

СТЕРОИДОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ГРАНУЛЕЗЫ В УСЛОВИЯХ СВЕРХНИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР

Притужалова Анна Олеговна, научный сотрудник лаборатории биологии развития

Кузьмина Татьяна Ивановна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории биологии развития

Ширяев Геннадий Владимирович, старший научный сотрудник биохимической группы
ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста

142132, Московская область, Городской округ Подольск, поселок Дубровицы, дом 60,
(812) 451-76-63, e-mail: aklevakina14@mail.ru.

Ключевые слова: клетки гранулезы, АФК, витрификация, эстрадиол, апоптоз, *Sus Scrofa domestica*.

В репродуктивных технологиях животных гранулезные клетки (КГ) используются для клонирования, моделирования систем дозревания ооцитов, что подразумевает хранение этих клеток в условиях сверхнизких температур. Цель исследования - идентификация особенностей функционирования КГ свиней, подвергшихся воздействию витрификации с учетом показателей стероидогенной активности (продукция эстрадиола, тестостерона), клеточной гибели (апоптоз), генерации активных форм кислорода (АФК). В экспериментах использовали КГ из 52 постмортальных яичников 6-8 месячных самок свиней породы ландрас. КГ предварительно витрифицировали с использованием криопротекторов (ДМСО, ЭГ и трегалоза). Размораживание проводили в растворах с понижающейся концентрацией трегалозы. Нативные и девитрифицированные КГ культивировали в течение 44 и 68 часов и оценивали уровни апоптоза и генерацию АФК (красители PI и DCFH-DA, соответственно). В фолликулярной жидкости и среде после культивирования определяли концентрацию эстрадиола и тестостерона (ИФА). В результате воздействия сверхнизких температур (-196°C) на КГ выявлено резкое сокращение их жизнеспособности до и в процессе культивирования (28% против 45%, $P < 0.05$ на 0 часов), через 44 часа (68% против 35%, $P < 0.01$), с увеличением до 73% через 68 часов культивирования. До и на всех этапах культивирования (44 и 68 часов) зафиксированы достоверные различия в уровне нежизнеспособных клеток между нативными и девитрифицированными клетками. Не обнаружено достоверных различий в содержании тестостерона в исследуемые временные промежутки культивирования. Выявлена достоверная отрицательная корреляция между долей клеток с повышенным уровнем H_2O_2 и концентрацией тестостерона ($r = 0.05$). Обнаружены достоверные различия в уровне продукции эстрадиола нативными и девитрифицированными клетками: на 44 часа (21.38 против 8.28 пг/мл, $r < 0.05$) и 68 часов (27.39 против 11.18 пг/мл, $r < 0.05$). Отмечена высокая обратная корреляция между уровнем клеток с высоким показателем АФК и секрецией ими эстрадиола в культивируемой среде ($P = 0.05$). Полученные данные могут быть использованы при создании эффективных моделей витрификации соматических клеток овариальных фолликулов, в частности, включение в состав культуральных сред реагентов, снижающих уровень генерации АФК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ, Госзадание (Проект № 0445-2021- 0005 и 121052600350-9)

Введение

Клетки гранулезы овариальных фолликулов животных продуцируют значительное количество биологически активных веществ, вовлеченных в механизмы формирования яйцеклеток, что определяет их использование при моделировании состава сред для созревания ооцитов *in vitro* в клеточной и генетической инженерии. Ядра соматических клеток фолликулов применяют в технологии соматического клонирования животных. Наличие в необходимом количестве и в требуемое время соматических и половых клеток животных позволит планомерно проводить эксперименты по получению нативных и реконструированных эмбрионов. Криосохранение биологических объектов заключается в замораживании и отогреве клеток - процессов, которые провоцируют деструктивные изменения в ин-

трацитоплазматических компартментах, сопровождающихся нарушениями их функциональной активности и продукцией активных форм кислорода (АФК) [1]. Известно, что АФК, в умеренных концентрациях, вовлечены в процессы передачи сигналов, контролирующих рост и апоптоз клеток гранулезы. Повышение уровня АФК детерминирует структурные превращения макромолекул, таких как липиды, белки и нуклеиновые кислоты, что приводит к значительному повреждению клеточных структур и вызывает окислительный стресс, который может повлечь за собой снижение функциональной активности клеток или же инициацию апоптоза [2].

Клетки гранулезы являются основным источником эстрадиола (Е2) в организме самок [3]. Эстрадиол стимулирует рост фолликулов, способствует формированию антрума, индуци-

рует овуляцию. В присутствии эстрадиола запускается всплеск концентрации ЛГ, приводящий к овуляции. Кроме того, синтез эстрадиола в фолликулярную жидкость растущего фолликула способствует экспансии кумулюса [4].

В связи вышесказанным цель нашего исследования – идентификация особенностей функционирования клеток гранулезы овариальных фолликулов свиней, подвергшихся воздействию сверхнизких температур, с учетом показателей стероидогенной активности (продукция эстрадиола, тестостерона), деструкции хроматина (апоптоз), генерации активных форм кислорода.

Материалы и методы исследований

В экспериментах использовали клетки гранулезы из 52 постмортальных яичников от 26 голов 6-8 месячных самок свиней породы ландрас после убоя на Мясоперерабатывающем комбинате «Тосненский» (Ленинградская область). Яичники отбирали на стадии фолликулярного роста, без патологических изменений. Фолликулярную жидкость, содержащую клетки гранулезы, аспирировали из антральных фолликулов диаметром 3–6 мм с высоким тургором и обширной сетью капилляров, затем центрифугировали 6 минут при 300 об/мин. Надосадочную фолликулярную жидкость подвергали заморозке при -20°C с последующим ее хранением до иммуно-ферментного анализа (ИФА). Осадок в виде суспензии клеток гранулезы (КГ) дважды промывали в стерильном фосфатно-солевом буфере (PBS) и оценивали жизнеспособность трипановым синим. Для исследования использовали популяцию клеток с долей жизнеспособности не менее 50-60% от общего пула. Культивирование КГ проводили в ТС-199 с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС, Gibco, ThermoScientific, USA), 10 мкг/мл гентамицина при температуре 38.5°C в атмосфере 5 % CO_2 . Концентрация КГ составляла 1×10^6 клеток на мл среды. Часть суспензии КГ обрабатывали тремя растворами криопротекторов (КПА), приготовленными на ТС-199: КПА-1: 0.7 М диметилсульфоксид (ДМСО) + 0.9 М этиленгликоля (ЭГ) в течение 3 минут; КПА-2: 1.4 М ДМСО + 1.8 М ЭГ в течение 3 минут и заключительная обработка КПА-3: 2.8 М ДМСО + 3.6 М ЭГ + 0.65 М трегалозы с экспонированием в течение 5 минут. Заключительную порцию осадка вносили в криопробирки с последующим внесением их в жидкий азот. Перед каждой обработкой КПА КГ центрифугировали при 300 об/мин в течение 60 секунд при комнатной температуре. Оттаивали

образцы в водяной бане (37°C) в течение 120 с, после чего суспензию клеток поэтапно отмывали в трех растворах с различными концентрациями трегалозы, приготовленными на основе ТС-199: в 0.25 М (3 минуты), в 0.19 М (3 минуты), и далее в 0.125 М трегалозе (3 минуты). После каждого этапа клетки центрифугировали при 300 об/мин 60 секунд при комнатной температуре. Контрольные (нативные) и девитрифицированные КГ (концентрация - 10^6 клеток на мл среды) культивировали при 38.5°C в атмосфере 5 % CO_2 в течение 44 и 68 часов в ТС-199 с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки и 10 мкг/мл гентамицина.

Определение доли мертвых клеток проводили после культивирования нативных и девитрифицированных клеток через 44 и 68 часов с помощью флуорохрома пропидия йодид (PI). КГ дважды отмывали в PBS буфере, с осаждением клеток центрифугированием при 1200 об./мин. в течение 7 мин. Клетки анализировали сразу после добавления красителя PI к исследуемым образцам до конечной концентрации 5 мкг/мл. Образцы анализировали на проточном цитометре CytoFLEX (BeckmanCoulter Life Sciences, USA).

Содержание внутриклеточного H_2O_2 в клетках определяли методом проточной цитометрии с применением проточного цитометра CytoFlex (BeckmanCoulter Life Sciences, USA). Для этого клетки гранулезы дважды отмывали PBS (1200 об./мин. 7 мин) и добавляли 2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетат (DCFH-DA), в конечной концентрации 5 мкМ/мл с последующей инкубацией в течение 30 мин ($t = 38.5^{\circ}\text{C}$). Затем клетки дважды отмывали от остатков флуорохрома (1200 об./мин. в течение 7 мин). При анализе флуоресценции на проточном цитофлуориметре выделяли две популяции клеток – с высоким и низким содержанием пероксида водорода [5].

Концентрацию тестостерона и эстрадиола определяли в аспирированной фолликулярной жидкости и средах после культивирования нативных и девитрифицированных клеток после 44 и 68 часов, для чего использовали набор реагентов «СтероидИФА-тестостерон» и «СтероидИФА-эстрадиол» (Алкор-био).

Все использованные в исследовании реагенты, за исключением обозначенных, производства фирмы Sigma-Aldrich. Пластиковая лабораторная посуда фирмы BD Falcon™. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали с помощью критерия χ^2 при трех уровнях значимости: $P < 0.05$, $P < 0.01$,

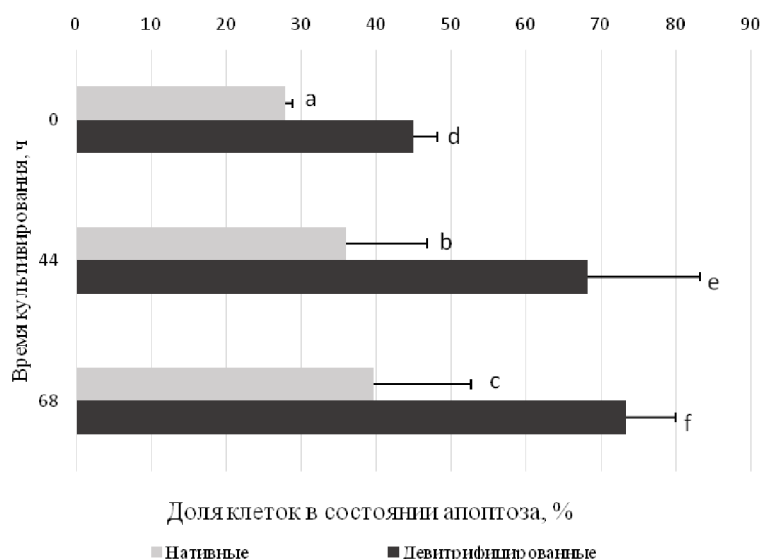


Рис. 1 - Апоптотические процессы в нативных и девитрифицированных клетках гранулезы при пролонгированном культивировании (a:d $P<0.05$; a:e, a:f, b:e, b:f, c:e, c:f, d:e, d:f $P<0.01$). (n клеток – 6460, в 3 повторностях)

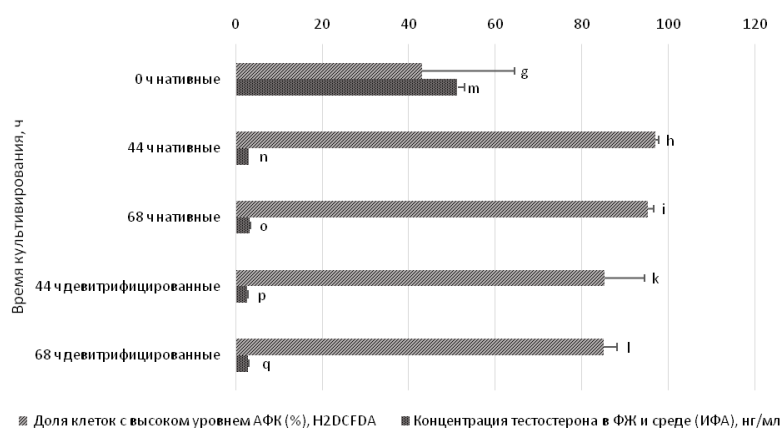


Рис. 2 - Продукция тестостерона клетками гранулезы в нативных и девитрифицированных клетках гранулезы до и после воздействия сверхнизких температур g:h;i;l;g;k;g;l;m;n;o;g:p;q;h;j;h;l;h;m;h;n;h;o;h;p;h;q;i;l;i;m;i;n;i;o;i;p;i;q;k;l;k;m;k;n;k;o;k;p;k;q;l;m;l;n;l;o;l;p;l;q;m;n;m;o;m;p;m;q; $p<0.001$. (Коэф Пирсона g, h, i, k, l : m, n, o, p, q - 0.965, при $P=0.05$)

$P<0.001$, а также коэффициент Пирсона и критерий Стьюдента.

Результаты исследований

В результате воздействия сверхнизких температур (-196°C) на соматические клетки овариальных фолликулов было выявлено резкое сокращение жизнеспособности клеток гранулезы до и в процессе культивирования (Рис. 1).

Доля апоптотических клеток до культивирования в нативной популяции составила 28 % против 45 % в девитрифицированных клетках ($P<0.05$). При этом в процессе культиви-

рования достоверного роста или снижения доли мертвых клеток выявлено не было. Однако в группе девитрифицированных клеток уже через 44 часа культивирования был выявлен значительный рост нежизнеспособных клеток (68% против 35 %, $P<0.01$), с увеличением данного показателя до 73 % уже через 68 часов культивирования. До и на всех этапах культивирования (44 и 68 часов) зафиксированы достоверные различия в уровне нежизнеспособных клеток между нативными и девитрифицированными клетками гранулезы.

Стероидогенез является одной из главных функций клеток гранулезы на стадии роста и созревания ооцита. На ранних этапах фолликулогенеза андрогены стимулируют рост и развитие фолликулов в яичнике, запускают активную пролиферативную активность клеток теки [6].

Нами был проанализирован гормональный статус (продукция тестостерона и эстрадиола) нативных и девитрифицированных клеток гранулезы в процессе культивирования до 44 и 68 часов (рис.2).

В результате анализа после культивирования клеток в течение 44 и 68 часов мы выявили достоверную отрицательную корреляцию между долей клеток с повышенным уровнем H_2O_2 и концентрацией тестостерона ($p=0.05$), что свидетельствует о подавлении стероидогенной активности в условиях оксидативного стресса. Не обнаружено достоверных различий в содержании тестостерона в исследуемые временные промежутки культивирования. В то же время выявлены

достоверные различия в уровне продуцирования эстрадиола клетками гранулезы в условиях оксидативного стресса при пролонгированном культивировании (рис. 3).

Так, наблюдаются достоверные различия в концентрации эстрадиола в среде с нативными и девитрифицированными клетками как на 44 часа (21.38 против 8.28 пг/мл, $p<0.05$), так и при последующем культивировании до 68 часов (27.39 против 11.18 пг/мл, $p<0.05$). При этом отмечена высокая обратная корреляция между уровнем клеток с высоким показателем АФК и

концентрацией эстрадиола в культивируемой среде ($P=0.05$).

Обсуждение

Полученные множественные данные свидетельствуют о тесном взаимодействии между фолликулярными соматическими клетками (клетками теки, гранулезы, кумюлюса) и ооцитами при формировании яйцеклетки *in vivo* и *in vitro* [7]. Морфофункциональная оценка кумюлюсных и гранулезных клеток – эффективный биомаркер качества развивающейся в фолликуле гаметы [8]. Активная пролиферация этих клеток в процессе фолликулогенеза определяет интенсивность выработки эстрадиола, который вызывает овуляторный всплеск уровня гонадотропинов, модулирующего индукцию овуляции яйцеклетки [9, 10]. Кокультивирование клеток гранулезы с ооцит-кумуляными комплексами *in vitro* дает возможность создания системы созревания ооцитов, адекватно отражающей условия *in vivo*. В наших исследованиях обнаружены достоверные различия в продукции стероидов клетками гранулезы разных экспериментальных групп. Показано резкое снижение жизнеспособности гранулезных клеток (увеличение уровня апоптозных клеток), спровоцированное воздействием сверхнизких температур.

Известно, что АФК образуются в результате утечки электронов с внутренней митохондриальной мембраны во время окислительного фосфорилирования [11]. Mabel M. et al. было показано, что искусственное повышение H_2O_2 вызывает токсические эффекты в культивируемых клетках опухолевой линии клеток гранулезы человека на синтез эстрадиола в присутствии андростендиона и ФСГ [12]. В наших исследованиях была выявлена высокая обратная корреляция между долей клеток с высокой генерацией АФК и концентрацией эстрадиола. При этом, повышение АФК отмечено в большей степени в группе нативных клеток, что, возможно, вызвано их высокой пролиферативной активностью в процессе культивирования в отличие от клеток, подвергшихся витрификации. Воздействие сверхнизких температур провоцирует нарушения в поддержании клеточного гомеостаза, индуцирует апоптотические процессы, особенно в момент размораживания клеток, когда существует высокая вероятность рекристаллизации льда, с образованием их новых точек роста, способных привести к разрушениям клеточных органелл

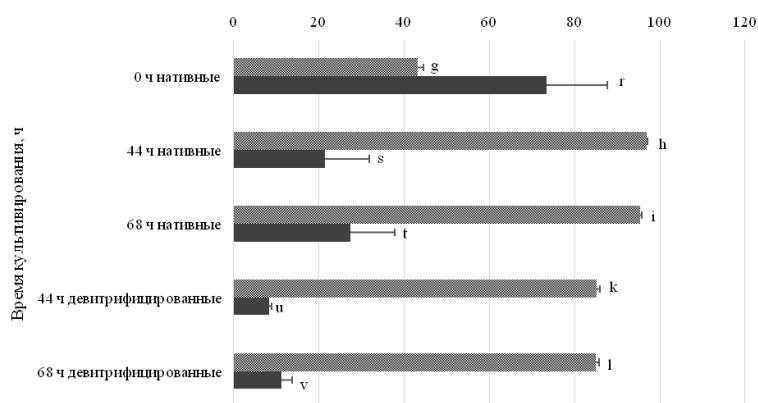


Рис. 3 - Продуцирование эстрадиола клетками гранулезы в условиях окислительного стресса. $p<0.05$: g, r; $p<0.01$: g, h; $p<0.001$: (Коэф Пирсона $g, h, i, k, l : r, s, t, u, v - 0.895$, при $P=0.05$)

[13]. Известно, что при криоконсервации в клетке в ответ на стресс инициируются механизмы апоптоз- или некроз- специфических сигналов. Связывание ядерных рецепторов с агонистами при оттаивании, гипоксии и повышении внутриклеточной концентрации кальция, например, при повреждении мембраны, может вызвать активацию внутриклеточных апоптотических сигналов поврежденной клеткой [14]. Помимо этого стрессовое состояние клетки приводит к метаболическим нарушениям, вызывающим патологические изменения в функционировании гранулезных клеток, и, соответственно, сбой в продукции эстрадиола.

Заключение

Получены данные, свидетельствующие об особенностях функционирования клеток гранулезы, подвергшихся воздействию сверхнизких температур в условиях их дальнейшего культивирования. Наличие окислительного стресса в условиях витрификации способно негативно сказываться на одной из основных функций гранулезных клеток – их стероидогенной активности. Результаты исследований могут быть использованы при создании эффективных моделей витрификации соматических клеток овариальных фолликулов, в частности, включение в состав культуральных сред реагентов, снижающих уровень генерации АФК.

Библиографический список

1. Gao, D. Mechanisms of cryoinjury in living cells / D. Gao, J. K. Critser // ILAR Journal. - 2000. - Vol. 41(4). - P. 187-196.
2. Ciani, F. Influence of ROS on Ovar-

ian Functions / F. Ciani, N. Cocchia, D. d'Angelo, S. Tafuri // New Discoveries in Embryology / IntechOpen. – 2015. – P. 41-73. – URL: <http://dx.doi.org/10.5772/61003>.

3. Pan, B. MicroRNA-574 Impacts Granulosa Cell Estradiol Production via Targeting TIMP3 and ERK1/2 Signaling Pathway / B. Pan, X. Zhan, J. Li // Frontiers in Endocrinology. – 2022. – Vol. 13, iss. 852127.

4. Ovulation: parallels with inflammatory processes / D. M. Duffy, C. Ko, M. Jo, M. Brannstrom, T. E. Curry // Endocrine Reviews. – 2018. – Vol. 40(2). – P. 369–416.

5. Dikalov, S. Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species / S. Dikalov, D. Harrison // Antioxidants & Redox Signaling. – 2014. – Vol. 20(2). – P. 372–382.

6. Gervásio, C. G. The role of androgen hormones in early follicular development / C. G. Gervásio, M. P. Bernuci, M. F. Silva-de-Sá, A. C. J. Rosa-e-Silva // Obstetrics and gynecology. – 2014. – Art. ID 818010.

7. Uyar, A. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality / A. Uyar, S. Torrealday, E. Seli // Fertility and Sterility. – 2013. – Vol. 99, iss. 4. – P. 979 – 997.

8. Alam, M. H. Interaction between growing oocytes and granulosa cells in vitro / M. H. Alam, T. Miyano // Reproductive Medicine and Biology. – 2020. – Vol. 19(1). – P. 13-23.

9. Goodman, H. M. Hormonal Control of Reproduction in the Female / Basic Medical Endo-

crinology / H. M. Goodman // Academic Press. – 2009. – P. 257–275.

10. Mitochondrial Function in Modulating Human Granulosa Cell Steroidogenesis and Female Fertility / D. B. Sreerangaraja Urs, W. H. Wu, K. Komrskova, P. Postlerova, Y. F. Lin, C. R. Tzeng, S. H. Kao // International journal of molecular sciences. – 2020. – Vol. 21(10), iss. 3592.

11. Devine, P. J. Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity / P. J. Devine, S. D. Perreault, U. Luderer // Biology of Reproduction. – 2012. – Vol. 86, iss. 2(27). – P. 1-10.

12. Overexpression of glutamate-cysteine ligase protects human COV434 granulosa tumour cells against oxidative and γ -radiation-induced cell death / M. M. Cortes-Wanstreet, E. Giedzinski, C. L. Limoli, U. Luderer // Mutagenesis. – 2009. – Vol. 24, iss. 3. – P. 211–224.

13. Cryopreservation of primary cultures of mammalian somatic cells in 96-well plates benefits from control of ice nucleation / M. I. Daily, T. F. Whale, R. Partanen, A. D. Harrison, P. Kilbride, S. Lamb, G. J. Morris, H. M. Picton, B. J. Murray // Cryobiology. – 2020. – Vol. 93. – P. 62–69.

14. Long-time cooling before cryopreservation decreased translocation of phosphatidylserine (Ptd-L-Ser) in human ovarian tissue / V. Isachenko, P. Todorov, E. Isachenko, G. Rahimi, A. Tchobanov, N. Mihaylova, I. Manoylov, P. Mallmann, M. Merzenich // PLoS ONE. – 2019. – Vol. 14(2). – P. e0212961.

STEROIDOGENIC ACTIVITY OF GRANULOSA CELLS UNDER ULTRA-LOW TEMPERATURE CONDITIONS

Prituzhalova A. O., Kuzmina T. I., Shiryayev G. V.

All-Russian Scientific Research Institute of Genetics and Animal Breeding - a branch of the state budgetary scientific institution "Federal Research Center of Animal Husbandry - VIZH named after Academician L.K. Ernst" 196625, St. Petersburg - Pushkin, Moskovskoe highway, 55a, Tel: (812) 451-76-63, e-mail: aklevakina14@mail.ru.

Key words: granulosa cells, ROI, vitrification, estradiol, apoptosis, *Sus Scrofa domestica*.

In animal reproductive technologies, granulosa cells (CG) are used for cloning and modeling of oocyte maturation systems, which involves storing these cells in ultra-low temperature conditions. The purpose of the study is to identify the features of functioning of pig CG exposed to vitrification, taking into account parameters of steroidogenic activity (production of estradiol, testosterone), cell death (apoptosis), and generation of reactive oxygen intermediates (ROI). CG from 52 postmortem ovaries of 6-8 month old female Landrace pigs were used in the experiments. CG was pre-vitrified using cryoprotectants (DMSO, EG and trehalose). Thawing was carried out in solutions with decreasing concentrations of trehalose. Native and devitrified CGs were cultured for 44 and 68 hours, and apoptosis levels and ROI generation were assessed (PI and DCFH-DA dyes, respectively). The concentrations of estradiol and testosterone (ELISA) were determined in the follicular fluid and medium after cultivation. As a result of the exposure of ultra-low temperatures (-196°C) to CG, a sharp reduction in their viability was revealed before and during cultivation (28% versus 45%, $P < 0.05$ at 0 hours), after 44 hours (68% versus 35%, $P < 0.01$), with an increase up to 73% after 68 hours of cultivation. Before and at all stages of cultivation (44 and 68 hours), significant differences in the level of non-viable cells between native and devitrified cells were recorded. No significant differences were found in the testosterone content during the studied time periods of cultivation. A significant negative correlation was revealed between the proportion of cells with elevated H_2O_2 levels and testosterone concentration ($p=0.05$). Significant differences were found in the level of estradiol production by native and devitrified cells: at 44 hours (21.38 versus 8.28 pg/ml, $p<0.05$) and 68 hours (27.39 versus 11.18 pg/ml, $p<0.05$). There was a high inverse correlation between the level of cells with a high ROI index and their secretion of estradiol in the cultured medium ($P = 0.05$). The data obtained can be used to create effective models of vitrification of somatic cells of ovarian follicles, in particular, the inclusion of reagents in the culture media that reduce the level of ROI generation.

Bibliography:

1. Gao, D. Mechanisms of cryoinjury in living cells / D. Gao, J. K. Critser // ILAR Journal. – 2000. – Vol. 41(4). – P. 187-196.
2. Ciani, F. Influence of ROS on Ovarian Functions / F. Ciani, N. Cocchia, D. d'Angelo, S. Tafuri // New Discoveries in Embryology / IntechOpen. – 2015. – P. 41-73. – URL: <http://dx.doi.org/10.5772/61003>.
3. Pan, B. MicroRNA-574 Impacts Granulosa Cell Estradiol Production via Targeting TIMP3 and ERK1/2 Signaling Pathway / B. Pan, X. Zhan, J. Li // Frontiers

in Endocrinology. - 2022. - Vol. 13, iss. 852127.

4. Ovulation: parallels with inflammatory processes / D. M. Duffy, C. Ko, M. Jo, M. Brannstrom, T. E. Curry // *Endocrine Reviews*. - 2018. - Vol. 40(2). - P. 369–416.

5. Dikalov, S. Methods for detection of mitochondrial

and cellular reactive oxygen species / S. Dikalov, D. Harrison // *Antioxidants & Redox Signaling*. - 2014. - Vol. 20(2). - P. 372–382.

6. Gervásio, C. G. The role of androgen hormones in early follicular development / C. G. Gervásio, M. P. Bernuci, M. F. Silva-de-Sá, A. C. J. Rosa-e-Silva // *Obstetrics and gynecology*. - 2014. - Art. ID 818010.

7. Uyar, A. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality / A. Uyar, S. Torrealday, E. Seli // *Fertility and Sterility*. - 2013. - Vol. 99, iss. 4. - P. 979–997.

8. Alam, M. H. Interaction between growing oocytes and granulosa cells in vitro / M. H. Alam, T. Miyano // *Reproductive Medicine and Biology*. - 2020. - Vol. 19(1). - P. 13–23.

9. Goodman, H. M. Hormonal Control of Reproduction in the Female / Basic Medical Endocrinology / H. M. Goodman // Academic Press. - 2009. - P. 257–275.

10. Mitochondrial Function in Modulating Human Granulosa Cell Steroidogenesis and Female Fertility / D. B. Sreerangaraja Urs, W. H. Wu, K. Komrskova, P. Postlerova, Y. F. Lin, C. R. Tzeng, S. H. Kao // *International journal of molecular sciences*. - 2020. - Vol. 21(10), iss. 3592.

11. Devine, P. J. Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity / P. J. Devine, S. D. Perreault, U. Luderer // *Biology of Reproduction*. - 2012. - Vol. 86, iss. 2(27). - P. 1–10.

12. Overexpression of glutamate–cysteine ligase protects human COV434 granulosa tumour cells against oxidative and γ -radiation-induced cell death / M. M. Cortes-Wanstreet, E. Giedzinski, C. L. Limoli, U. Luderer // *Mutagenesis*. - 2009. - Vol. 24, iss. 3. - P. 211–224.

13. Cryopreservation of primary cultures of mammalian somatic cells in 96-well plates benefits from control of ice nucleation / M. I. Daily, T. F. Whale, R. Partanen, A. D. Harrison, P. Kilbride, S. Lamb, G. J. Morris, H. M. Picton, B. J. Murray // *Cryobiology*. - 2020. - Vol. 93. - P. 62–69.

14. Long-time cooling before cryopreservation decreased translocation of phosphatidylserine (Ptd-L-Ser) in human ovarian tissue / V. Isachenko, P. Todorov, E. Isachenko, G. Rahimi, A. Tchorbanov, N. Mihaylova, I. Manoylov, P. Mallmann, M. Merzenich // *PLoS ONE*. - 2019. - Vol. 14(2). - R. e0212961.