

## Особенности функциональной активности липидома в ооцитах *Sus scrofa domestica* при интраовариальной витрификации

Д. А. Старикова<sup>✉</sup>, Т. И. Кузьмина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения животных – филиал Федерального исследовательского центра животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста, Санкт-Петербург, Россия

✉E-mail: live8avis@mail.ru

**Аннотация.** Создание криобанка репродуктивных клеток и тканей открывает возможности интенсификации внедрения инновационных клеточных репродуктивных технологий в практику животноводства, биомедицины, ветеринарии. **Цель** исследования – оценить эффекты диметилглицерола кремния (ДМГК) на морфологию гамет и липидом ооцитов свиней, подвергшихся интраовариальной витрификации (ИОВ). **Методы.** Витрификации подвергались фрагменты (15 × 20 мм) яичников, которые последовательно экспонировали в криопротекторах (КПА1 и КПА2) 25 мин. и 15 мин. Состав: КПА1: 7,5 % этиленгликоля (ЭГ), 7,5 % диметилсульфоксида (ДМСО), 65 % ФСБ с 2М бычьего сывороточного альбумина (БСА); КПА2: 2,0 % ЭГ, 20 % ДМСО, 60 % ФСБ, 1М БСА, 0,5 моль/л сахарозы. Эффективность использования ДМГК в исследуемых концентрациях на криосохранность биообъектов оценивали по морфологии гамет и показателям функциональной активности липидома (морфология, локализация и интенсивность флуоресценции липидных капель, визуализированных прижизненным красителем Nile Red) в ооцитах. **Результаты.** 0,2 % ДМГК не индуцирует апоптотические процессы в клетках гранулезы, снижает уровень голаядерных клеток. При введении 2 % ДМГК в состав криопротекторных сред снижается доля гамет с признаками морфологической дегенерации (с 31 % до 13 %,  $P < 0,001$ ). ДМГК способствует увеличению уровня гамет с позитивными показателями функционирования липидных капель: увеличивается доля гамет с диффузной локализацией (с 58 % до 83 %,  $P < 0,001$ ); возрастает уровень клеток с низкой интенсивностью флуоресценции комплекса Nile red / липидная капля (с 16 % до 29 %,  $P < 0,05$ ) и доля гамет с липидными гранулами (47 % против 68 %,  $P < 0,005$ ). **Научная новизна.** Впервые идентифицированы эффекты ДМГК на морфологию женских гамет, апоптотические процессы в хроматине клеток гранулезы и функциональную активность липидома ооцитов свиней при воздействии сверхнизких температур в условиях ИОВ. Модернизированы среды для ИОВ ооцит-кумулясных комплексов путем введения в их состав 0,2 % или 2 % ДМГК.

**Ключевые слова:** ооцит, свинья, липидные капли, ДНК, Nile red, витрификация.

**Для цитирования:** Старикова Д. А., Кузьмина Т. И. Особенности функциональной активности липидома в ооцитах *Sus scrofa domestica* при интраовариальной витрификации // Аграрный вестник Урала. 2022. № 12 (227). С. 62–72. DOI: 10.32417/1997-4868-2022-227-12-62-72.

**Дата поступления статьи:** 02.09.2022, **дата рецензирования:** 06.10.22, **дата принятия:** 17.10.22.

### Постановка проблемы (Introduction)

Сохранение генофонда высокоценных по хозяйственно полезным признакам животных, а также исчезающих пород – актуальная проблема современного животноводства, одним из вариантов решения которой является замораживание генетического материала ценных сельскохозяйственных животных [1, с. 132]. Криоконсервация женских гамет позволит значительно интенсифицировать внедрение инновационных клеточных репродуктивных технологий в практику животноводства,

биомедицину, ветеринарию. В настоящее время используются два подхода к замораживанию биообъектов (органов, тканей и клеток): медленное замораживание (криоконсервация) и быстрая заморозка (витрификация). В процессе криоконсервации при охлаждении образцов до криогенных температур молекулы воды преобразуются в кристаллы, что вызывает нарушение клеточной структуры и биологических процессов после оттаивания. Преимуществом витрификации является мгновенный переход жидкости в состояние льда с подавлением образо-

вания кристаллов, что встречается как при экстра- так и при интраовариальной витрификации женских гамет после оттаивания [2, с. 4]. В то же время при внутрифолликулярном (экстраовариальном) быстром замораживании женские гаметы защищены от инвазии криогенными микроорганизмами, поскольку окружены тканями яичников [3, с. 78]. Однако при витрификации возможны криотравмы, возникшие от фазового перехода липидов, что особенно ярко выражено у женских гамет, богатых липидными каплями, в частности, ооцитов свиньи [4, с. 79]. Для уменьшения негативного воздействия низких температур на гаметы применяются комплексные криопротекторы, минимизирующие льдообразование и ограничивающие токсическое и тератогенное действие на гаметы [5, с. 498]. Основой большинства вариантов криопротекторных сред служат антифризные вещества – проникающие или непроникающие. Наиболее часто используются проникающие через мембрану клетки диметилсульфоксид и этиленгликоль, а в качестве непроникающих криопротекторов, обволакивающих клетку, применяют трегалозу, сахарозу, а также глицерин и его производные [2, с. 3; 5, с. 498; 6, с. 2]. В качестве производных известны различные глицеролаты, обладающие ранозаживляющим, противомикробным и противовоспалительным свойствами [7, с. 92]. Одним из таких производных является  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}(\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_3)_2\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$  – водорастворимый диметилглицеролат кремния (ДМГК), синтезированный в Институте органического синтеза им. И. Я. Постовского УрО РАН (г. Екатеринбург). ДМГК в составе средства для лечения эндометритов коров обеспечивает пролонгированное действие активных компонентов [8, с. 22], обладает транскутантным и антибактериальным эффектами (Patent RF 2255939, 2005) [9, с. 56]. Также немаловажно, что диметилглицеролат кремния не изменяет со временем свою вязкость [10, с. 2179]. Все это позволяет использовать ДМГК в качестве криопротекторного компонента для интраовариальной витрификации.

Цель настоящего исследования – оценить криопротекторные эффекты ДМГК на морфологию женских гамет, хроматин соматических клеток овариальных фолликулов и липидом ооцитов *Sus scrofa domestica*, подвергшихся интраовариальной витрификации.

#### Методология и методы исследования (Methods)

Постмортальные яичники свиней породы ландрас без видимых признаков патологии доставляли в лабораторию в физиологическом растворе, содержащем антибиотики стрептомицин 50 мкг/мл и пенициллин 100 МЕ/мл. Клетки гранулезы (КГ) получали аспирацией фолликулярной жидкости из антральных фолликулов диаметром 3–6 мм. Суспензию центрифугировали при 250 g 10 мин. Супернатант удаляли, клетки дважды промывали в PBS.

Культивировали КГ  $((1,1\dots1,6) \times 10^6$  кл/мл среды) 3 часа при 37 °C в контрольной среде: PBS с 5 % сыворотки крупного рогатого скота, а также в опытной среде с 0,2 % диметилглицеролата кремния. Аспираты гранулезы контрольной и опытной групп центрифугировали с PBS, затем клетки отмывали и переносили на предметное стекло. Цитоцентрифугаты окрашивали азур2-эозином по Мэю – Грюнвальду. В каждой пробе подсчитывали по 500 клеток под иммерсией, определяли частоты встречаемости голаядерных клеток и апоптотических телец. Для количественного анализа содержания ДНК равное количество ДНК загружали в 1-процентный агарозный гель, содержащий 1 мкг/мл бромистого этидия, под напряжением 80 В. Фрагменты ДНК визуализировали путем воздействия на гель УФ-излучения, а затем фотографировали. Для заморозки готовили фрагменты яичника размером 15 × 20 мм путем поперечной резекции яичника. Витрификация фрагментов яичников проводилась в соответствии с ранее разработанными в лаборатории протоколами [11, с. 66–68]. Экспозиция фрагментов проводилась в криопротекторных агентах (КПА) последовательно и составила 25 минут и 15 минут. Для заморозки контрольную группу кусочков яичника инкубировали в растворах КПА1 (7,5 % этиленгликоль (ЭГ), 7,5 % диметилсульфоксид (ДМСО), 65 % фосфатно-солевой буфер (ФСБ), с добавлением 20 % бычьего сывороточного альбумина (БСА)) и КПА2 – 15 % ЭГ, 15 % ДМСО, 59,5 % ФСБ, 10 % БСА, 0,5 % сахарозы. Для создания условий опыта 1 в КПА2 добавляли ДМГК в концентрации 0,2 %, а для опыта 2 – ДМГК в концентрации 2 %. Витрифицированные образцы хранились в жидком азоте не менее 24 часов. Фрагменты яичника контрольной и опытных групп размораживали поочередно в растворе, состоящем из ФСБ с добавлением 10 % БСА, 0,5 % сахарозы в течение 1 мин. при 38,5 °C, а затем в растворе из ФСБ с 0,25 % сахарозы 5 мин. при 38,5 °C. Перед выделением ооцит-кумулясных комплексов (ОКК) фрагменты 10 мин. экспонировали в ФСБ. Нативные ОКК и ОКК из девитрифицированных фрагментов получали путем резекции яичника. Оценку морфологии клеток кумулюса девитрифицированных ооцит-кумулясных комплексов осуществляли на микроскопе МБС-9 при увеличении 2 × 14. Для анализа липидома и ядерного материала проводили двойное окрашивание предварительно денудированных пипетированием ооцитов. Для этого ооциты помещали в 2 мл раствора Nile red (1 мкМ), инкубировали 5 мин. при комнатной температуре, затем переносили по одной клетке в каждую лунку 12-луночного стекла. Цитологическая оценка липидома ооцитов проводилась с помощью микроскопа Carl Zeiss AxioImager A2m. Диаметр липидных капель оценивали в отношении к диаметру ооцита, используя программу JMicroVi-

sion 1.2.7. Для ранжирования ооцитов фиксировали диаметр липидных капель в отношении к диаметру ооцита: липидные капли, имеющие диаметр менее 10 % от диаметра ооцита определяли как гранулы, а липидные капли, имеющие диаметр более 10 % от диаметра ооцита, – как кластеры. В экспериментах использовали реагенты производства фирмы Sigma-Aldrich, за исключением вышеобозначенных. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием критерия  $\chi^2$  Пирсона и критерия Стьюдента с помощью статистической программы Statistica 6.0 (Dell, США). Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали при трех уровнях значимости:  $P < 0,05$ ;  $P < 0,005$ ;  $P < 0,001$ .

**Результаты (Results)**

Как показано ранее, диметилглицеролат кремния, обладающий ранозаживляющей, транскутанной, антибактериальной способностью в концентрации 0,2 % улучшает показатели ядерного созревания девитрифицированных гамет [12, с. 54]. В выборе концентрации ДМГК для настоящего исследования мы опирались на данные, полученные

нами при изучении цитопротекторных эффектов диметилглицеролат кремния в клеточных популяциях гранулезы, аспирированных из яичников свиной. Данные по исследованию частот встречаемости «голых ядер» в образцах с добавлением ДМГК приведены в таблице 1. В мазках образцов, приготовленных из интактных клеток, был обнаружен наибольший процент «голых ядер» (более 58 %) и апоптотических телец (13 %), в то время как в образцах с добавлением 0,2 % диметилглицеролат кремния частота встречаемости «голых ядер» оказалось на порядок ниже, а апоптотические тельца после добавления наночастиц не были обнаружены.

Апоптотические процессы в нативных и обработанных ДМГК клетках гранулезы изучали с использованием ПЦР-анализа (рис. 1).

На электрофореграмме обнаружены дорожки с фрагментированными ДНК нижний фрагмент маркера – 100 п. н., нижний фрагмент контрольного образца – 180–200 п. н., что соответствует самой короткой нуклеосоме при апоптотической фрагментации ДНК. Фрагментация ДНК не была выявлена на дорожках с образцами, обработанными 0,2 % ДМГК (рис. 1). В целом представленные данные по анализу воздействия 0,2 % ДМГК на клетки гранулезы свидетельствуют о его четко выраженном цитопротекторном эффекте. С учетом пагубного воздействия сверхнизких температур на клеточные компартменты задачей исследования следующей серии экспериментов явилось выявление характера воздействия ДМГК на морфологию женских гамет и особенностей функционирования липидома в ооцитах в условиях воздействия сверхнизких температур.

Возвращаясь к вопросу проникающей способности криопротекторных агентов, следует отметить, что А. I. Villaverde et al. при криоконсервации спермы котов использовали 3 %, 5 % и 7 % глицерина [13, с. 734], а Р. Q. Zhang – от 60 % до 80 % глицерина при криоконсервации жировой ткани мышей [14, с. 2]. ДМГК в концентрации 1 % снижал долю клеток гранулезы с ядрами в состоянии

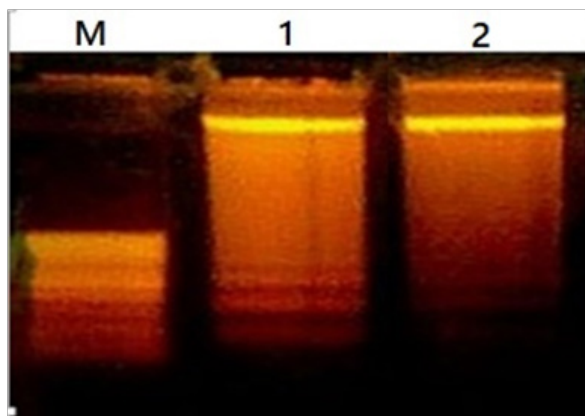


Рис. 1. ДНК-фрагментация («апоптотическая лестница») в интактных и обработанных 0,2 % ДМГК клетках гранулезы.

M – маркер, 1 – контроль, 2 – 0,2 % ДМГК

Fig. 1. DNA fragmentation (“apoptotic ladder”) in intact granulosa cells and cells treated with 0.2 % SDMГ.

M – marker, 1 – control, 2 – 0.2 % SDMГ

**Частоты встречаемости «голых ядер» и апоптотических телец в клетках гранулезы инкубированных с ДМГК ( $1,6 \times 10^6$  кл/мл – 4 повторности)**

Группы эксперимента	Доля клеток с «голыми ядрами», %	Доля клеток с апоптотическими тельцами, %
Контроль	58 ± 4,93	13 ± 3,36
0,2 % ДМГК	2 ± 0,95	Не обнаружено

Таблица 1

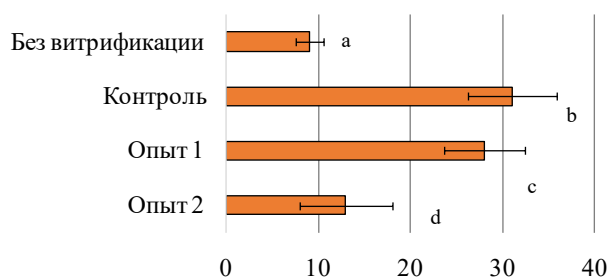
Table 1  
Frequencies of naked nuclei and apoptotic bodies in porcine granulosa cells treatment with silicon dimethylglycerolate ( $1.6 \times 10^6$  cells/ml – 4 replicates)

Experiment groups	Level of cells with naked nuclei, %	Level of cells with apoptotic bodies, %
Control	58 ± 4.93	13 ± 3.36 %
0.2 % SDMГ	2 ± 0.95	Not detected

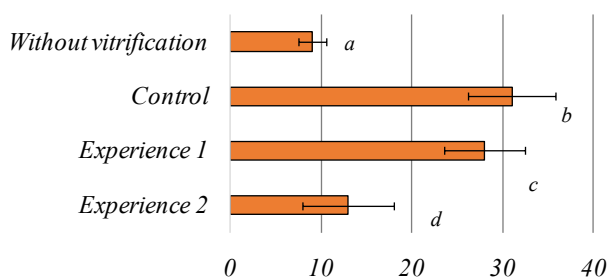
пикноза [15, с. 63]. Рекомендации изготовителей и поставщиков ДМГК (ИОС УрО РАН) и обнаруженные различия в процентном соотношении базового вещества глицерогидрогелей (глицерина) при витрификации обусловили выбор концентрации (0,2 % и 2 %). Результаты по анализу морфологии ооцитов с учетом признаков дегенерации (неправильная форма ооцита, неоднородная цитоплазма, отсутствие кумулюса, повреждение зоны пеллюцида и т. д.) после интраовариальной витрификации представлены на рис. 2.

При воздействии сверхнизких температур увеличивается доля гамет с признаками дегенерации, а именно с неправильной формой ооцита, неоднородной цитоплазмой, отсутствием кумулюса, повреждением зоны пеллюцида и т. д. После интраовариальной витрификации доля ооцитов с признаками

дегенерации в контрольной группе достоверно увеличилась на 22 % (с 9 % до 31 %,  $P < 0,001$ ), а в первой опытной группе (концентрация ДМГК – 0,2 %) на 19 % (с 9 % до 28 %,  $P < 0,001$ ). Следует отметить, что воздействие 2 % ДМГК на гаметы при витрификации не привело к достоверному увеличению уровня морфологически дегенерированных ооцитов (13 %) в сравнении с долей нативных гамет (9 %). При введении ДМГК в концентрации 2 % в состав криопротекторных сред уровень гамет с дегенерацией снизился на 18 % в сравнении с контролем (с 31 % до 13 %,  $P < 0,001$ ). Также отмечено, что витрификация в опытных условиях с 2 % ДМГК (13 %) снижает уровень гамет с признаками морфологической дегенерации на 15 % в сравнении с витрификацией при 0,2 % ДМГК (28 %,  $P < 0,01$ ).



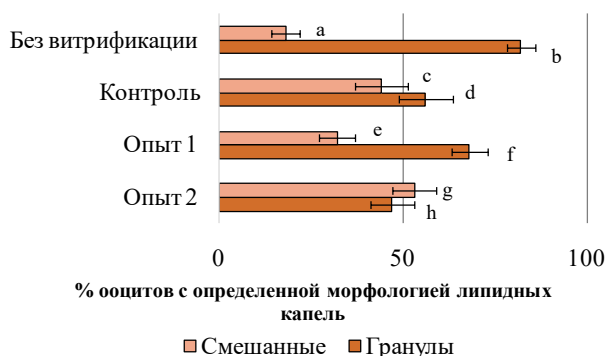
■ % ооцитов с признаками дегенерации по морфологии



■ % of oocytes with signs of degeneration by morphology

Рис. 2. Влияние ДМГК на морфологию ооцитов свиней после интраовариальной витрификации (количество ооцитов – 538; 3 повторности). Контроль – КПА2: 15 % этиленгликоля, 15 % диметилсульфоксида, 59,5 % фосфатно-солевого буфера, 10 % бычьего сывороточного альбумина, 0,5 % сахарозы; опыт 1 – контроль и 0,2 % ДМГК; опыт 2 – контроль и 2 % ДМГК. Достоверность различий  $\chi^2$ -test:  $a,b,a,cP < 0,001$ ,  $c,dP < 0,01$ ,  $b,dP < 0,005$

Fig. 2. The effect of SDMG on the morphology of porcine oocytes after intraovarian vitrification (number of oocytes – 538; 3 replicates). Control – CPA2: 15 % ethylene glycol, 15 % dimethyl sulfoxide, 59.5 % phosphate-buffered saline, 10 % bovine serum albumin, 0.5 % sucrose; experience 1 – control and 0.2 % SDMG; experience 2 – control and 2 % SDMG. Significance of differences  $\chi^2$ -test:  $a,b,a,cP < 0,001$ ,  $c,dP < 0,01$ ,  $b,dP < 0,005$

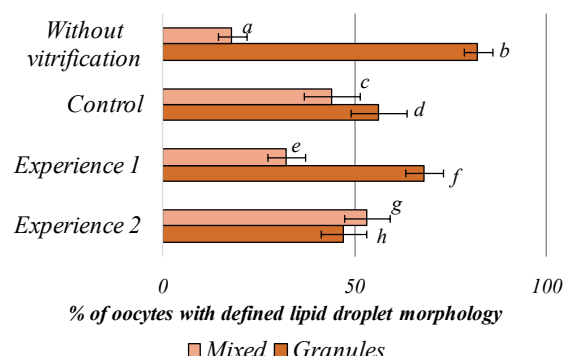


% ооцитов с определенной морфологией липидных капель

■ Смешанные ■ Гранулы

Рис. 3. Морфология липидных капель в ооцитах свиней после интраовариальной витрификации (количество ооцитов – 394; 3 повторности). Контроль – КПА2: 15 % этиленгликоля, 15 % диметилсульфоксида, 59,5 % фосфатно-солевого буфера, 10 % бычьего сывороточного альбумина, 0,5 % сахарозы; опыт 1 – контроль и 0,2 % ДМГК; опыт 2 – контроль и 2 % ДМГК.

Достоверность различий  $\chi^2$ -test:  $a,c,b,d,a,g,b,hP < 0,001$ ,  $a,c,b,fP < 0,05$ ,  $e,g,f,hP < 0,005$



% of oocytes with defined lipid droplet morphology

■ Mixed ■ Granules

Fig. 3. Morphology of lipid droplets in porcine oocytes after intraovarian vitrification (number of oocytes – 394; 3 replicates). Control – CPA2: 15 % ethylene glycol, 15 % dimethyl sulfoxide, 59.5 % phosphate-buffered saline, 10 % bovine serum albumin, 0.5 % sucrose; experience 1 – control and 0.2 % SDMG; experience 2 – control and 2 % SDMG.

Significance of differences  $\chi^2$ -test:  $a,c,b,d,a,g,b,hP < 0,001$ ,  $a,c,b,fP < 0,05$ ,  $e,g,f,hP < 0,005$

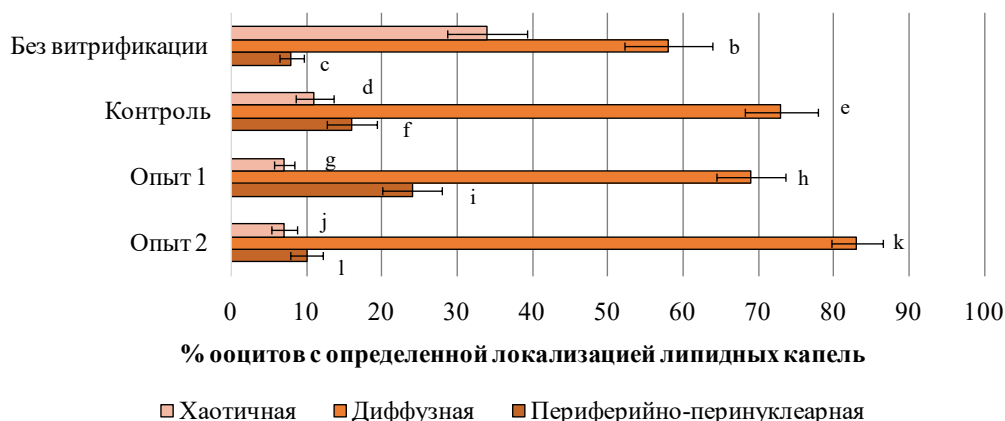


Рис. 4. Воздействие диметилглицеролат кремния на локализацию липидных капель в ооцитах свиней после интраовариальной витрификации (количество ооцитов – 422; 3 повторности). Контроль – КПА2: 15 % этиленгликоля, 15 % диметилсульфоксида, 59,5 % фосфатно-солевого буфера, 10 % бычьего сывороточного альбумина, 0,5 % сахарозы; опыт 1 – контроль и 0,2 % ДМГК; опыт 2 – контроль и 2 % ДМГК. Достоверность различий  $\chi^2$ -test: <sup>ci</sup> $P < 0,005$ , <sup>b,e, h,k</sup> $P < 0,05$ , <sup>a,d, a,g, a;j, b;k</sup> $P < 0,001$ , <sup>il</sup> $P < 0,01$

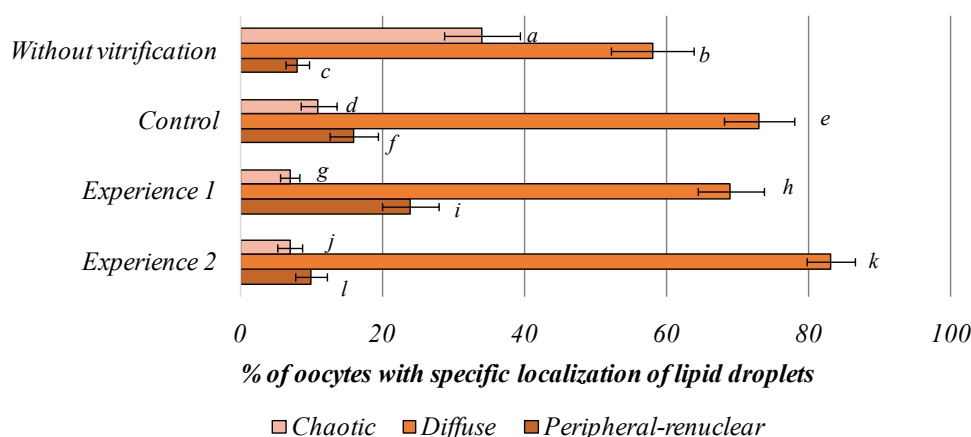


Fig. 4. The effect of silicon dimethylglycerolate on the localization of lipid droplets in porcine oocytes after intraovarian vitrification (number of oocytes – 422; 3 replicates). Control – CPA2: 15 % ethylene glycol, 15 % dimethyl sulfoxide, 59.5 % phosphate-buffered saline, 10 % bovine serum albumin, 0.5 % sucrose; experience 1 – control and 0.2 % SDMG; experience 2 – control and 2 % SDMG. Significance of differences  $\chi^2$ -test: <sup>ci</sup> $P < 0.005$ , <sup>b,e, h,k</sup> $P < 0.05$ , <sup>a,d, a,g, a;j, b;k</sup> $P < 0.001$ , <sup>il</sup> $P < 0.01$

Оценка морфологии и локализации внутриклеточных липидных капель ооцитов свиней осуществлялась путем визуализации липидного содержимого флуоресцентным красителем Nile red. Данный краситель успешно применяется для визуализации липидных капель, локализованных в цитоплазме женской гаметы, поскольку является специфическим к триглицеридам [16, с. 1023 (B), 17, с. 3].

Ранжирование ооцитов по морфологии липидных капель производилось в соответствии с вышеуказанными характеристиками на группы:

- 1) ооциты с липидными каплями в форме гранул;
- 2) ооциты с липидными каплями в форме гранул и кластеров – смешанный тип.

Как показано ранее, липидные капли в ооцитах с положительными качественными характеристиками имеют форму мелких гранул [18, с. 132].

Воздействие сверхнизких температур провоцирует снижение доли ооцитов с липидными каплями в виде гранул и, напротив, повышение уровня гамет

со смешанными формами липидных капель (рис. 3). Так, доля нативных гамет с гранулированными липидными каплями (82 %) достоверно превышает таковую как в контрольной (56 %,  $P < 0,001$ ), так и в опытных группах эксперимента (0,2 % ДМГК: 68 % против 82 % в контроле,  $P < 0,05$ ), 2 % ДМГК – 47 % против 82 % в контроле,  $P < 0,001$ ). При воздействии сверхнизких температур показано достоверное увеличение доли гамет со смешанной морфологией в контрольной группе девитрифицированных гамет (44 %,  $P < 0,001$ ), в первой опытной группе (0,2 % ДМГК) этот показатель составил 32 %,  $P < 0,05$ , во второй опытной группе (2 % ДМГК) – 53 %,  $P < 0,001$  в сравнении с уровнем нативных гамет со смешанной морфологией (18 %).

Доля ооцитов с гранулированными липидными каплями, витрифицированных с использованием 0,2 % ДМГК, достоверно выше доли аналогичных гамет в опытной группе 2 (концентрация ДМГК – 2 %, 68 % против 47 % соответственно,  $P < 0,005$ ).

На рис. 4 представлены результаты по воздействию сверхнизких температур на локализацию липидных капель в ооцитах свиней. Популяцию гамет ранжировали на 3 группы – в соответствии с расположением липидных капель в ооплазме: с периферийно-перинуклеарной, с диффузной (равномерное расположение липидных капель по цитоплазме ооцита) и с хаотичной (неравномерное расположение липидных капель по цитоплазме ооцита) локализацией [18, с. 5; 19, с. 142].

После интраовариальной витрификации выявлено повышение долей гамет с периферийно-перинуклеарной локализацией ЛК в опытной группе с 0,2 % ДМГК в сравнении с группой нативных клеток (24 % против 8 % соответственно,  $P < 0,005$ ). Также отмечен рост доли гамет с диффузной локализацией в контрольной (73 % против 58 %,  $P < 0,05$ ) и опытной с 2 % ДМГК (83 % против 58 %,  $P < 0,001$ ) группах в сравнении с нативными ооцитами. Напротив, влияние сверхнизких температур вызывает снижение долей ооцитов с хаотичной локализацией по сравнению с уровнем нативных клеток (34 %) как в контрольной группе – до 11 % ( $P < 0,001$ ), так и в опытных группах – до 7 % в обеих ( $P < 0,001$ ).

Доля ооцитов после витрификации с ДМГК в концентрации 0,2 % с периферийно-перинуклеарной локализацией липидных капель достоверно превысила долю гамет с аналогичным расположением липидных капель, витрифицированных с 2 % ДМГК (24 % против 10 % соответственно,  $P < 0,01$ ). Показано достоверное увеличение (на 14 %) доли гамет с диффузной локализацией, полученных из фолликулов фрагментов яичников, витрифицированных в опытной группе с введением 2 % ДМГК (83 %) в сравнении с уровнем гамет, витрифицированных в опытной группе с 0,2 % ДМГК (69 %),  $P < 0,05$ .

На рис. 5 представлены результаты по оценке интенсивности флуоресценции комплекса Nile red / липидная капля в ооцитах, подвергшихся процедуре интраовариальной витрификации. Анализ показателей интенсивности флуоресценции комплекса Nile red / липидная капля показал, что доля ооцитов (37 %) с низкой интенсивностью свечения достоверно превысила долю гамет с аналогичной градацией в контрольной (16 %,  $P < 0,005$ ) и в опытной (22 %,  $P < 0,05$ ) группах гамет, витрифицированных с 2 % ДМГК. Доля нативных ооцитов с высокой интенсивностью свечения липидных капель (6 %) была достоверно ниже уровня гамет, витрифицированных в контрольных (18 %,  $P < 0,01$ ) и опытных группах с использованием 0,2 % ДМГК (16 %,  $P < 0,05$ ) или 2 % ДМГК (19 %,  $P < 0,01$ ). После интраовариальной витрификации выявлено достоверное превышение доли ооцитов, витрифицированных с 0,2 % ДМГК с низкой интенсивностью свечения (29 %) над уровнем контрольных гамет (16 %),  $P < 0,05$ .

## Обсуждение и выводы (Discussion and Conclusion)

Известно, что одним из способов образования крупных липидных капель является слияние мембран малых липидных капель и объединение их внутреннего содержимого [20, с. 142]. При криоконсервации важным является фазовый переход внутриклеточных и мембранных липидов из жидкой неупорядоченной фазы в твердообразную упорядоченную фазу при сверхнизких температурах [4, с. 79]. Есть предположение, что между температурами начала фазового перехода липидов и кристаллизации липидов, происходящем при витрификации в предельно короткие сроки, триглицериды интрацеллюлярных липидных капель находятся в промежуточном жидкоупорядоченном состоянии [21, с. 581]. Методом рамановской микроскопии И. В. Мокроусовой и др. было показано сосуществование липидов в твердообразном упорядоченном и жидком неупорядоченном фазовом состоянии внутри одной и той же липидной капли при низких температурах в процессе криоконсервации [22, с. 180].

Таким образом, фазовый переход липидов влияет на их состояние при витрификации, что в дальнейшем до, во время и после девитрификации сказывается на морфофункциональном состоянии липидных капель, в том числе на изменении их морфологии. Подтверждением этому служат данные исследования X.-W. Fu et al, где показано увеличение количество мелких липидных капель после девитрификации ооцитов [23, с. 164].

Полученные нами данные не подтверждают результаты полученные авторами, вероятно, ввиду разных условий и объектов витрификации. Кроме того, исходя из разницы полученных результатов по оценке морфологии липидных капель в опытных группах можно предположить, что концентрация ДМГК оказывает влияние на его проникновение в цитоплазму клетки и изменение границ фазового перехода липидов. Также известно, что фазовый переход липидов влияет на локализацию липидных капель [24, с. 136].

По представленным нами данным диффузное распределение липидных капель вызвано повышением концентраций ДМГК в криопротекторах до 2 %. Логично предположить, что увеличенное количество диметилглицерола кремния в криопротекторе способствует большему проникновению его через оболочку фолликула, следствием чего является повышенное количество ДМГК в фолликулярной жидкости и цитоплазме ооцита, что может объяснить различия в результатах между опытными группами. Триглицериды – основной источник энергетических запасов клетки, который используется для формирования яйцеклетки.



Рис. 5. Воздействие диметилглицеролат кремния на интенсивность флуоресценции (ИФ) комплекса Nile red / липидная капля в ооцитах свиней после интраовариальной витрификации (количество ооцитов – 375; 3 повторности). Контроль – КПА2: 15 % этиленгликоля, 15 % диметилсульфоксида, 59,5 % фосфатно-солевого буфера, 10 % бычьего сывороточного альбумина, 0,5 % сахарозы; опыт 1 – контроль и 0,2 % ДМГК; опыт 2 – контроль и 2 % ДМГК. Достоверность различий  $\chi^2$ -test: <sup>ci</sup>P < 0,005, <sup>be, hk</sup>P < 0,05, <sup>ad, ag, aj, bk</sup>P < 0,001, <sup>il</sup>P < 0,01

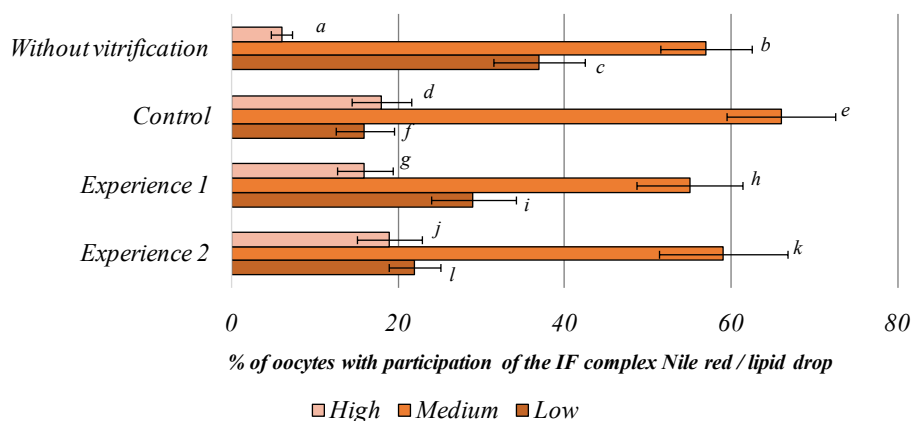


Fig. 5. The effect of silicon dimethylglycerolate on the fluorescence intensity (FI) of the Nile red / lipid drop complex in porcine oocytes after intraovarian vitrification (number of oocytes – 375; 3 replicates). Control – CPA2: 15 % ethylene glycol, 15 % dimethyl sulfoxide, 59.5 % phosphate-buffered saline, 10 % bovine serum albumin, 0.5 % sucrose; experience 1 – control and 0.2 % SDMG; experience 2 – control and 2 % SDMG. Significance of differences  $\chi^2$ -test: <sup>ci</sup>P < 0.005, <sup>be, hk</sup>P < 0.05, <sup>ad, ag, aj, bk</sup>P < 0.001, <sup>il</sup>P < 0.01

Разложением спектров Nile red показано снижение уровня триглицеридов на 17,7 % при созревании ооцита свиньи [25, с. 51]. Следовательно, чем большее участие триглицеридов в интрацитоплазматических процессах в клетке, тем ниже интенсивность окрашивания липидных капель красителем Nile red. В соответствии с полученными нами результатами по интенсивности флуоресценции комплекса Nile red / липидная капля можно предположить, что ДМГК в концентрации 0,2 % оказывает положительное влияние на внутриклеточные процессы в девитрифицированных клетках, активируя их; 2 % ДМГК не оказывает аналогичного стимулирующего эффекта, выражаемого в увеличении доли гамет с низкой интенсивностью флуоресценции комплекса, что является свидетельством дозозависимого эффекта ДМГК на степень свечения флуоресценции комплекса Nile red / липидная капля.

Касаясь технологических моментов при витрификации ооцитов, следует отметить, что температура отогрева в наших экспериментах составила 38,5 °С, однако при девитрификации, как указывают S. Amstislavsky et al., витрифицированные объекты при оттаивании требуют высоких скоростей и температур нагревания во избежание образования кристаллов льда в процессе девитрификации [4, с. 80]. В связи с этим надо учитывать, что обработка режимов оттаивания для ооцитов животных разных видов требует модификации. Проблема разработки эффективной технологии витрификации женских гамет *Sus scrofa domestica* усугубляется большим количеством в них липидного содержания (161 мкг) в сравнении с другими видами животных [26, с. 165].

В связи с вышеизложенным комплексное исследование показателей жизнеспособности и функ-

циональной активности структурных компонентов женской гаметы *Sus Scrofa Domesticus* с акцентом на тестировании особенностей функционирования липидных капель в условиях сверхнизких температур с использованием ДМГК как возможного компонента криопротекторных сред представляет несомненный интерес. Полученные нами данные позволили выявить особенности функционирования липидома (кластеризация и транслокация ли-

пидных капель, изменение интенсивности флуоресценции Nile red / липидная капля) ооцита спровоцированные воздействием сверхнизких температур и определить характер воздействия ДМГК на обозначенные вышепоказатели.

#### Благодарности (Acknowledgments)

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Государственное задание № 0445-2021-0005).

#### Библиографический список

1. Шинкарецкая Г. Г. Генофонд животных: проблема исследования и сохранения // Образование и право. 2020. № 2. С. 128–137.
2. Bojic S., Murray A., Bentley B. L., Spindler R., Pawlik P., Cordeiro J. L., Bauer R., de Magalhães J. P. Winter is coming: the future of cryopreservation // BMC Biology. 2021. Vol. 24. No. 19 (1). DOI: 10.1186/s12915-021-00976-8.
3. Campos L. B., da Silva A. M., Praxedes E. C. G. Vitrification of collared peccary ovarian tissue using open or closed systems and different intracellular cryoprotectants // Cryobiology. 2019. No. 91. Pp. 77–83.
4. Amstislavsky S., Mokrousova V., Brusentsev E., Okotrub K., Comizzoli P. Influence of Cellular Lipids on Cryopreservation of Mammalian Oocytes and Preimplantation Embryos: A Review // Biopreservation and biobanking. 2019. Vol. 17. No. 1. Pp. 76–83. DOI: 10.1089/bio.2018.0039.
5. Asl M. M., Rahbarghazi R., Beheshti R., Alihemmati A., Aliparasti M. R., Abedelahi A. Effects of Different Vitrification Solutions and Protocol on Follicular Ultrastructure and Revascularization of Autografted Mouse Ovarian Tissue // Cell Journal. 2021. Vol. 22. No. 4. Pp. 491–501. DOI: 10.22074/cellj.2021.6877.
6. Ekpo M. D., Xie J., Hu Y., Liu X., Liu F., Xiang J., Zhao R., Wang B., Tan S. Antifreeze Proteins: Novel Applications and Navigation towards Their Clinical Application in Cryobanking // International Journal of Molecular Sciences. 2022. Vol. 27. No. 23 (5). Article number 2639. DOI: 10.3390/ijms23052639.
7. Саркисян Н. Г., Ронь Г. И., Тузанкина И. А., Хонина Т. Г., Ларионов Л. П., Симбирцев А. С., Дроздова Л. И., Тимченко А. С. Морфологическая оценка эффективности использования фармакологических композиций на основе кремнийорганического глицерогидрогеля // Иммунология. 2017. Т. 38. № 2. С. 91–96.
8. Шадрина Е. В. Синтез и свойства полиолоатов кремния и гидрогелей на их основе: автореф. дис. ... канд. хим. наук. Екатеринбург, 2011. 26 с.
9. Barkova A. S., Shurmanova E. I., Khonina T. G., Millstein I.M. Possibilities of using functional biologically active organosilicon compounds in veterinary practice // Agrarian Bulletin of the Urals. 2020. No. 11 (202). Pp. 53–58. DOI: 10.32417/1997-4868-2020-202-11-53-58.
10. Хонина Т. Г., Ларченко Е. Ю., Шадрина Е. В., Ганебных И. Н., Бойко А. А., Маточкина Е. Г., Кодесс М. И., Чупахин О. Н. Состав, строение и свойства фармакологически активных диметилглицеролоатов кремния // Известия Академии наук. Серия химическая. 2010. № 12. С. 2175–2180.
11. Станиславович Т. И., Кузьмина Т. И., Молчанов А. В. Влияние интраовариальной витрификации на показатели криорезистентности ооцит-кумулясных комплексов свиней // Вопросы ветеринарно-правового регулирования в ветеринарии. 2019. № 4. С. 65–70. DOI: 10.17238/issn2072-6023.2019.4.65.
12. Станиславович Т. И., Кузьмина Т. И. Модификация этапов технологии интраовариальной витрификации ооцитов *Sus Scrofa Domesticus* // Аграрный вестник Урала. 2020. № 8 (199). С. 51–57. DOI 10.32417/1997-4868-2020-199-8-51-57.
13. Villaverde A. I., Fioratti E. G., Penitenti M., Ikoma M. R., Tsunemi M. H., Papa F. O., Lopes M. D. Cryoprotective effect of different glycerol concentrations on domestic cat spermatozoa // Theriogenology. 2013. Vol. 80. No. 7. Pp. 730–737. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2013.06.010.
14. Zhang P. Q., Tan P. C., Gao Y. M., Zhang X. J., Xie Y., Zheng D. N., Zhou S. B., Li Q. F. The effect of glycerol as a cryoprotective agent in the cryopreservation of adipose tissue // Stem cell research & therapy. 2022. Vol. 13. Article number 152. DOI: 10.1186/s13287-022-02817-z.
15. Алимова А. Д., Кундик Ю. В., Станиславович Т. И., Кузьмина Т. И. Влияние диметилглицеролата кремния на жизнеспособность клеток гранулезы из овариальных фолликулов *Sus Scrofa Domesticus* // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2019. № 2. С. 61–63. DOI: 10.17238/issn2072-6023.2019.2.
16. Abazarikia A., Ariu F., Rasekhi M., Zhandi M., Ledda S. Distribution and size of lipid droplets in oocytes recovered from young lamb and adult ovine ovaries // Reproduction, Fertility and Development. 2020. Vol. 32. No. 11. Pp. 1022–1026. DOI: 10.1071/RD20035.



17. Pedroza G. H., Lanzon L. F., Rabagliano M. B., Walker W. L., Vahmani P., Denicol A. C. Exposure to non-esterified fatty acids in vitro results in changes in the ovarian and follicular environment in cattle // *Animal Reproduction Science*. 2022. Vol. 238. Article number 106937. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2022.106937.
18. Dadarwal D., Adams G.P., Hyttel P., Brogliatti G.M., Caldwell S., Singh J. Organelle reorganization in bovine oocytes during dominant follicle growth and regression // *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2015. Vol. 13. Article number 124. DOI: 10.1186/s12958-015-0122-0.
19. Новичкова Д. А., Кузьмина Т. И., Хонина Т. Г. Воздействие кремнийсодержащих соединений на липидом ооцитов *Sus scrofa domesticus* // *Технологии живых систем*. 2018. Т. 15. № 5. С. 58–63. DOI: 10.18127/j20700997-201805-08.
20. Olzmann J. A., Carvalho P. Dynamics and functions of lipid droplets // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2019. Vol. 20. No. 3. Pp. 137–155.
21. Okotrub K. A., Mokrousova V. I., Amstislavsky S. Y., Surovtsev N. V. Lipid Droplet Phase Transition in Freezing Cat Embryos and Oocytes Probed by Raman Spectroscopy // *Biophysical Journal*. 2018. Vol. 7. No. 115 (3). Pp. 577–587. DOI: 10.1016/j.bpj.2018.06.019.
22. Mokrousova V. I., Okotrub K. A., Amstislavsky S. Y., Surovtsev N. V. Raman spectroscopy evidence of lipid separation in domestic cat oocytes during freezing // *Cryobiology*. 2020. Vol. 95. Pp. 177–182. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2020.03.005
23. Fu X.-W., Shi W.-Q., Zhang Q.-J., Zhao X.-M., Yan Ch. L., Hou Y.-P., Zhou G.-B., Fan Zhi-Q., Suo L., Wusiman Ab., Wang Y.-P., Zhu Shi-En. Positive effects of Taxol pretreatment on morphology, distribution and ultrastructure of mitochondria and lipid droplets in vitrification of in vitro matured porcine oocytes // *Animal reproduction science*. 2008. Vol. 115. Pp. 158–168. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2008.12.002.
24. Quinn P. J. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes // *Cryobiology*. 1985. Vol. 22. No. 2. Pp. 128–146. DOI: 10.1016/0011-2240(85)90167-1.
25. Romek M., Gajda B., Krzysztofowicz E., Kepczynski M., Smorag Z. New technique to quantify the lipid composition of lipid droplets in porcine oocytes and pre-implantation embryos using Nile Red fluorescent probe // *Theriogenology*. 2011. Vol. 75 (1). Pp. 42–54. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2010.06.040.
26. McEvoy T., Coull G., Broadbent P., Hutchinson J., Speake B. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida // *Reproduction*. 2000. Vol. 118. No. 1. Pp. 163–170.

#### Об авторах:

Дарья Андреевна Старикова<sup>1</sup>, научный сотрудник, ORCID 0000-0001-5324-4090, AuthorID 693374; +7 911 738-95-12, [live8avis@mail.ru](mailto:live8avis@mail.ru)

Татьяна Ивановна Кузьмина<sup>1</sup>, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией биологии развития, ORCID 0000-0002-4218-6080, AuthorID 78163; +7 921 392-19-47, [prof.kouzmina@mail.ru](mailto:prof.kouzmina@mail.ru)

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения животных – филиал Федерального исследовательского центра животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста, Санкт-Петербург, Россия

## Features of functional activity of lipidome in *Sus scrofa domesticus* oocytes after intraovarian vitrification

D. A. Starikova<sup>1</sup>✉, T. I. Kuzmina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding – Branch of the L. K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Saint Petersburg, Russia

✉E-mail: [live8avis@mail.ru](mailto:live8avis@mail.ru)

**Abstract.** The creation of a cryobank of reproductive cells and tissues opens up the possibility of intensifying the introduction of innovative cellular reproductive technologies into the practice of husbandry, biomedicine, and veterinary medicine. **The aim** of the study was to evaluate the effects of silicon dimethylglycerolate (SDMG) on the morphology of gametes and lipidome of porcine oocytes after intraovarian vitrification (IOV). **Methods.** Fragments (15 × 20 mm) of porcine ovaries were subjected to vitrification, which were exposed to cryoprotective agents (CPA1 and CPA2) for 25 minutes and 15 minutes. Composition: CPA1: 7.5 % ethylene glycol (EG), 7.5 % dimethyl sulfoxide (DMSO), 65 % PBS, with 2M bovine serum albumin (BSA) and CPA2 – 2.0% EG, 20 % DMSO, 60 % PBS, 1M BSA, 0.5 mol/l sucrose. The effectiveness of using SDMG at the studied concentrations on

the cryopreservation of bio objects was assessed by: the morphology of gametes and indicators of the functional activity of the lipidome (morphology, localization and fluorescence intensity of lipid droplets visualized with Nile Red vital dye) in oocytes. **Results.** 0.2 % SDMG does not induce apoptotic processes in granulosa cells, reduces the level of naked cells. Addition of 2 % SDMG into the composition of cryoprotective media, the proportion of gametes with signs of morphological degeneration decreases (from 31 % to 13 %,  $P < 0.001$ ). SDMG contributes to an increase in the level of gametes with positive indicators of the functioning of lipid droplets: the proportion of gametes with diffuse localization increases (from 58 % to 83 %,  $P < 0.001$ ); the level of cells with low fluorescence intensity of the Nile red/lipid droplets complex (from 16 % to 29 %,  $P < 0.05$ ) and the proportion of gametes with lipid granules (47 % vs 68 %,  $P < 0.005$ ) increased. **Scientific novelty.** For the first time, the effects of SDMG on the morphology of female gametes, apoptotic processes in the chromatin of granulosa cells and the functional activity of the lipidome of porcine oocytes under the influence of ultralow temperatures at IOV were identified. The media for IOV of oocyte-cumulus complexes were modernized with the addition of 0.2 % or 2 % SDMG.

**Keywords:** oocyte, pig, lipid droplets, DNA, Nile red, vitrification.

**For citation:** Starikova D. A., Kuz'mina T. I. Osobennosti funktsional'noy aktivnosti lipidoma v ootsitakh *Sus scrofa domestica* pri intraovarial'noy vitrifikatsii [Features of functional activity of lipidome in *Sus scrofa domestica* oocytes after intraovarian vitrification] // Agrarian Bulletin of the Urals. 2022. No. 12 (227). Pp. 62–72. DOI: 10.32417/1997-4868-2022-227-12-62-72. (In Russian.)

**Date of paper submission:** 02.09.2022, **date of review:** 06.10.22, **date of acceptance:** 17.10.22.

### References

1. Shinkaretskaya G. G. Genofond zhivotnykh: problema issledovaniya i sokhraneniya [Animal gene pool: the problem of research and meeting] // Education and Law. 2020. No. 2. Pp. 128–137. (In Russian.)
2. Bojic S., Murray A., Bentley B. L., Spindler R., Pawlik P., Cordeiro J. L., Bauer R., de Magalhães J. P. Winter is coming: the future of cryopreservation // BMC Biology. 2021. Vol. 24. No. 19 (1). DOI: 10.1186/s12915-021-00976-8.
3. Campos L. B., da Silva A. M., Praxedes E. C. G. Vitrification of collared peccary ovarian tissue using open or closed systems and different intracellular cryoprotectants // Cryobiology. 2019. No. 91. Pp. 77–83.
4. Amstislavsky S., Mokrousova V., Brusentsev E., Okotrub K., Comizzoli P. Influence of Cellular Lipids on Cryopreservation of Mammalian Oocytes and Preimplantation Embryos: A Review // Biopreservation and biobanking. 2019. Vol. 17. No. 1. Pp. 76–83. DOI: 10.1089/bio.2018.0039.
5. Asl M. M., Rahbarghazi R., Beheshti R., Alihemmati A., Aliparasti M. R., Abedelahi A. Effects of Different Vitrification Solutions and Protocol on Follicular Ultrastructure and Revascularization of Autografted Mouse Ovarian Tissue // Cell Journal. 2021. Vol. 22. No. 4. Pp. 491–501. DOI: 10.22074/cellj.2021.6877.
6. Ekpo M. D., Xie J., Hu Y., Liu X., Liu F., Xiang J., Zhao R., Wang B., Tan S. Antifreeze Proteins: Novel Applications and Navigation towards Their Clinical Application in Cryobanking // International Journal of Molecular Sciences. 2022. Vol. 27. No. 23 (5). Article number 2639. DOI: 10.3390/ijms23052639.
7. Sarkisyan N. G., Ron' G. I., Tuzankina I. A., Khonina T. G., Larionov L. P., Simbirtsev A. S., Drozdova L. I., Timchenko A. S. Morfologicheskaya otsenka effektivnosti ispol'zovaniya farmakologicheskikh kompozitsiy na osnove kremniyorganicheskogo glitserogidrogelya [Morphological evaluation of the effectiveness of the use of pharmacological compositions based on organosilicon glycerohydrogel] // Immunologiya. 2017. Vol. 38. No. 2. Pp. 91–96. (In Russian.)
8. Shadrina E. V. Sintez i svoystva poliولاتov kremniya i gidrogeley na ikh osnove: avtoref. dis. ... kand. khim. nauk [Synthesis and properties of silicon polyolates and hydrogels based on them: abstract of the dissertation ... candidate of chemistry sciences]. Ekaterinburg, 2011. 26 p. (In Russian.)
9. Barkova A. S., Shurmanova E. I., Khonina T. G., Millstein I.M. Possibilities of using functional biologically active organosilicon compounds in veterinary practice // Agrarian Bulletin of the Urals. 2020. No. 11 (202). Pp. 53–58. DOI: 10.32417/1997-4868-2020-202-11-53-58.
10. Khonina T. G., Larchenko E. Yu., Shadrina E. V., Ganebnykh I. N., Boyko A. A., Matochkina E. G., Kodess M. I., Chupakhin O. N. Sostav, stroenie i svoystva farmakologicheskii aktivnykh dimetilglitserolatov kremniya [Composition, structure and properties of pharmacologically active silicon dimethylglycerolates] // Russian Chemical Bulletin. 2010. No. 12. Pp. 2175–2180. (In Russian.)
11. Stanislavovich T. I., Kuz'mina T. I., Molchanov A. V. Vliyanie intraovarial'noy vitrifikatsii na pokazateli kriorezistentnosti oosit-kumulyusnykh kompleksov sviney [Influence of intraovarian vitrification on indices of cryoresistance of oocyte-cumulus complexes of pigs] // Voprosy veterinarno-pravovogo regulirovaniya v veterinarii. 2019. No. 4. Pp. 65–70. DOI: 10.17238/issn2072-6023.2019.4.65. (In Russian.)

12. Stanislavovich T. I., Kuz'mina T. I. Modifikatsiya etapov tekhnologii intraovarial'noy vitrifikatsii ootsitov Sus Scrofa Domesticus [Modification of the stages of the technology of intraovarian vitrification of oocytes Sus Scrofa Domesticus] // Agrarian Bulletin of the Urals. 2020. No. 8 (199). Pp. 51–57. DOI: 10.32417/1997-4868-2020-199-8-51-57. (In Russian.)
13. Villaverde A. I., Fioratti E. G., Penitenti M., Ikoma M. R., Tsunemi M. H., Papa F. O., Lopes M. D. Cryoprotective effect of different glycerol concentrations on domestic cat spermatozoa // Theriogenology. 2013. Vol. 80. No. 7. Pp. 730–737. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2013.06.010.
14. Zhang P. Q., Tan P. C., Gao Y. M., Zhang X. J., Xie Y., Zheng D. N., Zhou S. B., Li Q. F. The effect of glycerol as a cryoprotective agent in the cryopreservation of adipose tissue // Stem cell research & therapy. 2022. Vol. 13. Article number 152. DOI: 10.1186/s13287-022-02817-z.
15. Alimova A.D., Kundik Yu.V., Stanislavovich T.I., Kuz'mina T.I. Vliyanie dimetilglitserolata kremniya na zhiznesposobnost' kletok granulezy iz ovarial'nykh follikulov Sus Scrofa Domesticus [Effect of silicon dimethylglycerolate on the viability of granulosa cells from ovarian follicles of Sus Scrofa Domesticus] // Voprosy normativno-pravovogo regulirovaniya v veterinarii. 2019. No. 2. Pp. 61–63. DOI:10.17238/issn2072-6023.2019.2.
16. Abazarikia A., Ariu F., Rasekhi M., Zhandi M., Ledda S. Distribution and size of lipid droplets in oocytes recovered from young lamb and adult ovine ovaries // Reproduction, Fertility and Development. 2020. Vol. 32. No. 11. Pp. 1022–1026. DOI: 10.1071/RD20035.
17. Pedroza G. H., Lanzon L. F., Rabaglino M. B., Walker W. L., Vahmani P., Denicol A. C. Exposure to non-esterified fatty acids in vitro results in changes in the ovarian and follicular environment in cattle // Animal Reproduction Science. 2022. Vol. 238. Article number 106937. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2022.106937.
18. Dadarwal D., Adams G.P., Hyttel P., Brogliatti G.M., Caldwell S., Singh J. Organelle reorganization in bovine oocytes during dominant follicle growth and regression // Reproductive Biology and Endocrinology. 2015. Vol. 13. Article number 124. DOI: 10.1186/s12958-015-0122-0.
19. Novichkova D. A., Kuz'mina T. I., Khonina T. G. Vozdeystvie kremniysoderzhashchikh soedineniy na lipidom ootsitov Sus scrofa domesticus [The effect of silicon-containing compounds on the lipidome of Sus scrofa domesticus oocytes] // Tekhnologii zhivyykh sistem. 2018. Vol. 15. No. 5. Pp. 58–63. DOI: 10.18127/j20700997-201805-08. (In Russian.)
20. Olzmann J. A., Carvalho P. Dynamics and functions of lipid droplets // Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2019. Vol. 20. No. 3. Pp. 137–155.
21. Okotrub K. A., Mokrousova V. I., Amstislavsky S. Y., Surovtsev N. V. Lipid Droplet Phase Transition in Freezing Cat Embryos and Oocytes Probed by Raman Spectroscopy // Biophysical Journal. 2018. Vol. 7. No. 115 (3). Pp. 577–587. DOI: 10.1016/j.bpj.2018.06.019.
22. Mokrousova V. I., Okotrub K. A., Amstislavsky S. Y., Surovtsev N. V. Raman spectroscopy evidence of lipid separation in domestic cat oocytes during freezing // Cryobiology. 2020. Vol. 95. Pp. 177–182. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2020.03.005
23. Fu X.-W., Shi W.-Q., Zhang Q.-J., Zhao X.-M., Yan Ch. L., Hou Y.-P., Zhou G.-B., Fan Zhi-Q., Suo L., Wusiman Ab., Wang Y.-P., Zhu Shi-En. Positive effects of Taxol pretreatment on morphology, distribution and ultrastructure of mitochondria and lipid droplets in vitrification of in vitro matured porcine oocytes // Animal reproduction science. 2008. Vol. 115. Pp. 158–168. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2008.12.002.
24. Quinn P. J. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes // Cryobiology. 1985. Vol. 22. No. 2. Pp. 128–146. DOI: 10.1016/0011-2240(85)90167-1.
25. Romek M., Gajda B., Krzysztofowicz E., Kepczynski M., Smorag Z. New technique to quantify the lipid composition of lipid droplets in porcine oocytes and pre-implantation embryos using Nile Red fluorescent probe // Theriogenology. 2011. Vol. 75 (1). Pp. 42–54. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2010.06.040.
26. McEvoy T., Coull G., Broadbent P., Hutchinson J., Speake B. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida // Reproduction. 2000. Vol. 118. No. 1. Pp. 163–170.

#### Authors' information:

Darya A. Starikova<sup>1</sup>, researcher, ORCID 0000-0001-5324-4090, AuthorID 693374; +7 911 738-95-12, [live8avis@mail.ru](mailto:live8avis@mail.ru)

Tatyana I. Kuzmina<sup>1</sup>, doctor of biological sciences, professor, chief researcher, head of the laboratory of developmental biology, ORCID 0000-0002-4218-6080, AuthorID 78163; +7 921 392-19-47, [prof.kouzmina@mail.ru](mailto:prof.kouzmina@mail.ru)

<sup>1</sup>Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding – Branch of the L. K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Saint Petersburg, Russia