

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ И КЛЕТочНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

УДК 636.2.082.4:59.089.3:591.3

doi: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2019.1.25-31

**СОЗРЕВАНИЕ ООЦИТОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА *in vitro*:
МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДИКИ С ПРИМЕНЕНИЕМ РЕКОМБИНАНТНОГО
ФОЛЛИКУЛОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ГОРМОНА ЧЕЛОВЕКА**¹Сметанина И. Г., ¹Татарина Л. В., ^{1,2}Кривохарченко А.С.¹ВНИИ физиологии, биохимии и питания животных - филиал ФНЦ животноводства – ВИЖ им. Л.К. Эрнста, Боровск Калужской обл.; ²Институт химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, Москва, Российская Федерация

Цель работы – изучить эффективность созревания ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* в безбелковой среде МЕМ-α, дополненной двумя различными препаратами фолликулостимулирующего гормона (полученного из свиных гипофизов и рекомбинантного человеческого ФСГ). Критерием успешного созревания считали способность ооцитов после оплодотворения развиваться до стадии морулы-бластоцисты и бластоцисты. Показано, что ооциты, созревшие в присутствии рекомбинантного человеческого гормона, лучше развивались до стадии морулы-бластоцисты (в процентах от дробившихся эмбрионов), и этот эффект сохранялся при развитии до стадии бластоцисты. Заключение, что рекомбинантный ФСГ человека может использоваться для созревания ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* наравне с “классическим” гормоном, полученным из свиных гипофизов.

Ключевые слова: ооциты крупного рогатого скота, созревание *in vitro*, фолликулостимулирующий гормон человека, преимплантационные эмбрионы

Проблемы биологии продуктивных животных, 2019, 1: 25-31

Введение

Стимуляция множественного роста фолликулов *in vivo* и созревания яйцеклеток *in vitro* является одним из ключевых этапов вспомогательных репродуктивных технологий в медицине и биотехнологии. С этой целью традиционно используют гормональные препараты, получаемые из крови или гипофизов животных, мочи беременных женщин или женщин в менопаузе.

При использовании гормонов, полученных из биологического материала, необходимо учитывать ряд проблем, включая контаминацию другими гормонами, несоответствие между партиями препаратов и риск распространения переносчиков заболеваний (Hesser et al., 2011).

Технология рекомбинантных ДНК позволяет получать фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) с полным отсутствием контаминации лютеинизирующим гормоном (ЛГ) и какими-либо иными биологически активными веществами. Получены рекомбинантный человеческий ФСГ (рчФСГ), рекомбинантный бычий ФСГ (рбФСГ) и рекомбинантный свиной ФСГ (рсФСГ). По биологической активности эти рекомбинантные препараты идентичны ФСГ, экстрагированному из гипофизов.

Возможность использования рекомбинантных гормонов исследовалась при проведении экстракорпорального оплодотворения в медицинских клиниках. В ряде работ сравнивали эффективность гормональной стимуляции пациенток с использованием рчФСГ и “классического” ФСГ, извлекаемого из мочи женщин в менопаузе (человеческий менопаузальный гонадотропин – чМГ). Полученные данные весьма противоречивы.

Так, в некоторых работах было показано, что стимуляция яичников у женщин при использовании чМГ приводила к более высокому проценту рождений по сравнению с рчФСГ (Afnan, 2009; Coomarasamy et al., 2008).

Вместе с тем, сообщалось, что при использовании рчФСГ увеличивалось количество извлекаемых ооцитов и полученных эмбрионов, хотя по сохранению беременности и рождениям разницы между рчФСГ и чМГ высокой степени очистки (во-чМГ) выявлено не было (Frydman et al., 2010; Mogo et al., 2015).

В третьей группе работ не было выявлено различий между гормонами, и авторы пришли к выводу об их одинаковой клинической эффективности (Bjerke et al., 2010; Jee et al., 2010).

В настоящее время в медицинской практике все более широко распространенной становится процедура созревания ооцитов женщин вне организма. При этом в культуральных средах для созревания в основном используется чМГ (Fesahat et al., 2017; Pongsuthirak et al., 2015), и лишь в отдельных публикациях сообщалось о применении рчФСГ (Sekleniak et al., 2001). В то же время мы не встретили работ, посвященных сравнительному изучению влияния чМГ и рчФСГ на созревание *in vitro* ооцитов человека.

На крупном рогатом скоте возможность использования рекомбинантных гормонов исследована значительно меньше, чем на людях, причем, в основном это были *in vivo* эксперименты. Как отмечалось выше, при использовании гормонов, полученных из гипофизов, возникает ряд проблем. Масштаб применения технологии индукции супероуляции, более чем удвоился за последние 10 лет, но эффективность извлечения годных для пересадки эмбрионов остаётся по-прежнему низкой (примерно 6 эмбрионов на вымывание).

К настоящему времени опубликованы лишь единичные работы по индукции супероуляции у КРС, в одной из них рчФСГ был менее эффективен по сравнению с хорионическим гонадотропином лошади (Takagi et al., 2001), а в другой рбФСГ был сравним по эффективности со свиным гипофизарным ФСГ (Carvalho et al., 2014).

В работе (Takagi et al., 2001) было установлено, что рчФСГ ухудшает фолликулярное созревание у тёлочек по сравнению с хорионическим гонадотропином лошади (eCG), что может быть связано с отсутствием в этом препарате ЛГ-активности и жёсткой супрессии пульсации ЛГ после его использования. Обработанные группы значительно отличались друг от друга по стероидной продукции – тёлочки, обработанные рчФСГ, продуцировали значительно меньшее количество эстрадиола, по сравнению с тёлочками, стимулированными eCG, в течение первых дней стимуляции и гораздо меньшее количество прогестерона в период после ЛГ волны. У тёлочек, обработанных рчФСГ, в течение 27-35 ч после инъекции простагландина наблюдался более слабый ЛГ пульс. У всех тёлочек, обработанных рчФСГ, наблюдалась преовуляторная волна ЛГ, но в eCG группе она проявлялась значительно позже. Множественная овуляция наблюдалась только у половины рчФСГ-обработанных тёлочек с ЛГ волной и у всех животных – с ЛГ волной в eCG группе. Через 24 ч после ЛГ волны, процент ооцитов на стадии метафазы-2 с кортикальными гранулами, расположенными рядом с ооцитом, был значительно ниже в рчФСГ группе (7.3%), чем в eCG группе (55.9%).

В работе (Carvalho et al., год?) сравнили эффекты одиночной инъекции долгоживущего рбФСГ (типы А и В) и свиного ФСГ, полученного из гипофизов (Folltropin), при индукции супероуляции у голштинских молочных тёлочек. Проводили следующие четыре обработки: 1) 300 мг Folltropin, который вводили 8 раз в понижающейся дозе в течение 3.5 дней; 2) одиночная инъекция 50 мкг А-рбФСГ; 3) одиночная инъекция 100 мкг А-рбФСГ; 4) одиночная инъекция 50 мкг В-рбФСГ. Число овуляторных фолликулов составило 25.7 ± 3.2 , 18.9 ± 3.2 , 16.6 ± 3.1 и 5.9 ± 0.9 для обработок 1, 4, 3 и 2, соответственно. Число желтых тел составило 19.1 ± 2.4 , 16.1 ± 3.0 , 15.9 ± 2.9 и 2.6 ± 0.9 для обработок 1, 4, 3 и 2, соответственно. Число эмбрионов хорошего качества составило 7.6 ± 2.4 , 6.5 ± 1.7 , 4.3 ± 1.5 и 0.8 ± 0.5 для обработок 4, 1, 3 и 2, соответственно. Таким образом, одиночная инъекция рбФСГ (обработка 3 или 4)

позволяет получать такую же реакцию суперовуляции, как и обработка Folltropin. Авторы указывали на необходимость проведения дополнительных исследований по уточнению доз рбФСГ. Вместе с тем, отсутствуют публикации, посвященные влиянию рекомбинантного ФСГ на созревание ооцитов КРС вне организма.

Целью данной работы было изучить возможность использования рчФСГ для созревания ооцитов КРС *in vitro* в безбелковой среде МЕМ-альфа.

Материал и методы

Получение ооцитов КРС, их созревание, оплодотворение и культивирование осуществляли как было описано ранее (Сметанина и др., 2006; Сметанина и др., 2014; Сметанина и др., 2017) с некоторыми модификациями.

Яичники КРС получали на мясокомбинате и транспортировали в лабораторию в течение 2-3 ч при температуре 30°C в фосфатно-солевой среде Дюльбекко (ПанЭко, Россия). Ооциты выделяли из антральных фолликулов диаметром 2-6 мм методом рассечения. Для эксперимента отбирали ооциты с многослойным компактным кумулюсом, для их созревания использовали среду МЕМ- α (Sigma, США). В среду созревания добавляли следующие гормоны: ФСГ (ФСГ-супер, Агробиомед, Россия) в концентрации 1 мкг/мл (0.6 ед/мл) или рчФСГ (Гонал-Ф, Merck, Швейцария) в концентрации 0.6 ед/мл. Кроме гормонов в среду созревания добавляли пируват натрия (Sigma, США) и глутамин (Sigma, США) до концентрации 0.2 и 1 мМ соответственно. Для того, чтобы исключить возможное влияние неопределённых белковых компонентов, к среде созревания не добавляли сыворотку или бычий сывороточный альбумин (БСА). Ооциты культивировали в 4-луночных чашках (Nunc, Дания) по 30 кумулюс-ооцитных комплексов (КОК) на лунку с 500 мкл среды при температуре 38.5°C в течение 24 ч в атмосфере 5% CO₂ в воздухе.

Созревшие *in vitro* ооциты отмывали в среде Тироде (Bavister et al., 1983) с 10 мМ буфером НЕРЕС (Т-Н), содержащим 3 г/л свободного от жирных кислот БСА (N4919, Sigma, США), и помещали для совместного инкубирования со сперматозоидами из расчёта 30 КОК на 500 мкл среды оплодотворения Тироде (Т-О) с 25 мМ бикарбонатом натрия (Bavister et al., 1983), дополненную 10 мкг/мл гепарина (Sigma, США) и 6 г/л БСА (Sigma, США). Сперму готовили методом “всплывания” (Parrish et al., 1985). Концентрация сперматозоидов в среде оплодотворения составляла 2 млн/мл. Совместную инкубацию яйцеклеток и сперматозоидов осуществляли в течение 24 ч при температуре 38.5°C при содержании 5% CO₂ в воздухе.

Для оценки способности оплодотворённых ооцитов к дальнейшему развитию *in vitro* их помещали на культивирование в микрокапли синтетической жидкости яйцевода (СЖЯ, Tervit et al., 1972) объемом 50 мкл без глюкозы с заменимыми (по рецептуре МЕМ, Sigma, США) и незаменимыми (по рецептуре Игла, Sigma, США) аминокислотами, содержавшей 1 мМ глутамин, 0.33 мМ пируват натрия и 3 г/л БСА (Sigma, США). Через 42 ч после начала оплодотворения эмбрионы переносили в новые микрокапли среды СЖЯ объёмом 30 мкл, дополненной 20% эстральной сыворотки. Еще через двое суток в капли развития добавляли глюкозу (Sigma, США) до концентрации 4 мМ. Культивирование осуществляли в течение 240 ч при температуре 38.5°C в атмосфере трехкомпонентной газовой смеси (5% CO₂, 5% O₂ и 90% N₂). Во все среды добавляли комбинированный препарат пенициллин/стрептомицин в концентрации 100 ед/мкг на 1 мл (ПанЭко, Россия).

Результаты и обсуждение

После созревания ооцитов в присутствии рчФСГ наблюдалось улучшение развития эмбрионов до поздних преимплантационных стадий (табл. 1, рис. 1). Значительно большая процентная доля от числа дробившихся эмбрионов достигала стадии морулы-бластоцисты. Схожий эффект сохранялся и у эмбрионов, достигших стадии бластоцисты.

Таблица 1. Созревание ооцитов и развитие эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* при использовании различных препаратов ФСГ

Препарат ФСГ	Число ооцитов	Дробление (начиная с двух клеток), %	Морулы-бластоцисты, %		Бластоцисты, %	
			от общего числа ооцитов	от числа дробящихся эмбрионов	от общего числа ооцитов	от числа дробящихся эмбрионов
ФСГ-супер	98	49.0	20.4	41.7 *	10.2	20.8
Гонал-Ф	77	46.8	29.9	63.9 *	14.3	30.6

Примечание: приведены значения суммы результатов от двух опытов. * $P < 0.05$ по t -критерию при сравнении препаратов ФСГ.

Следует отметить, что согласно общепринятым методикам, культуральные среды для созревания ооцитов млекопитающих *in vitro* содержат как ФСГ, так и ЛГ. Считается, что сочетание этих двух гормонов обеспечивает полноценное созревание ооцитов и последующее развитие эмбрионов. Используемые в наших экспериментах препараты отличаются по своему составу. Так, Гонал-Ф – это чистый ФСГ, не содержащий даже следов ЛГ активности, в то время как в препарате ФСГ-супер, полученном из свиных гипофизов, ЛГ все же содержится в небольшом количестве (ФСГ/ЛГ > 1000). Полученные в данной работе результаты показывают, что эмбрионы из ооцитов, созревших в среде с рчФСГ, то есть без каких-либо примесей ЛГ, лучше развивались до поздних преимплантационных стадий. Вместе с тем, вопрос о качестве эмбрионов, получаемых с использованием различных препаратов ФСГ остаётся открытым и требует дальнейшего изучения.

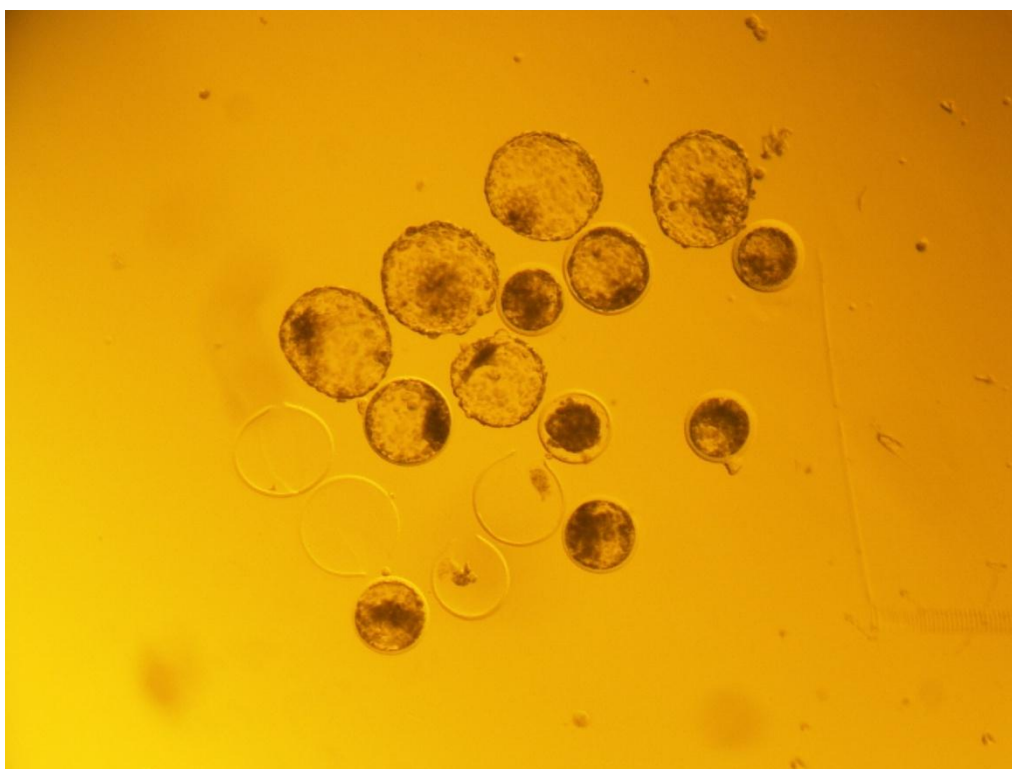


Рис. 1. Эмбрионы КРС, полученные *in vitro*, на стадии бластоцисты.

На основании полученных результатов мы полагаем, что расширенные сравнительные исследования с использованием обоих препаратов могут оказаться полезными для изучения механизмов созревания ооцитов млекопитающих, а также для понимания влияния условий созревания на жизнеспособность получаемых эмбрионов.

Заключение

Показано, что рекомбинантный ФСГ человека может использоваться для созревания ооцитов КРС вне организма наравне с “классическим” гормоном, извлекаемым из свиных гипофизов. С позиций общих био-медицинских технологий, полученные данные указывают на возможность использования системы созревания ооцитов КРС *in vitro* для тестирования гормонов, применяемых при проведении экстракорпорального оплодотворения у человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке гос. задания АААА-А18-118021590132-9 № 0445-2019-0030.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сметанина И.Г., Татарина Л.В., Кривохарченко А.С. Оплодотворение ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* в безбелковой культуральной системе // Онтогенез. – 2006. – Т. 37. – № 6. – С. 438-443.
2. Сметанина И.Г., Татарина Л.В., Кривохарченко А.С. Влияние гормонов на созревание ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* // Бюлл. экспер. биол. – 2014. – Т. 157. – № 5. – С. 655-658.
3. Сметанина И.Г., Татарина Л.В., Кривохарченко А.С. Влияние гипоксантина в низких концентрациях на созревание и оплодотворение ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* // Известия РАН. Серия биологическая. – 2017. – Т. 44. – № 5. – С. 1-4.
4. Afnan M. Identifying real differences in live birth rates between HMG and rFSH in IVF // *Reprod. Biomed. Online*. – 2009. – Vol. 18 (Suppl. 2). – P. 25-30.
5. Bavister B.D., Leibfried M.L., Lieberman G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium // *Biol. Reprod.* – 1983. – Vol. 28. – P. 235-247.
6. Bjercke S., Tanbo T., Abyholm T. et al. Clinical outcome following stimulation with highly purified hMG or recombinant FSH in patients undergoing their first treatment cycle of IVF or ICSI // *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* – 2010. – Vol. 89. – P. 1053-1060.
7. Carvalho P.D., Hackbart K.S., Bender R.W. et al. Use of a single injection of long-acting recombinant bovine FSH to superovulate Holstein heifers: a preliminary study // *Theriogenology*. – 2014. – Vol. 82. – P. 481-489.
8. Cekleniak N.A., Combelles C.M.H., Ganz D.A. et al. A novel system for *in vitro* maturation of human oocytes // *Fertility and Sterility*. – 2001. – Vol. 75. – P. 1185-1193.
9. Coomarasamy A., Afnan M., Cheema D. et al. Urinary hMG versus recombinant FSH for controlled ovarian hyperstimulation following an agonist long down-regulation protocol in IVF or ICSI treatment: a systematic review and meta-analysis // *Hum. Reprod.* – 2008. – Vol. 23. – P. 310-315.
10. Fesahat F., Firouzabadi R.D., Faramazzi M., Ali Khalili M. The effects of different types of media on *in vitro* maturation outcomes of human germinal vesicle oocytes retrieved in intracytoplasmic sperm injection cycles // *Clin. Exp. Reprod. Med.* – 2017. – Vol. 44. – P. 79-84.
11. Frydman R., Howles C.M., Fruong F. A double-blind, randomized study to compare recombinant human follicle stimulating hormone (FSH; Gonal-F) with highly purified urinary FSH (Metrodin HP) in women undergoing assisted reproductive techniques including intracytoplasmic sperm injection // *Hum. Reprod.* – 2000. – Vol. 15. – P. 520-525.
12. Hesser M.W., Morris J.C., Gibbons J.R. // *Advances in recombinant gonadotropin production for use in bovine superovulation* // *Reprod. Domestic Anim.* – 2011. – Vol. 46. – P. 933-942.
13. Jee B.C., Suh C.S., Kim Y.B. et al. // Clinical efficacy of highly purified hMG versus recombinant FSH in IVF/ICSI cycles: a meta-analysis // *Gynecol. Obstet. Invest.* – 2010. – Vol. 70. – P. 132-137.
14. Moro F., Scarinci E., Palla C. et al. Highly purified hMG versus recombinant FSH plus recombinant LH in intrauterine insemination cycles in women >35years: a RCT // *Hum. Reprod.* – 2015. – Vol. 30. – P. 179-185.

15. Pongsuthirak P., Songveeratham S., Vutyavanish T. Comparison of blastocyst and Sage media for in vitro maturation of human immature oocytes // *Reproductive Science*. – 2015. – Vol. 22. – P. 343-346.
16. Takagi M., Kim J.H., Izadyar F. et al. Impaired final follicular maturation in heifers after superovulation with recombinant human FSH // *Reproduction*. – 2001. – Vol. 121. – P. 941-951.
17. Tervit H.R., Whittingham D., Rowson L. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova // *J. Reprod. Fertil.* – 1972. – Vol. 30. – P. 493-497.

REFERENCES

1. Afnan M. Identifying real differences in live birth rates between HMG and rFSH in IVF. *Reprod. Biomed. Online*. 2009, 18(Suppl. 2): 25-30.
2. Bavister B.D., Leibfried M.L., Lieberman G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Biol. Reprod.* 1983, 28: 235-247.
3. Bjercke S., Tanbo T., Abyholm T. et al. Clinical outcome following stimulation with highly purified hMG or recombinant FSH in patients undergoing their first treatment cycle of IVF or ICSI. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2010, 89:1053-1060.
4. Carvalho P.D., Hackbart K.S., Bender R.W. et al. Use of a single injection of long-acting recombinant bovine FSH to superovulate Holstein heifers: a preliminary study. *Theriogenology*. 2014, 82: 481-489.
5. Cekleniak N.A., Combelles C.M.H., Ganz D.A. et al. A novel system for in vitro maturation of human oocytes. *Fertility and Sterility*. 2001, 75: 1185-1193.
6. Coomarasamy A., Afnan M., Cheema D. et al. Urinary hMG versus recombinant FSH for controlled ovarian hyperstimulation following an agonist long down-regulation protocol in IVF or ICSI treatment: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod.* 2008, 23: 310-315.
7. Fesahat F., Firouzabadi R.D., Faramazzi M., Ali Khalili M. The effects of different types of media on in vitro maturation outcomes of human germinal vesicle oocytes retrieved in intracytoplasmic sperm injection cycles. *Clin. Exp. Reprod. Med.* 2017, 44: 79-84.
8. Frydman R., Howles C.M., Fruong F. A double-blind, randomized study to compare recombinant human follicle stimulating hormone (FSH; Gonal-F) with highly purified urinary FSH (Metrodin HP) in women undergoing assisted reproductive techniques including intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 2000, 15: 520-525.
9. Hesser M.W., Morris J.C., Gibbons J.R. Advances in recombinant gonadotropin production for use in bovine superovulation. *Reprod. Domestic Anim.* 2011, 46: 933-942.
10. Jee B.C., Suh C.S., Kim Y.B. et al. Clinical efficacy of highly purified hMG versus recombinant FSH in IVF/ICSI cycles: a meta-analysis. *Gynecol. Obstet. Invest.* 2010, 70: 132-137.
11. Moro F., Scarinci E., Palla C. et al. Highly purified hMG versus recombinant FSH plus recombinant LH in intrauterine insemination cycles in women >35years: a RCT. *Hum. Reprod.* 2015, 30: 179-185.
12. Pongsuthirak P., Songveeratham S., Vutyavanish T. Comparison of blastocyst and Sage media for in vitro maturation of human immature oocytes. *Reproductive Science*. 2015, 22: 343-346.
13. Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Krivokharchenko A.S. [Fertilization of bovine oocytes in vitro in protein-free culture system]. *Ontogeny - Developmental Biology*. 2006, 37(6): 438-443.
14. Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Krivokharchenko A.S. [The effect of hormones on the maturation of bovine oocytes in vitro]. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny – Bull. Exp. Biol. Med.* 2014, 157(5): 655-658.
15. Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Krivokharchenko A.S. [The effect of hypoxanthine in low concentrations on the maturation and fertilization of bovine cattle oocytes in vitro]. *Izvestiya Rossiiskoi akademii nauk, seriya biologiya - Bulletin of the Russian Academy of Sciences. Series of biology*. 2017, 44(5): 1-4.
16. Takagi M., Kim J.H., Izadyar F. et al. Impaired final follicular maturation in heifers after superovulation with recombinant human FSH. *Reproduction*. 2001, 121: 941-951.
17. Tervit H.R., Whittingham D., Rowson L. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fertil.* 1972, 30: 493-497.

Maturation of bovine oocytes *in vitro*: modification of the technique with the use of recombinant folliculate stimulating human hormone

¹Smetanina I.G., ¹Tatarinova L.V., ^{1,2}Krivokharchenko A.S.

¹*Institute of Animal Physiology, Biochemistry and Nutrition - Branch of Federal Science Center of Animal Husbandry, Borovsk, Kaluga oblast;*

²*Semenov Institute of Chemical Physics RAS, Moscow, Russian Federation*

ABSTRACT. The aim was to study the efficiency of maturation of bovine oocytes *in vitro* in a protein-free medium MEM-alfa supplemented by two various preparations of follicle stimulating hormone, isolated from pig pituitary glands and recombinant. The development of *in vitro* matured and fertilized oocytes to morula-blastocyst stage and to blastocyst stage was considered as criterion of successful maturation. It has been shown that oocytes matured in the presence of recombinant human hormone developed better to the morula-blastocyst stage (as a percentage of divided embryos), and this effect was maintained during development to the blastocyst stage. It was concluded that recombinant human FSH can be used for the maturation of cattle oocytes *in vitro* along with the “classical” hormone obtained from porcine pituitary glands.

Keywords: bovine oocytes, in vitro maturation, human follicle stimulating hormone, preimplantation embryos

Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology, 2019, 1: 25-31

Поступило в редакцию: 05.02.2019

Получено после доработки: 21.02.2019

Сметанина Ирина Геннадьевна, к.б.н., с.н.с., тел.8(961)006-90-49; sme.irina2011@yandex.ru;

Татарина Людмила Викторовна, н.с., тел. 8(903)564-43-49; lyudtat@yandex.ru;

Кривохарченко Александр Сергеевич, к.б.н., н.с., тел. 8(915)002-84-50; saniak3@yandex.com