



УДК: 636.018:591.16

DOI:10.17238/issn2072-2419.2021.3.192

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ И КРИОКОНСЕРВАЦИИ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА IN VITRO

Г.С. Никитин- доц., к.вет.н. (ФГБОУ ВО СПбГУВМ)

Ключевые слова: трансплантация эмбрионов, высокопродуктивные животные, бластоциста, ооцит, созревание ооцитов, фертилизация, капацитация, культивирование эмбрионов. **Key words:** embryo transplantation, highly productive animals, blastocyst, oocyte, oocyte maturation, fertilization, capacitation, embryo cultivation.



РЕФЕРАТ

В настоящее время трансплантация эмбрионов сельскохозяйственных животных широко применяется в воспроизводстве во многих странах [1]. Однако, из-за не высокой эффективности и низкой приживляемости эмбрионов, в сравнении с искусственным осеменением, она используется преимущественно как дополнительный биотехнологический метод, направленный на более рациональное использование генетически ценных племенных животных и ускорения селекции, особенно в отношении племенного ядра [1–7]. Использование технологии получения эмбрионов крупного скота in vitro (IVP – in vitro produced) позволяет значительно ускорить интенсивность селекции животных и является актуальной темой для изучения [8–10]. Исследования многих ученых направлены на изучение аспектов, связанных с фолликулогенезом, стимуляцией полиовуляции, и факторов, влияющих на эмбрионы и ооциты, позволяющие увеличить эффективность данной процедуры [11–15]. Однако, современные лидеры в репродуктивных технологиях, такие как Agtech, Inc., IETS, Animal Reproduction Laboratory (Colorado State University) и другие, не дают конкретных инструкций и рекомендаций по производству эмбрионов in vitro, а получаемые достижения в этой сфере описываются в основном в научных публикациях.

В статье представлен обзор ключевых этапов современных биотехнологических методов ускоренного воспроизводства высокоценных сельскохозяйственных животных, включая пункцию фолликулов и аспирацию ооцитов (OPU – ovum pic-up), созревание ооцитов в лабораторных условиях (IVM – in vitro maturation), подготовку спермы и оплодотворение ооцитов (IVF – in vitro fertilization), культивирование эмбрионов (IVC – in vitro culture), а также криоконсервацию полученных эмбрионов. Представленный в публикации литературный обзор затрагивает вопросы фолликулогенеза и овогенеза животных, и некоторые принципы нейроэндокринной регуляции эстрального цикла и их взаимосвязь при использовании различных методик получения ооцитов. Публикации различных авторов по данной тематике позволили обобщить используемые методы и представить их в статье в форме сводных таблиц, в которых описаны различия температурных режимов инкубирования, условия транспортировки биоматериала, рассмотрены основные физические параметры внешней среды культивирования ооцитов, их оплодотворения и дальнейшего развития, освещены характеристики и состав различных пита-

тельных сред, описаны методы подготовки спермы для проведения оплодотворения ооцитов, а также обобщены сводные данные по калибровке рабочих растворов при центрифугировании спермы в градиентах плотности, в том числе определены некоторые закономерности криоконсервации эмбрионов различными методами.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-116-50169

ВВЕДЕНИЕ

В виду того, что для производства эмбрионов необходимо получить исходный материал в виде половых гамет, вся технология может быть условно разделена на несколько ключевых этапов. Ооциты, которые используются для последующего оплодотворения могут быть получены из фолликулов яичников коров и телок, как из боенского материала, так и хирургически с использованием трансвагинальной пункции фолликулов и последующей их аспирацией (ovum pick-up, OPU). Таким образом, первым этапом в получении эмбрионов *in vitro* является сбор ооцитов. При этом необходимо иметь ввиду некоторые физиологические особенности их строения и развития половых гамет. Яичники – это парные органы, выполняющие две основные функции: синтез половых гормонов и выработка половых гамет. Также в яичниках выделяют две основные зоны: корковую – в которой происходит фолликулогенез, овогенез, образование желтого тела (CL), а также синтез гормонов, и мозговую – которая выполняет трофическую функцию. Паренхима яичников расположена в корковой зоне и представлена фолликулами с различной степенью их развития. По данным Госдена и Телфера количество фолликулов с ооцитами при рождении телочки составляет около $1 \cdot 10^5$ [16]. В ходе роста и развития фолликулов развиваются и ооциты, которые проходят различные стадии мейоза. Таким образом, ооциты могут быть в различной стадии развития, а фолликулы, в которых они находятся, также могут быть на разных стадиях развития, что в свою очередь, непосредственно влияет на динамику их развития в культуре *in vitro*. Так, принято выделять в развитии фолликулов примордиальные, первичные, вторичные и третичные (антральные или

полостные) фолликулы. Некоторые авторы выделяют две основные фазы развития фолликулов: первая - гормон независимая, в которой развитие фолликулов происходит в ответ на воздействие факторов роста через паракринную регуляцию и во многом зависит от пролиферации клеток гранулезы фолликулярной стенки [17] и вторая – гормон зависимая, в которой происходит окончательное формирование фолликула до предовуляторного состояния и в которой решающую роль играют гонадотропины - фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) и лютеинизирующий гормон (ЛГ) [17,18]. Однако, факторы роста оказывают влияние на развитие фолликула и во вторую фазу, модулируя его рост, также они участвуют в стимуляции пролиферации, дифференцировке и стероидогенезе фолликулярной стенки. Среди таких факторов роста выделяют группы инсулиноподобных факторов роста (IGF), эпидермальные факторы роста (EGF) и трансформирующие факторы роста (TGF). Также фолликулы могут находиться в состоянии атрезии по кистозному или аблiterationационному типу. Ооциты, полученные из антральных фолликулов покрыты клетками фолликулярного эпителия (гранулезы), которые называют лучистым венцом или кумулюсом, поэтому такие ооциты часто называют ооцит кумулюсный комплекс (ОКК). Некоторые авторы выделяют положительную взаимосвязь между размером фолликула и способностью ооцита к оплодотворению и дальнейшему развитию [19]. Таким образом, исследования о структурных и функциональных особенностях фолликулов позволили развить способы производства эмбрионов *in vitro*.

Некоторыми коллективами ученых были получены результаты в области культивирования паренхимы яичников с целью производства ооцитов, в ходе кото-

рых были получены данные об особенностях взаимодействия фолликулов и ооцитов [20–22]. Известно, что мейоз ооцитов у млекопитающих начинается в антенатальный период и останавливается на стадии диплотены профазы I. Остановка мейоза сохраняется во время нахождения ооцита в примордиальном фолликуле и возобновляется одновременно с развитием фолликула. Второе деление мейоза завершается только после овуляции и проникновения сперматозоида в овоплазму. Выделяют взаимосвязь между размером ооцита и способностью проходить мейотическое деление. Так, например, при достижении ооцитом размера в 110 мкм он способен инициировать мейотическое созревание. В ходе его развития значительное влияние оказывают фолликулярная жидкость и клетки фолликулярного эпителия. По составу фолликулярная жидкость схожа с плазмой крови, однако, содержит многочисленные компоненты, влияющие на ооцит. Среди них выделяют альбумины, полипептиды, лизосомальные ферменты, ионы, аскорбиновую кислоту, стероидные гормоны, гонадотропины, ингибины, пролактин, липопroteины, гликозаминогликаны, проренин и факторы роста [23–27]. Также важную роль в развитии ооцита играет его кумулюсная оболочка, так как она находится в постоянном контакте с прозрачной оболочкой ооцита и имеет пальцеобразные отростки, которые врастают в оболочку и осуществляют обмен ионами и другими молекулами, размер которых не превышает 1 кДа. Таким образом, для успешного культивирования эмбрионов крупного рогатого скота в лабораторных условиях необходимо учитывать множество факторов на разных этапах. Основные технологические моменты данной вспомогательной репродуктивной технологии (BPT) будут описаны далее с учетом данных, представленных рядом авторов в научных трудах и в сравнительном аспекте.

Сбор ооцитов. Технология производства эмбрионов *in vitro* включает в себя несколько этапов, первым из которых является получение ооцитов для их по-

следующего дозревания, оплодотворения и культивирования полученных эмбрионов до предимплантационного состояния. Получить для этой цели ооциты возможно из боенского материала, когда отбирают яичники, транспортируют их в лабораторию и получают ооциты путем их резекции или аспирации [28,29]. Возможно использование прижизненной пункции фолликулов через влагалищную стенку под контролем ультразвукового оборудования. Таким образом, до помещения ооцитов в матурирующий раствор, они могут быть подвержены факторам внешней среды. Для предотвращения этих негативных воздействий принято соблюдать некоторые общие принципы и методики, которые описываются рядом авторов [30–39]. При получении ооцитов из боенских яичников обычно используют метод аспирации шприцем или метод резекции яичника лезвием с последующим промыванием и идентификацией ооцитов. В случае прижизненного получения ооцитов используют метод ОРУ, который заключается в использовании пункционной иглы (обычно 18-21G) в сочетании с интравагинальным ультразвуковым датчиком, который позволяет визуализировать яичники и фолликулы для их пункции и аспирации. Игла соединена трубкой к аспирационному насосу и пробиркой. Важное значение играет давление при аспирации, которое должно составлять 90 – 150 мм рт. ст. или расход 20-40 мл/мин [40]. Полученные ооциты должны быть помещены в специальный раствор при определенной температуре. В таблице 1. представлены сводные данные литературных источников, в которых кратко описана методика получения ооцитов, температурный режим, а также компоненты рабочего раствора при аспирации.

Проанализировав обобщенные данные, представленные в таблице, можно отметить, что если яичники получали на бойне, то их транспортировали в лабораторию в течении не более 4-х часов. Транспортировку яичников осуществляли в подогретом физиологическом растворе. Также для транспортировки яичников

используют фосфатно-буферный раствор. В случае использования ОРУ метода животных фиксировали в станке, производили эпидуральную блокаду и аспирировали фолликулярную жидкость, которую доставляли в лабораторию через 5 минут. Температурный режим при транспортировке яйчников варьировал от 29 до 38,8°C. Рабочий раствор, в который помещали ооциты после их аспирации был произведен на основе TCM-199 или DPBS с добавлением 20 МЕ/мл гепарина и других вспомогательных компонентов. Гепарин необходим для предотвращения свертывания крови при попадании в рабочий раствор в ходе аспирации. В последующем, если ооциты промывают растворами для удаления слущенного эпителия, остатков слизи, крови и др. гепарин не используют. В некоторых публикациях ооциты промывали несколько раз матурирующим раствором, который в дальнейшем будет использован для созревания ооцитов в инкубаторе. При этом в состав таких растворов были использованы такие компоненты, как NEPES, поливиниловый спирт, L-глутамин, фосфатный буфер, гонадотропины, факторы роста, а также антибиотические препараты – пенициллин и стрептомицин 100МЕ, или гентамицин 50 мг/мл. Таким образом, основа данных растворов представлена либо 199-й средой, либо раствором Дюльбекко с добавлением гепарина и антибиотика, а для повышения эффективности в рабочий раствор были введены вспомогательные компоненты в виде буферов, питательных веществ, гормонов и факторов роста. Так, Р. Гонзалес и соавт. в своих исследованиях определяет воздействие стресса при добавлении в матурирующий раствор плазмы крови, полученной от свиней обработанных АКТГ и дальнейшее ее влияние как на сами ооциты, так и на развивающиеся потом эмбрионы [41]. При этом яйчники транспортировали в 0,9% растворе хлорида натрия при температуре от 32 °С до 34 °С в течение 3-4 часов после убоя. Аспирацию проводили с использованием TCM-199, модифицированного Nepes с добавлени-

ем гидрокарбоната натрия, L-глутамина, поливинилового спирта, гепарина гентамицина. Затем полученные ооциты трижды промывали в той же среде, но без гепарина, а после отбора их один раз промывали в среде для созревания. Хотя исследования проводили на свиньях и их яйчниках, основные принципы получения ооцитов и среды для дозревания ооцитов очень схожи с методиками для крупного рогатого скота.

Созревание ооцитов. После получения ооцитов их исследуют с использованием стерномикроскопа при увеличении 40х. При этом ключевыми факторами, которые учитываются при определении качества ооцитов – это количество рядов кумулюсных клеток, плотность их расположения, прозрачность, а также цвет и наличие грануляции цитоплазмы ооцита [40]. Оптимальным для использования считается ооцит, который имеет как минимум пять слоев кумулюсных клеток, однако, для оценивания ооцитов используются различные системы оценки от 2-х до 4-х категорий пригодности [30,35,49].

Известно, что в процессе созревания ооцитов они подвержены воздействию гонадотропных гормонов, что послужило основанием для использования гонадотропинов и при матурации (созревании) ооцитов в культуре *in vitro*. Так, в публикации Wei Suocheng [50] были оценены показатели скорости развития ооцитов, уровни апоптоза ооцитов и экспрессия рецепторов фолликулостимулирующего, лютеинизирующего гормона и релизинг факторов. Установлено, что добавление 10 МЕ/мл ФСГ в матурирующую среду является оптимальным и увеличивает скорость созревания ооцитов, экспрессию рецепторов к ФСГ, ЛГ и ГНРГ и экспрессию синтеза рецепторных белков.

Проанализировав данные, представленные в таблице 2, можно отметить, что для созревания ооцитов после их предварительного промывания их помещали в среду для созревания группами от 10 до 150 шт в объеме среды от 50 мкл до 2500 мкл. Среднее количество ооцитов при единовременном культивировании соста-

вило $53,38 \pm 39,29$, в среднем объеме $909,38 \pm 972,32$ мкл. Таким образом, проведя анализ полученных данных, средний объем среды на один ооцит составил $14,71 \pm 9,99$ мкл, а количество ооцитов на 1 мкл составило $0,1 \pm 0,07$.

Следующим немаловажным моментом, который можно выделить – это промывание ооцитов в матурирующем растворе после их переноса из раствора для проведения ОРУ или поиска из боенских яичников. Практически все изученные нами научные работы или публикации указывают, что промывание необходимо проводить один или два раза. Исходя из нашего опыта можно отметить, что при переносе ооцитов из предыдущего раствора в матурирующий, объемом несколько десятков микролитров это может сопровождаться сильным его разбавлением, что значительно повлияет на его состав. Степень разбавления во многом зависит и от объема используемой пипетки.

Стоит отметить, что при непосредственном переносе ооцитов без промывания могут попадать частички фолликулярного эпителия, кумулюса и другие нежелательные частицы. Следовательно однократное или двукратное промывание ооцитов матурирующим раствором является обязательной процедурой и препятствует изменению состава матуриационной среды.

После промывания ооциты покрывали минеральным маслом для снижения оксидационного стресса, однако данный прием указывался не во всех публикациях. Объем используемого масла варьирует от 50 до 600 мкл и зависит как от объема внесенной матурирующей среды, так и от размера чашек Петри. Режим инкубирования мало отличался во всех случаях и, как правило, составлял 24 часа, $38,5-39^\circ\text{C}$ при 5% содержания CO_2 , кроме работ некоторых авторов, таких как До и др. [42], которые дополнительно указывают 19% O_2 и 75% N_2 . Такой режим инкубирования предусматривает использование мультигазовых инкубаторов и направлен на повышение эффективности данной методики.

Состав матурирующей среды очень разнообразен и содержит множество компонентов в обозреваемых методиках. Однако, можно отметить, что практически во всех методах основу его составляет среда 199, содержащая соли Эрла, которые используются в газовой среде с 5% CO_2 (в других методиках при обеспечении матурации в атмосферном воздухе используется 199-я среда с солью Хенкса). Наиболее распространенной является среда 199, модифицированная буфером Нерес. Следующим по распространенности компонентом является фетальная бычья сыворотка в концентрации 5-10%. Также в составе матурирующего раствора можно встретить такие компоненты, как пируват натрия, эстрадиол, гонадотропины, эпидермальный ростовой фактор и другие вспомогательные компоненты. В статье Avery и др., [45] указывается использование в среде для матурации препарата Suigonan, который в своем составе содержит сыворотку жеребых кобыл, богатую фолликулостимулирующим и лютеинизирующим гормонами, а также хорионический гонадотропин человека. Помимо компонентов, обеспечивающих созревание ооцитов, в данную среду вносят противомикробные и противогрибковые компоненты для предотвращения развития микроорганизмов и грибов. Как правило используют Гентамицин в концентрации 50 мг/мл или пенициллин и стрептомицин по 100 МЕ/мл.

Оплодотворение. Существует несколько способов достичь оплодотворения в лабораторных условиях, но одним из ключевых факторов является состояние гамет. В отношении ооцита важно было достичь его созревания в описанных выше условиях, но и сперматозоиды должны обладать оплодотворяющей способностью, которая у них появляется после деблокирования ферментативной активности их акросомы и ряда других метаболических изменений. Среди таких изменений выделяют капацитацию. Как известно, сперматозоиды синтезируются в извитых семенных канальцах и накапливаются в хвосте придатка семенника, где

находятся в состоянии анабиоза и не обладают оплодотворяющей способностью. Их активация происходит только после эякуляции за счет изменения кислотности среды при смешивании с секретом придаточных половых желез. Капацитация происходит уже после попадания эякулята или разбавленной спермы в половые пути самки. Таким образом, ряд авторов выделяет факторы, препятствующие капацитации и стимулирующие ее. Последние, вероятно, связаны со средой в половой системе самки, которая, в свою очередь, находится в динамике, и во многом зависит от стадии эстрального цикла и концентрации половых гормонов. Так, некоторые авторы отмечают негативное влияние высоких концентраций прогестерона при обеспечении капацитации *in vitro* [55–57, 57–59]. Тем не менее, механизмы капацитации изучены недостаточно широко, но уже обобщены некоторые биохимические и ультраструктурные изменения, которые приводят к устранению компонентов, расположенных на базальной мембране сперматозоидов, изменению липидного состава мембраны сперматозоидов, повышению проницаемости ионов Са, интенсивности метаболизма других факторов. Так, было установлено, что холестерин в высокой концентрации содержится в эякуляте и при его добавлении в лабораторных условиях снижается оплодотворяющая способность сперматозоидов. В свою очередь было отмечено, что сперматозоиды способны высвобождать холестерин при прохождении капацитации, а некоторые вещества, такие как бычий сывороточный альбумин и липопротеины высокой плотности, могут стимулировать этот процесс. В норме они содержатся в фолликулярной жидкости и попадают в яйцевод, связываясь с холестерином и стимулируя его высвобождение. Ряд авторов [40][60] выделяют необходимость присутствия кальция, так как он депонируется в акросоме сперматозоидов. Таким образом для подготовки спермы к оплодотворению выделяют следующие способы:

Метод Swim-up (SU) [61]. Одним из используемых средств является модифи-

цированный тирод-лактат (TALP), дополненный альбумином и пируватом. Методика основана на миграционной способности сперматозоидов во время инкубирования в специальной среде, т.е. активная фракция спермы всплывает на поверхность.

Вторым по распространенности методом является центрифугирование спермы в градиентах плотности и осаждение их активной фракции на дне конической центрифужной пробирки. Более подробно о выполнении данной методики будет описано ниже.

Также для отделения активной фракции использовали метод фильтрации спермы в предварительно промытом культуральной средой стекловолнистым фильтре [40].

Другими методами подготовки спермы для оплодотворения являются метод миграционной седиментации, магнитной сепарации, метод микрожидкостных камер и др. [62].

Более подробно эти методы описаны в клинических рекомендациях «Вспомогательные репродуктивные технологии и искусственная инсеминация» и в работах ряда зарубежных авторов [63–65].

В обзорной публикации Андреано Фернандеза [40], а также в рекомендациях компании «Nidacon» отмечено, что наиболее распространенным и воспроизводимым методом подготовки спермы для IVF процедуры является метод центрифугирования в градиентах плотности с использованием в качестве градиента Percoll, который представляет микроскопическую взвесь диоксида кремния, покрытую поливинилпирролидоном. Более подробное рассмотрение данного метода представлено в таблице 3. Данная методика проводится в несколько этапов. Во-первых, при использовании криоконсервированной спермы ее размораживают на водяной бане также, как и при искусственном осеменении с соблюдением температурного режима используемой методики. В дальнейшем в пробирке наслаивают два или три градиента Перколлы, не смешивая их между собой. От-

таянную сперму аккуратно вносят сверху приготовленных растворов и центрифугируют. В ходе центрифугирования активная фракция спермы скапливается на дне пробирки, а растворитель, менее активные и нежизнеспособные сперматозоиды остаются в надосадочной жидкости. В виду некоторой токсичности Перколла и возможности его взаимодействия со сперматозоидами необходимо перенести этот осадок в промывочную среду, ресуспендировать и центрифугировать повторно. Далее опять удаляют часть надосадочной жидкости и смешанный осадок с остатками этой среды исследуют для определения концентрации. При получении нужной концентрации активной спермы ее вносят в среду для IVF для дальнейшего взаимодействия с ооцитами.

Проанализировав данные таблицы, можно выделить следующие закономерности: режим оттаивания спермы практически не отличается от аналогичного при искусственном осеменении, однако, в некоторых публикациях используют несколько меньшую температуру оттаивания, возможно для избегания значительных перепадов температуры при центрифугировании, т.к. центрифугирование проводится при комнатной температуре длительное время. Как правило используют два градиента – 45% и 90%. Режим центрифугирования составляет от 300 до 700 g. Повторное промывочное центрифугирование обычно не продолжительное и с меньшим усилием. Следует отметить, что приготовление рабочих растворов Перколла требует тщательной калибровки с измерением их плотности, а режим центрифугирования будет зависеть от вида пробирок, объема жидкости и наклона пробирок в роторе центрифуги. Таким образом, для воспроизведения данной методики необходимо сделать некоторые поправки с учетом используемого оборудования. Так, например, в инструкции к приготовлению рабочих растворов Перколла от компании «Сигма» предполагается использовать калибровочный график и вычислить плотность и объем разбавителя для приготовления первичного рас-

твора SIP и дальнейшего приготовления растворов с необходимым процентом разбавления. Для калибровки предлагается использовать рефрактометр и определять плотность раствора SIP и конечных растворов [70]. Однако, для определения плотности указанных растворов рефрактометрическим методом необходимо перевести коэффициенты полученных значений преломления в плотность, что сильно усложняет поставленную задачу. В ряде публикаций указан коэффициент преломления различных концентраций Перколла и его пересчет в плотность [71,72], благодаря которым нам удалось выразить степень разбавления, коэффициент преломления и плотность этих растворов в взаимосвязанной таблице (таб. 4).

Культивирование эмбрионов *in vitro*. Культивирование эмбрионов в искусственной среде должно воспроизводить такие же условия внешней для него среды, как и внутри организма в естественных условиях. Таким образом, важное значение в подборе питательных сред и физических факторов играет понимание метаболических изменений самого эмбриона в процессе его развития. Среди некоторых процессов энергетического обмена выделяют процессы окислительного фосфорилирования с участием пирувата и оксалата, активно протекающие совместно с циклом трикарбоновых кислот в первые несколько суток развития зиготы. В дальнейшем после 3-х суток у эмбриона активно развиваются процессы аэробного гликолиза [73]. Аминокислоты наряду с другими веществами играют немаловажную роль в развитии эмбриона. Учеными установлена положительная взаимосвязь между наличием в составе питательных сред глицина, аланина, глутамина и других компонентов [40]. Учитывая высокую чувствительность эмбрионов к различным факторам, особое внимание уделялось качеству используемой в средах воды, осмолярности и ионному составу. Так, при подготовке сред, оценивались различные способы получения дистиллята, такие как многократное дистиллирование, ультрафильтрация и метод обрат-

ного осмоса. К примеру, осмолярность питательных сред должна находиться в пределах от 270 до 300 мОсм; синтетический секрет яйцевода, используемый при культивировании, содержит 4,5 мМ ионов K^+ , а соотношение ионов K/Na составляет 0,32 +/- мМ. Питательные среды должны отвечать необходимым характеристикам, содержать нужные буферные системы и поддерживать концентрацию водородных ионов в пределах pH 7.3 – 7.4. Воздушная среда, как правило, поддерживается газовым инкубатором либо с 5% углекислого газа либо используются более сложные модели, в которых также контролируется концентрация 5% углекислого газа, 5% кислорода и 90% азота. Характеристики технологии культивирования эмбрионов представлены в таблице 5.

Как видно из таблицы 5, при культивировании эмбрионов необходимо придерживаться некоторых общих принципов. Культивирование, как и другие этапы, происходит в чашках Петри в газовом инкубаторе, причем некоторые исследователи выделяют большую эффективность мультигазовых инкубаторов, в которых контролируется не только уровень углекислого газа, но и кислорода с азотом. Также можно отметить, что объем культуральной среды в капле также имеет значение и составляет около 1 мкл среды на 1 культивируемый эмбрион. Аналогично, как и при выполнении других этапов, важно производить промывание эмбриона перед его культивированием от 1 до 4 раз либо в культуральной среде, либо в ее модификации. Температура культивирования, как правило, составляет 38,5 – 39 °С. В динамике развития эмбрион может выделять продукты обмена, а сама культуральная среда взаимодействует с воздушной средой и, несмотря на использование минерального масла, окисляется. В связи с этим, необходимо обновлять эту среду либо переносом эмбрионов в новые чашки Петри, либо заменяя до 50% объема предыдущей среды новой. Состав культуральных сред очень разнообразен и, зачастую, схож со средами для матурирования на основе 199 среды с добавле-

нием дополнительных компонентов в виде фетальной сыворотки, противомикробных и противогрибковых препаратов, питательных компонентов, ростовых факторов. В настоящее время наиболее распространена среда на основе синтетического секрета яйцевода (SOF), которая также может сочетаться с добавлением как фетальной сыворотки так и других вспомогательных компонентов.

Криоконсервация эмбрионов. Для криоконсервации эмбрионов широко используются специальные программируемые замораживающие приборы, такие как Freeze Control® различных модификаций, и другие приборы, обеспечивающие контролируемое снижение температуры замораживаемого объекта в сочетании с криопротекторными средами. Но, в настоящее время, существует и другая технология криоконсервации эмбрионов – витрификация. Эти методы имеют ряд преимуществ и недостатков [49,74,75]. Так, например, контролируемая заморозка требует использования меньших концентраций криопротекторов и таким образом оказывает меньшее токсическое действие на эмбрион, но при этом требуется значительно больше времени для осуществления этой методики и необходим дорогостоящий прибор [31,38]. Витрификация в свою очередь производится очень быстро, при этом нет необходимости использовать программируемый замораживатель, но для осуществления этой методики используются специальные среды, концентрация криопротектора в которых как правило более значительная. В литературе упоминается множество подходов для обеспечения витрификации эмбрионов. Так в публикации Van Hong Do «Сравнение оплодотворяемости крупного рогатого скота при подсадке реципиентам невитрифицированных и витрифицированных эмбрионов» указывается следующая методика: все манипуляции проводят на подогревательном столике при 37 °С. От одной до четырех blastocyst помещали в объем 50 мкл уравнивающего раствора (среда TCM-199 на основе Hepes (TCM-H), содержащая 1% BSA по весу,

7,5% DMSO и 7,5% этиленгликоля) на 3 мин. Затем бластоцисты переносили в 50 мкл витрификационной среды (ТСМ-Н, содержащий 1% мас./Об. BSA, 15% об./об. DMSO и 15% об. этиленгликоля, с добавлением 0,5М сахарозы). В течение 1 мин после переноса в среду для витрификации эмбрионы загружали в устройство Cryotop® (Китазато, Токио, Япония) в минимальном объеме среды примерно 0,1 мкл с использованием стеклянной пипетки. После загрузки эмбрионов устройство Cryotop® погружали непосредственно в жидкий азот.

Таким образом, проанализировав доступные отечественные и зарубежные литературные источники, можно сделать вывод, что производство и криоконсервация эмбрионов животных *in vitro* является очень сложной и многоэтапной процедурой, которая должна обеспечивать все необходимые физические и химические условия для развития как ооцитов, так и эмбрионов. Но, каждый этап этой технологии подчиняется общим биологическим принципам, а основные параметры жидкостных и газовых сред имеют схожую основу, хотя и отличаются в рамках вспомогательных компонентов, направленных на повышение эффективности данной методики. Представленный в публикации обзор не только обобщает некоторые принципы выполнения каждого этапа *in vitro* технологии, но и указывает на актуальные направления для научных исследований, которые позволят в будущем разработать новые репродуктивные технологии и пути решения существующих проблем, связанных с показателями производства и приживляемости IVP эмбрионов.

Modern approaches for obtaining and cryoconservation of cattle embryos *in vitro*. Nikitin G.S. – docent, PhD of Vet. Scie. Federal state budgetary educational institution of higher education «St. Petersburg State University of veterinary medicine».

ABSTRACT

Currently, the transplantation of embryos of farm animals is widely used in reproduc-

tion in many countries. However, due to the low efficiency and low survival rate of embryos, in comparison with artificial insemination, it is used mainly as an additional biotechnological method, aimed at more rational use of genetically valuable breeding animals and accelerating selection, especially in relation to the breeding nucleus. The use of the technology for *in vitro* production of cattle embryos (IVP - *in vitro* produced) makes it possible to significantly accelerate the intensity of animal breeding and is an urgent topic for study. Researches by many scientists are aimed at studying aspects associated with folliculogenesis, stimulation of poliovirus, and factors affecting embryos and oocytes, which can increase the effectiveness of this procedure. However, modern leaders in reproductive technologies, such as Agtech, Inc., IETS, Animal Reproduction Laboratory (Colorado State University) and others, do not give specific instructions and recommendations for the production of embryos *in vitro*, and the achievements in this area are described mainly in scientific publications.

The article provides an overview of the key stages of modern biotechnological methods for accelerated reproduction of high-value farm animals, including follicle puncture and oocyte aspiration (OPU - ovum pick-up), oocyte maturation *in vitro* (IVM - *in vitro* maturation), sperm preparation and oocyte fertilization (IVF - *in vitro* fertilization), embryo cultivation (IVC - *in vitro* culture), as well as cryopreservation of the resulting embryos. The literature review presented in the publication touches upon the issues of folliculogenesis and oogenesis in animals, and some principles of neuroendocrine regulation of the estrous cycle and their relationship, when using various methods of obtaining oocytes. Publications of various authors over this topic made it possible to generalize the methods used and present them in the article at the form of summary tables, which describe the differences in temperature regimes of incubation, the conditions for transporting biomaterial, considered the main physical parameters of the external environment of oocyte cultivation;

their fertilization and further development; highlights the characteristics and the composition of various nutrient media; methods for preparing sperm for oocyte fertilization are described, and summary data on the calibration of working solutions during centrifugation of sperm in density gradients are summarized, including some patterns of cryopreservation of embryos by various methods.

Funding: The reported study was funded by RFBR, project number 20-116-50169.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зиновьева Н.А., Позябин С.В., Чинаров Р.Ю. Вспомогательные репродуктивные технологии: история становления и роль в развитии генетических технологий в скотоводстве. *Сельскохозяйственная биология*, 2020, 55(2): 225–242 (doi: 10.15389/agrobiology.2020.2.225eng).

2. Никиткина Е.В., Пестунович Е.М., Егизарян А.В. Актуальность трансплантации эмбрионов. *Сельскохозяйственные вести*, 2011: 2–3.

3. Никиткина Е.В., Пестунович Е.М., Крутикова А.А., Племяшов К.В. Трансплантация эмбрионов животных: проблемы и пути решения. *Аграрная наука на современном этапе состояние, проблемы, перспективы*, 2018: 131–135.

4. Заертяев Б.П., Никиткина Е.В., Ялуга В.Л. Эффективность биотехнологических методов в воспроизводстве и селекции молочного скота. *Разведение и генетика животных*, 1999, 31–32: 82–83.

5. Хакимов И.Н., Баймишев Х.Б., Салимова О.С., Бададин О.В. Использование метода трансплантации эмбрионов для создания высокопродуктивных стад мясного скота. *Вестник Тюменской государственной сельскохозяйственной академии*, 2008, 2: 19–22.

6. Бригида А.В., Сорокин В.И., Ковальчук С.Н., Пантюх К.С., Рукин И.В., Рожин К.А. Прогнозирование эмбриопродуктивности коров-доноров на основании экографической характеристики яичников. *Сельскохозяйственная биология*, 2018, 53(4): 753–761 (doi: 10.15389/agrobiology.2018.4.753rus).

7. Singina G.N., Sergiev P.V., Lopukhov

A.V., Rubtsova M.P., Taradajnic N.P., Ravin N.V., Shedova E.N., Taradajnic T.E., Polejaeva I.A., Dozev A.V., Brem G., Dontsova O.A., Zinovieva N.A. Production of a Cloned Offspring and CRISPR/Cas9 Genome Editing of Embryonic Fibroblasts in Cattle. *Biochemistry, biophysics, and molecular biology*, 2021, 496(1): 48–51 (doi: 10.1134/S1607672921010099).

8. Wright R.W., Curtis J.L. Cattle Embryo Transfer Procedure. *Journal of Range Management*, 1992, 45(5): 510 (doi: 10.2307/4002916).

9. Kafi M., McGowan M.R. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Animal Reproduction Science*, 1997, 48(2–4): 137–157 (doi: 10.1016/S0378-4320(97)00033-X).

10. Seidel G.E., Seidel S. Training manual for embryo transfer in cattle. *Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University, USA*, 2004.

11. Martens G., Nohner H.P., Leiding C., Schneider F., Becker F., Nuernberg G., Kanitz W. 326 Optimizing frequency of fsh application for superovulatory treatment in cattle. *Reproduction, Fertility and Development, CSIRO Publishing*, 2005, 17(2): 313 (doi: 10.1071/rdv17n2ab326).

12. Naranjo C., Fernando M.P., Felipe C.S., Rodolfo A.A. Concepción Embryo production after superovulation of bovine donors with a reduced number of FSH applications and an increased eCG dose. *Theriogenology*, 2020, 141: 168–172 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.09.018).

13. Mikkola M., Taponen J. Embryo yield in dairy cattle after superovulation with Folltropin or Pluset. *Theriogenology*, 2017, 88: 84–88 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.09.052).

14. Kasimanickam R., Kasimanickam V., Kastelic J. P., Ramsey K. Metabolic biomarkers, body condition, uterine inflammation and response to superovulation in lactating Holstein cows. *Theriogenology*, 2020, 146: 71–79 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.02.006).

15. Sikora M., Król J., Nowak M., Stefaniak T., Aubertsson G., Kozdrowski R. The usefulness of uterine lavage and acute phase

- protein levels as a diagnostic tool for sub-clinical endometritis in Icelandic mares. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2016, 58(1): 50 (doi: 10.1186/s13028-016-0233-4).
16. Gosden R.G., Telfer E. Numbers of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships. *Journal of Zoology*, 1987, 211(1): 169–175 (doi: 10.1111/j.1469-7998.1987.tb07460.x).
17. Monniaux D., Monget P., Besnard N., Huet C., Pisselet C. Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. *Theriogenology*, 1997, 47(1): 3–12 (doi: 10.1016/S0093-691X(96)00334-2).
18. Parrish J.J., Kim C.I., Bae I.H. Current concepts of cell-cycle regulation and its relationship to oocyte maturation, fertilization and embryo development. *Theriogenology*, 1992, 38(2): 277–296 (10.1016/0093-691X(92)90236-K).
19. Pavlok A., Lucas-Hahn A., Niemann H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Molecular Reproduction and Development*, 1992, 31(1): 63–67 (doi: 10.1002/mrd.1080310111).
20. Eppig J.J., Schroeder A.C. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization in vitro. *Biology of Reproduction*, 1989, 41(2): 268–276 (doi: 10.1095/biolreprod41.2.268).
21. Daniel S.A.J., Armstrong D.T., Gore-Langton R.E. Growth and development of rat oocytes in vitro. *Gamete Research*, 1989, 24(1): 109–121 (doi: 10.1002/mrd.1120240113).
22. Nayudu P.L., Osborn S.M. Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1992, 95(2): 349–362 (doi: 10.1530/jrf.0.0950349).
23. Bellin M.E., Ax R.L. Chemical characteristics of follicular glycosaminoglycans. *Advances in experimental medicine and biology*, 1987, 219: 731–735 (doi: 10.1007/978-1-4684-5395-9_51).
24. Concentrations of High Density Lipoproteins Vary Among Follicular Sizes in the Bovine [Electronic resource]. URL: https://www.researchgate.net/publication/19480669_Concentrations_of_High_Density_Lipoproteins_Vary_Among_Follicular_Sizes_in_the_Bovine (accessed: 12.03.2021).
25. Brantmeier S.A., Grummer R.R., Ax R.L. Concentrations of High Density Lipoproteins Vary Among Follicular Sizes in the Bovine. *Journal of Dairy Science*, 1987, 70(10): 2145–2149 (doi: 10.3168/jds.S0022-0302(87)80266-7).
26. Alterations in intrafollicular levels of different molecular mass forms of inhibin during development of follicular- and luteal-phase dominant follicles in heifers | Request PDF [Electronic resource]. URL: https://www.researchgate.net/publication/14415221_Alterations_in_intrafollicular_levels_of_different_molecular_mass_forms_of_inhibin_during_development_of_follicular_and_luteal-phase_dominant_follicles_in_heifers (accessed: 12.03.2021).
27. Andersen M.M. et al. Protein composition in the fluid of individual bovine follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1976, 48(1): 109–118 (doi: 10.1530/jrf.0.0480109).
28. Машталер Д.В., Голубец Л.В., Дешко А.С., Хромов Н.И. Некоторые аспекты трансвагинальной аспирации ооцитов крупного рогатого скота. *Farm News*, 2018: 33–36.
29. Сметанина И.Г., Татарина Л.В. Влияние сыворотки крови на созревание ооцитов и развитие эмбрионов крупного рогатого скота in vitro. *Проблемы биологии продуктивных животных*, 2018: 45–53 (doi: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2018.3.45-53).
30. Ротарь Л.Н., Souza J.F. Морфологическая характеристика ооцит-кумулюсных комплексов *Bos taurus* и *Bos indicus* разного направления продуктивности. *Российская сельскохозяйственная наука*, 2019, 3: 64–67 (doi: 10.31857/s2500-26272019364-67).
31. Denisenko V.Y., Kuzmina T.I. Mobiliza-

- tion of Ca²⁺ from intracellular stores in *Sus scrofa domestica* oocytes after vitrification and thawing, *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*, Academy of Sciences of Ukraine, 2018, 28(2): 120–130 (doi: 10.15407/cryo28.02.120).
- 32.Lojkic M., Getz I., Samardzija M., Matkovic M., Bacic G., Karadjole T., Macesic N., Folnozic I., Spoljaric B. Effect of cysteamine supplementation during in vitro culture of early stage bovine embryos on blastocyst rate and quality. *Acta Veterinaria Brno*, 2012, 81(3): 229–234 (doi: 10.2754/avb201281030229).
- 33.De Ávila A.C.F.C.M., Da Silveira J.C. Role of extracellular vesicles during oocyte maturation and early embryo development. *Reproduction, Fertility and Development*, 2019, 32(2): 56–64 (doi: 10.1071/RD19389).
- 34.Azam A., Shahzad Q., Asma-Ul-Husna Q., Ejaz R., Fouladi-Nashta, Ali A., Khalid M., Ullah N., Akhtar T., Akhter S. Supplementing α -Linolenic acid in the in vitro maturation media improves nuclear maturation rate of oocytes and early embryonic development in the Nili Ravi buffalo. *Animal Reproduction, Colegio Brasileiro de Reproducao Animal*, 2017, 14(4): 1161–1169 (10.21451/1984-3143-AR859).
- 35.Coleman N.V., Shagiakhmetova G.A., Lebedeva I.Y., Kuzmina T.I., Golubev A.K. In vitro maturation and early developmental capacity of bovine oocytes cultured in pure follicular fluid and supplementation with follicular wall. *Theriogenology*, 2007, 67(5): 1053–1059 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.10.019).
- 36.Xia P., Rutledge J., Armstrong D.T. Expression of glycine cleavage system and effect of glycine on in vitro maturation, fertilization and early embryonic development in pigs. *Animal Reproduction Science*, 1995, 38(1–2): 155–165 (doi: 10.1016/0378-4320(94)01345-M).
- 37.Accogli G., Douet C., Ambruosi B., Martino N.A., Uranio M.F., Deleuze S., Dell'Aquila M.E., Desantis S., Goudet G. Differential expression and localization of glycosidic residues in in vitro- and in vivo-matured cumulus-oocyte complexes in equine and porcine species. *Molecular Reproduction and Development*, 2014, 81(12): 1115–1135 (doi: 10.1002/mrd.22432).
- 38.El-Shalofy A.S., Moawad A.R., Darwish G.M., Ismail S.T., Badawy A.B.A., Badr M.R. Effect of different vitrification solutions and cryodevices on viability and subsequent development of buffalo oocytes vitrified at the germinal vesicle (GV) stage. *Cryobiology*, 2017, 74: 86–92 (doi: 10.1016/j.cryobiol.2016.11.010).
- 39.El-Shalofy A.S., Moawad A.R., Darwish G.M., Ismail S.T., Badawy A.B.A., Badr M.R. Effects of highly dispersed silica nanoparticles on the cryoresistance of the bovine cumulus-oocyte complexes. *Cryobiology*, 2018, 85: 176 (doi: 10.1016/j.cryobiol.2018.10.215).
- 40.Fernández A., Díaz T., Muñoz G. Producción in vitro de embriones bovinos. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 2007, 48(1): 51–60.
- 41.González R., Sjunnesson Y.C.B. Effect of blood plasma collected after adrenocorticotrophic hormone administration during the preovulatory period in the sow on oocyte in vitro maturation. *Theriogenology*, 2013, 80(6): 673–683 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.06.017).
- 42.Do V., Catt S., Amaya G., Batsiokis M., Walton S., Taylor-Robinson A.W. Comparison of pregnancy in cattle when non-vitrified and vitrified in vitro-derived embryos are transferred into recipients. *Theriogenology*, 2018, 120: 105–110 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.07.027).
- 43.Goto K., Kajihara Y., Kosaka S., Koba M., Nakanishi Y., Ogawa K. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in-vitro fertilization of in-vitro matured follicular oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1988, 83(2): 753–758 (doi: 10.1530/jrf.0.0830753).
- 44.Xiao X., Zi X.D., Niu H.R., Xiong X.R., Zhong J.C., Li J., Wang L., Wang Y. Effect of addition of FSH, LH and proteasome inhibitor MG132 to in vitro maturation medium on the developmental competence of yak (*Bos grunniens*) oocytes. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2014, 12(1): 1

- 7 (doi: 10.1186/1477-7827-12-30).
45. Avery B., Strøbech L., Jacobsen T., Bøgh I.B., Greve T. In vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes in undiluted follicular fluid: Effect on nuclear maturation, pronucleus formation and embryo development. *Theriogenology*, 2003, 59(3-4): 987-999 (doi: 10.1016/S0093-691X(02)01139-1).
46. Chauhan M.S., Palta P., Das S.K., Katiyar P.K., Madan M.L. Replacement of serum and hormone additives with follicular fluid in the IVM medium: Effects on maturation, fertilization and subsequent development of buffalo oocytes in vitro. *Theriogenology*, 1997, 48(3): 461-469 (doi: 10.1016/S0093-691X(97)00255-0).
47. Nedambale T.L., Dinnyés A., Groen W., Dobrinsky J.R., Tian X.C., Yang X. Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, 2004, 62(3-4): 437-449 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2003.10.020).
48. Yang Y., Kanno C., Sakaguchi K., Katagiri S., Yanagawa Y., Nagano M. Theca cells can support bovine oocyte growth in vitro without the addition of steroid hormones. *Theriogenology*, 2020, 142: 41-47 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.09.037).
49. Яремчук И.М., Шаловило С.Г., Шаран Н.М. Усовершенствование среды для размораживания эмбрионов крупного рогатого скота. Институт биологии животных УААН, г. Львов, Украина, 2003, 1 (2): 170-173.
50. Suocheng W., Zhuandi G., Li S., Haoqin L., Luju L., Yingying D. Maturation rates of oocytes and levels of FSHR, LHR and GnRHR of COCs response to FSH concentrations in IVM media for sheep. *Journal of Applied Biomedicine*, 2017, 15(3): 180-186 (doi: 10.1016/j.jab.2017.01.001).
51. Nedambale T. L., Dinnyés A., Groen W., Dobrinsky J. R., Tian X. C., Yang, X. Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, 2003, 62: 437-449 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2003.10.020).
52. Otoi T., Yamamoto K., Koyama N., Tachikawa S., Suzuki T. Cryopreservation of Mature Bovine Oocytes by Vitrification in Straws. *Cryobiology*, 1998, 37(1): 77-85 (doi: 10.1006/cryo.1998.2103).
53. Enright B.P., Lonergan P., Dinnyes A., Fair T., Ward F.A., Yang X., Boland M.P. Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo: Implications for early embryo development and quality. *Theriogenology*, 2000, 54(5): 659-673 (doi: 10.1016/S0093-691X(00)00381-2).
54. Abdalla H., Shimoda M., Hara H., Morita H., Kuwayama M., Hirabayashi M., Hochi S. Vitrification of ICSI- and IVF-derived bovine blastocysts by minimum volume cooling procedure: Effect of developmental stage and age. *Theriogenology*, 2010, 74(6): 1028-1035 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.04.033).
55. Bruinje T.C., Gobikrushanth M., Colazo M.G., Ambrose D.J. Dynamics of pre- and post-insemination progesterone profiles and insemination outcomes determined by an in-line milk analysis system in primiparous and multiparous Canadian Holstein cows. *Theriogenology*, 2017, 102: 147-153 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.05.024).
56. Bruinje T.C., Ambrose D.J. Technical note: Validation of an automated in-line milk progesterone analysis system to diagnose pregnancy in dairy cattle. *Journal of dairy science*, 2019, 102(4): 3615-3621 (doi: 10.3168/jds.2018-15692).
57. Martins J.P.N., Wang D., M N., Rossi G.F., Martini A.P., Martins V.R., Pursley J.R. Level of circulating concentrations of progesterone during ovulatory follicle development affects timing of pregnancy loss in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(11): 10505-10525 (doi: 10.3168/jds.2018-14410).
58. Nyman S., Gustafsson H., Berglund B. Extent and pattern of pregnancy losses and progesterone levels during gestation in Swedish Red and Swedish Holstein dairy cows. *Acta veterinaria Scandinavica*, 2018, 60(1): 68 (doi: 10.1186/s13028-018-0420-6).
59. Bruinje T.C., Colazo M.G., Ribeiro E.S., Gobikrushanth M., Ambrose D.J. Using in-

- line milk progesterone data to characterize parameters of luteal activity and their association with fertility in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 2019, 102(1): 780–798 (doi: 10.3168/jds.2018-14654).
- 60.Stringfellow D.A., Seidel S.M., Society I. embryo transfer. *Manual of the International Embryo Transfer Society*, 3rd rev. ed. 1998.
- 61.Parrish J.J., Susko-Parrish J.L., Leibfried-Rutledge M.L., Critser E.S., Eyestone W.H., First N.L. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 1986, 25(4): 591–600 (doi: 10.1016/0093-691X(86)90143-3).
- 62.Beydola T., Sharma R., Lee W., Agarwal A. Sperm preparation and selection techniques. In *Male Infertility Practice*, 2013: 244–251.
- 63.Henkel R.R., Schill W.B. Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2003, 1: 1 – 22 (doi: 10.1186/1477-7827-1-108).
- 64.WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen – 5th ed. Moscow: CJSC “Publishing house”, 2010.
- 65.Вспомогательные репродуктивные технологии и искусственная инсеминация. Москва, 2019.
- 66.(PDF) USING PERCOLL AND SWIM-UP METHODS FOR BOVINE IN VITRO FERTILIZATION [Electronic resource]. URL: https://www.researchgate.net/publication/338221625_USING_PERCOLL_AND_SWIM-UP_METHODS_FOR_BOVINE_IN_VITRO_FERTILIZATION (accessed: 25.03.2021).
- 67.Ribrio I.T.P.B., Lucia N.M., Emilie C., Carmen A., Joanna M.G.S.F., Vicente J.F.F., Pascal M. Combination of oviduct fluid and heparin to improve monospermic zygotes production during porcine in vitro fertilization. *Theriogenology*, 2015, 86(2): 495–502.
- 68.Guerreiro B.M., Batista E.O.S., Vieira L.M., Sá Filho M.F., Rodrigues C.A., Castro Netto A., Silveira C.R.A., Bayeux B.M., Dias E.A.R., Monteiro F.M., Accorsi M., Lopes R.N.V.R., Baruselli P. S. Plasma anti-mullerian hormone: An endocrine marker for invitro embryo production from Bos taurus and Bos indicus donors. *Domestic Animal Endocrinology*, 2014, 49(1): 96–104 (doi: 10.1016/j.domaniend.2014.07.002).
- 69.Storage and Stability [Electronic resource]. URL: www.nidacon.com (accessed: 02.06.2021).
- 70.How to make and use gradients of Percoll | Sigma-Aldrich [Electronic resource]. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/cell-separation-media/gradients-of-percoll.html> (accessed: 02.06.2021).
- 71.Seljelid R., Pertoft H. Separation of monocytes by density gradients of Percoll. *Methods for Studying Mononuclear Phagocytes*, 1981: 201–205.
- 72.Hester R.B., Walker W.S. Separation of murine mononuclear phagocytes by density gradients of Percoll // *Methods for Studying Mononuclear Phagocytes*. Elsevier, 1981. P. 195–200 (doi: 10.1016/b978-0-12-044220-1.50028-3).
- 73.Rocha-Frigoni N., Leao B., Feliciano M., Vicente W., Oliveira M. In vitro production of sheep embryos: advances and challenges. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 2014, 38: 103–109.
- 74.Корниенко Е.В., Романова А.Б., Попов Д.В., Маленко Г.П. Витрификация эмбрионов крупного рогатого скота без блестящей оболочки в триацетат целлюлозном полом волокне. *Ветеринария, зоотехния и биология*, 2017, 12: 35–44.
- 75.Машталер Д., Хромов Н. Сравнительная эффективность криоконсервации эмбрионов КРС витрификации и программной полученных методом in vitro. *Генетика и селекция*, 2013, 1: 51–58.