

## Ядерно-цитоплазматическое созревание ооцитов *Sus Scrofa Domestica* в условиях сверхнизких температур

Т. И. Кузьмина✉

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

✉E-mail: prof.kouzmina@mail.ru

**Аннотация.** Витрификация женских гамет – важнейший инструмент для решения стратегических задач клеточных репродуктивных технологий в животноводстве, ветеринарии, биомедицине: тиражирование элитных особей (клонирование, трансгенез), сохранение биоразнообразия, ксенотрансплантация органов и др. **Цель** настоящего исследования – оценить показатели ядерно-цитоплазматического созревания (статус хроматина и митохондриальную активность) и компетенции к развитию донорских ооцитов свиней, подвергшихся интра- (ИОВ) или экстраовариальной (ЭОВ) витрификации. **Методы.** Донорские ооциты свиней (в возрасте 6–8 месяцев) витрифицировали экстра- или интраовариально с использованием криопротекторных агентов (диметилсульфоксид, этиленгликоль, трегалоза, сахароза). Состав криопротекторных агентов дополняли 0,001 % наночастицами ВДК (нВДК), Оттаивали ооциты в растворах трегалозы в ТС-199 с 10 % фетальной бычьей сыворотки ФБС. Ооциты культивировали 44 часа в средах, дополненных клетками гранулезы ( $10^6$  клеток на 1 мл среды) и/или 0,001 % нВДК при 38.5 °С, в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. Оплодотворение *in vitro* проводили в соответствии с рекомендациями, представленными нами ранее [17, с. 17]. Функциональную активность митохондрий и статус хроматина в ооцитах оценивали методом двойного окрашивания (красители MitoTracker Orange CMTRos и Hoechst 33258). **Результаты.** Процент созревших ооцитов при совместном использовании в составе среды для культивирования нВДК и клеток гранулезы составил 61 % при ЭОВ и 29 % при ИОВ, а уровень дробящихся эмбрионов при ЭОВ был на 11 % (31 % против 20 %,  $P < 0,05$ ) выше, чем при ИОВ. Максимальные показатели функциональной активности митохондрий среди девитрифицированных ооцитов были отмечены в группе ЭОВ ооцитов, прокультивированных в средах, дополненных нВДК и клетками гранулезы ( $152 \pm 14,9$  мкА). **Научная новизна.** Модернизированы протоколы интра- и экстраовариальной витрификации ооцитов свиней, позволяющие значительно увеличить показатели фертильности девитрифицированных гамет путем введения в состав криопротекторных агентов нВДК и кокультивирования девитрифицированных ооцитов в средах с нВДК и клетками гранулезы.

**Ключевые слова:** ооцит, эмбрион, мейоз, митохондрии, интра- и экстраовариальная витрификация, свинья.

**Для цитирования:** Кузьмина Т. И. Ядерно-цитоплазматическое созревание ооцитов *Sus Scrofa Domestica* в условиях сверхнизких температур // Аграрный вестник Урала. 2023. Т. 23, № 12. С. 83–93. DOI: 10.32417/1997-4868-2023-23-12-83-93.

**Дата поступления статьи:** 28.05.2023, **дата рецензирования:** 17.06.2023, **дата принятия:** 23.10.2023.

## Nuclear cytoplasmic maturation of *Sus Scrofa Domestica* oocytes at ultralow temperatures

T. I. Kuzmina✉

All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals – a branch of the Federal Research Center for Animal Husbandry – VIZH named after Academician L. K. Ernst, Saint Petersburg, Russia

✉E-mail: prof.kouzmina@mail.ru

**Abstract.** Vitrification of female gametes is the most important tool for solving the strategic tasks of cellular reproductive technologies in animal husbandry, veterinary medicine and biomedicine: replication of elite individuals (cloning, transgenesis), biodiversity conservation, organ xenotransplantation. **The aim** of this study was to evaluate the parameters of nuclear cytoplasmic maturation (chromatin status and mitochondrial activity) and developmental competence of donor porcine oocytes subjected to intra- (IOV) or extra-ovarian (EOV) vitrification and cultured in various maturation systems. **Methods.** Donor pig oocytes (6–8 months old) were vitrified extra- or intraovarily using cryoprotective agents (DMSO, ethylene glycol, trehalose, sucrose). The composition of cryoprotective agents was supplemented with 0.001 % highly dispersed silica nanoparticles (HDSns). Oocytes were thawed in trehalose solutions in TS-199 with 10 % of fetal bovine serum (FBS). Oocytes were cultured for 44 hours in media supplemented with granulosa cells ( $10^6$  cells per ml of medium) and/or 0.001% of HDSns at 38.5 °C, in an atmosphere of 5 % CO<sub>2</sub>. Fertilization in vitro was carried out in accordance with the recommendations presented by us earlier [17. p. 17]. The functional activity of mitochondria and the status of chromatin in oocytes were assessed by double staining using MitoTracker Orange CMTMRos and Hoechst 33258 dyes. **Results.** The level of matured oocytes was 61 % at EOV and 29 % at IOV, and the level of cleavage embryos in EOV was in 11 % (31 % vs. 20 %,  $P < 0.05$ ) higher than at IOV when HDSns with granulosa cells were added in culture media. The maximum indicators of the functional activity of mitochondria among devitrified oocytes were in the group of EOV oocytes have cultured in media supplemented with HDSns and granulosa cells ( $152 \pm 14.9 \mu\text{A}$ ). **Scientific novelty.** The protocols for intra- and extra-ovarian vitrification of porcine oocytes have been modernized. Addition to cryoprotective agents and culture media of HDSns and co-culture of devitrified oocytes with granulosa cells significantly increased the fertility rates of devitrified gametes.

**Keywords:** oocyte, embryo, meiosis, mitochondria, intra- and extra-ovarian vitrification, pig.

**For citation:** Kuzmina T. I. Yaderno-tsitoplazmaticheskoe sozrevanie oositov *Sus Scrofa Domesticus* v usloviyakh sverkhnizkikh temperatur [Nuclear cytoplasmic maturation of *Sus Scrofa Domesticus* oocytes at ultralow temperatures] // Agrarian Bulletin of the Urals. 2023. Vol. 23, No. 12. Pp. 83–93. DOI: 10.32417/1997-4868-2023-23-12-83-93. (In Russian.)

**Date of paper submission:** 28.05.2023, **date of review:** 17.06.2023, **date of acceptance:** 23.10.2023.

### Постановка проблемы (Introduction)

Интенсификация внедрения инновационных клеточных репродуктивных технологий в практику животноводства, ветеринарию, биомедицину, сохранение исчезающих видов и пород обуславливает необходимость создания криобанков женских репродуктивных клеток и тканей животных [1, с. 132]. Производство эмбрионов свиней *in vitro* имеет большое значение не только для понимания биологических процессов функционирования организма, получения высокопродуктивных животных, но и для производства трансгенных свиней с целью создания моделей для изучения различных заболеваний и для ксенотрансплантации органов [2, с. 113; 3, с. 2]. *Sus Scrofa Domesticus* – важная экспериментальная модель, поскольку этот вид имеет анатомическое, биохимическое и эндокринное сходство с *Homo sapiens* [3, с. 2]. Витрификация ооцитов – перспективный метод для вспомогательных репродуктивных технологий у человека, имеющий большой потенциал для бессрочного хранения женских гамет у сельскохозяйственных и домашних животных, исчезающих видов [4, с. 2; 5, с. 1]. Успешная криоконсервация ооцитов млекопитающих оказалась очень сложной задачей из-за морфологических и физиологических характеристик этих самых больших клеток в организме животного [6, с. 205]. Ооциты чувствительны, в первую очередь, к охлаждению из-за высокого

содержания воды, большого размера и уникальной клеточной структуры. Витрификация в основном используется для криоконсервации женских гамет [7, с. 88]. Эта техника позволяет поддерживать жизнеспособность, функционирование клеточных компартментов и потенциал развития ооцита при низких температурах в жидком азоте (при температуре 196 °C). Воздействие криопротекторов и очень быстрое охлаждение вызывают деструктивные морфологические и молекулярные изменения в ооците и его органеллах, что в итоге приводит к снижению показателей фертильности девитрифицированных женских гамет [8, с. 16]. Несмотря на несомненный прогресс, показатели успеха, измеряемые количеством жизнеспособных бластоцист, полученных из девитрифицированных женских гамет животных, незначительны [9, с. 168]. Ключевыми факторами, определяющими прогресс в совершенствовании технологии витрификации женских гамет, являются разработка модели витрификации (интра- или экстраовариальная), состав криопротекторных агентов, стадия мейоза ооцита. Использующиеся в настоящее время криопротекторы, которые призваны обеспечить защиту клеток при охлаждении и нагревании, зачастую неэффективны, поскольку токсичны и снижают жизнеспособность ооцитов в результате нарушения структуры клеточного цитоскелета, целостности хроматина [10, с. 7]. Модерни-

зация состава криопротекторных сред – актуальная задача эмбрио- и криотехнологов. Использование в технологии витрификации и экстракорпорального созревания женских гамет сельскохозяйственных животных наночастиц высокодисперсного кремнезема базируется на антиоксидантных свойствах последних, что позволяет снизить негативные последствия деструктивных эффектов сверхнизких температур [11, с. 24; 12, с. 5; 13, с. 778] на функционирование интрацеллюлярных компартментов ооцита. *In vivo* яйцеклетка формируется в микроокружении фолликулярных клеток (гранулеза, кумулюс), функциональная активность которых детерминирует завершение процессов ядерно-цитоплазматического созревания гамет. Целостность клеток кумулюса, их коммуникации с ооцитом обеспечивает физиологические процессы, определяющие реинициацию и прохождение мейоза [14, с. 2]. Ранее в наших исследованиях показан позитивный эффект системы экстракорпорального созревания нативных женских гамет *Sus Scrofa Domesticus*, составляющими которой являлись наночастицы высокодисперсного кремнезема и клетки гранулезы, на показатели фертильности ооцитов *in vitro* [15, с. 238]. В настоящем исследовании проанализированы эффекты сверхнизких температур на показатели жизнеспособности ооцитов свиней в условиях воздействия ультранизких температур.

Цель исследования – оценить показатели ядерно-цитоплазматического созревания (статус хроматина и митохондриальную активность) и компетенции к развитию донорских ооцитов свиней, подвергшихся интра- или экстраовариальной витрификации и прокультивированных в различных системах созревания.

#### Методология и методы исследования (Methods)

В исследовании использовали постмортальные яичники свиней (*Sus Scrofa Domesticus*) породы ландрас в возрасте 6–8 месяцев. После овариоэкто-

мии яичники, помещенные в термос (температура 30–38 °С) в 0,9-процентный раствор NaCl с антибиотиками (100 МЕ/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина и 0,25 нг/мл амфотерицина В) доставляли с бойни Мясоперерабатывающего комбината «Тосненский» в лабораторию (время транспортировки – 40 минут) и ранжировали в соответствии со стадией овариального цикла. Для экстраовариальной витрификации использовали ооцит-кумулюсные комплексы, извлеченные из фолликулов яичников на стадии фолликулярного роста, с высоким тургором, обширной сетью капилляров, размером 3–6 мм (рис. 1).

До помещения ооцит-кумулюсных комплексов в криопротекторные среды гамету подвергали морфологической оценке с учетом следующих показателей: морфология клеток кумулюса (количество слоев и степень экспансии); целостность ооцит-кумулюсных коммуникаций и оболочки ооцита, ширина зоны пеллюцида; структура ооплазмы (гомогенная, гетерогенная, наличие инклюзивных свободноплавающих телец). Только ооциты с равномерной по ширине зоной пеллюцида, гомогенной ооплазмой, окруженные плотным кумулюсом (не менее чем 5–6 слоев), подвергали процедуре витрификации. Отобранные для экстраовариальной витрификации ооцит-кумулюсные комплексы поэтапно обрабатывали растворами криопротекторных агентов (КПА), которые готовили на ТС-199 с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС, HyClone, Великобритания). Состав КПА: КПА-1 – 0,7 М диметилсульфоксид (DMSO) и 0,9 М этиленгликоль (EG); КПА-2 – 1,4 М DMSO и 1,8 М EG; КПА-3 – 2,8 М DMSO, 3,6 М EG и 0,65 М трегалоза (Trehalose). Растворы КПА для витрификации ооцитов дополняли 0,001 % наночастицами ВДК (нВДК, размер 4–17 нм), синтезированных в ИХП им. А. А. Чуйко НАН Украины путем высокотемпературного гидролиза. нВДК использовали в виде стабильной суспензии, состоящей преимущественно из субмикронных агрегатов. При выборе концентрации руководствовались указаниями разработчиков и результатами проведенной нами ранее серии экспериментов по влиянию наночастиц ВДК на функционирование репродуктивных клеток сельскохозяйственных животных [15, с. 238; 16, с. 165]. Длительность пребывания ооцит-кумулюсных комплексов в КПА составляла 30 с в КПА-1, затем 30 с в КПА-2 и 20 с в КПА-3. После обработки криопротекторами пайеты с ОКК помещали в сосуды Дьюара с жидким азотом, где они находились не менее 3 часов. Оттаивание ОКК проводили, последовательно помещая их в 0,25 М раствор трегалозы в ТС-199 с 10 % ФБС (3 мин., 37 °С), затем в 0,19 М раствор трегалозы (3 мин., 37 °С) и 0,125 М раствор трегалозы (3 мин., 37 °С). Отмыв клеток проводили трижды в ТС-199 с 10 % ФБС. При ин-

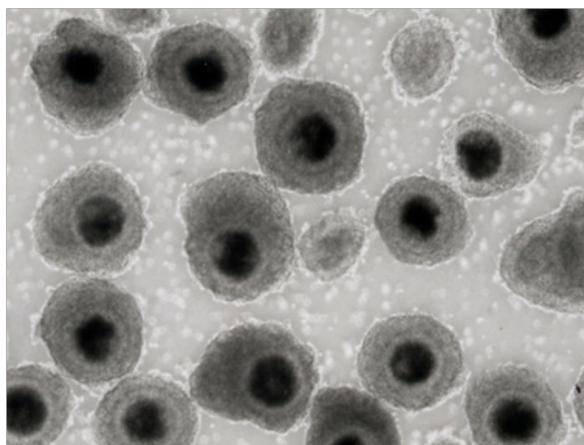


Рис. 1. Ооцит-кумулюсные комплексы *Sus Scrofa Domesticus* (увеличение  $\times 40$ )  
Fig. 1. Oocyte-cumulus complexes of *Sus Scrofa Domesticus* (magnification  $\times 40$ )

траовариальной витрификации препарированные яичники делили на 6–8 секций (15 × 20 мм), помещали в стерильные марлевые мешочки и опускали поэтапно в растворы КПА, приготовленные на основе фосфатного буферного раствора Дюльбекко (ФБР) с добавлением 20 % ФБС: КПА-1 – 7,5 % ЭГ + 7,5 % ДМСО (15 мин.), затем в КПА-2 – 15 % ЭГ, 15 % ДМСО и 0,5 М сахарозы (2 мин.). Стерильные марлевые мешочки с фрагментами яичников погружали в сосуды Дьюара с жидким азотом (–196 °С) не менее чем на 3 ч. Аспирированные из оттаявших в ФБР фрагментов (экспозиция 3 мин. при температуре 37 °С) ооциты последовательно обрабатывали 0,5 М (1 мин.) и 0,25 М (5 мин.) растворами трегалозы, приготовленными на основе ФБР с 20 % ФБС. Клетки отмывали от трегалозы трижды в ТС-199 с 10 % ФБС.

Перспективные к созреванию *in vitro* после морфологической оценки девитрифицированные ОКК (40–50 шт.) помещали в капли (объемом 500 мкл) сред для созревания следующего состава:

1. Контроль – среда North Carolina State University-23 (NCSU-23) + 10 % фолликулярной жидкости (из фолликулов диаметром 3–6 мм), 10 МЕ хорионического гонадотропина человека, 10 МЕ хорионического гонадотропина лошади + 50 мкг/мл гентамицина.

2. Контроль + 0,001 % нВДК.

3. Контроль + клетки гранулы (10<sup>6</sup> клеток на 1 мл среды).

4. Контроль + 0,001 % нВДК + клетки гранулы (10<sup>6</sup> клеток на 1 мл среды).

Через 22 ч проводили смену сред с исключением во всех исследуемых группах гормональных добавок и последующим культивированием еще в течение 22 ч при температуре 38,5 °С, в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>.

Оплодотворение *in vitro* проводили в модифицированной среде mTBM, содержащей 113,1 мМ NaCl, 3,0 мМ KCl, 7,5 мМ CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 20,0 мМ Трис, 11,0 мМ глюкозы, 5,0 мМ натрия пирувата, 1 мМ кофеина и 0,1 % BSA. После 44 ч культивирования ооциты очищали от клеток кумулюса. Затем в количестве 10 шт. помещали в капли среды mTBM (объемом 90 мкл под парафиновым маслом) в 35 мм чашки для культивирования на 30 мин. в CO<sub>2</sub>-инкубатор для эквивалентности. Оплодотворяли ооциты нативной спермой (исходная концентрация в разбавителе 3 × 10<sup>9</sup> сперматозоидов на 1 мл). После трехкратного центрифугирования 10 мл суспензии сперматозоидов (80 г в течение 3 мин. при комнатной температуре) осадок ресуспендировали в 10 мл DPBS с 0,1 % BSA и доводили концентрацию сперматозоидов до 2 · 10<sup>6</sup> кл/мл. 16 мкл суспензии сперматозоидов добавляли в капли с ооцитами объемом 90 мкл и культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 38,5 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> и 90 % влажности.

Через 6 ч после инкубирования со сперматозоидами ооциты были перенесены в 500 мкл среды NCSU-23 с 0,4 % BSA для культивирования в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 7 дней при температуре 38,5 °С в атмосфере 5 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> и 90 % N<sub>2</sub> со сменой среды через каждые 48 ч культивирования.

Функциональную активность митохондрий и статус хроматина в ооцитах оценивали методом двойного окрашивания с использованием красителей MitoTracker Orange CMTMRos (Thermo Fisher Scientific, Великобритания) и Hoechst 33258 (2,5 мкг/мл, Thermo Fisher Scientific, Великобритания), описанных нами ранее [17, с. 22].

Реагенты, использованные в экспериментах, за исключением обозначенных в тексте статьи, производства компании Sigma-Aldrich (США), пластиковая лабораторная посуда – BD Falcon™ (Becton Dickinson and Co., BD Biosciences, США).

Результаты обрабатывали с использованием статистической программы Sigma Stat (Jandel Scientific Software, США). Для оценки достоверности переменных частотных значений использовали критерий  $\chi^2$  Пирсона и *t*-критерий Стьюдента. Значимость различий сравниваемых значений оценивали при следующих уровнях:  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  и  $p < 0,001$  для трех независимых экспериментов.

### Результаты (Results)

Яйцеклетка животного формируется *in vivo* из ооцита, завершившего фазу роста, реиницировавшего и завершившего мейоз в антральном фолликуле с вовлечением в вышеуказанные процессы клеток кумулюса и гранулы. Фертильность гамет оценивается их компетентностью к завершению мейоза (ядерно-цитоплазматическое созревание) и развитием из них биологически полноценных эмбрионов. Наши эксперименты были направлены на моделирование состава сред для созревания ооцитов свиней, подвергшихся интра- или экстраовариальной витрификации. С учетом полученных ранее результатов о позитивном влиянии наночастиц хитозана и высокодисперсного кремнезема и роли клеток гранулы в выше обозначенных эффектах [15, с. 348; 18, с. 349] цель исследования заключалась в идентификации особенностей функционирования структурных компонентов женских гамет после их экстра- или интраовариальной витрификации и культивирования в средах совместно с клетками гранулы и нВДК. В наших экспериментах проанализированы показатели ядерного созревания (рис. 2) и функциональной активности митохондрий (интенсивность флуоресценции красителя MitoTracker Orange CMTMRos) в нативных и девитрифицированных ооцитах свиней (рис. 3).

Всего 1166 ооцитов подверглось цитологическому анализу. Результаты оценки статуса хроматина гамет представлены на рис. 4. Лучшие результаты получены во всех экспериментальных группах,

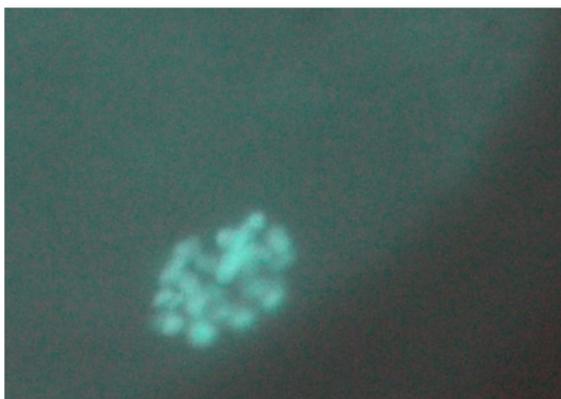


Рис. 2. Репрезентативное изображение хроматина ооцита на стадии метафазы II в девитрифицированном ооците *Sus Scrofa Domesticus* (окраска Hoechst 33258, увеличение  $\times 400$ )

Fig. 2. Representative image of oocyte chromatin at the metaphase II stage in a devitrified *Sus Scrofa Domesticus* oocyte (Hoechst 33258 stain, magnification  $\times 400$ )

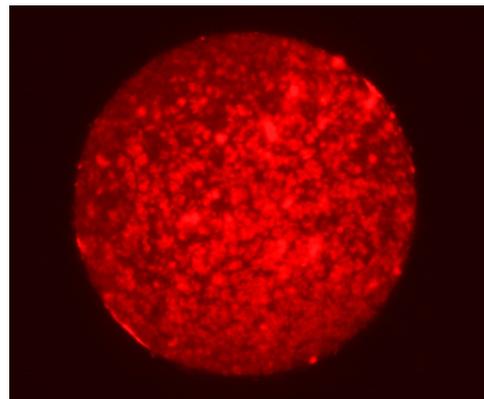


Рис. 3. Репрезентативное изображение митохондрий в девитрифицированном ооците *Sus Scrofa Domesticus* на стадии метафазы II (окраска флуоресцентным зондом MitoTracker Orange MTMRos, увеличение  $\times 400$ )

Fig. 3. Representative image of mitochondria in devitrified *Sus Scrofa Domesticus* oocytes at metaphase II stage (staining with a MitoTracker Orange MTMRos fluorescent probe, magnification  $\times 400$ )

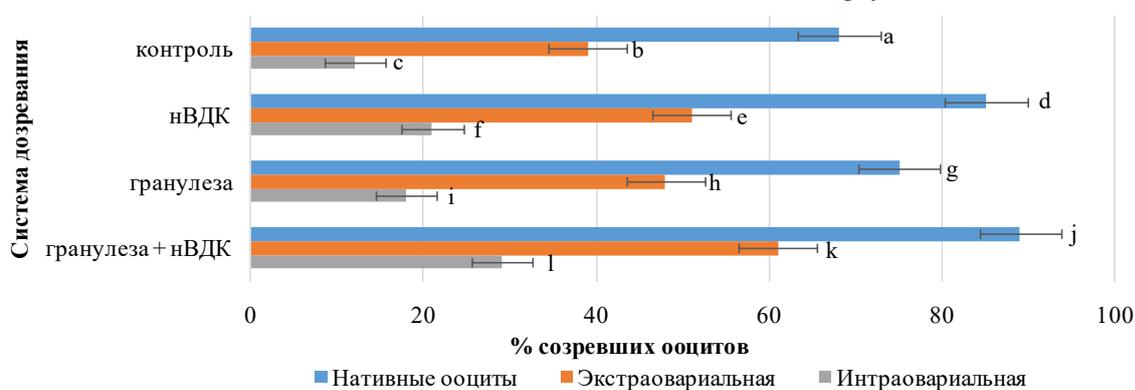


Рис. 4. Ядерное созревание в нативных и девитрифицированных (экстра- или интраовариально) ооцитах свиней после культивирования в различных системах (время культивирования – 44 ч, количество ооцитов – 1166, число экспериментов – 5),  $c^b, c^a, f^e, f^d, i^h, i^g, l^k, l^j, b^a, e^d, h^g, k^j, a^j P < 0,001, b^k P < 0,005, a^d, g^j P < 0,01, c^l P < 0,005, \chi^2\text{-test}$

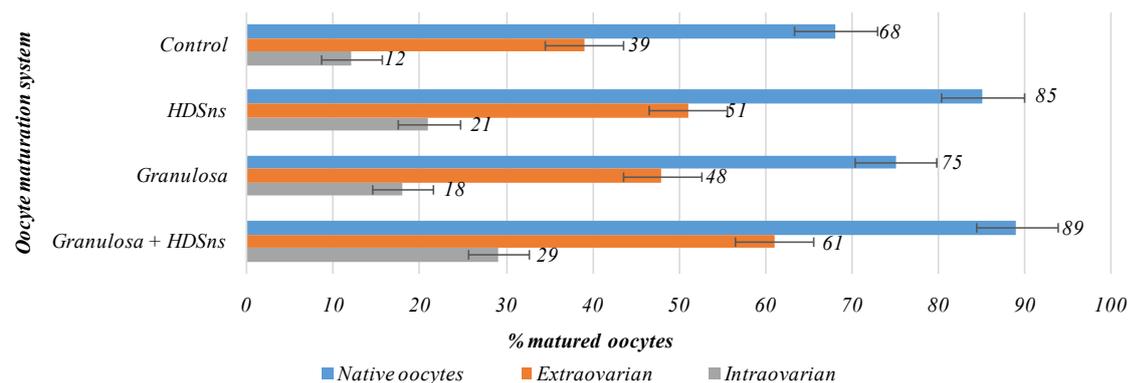


Fig. 4. Nuclear maturation of native and devitrified (extra- or intra-ovarian) porcine oocytes after culture in various systems (culture time – 44 hours, number of oocytes – 1166, number of experiments – 5),  $c^b, c^a, f^e, f^d, i^h, i^g, l^k, l^j, b^a, e^d, h^g, k^j, a^j P < 0,001, b^k P < 0,005, a^d, g^j P < 0,01, c^l P < 0,005, \chi^2\text{-test}$

где после оттаивания ооциты культивировали совместно с клетками гранулезы и нВДК. Так, более половины ооцитов, витрифицированных экстраовариально (61 %), достигли завершающей стадии созревания (метафаза II), при интраовариальной витрификации доля созревших клеток была 29 %, при этом данные показатели оказались достоверно ниже процента завершающих свое созревание на-

тивных клеток (89 %,  $P \leq 0,001$ ) (рис. 4). В целом введение в протоколы культивирования как отдельно нВДК или клеток гранулезы, так и совместное их использование при экстракорпоральном созревании значительно повысило показатели криорезистентности хроматина ооцитов. При этом максимальный позитивный эффект отмечен при их совместном использовании.

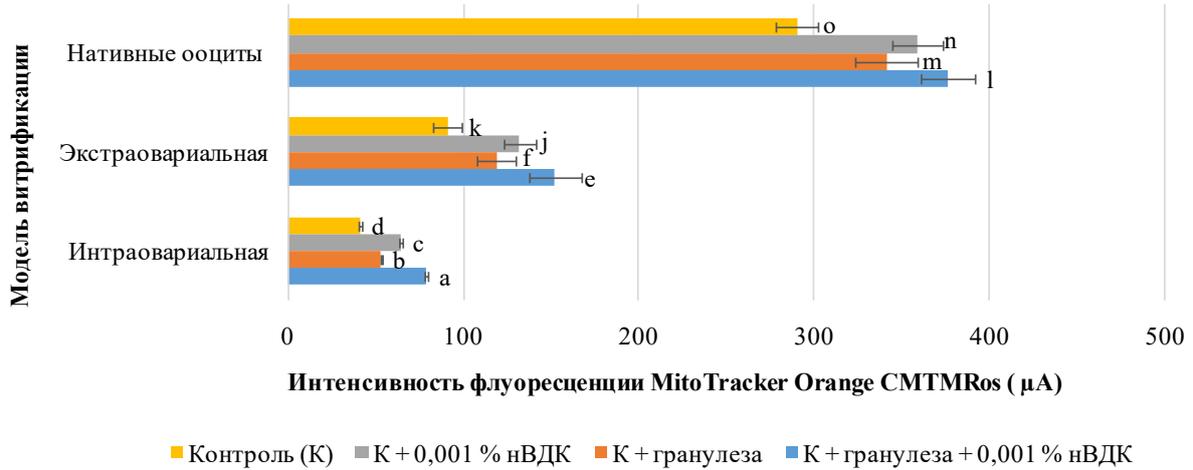


Рис. 5. Интенсивность флуоресценции MitoTracker Orange CMTMRos (мкА) в ооцитах, прокультивированных в различных системах после интра- или экстраовариальной витрификации (время культивирования – 22 ч, количество ооцитов – 367, число экспериментов – 3),  $a,b,a,d,a,e,c,d,c,j,c,f,d,f,d,j,d,k,e,f,e,k,n,o,j,k P < 0,05, a,j,b,f,b,j,b,k,c,e P < 0,01, a,f,a,k,a,l,a,m, a,n,a,o,b,l,b,m,b,n,b,o,c,k,c,l,c,m,c,n,c,o,d,l,d,m,d,n,d,o,e,l,e,m,e,n,e,o,f,l,f,m,f,n,f,o,j,l,j,m,j,n,j,o,k,l,k,m,k,n,k,o P < 0,001, t$ -критерий Стьюдента

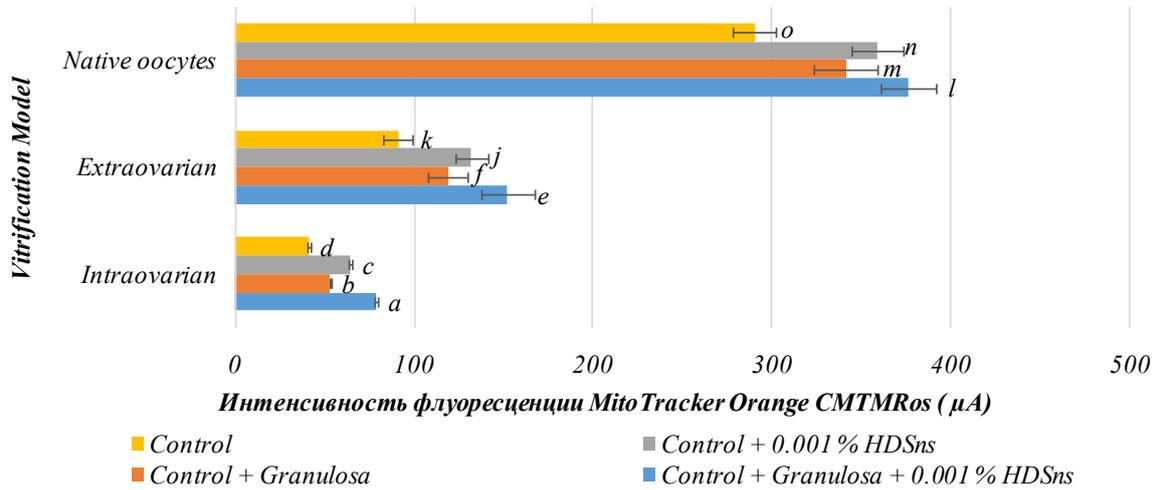


Fig. 5. Fluorescence intensity of MitoTracker Orange CMTMRos ( $\mu A$ ) in oocytes cultured in different systems after intra- or extra-ovarian vitrification (time of culture – 22 h, number of oocytes – 367, number of experiments – 3),  $a,b,a,d,a,e,c,d,c,j,c,f,d,f,d,j,d,k,e,f,e,k,n,o,j,k P < 0,05, a,j,b,f,b,j,b,k,c,e P < 0,01, a,f,a,k,a,l,a,m, a,n,a,o,b,l,b,m,b,n,b,o,c,k,c,l,c,m,c,n,c,o,d,l,d,m,d,n,d,o,e,l,e,m,e,n,e,o,f,l,f,m,f,n,f,o,j,l,j,m,j,n,j,o,k,l,k,m,k,n,k,o P < 0,001, Student's t$ -test

В следующей серии экспериментов (рис. 5) оценивались показатели функциональной активности митохондрий. Митохондрии обеспечивают клетку аденозинтрифосфатом, необходимым для завершения мейотического созревания, особенности их функционирования – один из биомаркеров функционального состояния гаметы и ее качества [19, с. 696]. Уровень митохондриальной активности оценивали через 22 ч культивирования. В группе интраовариально витрифицированных ооцитов митохондриальный потенциал (в качестве маркера функциональной активности митохондрий использовали показатели интенсивности флуоресценции MitoTracker Orange CMTMRos в мкА) был значительно снижен по сравнению с ооцитами, витрифицированными экстраовариально ( $41 \pm 1,1$  мкА против  $91 \pm 8,3$  мкА соответственно,  $P \leq 0,05$ ) (рис. 5). В группе нативных ооцитов показатель интен-

сивности флуоресценции MitoTracker Orange CMTMRos составил  $290 \pm 11,9$  мкА. Максимальные показатели среди девитрифицированных ооцитов были отмечены в группе экстраовариально витрифицированных ооцитов, прокультивированных в средах, дополненных нВДК и клетками гранулезы ( $152 \pm 14,9$  мкА). Девитрифицированные ооциты всех экспериментальных групп отличались низкими показателями интенсивности флуоресценции MitoTracker Orange CMTMRos от таковой в группе нативных ооцитов.

Данные по оценке фертильности ооцитов представлены на рис. 6–8. Уровень дробления при интраовариальной витрификации в контрольной группе не превысил 1 %, совместное введение нВДК и клеток гранулезы в среду дозревания повысило вышеуказанный показатель до 21 %, в этой же группе 1 эмбрион достиг стадии поздней морулы (рис. 6).

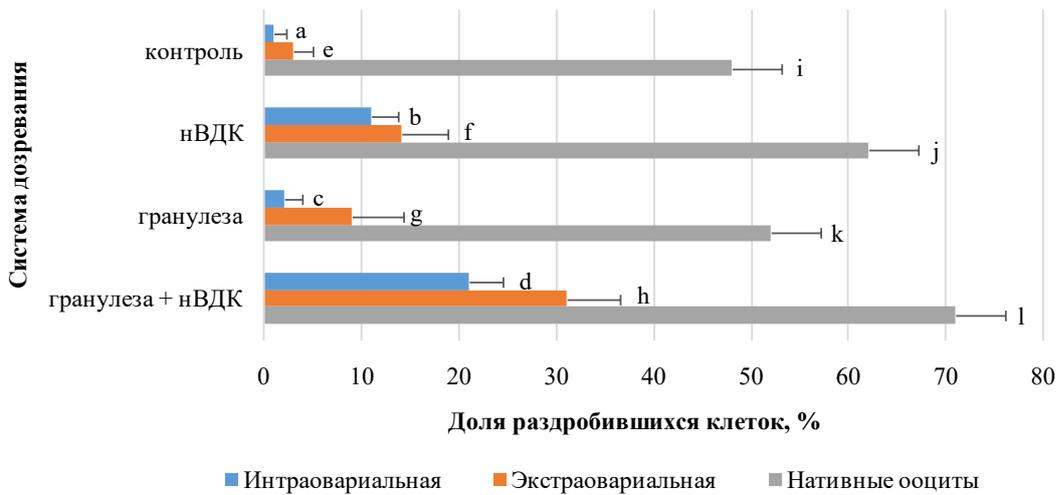


Рис. 6. Выход раздробившихся клеток (%), развившихся из ооцитов, прокультивированных в различных системах после интра- или экстраовариальной витрификации (количество ооцитов – 1509, число экспериментов – 4),  $b,d; b,e; i,j; d,h$   $P < 0,05$ ;  $a,g; b,c; b,h; b,i; b,j; b,k; b,l; c,g; d,g; e,f; f,h; h,i; k,l$   $P < 0,01$ ;  $a,b; a,d; a,f; a,h; a,i; a,j; a,k; a,l; c,d; e,f; e,h; e,i; e,j; e,k; e,l; d,e; d,i; d,j; d,k; d,l; e,h; e,i; e,j; e,k; e,l; f,l; f,j; f,k; f,l; g,h; g,i; g,j; g,k; g,l; h,j; h,k; h,l; i,l$   $P < 0,001$ ,  $\chi^2$ -test

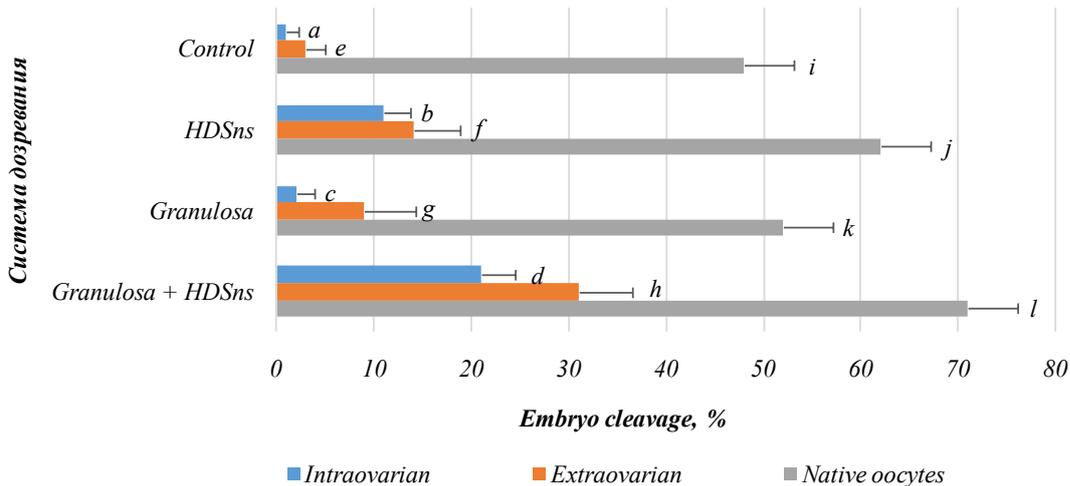


Fig. 6. Level of cleavage (%) of embryos developed from oocytes cultured in various systems after intra- or extra-ovarian vitrification (number of oocytes – 1509, number of experiments – 4),  $b,d; b,e; i,j; P < 0,05$ ,  $a,g; b,c; b,h; b,i; b,j; b,k; b,l; c,g; d,g; e,f; f,h; h,i; k,l$   $P < 0,01$ ;  $a,b; a,d; a,f; a,h; a,i; a,j; a,k; a,l; c,d; e,f; e,h; e,i; e,j; e,k; e,l; d,e; d,i; d,j; d,k; d,l; e,h; e,i; e,j; e,k; e,l; f,l; f,j; f,k; f,l; g,h; g,i; g,j; g,k; g,l; h,j; h,k; h,l; i,l$   $P < 0,001$ ,  $\chi^2$ -test

При добавлении в состав среды для культивирования интравариально витрифицированных ооцитов только гранулезных клеток достоверных различий в доле раздробившихся клеток не обнаружено. Положительный эффект (увеличение уровня дробления с 1 % до 11 %,  $P < 0.01$ ) выявлен также при дополнении состава культуральных сред интравариально витрифицированных ооцитов нВДК.

Доля дробящихся клеток значительно увеличилась при использовании в системе дозревания экстраовариально витрифицированных ооцитов с нВДК (3 % в контроле против 14 %,  $P < 0,01$ ) и при совместном использовании нВДК и клеток гранулезы (3 % в контроле против 31 %,  $P < 0,001$ ).

Результаты анализа потенций раздробившихся зигот к развитию до доимплантационных эмбрионов (рис. 7) представлены на рис. 8.

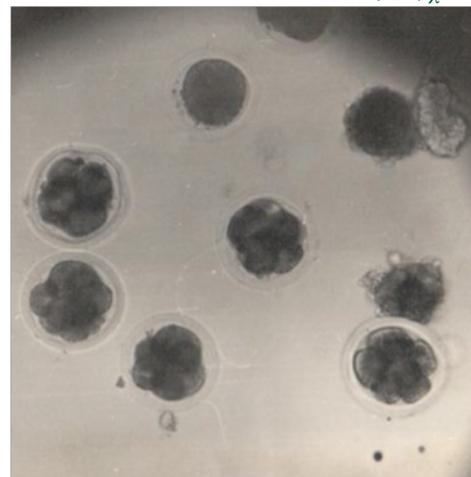


Рис. 7. Доимплантационные эмбрионы *Sus Scrofa Domestica* (увеличение  $\times 100$ )  
Fig. 7. Pre-implantation embryos of *Sus Scrofa Domestica* (magnification  $\times 100$ )

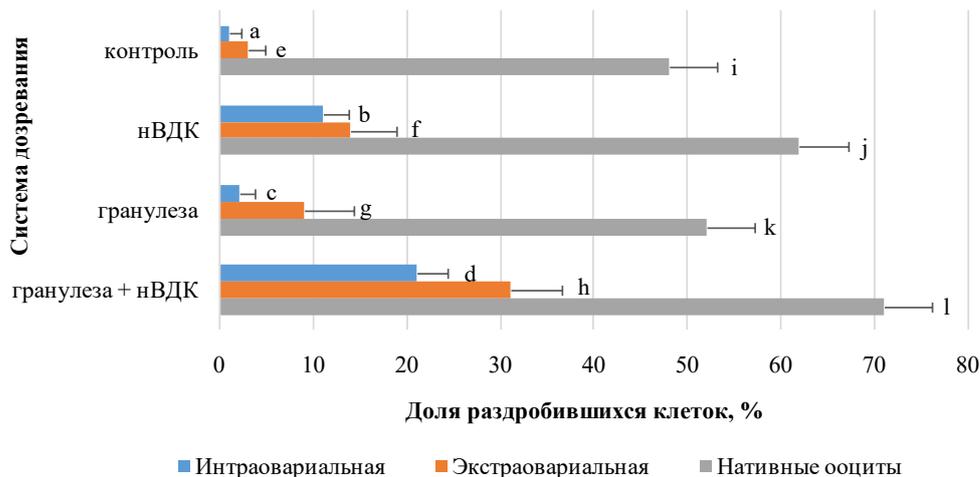


Рис. 8. Выход эмбрионов на стадиях поздней морулы и бластоцисты из ооцитов, прокультивированных в различных системах после интра- или экстраовариальной витрификации (количество ооцитов – 1509, число экспериментов – 4),  $m, r; m, s; n, s; o, r; o, s; q, r; q, s; t, u; v, x P < 0,05$ ;  $n, r; r, u; p, t; t, w P < 0,01$ ;  $m, t; m, u; m, v; m, w; m, x; n, t; n, u; n, v; n, x; o, t; o, u; o, v; o, w; o, x; p, u; p, v; p, w; p, x; q, t; q, u; q, v; q, w; q, x; r, v; r, w; r, x; s, u; s, v; s, w; s, x; t, v; t, x; u, x; v, x P < 0,001, \chi^2\text{-test}$

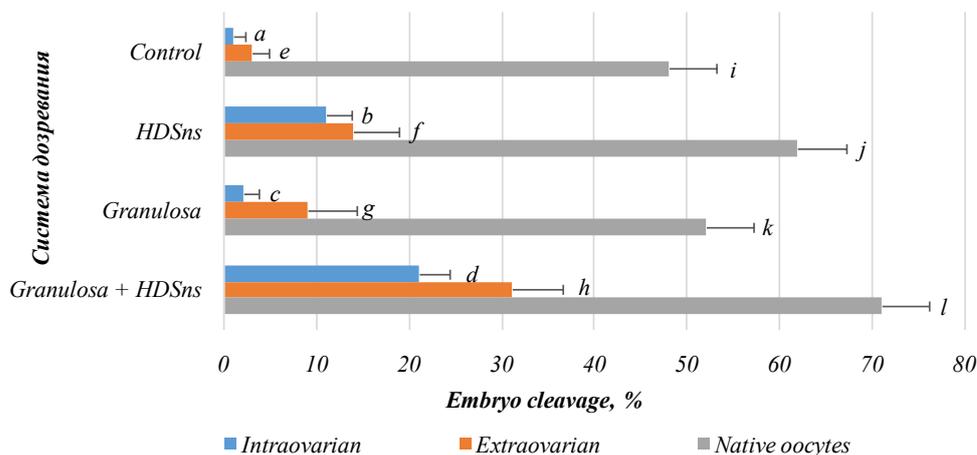


Fig. 8. Development of embryos from oocytes cultured in various systems after intra- or extra-ovarian vitrification (number of oocytes – 1509, number of experiments – 4),  $m, r; m, s; n, s; o, r; o, s; q, r; q, s; t, u; v, x P < 0,05$ ;  $n, r; r, u; p, t; t, w P < 0,01$ ;  $m, t; m, u; m, v; m, w; m, x; n, t; n, u; n, v; n, x; o, t; o, u; o, v; o, w; o, x; p, u; p, v; p, w; p, x; q, t; q, u; q, v; q, w; q, x; r, v; r, w; r, x; s, u; s, v; s, w; s, x; t, v; t, x; u, x; v, x P < 0,001, \chi^2\text{-test}$

Использование в системе дозревания совместно с соматическими клетками фолликула наночастиц высокодисперсного кремнезема благоприятно сказалось на формировании эмбрионов при пролонгированном культивировании. Так, уровень эмбрионов на стадиях поздней морулы и бластоцисты в группе, где развивались эмбрионы из экстраовариально витрифицированных ооцитов, созревших в присутствии клеток гранулезы и нВДК, составил 9 % (рис. 8).

Следует отметить, что работы по экстраовариальной витрификации женских гамет свиней находятся на уровне исследовательских проектов и до сих пор, начиная с 2014 года [3, с. 6], когда японские исследователи получили живое потомство из витрифицированных на стадии зародышевого пузырька ооцитов свиней, выход эмбрионов на стадии поздней морулы и бластоцисты не превышает 5–7 %, при интраовариальной витрификации аналоги наших экспериментов отсутствуют. Анализ

полученных данных выявил четко выраженный положительный эффект совместного использования нВДК с клетками гранулезы в протоколах экстракорпорального созревания как нативных, так и девитрифицированных ооцитов.

#### Обсуждение и выводы (Discussion and Conclusion)

Создание криобанка донорских ооцитов животных – ключ к решению многих проблем, связанных с совершенствованием и повышением эффективности внедрения клеточных репродуктивных технологий в практику животноводства, ветеринарию, биомедицину. Витрификация незрелых ооцитов у животных позволит использовать большее количество гамет, т. к. яичники животных содержат огромное количество рекрутированных и «спящих» фолликулов с ооцитами на стадии диплотены. Для сохранения жизнеспособности витрифицированных женских гамет животных криобиологами и эмбриологами разработаны криопротекторные агенты и предложены среды для культивирования ооцитов

разных видов животных, однако фертильность девитрифицированных ооцитов и их компетентность к оплодотворению продолжает оставаться на низком уровне. Наши исследования были направлены на разработку сред для дозревания донорских ооцитов, витрифицированных интра- или экстраовариально. С учетом результатов выполненных ранее экспериментов, свидетельствующих о позитивном влиянии клеток гранулезы и наночастиц высокодисперсного кремнезема на показатели фертильности нативных свиных ооцитов, среды для созревания девитрифицированных ооцитов дополняли гранулезными клетками и нВДК. В своих исследованиях мы опирались на знания о характере деструктивных изменений на ооцит-кумуляные взаимодействия и имеющиеся сведения о росте уровня генерации активных форм кислорода в клетках, подвергшихся обработке ультранизкими температурами. Полученные результаты свидетельствуют об увеличении доли ооцитов, реиницировавших и завершивших мейотическое созревание. Как известно, после девитрификации процент денудированных ооцитов возрастает, а введение в систему дозревания клеток гранулезы (продуцентов целого комплекса биологически важных модуляторов формирования яйцеклетки), по-видимому, восполняет продукцию оставшихся после витрификации клеток кумулюса. Целесообразность превентивной обработки донорских ооцитов нВДК и их введение в состав культуральных сред мы обосновывали антиоксидантными свойствами нВДК и возможностью снижения ими температуры замораживания. При замораживании мембран митохондрий, истощенных по холестерину, фазово-структурные переходы липидов из жидкокристаллического в гель-состояние и их латеральное разделение охватывают весь липидный бислой. В области фазового перехода липидных молекул более упорядоченные области мембраны существуют с разупорядоченными (жидкими), что ведет к фазовому разделению липидов и появлению трансмембранных дефектов. На фоне латерального разделения липидов возникает разупорядочивание белковых молекул, а позже их слияние в агрегированные структуры. Наночастицы высокодисперсного кремнезема способствуют снижению фазового

перехода липидов к более низким температурам (укорочение диапазона фазового перехода), что снижает степень сближения белков и образования белковых агрегатов. Также адсорбция наночастиц (отрицательно заряженных) на участках мембраны митохондрий (белках), имеющих пониженный заряд, возникающий при повышении концентрации солей и катионов (белки не несут никакого заряда, находятся близ своей изоэлектрической точки), приводит к электростатическому отталкиванию белковых структур друг от друга и торможению образования агрегатов. Наночастицы способствуют снижению степени открытия неспецифических митохондриальных пор, которые образуются как дефекты мембраны при криогенном окислительном стрессе, что является следствием торможения латерального разделения липидов.

Выявленные нами различия в интенсивности флуоресценции MitoTracker Orange CMTMRos (биомаркера функциональной активности митохондрий) в ооцитах в зависимости от способа их витрификации свидетельствуют о глубоких нарушениях в функционировании митохондрий гамет, подвергшихся интраовариальной витрификации, что привело к негативным результатам по получению из них эмбрионов.

В целом результаты сравнительного анализа показателей жизнеспособности донорских ооцитов, подвергшихся интра- или экстраовариальной витрификации и прокультивированных в различных системах созревания, выявили позитивный эффект превентивной инкубации (до витрификации) ооцитов с нВДК и их введения совместно с клетками гранулезы в состав культуральных и криопротекторных сред на функциональную активность митохондрий и статус хроматина ооцитов. Вышесказанное позволяет рекомендовать разработанные протоколы интра- и экстраовариальной витрификации для криосохранения донорских ооцитов *Sus Scrofa Domesticus*.

#### Благодарности (Acknowledgments)

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

#### Библиографический список

1. Шинкарецкая Г. Г. Генофонд животных: проблема исследования и сохранения // Образование и право. 2020. № 2. С. 128–137.
2. Romar R., Canovas S., Matas C., Gadea J., Coy P. Pig in vitro fertilization: where are we and where do we go? // *Theriogenology*. 2019. No. 137. Pp. 113–121.
3. Chen P. R., Uh K., Redel B. K., Reese E. D., Prather R. S., Lee K. Production of Pigs From Porcine Embryos Generated in vitro // *Frontiers in Animal Science*. 2022. Vol. 3. Article number 826324. DOI: 10.3389/fanim.2022.826324.
4. Son W. Y., Henderson S., Cohen Y., Dahan M., Buckett W. Immature oocyte for fertility preservation // *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. 2019. No. 10. Article number 464. DOI: 10.3389/fendo.2019.00464.
5. Tharasanit T., Thuwanut P. Oocyte cryopreservation in domestic animals and humans: principles, techniques and updated outcomes // *Animals*. 2021. Vol. 11. Pp. 2949. DOI: 10.3390/ani11102949.

6. Fowler K. E., Mandawala A. A., Griffin D. K., Walling G. E., Harvey S. C. The production of pig preimplantation embryos in vitro: current progress and future prospects // *Reproductive Biology*. 2018. Vol. 18 (3). Pp. 203–211.
7. Appeltant R., Somfai T., Kikuchi K. Faster, cheaper, defined and efficient vitrification for immature porcine oocytes through modification of exposure time, macromolecule source and temperature // *Cryobiology*. 2018. Vol. 85. Pp. 87–94.
8. Somfai T., Haraguchi S., Dang-Nguyen T. Q., Kaneko H., Kikuchi K. Vitrification of porcine immature oocytes and zygotes results in different levels of DNA damage which reflects developmental competence to the blastocyst stage // *PLoS ONE*. 2023. Vol. 18 (3). Article number e0282959. DOI: 10.1371/journal.pone.0282959
9. Casillas F. The Porcine Experimental Model for Oocyte Cryopreservation by Vitrification // *AJBSR*. 2020. Vol. 9 (2). Pp. 165–169.
10. López A., Betancourt M., Ducolomb Y., Rodríguez J. J., Casas E., Bonilla E., Bahena I., Retana-Márquez S., Juárez-Rojas L., Casillas F. DNA damage in cumulus cells generated after the vitrification of in vitro matured porcine oocytes and its impact on fertilization and embryo development // *Porcine Health Management*. 2021. Vol. 7 (1). DOI: 10.21203/rs.3.rs-441164/v1.
11. Савченко Д. С. Изучение антиоксидантных свойств нанокompозита высокодисперсного кремнезема с наночастицами серебра // *Медицина и образование в Сибири*. 2013. № 6. С. 23–30.
12. Remião M. H., Segatto N. V., Pohlmann A., Guterres S. S., Seixas F. K., Collares T. The potential of nanotechnology in medically assisted reproduction // *Frontiers in Pharmacology*. 2018. Vol. 8. DOI: 10.3389/fphar.2017.00994.
13. Kuzmina T. I., Chistyakova I. V., Tatarskaya D. N. The influence of highly dispersed silica nanoparticles on the functional activity of mitochondria and chromatin state in native and devitrified *Bos Taurus* oocytes // *Agricultural Biology*. 2020. Vol. 55 (4). Pp. 784–793.
14. Casillas F., Ducolomb Y., López A., Betancourt M. Effect of porcine immature oocyte vitrification on oocyte-cumulus cell gap junctional intercellular communication // *Porcine Health Management*. 2020. Vol. 6 (1). DOI: 10.1186/s40813-020-00175-x.
15. Kuzmina T. I., Chistyakova I. V., Prituzhalova A. O., Tatarskaya D. N. The role of highly dispersed silica nanoparticles in the realization of the effects of granulosa on the maturation and fertilization competence of *Sus scrofa domestica* oocytes // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022. Vol. 26 (3). Pp. 234–239.
16. Зюзюн А. Б., Щербак О. В., Осипчук О. С., Ковтун С. И., Дзіцюк В. В. Застосування наноматеріалу в ембріогенетичній системі in vitro отримання ембріонів свиней // *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2015. Т. 17. С. 164–168.
17. Кузьмина Т. И., Альм Х., Торнер Х. Методы получения эмбрионов свиней in vitro: методические рекомендации. Санкт-Петербург, Пушкин: Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных Россельхозакадемии, 2008. 38 с.
18. Roy P. K., Qamar A. Y., Fang X., Kim G., Bang S., Zoysa M., Shin S. T., Cho J. Chitosan nanoparticles enhance developmental competence of in vitro-matured porcine oocytes // *Reproduction in Domestic Animals*. 2020. Vol. 56 (2). Pp. 342–350.
19. Al-Zubaidi U., Liu J., Cinar O., Robker R. L., Adhikari D., Carroll J. The spatio-temporal dynamics of mitochondrial membrane potential during oocyte maturation // *Molecular Human Reproduction*. 2019. Vol. 25 (11). Pp. 695–705.

**Об авторе:**

Татьяна Ивановна Кузьмина, 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)

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

**References**

1. Shinkaretskaya G. G. Genofond zhivotnykh: problema issledovaniya i sokhraneniya [Animal gene pool: the problem of research and conservation] // *Education and Law*. 2020. No. 2. Pp. 128–137. (In Russian.)
2. Romar R., Canovas S., Matas C., Gadea J., Coy P. Pig in vitro fertilization: where are we and where do we go? // *Theriogenology*. 2019. No. 137. Pp. 113–121.
3. Chen P. R., Uh K., Redel B. K., Reese E. D., Prather R. S., Lee K. Production of Pigs From Porcine Embryos Generated in vitro // *Frontiers in Animal Science*. 2022. Vol. 3. Article number 826324. DOI: 10.3389/fanim.2022.826324.

4. Son W. Y., Henderson S., Cohen Y., Dahan M., Buckett W. Immature oocyte for fertility preservation // *Frontiers in Endocrinology* (Lausanne). 2019. No. 10. Article number 464. DOI: 10.3389/fendo.2019.00464.
5. Tharasanit T., Thuwanut P. Oocyte cryopreservation in domestic animals and humans: principles, techniques and updated outcomes // *Animals*. 2021. Vol. 11. Pp. 2949. DOI: 10.3390/ani11102949.
6. Fowler K. E., Mandawala A. A., Griffin D. K., Walling G. E., Harvey S. C. The production of pig preimplantation embryos *in vitro*: current progress and future prospects // *Reproductive Biology*. 2018. Vol. 18 (3). Pp. 203–211.
7. Appeltant R., Somfai T., Kikuchi K. Faster, cheaper, defined and efficient vitrification for immature porcine oocytes through modification of exposure time, macromolecule source and temperature // *Cryobiology*. 2018. Vol. 85. Pp. 87–94.
8. Somfai T., Haraguchi S., Dang-Nguyen T. Q., Kaneko H., Kikuchi K. Vitrification of porcine immature oocytes and zygotes results in different levels of DNA damage which reflects developmental competence to the blastocyst stage // *PLoS ONE*. 2023. Vol. 18 (3). Article number e0282959. DOI: 10.1371/journal.pone.0282959
9. Casillas F. The Porcine Experimental Model for Oocyte Cryopreservation by Vitrification // *AJBSR*. 2020. Vol. 9 (2). Pp. 165–169.
10. López A., Betancourt M., Ducolomb Y., Rodríguez J. J., Casas E., Bonilla E., Bahena I., Retana-Márquez S., Juárez-Rojas L., Casillas F. DNA damage in cumulus cells generated after the vitrification of *in vitro* matured porcine oocytes and its impact on fertilization and embryo development // *Porcine Health Management*. 2021. Vol. 7 (1). DOI: 10.21203/rs.3.rs-441164/v1.
11. Savchenko D. S. Izuchenie antioksidantnykh svoystv nanokompozita vysokodispersnogo kremnezema s nanochastitsami serebra [Study of the Antioxidant Properties of a Nanocomposite of Finely Dispersed Silica with Silver Nanoparticles] // *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2013. No. 6. Pp. 23–30. (In Russian.)
12. Remião M. H., Segatto N. V., Pohlmann A., Guterres S. S., Seixas F. K., Collares T. The potential of nanotechnology in medically assisted reproduction // *Frontiers in Pharmacology*. 2018. Vol. 8. DOI: 10.3389/fphar.2017.00994.
13. Kuzmina T. I., Chistyakova I. V., Tatarskaya D. N. The influence of highly dispersed silica nanoparticles on the functional activity of mitochondria and chromatin state in native and devitrified *Bos Taurus* oocytes // *Agricultural Biology*. 2020. Vol. 55 (4). Pp. 784–793.
14. Casillas F., Ducolomb Y., López A., Betancourt M. Effect of porcine immature oocyte vitrification on oocyte-cumulus cell gap junctional intercellular communication // *Porcine Health Management*. 2020. Vol. 6 (1). DOI: 10.1186/s40813-020-00175-x.
15. Kuzmina T. I., Chistyakova I. V., Prituzhalova A. O., Tatarskaya D. N. The role of highly dispersed silica nanoparticles in the realization of the effects of granulosa on the maturation and fertilization competence of *Sus scrofa domestica* oocytes // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022. Vol. 26 (3). Pp. 234–239.
16. Zyuzyun A. B., Shcherbak O. V., Osipchuk O. S., Kovtun S. I., Dzitsyuk V. V. Zastosuvannya nanomaterialu v embriogenetichniy sistemi *in vitro* otrimannya embrioniv sviney [Study of the antioxidant properties of a nanocomposite of highly dispersed silica with silver nanoparticles] // *Factors in experimental evolution of organisms*. 2015. Vol. 17. Pp. 164–168. (In Ukrainian.)
17. Kuz'mina T. I., Al'm Kh., Torner Kh. Metody polucheniya embrionov sviney *in vitro*: metodicheskie rekomendatsii [Methods of Porcine Embryos Production *in vitro*]. Saint Petersburg, Pushkin: Vserossiyskiy nauchno-issledovatel'skiy institut genetiki i razvedeniya sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh Rossel'khozakademii, 2008. 38 p. (In Russian.)
18. Roy P. K., Qamar A. Y., Fang X., Kim G., Bang S., Zoysa M., Shin S. T., Cho J. Chitosan nanoparticles enhance developmental competence of *in vitro*-matured porcine oocytes // *Reproduction in Domestic Animals*. 2020. Vol. 56 (2). Pp. 342–350.
19. Al-Zubaidi U., Liu J., Cinar O., Robker R. L., Adhikari D., Carroll J. The spatio-temporal dynamics of mitochondrial membrane potential during oocyte maturation // *Molecular Human Reproduction*. 2019. Vol. 25 (11). Pp. 695–705.

#### Author's information:

Tatyana I. Kuzmina, 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) All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals – a branch of the Federal Research Center for Animal Husbandry – VIZH named after Academician L. K. Ernst, Saint Petersburg, Russia