

ВПЛИВ ГОРМОНАЛЬНОЇ СТИМУЛЯЦІЇ НА МОРФОЛОГІЧНІ ТА ЕЛЕКТРИЧНІ ПАРАМЕТРИ ООЦИТІВ МИШИ

Є. І. Смольянінова¹, В. О. Шигимага², А. О. Колеснікова²

¹Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України

²Інститут тваринництва УААН

Досліджено вплив обробки гонадотропними гормонами самок мишей з метою виклику в них суперовуляції, на морфологічні показники та електричні параметри ооцитів. Гормональну стимуляцію здійснювали за трьома схемами: 1) ГСЖК+лХГ; 2) ГСЖК; 3) лХГ. За методом електропорації була визначена питома електрична провідність ооцитів миші, які були отримані в результаті суперовуляції та у природному циклі тварин. Показано, що у загальному пулі ооцитів, які були отримані в результаті суперовуляції за схемами 1 і 2, присутні дві групи ооцитів, які не відрізняються між собою за морфологічними ознаками, але відрізняються за своїми електричними параметрами та стійкістю до електричного пробою. Показано, що застосування гормональної стимуляції призводить до вірогідного збільшення морфологічних порушень ооцитів на відміну від спонтанної овуляції. Проведене дослідження свідчить про найбільш суттєвий вплив на якість ооцитів фолікулостимулюючого гормону. Внаслідок дії ГСЖК до овуляції здатні ооцити, які суттєво різняться за своїм функціональним потенціалом розвитку, що, в свою чергу, віддзеркалюється на їх електричних параметрах.

Ключові слова: ООЦИТ, ООЦИТ-КУМУЛЮСНИЙ КОМПЛЕКС, ЕЛЕКТРОПОРАЦІЯ, ЕЛЕКТРИЧНА ПРОВІДНІСТЬ, СУПЕРОВУЛЯЦІЯ, САХАРОЗА, ЕЛЕКТРИЧНИЙ ПРОБІЙ.

Гормональна стимуляція із використанням гонадотропних гормонів має широке застосування як у інтенсивних біотехнологіях відтворення господарських та лабораторних тварин, так і у клінічній практиці лікування безпліддя людини [1, 2]. Мета такої стимуляції — це отримання додаткової кількості повноцінних ооцитів для подальшого кріоконсервування, запліднення в умовах *in vitro* та трансплантації, експериментальної роботи. Однак відомо, що гормональна стимуляція впливає на характер овуляції та якість отриманих ооцитів, що, в свою чергу, впливає на подальший розвиток ембріонів. Вплив суперовуляції на гормональний статус організму відбивається, перш за все, на співвідношенні прогестерон : естрадіол, що впливає на підтримку вагітності, на життєздатність та нормальний розвиток зародків [3]. Серед факторів, що визначені найбільш вагомими для вибору гормональної обробки з метою виклику суперовуляції, є дози фолікулостимулюючого та лютеїнізуючого гормонів, вік та генетичні особливості виду тварин [1, 4–7]. Однак досить суперечливі дані про виникнення під дією різних доз гонадотропних гормонів генетичних, морфологічних та функціональних порушень ооцитів [8, 9] потребують додаткового дослідження окремих внесків у ці порушення фолікулостимулюючого та лютеїнізуючого гормонів.

Безсумнівно цінність мають проведені на тваринах експерименти, які дають можливість порівняння характеристик ооцитів, що отримані під дією екзогенних гормонів та у природному циклі тварин із розширенням спектра клітинних параметрів та методів оцінки.

Протягом останніх 20 років у біологічній практиці набув широкого застосування метод електропорації. [10, 11]. Відомо, що електричні параметри клітин тісно пов'язані із їх

функціональним станом і віддзеркалюють зміни у метаболізмі клітин як у нормі, так і під впливом зовнішніх чинників [12].

Метою нашої роботи було визначення питомої електричної провідності ооцитів миші, що були отримані в результаті гормонально викликаної суперовуляції за різними схемами у порівнянні з ооцитами, що були отримані у природному циклі тварин.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були ооцити миші на стадії метафази II мейозу (М II), що були отримані від самок лінії СВА віком 6–8 тижнів. Тварини були розподілені на три експериментальні та одну контрольну групи. У тварин контрольної групи (n=8) були взяті вагінальні мазки для визначення стадії естрального циклу. До експерименту були залучені тварини на стадії еструсу, що відповідає спонтанній овуляції. У самок першої експериментальної групи (n=13) викликали суперовуляцію без урахування стадії естрального циклу шляхом внутрішньочеревного введення гонадотропних гормонів: 5 МО гонадотропіну сироватки жеребих кобил (ГСЖК) («Folligon», Нідерланди) та через 48 годин 7,5 МО хоріонічного гонадотропіну людини (лХГ) («Chogulon», Нідерланди). Тваринам другої експериментальної групи (n=8) вводили внутрішньочеревно 5 МО ГСЖК без подальшого введення лХГ та без визначення стадії естрального циклу. Тварин третьої експериментальної групи (n=6) піддавали ін'єкції 7,5 МО лХГ внутрішньочеревно без урахування стадії естрального циклу.

Ооцити отримували за стандартними методами [13]. Самок забивали шляхом дислокації шийних хребців. Самок першої та третьої експериментальних груп забивали через 12–14 годин після введення лХГ, тварин контрольної групи — у день визначення стадії еструсу, тварин другої експериментальної групи — через 48 годин після введення ГСЖК.

Ооцити на стадії М II мейозу (від тварин контрольної, першої та третьої експериментальних груп) отримували шляхом розриву ампули яйцепроводів, що були попередньо відпрепаровані у поживному середовищі Дюльбекко із додаванням 10 % фетальної сироватки теляти (ФСТ, «Sigma»). Для звільнення ооцитів від клітин кумулюсу використовували розчин гіалуронідази (150 од./мл) (Sigma, USA). Виділені ооцити тричі відмивали у фосфатно-буферному середовищі Дюльбекко (ФБС Дюльбекко, «Sigma») з 10 % вмістом ФСТ. Отримані ооцити піддавали прижиттєвій морфологічній оцінці. Враховували стан цитоплазми (прозорість та щільність), наявність першого полярного тільця, стан перивітелінового простору. У експерименті використовували тільки морфологічно повноцінні ооцити.

Ооцити миші у складі ооцит-кумулясних комплексів (ОКК) виділяли шляхом розрізання зовнішніх стінок антральних фолікулів яєчників тварин другої експериментальної групи у фосфатно-буферному середовищі Дюльбекко з 10 % вмістом ФСТ. Для дозрівання *in vitro* відбирали ОКК з багатошаровим компактним кумулюсом і рівномірно гранульованою ооплазмою. ОКК культивували у краплях по 100 мкл середовища Waymouth MB 752/1 з 10 % ФСТ і з додаванням 0,22 мг/мл пірувату натрію («Sigma»), 2,24 мг/мл бікарбонату натрію («Sigma»), 40 мкг/мл гентаміцину під мінеральним маслом. Культивування здійснювали при температурі 37° С, максимальній вологості впродовж 15–17 годин, вміст CO₂ у повітрі становив 5 %. Ефективність дозрівання ооцитів оцінювали методом світлової мікроскопії за такою морфологічною ознакою, як розпушування кумулюса. Потім ооцити відмивали від клітин кумулюса, піддавали морфологічній оцінці та негайно використовували у експерименті.

Експерименти на тваринах виконували згідно з вимогами Європейської конвенції захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментальних, та інших наукових цілей (Страсбург, 1985).

Визначення питомої електричної провідності ооцитів здійснювали за методом електропорації. Експерименти проведені із застосуванням апаратурного комплексу, який був розроблений у лабораторії клітинної та молекулярної біології Інституту тваринництва УААН [14]. Кожний окремих ооцит двічі відмивали у 0,3 М ізотонічному розчині сахарози для видалення слідів сольового розчину. Потім зразки переносили на предметному склі на предметний столик світлового мікроскопа. У краплю сахарози з ооцитом занурювали мікроелектроди, так, щоб ооцит опинився між ними. Послідовно з мікроелектродами до виходу генератора прямокутних імпульсів напруги був підключений калібрований резистор, на якому вимірювали амплітуду та тривалість електричного імпульсу.

Питому електричну провідність об'єкту G , що знаходиться у міжелектродному просторі, визначали згідно з раніше розробленим алгоритмом [14].

Статистичну обробку даних здійснювали із застосуванням програми Microsoft Office Excel за методом Стюдента. При цьому протягом усієї роботи довірчий інтервал обчислювали для вірогідності попадання до нього $P = 0,95$ та $P = 0,99$ [15].

Результати й обговорення

У таблиці 1 представлені результати морфологічної оцінки ооцитів, отриманих за різними схемами обробки гонадотропними гормонами та у природному статевому циклі тварин.

Таблиця 1

Морфологічна якість ооцитів, що були отримані внаслідок гормональної стимуляції тварин за різними схемами

Режим обробки	Кількість тварин	Загальна кількість ооцитів	Кількість ооцитів з полярним тільцем, (%)	Кількість дегенеративних ооцитів, (%)
Спонтанна овуляція	8	34	27 (79,4) ^a	0
ГСЖК + лХГ	13	138	76 (55,0) ^b	6 (4,3) ^d
ГСЖК	8	43	25(58,1) ^c	30 (30,6) ^e
лХГ	6	54	28(51,8) ^b	2 (3,7) ^d

Примітка: a:b — $p < 0,01$, a:c — $p < 0,05$, d:e — $p < 0,001$.

Як видно з отриманих даних, рівень виходу зрілих ооцитів на стадії М II мейозу при спонтанній овуляції був вірогідно вищим, ніж в інших експериментальних групах. У контрольній групі були відсутні ооцити з морфологічними ознаками дегенерації, в той час як у експериментальних групах тварин, яких піддавали гормональній обробці за різними схемами, морфологічні ознаки дегенерації мали місце з різною частотою. Незважаючи на те, що стимуляція тварин тільки ГСЖК або тільки лХГ не приводила до суттєвої різниці за виходом зрілих ооцитів (за наявності полярного тільця), стимуляція ГСЖК викликала більший рівень дегенерації порівняно з лХГ. Так, у другій експериментальній групі рівень дегенерації ооцитів був найвищим і складав 30,6 %, тоді як у третій — 3,7 %. Переважним видом дегенерації серед ооцитів першої та другої експериментальних груп була фрагментація. Слід відмітити, що серед дегенерованих ооцитів першої групи були присутні ооцити, що не мали кумулюса на час виділення їх з яйцепроводів, а до складу дегенерованих ооцитів третьої експериментальної групи входили ооцити з недозрілим на момент овуляції кумулюсом. Таким чином, з одержаних даних видно, що гормональна стимуляція суттєво впливає на морфологічні ознаки ооцитів. Гормональна обробка ГСЖК та лХГ підвищує ризик появи як недозрілих, так і «старіючих» ооцитів, що збігається з результатами роботи [16]. Одночасно відомо, що гормональна стимуляція призводить не тільки до наявних

морфологічних порушень, але й до прихованих, які мають подальші наслідки. Тому з метою оцінки одержаних ооцитів при різних гормональних обробках ми використали метод імпульсної кондуктометрії.

Відомо, що дія електричного імпульсу на клітину призводить до різкого збільшення мембранного потенціалу. Перевищення деякого критичного значення мембранного потенціалу, яке згідно з даними деяких авторів становить величину порядку 1 В, викликає локальні структурні зміни, перш за все, у ліпідному бішарі та призводить до різкого зростання електричної провідності клітинної мембрани [10]. Останнє, в свою чергу, пов'язане з появою у мембрані короточасних дефектів типу наскрізних пір. Доля пори, що утворюється, залежить від умов та експериментальних параметрів (амплітуда та тривалість електричного імпульсу, стан мембрани, склад та іонна сила оточуючого середовища). Якщо радіус пори не перевищує критичного значення, пора зникає через деякий час, тобто має місце оборотний електричний пробій мембрани. Якщо радіус гідрофільної пори перевищує деяке критичне значення, то відбувається необоротний електричний пробій мембрани, що супроводжується руйнуванням та лізисом клітини. Значення критичної напруги пробією може бути важливим параметром, що характеризує структуру мембрани та ступінь її цілісності. У низці робіт показано, що навіть малі коливання у структурі мембрани під впливом зовнішніх чинників відображаються на значенні критичної напруги [12].

На рисунку 1 подані залежності питомої електричної провідності ооцитів миші, які були отримані від гормонально оброблених тварин першої експериментальної групи, від напруженості зовнішнього електричного поля в 0,3 М розчині сахарози.

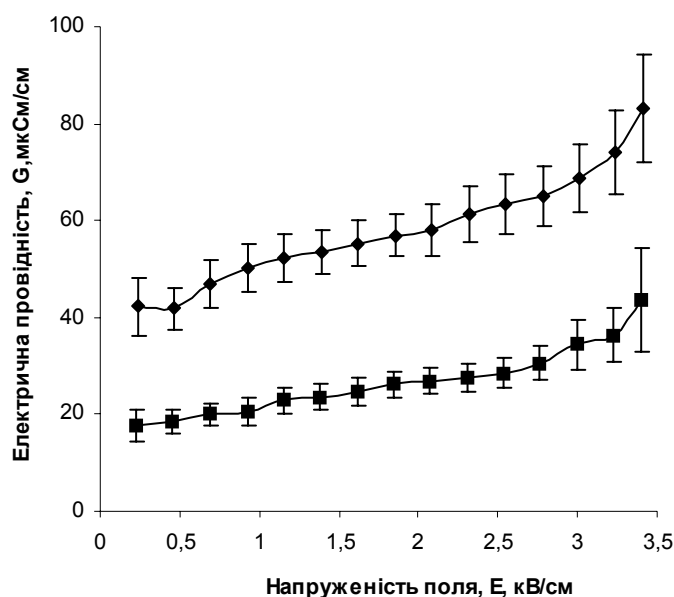


Рис. 1. Залежність питомої електричної провідності ооцитів миші від напруженості зовнішнього електричного поля в 0,3 М розчині сахарози (◆ — група 1; ■ — група 2). Ооцити були отримані в результаті стимуляції ГСЖК+лХГ.

При збільшенні напруги поля 3,5 кВ/см в окремих випадках для ооцитів цієї групи реєстрували різке зростання провідності, що свідчить про незворотній електричний пробій плазматичної мембрани ооцитів. У таких випадках спостерігали лізис клітини (рис. 2).

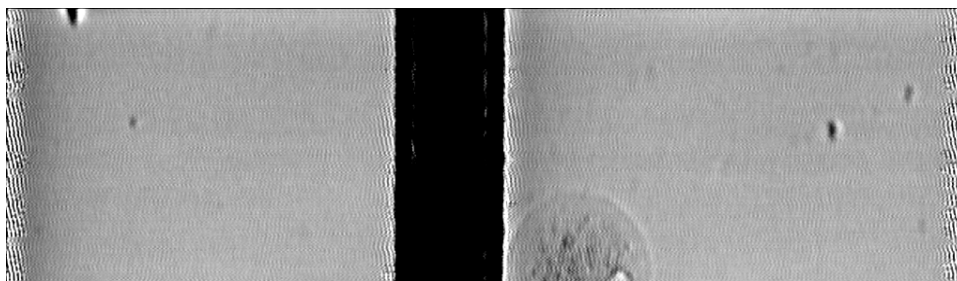


Рис. 2. Лізис ооцитів миші в результаті необоротного електричного пробою.

На рисунку 3 подана залежність питомої електричної провідності від напруженості електричного поля для ооцитів, що були отримані від мишей у природному статевому циклі тварин.

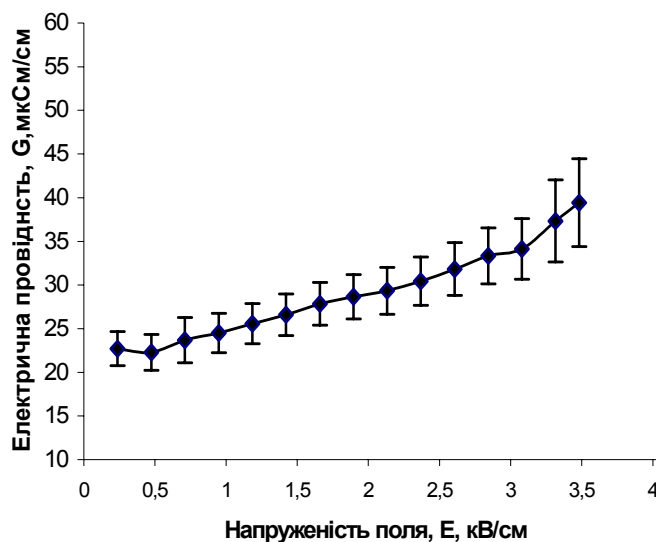


Рис. 3. Залежність питомої електричної провідності ооцитів миші від напруженості електричного поля в 0,3 М розчині сахарози. Ооцити були отримані в результаті спонтанної овуляції.

Як видно з отриманих відомостей, у цьому випадку розподіл ооцитів за електричними показниками на дві групи відсутній. Електричні параметри окремих ооцитів характеризуються близькими значеннями, хоча має місце деякий розкид, що характеризує особисті властивості ооцитів. Значення питомої електричної провідності змінюються у діапазоні $22,8 \pm 1,0 \div 37,7 \pm 2,6$ мкСм/см. Необоротний електричний пробій також не

спостерігався, що свідчить про більш високу стійкість ооцитів, які отримані у природному циклі, до дії електричного імпульсу у порівнянні з ооцитами, що отримані в результаті суперовуляції.

На рисунку 4 представлені залежності питомої провідності ооцитів миші, що були отримані від тварин другої експериментальної групи. Питома електрична провідність ооцитів цієї групи характеризувалася значно більшою дисперсією порівняно з іншими експериментальними групами. Хоча візуального розподілу на дві групи не спостерігалось, була перевірена гіпотеза про нормальний розподіл середніх значень цієї групи за загальноприйнятим критерієм χ^2 . Встановлено, що розраховане значення критерію χ^2 становить 55,4, а це перевищує теоретично очікуване (42,9) при рівні значущості 0,01. Таким чином, з вірогідністю 99 % можна стверджувати, що ця сукупність ооцитів не належить до однієї групи, а її слід поділити принаймні на дві групи клітин, що не відрізняються між собою за морфологічними ознаками, але мають суттєво різні електричні параметри.

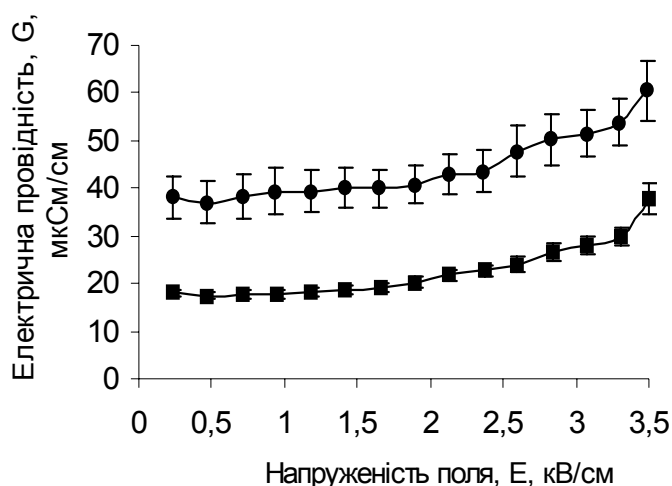


Рис. 4. Залежність питомої електричної провідності ооцитів миші у 0,3 М розчині сахарози від величини напруженості зовнішнього електричного поля (◆ — група 1; ■ — група 2). Ооцити були отримані з антральних фолікулів тварин після стимуляції ГСЖК з подальшим дозріванням до стадії М II мейозу *in vitro*.

Розподілу серед ооцитів, одержаних внаслідок стимуляції тільки ЛХГ (рис. 5), на дві групи за електричними параметрами не спостерігалось, що свідчить про досить однорідний енергетичний стан отриманих клітин. Питома електрична провідність змінювалася у діапазоні $20,63 \pm 1,25 \div 40,01 \pm 3,10$ мкСм/см. Кількісні значення були близькі до значень, що характерні для ооцитів, отриманих у природному циклі тварин. Але в деяких випадках спостерігався лізис ооцитів, що свідчить про знижену стійкість окремих ооцитів до дії електричного імпульсу.

Різницю між електричними параметрами ооцитів різних експериментальних груп можна пояснити, керуючись наступним припущенням. Відомо, що гормональна обробка самок-донорів гонадотропними гормонами з метою виклику у них суперовуляції впливає на якість ооцитів, що овулюють, і, тим самим — на результат біотехнологічної процедури [17]. Препарати з фолікулостимулюючою активністю діють на фолікули подвійно: збільшують мітотичну активність у дрібних фолікулах та захищають від атрезії більш великі [1].

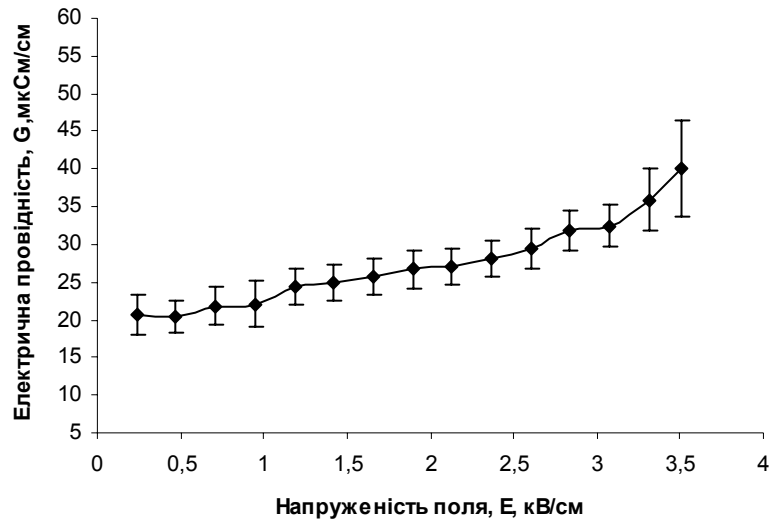


Рис. 5. Залежність питомої електричної провідності ооцитів миші в 0,3 М розчині сахарози від напруженості електричного поля. Ооцити були отримані від тварин, що піддавали стимуляції тільки ЛХГ

Механізм цієї захисної дії полягає в індукції утворення рецепторів до лютеїнізуючого гормону та активації комплексу ферментів, що стимулюють секрецію фолікулом естрадіолу. Однак поряд з підвищенням загальної кількості ооцитів у результаті суперовуляції зростає кількість ооцитів, що дегенерують. Пояснюється це тим, що препарати із фолікулостимулюючою дією несуть у своєму складі домішку лютеїнізуючого гормону, що призводить до передчасної овуляції деяких фолікулів. Спочатку через 20 годин після ін'єкції фолікулостимулюючого гормону овулює перша частина ооцитів, а друга частина овулює у відповідь на введення лютеїнізуючого гормону через 48 годин після введення фолікулостимулюючого гормону. У роботі [18] показано, що гормональна обробка самок миші фолікулостимулюючим гормоном у різних дозах впливає на біохімічний статус яєчників тварин. Суперовуляція призводить до підвищення активності лактатдегідрогенази та кислої фосфатази, а також зниження активності амінотрансферази. Автори вважають, що такі метаболічні зміни у яєчниках тварин можуть індукувати дефіцит біосинтезу ооцитів, що овулюють, що, в свою чергу, є причиною підвищеної загибелі зародків. Ertzeid G. and Storeng R. [19] виявили вірогідне збільшення морфологічних порушень двохклітинних ембріонів, затримку формування скелету та зниження ваги постімплантаційних ембріонів у мишей, що підлягали суперовуляції порівняно з ембріонами, що були отримані внаслідок спонтанної овуляції. Крім того, у результаті виклику у тварин суперовуляції, і, перш за все, під дією ГСЖК, можуть овулювати ооцити різної морфології та з різним потенціалом щодо подальшого розвитку [1, 16]. Проведене дослідження впливу стимуляції тварин гонадотропними гормонами за різними схемами на електричні параметри ооцитів свідчить про суттєвий вплив на якість ооцитів саме фолікулостимулюючого гормону.

Висновки

Обробка самок мишей екзогенними гонадотропними гормонами з метою виклику в них суперовуляції впливає на якість ооцитів, що відбивається на їх морфологічних показниках та електричних параметрах. У результаті гормональної стимуляції тварин овулюють ооцити різної морфології та збільшується відсоток ооцитів, що дегенерують, у порівнянні з ооцитами, отриманими у природному циклі тварин. У загальному пулі ооцитів, які були отримані від гормонально оброблених тварин за схемами: 1) ГСЖК+ЛХГ та 2) ГСЖК

та відібрані за ознаками морфологічної цілісності, присутні дві групи клітин, які не відрізняються між собою за морфологією, але відрізняються суттєво за своїми електричними параметрами. Одержані дані свідчать про наявність прихованих змін у функціональному стані ооцитів, викликаних саме гормональною стимуляцією, що можуть суттєво вплинути на подальший потенціал їх розвитку. Внаслідок дії саме ГСЖК до овуляції здатні ооцити, що суттєво різняться за своїм енергетичним станом, що, в свою чергу, віддзеркалюється в їх електричних параметрах.

Перспективи подальших досліджень. Метод імпульсної кондуктометрії є перспективним методичним підходом для визначення прихованих порушень клітин, що виникають під дією зовнішніх чинників, а також оцінки початкового стану поодиноких клітин, уникаючи порушення їх інтегральної цілісності. Визначення пасивних електричних характеристик клітин дозволяє розширити спектр клітинних параметрів, які відповідають за морфо-функціональний стан клітини. Зіставлення таких досліджень з вивченням функціонального потенціалу ооцитів можуть бути одним з найбільш інформативних засобів при розробці біотехнологічних операцій.

E. I. Smolyaninova, V. A. Shigimaga, A. A. Kolesnikova

THE EFFECT OF HORMONE STIMULATION ON MORPHOLOGICAL AND ELECTRIC PARAMETERS OF MURINE OOCYTES

S u m m a r y

The effect of gonadotrophin administration in mouse females to induce superovulation on morphologic and electric oocyte parameters is investigated. Hormone stimulation was carried out according three schemes: 1) GPSM+hLG; 2) GPSM; 3). Using the method of electroporation the specific electric conductivities of oocytes that were obtained as a result of superovulation and spontaneous ovulation were determined. It is shown that the whole pool of oocytes that were obtained after superovulation under schemes 1 and 2 consists of two groups of oocytes that don't differ each from other morphologically but differ by their electric parameters and resistance to electric breakdown. It is shown that hormonal stimulation in mice leads to morphological injury of oocytes in comparison with oocytes obtained after spontaneous ovulation. This study shows that folliculostimulate hormone affects essentially the quality of oocytes. As a result of administrating with GPSM the oocytes of different developmental functional potential are able to ovulate.

E. И. Смольянинова, В. А. Шигимага, А. А. Колесникова

ВЛИЯНИЕ ГОРМОНАЛЬНОЙ СТИМУЛЯЦИИ НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ООЦИТОВ МЫШИ

А н н о т а ц и я

Исследовано влияние обработки гонадотропными гормонами самок мышей с целью вызова у них суперовуляции на морфологические показатели и электрические параметры ооцитов. Гормональную стимуляцию осуществляли по трем схемам: 1) ГСЖК+чХГ; 2) ГСЖК; 3) чХГ. Методом электропорации была определена удельная электрическая проводимость ооцитов мыши, полученных в результате суперовуляции и в природном цикле животных. Показано, что в общем пуле ооцитов, которые были получены в результате суперовуляции по схемам 1 и 2, присутствуют две группы ооцитов, которые не отличаются между собой

морфологически, но отличаются по своим электрическим параметрам и устойчивостью к электрическому пробую. Показано, что применение гормональной стимуляции суперовуляции приводит к достоверному увеличению морфологических нарушений ооцитов, в отличие от спонтанной овуляции. Проведенное исследование показывает, что наиболее существенное влияние на качество ооцитов оказывает фолликулостимулирующий гормон. Вследствие действия ГСЖК к овуляции способны ооциты, существенно различающиеся по своему функциональному потенциалу развития, что, в свою очередь, отражается на их электрических параметрах.

1. *Амстиславский С. Я.* Создание генетических криобанков и использование методов биологии развития как способ сохранения редких видов животных. III. Перспективы, проблемы и ограничения: селекция, модификации и мутации / Амстиславский С. Я., Кривохарченко А. С., Ротт Н. Н. // Онтогенез. — 1997. — С. 412–420.
2. *Verberg M. F. G.* Mild ovarian stimulation for IVF / Verberg M. F. G., Mcklon N. S., Nardund G. et al. // Hum. reprod. Update–2009. — Vol. 15, N 1. — P. 13–29.
3. *Safro E.* Elevated luteal phase estradiol:progesterone ratio in mice causes implantation failure by creating a uterine environment that suppresses embryonic metabolism / Safro E., O'Neill C., Saunders D. M. // Fertility and Sterility. — Vol. 54, № 6. — P. 1150–1153.
4. *Tarin J. J.* Stage of the estrous cycle at the time of pregnant mare's serum gonadotrp in injection affects preimplantation embryo development in vitro in the mouse / Tarin J. J., Perez-Albala S., Gomez-Piquer V. et al. // Mol. Reprod. Dev. — 2002. — Vol. 62, N 3. — P. 312–319.
5. *Ozgunen K. T.* Effect of gonadotrophin dose on oocyte retrieval in superovulated BALB : C mice / Ozgunen K. T., Erdogan S., Mazmanoglu N. et al. // Theriogenology. — 2001. — Vol. 56, N 3. — P. 435–445.
6. *Ziebe S.* Impact of gonadotrophin dose on pre-embryo recovery and development in superovulated mice / Ziebe S., Guoliang X., Byskov A. G. // Hum. reprod. — 1993. — Vol. 8, N 3. — P. 385–3884.
7. *Ertzeid G.* The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice / Ertzeid G., Storeng R. // Hum. Reprod. — 2001. — Vol. 16, N 2. — P. 221–225.
8. *Коваленко Т. А.* Вплив різних доз гонадотропінів на кількісні морфологічні та цитогенетичні характеристики ооцитів мишей лінії СВА / Коваленко Т. А., Лакіза О. В., Стефанович Г. В., Барияк І. Р. // Цитология и генетика. — 1999. — Т. 33, № 1. — С. 49–53.
9. *Wang Y.* Effect of gonadotrophin stimulation on mouse oocyte quality and subsequent embrionic development in vitro / Wang Y., Osk S. A., Chian R. C. // Reprod.Biomed.Online. — 2006. — Vol. 12, N 3. — P. 304–314
10. *Teisse J.* An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electroporabilization / Teisse J., Rols M. P. // Biophys. J. — 1990. — Vol. 65, N 6. — P. 409–413.
11. *Zimmermann U.* Electric field mediated fusion and related electrical henomena / Zimmermann U. // Biochim. Biophys. Acta. — 1982. — Vol. 694. — P. 227–277.
12. *Чизмаджиев Ю. А.* Электрический пробой бислойных липидных мембран / В кн. Итоги науки и техники. / Чизмаджиев Ю. А., Черномордик Л. В., Пастушенко В. Ф. и др. // Биофизика мембран. — Москва, 1982. — Т. 2. — С. 161–266.
13. Биология развития млекопитающих : Методы / Под ред. М. Манк. — Москва : Мир, 1990. — 406 с.
14. *Шигимага В. А.* Определение проводимости эмбриональных клеток животных / Шигимага В. А. // Проблемы бионики. — 2003. — Вып. 59. — С. 60–64
15. *Атраментова Л. А.* Статистические методы в биологии / Атраментова Л. А., Утевская О. М. — Горловка : Выдавництво лихтар, 2008. — 248 с.

16. *Redina O. E.* Induction of superovulation in DD mice at different stages of the oestrous cycle / Redina O. E., Amstislavsky S. Ya., Maksimovsky // *J. Reprod. Fert.* — 1994. — Vol. 102. — P. 263–267.
17. *Krisher R. L.* The effect of oocyte quality on development / Krisher R. L. // *J. Anim. Sci.* — 2004. — Vol. 82. — (E. Suppl.). — P. E14–E23.
18. *Dhanju C. K.* Biochemical status of ovarian after induction of superovulation on different days of estrus cycle in mice / Dhanju C. K., Sangha G. K., Sekhon P. K. // *Indian J. Exp. Biol.* — 2001. — Vol. 39, N 8. — P. 777–780.
19. *Ertizeid G.* Adverse effects of gonadotrophin treatment on pre- and postimplantation development in mice / Ertizeid G., Storeng R. // *J. Reprod. Fert.* — 1992. — Vol. 96, N 4. — P. 649–655

Рецензент: завідувач сектору інтелектуальної власності та маркетингу інновацій, кандидат біологічних наук, с. н. с. Грабовська О. С.