Окотруб Светлана Васильевна

РАННЕЕ РАЗВИТИЕ И КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ООЦИТОВ И ЭМБРИОНОВ МАЛЫХ КОШЕК (FELIDAE: FELINAE): ВЛИЯНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ЛИПИДОВ

1.5.12-Зоология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Новосибирск 2023

Работа выполнена в секторе криоконсервации и репродуктивных технологий Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики СОРАН, г. Новосибирск.

Научный руководитель:

Амстиславский Сергей Яковлевич

доктор биологических наук, сектор криоконсервации репродуктивных технологий Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики СОРАН, главный научный сотрудник, заведующий сектором

Ярцев Вадим Вадимович

Официальные оппоненты:

биологических наук, Институт кандидат биологии, экологии, почвоведения, сельского хозяйства (Биологический лесного Национального институт) исследовательского Томского государственного университета, доцент кафедры зоологии позвоночных и экологии,

Кузьмина Татьяна Ивановна

доктор биологических наук, профессор, Всероссийский научно-исследовательский институт разведения генетики И сельскохозяйственных животных-филиал исследовательского центра Федерального животноводства – ВИЖ имени академика Л. Эрнста», заведующий лабораторией биологии развития.

Ведущее учреждение:

Институт проблем экологии и эволюции

имени А.Н. Северцова РАН, Москва

Защита диссертации состоится 16 мая 2023г. в 10часов на заседании диссертационного совета 24.1.119.01 Института систематики и экологии животных СО РАН по адресу: 630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе 11.Факс(383)217-09-73,e-mail:dis@eco.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института систематики и экологии животных СО РАН и на сайте института http://eco.nsc.ru/soiskateli.html

Автореферат разослан « » ____2023г.

Ученыйсекретарь диссертационного совета, кандидат биологических наук Sump

Петрожицкая Людмила Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Криоконсервация гамет и преимплантационных эмбрионов является перспективным подходом к сохранению генетического разнообразия млекопитающих, в том числе представителей семейства кошачьих (Амстиславский и др., 2021). Липидные гранулы, которые в большом количестве присутствуют в цитоплазме ооцитов и преимплантационных эмбрионов представителей отряда Carnivora, в частности, всех исследованных видов кошек, повышают их криочувствительность (Apparicio et al., 2012; Amstyslavsky et al., 2019; Zahmel et al., 2021). Исследования, проведенные на искусственно созданных мембранах, показали, что липиды претерпевают фазовый переход при различных температурах, причем, чем выше степень ненасыщенности липидов, тем ниже температура их фазового перехода (T^*) (Dmitriev, Surovtsev, 2015). Модифицирование липидного состава клеток в более ненасыщенную или насыщенную сторону в культуре in vitro может стать способом борьбы с негативными последствиями криоконсервации ооцитов и эмбрионов, богатых внутриклеточными липидами (Horvath, Seidel, 2006; Accorsi et al., 2016; Dias et al., 2020; Igonina et al., 2021; Брусенцев и др., 2022). Ооциты и полученные путем эктракорпорального оплодотворения (ЭКО) эмбрионы домашней кошки (Felis silvestris catus) являются удобной моделью для такого рода исследований (Mokrousova et al., 2020b; Sowinska et al., 2020; Fernandez-Gonzalez et al., 2021; Kochan et al., 2021a,b). Модификация липидного состава может стать ключом к разработке более эффективных протоколов криоконсервации ооцитов и эмбрионов, родственных домашней кошке представителей подсемейства Felinae, находящихся под угрозой исчезновения, и поможет сохранить генетическое разнообразие. Кроме того, изучение роли липидов в развитии эмбрионов кошачьих на примере домашней кошки вносит вклад в изучение ранних этапов развития представителей этого семейства.

Степень разработанности темы. Известно, что домашняя кошка, как и другие представители кошачьих, относится к млекопитающим с богатым содержанием липидов в ооцитах и преимплантационных эмбрионах (Guraya, 1965; Fernandez-Gonzalez et al., 2015; Брусенцев и др., 2019; Amstislavsky et al., 2019). В настоящее время существуют трудности с успешной криоконсервацией эмбрионов и ооцитов, богатых липидами (Amstislavsky et al., 2019). Однако механизмы криоповреждений, связанные с обилием липидных гранул не изучены, и эта проблема является предметом интенсивных исследований (Borges, Vireque, 2019; Idrissi et al., 2021, 2022; Igonina et al., 2021). Ранее предпринимались попытки делипидизации ооцитов (Galiguis et al., 2014) и эмбрионов (Tharasanit and Techakumphu, 2011), но модификация липидного состава ооцитов и эмбрионов кошачьих с целью изменения степени ненасыщенности внутриклеточных липидов и, соответственно, их T^* , продемонстрирована в нашей работе впервые. Подтверждение гипотезы о том, что криоустойчивость клеток зависит не

но и

на

богатых

OT

степени ненасыщенности

ооцитах

липидами

только от общего количества,

липидов

внутриклеточных

преимплантационных эмбрионах домашней кошки является одной из главных задач данной работы. Для эмбрионов мышей установлено, что от степени ненасыщенности липидов зависит их T^* (Igonina et al., 2021). Однако для ооцитов и эмбрионов кошек данные характеристики еще не изучены. В исследованиях на ооцитах и эмбрионах домашней кошки использованием спектроскопии комбинационного выполненных рассеяния света (КРС) показано, что фазовый переход в липидных гранулах может наступать при разных температурах, в зависимости от состава липидов, по сравнению с монокомпонентными липидными моделями (Okotrub et al., 2018). Позже показано, что при -25°C внутри липидных гранул ооцита домашней кошки сосуществуют фазы, состоящие из липидов в разных конформационных состояниях, а именно в упорядоченном и разупорядоченном (Mokrousova et al., 2020a). Эти работы поднимают вопросы о составе сосуществующих фаз, как он зависит от температуры и возможно ли подавить разделение фаз в процессе криоконсервации путем модификации липидного состава. Применение дейтерированных меток выделить интересующие молекулы KPC. позволяет на спектрах Предложенный подход позволяет выявить, как внутри липидных гранул происходит пространственное перераспределение различных липидных фракций и изменение их конформационного состояния при охлаждении. Изучение роли липидов при криоконсервации ооцитов и эмбрионов особенно тех видов млекопитающих, которые богаты липидами на ранних стадиях развития, является общепризнанной мировой задачей (Pereira, Marques, 2008; Alminana, Cuello, 2015; Borges, Virequem 2019). Результаты работы помогут пониманию роли липидов в раннем развитии кошачьих и разработке эффективных протоколов для сохранения генетических ресурсов представителей Felinae.

Цель исследования: изучение роли внутриклеточных липидов при криоконсервации ооцитов и преимплантационных эмбрионов млекопитающих с использованием домашней кошки в качестве экспериментальной модели.

Задачи исследования:

- 1. Изучить распределение липидов внутри липидных гранул ооцитов домашней кошки (Felis silvestris catus) при комнатной температуре и при замораживании.
- 2. Охарактеризовать состав внутриклеточных липидов после его направленной модификации в ооцитах и преимплантационных эмбрионах домашней кошки путем их культивирования *in vitro* в питательной среде с добавлением ненасыщенной линолевой кислоты либо насыщенной стеариновой кислоты.
- 3. Исследовать эффекты направленного изменения липидного состава ооцитов и преимплантационных эмбрионов домашней кошки на их развитие *in vitro*.
- 4. Изучить фазовые переходы липидов при охлаждении ооцитов и полученных *in vitro* преимплантационных эмбрионов домашней кошки как без воздействий, так и при модификации липидного состава.

5. Исследовать влияние модификации липидного состава на эффективность программного замораживания ооцитов и преимплантационных эмбрионов домашней кошки и их последующее развитие в культуре *in vitro*.

Научная новизна работы. В данной работе впервые модифицирован состав внутриклеточных липидов в ооцитах и в полученных путем ЭКО эмбрионах домашней кошки (Felis silvestris catus). В частности, впервые, при помощи спектроскопии КРС с использованием дейтерированных жирных кислот, исследован процесс их накопления в дозревающих in vitro ооцитах домашней кошки и их распределение внутри липидных гранул при комнатной температуре и при замораживании. Данный подход позволил определить фракций липидов T^* разной c ненасыщенности и визуализировать их распределение в липидных гранулах. Впервые направленно модифицирован липидный состав ооцитов и преимплантационных эмбрионов домашней кошки при помощи их культивирования *in vitro* в среде с добавлением насыщенной (стеариновой) и ненасыщенной (линолевой) жирных кислот. Исследовано влияние жирных кислот на особенности развития ооцитов и эмбрионов домашней кошки in vitro. Впервые изучена эффективность криоконсервации ооцитов и преимплантационных эмбрионов домашней кошки с направленно внутриклеточных измененным составом липидов. Впервые использованием ооцитов и эмбрионов домашней кошки, в качестве экспериментальной модели, проведена проверка гипотезы о том, что степень ненасыщенности внутриклеточных липидов влияет на их T^* и эффективность криоконсервации ооцитов И преимплантационных эмбрионов кошачьих. Впервые приведены рекомендации для сохранения генетического разнообразия представителей подсемейства малых кошек (Felinae), с учетом особенностей липидного состава эмбрионов кошачьих.

Теоретическая и научно-практическая ценность работы. Ооциты и полученные путем ЭКО эмбрионы домашней кошки изучены in vitro при разных условиях культивирования, что важно для понимания особенностей раннего развития кошачьих. Теоретическая значимость работы заключается в том, что она вносит фундаментальный вклад в понимание роли липидов при охлаждении и криоконсервации ооцитов и преимлантационных эмбрионов видов семейства кошачьих. Показано, что направленное внутриклеточных ненасыщенности изменение степени преимплантационных эмбрионов домашней кошки при определенных культивирования сопровождается повышением условиях криотолерантности. Таким образом, научно-практическая ценность работы состоит в том, что полученные результаты и выводы могут быть использованы для усовершенствования протоколов криоконсервации ооцитов и эмбрионов диких видов кошачьих, в том числе редких и исчезающих, путем направленного воздействия на степень ненасыщенности внутриклеточных липидов.

Методология и методы исследования. В данной работе ооциты получали путем измельчения ткани яичников домашних кошек, а эмбрионы

- при помощи ЭКО in vitro эпидидимальным семенем. Липидный состав ооцитов и эмбрионов домашней кошки модифицировали путем добавления жирных кислот, связанных с бычьим сывороточным альбумином, в культуральные среды для развития in vitro гамет и эмбрионов. Эффективность проникновения жирных кислот в липидные гранулы, а также степень ненасыщенности липидов и температуру их фазового перехода в ооцитах и эмбрионах домашней кошки исследовали при помощи спектроскопии КРС. Дозревание ооцитов и развитие эмбрионов in vitro после воздействия жирных кислот оценивали при помощи 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI), который окрашивает ДНК, с последующей флуоресцентной микроскопией. Ооциты и эмбрионы с модифицированным липидным составом криоконсервировали при помощи программного замораживания. Эффективность криоконсервации ооцитов оценивали при тетраметилродамина (TMRM), который помощи окрашивает функционирующие митохондрии, а эффективность криоконсервации эмбрионов оценивали по их развитию в культуре in vitro и при помощи окрашивания DAPI с последующей флуоресцентной микроскопией. Ниже приведен список используемых методов:
 - культивирование гамет и эмбрионов млекопитающих *in vitro*;
 - световая микроскопия;
- флуоресцентная микроскопия с применением таких красителей как DAPI и TMRM;
- конфокальная лазерная сканирующая микроскопия с применением нильского красного;
- спектроскопия комбинационного рассеяния света или Рамановская спектроскопия;
- статистическая обработка данных с использованием таких методов, как хи-квадрат, t-критерий Стьюдента и U-критерий Манна–Уитни.

Положения, выносимые на защиту:

- 1. Жирные кислоты проникают и накапливаются в липидных гранулах ооцитов домашней кошки при культивировании *in vitro*, и в дальнейшем влияют на фазовый переход внутриклеточных липидов.
- 2. Воздействие *in vitro* ненасыщенной линолевой либо насыщенной стеариновой жирными кислотами сопровождается модификацией состава внутриклеточных липидов, а также изменением криотолерантности преимплантационных эмбрионов домашней кошки.
- 3. Повышение степени ненасыщенности внутриклеточных липидов в развивающихся *in vitro* эмбрионах домашней кошки сопровождается снижением температуры фазового перехода липидов, а понижение степени ненасыщенности, наоборот, ее повышением.
- 4. Модификация липидного состава эмбрионов в направлении увеличения их ненасыщенности позволит повысить эффективность криоконсервации эмбрионов представителей подсемейства малых кошек (Felinae), в том числе находящихся под угрозой исчезновения, и сохранить их генетическое разнообразие.

Степень достоверности результатов. Достоверность полученных результатов обеспечена тем, что в работе использованы современные методы световой, конфокальной и флуоресцентной микроскопии в сочетании с использованием надежных флуорохромов, таких как DAPI, TMRM и нильский красный. Кроме того, в данном исследовании применяли спектроскопию КРС, которая позволяет получить информацию о распределении жирных кислот внутри липидных гранул, ненасыщенности липидов, содержащихся в исследуемых клетках, и их T^* . Данная методика сочетает в себе высокое пространственное разрешение оптической микроскопии и чувствительность масс спектрометрии, что делает ее мощным инструментом для исследования, в частности, для внутриклеточных липидов млекопитающих. При материала в работе использовали принцип рандомизации, т.е. полученные от каждой кошки ооциты и эмбрионы делили случайным образом между группами. Для каждого эксперимента созданы как опытные, так и контрольные группы с числом повторов не менее пяти. Статистическую обработку проводили в программе STATISTICA.

Апробация результатов. Материалы диссертации обсуждены на конференция: "XXVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов»" (г. Москва, 2021); "VIII Научно-практическая конференция с международным участием «Генетика — фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции»", (Ростовна-Дону, 2019); Международная научная конференция криобиологического общества "CRYO2021" (Chicago, 2021). Диссертационный доклад был обсужден на заседании кафедры зоологии позвоночных и экологии Института биологии, экологии, почвоведения, сельского и лесного хозяйства (Биологический институт) Национального исследовательского Томского государственного университета (г. Томск).

Личный вклад автора. Автор участвовал в обсуждении общего дизайна исследования. Подавляющий объем работы, включающий получение сперматозоидов, получение и дозревание *in vitro* ооцитов, проведение ЭКО, культивирование ооцитов и эмбрионов *in vitro*, их криоконсервацию, микроскопический анализ, осуществлено непосредственно автором. Анализ данных и обобщение результатов выполнены автором при консультациях с научным руководителем.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 3 научные статьи в рецензируемых отечественных изданиях, 2 статьи в рецензируемых зарубежных изданиях (все 5 в журналах, рекомендованных ВАК) и 4 тезиса в сборниках трудов конференций.

Структура диссертации. Диссертационная работа состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 173 страницах печатного текста, содержит 20 рисунков и 12 таблиц. Библиографический указатель литературы включает 239 источников, из них 11 отечественных и 228 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

- 1.1. Проблема сохранения генетического разнообразия диких примере семейства млекопитающих Felidae. на представителей семейства Felidae встречается больше видов, находящихся под угрозой исчезновения, по сравнению с другими млекопитающими. Пять видов из семейства Felidae являются исчезающими, а 13 видов – уязвимыми (IUCN, 2022). Объектом данной работы является домашняя кошка, относящаяся к подсемейству Felinae, роду Felis, в котором ее относят к подвиду лесного кота – Felis silvestris catus. Домашняя кошка часто совершенствования модельным объектом ДЛЯ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), применимых для сохранения диких видов кошачьих, находящихся под угрозой исчезновения (Амстиславский И др., 2021). В данном подразделе приводится таксономическое описание семейства Felidae, а также охранный статус каждого вида. Также описываются подходы in situ, ex situ, в том числе ВРТ, применяемые для сохранения генетического разнообразия кошачьих. Подробно представлена концепция криобанка эмбрионов и гамет и ее применение по отношению к млекопитающим, а также применяемые протоколы криоконсервации и их эффективность для ооцитов и эмбрионов различных видов кошачьих.
- 1.2. Роль липидов в раннем развитии млекопитающих. Поскольку домашняя кошка, как и другие представители кошачьих, относится к млекопитающим с богатым содержанием липидов преимплантационных эмбрионах (Guraya, 1965; Fernandez-Gonzalez et al., 2015; Брусенцев и др., 2019; Amstislavsky et al., 2019), важно понимать роль липидов в преимплантационном развитии млекопитающих. Липидные гранулы играют важную роль при созревании ооцитов и развитии преимплантационных эмбрионов различных видов млекопитающих (Брусенцев и др., 2019; Ibayashi et al., 2021; Arena et al., 2021). Липиды потенциальным резервуаром энергии ДЛЯ эмбрионального развития до активации эмбрионального генома (de Andrade Melo-Sterza, Poehland, 2021). Существует видовая специфичность по количеству липидных гранул в ооцитах/эмбрионах и характеру распределения по цитоплазме (Dunning et al., 2014). Показало, что ооциты свиньи содержат в 2.4 раза больше липидов, чем ооциты крупного рогатого скота, а также в 6.8 раза больше, чем ооциты мыши (Genicot et al., 2005). Ооциты богатые липидами, в том числе и кошачьи, выглядят более темными при наблюдении в световой микроскоп, что связано с интенсивным рассеянием света на липидных гранулах (Amstislavsky et al., 2019). Состав и общее количество липидов в ооцитах/эмбрионах кошачьих до сих пор не исследован, однако, при помощи масс-спектрометрии показано, что в ооцитах кошек большое количество ненасыщенных жирных кислот, в частности ацильных остатков линолевой и олеиновой жирных кислот

(Apparicio et al., 2012). Кроме того, методом спектроскопии КРС, показано, что степень ненасыщенности липидов, т.е. соотношение числа ненасыщенных и насыщенных углеводородных цепочек, в ооцитах домашней кошки довольно высока: выше, чем у свиньи, крупного рогатого скота, человека, кролика и овцы, и близка к значениям, полученным для ооцитов крыс и мышей (Okotrub K. Et al., 2018; Amstislavsky et al., 2019).

- 1.3. Криоконсервация ооцитов и эмбрионов как подход к сохранению генетических ресурсов млекопитающих. Важную часть в данном подразделе занимает описание роли липидов в процессе замораживания ооцитов и эмбрионов. На сегодняшний момент существуют трудности с успешной криоконсервацией эмбрионов и ооцитов, богатых липидами (Amstislavsky et al., 2019). В подразделе приведено сравнение эффективности криоконсервации ооцитов и эмбрионов с различным содержанием внутриклеточных липидов. Прослеживается закономерность, что при использовании программного замораживания, чем больше липидов содержится оошитах И эмбрионах, тем хуже протекает криоконсервация. Так как механизмы криоповреждений, связанные с обилием липидных гранул не изучены, это является предметом интенсивных исследований криобиологов (Borges, Vireque, 2019; Idrissi et al., 2021, 2022; Igonina et al., 2021). Также приведено понятие фазового перехода внутриклеточных липидов (ФПЛ) в процессе охлаждения клеток. Охлаждение клетки приводит к ФПЛ, которые изменяют свойства мембран: функционирование мембранных белков (van Meer et пространственное распределение липидов (Quinn, 1985) и мембранный транспорт (Elamrani et al., 1983). Приведенные в этом разделе данные свидетельствуют о весьма невысокой эффективности криоконсервации эмбрионов и ооцитов кошачьих. Причем в случае кошачьих более эффективным способом является программное замораживание, витрификацией. Таким образом, криобиологические исследования, направленные на улучшение этих показателей, являются актуальными.
- 1.4. Способы воздействия на состав внутриклеточных липидов с целью улучшения результатов криоконсервации ооцитов и преимплантационных эмбрионов млекопитающих. Существует две основные стратегии влияния на липидный состав клеток для повышения их криоустойчивости: 1) уменьшение общего количества внутриклеточных липидов и 2) модификация состава липидных гранул с целью смягчения эффектов ФПЛ (Amstislavsky et al., 2019). Модификация состава липидных гранул, в частности, с помощью насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, является перспективным подходом для изменения T^* и уменьшения повреждения клеток при криоконсервации. Между тем, в отношении кошачьих данный подход до нашей работы не применяли. В подразделе также представлена информация о влиянии жирных кислот на ооциты и эмбрионы *in vitro*.

Таким образом, на основании изученной литературы, можно заключить, что модификация протоколов замораживания для гамет и

преимплантационных эмбрионов, богатых внутриклеточными липидами, является актуальной задачей, так как повышение эффективности криоконсервации является современным решением для сохранения генетического материала исчезающих видов млекопитающих, в частности, представителей семейства Felidae. Роль внутриклеточных липидов в развитии ооцитов и эмбрионов кошачьих изучена крайне слабо. Настоящее исследование имеет целью именно восполнение данного пробела с использованием домашней кошки в качестве биологической модели.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на базе Федерального исследовательского центра «Института цитологии и генетики СО РАН» в секторе криоконсервации и репродуктивных технологий, в SPF-виварии ИЦиГ СО РАН, а также центре коллективного пользования «Микроскопический анализ биологических объектов». Физическая часть работы выполнена на базе Института автоматики и электрометрии СО РАН в центре коллективного пользования "Высокоразрешающая спектроскопия газов и конденсированных сред".

- **2.1. Животные.** В данной работе использованы семенники с эпидидимисами домашних котов, а также яичники кошек, которые получали после плановой орхиэктомии/овариогистерэктомии в пункте льготной стерилизации животных г. Новосибирска и доставляли в лабораторию в течение 4 ч. Общее число самок для экспериментальной работы составило 171 особи, самцов 9 особей. Число ооцитов во всех экспериментальных блоках составило 380, число эмбрионов 286. Все эксперименты на животных соответствовали стандартам Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей.
- **2.2.** Созревание ооцитов *in vitro*. Кумулюс-ооцитные комплексы (КОК) выделяли из фолликулов, и ооциты с темной и гомогенной цитоплазмой, окруженные несколькими слоями клеток кумулюса отбирали для созревания *in vitro*. В качестве среды для созревания использовали М199 с добавлением 15 мМ бикарбоната натрия, 2 МЕ/мл хорионического гонадотропина лошади и 10 МЕ/мл хорионического гонадотропина человека. Ооциты дозревали в 4-луночном планшете в СО2-инкубаторе New BrunswickTM Galaxy 48R (Eppendorf, Германия) при 38.5 °C, 5% СО2, и 90% влажности в течение 24 часов.
- **2.3.** Получение сперматозоидов и экстракорпоральное оплодотворение. Сперматозоиды получали из эпидидимисов 14ти взрослых беспородных домашних котов. Каудальные части эпидидимисов извлекали, переносили на чашку Петри и измельчали в одном мл среды М199 с добавлением 20 мМ HEPES. После обработки градиентными растворами суспензию семени с конечной концентрацией 1*10⁶ подвижных сперматозоидов/мл добавляли к ооцитам. Оплодотворение проводили в среде для культивирования Ham's F-10 либо CSCM-C. Гаметы совместно инкубировали в течение 22 часов как описано выше.

- **2.4.** Приготовление растворов жирных кислот. Растворы линолевой (ЛК), стеариновой (СК), дейтерированной стеариновой (ДСК) и дейтерированной олеиновой (дОК) кислот для добавления в культуральные среды готовили по протоколу, описанному ранее (Aardema et al., 2011). Готовые растворы добавляли в среду для дозревания ооцитов или культивирования эмбрионов до получения финальной концентрации 50, 100, 200, 400 мкМ.
- **2.5.** Дизайн эксперимента. Исследовательский проект состоял из двух основных экспериментов, которые описаны в пунктах 2.5.1 и 2.5.2.
 - 2.5.1. Модификация липидного состава ооцитов домашней кошки.
- 2.5.1.1. Исследование распределения дейтерированных жирных кислот внутри липидных гранул ооцитов при комнатной температуре и при замораживании. В данной части исследования ооциты домашней кошки культивировали с добавлением дСК и дОК для изучения эффективности поглощения жирных кислот клетками, их распределения внутри липидных гранул ооцитов при комнатной температуре и при замораживании. Для этого ооциты культивировали с добавлением в культуральную среду дСК в концентрации 50, 100, 200, 400 мкМ в течение 23 ч и 45 ч периода дозревания. Каждый ооцит с определенной концентрацией дСК и временем культивирования исследовали при помощи спектроскопии KPC. Для проверки токсического воздействия дейтерированных меток на дозревание ооциты культивировали в среде без (контроль), среде с добавлением ЖК В протонированной СК или с добавлением 200 мкМ дСК в течение 23 ч. После культивирования ооциты фиксировали в 4% формальдегиде и окрашивали DAPI, для оценки развития как описано в пункте 2.8.

Для исследования жирных кислот при замораживании ооциты домашней кошки культивировали с добавлением дСК или дОК в соотношении с БСА=3:1 в течение 45 часов. После культивирования ооциты помещали в криопротекторный раствор, замораживали по протоколу, описанному ниже с применением спектроскопии КРС (пункт 2.11.3).

2.5.1.2. Исследование влияния модификации липидного состава ооцитов на температуру фазового перехода липидов и развитие ооцитов *in vitro* до и после криоконсервации. Незрелые ооциты домашней кошки дозревали *in vitro* без добавления жирных кислот (контроль) либо с добавлением 400 мкМ ненасыщенной линолевой кислоты (группа ЛК) или насыщенной стеариновой кислоты (группа CK). Bce культивировали в CO₂ -инкубаторе Galaxy 48R при 38.5 °C, 5% CO₂ и влажности 90% в течение 24 ч. После дозревания *in vitro* некоторые ооциты отобраны для оценки при помощи спектроскопии КРС для измерения степени ненасыщенности внутриклеточных липидов и температуры фазового перехода липидов. Для оценки развития ооциты окрашивали DAPI (пункт 2.8). Оставшиеся ооциты после дозревания *in vitro* криоконсервированы при помощи программного замораживателя (пункт 2.6). Жизнеспособность ооцитов после криоконервации оценивали при помощи окрашивания митохондрий ТМРМ (пункт 2.9).

- 2.5.2. Модификация липидного состава преимплантационных эмбрионов домашней кошки. Двухклеточные эмбрионы домашней кошки, полученные в результате ЭКО, культивировали без добавления жирных кислот (контроль) либо с добавлением 400 мкМ ненасыщенной линолевой кислоты (ЛК группа) или насыщенной стеариновой кислоты (СК группа). Эмбрионы контрольной группы культивировали в течение 66 часов в 20 мкл модифицированной среды Ham's F-10 либо в CSCM-C, в то время как эмбрионы из группы ЛК или СК культивировали в средах с добавлением 400 мкМ ЛК-БСА и 400 мкМ СК-БСА, соответственно. После 66 ч культивирования некоторые из преимплантационных эмбрионов всех трех групп (контроль, ЛК, СК) отобраны для анализа при помощи спектроскопии КРС для оценки степени ненасыщенности внутриклеточных липидов и их T^* . Другие эмбрионы отбирали для дальнейшей оценки их развития при помощи DAPI и флуоресцентной микроскопии, либо для оценки общего уровня внутриклеточных липидов при помощи Nile Red и конфокальной микроскопии (пункты 2.8 и 2.10). Остальные эмбрионы замораживали (пункт 2.7), оттаивали и культивировали *in vitro* в течение 30 ч. Затем оценивали развитие при помощи окрашивания DAPI и флуоресцентной микроскопии (пункт 2.8). Общее время культивирования in vitro эмбрионов, подвергавшихся криоконсервации, на момент фиксации составило 96 ч.
- **2.6. Криоконсервация ооцитов.** Для замораживания ооцитов домашней кошки применяли программный замораживатель CL 8800 (CryoLogic, Австралия). Ооциты охлаждали по протоколу, описанному ранее Лювони и Пеллиццари (2000) с некоторыми модификациями. Криопротекторная смесь состояла из PBS (pH = 7.2-7.4) с добавлением 0.2 М сахарозы, 1.5 М этиленгликоля (ЭГ) и 20% FCS.
- **2.7. Криоконсервация эмбрионов.** Эмбрионы криоконсервировали по протоколу Гомец с соавторами (2003) с модификациями с использованием программного замораживателя CL 8800 (CryoLogic, Австралия). В качестве криопротектора использовали раствор 1.5 М пропиленгликоля с добавлением 0.1М сахарозы.
- 2.8. Окрашивание DAPI с применением флуоресцентной микроскопии. Ооциты и эмбрионы окрашивали 2 мг/мл DAPI, который связывается с ДНК. Окрашенные ооциты делили на три группы по стадиям созревания: герминальный везикул (ГВ), метафаза I (МІ), метафаза II (МІІ). Подсчитывали процент каждой стадии. Для каждого эмбриона подсчитывали как общее число ядер, так и отдельно число интерфазных ядер и число фрагментированных ядер. Индекс фрагментации оценивали, как процент ядерных фрагментов к общему числу ядер. По общему числу ядер (Роре et al., 1998; Mokrousova et al., 2020b) преимплантационные зародыши классифицировали как остановившиеся в развитии (менее 8 ядер), развившиеся преимплантационные зародыши на стадии дробления (9-16 ядер), морулы (17-50 ядер) и поздние морулы (более 50 ядер).
- **2.9.** Окрашивание TMRM с последующей флуоресцентной микроскопии. Жизнеспособность клетки оценивали по наличию

активности митохондрий, при помощи красителя TMRM, который аккумулируется функционирующими, отрицательно заряженными митохондриями, придавая клеткам оранжевое свечение. Такие ооциты считали позитивно меченными (TMRM+) и, соответственно, живыми, то есть успешно перенесшими криоконсервацию. Практически полное отсутствие флуоресценции наблюдали, когда мембранный потенциал митохондрий нарушался. Такие ооциты считали негативно меченными (TMRM-) и, соответственно, погибшими.

- 2.10. Окрашивание красным нильским последующей сканирующей конфокальной лазерной микроскопии. Оценку интенсивности окрашивания внутриклеточных липидов проводили с помощью окрашивания нильским красным, как описано ранее (Брусенцев и др., 2020). Образцы помещали на предметные стекла в PBS. Изображения получали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа 780 NLO Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием программного обеспечения Zen 2012 (Carl Zeiss, Германия). изображения получены в режиме подсчета фотонов. Суммирование оптических срезов и вычитание фоновой флуоресценции выполняли с помощью программы ImageJ.
- **2.11.** Спектроскопия комбинационного рассеяния света. Изменение степени ненасыщенности липидов и T^* в ооцитах и преимплантационных эмбрионах домашней кошки, а также накопление и распределение дейтерированных жирных кислот в липидных гранулах до и после охлаждения изучали с помощью спектроскопии КРС.
- Экспериментальная установка. Спектроскопию проводили на экспериментальной установке, состоящей из прямого Leitz), оснащенного микроскопа Orthoplan (Wild сканирующим пьезопозиционером РХҮ-200. Использовали монохроматор SP2500i с Spec-10:2K/LN. детектором Оптический многоканальным THMS350V использовали для проведения измерений спектров при различных температурах. Источником монохроматического излучения для возбуждения КРС служил твердотельный лазер Excelsior (Spectra-Physics, США) с длиной волны 532.1 нм.
- 2.11.2. Оценка степени ненасыщенности внутриклеточных липидов. Для изучения степени ненасыщенности липидов в образцах измерено 100 спектров КРС от разных случайно выбранных локальных областей внутри эмбрионов. Для выделения спектрального вклада липидов главных Для использовали метод компонент. оценки ненасыщенности липидов при T = 25 °C использовали соотношение интенсивностей линии валентных колебаний связей C=C при 1657 см⁻¹ к линии ножничных деформационных колебаний CH_2 (δCH), $I_{C=C}/I_{\delta CH}$. Интенсивность первой линии увеличивается с увеличением концентрации двойных связей С=С, интенсивность второй линии увеличивается с увеличением числа метиленовых групп.
- **2.11.3.** Измерение температуры начала фазового перехода липидов. Для изучения зависимости фазового состояния липидов от

температуры образцы помещали в раствор EmbryoMax KSOM (Merck, Германия) с добавлением 0.2 М сахарозы и 1.5 М ЭГ в случае ооцитов, либо 1.5 М ПГ в случае эмбрионов. Изменение фазового состояния липидов отслеживали по соотношению интенсивностей антисимметричных (аСН) и симметричных (sCH) валентных колебаний CH_2 на 2880 и 2850 см⁻¹, соответственно. Это соотношение отражает изменение конформационного состояния липидов, происходящее при фазовом переходе.

2.12. Статистика. Все выборки проверяли на нормальное распределение с помощью критерия W-критерия Шапиро-Уилка и анализировали с помощью программы STATISTICA v 8.0 StatSoft, Inc. Данные с нормальным распределением сравнивали по t-критерию Стьюдента, в противном случае использовали U-критерий Манна-Уитни. Процент стадий созревания ооцитов, жизнеспособность ооцитов после криоконсервации между группами без и с добавлением жирных кислот, а также процент эмбрионов на разных стадиях развития до и после замораживания сравнивали тестом Хи-квадрат. Различия при р < 0.05 считали статистически достоверными.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

- 3.1. Направленная модификация внутриклеточных липидов и исследование роли липидов в развитии и криоконсервации ооцитов домашней кошки.
- 3.1.1. Накопление дейтерированной стеариновой кислоты в липидных гранулах ооцитов при комнатной температуре. Максимальное значение накопленной дСК в ооците получено после культивирования ооцитов с дСК в течение 45 ч при максимальной концентрации (400 мкМ) и равно ≈ 10−12%. Данная концентрация (400 мкМ) жирных кислот выбрана для модификации липидного состава ооцитов и эмбрионов в дальнейшем исследовании.
- 3.1.2. Распределение дейтерированной стеариновой кислоты в липидных гранулах ооцитов при комнатной температуре и при замораживании. Карта пространственного распределения дСК в липидных гранулах ооцита при комнатной температуре (Рисунок 1(б)) демонстрирует, что рядом расположенные гранулы содержат различные концентрации дСК, но жирная кислота распределяется равномерно внутри гранулы. Однако, при замораживании ооцитов происходит разделение фаз. Распределение дейтерированных жирных кислот показывает, что липиды, образованные из дСК, преимущественно локализуются на периферии липидных гранул (Рисунок 1(в)), в то время как липиды, сформированные из дОК, напротив, гранулы (Рисунок локализуются ПО центру $1(\Gamma)$). процессе криоконсервации ооцитов соотношение I(aCH2)/I(sCH2), показывающее T^* , всегда выше для ооцитов, которые культивировали с добавлением дСК, по сравнению с ооцитами, которые культивировали с дОК. Для ооцитов, которые культивировали с дОК, T^* наступает между 0-5°С. В случае дСК, соотношение I(aCH2)/I(sCH2) не является нулевым даже при оттаивании до 40°С, что выше, чем температура культивирования ооцитов. Это означает,

что некоторая часть липидов, содержащих стеариновую кислоту, остается в липидных гранулах в упорядоченном состоянии, что может мешать протеканию физиологических процессов.

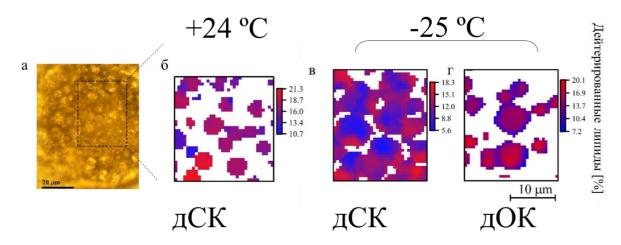


Рисунок 1. Карты распределения дейтерированных жирных кислот в липидных гранулах, снятых с небольшого участка цитоплазмы ооцита (а). Равномерное распределение дейтерированной стеариновой кислоты (дСК) внутри липидных гранул ооцита при комнатной температуре (б). Образование фракций внутри липидных липидных гранул при замораживании ооцита, после воздействия дСК (в) и дОК (г). Примечание: белый цвет соответствует областям с низкой интенсивностью IsCD и IsCH, т.е. ооплазме без липидного вклада; цветовая шкала справа от каждой карты демонстрирует долю дейтерированных липидов, проникших в клетки (синий – минимальное значение, красный – максимальное значение).

- 3.1.3. Влияние модификации липидного состава ооцитов на температуру фазового перехода липидов, развитие ооцитов *in vitro* и эффективность их криоконсервации.
- **3.1.3.1. Влияние линолевой и стеариновой кислот на дозревание ооцитов** *in vitro*. Добавление 400 мкМ ЛК или 400 мкМ СК в культуральную среду не повлияло на процент созревающих *in vitro* ооцитов (Рисунок 2a).
- 3.1.2.2. Влияние линолевой и стеариновой кислоты на степень ненасыщенности и температуру фазового перехода липидов при дозревании ооцитов *in vitro*. Добавление в питательную среду 400 мкМ ЛК и 400 мкМ СК при дозревании *in vitro* ооцитов домашней кошки в течение 24 ч не приводит к изменению степени ненасыщенности $(1.11\pm0.06\ \text{и}\ 0.92\pm0.04$, соответственно) внутриклеточных липидов по сравнению с контролем (0.98 ± 0.02) . При этом не выявлено изменения T^* ооцитов после воздействия ЛК (1.12 ± 1.54) по сравнению с контролем (-0.62 ± 1.08) . Однако, СК привела к повышению T^* (10.12 ± 1.78) по сравнению с контролем (-0.62 ± 1.08) .

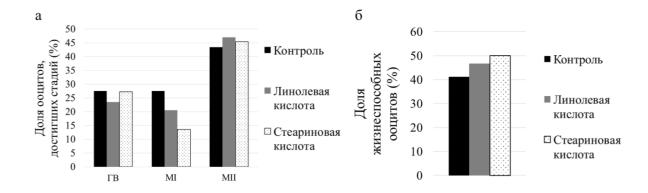


Рисунок 2. (а) - число ооцитов на разных стадиях созревания после культивирования с жирными кислотами. Примечание: ΓB — герминальный везикул; MI — метафаза I; MII — метафаза II; число повторов — 5; число самок — 24; число ооцитов в группах: контроль (n=69); линолевая кислота (n=34); стеариновая кислота (n=44).

- (б) число жизнеспособных ооцитов, положительно меченных тетраметилродамином после криоконсервации и оттаивания. Примечание: число повторов -5; число самок -24; число ооцитов в группах: контроль (n=63); линолевая кислота (n=30); стеариновая кислота (n=36).
- **3.1.2.3.** Эффективность криоконсервации ооцитов после воздействия линолевой и стеариновой кислот. Добавление в питательную среду 400 мкМ ЛК и 400 мкМ СК при дозревании *in vitro* ооцитов домашней кошки в течение 24 ч не повлияло на эффективность криоконсервации ооцитов (Рисунок 26).
- 3.2. Направленная модификация внутриклеточных липидов и исследование их роли в развитии и криоконсервации преимплантационных эмбрионов домашней кошки.
- 3.2.1. Влияние модификации липидного состава эмбрионов на температуру фазового перехода липидов, развитие эмбрионов *in vitro* и эффективность их криоконсервации.
- **3.2.1.1.** Воздействие линолевой и стеариновой кислоты при культивировании *in vitro* эмбрионов домашней кошки на эффективность их развития. Добавление в культуральную среду 400 мкМ ЛК или 400 мкМ СК не повлияло на развитие эмбрионов (Рисунок 3а,4а), на фрагментацию их ядер, а также на число ядер через 66 ч культивирования (Рисунок 36,4б).
- 3.2.1.2. Влияние линолевой и стеариновой кислоты на степень ненасыщенности и температуру фазового перехода липидов при культивировании эмбрионов *in vitro*. Добавление 400 мкМ ЛК в культуральную среду вызывало достоверное увеличение степени ненасыщенности ($I_{\text{C=C}}/I_{\delta\text{CH}} = 1.08 \pm 0.02$) внутриклеточных липидов по сравнению с контролем ($I_{\text{C=C}}/I_{\delta\text{CH}} = 0.96 \pm 0.03$), а также достоверное снижение T^* на 5 градусов до $T^* = -3.6 \pm 1.2$ °C по сравнению с контролем ($+1.6 \pm 0.8$ °C). Добавление 400 мкМ СК в культуральную среду вызывало достоверное снижение степени ненасыщенности ($I_{\text{C=C}}/I_{\delta\text{CH}} = 0.74 \pm 0.07$)

внутриклеточных липидов, а также достоверное повышение T^* более чем на 20 градусов до $T^* = +25 \pm 0.0$ °C (Рисунок 5).

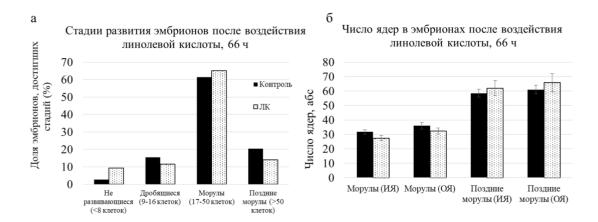


Рисунок 3. Развитие эмбрионов *in vitro* под воздействием линолевой кислоты (a, б). Примечание: ИЯ – интерфазные ядра, ОЯ – общее число ядер. Контроль (n=39); линолевая кислота (n=43); число повторов – 9; число самок – 47

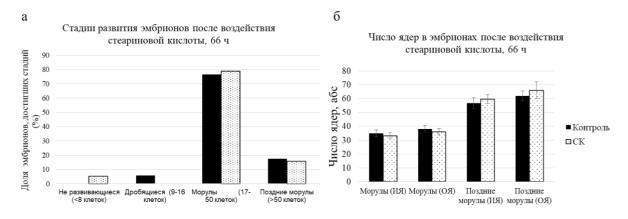


Рисунок 4. Развитие эмбрионов *in vitro* под воздействием стеариновой кислоты (a, б). Примечание: ИЯ – интерфазные ядра, ОЯ – общее число ядер; контроль (n=17); стеариновая кислота (n=19); число повторов – 5; число самок – 49.

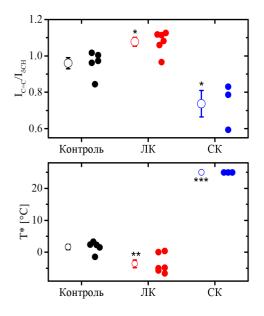


Рисунок 5. Степень ненасыщенности внутриклеточных липидов эмбрионов и их T^* . Примечание: на верхнем графике представлено соотношение интенсивностей $I_{C=C}/I_{\delta CH}$, характеризующее степень ненасыщенности липидов эмбрионов на нижнем графике показана температура фазового перехода эмбрионов; круги с усами соответствуют M±SEM, точки соответствуют каждому измеренному эмбриону. p < 0.05, p < 0.01, p < 0.01по сравнению с контролем.

3.2.1.3. Оценка общего содержания внутриклеточных липидов в преимплантационных эмбрионах домашней кошки. Добавление в среду 400 мкМ ЛК или 400 мкМ СК при культивировании в течение 66 ч не влияло на общее количество внутриклеточных липидов в эмбрионах кошек. В эксперименте с ЛК интенсивность флуоресценции, измеренная по числу фотонов, в контроле — у эмбрионов, культивированных без добавления ЖК составила $18.08*10^6 \pm 1.38*10^6$, а в группе ЛК - $16.92*10^6 \pm 0.97*10^6$. В эксперименте с СК интенсивность флуоресценции в контроле составила $6.4*10^6$ [5.5*10⁶; $7.3*10^6$] и в группе СК - $(5.6*10^6$ [5.2*10⁶; $6.1*10^6$].

3.2.1.4. Жизнеспособность эмбрионов после криоконсервации. Добавление 400 мкМ ЛК в культуральную среду не влияло на долю эмбрионов, находящихся на разных стадиях развития после оттаивания с последующим культивированием *in vitro* в течение 30 ч. Однако, в поздних морулах ЛК группы обнаружено большее число интерфазных ядер (p < 0.05) по сравнению с контролем (Рисунок ба). Индекс фрагментации не отличался между группами после криоконсервации. Добавление 400 мкМ СК эффективность криоконсервации эмбрионов значительно ухудшило (Рисунок 66), что оценено по сниженному числу ядер (р < 0.01) и интерфазных ядер (р < 0.001) в группе СК по сравнению с контролем после криоконсервации и дополнительного культивирования. Кроме того, в эмбрионах группы СК индекс фрагментации достоверно больше (р < 0.001) в группе СК по сравнению с контролем, а именно 97.7 [90.6;100] и 23.8 [12;42.9], соответственно.

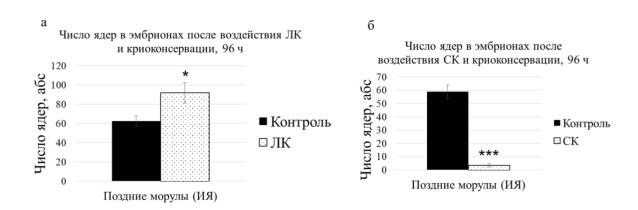


Рисунок 6. Развитие эмбрионов *in vitro* под воздействием линолевой кислоты (а) и стеариновой кислоты (б) после процедуры криоконсервацииоттаивания и дополнительного культивирования. Примечание: ИЯ — интерфазные ядра, ЛК — линолевая кислота, СК — стеариновая кислота; число повторов — 9/5; число самок — 47/49.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате исследования выяснилось, что дейтерированную СК можно применять как витальную изотопную метку в ходе Рамановской спектроскопии для получения новой информации о метаболизме жирных кислот в ооцитах кошачьих, так как она не оказывает токсического воздействия на развитие ооцитов домашних кошек при культивировании іп vitro. В данной работе показано, что поглощение дСК ооцитами становится менее эффективным с течением времени культивирования. Можно предположить, что одной из причин этого является неспособность созревших ооцитов синтезировать достаточное количество белков для поглощения жирных кислот и усиления липидного обмена (Schultz et al., 1978). Однако при использовании 400 мкМ дСК наблюдается большее накопление жирных кислот в клетке по сравнению с использованием меньщих доз дСК: 50, 100 и 200 мкМ. Дейтерированная СК включается во все липидные гранулы в ооцитах (предположительно в основном как компонент триацилглицеринов) и распределяется внутри них равномерно (Рисунок 16). Такое распределение дСК на наших картах КРС согласуется с гипотезой о синтезе триацилглицеринов на поверхности липидных гранул (Wilfling et al., 2013). Также нельзя исключать, что дСК может накапливаться при слиянии уже существующих гранул с новыми образующимися липидными гранулами, ИЗ эндоплазматического ретикулума. Различная концентрация дСК внутри липидных гранул является отражением их неэквивалентности в ооцитах домашней кошки. Липидные гранулы могут различаться по поверхностным белкам, полярным липидам и поверхностному натяжению (Thiam et al., 2013). Таким образом, неоднородность липидного состава В гранулах, которая продемонстрирована на кошачьих в нашей работе, может повлиять на эффективность криоконсервации ооцитов и эмбрионов. Полученные данные нужно учитывать при разработке протоколов замораживания для сохранения генетического разнообразия семейства кошачьих.

Впервые на ооцитах млекопитающих при помощи дейтерированных меток мы показали, что неохлажденные ооциты, которые культивировали при комнатной температуре с добавлением дСК, либо с дОА, содержат жидкой неупорядоченной фазе. Снижение температуры постепенно увеличивает долю липидов в упорядоченном состоянии. Насыщенные липиды в основном находятся в упорядоченной фазе и распределяются на периферии липидных гранул (Рисунок Гипотетически избыточное распределение упорядоченной фазы вблизи поверхности липидных гранул может влиять на фазовое состояние и функциональные свойства поверхностного монослоя (Giraud et al., 2000). Более того, после охлаждения и при последующем нагревании некоторая часть насыщенных липидов остается в упорядоченном состоянии даже при 40°C, что выше оптимальной физиологической температуры для ооцитов кошачьих (Herrick et al., 2019). В отличие от насыщенных липидов, ненасыщенные липиды более распространены в неупорядоченных фазах, и располагаются в центре липидных гранул (Рисунок 1г). Таким образом качественный состав внутриклеточных липидов играет важную роль в ходе замораживания клеток, в особенности для богатых липидами ооцитов и эмбрионов млекопитающих, в частности, представителей семейства Felidae.

По литературным данным известно, что ЛК/конъюгированные изомеры ЛК либо не влияют (в относительно низких дозах – до 100 мкМ), либо приводят к негативным последствиям (в высоких концентрациях >100 мкМ) при дозревании ооцитов и последующем развитии эмбрионов парнокопытных животных (Hochi et al., 1999; Marei et al., 2010; Absalon-Medina et al., 2014; Amini et al., 2016; Roura et al., 2018). Однако в настоящей работе относительно большая дозировка ЛК (400 мкМ), не оказала существенного влияния на дозревание in vitro ооцитов домашней кошки (Рисунок 2а). Это может быть связано с составом внутриклеточных липидов, в частности, степенью их ненасыщенности, которая в ооцитах домашней кошки более высокая по сравнению с некоторыми другими видами млекопитающих, в частности по сравнению с ооцитами крупного рогатого скота (Amstislavsky et al., 2019). В случае с эмбрионами есть работы, которые демонстрируют не только негативный, но и позитивный эффект ЛК и ее изомеров на развитие эмбрионов некоторых видов млекопитающих (Hochi et al., 1999; Lapa et al., 2011; Dias et al., 2020). Возможно, в силу видовой специфики, ЛК не является важным фактором, влияющим на преимплантационный период развития у домашних кошек, и этим можно объяснить отсутствие эффекта ЛК в данной дозе на развитие 3). Отсутствие изменения эмбрионов in vitro (Рисунок ненасыщенности внутриклеточных липидов ооцитов при добавлении ЛК в культуральную среду можно объяснить слишком коротким временем воздействия ЛК на ооциты (Dias et al., 2020). Однако, ЛК активно проникала эмбриональные клетки, повышая уровень ненасыщенности внутриклеточных липидов в эмбрионах после 66 ч культивирования *in vitro* (Рисунок 8). Предполагается, что чем выше T^* , тем более клетки повреждениям подвержены при охлаждении, тем ниже жизнеспособность после криоконсервации (Zeron et al., 2002). Снижение T^* примерно на 5 °C в эмбрионах (Рисунок 5), но не в ооцитах, под воздействием ЛК по сравнению с контролем может быть связано с повышением степени ненасыщенности внутриклеточных липидов. Данная зависимость степени ненасыщенности от T^* согласуется с данными, полученными на эмбрионах мышей (Igonina et al., 2021). Воздействие ЛК во время дозревания in vitro ооцитов не повлияло на их жизнеспособность после процедур замораживания-оттаивания (Рисунок 26), что можно изменения T^* из-за отсутствием слишком инкубирования ооцитов с жирной кислотой. Однако у эмбрионов кошек, подвергнутых воздействию ЛК in vitro, а затем замораживаниюоттаиванию, наблюдали увеличение числа клеток в поздних морулах (Рисунок ба), развивающихся в культуре *in vitro* после криоконсервации, что согласуется исследованиями, проведенными млекопитающих (Pereira, Marques, 2008; Absalon-Medina et al., 2014; Accorsi

еt al., 2016; Dias et al., 2020). Существует предположение, что ЛК способна изменять метаболизм эмбрионов, что может положительно сказаться на их развитии *in vitro* (Accorsi et al., 2016). Также ЛК может приводить к увеличению текучести мембраны за счет ее прямого включения в липидный бислой (Hochi et al., 1999). Результаты настоящего исследования вносят существенный вклад в подтверждение гипотезы о том, что увеличение степени ненасыщенности внутриклеточных липидов приводит к снижению T^* , и повышает криотолерантность эмбрионов домашней кошки, что может быть в будущем применено и по отношению к диким видам кошачьих

Добавление СК в среду для дозревания ооцитов *in vitro* не повлияло на их развитие (Рисунок 4а), что может быть связано с защитным эффектом кумулюсных клеток, которые окружают ооциты на этапе их дозревания (Aardema et al., 2017) и не слишком длительным временем экспозиции. После воздействия СК в течение 24 часов на ооциты изменение степени ненасыщенности внутриклеточных липидов не наблюдалось, однако T^* увеличилась по сравнению с контролем. По-видимому, того количества СК, которое успело проникнуть в ооциты за 24 ч достаточно для повышения T^* . Несмотря на то, что T^* значительно повысилась, эффективность криоконсервации ооцитов не изменилась по сравнению с контрольной группой (Рисунок 4б). Возможно такое повышение температуры фазового перехода не было критическим для жизнеспособности ооцитов. Можно предположить, что в силу более ненасыщенного липидного состава ооцитов, которое показано ранее Окотрубом с соавторами (Okotrub et al., 2018), происходит компенсация увеличения T^* , и клетка справляется с негативным эффектом насыщенных жирных кислот. Культивирование эмбрионов с СК также не повлияло на их развитие. Однако, выявлено, что степень ненасыщенности липидов в эмбрионах, после культивирования іп vitro с добавлением СК значительно снижается, в то время как T^* в эмбрионах значительно повышается по сравнению с контролем (Рисунок 5), что привело к значительному снижению эффективности криоконсервации эмбрионов (Рисунок 6б). Полученные данные эффективности ПО замораживания согласуется с исследованиями, полученными на крупном рогатом скоте (Shehab-El-Deen et al., 2009; Aardema et al., 2022).

Таким образом, в ходе данной работы, подтверждена гипотеза о том, ненасыщенности липидов играет важную криоустойчивости ооцитов и эмбрионов домашней кошки. Полученные данные впервые показаны для ооцитов и эмбрионов представителя семейства кошачьих – домашней кошки и являются важными с точки зрения разработки новых протоколов криоконсервации эмбрионов как домашней кошки, так и диких кошачьих. Полученные результаты являются важными для понимания роли липидов в развитии ооцитов и преимплантационных эмбрионов домашней кошки (Felis silvestris catus), а также с точки зрения сохранения биоразнообразия, так как помогут разработке новых протоколов криоконсервации эмбрионов диких кошачьих. Продемонстрированная впервые зависимость эффективности криоконсервации эмбрионов домашней кошки степени ненасыщенности

внутриклеточных липидов может внести важный вклад не только в зоологию, но и в фундаментальную и прикладную криобиологию.

В качестве рекомендаций по реализации программ сохранения генетического разнообразия диких представителей кошачьих, в том числе разводимых в неволе представителей малых кошек (Felinae), предлагается измерять степень ненасыщенности липидного состава получаемых преимплантационных эмбрионов, и, в зависимости от результата, применять дополнительное культивирование *in vitro* с добавлением ненасыщенных жирных кислот. Эмбрионы с достаточно высоким показателем степени ненасыщенности липидов могут быть более успешно криоконсервированы и помещены в криобанк для сохранения генетического разнообразия соответствующего вида или подвида малых кошек.

ВЫВОДЫ

- 1. Дейтерированные жирные кислоты проникают в липидные гранулы ооцитов домашней кошки и распределяются внутри них равномерно при комнатной температуре, а при охлаждении до -25° С более насыщенные липиды располагаются по периферии липидных гранул, в то время как более ненасыщенные липиды располагаются по центру липидных гранул.
- 2. Воздействие в ходе культивирования *in vitro* 400 мкМ ненасыщенной линолевой кислоты либо 400 мкМ насыщенной стеариновой кислоты приводит к увеличению (на 12,5%) и снижению (на 23%), соответственно, степени ненасыщенности внутриклеточных липидов в преимплантационных эмбрионах, но не влияет на степень ненасыщенности липидов ооцитов домашней кошки.
- 3. Добавление 400 мкМ ненасыщенной линолевой либо 400 мкМ насыщенной стеариновой кислот в процессе дозревания ооцитов и культивирования преимплантационных эмбрионов домашней кошки не влияет на их развитие *in vitro* при физиологических температурах.
- 4. Добавление 400 мкМ линолевой кислоты в культуральную среду приводит к снижению температуры фазового перехода липидов в преимплантационных эмбрионах (на 5°C), но не ооцитах домашней кошки при их охлаждении; добавление же 400 мкМ стеариновой кислоты в культуральные среды приводит к повышению температуры фазового перехода липидов как в ооцитах (на 11°C), так и в эмбрионах домашней кошки (>20°C).
- 5. Добавление 400 мкМ линолевой кислоты в культуральную среду не повлияет на эффективность криоконсервации ооцитов, но приводит к повышению эффективности криоконсервации преимплантационных эмбрионов домашней кошки, которую оценивали по увеличению числа интерфазных ядер в поздних морулах. Добавление 400 мкМ стеариновой кислоты в культуральную среду не влияет на эффективность криоконсервации ооцитов, но приводит к снижению эффективности криоконсервации эмбрионов, которую оценивали по снижению как общего числа ядер, так и интерфазных ядер, а также по увеличению процента фрагментированных ядер.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ Статьи:

- 1. **Раннева С.В.** (Окотруб С.В.), Брусенцев, Рожкова И.Н., Игонина Т.Н., Рагаева Д.С., Ершов Н. И., Амстиславский С.Я. Влияние культивирования эмбрионов на онтогенез потомства млекопитающих. Онтогенез. 2020. V. 6(51). P. 417-439.
- 2. **Ranneva, S. (Okotrub S.)**, Okotrub, K., Amstislavsky, S., Surovtsev, N. Deuterated stearic acid uptake and accumulation in lipid droplets of cat oocytes // Arch. Biochem. Biophys. 2020. V. 692. P. 108532.
- 3. Амстиславский, С.Я., Мокроусова В. И., **Окотруб, С. В.**, Брусенцев, Е. Ю., Напримеров, В. А. Применение концепции криобанка по отношению к диким и исчезающим видам отряда хищных (Carnivora) // Онтогенез. -2021. Т. 52. № 5. С. 345-366.
- 4. Okotrub, K., **Okotrub**, **S**., Mokrousova, V., Amstislavsky, S., Surovtsev, N. Lipid phase transitions in cat oocytes supplemented with deuterated fatty acids // Biophys. J. 2021. V. 120(24). P. 5619-5630.
- 5. **Окотруб С.В.**, Лебедева Д.А., Окотруб К.А., Чуйко Э.А., Брусенцев Е.Ю., Рахманова Т.А. Амстиславский С.Я. Влияние линолевой кислоты на криоконсервацию полученных путем ЭКО эмбрионов домашней кошки // Онтогенез 2022 Т. 53 (5). С. 1-13.

Тезисы:

- 1. Напримеров В.А., Окотруб К.А., Брусенцев Е.Ю., Игонина Т.Н., **Раннева С.В.** (Окотруб С.В.), Чуйко Э.А., Рожкова И.Н., Мокроусова В.И., Амстиславский С.Я. Модификация состава липидных гранул в преимплантационных эмбрионах млекопитающих при их культивировании *in vitro*. VIII Научно-практическая конференция с международным участием «Генетика фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции». Ростов-на-Дону, 2019.
- 2. **Окотруб С.В.**, Окотруб К.А., Лебедева Д.А. Влияние культивирования преимплантационных эмбрионов кошки с линолевой кислотой на эффективность их криоконсервации, степень ненасыщенности липидов и температуру их фазового перехода. XXVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов». Москва, 2021.
- 3. **Okotrub S.V.**, Okotrub K.A., Lebedeva D.A., Chuyko E.A, Brusentsev E.Yu., Amstislavsky S.Ya. Cryopreservation of domestic cat preimplantation embryos: effects of in vitro ex-posure to linoleic acid. CRYO2021 The Society for Cryo-biology's 58th Annual Meeting, Poster session, Chicago, 2021.
- 4. Okotrub K.A., **Okotrub S.V.**, Amstislavsky S.Ya., Surovtsev N.V. Study of the lipid phase transition in cat oocytes using raman spectroscopy of deuterium labeled lipids. The Society for Cryo-biology's 58th Annual Meeting, Poster session, Chicago, 2021.