

УДК: 591.465.12/.31:57.085.43

## ВПЛИВ СТУПЕНЯ ЗРІЛОСТІ НА ЕЛЕКТРИЧНУ ПРОВІДНІСТЬ ООЦИТІВ МИШЕЙ

Є. І. Смольянінова<sup>1</sup>, В. О. Шигимага<sup>2</sup>, А. О. Колеснікова<sup>2</sup>, О. А. Стріха<sup>1</sup>,  
Л. І. Попівненко<sup>1</sup>, Є. О. Гордієнко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, вул. Переяслівська, 23, м. Харків, 61015, Україна

<sup>2</sup>Інститут тваринництва НААН України, вул. 7-ї Гвардійської армії, 3, с.м.т. Кулінічі, 62404, Харківська обл., Україна

*Розвиток допоміжних репродуктивних технологій із відтворення сільськогосподарських і лабораторних тварин як наукових моделей для лікування безпліддя людини тісно пов'язаний з пошуком додаткових клітинних параметрів оцінки якості гамет та методів їх визначення. Відомо, що морфологічна кість ооцитів це один з критеріїв подальшого розвитку, а також здоров'я народжених нащадків.*

*Метою роботи було визначення питомої електричної провідності (ЕП) ооцитів мишей різного ступеня зрілості, які були вилучені з яєчників самок після гормональної стимуляції.*

*ЕП ооцитів визначали за методом електричної кондуктометрії. Оскільки індукований еструс спричиняє овуляцію кількох фолікулів різної стадії дозрівання загальна популяція ооцитів на цьому етапі фолікулогенезу є гетерогенною за ступенем зрілості. При визначенні питомої ЕП окремих ооцитів, вилучених за умов гормональної стимуляції, виявлено суттєве коливання показників ЕП між окремими гаметами і різну стійкість ооцитів до дії електричного імпульсу. Гамети, що склали за ступенем зрілості спільну групу, характеризувалися і більш близькими за значенням показниками ЕП. Для ооцитів із щільним шаром кумулюса ЕП змінюється у діапазоні від 27,4±10,9 до 77,9±29,3 мкСм/см. Показники ЕП ооцитів на стадії метафази 2 є вірогідно нижчими ( $p < 0,05$ ) і змінюються у діапазоні від 13,4±3,74 до 19,4±6,31 мкСм/см. Різниця в електричних параметрах ооцитів відображає розбіжність функціонального стану гамет залежно від ступеня їх зрілості. Висока точність параметрів електричного імпульсу та можливість вимірювання ЕП мікрооб'єктів дозволяють розглядати метод імпульсної кондуктометрії як перспективний експериментальний підхід для експрес-оцінки функціонального стану жіночих гамет, а протокол електропорації використовувати у допоміжних репродуктивних біотехнологіях.*

**Ключові слова:** ООЦИТ, ФОЛІКУЛОГЕНЕЗ, ЕЛЕКТРОПОРАЦІЯ, ЕЛЕКТРОПРОВІДНІСТЬ, ЕЛЕКТРИЧНИЙ ПРОБІЙ

## THE STAGE OF MURINE OOCYTE MATURATION CORRELATES WITH THEIR ELECTRIC CONDUCTIVITY

E. I. Smolyaninova<sup>1</sup>, V. A. Shigimaga<sup>2</sup>, O. A. Strikha<sup>1</sup>, L. I. Popivnenko<sup>1</sup>, E. A. Gordienko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> The Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Science in Ukraine, Pereyaslivska Str., 23, Kharkiv, 61015, Ukraine

<sup>2</sup>The Institute of Animal Breeding, National Academy of Agriculture Science in Ukraine, Gvardeyskoi Armii Str., 3/7, Kulynichi, 62404, Kharkiv Region, Ukraine

*Improvement of assisted reproductive technologies connected with a search of additional criteria and technique for gametes quality estimation and determination. Use of domestic and laboratory animals as scientific models for the females infertility overcoming is good alternative to BioMedicine. Well-known it is*

*that oocytes morphology is important criteria for further embryo development as well as for the future state of health of newborn offspring.*

*The aim of the work is determination of electric conductivity (EC) for murine oocytes at various maturation stages retrieved from females after hormone stimulation.*

*The EC of murine oocytes has been determined by method of electric conductivity measurement (conductometry). It has been shown that oocyte population is heterogeneous by maturation degree due to hormonal oestrus induction causing the ovulation of the follicles at the different stages of growth. At the measurement of common electric conductivity of oocytes harvested from females after hormone induction of oestrus, a substantial amplitude oscillation at the resistance of different oocytes to an electric impulse been revealed.*

*The gametes that classified as similar by maturation stage assessed as those that had the same EC. For oocytes with compact cumulus the measurement lies in the range from  $27.4 \pm 10.9$  to  $77.9 \pm 29.3$   $\mu\text{S}/\text{cm}$ . The EC is significantly lower with probability ( $p < 0.05$ ) for oocytes in metaphase II and varies from  $13.4 \pm 3.74$  to  $19.4 \pm 6.31$   $\mu\text{S}/\text{cm}$ . The oocytes EC reflects gametes' functional prosperity and maturation degree. A high accuracy of electric impulse parameter setting and a capability to measure biological micro objects allow to consider the method of impulse electronic conductometry as a promising experimental approach to express-estimation of female gametes prosperity as well as the electroporation protocol use in assisted reproductive technologies*

**Keywords:** OOCYTE, FOLLICLES, ELECTROPORATION, ELECTRIC CONDUCTIVITY, ELECTRIC BREAKDOWN

## **ВЛИЯНИЕ СТЕПЕНИ ЗРЕЛОСТИ НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ ПРОВОДИМОСТЬ ООЦИТОВ МИШЕЙ**

*Е. И. Смольянинова<sup>1</sup>, В. А. Шигимага<sup>2</sup>, А. А. Колесникова<sup>2</sup>, О. А. Стриха<sup>1</sup>,  
Л. И. Попивненко<sup>1</sup>, Е. А. Гордиенко<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, 61015, Украина

<sup>2</sup>Институт животноводства НААН Украины, ул. 7-й Гвардейской армии, 3, п.г.т. Кулинич, 62404, Харьковская обл., Украина

*Развитие вспомогательных репродуктивных технологий по восстановлению сельскохозяйственных и лабораторных животных и лечения бесплодия у человека тесно связано с поиском дополнительных клеточных параметров для оценки качества гамет и методов их определения. Известно, что качество ооцитов млекопитающих влияет не только на результаты биотехнологических операций, но и на дальнейшее развитие эмбрионов и даже состояние здоровья взрослого организма.*

*Целью данной работы явилось определение удельной электрической проводимости (ЭП) ооцитов мышей, которые были выделены из яичников животных после гормональной стимуляции с использованием фолликулостимулирующего гормона, в зависимости от их стадии зрелости.*

*ЭП определяли методом электрической кондуктометрии. Показано, что общая популяция ооцитов на данном этапе фолликулогенеза является гетерогенной по степени зрелости. При определении удельной ЭП ооцитов, полученных после гормональной стимуляции, выявлены существенная разница значений этого параметра между отдельными гаметами и различная устойчивость ооцитов к действию электрического импульса. Гаметы, которые составляют по стадии зрелости одну группу, характеризуются и более близкими значениями ЭП. Значения этого параметра для ооцитов с плотным слоем кумулюса изменяются в диапазоне от  $27,4 \pm 10,9$  до  $77,9 \pm 29,3$  мкСм/см. У ооцитов на стадии метафазы 2 мейоза значения ЭП достоверно меньше ( $p \leq 0,05$ ) и изменяются в диапазоне от  $13,4 \pm 3,74$  до  $19,4 \pm 6,31$  мкСм/см. Колебание значений электрических параметров ооцитов отражает различия функционального состояния гамет в зависимости от степени их зрелости. Высокая точность параметров электрического импульса и возможность измерения ЭП биологических микробиологических объектов позволяют рассмотреть метод*

*импульсной кондуктометрии как перспективный экспериментальный подход для экспресс-оценки функционального состояния женских гамет, а протокола электропорации использовать во вспомогательных репродуктивных технологиях.*

**Ключевые слова:** ООЦИТ, ФОЛЛИКУЛОГЕНЕЗ, ЭЛЕКТРОПОРАЦИЯ, ЭЛЕКТРОПРОВОДНОСТЬ, ЭЛЕКТРИЧЕСКИЙ ПРОБОЙ

Удосконалення допоміжних репродуктивних технологій з відтворення сільськогосподарських і лабораторних тварин та лікування безпліддя людини тісно пов'язано з дослідженнями, які спрямовані на визначення чинників, що впливають на якість ооцитів ссавців. Наразі відомо, що якість ооцитів безпосередньо впливає на їхню здатність до запліднення та подальший розвиток ембріонів [1–3]. У низці робіт показано, що такі електричні характеристики клітин, як мембранний потенціал і транспортування іонів крізь плазматичні мембрани, є чутливими параметрами, які відображають стан клітин та його зміну під впливом різноманітних ендогенних та екзогенних чинників, зокрема ступінь зрілості ооцитів ссавців [4–7]. У сучасній біотехнології широкого застосування набув метод електропорації [8, 9], який ґрунтується на утворенні в плазматичній мембрані короточасних дефектів за типом наскрізних пор під впливом зовнішнього електричного поля [9]. Традиційно дію електричного імпульсу використовують для навантаження клітин агентами, які в нормі не проникають крізь плазматичні мембрани, а також для трансфекції клітин чужорідною ДНК, злиття клітин тощо [8]. Значення напруженості імпульсного електричного поля (ІЕП), яке спричиняє електричний пробій мембрани, є чутливим критерієм, що безпосередньо пов'язаний зі структурою мембрани та зміною її стану під впливом різних чинників. Електричною характеристикою цього процесу є електропровідність клітини, яка істотно змінюється зі зростанням напруженості [10, 11]. Попередніми дослідженнями було показано, що електрична провідність є чутливим параметром, який дає змогу виявити приховані порушення функціонального стану ооцитів і ембріонів

та дослідити динаміку його зміни упродовж розвитку [12–14].

Метою роботи було визначення питомої електричної провідності ооцитів миші залежно від ступеня їх зрілості, які були вилучені з яєчників тварин після гормональної стимуляції із застосуванням фолікулостимулюючого гормона.

### Матеріали і методи

У самок мишей *F<sub>1</sub>* (*C57BlxС57*) (n=5) викликали гормональну стимуляцію яєчників шляхом внутрішньочеревного введення фолікулостимулюючого гормона: 5 МО гонадотропіну сироватки жеребих кобил (ГСЖК) («Folligon», Нідерланди). Через 48 годин після введення ГСЖК у тварин брали вагінальні мазки для визначення стадії естрального циклу. До експерименту були залучені тварини на стадії еструсу.

Ооцити отримували за стандартними методами [15]. Евтаназію здійснювали дислокацією шийних хребців. Яєчники відпрепаровували у фосфатно-буферному середовищі Дюльбекко із додаванням 10 % фетальної сироватки телят (ФСТ, «Sigma», США). Ооцити у складі ооцит-кумулясних комплексів (ОКК) отримували шляхом проколювання крупних фолікулів під контролем мікроскопа МБІ–9. Ооцити тричі відмивали у середовищі Дюльбекко, оцінювали їхній морфологічний стан, ступінь зрілості та безпосередньо використовували в експерименті.

Експерименти на тваринах виконували відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених I–III Національними конгресами з біоетики (Київ, 2001–2007 рр.) і узгоджених з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних

та інших наукових цілей» (Страсбург, Франція, 1986 р.).

Питому електричної провідності (ЕП) ооцитів визначали методом імпульсної кондуктометрії [11]. Кожний окремих ооцит двічі відмивали у 0,3 М ізотонічному розчині сахарози для видалення залишків сольового розчину. Потім зразки переносили на предметному склі на предметний столик світлового мікроскопа. У краплю сахарози з ооцитом занурювали мікроелектроди з золотої нитки, що були запаєні у скляні капіляри, таким чином, щоб ооцит опинився між ними. На мікроелектроди подавалися поодинокі прямокутні електричні імпульси, амплітуда яких з кожним імпульсом зростала лінійно на визначену величину. Тривалість електричного імпульсу складала 60 мкс. Питому ЕП ооцитів визначали опосередковано — шляхом вимірювання амплітуди напруги на каліброваному

резисторі, який був підключений послідовно з мікроелектродами. Питому ЕП об'єкта G, який знаходився в міжелектродному просторі, визначали згідно з раніше розробленим алгоритмом [10].

Статистичну обробку виконували із застосуванням пакета статистичного параметричного аналізу даних за програмою «Microsoft Office Excel–2010». Аналіз даних проводили за остаточними значеннями ЕП для окремих ооцитів. Дані представляли у вигляді  $M \pm SE$ .

### Результати й обговорення

На рисунку 1 подано фотографічне зображення яєчника миші (а) та мікроскопічне зображення ооцитів, що були виділені із фолікулів (б) через 48 годин після введення тваринам ГСЖК.

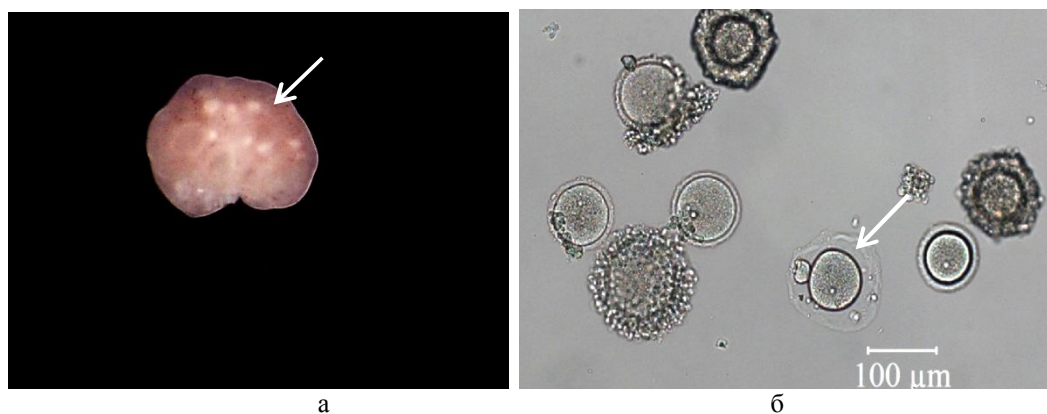


Рис. 1. Фотографічне зображення яєчника миші через 48 годин після гормональної стимуляції ГСЖК. Стрілкою показані жовті тіла (а); мікроскопічне зображення ооцитів миші, отриманих через 48 годин після гормональної стимуляції яєчників тварин. Стрілкою показано ооцит на стадії метафази II мейозу (б)

Як видно з рисунку 1 після гормональної стимуляції самок у структурі яєчника миші присутні як зростаючі фолікули, так і жовті тіла, що свідчить про передчасну овуляцію деяких ооцитів. Популяція гамет на цьому етапі фолікулогенезу є гетерогенною за ступенем зрілості. У загальному пулі є присутніми ооцити з щільним шаром кумулюсних клітин, ооцити, в яких шар кумулюсних

клітин майже відсутній, а також зрілі ооцити на стадії метафази II мейозу.

При визначенні питомої ЕП окремих ооцитів, вилучених після стимуляції ГСЖК, виявлено суттєвий розкид значень цього параметра між окремими гаметами і різну стійкість ооцитів до дії електричного імпульсу (рис. 2), що, на наш погляд, свідчить про різний функціональний стан гамет залежно від ступеня їх зрілості.

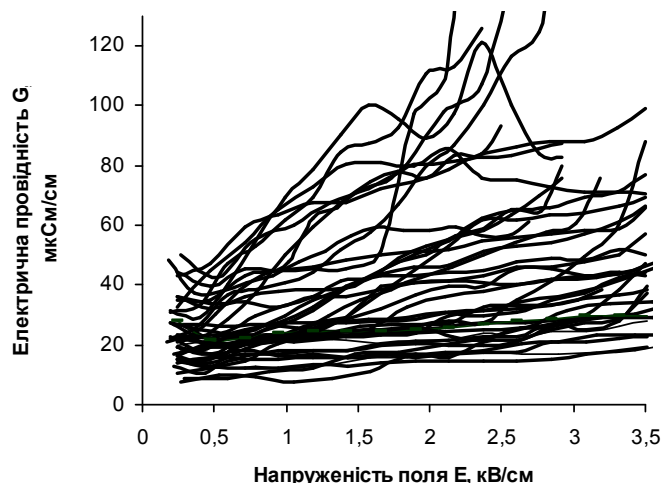
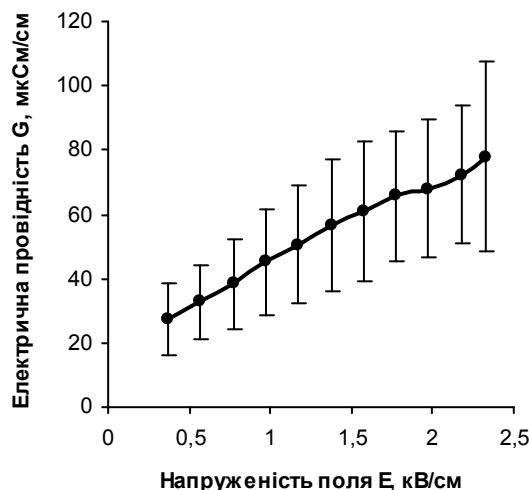
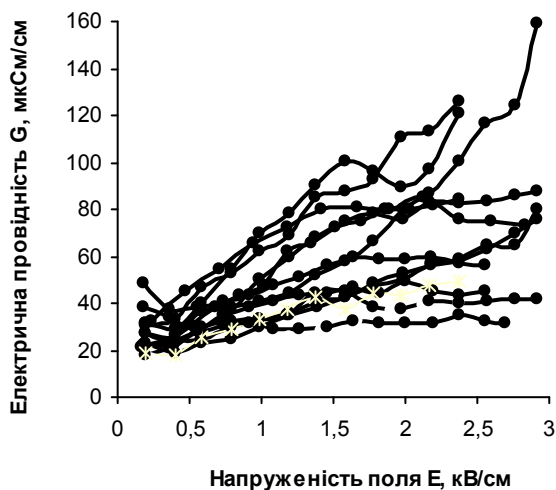


Рис. 2. Залежність питомої електричної провідності окремих ооцитів миші, виділених з яєчників тварин через 48 годин після введення ГСЖК

Аналіз отриманих даних показав, що гамети, які складають за ступенем зрілості одну групу, характеризуються і більш близькими значеннями ЕП. Значення цього параметра для ооцитів із щільним шаром кумулюсу змінюються у діапазоні від

27,4±10,9 до 77,9±29,3 мкСм/см. Залежність ЕП від напруженості електричного поля цієї групи гамет значно зростає із збільшенням амплітуди електричного імпульсу, що подається (рис. 3).



а

б

Рис. 3. Залежність питомої електричної провідності (ЕП) окремих ооцит кумулюсних комплексів від напруженості електричного поля (а), статистично оброблені дані (б)

У випадку ооцитів у стадії метафази 2 значення ЕП є вірогідно нижчими ( $p < 0,05$ ) і змінюються у діапазоні від

13,4±3,74 до 19,4±6,31 мкСм/см. Залежність цього параметра від напруженості електричного поля є більш слабкою (рис. 4).

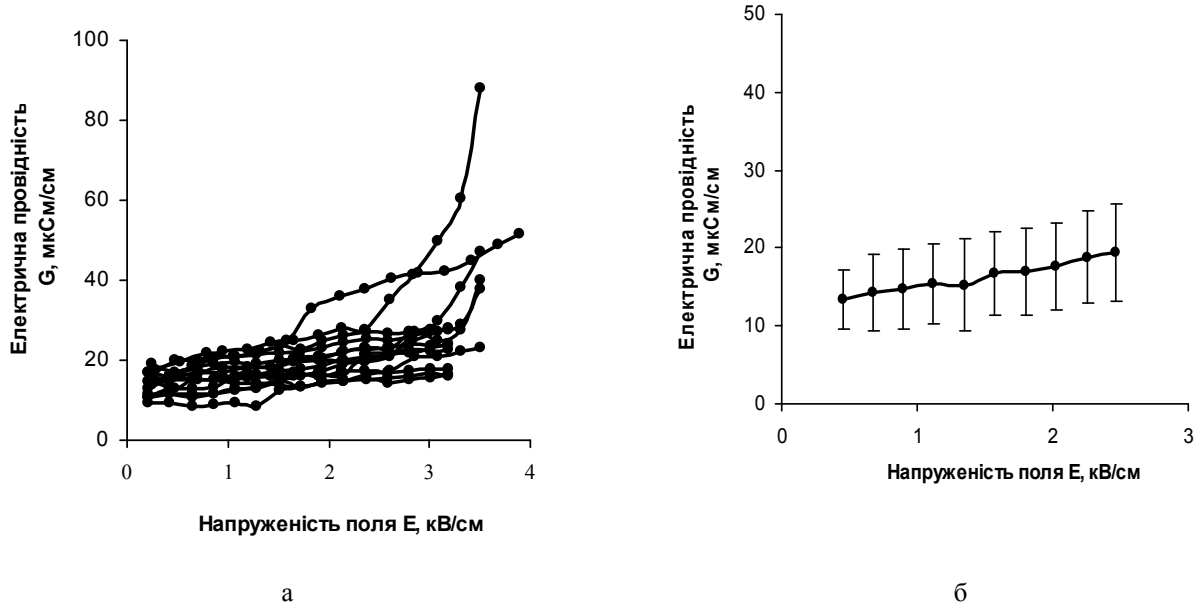


Рис. 4. Залежність питомої електричної провідності (ЕП) окремих ооцитів стадії метафази 2 від напруженості електричного поля (а), статистично оброблені дані (б)

По досягненні напруженості поля близько 2,5 кВ/см в обох групах гамет мав місце незворотний електричний пробій мембран, що відобразалось у різкому зростанні електричної провідності та лізису ооцитів. Початкові значення ЕП недозрілих ооцитів, які морфологічно оцінені як ооцит-кумулюсні комплекси, були більшими, ніж показники дозрілих ооцитів на стадії МІІ. Гіпотетично, це можна пояснити наявністю фолікулярних соматичних клітин, що роблять свій внесок у сукупне значення ЕП недозрілих ооцитів, а більш значний зріст цього параметра від напруженості поля — наявністю щільних міжклітинних контактів кумулюсу з ооцитом.

Попередні чисельні дослідження довели, що упродовж фолікулогенезу електричні параметри ооцитів ссавців змінюються за час їхнього визрівання та суттєво залежать від присутності фолікулярних клітин [5, 7]. Зокрема, є дані про те, що мембранний потенціал ооцитів хом'яка у складі ооцит-кумулюсного комплексу на стадії преантрального фолікула суттєво різниться від мембранного потенціалу ооцитів стадії метафази ІІ мейозу, а значення мембранного потенціалу клітин кумулюсу відрізняється від значень мембранного

потенціалу ооцитів [5]. Також встановлено, що значення мембранного потенціалу ооцитів на стадії преантрального фолікула, вільних від клітин кумулюса та зрілих ооцитів майже не відрізняються. На ооцитах свині [7] було також показано, що мембранний потенціал ооцитів у складі ОКК та мембранний потенціал фолікулярних клітин за абсолютним значенням вище, ніж мембранний потенціал ооцитів на стадії МІІ та денудованих ооцитів. Зокрема, авторами було зроблено припущення, що фолікулярні соматичні клітини через щільні контакти з оолеомою ооцита впливають на іонний склад ооцита, тим самим, підвищуючи його потенціал до свого рівня. Досліджуючи вплив гонадотропних гормонів на мембранний потенціал ооцитів свині *in vitro* та *in vivo*, автори показали, що лютеїнізуючий гормон (ЛГ) призводить до деполяризації мембранного потенціалу ОКК, головним чином впливаючи на фолікулярні клітини. У той самий час фолікулостимулюючий гормон суттєво знижує амплітуду деполяризації, що викликана дією ЛГ. У попередніх дослідженнях методом електропорації було показано, що гормональна стимуляція яєчників мишей

суттєво впливає на морфофункціональний стан ооцитів, що відбивається на значеннях їх електричної провідності [18, 19]. Також було встановлено, що значення цього параметра значно змінюються після запліднення ооцитів, та упродовж розвитку ембріонів на доімплантаційній стадії [20].

Відомо, що гормональна стимуляція тварин гонадотропними гормонами впливає на характер та перебіг фолікулогенезу [2, 16–19]. Поряд з підвищенням загальної кількості ооцитів у результаті суперовуляції є ооцити, які овулюють передчасно. Пояснюється це тим, що препарати із фолікулостимулюючою дією несуть у своєму складі домішку лютеїнезуючого гормону, що призводить до передчасної овуляції деяких фолікулів. Якщо такі «старіючі» ооцити і можуть бути надалі запліднені, то вже на стадії зиготи в таких ембріонах починають розвиватися процеси апоптозу [3, 20].

### Висновки

Гетерогенність популяції ооцитів, одержаних за умов гормональної стимуляції еструсу, знаходить відображення у коливаннях показників їх електричної провідності (ЕП) і є чутливим параметром для дослідження динаміки функціонального стану жіночих гамет, які дозрівають і овулюють під впливом екзогенних гормонів. Показники ЕП суттєво залежать від наявності та/або щільності кумулюсного шару у недозрілих ооцитах, що обумовлює широку амплітуду коливань значень ЕП ооцитів різної морфології. ЕП дозрілих до метафази 2 ооцитів вирогідно нижча, формуючи стійку динаміку характерних залежностей цього фізичного показника від морфологічних особливостей ооцитів.

Висока точність параметрів електричного імпульсу та можливість вимірювання ЕП мікрооб'єктів дозволяють розглядати метод імпульсної кондуктометрії як перспективний експериментальний підхід для експрес-оцінки функціонального стану жіночих

гамет, а протокол електропорації використовувати у допоміжних репродуктивних біотехнологіях.

**Перспективи подальших досліджень.** Планується використовувати електричну провідність в якості клітинного параметра для вивчення впливу різноманітних екзогенних чинників, зокрема кріоконсервування, на структурну цілісність мембран ооцитів та ембріонів ссавців.

Продовження досліджень можуть полягати у порівнянні ЕП фолікулярних і яйцепровідних ооцитів мишей, а також підтвердженні висунутих гіпотетичних припущень, вимірюванням ЕП ооцитів, одержаних від самок у натуральному еструсі. Враховуючи те, що у мишей в натуральному еструсі є можливим вимивання за одну сесію ембріонів від різних хвиль овуляції, подальші дослідження з вимірювання ЕП можуть суттєво доповнити існуючі теоретичні відомості щодо особливостей розвитку жіночих гамет.

1. Madich A. Molecular aspects of critical periods of early embryonic development of animals. *The Animal Biology*, 2005, vol. 7, № 1–2, pp. 22–29 (in Ukrainian).

2. Krisher R. L. The oocyte quality effects to the development. *J. Anim. Sci.*, 2004, vol. 82, E–Suppl, E14–E23.

3. Fissore R. A., Kurokawa M., Knott J., Zhang M., Smyth J. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory aging. *Reproduction*, 2002, vol. 124, pp. 745–754.

4. Day M. L., Johnson M. H., Cook D. I. A cytoplasmic cell cycle controls the activity of K<sup>+</sup> – channel in the pre-implantation mouse embryos. *EMBO J.*, 1998, vol. 17, no. 7, pp. 1952–1960.

5. Emery B. R., Miller R. L. and Carrell D. T. Hamster oocyte membrane potential and ion permeability vary with preantral cumulus cell attachment and developmental stage. *BMC Developmental Biology*, 2001, 1:14. doi: 10.1186/1471–213X–1–14.

6. Okamoto H., Takahashi K., Yamashita N. Ionic currents through the membrane of the mammalian oocyte and their comparison with those in the tunicate and sea urchin. *J. Physiol.*, 1977, vol. 267, no. 2, pp. 465–495.

7. Mattioli M., Barboni B., Bacci M. L., Seren E. Maturation of Pig oocytes: Observation on membrane potential. *Biol. of Rreprod.*, 1990, vol. 43, pp. 318–322.
8. Chehl J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol. Scand.*, 2003, vol. 177, no. 4. pp. 437–447.
9. Chizmadzhev Yu. A., Chernomordik L.V., Pastushenko V.F., Abidor I.G. Electric breakdown of bi-layered lipid membranes. *Totals of Science and Technology. The membrane biophysics*, 1982, vol. 2, pp. 161–266 (in Russian).
10. Shigimaga V. A. Determination of conductivity of embryonic animal cells. *Problems of bionics*, 2003, vol. 59, pp. 60–64 (in Russian).
11. Shigimaga V. A. Impulse conductometer for biological cells and liquid media. *Measurement Techniques. Springer New York*, 2013, vol. 55, no. 11, pp. 1294–1300.
12. Kolesnikova A. A., Shigimaga V. A., Smolyaninova E. I. The influence of stimulation of maturation on electroconductivity and fertilization rate of mouse oocytes. *Fundamental Reseach*, 2013, vol. 4, no. 4, pp. 896–899 (in Russian).
13. Smolyaninova E. I., Shigimaga V. A., Kolesnikova A. A. The effect of hormone stimulation on morphological and electric parameters of murine oocytes. *The Animal Biology*, 2009, vol. 11, no. 1–2, pp. 329–338 (in Ukrainian).
14. Smolyaninova E. I., Strikha O. A., Shigimaga V. A., Kolesnikova A. A. Electric conductivity of murine embryos at preimplantation stages after ovary hormonal stimulation in animals. *Biotechnologia Acta*, 2013, vol. 6, no. 1, pp. 105–112 (in Ukrainian).
15. Mammalian development. A practical approach. Edited by M. Monk, Mir Press, 1990. 406 p. (in Russian).
16. Kovalenko T. A., Lakiza O. V., Stefanovich G. V., Barilyak I. P. Effect of several dozez of gonadotropins on quantitative morphologic and cytogenic characteristics of CBA mouse oocytes. *Tsytology and Genetics*, 1999, vol. 33, no. 1, pp. 49–53 (in Ukrainian).
17. Ertzeid G., Storeng R. The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Hum. Reprod.*, 2001, vol. 16, no. 2, pp. 221–225.
18. Verberg M. F. G., Mcklon N. S., Nardund G., et al. Mild ovarian stimulation for IVF. *Hum. reprod. Update*, 2009, vol. 15, no. 1, pp. 13–29.
19. Wang Y., Osk S. A., Chian R. C. Effect of gonadotrophin stimulation on mouse oocyte quality and subsequent embryonic development in vitro. *Reprod. Biomed. Online*, 2006, vol. 12, no. 3, pp. 304–314.
20. Markstrom E., Svensson E. Ch., Shao R., Svanberg B., Billig H. Survival factors regulating ovarian apoptosis-dependence on follicle differentiation. *Reproduction*, 2002, vol. 123, pp. 23–30.