада в короткие сроки, что возможно только при активном внедрении вспомогательных репродуктивных технологий, таких как получение эмбрионов *in vitro* (IVP технология) [2, 3]. Развитие и практическое применение IVP технологии позволяет решить задачи, связанные с сохранением и тиражированием ценных генотипов, а также созданием новых генотипов методом геномного редактирования [4, 5].

Для успешной реализации всех этапов культивирования ооцит-кумулюсных комплексов и эмбрионов *in vitro* необходимо поддерживать параметры среды в оптимальном физическом и химическом состоянии в достаточно узких пределах с помощью качественного оборудования, газовых смесей и культуральных сред, применяемых на разных этапах данной технологии [6, 7]. Несмотря на разнообразные исследования, универсального состава питательных сред для культивирования эмбрионов животных *in vitro* не существует [8, 9]. Вместе с тем, на рынке присутствуют различные линейки культу-

ральных сред для животных только зарубежных производителей (например, Великобритания, Германия, Бразилия), а единственное предприятие в России «ПанЭко» на сегодняшний день выпускает культуральные среды, предназначенные для человека. Наличие собственного отечественного производства питательных сред для репродуктивной технологии *in vitro* с учетом особенностей региональных условий, а также клеточного материала сельскохозяйственных животных и методических руководств является основным трендом в развитии направления, что будет способствовать повышению надежности культуральных систем, снижению риска загрязнения патогенами, улучшению воспроизводимости результатов по экспериментальному протоколу. Кроме того, использование культуральных сред отечественного производства обеспечит большую доступность, снижение экономических затрат и скорейшее развитие селекционной работы, а также достижение новых разработок в биомедицине в России. Цель: оценка результативности применения IVP-технологии при использовании культуральных сред отечественного производителя НПП «ПанЭко» (Россия) для получения эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

При разработке собственного протокола получения эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* за основу были взяты протоколы производителей питательных сред Научно-производственного предприятия «ПанЭко» (Россия) [10] и IVF Biosci-

енсе (Великобритания) [11]. Протокол получения эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* с применением сред отечественного производителя ПанЭко (Россия) включал пять этапов.

1. Этап транспортировки. Яичники коров черно-пестрой голштинизированной породы (ООО «СПК «Межениновский», Томская область, с. Рыболово, удой – 7871 кг) после убоя транспортировали в течение не более 3 часов в лабораторию в термосе при температуре от плюс 25°C до плюс 35°C в 500 мл стерильного физиологического раствора, в который добавляли 0,5 мл гепарина, 0,2 мл гентамицина и 90 мг бычьего сывороточного альбумина.

2. Этап аспирации яичников. В лаборатории яичники освобождали от близлежащих тканей и получали ооцит-кумулосные комплексы путем аспирации фолликулов, используя аспиратор с сосудом ловушкой FTA-2i с иглой 18 G и средой ЭКО1 «Аспирационная». Затем ооцит-кумулосные комплексы промывали в 2-х каплях среды (по 50 мкл каждая капля) ЭКО1 "Универсальная" и оценивали под микроскопом. Оценка качества ооцит-кумулосных комплексов и их способности к дальнейшему развитию и созреванию состояла из исследования морфологической структуры кумулюса, ооплазмы и прозрачной оболочки [12, 13].

3. Этап созревания ооцитов. Ооцит-кумулосные комплексы, соответствующие категориям по классификации «отлично», «хорошо» и «удовлетворительно» помещали для созревания в 4х луночные планшеты в капли среды ЭКО1 "Универсальная" объемом 600 мкл без покрытия маслом и инкубировали в течение 21-24 часов;

4. Этап оплодотворения. Для оплодотворения использовали криоконсервированную сперму быка: соломинку со спермой объемом 0,25 мл оттаивали в течение 30 секунд на водяной бане (37°C) и затем отмывали с использованием двухступенчатого градиента. Метод коллоидного центрифугирования позволяет разделить фракцию жизнеспособных и продуктив-

ных сперматозоидов от неподвижной фракции, тем самым, повышая вероятность оплодотворения [14]. Последовательно аккуратно в пробирку настилали 0,25 мл среды НПП «ПанЭко» «Перселект» 90 %, 0,25 мл «Перселект» 45 % и 0,25 мл спермы, что соответствовало соотношению 1:1:1. Градиент центрифугировали при ускорении 1500 об/мин в течение 20 минут при комнатной температуре [15]. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 2 мл среды ЭКО 1 «Спермопреп» или в ЭКО 1 «Универсальная» и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 минут. Процедуру отмывки повторяли еще раз. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в соответствующем объеме среды ЭКО 1 «Спермопреп» или в ЭКО 1 «Универсальная». Созревшие ооциты помещали в 4х луночные планшеты в капли среды ЭКО 1 «Универсальная» объемом 600 мкл с добавлением спермиев без покрытия маслом и инкубировали в течение 16 -20 часов;

5. Этап культивирования эмбрионов. На стадии 2-х бластомеров эмбрионы помещали в каплю 600 мкл среды ЭКО ПРО "Дробление" без покрытия маслом и на стадии от 4 до 8 бластомеров для последующего культивирования эмбрионы переносили в ЭКО ПРО "Бластная" (600 мкл) без покрытия маслом и инкубировали до стадии готовых к витрификации бластоцист (7-8 день от момента оплодотворения).

Инкубировали при температуре 38,6-38,9 °C, содержании CO₂ от 6,2 % до 6,8 % и неконтролируемой влажности. Использовали инкубатор с системой FPI-сенсора и контролем RD4 (Binder GmbH). По рекомендации производителя в инкубатор устанавливали контейнер с водой из расчета объема инкубатора. Температурный (38,6–38,9 °C) и газовый (CO₂ 6,2–6,8 %) диапазоны были подобраны эмпирическим путем, исходя из рекомендуемых параметров протоколов британского производителя, где указаны диапазоны подачи CO₂ в зависимости от расположения местности над уровнем моря.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Питательные среды и условия культивирования *in vitro* должны обеспечить максимально приближенные параметры к естественным жидкостям, в которых половые клетки и эмбрионы животного находятся *in vivo*. В исследованиях и практике используются различные модельные среды, которые относительно схожи по составу и содержат аминокислоты, соли, глюкозу, а также бычий сывороточный альбумин в качестве макромолекулярного компонента. Основные различия в составе модельных питательных сред касаются концентрации глюкозы, лактата и аминокислот.

В технологии *in vitro* к питательной среде на разных стадиях процесса репродукции (IVP) не редко используют различные добавки, такие как структурные компоненты фолликула, клетки гранулы (фолликулярный слой клеток, окружающий яйцеклетку) и высокодисперсные наночастицы кремнезема, кофеин, глутатион, цистеин, бычий сывороточный альбумин, синтетический заменитель сыворотки (например, PS48 (5-(4-хлорфенил)-3-фенилпент-2-еновая кислота)), что обеспечивает лучшие показатели в формировании и подготовке половых клеток и развития эмбрионов [7].

Помимо основных моделей сред и добавок к ним изучается возможность применения коммерческих сред, разработанных

для эмбрионов человека, в экспериментах по созреванию *in vitro* ооцитов свиней (Sage-HEPES и Life-Global), где в состав входят человеческие сывороточный альбумин и гормоны [8]. Таким образом, не смотря на разнообразные исследования питательных сред универсального состава и единого протокола для культивирования эмбрионов животных *in vitro* не существует. На российском рынке сегодня доступны к приобретению культуральные среды для биоматериала сельскохозяйственных животных (крупный рогатый скот) зарубежных производителей (IVF Bioscience (Великобритания), Minitube (Германия), Vitrogen (Бразилия)), имеющие достаточно высокую цену. Условия поставок, сроки годности культуральных сред и условия реализации всех этапов эмбриональных технологий не синхронизируются между собой и успешное проведение этапов репродуктивной технологии (*in vitro*) возможно только при наличии всех требуемых культуральных сред к моменту запуска процедур, что может быть решено за счет сред отечественного производителя.

В рамках проведения научно-исследовательской работы была решена задача, направленная на организацию технологического процесса получения эмбрионов крупного рогатого скота с использованием культуральных сред, разра-

Таблица 1 – Результаты культивирования эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* до стадии бластоцисты при использовании питательных сред «ПанЭко» (Россия)

Показатели	Количество, шт	Доля (%) по отношению к общему количеству ооцит-кумулясных комплексов	Доля (%) к предыдущей категории
Общее количество ооцит-кумулясных комплексов	138	-	-
Пригодные для культивирования ооцит-кумулясные комплексы (день -1)	65	47,4	-
Жизнеспособные ооциты (день 0)	51	37,5	78,5
Достигли стадии от 2 бластомеров до 4 бластомеров (день 1-2)	23	16,7	45,1
Достигли стадии морулы (день 4-5)	10	7,2	43,5
Достигли стадии бластоцисты (день 6-9)	7	5,1	70,8

ботанных для человека отечественного производителя НПП «ПанЭко» в условиях специального лабораторного и образовательного пространства передовой инженерной школы «Агробитек» НИ ТГУ. Было выполнено 6 сеансов инкубации с общей суммой ооцит-кумулюсных комплексов 138 шт. Популяция фолликулярных ооцитов, аспирированных из яичников, полученных на бойне, явилась весьма неоднородной по морфологическим признакам. У 52,6 % клеток от общего числа ооцит-кумулюсных комплексов были зарегистрированы выраженные признаки дегенерации: отслоение или полное отсутствие кумулюса, деформированное или фрагментированное ядро, неравномерная по толщине прозрачная оболочка и др. (таблица 1).

Ооцит-кумулюсные комплексы (47,4 % клеток от общего числа ооцит-кумулюсных комплексов), удовлетворяющие критериям морфологической оценки были отобраны для этапа созревания и инкубированы в течение 21- 24 часов с использованием среды ЭКО1 "Универсальная". По истечению срока созревания ооцит-кумулюсных комплексов и после морфологической оценки считали жизнеспособными 78,5 % ооцитов по отношению к общему количеству пригодных для культивирования ооцит-

кумулюсных комплексов. Полученные данные сопоставимы с данными, полученными И.Г. Сметаниной и ее коллегами [16]. Жизнеспособные ооциты культивировали совместно со спермой в среде ЭКО 1 «Универсальная» в течение промежутка времени от 16 до 20 часов. После оплодотворения на стадии 2х бластомеров эмбрионы помещали в среду ЭКО ПРО "Дробление" и на стадии от 4 до 8 бластомеров для последующего культивирования эмбрионы переносили в ЭКО ПРО "Бластная", где они находились все дальнейшее время культивирования до стадии бластоцисты. Эмбрионы с 2 или 4 бластомерами, соответствующие по морфологическим характеристикам качественным эмбрионам, составили 16,7 % клеток от общего количества ооцит-кумулюсных комплексов и 45,1 % клеток от общего количества жизнеспособных ооцитов (таблица 1). Из литературных источников известно, что в процессе оплодотворения спермой, капацизированной гепарином, достигается нормальная пенетрация порядка от 50 % до 60 % с частотой партеногенетической активации порядка от 10 % до 15 % и полиспермии порядка от 5 % до 10 % [16]. В наших экспериментах гепарин в среду оплодотворения не добавляли. Спустя промежуток времени от 96 до 120 часов или на 4 –

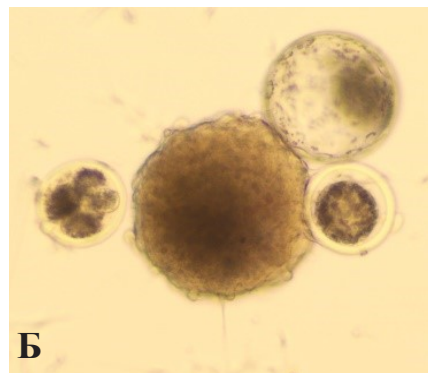
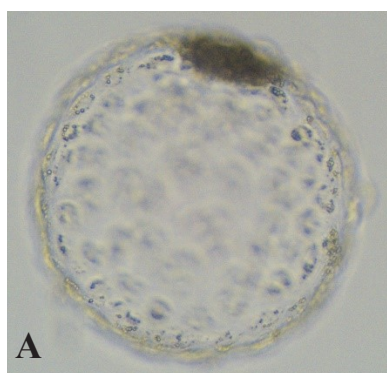


Рисунок 1 – Экспандированная бластоциста (7-8 день с момента оплодотворения):
А – увеличение 400х, Б – увеличение 40х.

5 сутки от момента оплодотворения было получено 7,2 % эмбрионов от общего количества ооцит-кумулюсных комплексов на стадии морулы, соответствующие по морфологическим характеристикам качественным эмбрионам (таблица 1). В тоже время, полученные эмбрионы на стадии морулы по отношению к общему количеству оплодотворенных ооцитов, достигших стадии 2 – 4 бластомеров составили 43,5 % (таблица 1). Эмбрионы, достигшие стадии бластоцисты, соответствующие по морфологическим характеристикам качественным эмбрионам, составили 5,1 % от общего количества ооцит-кумулюсных комплексов и 70,8 % от общего количества эмбрионов, достигших стадии морулы (таблица 1, рисунок 1). В монографии Голубца (2019) представлены данные, где поздние и экспандированные бластоцисты в среде обнаруживаются через 8 суток после оплодотворения, а вышедшие из зоны пеллюцида через 264 часа (11 суток) [12]. Культивируя, полученные *in vitro* зиготы, можно получать до 40 % бластоцист, но не более 50 % [16]. В нашем случае получено 30,4 % эмбрионов на стадии бластоцисты по отношению к общему количеству оплодотворенных ооцитов, достигших стадии 2 – 4 бластомеров.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Используя линейку сред отечественного производителя «ПанЭко» (Россия) для получения эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* в условиях инкубации при температуре 38,6-38,9 °C, содержании CO₂ 6,2-6,8 % и неконтролируемой влажности, на 6-8 сутки, через 140-182 часов от момента оплодотворения было получено 30,4 % эмбрионов на стадии бластоцисты по отношению к общему количеству оплодотворенных ооцитов, достигших стадии 2 – 4 бластомеров.

OBTAINING CATTLE EMBRYOS USING READY-MADE MEDIA OF THE SCIENTIFIC AND PRODUCTION ENTERPRISE "PANECO"

Homenko V.A.¹ – educational master of the Department of Human and Animal Physiology (ORCID 0009-0006-8235-2035); **Bo-**

rodina S.V.¹ – Assistant of the Department of Human and Animal Physiology (ORCID 0009-0009-5022-5244); **Svetlik M.V.**^{1,2} – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Human and Animal Physiology, Associate Professor of the Department of Medical and Biological Cybernetics (ORCID 0000-0003-0990-2580); **Tomova T.A.**^{1,3} – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Human and Animal Physiology, Associate Professor of the Department of Biology (ORCID 0000-0003-2435-2003); **Moshkina M.V.**¹ – Assistant of the Department of Human and Animal Physiology (ORCID 0009-0002-4455-0541).

¹National Research Tomsk State University

²Siberian State Medical University

³Tomsk State Pedagogical University

*eskovata77@mail.ru

Financing: The work was supported by Grant No. 075-15-2022-1152 of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of the federal project "Advanced Engineering Schools" of the state program of the Russian Federation "Scientific and Technological Development of the Russian Federation" (Resolution No. 619 of April 8, 2022).

ABSTRACT

The development and widespread practical application of *in vitro* embryo production technology will make it possible to replenish the herd population in a short time, preserve and replicate valuable genotypes, as well as create new genotypes using the method of genome editing. Livestock breeding is tasked with providing agriculture with a high-value herd in a fairly short time, while farmers are charged with replenishing the herd in a short time, which is possible only with the active introduction of assisted reproductive technologies, such as *in vitro* embryo production (IVP technology). The use of domestically produced cultural media in technology will ensure greater accessibility, reduced eco-

nomic costs and the rapid development of breeding work in Russia. The purpose of the work was to evaluate the effectiveness of the IVP technology when using culture media from the domestic manufacturer SPE "PanEco" (Russia) to obtain cattle embryos in vitro. Our own protocol for obtaining cattle embryos was based on the protocols of culture media manufacturers SPE "PanEco" and IVF Bioscience (UK). Thus, for the first time using the line of media from the domestic manufacturer "PanEco" to obtain cattle embryos in vitro under incubation conditions at temperatures from plus 38.6 °C to plus 38.9 °C, CO₂ content 6.2-6.8 % and uncontrolled humidity, on 6-8 days after a period of time from 140 to 182 hours from the moment of fertilization, 30.4 % of embryos were obtained at the blastocyst stage in relation to the total number of fertilized oocytes that reached the stage of 2 – 4 blastomeres.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Мировые прогнозы рынка мяса до 2030. Где будет расти потребление и производство. Режим доступа: <https://bcs-express.ru/novosti-i-analitika/mirovye-prognozy-rynka-miasa-do-2030-gde-budet-rasti-potreblenie-i-proizvodstvo>.
2. Ferré, L. B. Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods / L. B. Ferré, M. E. Kjelland, L. B. Strøbech et al. // *Animal*. – 2020. – V. 14. – № 5. – P. 991-1004. – DOI 10.1017/S1751731119002775. Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31760966/>
3. Сингина, Г. Н. Результаты получения и трансплантации ИВЕР эмбрионов у овец (Ovisaries) / Г. Н. Сингина, В. А. Луканина, Е. Н. Шедова и др. // *Сельскохозяйственная биология*. – 2023. – Т. 58. – № 6. – С. 1088–1099. – DOI 10.15389/agrobiology.2023.6.1088rus. Режим доступа: <https://agrobiology.ru/6-2023singina.html.html>
4. Souza-Fabjan, J. M. G. vitro production of small ruminant embryos: latest improvements and further research / J. M. G. Souza-Fabjan, R. I. T. P. Batista, L. F. L. Correia et al. // *Reproduction, Fertility and Development*. – 2021. – V. 33. – №2. – P. 31-54. – DOI 10.1071/RD20206. Режим доступа: <https://www.publish.csiro.au/RD/RD20206>
5. Шульгина, В. Д. Применение вспомогательных репродуктивных технологий для сохранения и совершенствования генофонда пород крупного рогатого скота / В. Д. Шульгина, Л. Н. Ротарь, И. К. Шульгин // *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*. – 2024. – № 1 (105). – С. 264–271. – DOI 10.37670/2073-0853-2024-105-1-264-271. Режим доступа: <https://elibrary.ru/item.asp?edn=zpozdw>
6. Gadea, J. Reproductive Technologies in swine / J. Gadea, P. Coy, C. Matás et al. // *Reproductive Technologies in Animals*. – 2020. – P. 67-79. – DOI 10.1016/b978-0-12-817107-3.00005-9. Режим доступа: <https://www.sci-hub.ru/10.1016/b978-0-12-817107-3.00005-9>
7. Кузьмина, Т. И. Роль наночастиц высокодисперсного кремнезема в реализации эффектов гранулезы на компетентность к созреванию и оплодотворению ооцитов *Susscrofadomesticus* / Т. И. Кузьмина, И. В. Чистякова, А. О. Притужалова, Д. Н. Татарская // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2022. – Т. 26. – № 3. – С. 234–239. – DOI 10.18699/VJGB-22-30. Режим доступа: https://sites.icgbio.ru/vogis/download/02_Kuzmina.pdf
8. Сметанина, И. Г. Использование коммерческих сред, разработанных для эмбрионов человека, в экспериментах по созреванию in vitro ооцитов свиней / И. Г. Сметанина, Л. В. Татарина, К. В. Кириенко, С. М. Максименко // *Проблемы биологии продуктивных животных*. – 2018. – № 4 – С. 110–115. – DOI 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2018.3.110-115. Режим доступа: <https://elibrary.ru/yphhtml>
9. Petters, R. M. Culture of pig embryos / R. M. Petters, K. D. Wells // *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. – 1993. – № 48. – P. 61-73. Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8145215/>
10. ПанЭко. Питательные среды и расходные материалы для ЭКО. – Режим доступа: <https://paneco-ltd.ru/catalog/pitatelnye-sredy-i-rashodnye-materialy-dlya-eko>.

11.IVF Bioscience. Bovine media. – Режим доступа: <https://ivfbioscience.com/bovine-media>.

12. Голубец, Л. В. Инновационные технологии в разведении и селекции племенного скота: монография / Л. В. Голубец, А. С. Дешко, И. С. Кысса, Е. К. Стецкевич. – Гродно: Издательство «ГТАУ», 2019. – 430 с. Режим доступа: <https://elib.ggau.by/handle/123456789/1741>

13. Ротарь, Л. Н. Морфологическая характеристика ооцит-кумулусных комплексов *bostaurusi bosindicus* разного направления продуктивности / Л. Н. Ротарь, J. F. Souza // Российская сельскохозяйственная наука. – 2019. – № 3. – С. 64-67. – DOI 10.31857/S2500-26272019364-67. Режим доступа: <https://elibrary.ru/item.asp?id=38194867>

14. Никитин, Г. С. Эффективность различных протоколов коллоидного центрифугирования спермы быков для IVF / Г. С. Никитин, В. В. Ачилов, И. И. Мирзакаева // Нормативно-правовое регулирование в ветеринарии. – 2023. – № 3. – С. 63-66. – DOI 10.52419/issn2782-6252.2023.3.63. Режим доступа: <https://ilvm.elpub.ru/jour/article/view/625/616>

15. Приготовление суспензии сперматозоидов. Режим доступа: <https://paneco-ltd.ru/products/sreda-perselekt-45>

16. Сметанина И. Г. Исследования по разработке культуральных систем для созревания ооцитов крупного рогатого скота в условиях *in vitro*: состояние и перспективы / И. Г. Сметанина, А. С. Кривохарченко // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2017. – № 1. – С. 28–53. Режим доступа: <https://elibrary.ru/yfteo>.

REFERENCES

1. Global forecasts of the meat market until 2030. Where consumption and production will grow. URL: <https://bcs-express.ru/novosti-i-analitika/mirovye-prognozy-rynka-miasa-do-2030-gde-budet-rasti-potreblenie-i-proizvodstvo>

2. Ferré, L. B. Review: Recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology history and methods / L. B. Ferré, M. E. Kjelland, L. B. Strøbech

et al. // *Animal*.2020;14(5):991-1004. – DOI 10.1017/S1751731119002775. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31760966/>

3. Singina, G. N. Results of obtaining and transplanted of IVEP embryos in sheep (Ovisaries) / G. N. Singina, V. A. Lukanina, E. N. Shedova et al. // *Agricultural Biology*.2023;58(6):1088–1099. – DOI 10.15389/agrobiology.2023.6.1088rus. URL: <https://agrobiology.ru/6-2023singina-html.html>

4. Souza-Fabjan, J. M. G. *in vitro* production of small ruminant embryos: latest improvements and further research / J. M. G. Souza-Fabjan, R. I. T. P. Batista, L. F. L. Correia et al. // *Reproduction, Fertility and Development*.2021;33(2):31-54. – DOI 10.1071/RD20206. URL: <https://www.publish.csiro.au/RD/RD20206>

5. Shulgina, V. D. The use of assisted reproductive technologies for the preservation and improvement of the gene pool of cattle breeds / V. D. Shulgina, L. N. Rotar, I. K. Shulgin // *Izvestiya Orenburg State Agrarian University*.2024;1(105):264–271. – DOI 10.37670/2073-0853-2024-105-1-264-271.

URL: <https://elibrary.ru/item.asp?edn=zpozdw>

6. Gadea, J. Reproductive Technologies in swine / J. Gadea, P. Coy, C. Matás et al. // *Reproductive Technologies in Animals*.2020;67-79. – DOI 10.1016/b978-0-12-817107-3.00005-9. URL: <https://www.sci-hub.ru/10.1016/b978-0-12-817107-3.00005-9>

7. Kuzmina, T. I. The role of nanoparticles of highly dispersed silica in the realization of the effects of granulosa on the competence to mature and fertilize *Sus scrofa domestica* oocytes / T. I. Kuzmina, I. V. Chistyakova, A. O. Prituzhalova, D. N. Tatarskaya // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*.2022;26(3):234–239. – DOI 10.18699/VJGB-22-30. URL: https://sites.icgbio.ru/vogis/download/02_Kuzmina.pdf

8. Smetanina, I. G. The use of commercial media developed for human embryos in experiments on *in vitro* maturation of pig oocytes / I. G. Smetanina, L. V. Tatarinova, K. V. Kiriienko, S. M. Maksimenko // *Problems of biology of productive animals*.2018;4:110–115. – DOI 10.25687/1996

- 6733.prodanimbiol.2018.3.110-115. URL: <https://elibrary.ru/yphtml>
9. Petters, R. M. Culture of pig embryos / R. M. Petters, K. D. Wells // Journal of Reproduction and Fertility Supplement. 1993:48:61-73. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8145215/>
10. PanEco. Nutrient media and supplies for ECO. – URL: <https://paneco-ltd.ru/catalog/pitatelnye-sredy-i-rashodnye-materialy-dlya-eko>.
11. IVF Bioscience. Bovine media. – Access mode: <https://ivfbioscience.com/bovine-media>.
12. Golubets, L. V. Innovative technologies in breeding and breeding of breeding cattle: monograph / L. V. Golubets, A. S. Deshko, I. S. Kissa, E. K. Stetskevich. – Grodno: Publishing house "GGAU", 2019:430. URL: <https://elib.ggau.by/handle/123456789/1741>
13. Rotar, L. N. Morphological characteristics of oocyte-cumulus complexes of bostaurus and bosindicus of different productivity directions / L. N. Rotar, J. F. Souza // Russian Agricultural Science. 2019:3:64-67. – DOI 10.31857/S2500-26272019364-67. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=38194867>
14. Nikitin, G. S. The effectiveness of various protocols for colloidal centrifugation of bovine sperm for IVF / G. S. Nikitin, V. V. Achilov, I. I. Mirzakaeva // Regulatory and legal regulation in veterinary medicine. 2023:3:63-66. – DOI 10.52419/issn2782-6252.2023.3.63. URL: <https://ilvm.elpub.ru/jour/article/view/625/616>
15. Preparation of sperm suspension. URL: <https://paneco-ltd.ru/products/sreda-perselekt-45>
16. Smetanina I. G. Research on the development of cultural systems for the maturation of cattle oocytes in vitro: state and prospects / I. G. Smetanina, A. S. Krivokharchenko // Problems of biology of productive animals. 2017:1:28–53. URL: <https://elibrary.ru/yfteod>