

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ИНСТИТУТ  
ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ  
АКАДЕМИИ НАУК

*На правах рукописи*

УДК 599.742.7; 591.3

**Окотруб Светлана Васильевна**

Раннее развитие и криоконсервация ооцитов и эмбрионов малых кошек  
(Felidae: Felinae): влияние внутриклеточных липидов

1.5.12 – зоология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
д.б.н. С.Я. Амстиславский

Новосибирск – 2023

## Оглавление

Введение.....	5
Глава 1. Обзор литературы.....	19
1.1. Проблема сохранения генетического разнообразия диких видов млекопитающих на примере семейства Felidae .....	19
1.1.1 Систематика, разнообразие кошачьих и их охранный статус.....	19
1.1.2. Подходы к сохранению генетического разнообразия кошачьих: <i>ex situ</i> и <i>in situ</i> .....	20
1.1.3. Применение вспомогательных репродуктивных технологий для сохранения биоразнообразия в семействе кошачьих .....	23
1.2. Роль липидов в раннем развитии млекопитающих .....	30
1.2.1. Характеристика стадий созревания ооцитов и развития преимплантационных эмбрионов.....	30
1.2.2. Состав внутриклеточных липидов в ооцитах и эмбрионах различных видов млекопитающих.....	37
1.3. Криоконсервация ооцитов и эмбрионов как подход к сохранению генетических ресурсов млекопитающих .....	42
1.3.1. Описание методов криоконсервации .....	42
1.3.2. Фазовые переходы липидов при замораживании ооцитов и преимплантационных эмбрионов.....	46
1.3.3. Эффективность криоконсервации ооцитов и эмбрионов с различным содержанием внутриклеточных липидов .....	48
1.4. Способы воздействия на состав внутриклеточных липидов с целью улучшения результатов криоконсервации ооцитов и преимплантационных эмбрионов млекопитающих .....	54
1.4.1. Влияние линолевой и стеариновой кислот на ооциты и преимплантационные эмбрионы млекопитающих .....	57
1.5. Заключение к литературному обзору.....	64
Глава 2. Материалы и методы исследования .....	65

2.1. Животные .....	65
2.2. Созревание ооцитов <i>in vitro</i> .....	66
2.3. Получение сперматозоидов и экстракорпоральное оплодотворение .....	66
2.4. Приготовление растворов жирных кислот .....	67
2.5. Дизайн эксперимента.....	69
2.5.1. Модификация липидного состава ооцитов домашней кошки.....	69
2.5.2. Модификация липидного состава преимплантационных эмбрионов домашней кошки .....	72
2.6. Криоконсервация ооцитов.....	75
2.7. Криоконсервация эмбрионов .....	76
2.7.1. Криоконсервация эмбрионов (протокол 1) .....	76
2.7.2. Криоконсервация эмбрионов (протокол 2) .....	77
2.8. Флуоресцентная микроскопия .....	78
2.8.1. Окрашивание 4',6-диамидино-2-фенилиндолом.....	78
2.8.2. Окрашивание тетраметилродамином.....	80
2.9. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия с применением красителя нильский красный .....	81
2.10. Спектроскопия комбинационного рассеяния света.....	81
2.10.1. Экспериментальная установка.....	82
2.10.2. Оценка степени ненасыщенности внутриклеточных липидов.....	82
2.10.3. Измерение температуры начала фазового перехода липидов .....	84
2.11. Статистика .....	85
2.12. Список использованных материалов .....	86
Глава 3. Результаты.....	89
3.1. Направленная модификация внутриклеточных липидов и исследование роли липидов в развитии и криоконсервации ооцитов домашней кошки .....	89

3.1.1. Поглощение дейтерированных жирных кислот ооцитами и их распределение внутри липидных гранул.....	89
3.1.2. Влияние модификации липидного состава ооцитов на температуру фазового перехода липидов, развитие ооцитов <i>in vitro</i> и эффективность их криоконсервации .....	96
3.2. Направленная модификация внутриклеточных липидов и исследование их роли в развитии и криоконсервации преимплантационных эмбрионов домашней кошки .....	102
3.2.1. Влияние модификации липидного состава эмбрионов на температуру фазового перехода липидов, развитие эмбрионов <i>in vitro</i> и эффективность их криоконсервации .....	102
Глава 4. Обсуждение.....	117
4.1. Роль липидного состава ооцитов домашней кошки в их развитии <i>in vitro</i> до и после криоконсервации .....	117
4.1.1. Распределение жирных кислот внутри липидных гранул ооцитов домашней кошки при комнатной температуре .....	117
4.1.2. Распределение жирных кислот внутри липидных гранул ооцитов домашней кошки при замораживании .....	119
4.1.3. Влияние линолевой и стеариновой кислот на созревание ооцитов домашней кошки <i>in vitro</i> .....	121
4.2. Роль липидного состава преимплантационных эмбрионов домашней кошки в их развитии <i>in vitro</i> до и после криоконсервации.....	124
4.2.1. Влияние линолевой кислоты на преимплантационные эмбрионы домашней кошки .....	124
4.2.2. Влияние стеариновой кислоты на преимплантационные эмбрионы домашней кошки .....	127
4.3. Рекомендации по сохранению генетических ресурсов диких кошачьих	130
Заключение .....	135
Список сокращений .....	139
Список литературы .....	142
Приложение 1 .....	170

## Введение

### Актуальность темы исследования

Представители отряда хищных (Carnivora), в частности, некоторые кошачьи, находятся под угрозой исчезновения в их естественной среде обитания (Найденко, 2015; IUCN, 2022). Криоконсервация гамет и преимплантационных эмбрионов является перспективным подходом к сохранению генетического разнообразия исчезающих видов млекопитающих – в том числе, представителей отряда хищных (Pope, 2000; Amstislavsky et al., 2012; Jewgenow et al., 2017; Comizzoli, Holt, 2019; Амстиславский и др., 2021). Для разработки эффективных протоколов криоконсервации используют биологический материал домашней кошки (*Felis silvestris catus*), которую рассматривают в качестве модельного объекта для изучения криотолерантности эмбрионов и гамет диких представителей семейства кошачьих (Mokrousova et al., 2020b; Sowinska et al., 2020; Kochan et al., 2021a,b; Амстиславский и др., 2021). Однако нет универсального, а главное эффективного протокола криоконсервации кошачьих гамет и эмбрионов. Существует предположение, что липиды, которые в большом количестве присутствуют в цитоплазме ооцитов и преимплантационных эмбрионов представителей отряда Carnivora, и в частности, кошек, повышают чувствительность ооцитов и клеток эмбрионов к охлаждению и криоконсервации (Amstislavsky et al., 2019; Borges, Vireque, 2019; Idrissi et al., 2021, 2022).

Липиды в процессе программного замораживания претерпевают фазовый переход, т.е. переход из неупорядоченного конформационного состояния углеводородных цепочек в упорядоченное, что может инициировать повреждение клетки (Quinn, 1985; Ghetler et al., 2005). Температура фазового перехода ( $T^*$ ) липидов может играть важную роль в

процессе криоконсервации клеток, поскольку предполагается, что данный показатель связан с криповреждением мембран, возникающим при относительно высоких температурах в начале протокола охлаждения (Zeron et al., 2002). Кроме того, при замораживании фазовый переход липидов изменяет свойства мембран: функционирование мембранных белков (Van Meer et al., 2008), пространственное распределение липидов (Quinn, 1985) и мембранный транспорт (Elamrani, Blume, 1983). Исследования, проведенные на искусственно созданных мембранах, показали, что липиды претерпевают фазовый переход при различных температурах, причем, чем выше степень ненасыщенности липидов, тем ниже  $T^*$  (Dmitriev, Surovtsev, 2015). Модифицирование липидного состава клеток в культуре *in vitro* с целью изменения степени ненасыщенности липидов и, соответственно, их  $T^*$ , может рассматриваться в качестве стратегии, направленной на минимизацию негативных последствий 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). Результаты такого исследования могут стать ключом к разработке более эффективных протоколов криоконсервации ооцитов и эмбрионов, родственных домашней кошке представителей диких видов кошачьих, находящихся под угрозой исчезновения, и помогут сохранить их генетическое разнообразие. Более того, поскольку среди млекопитающих достаточно много видов с ооцитами и эмбрионами, богатыми внутриклеточными липидами, поиск эффективных способов направленного воздействия на состав этих липидов важен для сохранения генетического разнообразия всех этих видов, а не только представителей семейства кошачьих. 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; Брусенцев и др., 2019; Amstislavsky et al., 2019). Между тем, мало что известно о составе внутриклеточных липидов кошачьих, и попытки изучить этот состав (Apparicio et al., 2012) не привели пока к значимому прогрессу в понимании роли липидов в повреждении клеток в процессе их криоконсервации. Ранее предпринимались попытки делипидизации ооцитов (Galiguis et al., 2014) и эмбрионов (Tharasanit, Techakumphu, 2011), но изменение степени ненасыщенности внутриклеточных липидов ооцитов и эмбрионов кошачьих продемонстрировано в нашей работе впервые.

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). Поскольку эмбрионы и ооциты кошачьих богаты липидами, эта проблема касается представителей данного семейства хищных в полной мере.

Проверка гипотезы о том, что криоустойчивость клеток зависит не только от общего количества, но и от степени ненасыщенности внутриклеточных липидов, с использованием богатых липидами ооцитов и преимплантационных эмбрионов домашней кошки в качестве модели исследования, 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. Между тем, в отличие от мышей, ооциты и

эмбрионы которых содержат мало липидов, роль которых в преимплантационном развитии не вполне понятна (Bradley, Swann, 2019; Ibayashi et al., 2021; Arena et al., 2021), ооциты и эмбрионы кошек и других видов кошачьих богаты внутриклеточными липидами (Guraya, 1965; Gomez et al., 2004; Apparicio et al., 2012; Брусенцев и др., 2019; Amstislavsky et al., 2019; Zahmel et al., 2021). В исследованиях на ооцитах и эмбрионах домашней кошки, выполненных с использованием спектроскопии комбинационного рассеяния света (КРС) или Рамановской спектроскопии 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 продемонстрировано, что при  $-25^{\circ}\text{C}$  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. Подходы колебательной спектроскопии имеют низкую способность различать разные липиды и изучать эффект разделения различных фаз агрегатного состояния липидов (Okotrub et al., 2018; Mokrousova et al., 2020a). Тем не менее, можно выделить интересные молекулы с помощью мечения стабильными изотопами. Замена протонов на дейтерии приводит к изотопическому сдвигу колебательных спектров в область спектра, не занятую другими линиями, что позволяет проводить независимое исследование дейтерированных соединений. Рамановская спектроскопия, дейтерированных соединений сочетает в себе бесконтактные измерения высокого разрешения флуоресцентной микроскопии и чувствительность к изотопным меткам масс-спектрометрии, поэтому является надежной методикой для решения зоологических задач.

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). Ооциты и полученные путем экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) эмбрионы домашней кошки могут служить удобной моделью для такого рода исследований (Okotrub et al., 2018, Брусенцев и др., 2019; Amstislavsky et al., 2019; Mokrousova et al., 2020 a,b).

Результаты работы помогут пониманию роли липидов в раннем развитии кошачьих и разработке эффективных протоколов для сохранения генетических ресурсов представителей *Felinae*

В связи с этим поставлены следующие цель и задачи работы.

**Цель работы** – 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 полученных путем ЭКО эмбрионах домашней кошки (*Felis silvestris catus*). В частности, при помощи спектроскопии КРС с использованием дейтерированных жирных кислот, исследован процесс их накопления в созревающих *in vitro* ооцитах домашней кошки и их распределение внутри липидных гранул при комнатной температуре и при замораживании. Данный подход позволил впервые определить  $T^*$  фракций липидов с разной степенью 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) или ненасыщенной (линолевой) жирных кислот. В результате, впервые на ооцитах и эмбрионах кошачьих, произведено направленное изменение степени ненасыщенности внутриклеточных липидов в развивающихся *in vitro* эмбрионах в сторону ее снижения либо возрастания.

Впервые 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 измененным составом внутриклеточных липидов. Впервые с использованием ооцитов и полученных путем ЭКО 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 преимплантационных эмбрионов видов семейства кошачьих. Показано, что направленное изменение степени ненасыщенности внутриклеточных липидов преимплантационных эмбрионов домашней кошки при определенных условиях их культивирования сопровождается повышением их 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

Для исследования ооцитов и эмбрионов получали яичники домашних кошек и придатки семенников (epididymides) домашних котов в пункте стерилизации домашних животных в г. Новосибирске. Ооциты получали путем измельчения ткани яичника, а эмбрионы – при помощи экстракорпорального оплодотворения *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 комбинационного рассеяния света. Дозревание ооцитов и развитие эмбрионов *in vitro* после воздействия жирных кислот оценивали при помощи окрашивания 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 помощи тетраметилродамина (TMRM), который 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 методов, которые подробно описаны в главе 2:

- культивирование гамет и эмбрионов млекопитающих *in vitro*;
- световая микроскопия;

- флуоресцентная микроскопия с применением таких красителей как 4',6-диамидино-2-фенилиндо́л (DAPI) и тетраметилродамин (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 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI), тетраметилродамин (TMRM) и нильский красный (Nile Red). Кроме того, в данном исследовании применяли спектроскопию КРС, которая позволяет получить информацию о степени ненасыщенности липидов, содержащихся в исследуемых клетках, и их  $T^*$ . Кроме того, при помощи спектроскопии КРС удалось исследовать эффективность поглощения дейтерированных жирных кислот и их распределение внутри липидных гранул ооцитов *Felis silvestris catus*. Данная методика сочетает в себе высокое пространственное разрешение оптической микроскопии и чувствительность масс спектрометрии, что делает ее мощным инструментом для исследования, в частности, для изучения внутриклеточных липидов млекопитающих. В работе данный подход был применен к ооцитам и преимплантационным эмбрионам. При наборе материала в работе использовали принцип рандомизации, т.е. полученные от каждой кошки ооциты и эмбрионы делили случайным образом между группами. Общее число самок для экспериментальной работы составило 171 особи, самцов – 9 особей. Число ооцитов во всех экспериментальных блоках составило 380, число эмбрионов – 286. Для каждого эксперимента созданы как опытные, так и контрольные группы с числом повторов не менее пяти. В процессе статистической обработки все выборки проверяли на нормальное распределение с помощью W-критерия Шапиро – Уилка с использованием пакета STATISTICA. Для сравнения данных использовали корректные методы

статистического анализа, такие как метод хи-квадрат, t-критерий Стьюдента и U-критерий Манна – Уитни.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертация соответствует следующим направлениям исследования, указанным в паспорте научной специальности 1.5.12 – зоология.

Пункт № 2. Онтогенез: закономерности роста и развития. В диссертации представлены результаты по влиянию жирных кислот на раннее развитие представителя семейства кошачьих, подсемейства малых кошек (Felinae) – *Felis silvestris catus*, а именно: на созревание, рост и жизнеспособность ооцитов и преимплантационных эмбрионов *in vitro* до и после криоконсервации.

Пункт № 6. Разработка научных рекомендаций по охране животных. Результаты, полученные в ходе диссертационного исследования, могут быть применимы к разработке протоколов криоконсервации эмбрионов представителей подсемейства малых кошек (Felinae), в частности, тех, которые являются редкими, уязвимыми или исчезающими. Рекомендации, представленные в обсуждении, могут быть полезны для повышения эффективности криоконсервации эмбрионов диких представителей Felidae и сохранить их генетическое разнообразие.

### **Апробация результатов**

Материалы диссертации обсуждены на конференциях: “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»”, (Ростов-на-Дону, 2019); “CRYO2021 The society for cryo-biology’s 58th annual meeting” (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).

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано три научные статьи в рецензируемых отечественных изданиях, две статьи в рецензируемых зарубежных изданиях и четыре тезиса в сборниках трудов конференций.

### **Список публикаций**

#### **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. (Окотруб С. В.)**, 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., Иголина 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. CRYO2021. The Society for Cryo-biology's 58th Annual Meeting, Poster session, Chicago, 2021.

## **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.

## **Благодарности**

Автор выражает благодарность научному руководителю д-ру биол. наук Сергею Яковлевичу Амстиславскому, канд. физ.-мат. наук Окотрубю Константину Александровичу, а также всем сотрудникам сектора криоконсервации и репродуктивных технологий за неоценимую помощь на всех этапах работы над диссертацией.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1. Проблема сохранения генетического разнообразия диких видов млекопитающих на примере семейства *Felidae*

#### 1.1.1 Систематика, разнообразие кошачьих и их охранный статус

Семейство кошачьих (*Felidae*) относится к отряду Хищные (*Carnivora*). Некоторые исследователи выделяют 41 вид в семействе кошачьих (Kitchener, 2017). Согласно данным международного союза охраны природы (IUCN, 2022) в данном семействе выделяют 14 родов, включающих в себя 38 видов. В Таблице 12 представлена таксономия семейства кошачьих, некоторые характеристики видов и их охранный статус по IUCN (Приложение 1). Все кошачьи подразделяются на два подсемейства – большие (*Pantherinae*) и малые (*Felinae*) кошки. К первым относят пять крупных видов из рода Пантера (*Panthera*): ирбис (*Panthera uncia*), леопард (*Panthera pardus*), ягуар (*Panthera onca*), лев (*Panthera leo*), тигр (*Panthera tigris*); а также два представителя из рода Дымчатые леопарды (*Neophelis*): дымчатый леопард (*Neophelis nebulosa*) и борнейский дымчатый леопард (*Neophelis diardi*). К малым кошкам относятся остальные 12 родов и, соответственно, 31 вид кошек (Kitchener, 2017; IUCN, 2022). Основным отличием больших кошек от малых является наличие в гортани длинных, утолщенных, эластичных голосовых связок, которые резонируют и позволяют крупным кошкам рычать (Kitchener, 2017). В то время как малые кошки имеют более простые голосовые связки, которые позволяют им мурлыкать, шипеть, урчать, но не позволяют издавать рык (Hast et al., 1989; Kitchener, 2017).

Естественные места обитания кошачьих распространены практически по всему миру, за исключением Австралии, Арктики и Антарктики (Kitchener, 2017). Дикие кошачьи – это хищные животные, которым требуются большие территории обитания с достаточным количеством пищевых ресурсов. Однако

рост популяции человека привел к снижению численности большинства видов (Thongphakdee et al., 2020). Среди представителей семейства Felidae встречается больше видов, находящихся под угрозой исчезновения, по сравнению с другими млекопитающими. Согласно IUCN (2022) 29 из 38 видов кошачьих имеют тенденцию к снижению численности особей. Охранный статус около 50% всех диких видов кошачьих вызывает большое беспокойство у исследователей и природоохранных организаций, так как пять видов являются исчезающими, а 13 видов – уязвимыми (IUCN, 2022). Следует также отметить, что во многих видах, которые, в целом, не являются уязвимыми или исчезающими, есть подвиды, которые таковыми являются (Izawa et al., 2009; Lewis et al., 2020).

Объектом данной работы является домашняя кошка, относящаяся к подсемейству Felinae, роду *Felis*, в котором ее выделяют либо в отдельный вид *Felis catus*, либо относят к подвиду лесного кота – *Felis silvestris catus*. Домашняя кошка часто выступает модельным объектом для совершенствования методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), применимых для сохранения диких видов кошачьих, находящихся под угрозой исчезновения (Gomez et al., 2003; Pope et al., 2012a,b; Mokrousova et al., 2020b; Амстиславский и др., 2021; Kochan et al., 2021a,b).

### **1.1.2. Подходы к сохранению генетического разнообразия кошачьих: *ex situ* и *in situ***

В настоящий момент многие виды и подвиды семейства кошачьих находятся под угрозой исчезновения в их естественной среде обитания (IUCN, 2022). Основной причиной снижения численности представителей таксона Felidae является развитие человеческой цивилизации, которое привело к повышению эксплуатации природных ресурсов и, соответственно, к уменьшению источников пищи для диких животных, а также сокращению и нарушению как их индивидуальных участков, так и в целом ареала обитания

вида. Кроме того, незаконная охота также вносит вклад в снижение природных популяций зверей. Сокращение популяций и их фрагментация на небольшие изолированные группы значительно затрудняют поток генов, что приводит к инбридингу, и представляет серьезную угрозу сохранения биоразнообразию всех видов кошек, обитающих в дикой природе (Napolitano et al., 2015; Lehoska et al., 2021; Khan et al., 2021). Программы сохранения диких кошачьих включают применение двух подходов – *in situ* и *ex situ*.

Деятельность по сохранению диких кошачьих *in situ* (с лат. – «на месте») заключается в защите видов в их естественной среде обитания и восстановлении экосистем. Кроме этого, территориям, на которых обитают дикие кошки, присваивается статус заповедников. Примером сохранения *in situ* может служить поддержание популяции евразийской рыси (*Lynx lynx*) за счет восстановления связи между большими лесами, улучшения качества лесов, повышения доступности источников пищи (Schmidt et al., 2011; Kochan et al., 2019; Premier et al., 2021). Преимущество подхода *in situ* связано с комплексной защитой местообитаний животных и экосистем. Однако ввиду достаточно быстрого изменения климата и все большего разрушения среды обитания опора исключительно на подходы *in situ* не может обеспечить долгосрочное сохранение многих видов.

Программы *ex situ* (с лат. – «вне места») направлены на создание зоопарков и ферм, где содержат и поддерживают животных с опасным охранным статусом в неволе (Kleinman-Ruiz et al., 2019). Примером таких программ может служить научно-экспериментальная база Черноголовка (Россия, Московская область), целью создания которой является изучение поведения и коммуникации диких видов млекопитающих, таких как обыкновенная рысь (*L. lynx*), рыжая рысь (*Lynx rufus*), дальневосточный лесной кот (*Prionailurus bengalensis euptilurus*) и др., в больших вольерах и экспериментальных полигонах, где условия приближены к естественным местам обитания животных (Найденко, 2015). Решение фундаментальных

проблем этологии, экологии и общей зоологии важно для сохранения и разведения редких видов млекопитающих. Создание банков генетических ресурсов для воспроизводства потомства диких представителей кошачьих и их реинтродукции, то есть возвращения в естественную среду обитания, также являются важной частью программ *ex situ* (Амстиславский и др., 2017). Подход *ex situ* вносит существенный вклад в охрану исчезающих видов и быстро развивается благодаря глобальной координации, инфраструктуре, практическим знаниям (Pritchard et al., 2012; Thongphakdee et al., 2020).

Используемые в настоящее время методы сохранения диких представителей семейства кошачьих не гарантируют устойчивости их популяции. Для разработки эффективных и оптимальных программ сохранения кошачьих необходимо объединить достижения различных научных дисциплин таких как генетика, экология, репродуктивная биология с целью сохранения биоразнообразия различных видов кошачьих, в том числе редких и исчезающих (Kochan et al., 2019), а также применить междисциплинарный подход при работе с этими видами. Хотя естественное скрещивание находится на первом месте по восполнению популяций исчезающих видов в условиях неволи (Swanson et al., 2006; Swanson et al., 2007), часто животные плохо размножаются по разным причинам, например, из-за агрессивности самцов, поведенческой несовместимости или бесплодия (Thongphakdee et al., 2020). За последние несколько лет знания о репродукции кошачьих значительно расширились благодаря исследованиям с использованием домашней кошки в качестве исследовательской модели (Amstislavsky et al., 2018; Brusentsev et al., 2018; Luvoni et al., 2018). Во многом благодаря этим работам на домашней кошке, а также исследованиям на некоторых других видах кошачьих, включая исчезающих представителей этого семейства, получены знания о репродуктивной биологии кошачьих, которые позволяют эффективно применить репродуктивные технологии в

контексте сохранения биоразнообразия отдельных видов и подвидов этого семейства.

### **1.1.3. Применение вспомогательных репродуктивных технологий для сохранения биоразнообразия в семействе кошачьих**

Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ), например, искусственное осеменение (ИО), сбор ооцитов и их созревание *in vitro* (IVM – *in vitro* maturation), сбор семени *in vivo* или *post mortem*, экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (ИКСИ/ICSI – intracytoplasmic sperm injection), трансплантация эмбрионов или ядерного материала соматической клетки применяются учеными по всему миру, чтобы спасти от исчезновения отдельные виды и подвиды семейства кошачьих (Lueders et al., 2014; Baldassare et al., 2017; Erdmann et al., 2020; Zahmel et al., 2021; Pope et al., 2006a; Gomez et al., 2008; Pope et al., 2012a), а также представителей других таксонов (Herrick, 2019). Важнейшим подходом к сохранению генетического разнообразия различных таксонов млекопитающих является создание криобанков гамет и эмбрионов (Thongphakdee et al., 2020). Уже несколько десятилетий назад в классических работах отечественных исследователей Вепринцева и Ротта, а также зарубежных авторов, в частности, Вилдта и его соавторов, указывалось на перспективность применения методов репродуктивной биологии и криобиологии для сохранения диких видов млекопитающих (Veprintsev, Rott, 1979; Wildt, 1992; Wildt, Roth, 1997). В настоящее время эти методы становятся все более важными и значимыми для сохранения биоразнообразия диких видов отряда хищных (Амстиславский и др., 2017; 2021; Wild et al., 2009; Comizzoli, Holt, 2019; Praxedes et al., 2018; Luvoni, Colombo, 2020; Fernandez-Gonzalez et al., 2021). Рассмотрим подробнее применение этих подходов с целью сохранения генетических ресурсов кошачьих.

### 1.1.3.1. Получение семени кошачьих

Прогресс развития ВРТ по отношению к сохранению диких представителей кошачьих зависит от возможности получения достаточного пула гамет хорошего качества (Kochan et al., 2021a). Одним из способов забора семени у диких котов *in vivo* является электроэякуляция. Таким способом получено семя у многих видов кошачьих, в частности, у гепарда (*Acinonyx jubatus*), дальневосточного лесного кота (*P. bengalensis euptilurus*), маргая (*Leopardus wiedii*) и многих других в целях последующей криоконсервации (Terrell et al., 2012; Amstislavsky et al., 2018; Erdmann et al., 2020). Электроэякуляция считается «золотым стандартом» среди методов взятия семени у животных (Swanson, Brawn, 2004; Swanson, 2018; Furthner et al., 2018). Альтернативным является метод, разработанный Замбелли с соавторами, включающий катетеризацию уретры после введения животному медетомидина (Zambelli et al., 2008). Медетомидин вызывает сужение эякуляторных протоков и выталкивает сперму в уретру, так что после введения в нее катетера можно взять образец семени. Наряду с электроэякуляцией, этот метод рекомендован для получения семени у диких кошачьих, хотя применялся он пока на ограниченном числе видов (Lueders et al., 2012; 2014; Kheirkhah et al., 2017; Jeong et al., 2018 Kochan et al., 2019). Данная процедура успешно применялась для азиатского льва (*P. leo persica*) и азиатской золотой кошки (*Catopuma temminckii*) (Lueders et al., 2012; Lueders et al., 2014). Еще один способ получения эякулята, который иногда применяется к домашним котам, – мануальная стимуляция с применением искусственной вагины (Buranaamnuay, 2017).

В случае внезапной гибели ценной особи возможен сбор сперматозоидов из эпидидимисов после изоляции семенников вместе с эпидидимисами. Таким образом, например, получено и успешно криоконсервировано эпидидимальное семя амурского тигра (*P. tigris tigris*) (Cocchia et al., 2010).

Сперматозоиды получают путем измельчения эпидидимисов в подходящей питательной среде, что приводит к высвобождению подвижных сперматозоидов. Процедура позволяет получать живые сперматозоиды даже через некоторое время после смерти животного проведения процедуры орхиэктомии с целью стерилизации самцов при условии надлежащего сохранения семенников с эпидидимисами, что важно в случае диких кошачьих, находящихся под угрозой исчезновения. Описанный метод практикуют в настоящее время и по отношению к домашним котам, поскольку эпидидимисы взрослых котов доступны в ветеринарных клиниках после процедур плановой стерилизации (Brusentsev et al., 2018).

Способ получения семени влияет на некоторые морфологические и функциональные показатели сперматозоидов (Амстиславский и др., 2021). Например, преимуществом электроэякуляции по сравнению с уретральной катетеризацией является больший объем семени, что показано на примере азиатской золотой кошки (*C. temminckii*) (Lueders et al., 2014). Тем не менее семя, полученное методом уретральной катетеризации, обладало большей концентрацией сперматозоидов при сходных показателях подвижности по сравнению с электроэякуляторным семенем (Lueders et al., 2014). Похожие результаты получены при применении уретральной катетеризации ко льву (*P. leo*), камышовому коту (*Felis chaus*) и дальневосточному лесному коту (*P. bengalensis euptilurus*) (Lueders et al., 2012; Kheirkhah et al., 2017; Jeong et al., 2018). При использовании мануального метода на домашних котах объем полученного семени обычно меньше, по сравнению с семенем, собранным с помощью электроэякуляции, но характеристики подвижности и концентрации сперматозоидов сопоставимы (Buranaamnuay, 2017). Семя домашних котов, собранное из эпидидимисов, немного уступает по подвижности сперматозоидам, полученным с помощью электроэякуляции и искусственной вагины (Brusentsev et al., 2018; Buranaamnuay, 2017).

### 1.1.3.2. Получение ооцитов кошачьих

У домашней кошки, на которой можно отработать протоколы созревания ооцитов *in vitro*, их оплодотворения, эмбриотрансфера и криоконсервации, кумулюс-ооцитные комплексы (КОК) получают из яичников, доступных исследователям в ветеринарных клиниках, в которых осуществляют стандартную процедуру орхиогистерэктомии (Амстиславский и др., 2021). Ооциты, окруженные кумулюсом, получают путем измельчения яичников в подходящей питательной среде, чаще всего модифицированной Medium 199 с добавлением HEPES для поддержания pH и бычьего сывороточного альбумина (БСА) (Mokrousova et al., 2020b; Kochan et al., 2021a). Ооциты диких кошек получить сложнее. Сбор ооцитов *in vivo* осуществляется после гормональной стимуляции самки путем лапароскопической операции под наркозом. Например, данную процедуру применяли по отношению к кошке-рыболову (*Prionailurus viverrinus*), каракалу (*Caracal caracal*), пуме (*Puma concolor*) (Pope et al., 2006a; Baldassare et al., 2017). В результате в среднем получено 25-36 ооцитов, пригодных для дальнейшей продукции эмбрионов *in vitro* (Pope et al., 2006a; Baldassare et al., 2017). Ооциты также могут быть собраны *post mortem* у старых или больных особей (Rao et al., 2015). В таком случае ооциты получают путем измельчения яичников в подходящей питательной среде (Rao et al., 2015). Число собранных клеток зависит от возраста, стадии эстрального цикла и общего здоровья особи. Общеизвестно, что по мере старения животного число получаемых ооцитов снижается, также ухудшается их качество и способность к дальнейшему развитию (Kochan et al., 2019; Амстиславский и др., 2020). Кроме того, ооциты кошачьих, даже собранные у одной и той же кошки, отличаются по качеству. Ооциты кошачьих с темной ооплазмой, т.е. с большим содержанием липидов, в большей степени способны к оплодотворению и дальнейшему развитию эмбриона, по сравнению с теми, которые имеют более

бледную цитоплазму (Wood, Wildt, 1997; Kochan et al., 2021a). Обычно лишь приблизительно 50-60% ооцитов, полученных от диких видов кошачьих пригодны для последующих работ с применением ВРТ (Rao et al., 2015; Kochan et al., 2021a).

### 1.1.3.3. Получение эмбрионов кошачьих

Эмбрионы кошачьих для криоконсервации, эмбриотрансфера или для исследовательских целей могут быть получены *in vitro* с помощью традиционного ЭКО или с помощью ИКСИ (Pope, 2012a,b; 2014). Вспомогательные репродуктивные технологии позволяют получить потомство от особей с пониженной фертильностью, а также использовать как гаметы, так и эмбрионы для сохранения биоразнообразия видов. Даже спустя много лет после смерти животного можно использовать его генетический материал, хранящийся в криобанках (Kochan et al., 2019).

Первая домашняя кошка, зачатая с использованием классической методики ЭКО, родилась в 1988 году (Goodrowe et al., 1988). С тех пор ЭКО неоднократно применялось для получения и/или трансплантации эмбрионов как домашней кошки, так и диких видов кошачьих: тигра (*P. tigris*), сервала (*Leptailurus serval*), каракала (*C. caracal*), кошки-рыболова (*P. viverrinus*), черноногой кошки (*Felis nigripes*), льва (*P. leo*) (Donoghue 1990; Pope et al., 2006a,b; Pope et al., 2012a; Zahmel et al., 2021). Эффективность ЭКО зависит во многом от хорошего качества семени, что у диких кошек встречается крайне редко (Pukazhenti et al., 2006). При использовании ооцитов, подвергнутых криоконсервации, возможен преждевременный экзоцитоз кортикальных гранул, приводящий к отвердению блестящей оболочки (*zona hardening*), что снижает эффективность ЭКО или приводит к полиспермии (Matson et al., 1997; Borini, Bianchi, 2010).

Альтернативным способом получения эмбрионов *in vitro* является ИКСИ. Впервые данный метод был применен по отношению к кошачьим, а

именно к домашней кошке, а также ягуарунди (*Herpailurus yaguaron*) в 1998 году (Pope et al., 1998). С тех пор опубликовано еще несколько исследовательских работ с использованием ИКСИ по отношению к кошачьим (Buarprung et al 2013; Prochowska et al., 2018). Данная процедура имеет массу преимуществ, но является очень сложной методикой, требует дорогостоящего оборудования и может выполняться только высококвалифицированным персоналом. Помимо *in vitro* технологий для получения потомства также применяют искусственное осеменение самок. Данный способ оплодотворения использовали, как со свежим семенем, так и замороженным семенем на нескольких видах диких кошачьих с выходом беременностей 5-100% (см. обзор Thongphakdee et al., 2020).

#### 1.1.3.4. Эмбриотрансфер

Трансплантация эмбрионов и рождение котенка — это конечный этап подтверждения эффективности и безопасности ЭКО, ИКСИ, репродуктивного клонирования, процедур криоконсервации и любых манипуляций с эмбрионами кошачьих *in vitro* (Pope, 2000; Pope et al., 2006a; Conforti et al., 2008; Gomez et al., 2008; Pope et al., 2012a,b). Эмбрионы редких видов кошачьих иногда переносят реципиентам других видов или подвидов (межвидовой эмбриотрансфер). Котята барханного кота (*Felis margarita*) и черноногой кошки (*Felis nigripes*), зачатые в результате ЭКО или репродуктивного клонирования, были выношены домашними кошками (Gomez et al., 2008; Pope et al. 2012a). Однако детеныши более крупных видов диких кошек, в частности, тигра (*P. tigris*), кошки-рыболова (*P. viverrinus*), каракала (*C. caracal*) родились в результате внутривидового эмбриотрансфера (Donoghue et al., 1990; Pope et al., 2006a). Эмбрионы кошачьих обычно трансплантируют либо на ранних стадиях в яйцевод (Goodrowe et al., 1988; Gomez et al., 2008), либо на стадии морулы/бластоцисты в матку (Gomez et al., 2000; Pope et al., 2006a) лапароскопическим методом.

### 1.1.3.5. Консервация генетических ресурсов кошачьих

Для сохранения генетических ресурсов кошачьих иногда подвергают криоконсервации соматические клетки, например, фибробласты, собранные из срезов кожи. Получение небольших срезов кожи длиной в несколько миллиметров не приносит большого вреда животному, тем более, что образец можно брать при проведении других ветеринарных процедур. Например, в Польше таким образом заморожены образцы клеток 14 видов диких кошек и 10 пород домашних кошек (Kochan et al., 2019). Фибробласты, полученные от диких кошачьих, хранящиеся в банке клеток, представляют собой источник донорских ядер клеток, используемых в процедурах репродуктивного клонирования. Их ядра впоследствии переносят либо в энуклеированные ооциты того же вида, либо при недостатке таковых, в ооциты, полученные от домашней кошки (Gomez et al., 2008; Moro et al., 2015). Развитие методики репродуктивного клонирования имеет большое значение для сохранения животных, находящихся под угрозой исчезновения. Первый клон домашней кошки получен в 2002 году (Shin et al., 2002). После успешных экспериментов над домашней кошкой, была клонирована африканская дикая кошка (*Felis silvestris lybica*) (Gomez et al., 2004).

Помимо соматических клеток криоконсервируют также гаметы и эмбрионы. Семя как домашних, так и диких кошек довольно успешно заморожено (см. обзор Амстиславский и др., 2021). Например, криоконсервировано семя гепарда (*Acynonyx jubatus*), льва (*P. leo*), маргая (*Leopardus wiedii*), пиренейской рыси (*Lynx pardinus*) и красной рыси (*L. rufus*) (Terrell et al., 2012; Luther et al., 2017; Erdmann et al., 2020; Ganán et al., 2009 a,b). Изучение литературы показало, что в подавляющем большинстве работ, для криоконсервации сперматозоидов кошачьих в качестве криопротектора используют глицерин, при этом вполне подходят стандартные способы охлаждения и криоконсервации семени, используемые, например, для

большинства сельскохозяйственных животных (Амстиславский и др., 2021). Что касается ооцитов и преимплантационных эмбрионов кошачьих, которые являются предметом нашего исследования, их криоконсервация будет более подробно рассмотрена в специальном разделе данного обзора.

## **1.2. Роль липидов в раннем развитии млекопитающих**

Поскольку домашняя кошка, как и другие представители кошачьих, относится к млекопитающим с богатым содержанием липидов в ооцитах и преимплантационных эмбрионах (Guraya, 1965; Брусенцев и др., 2019; Amstislavsky et al., 2019), важно понимать роль липидов в преимплантационном развитии млекопитающих.

### **1.2.1. Характеристика стадий созревания ооцитов и развития преимплантационных эмбрионов**

Ооциты – половые клетки самок млекопитающих, которые располагаются в фолликулах яичников. Ооциты окружены соматическими кумулюсными (фолликулярными) клетками, которые соединены друг с другом щелевыми соединениями и необходимы для роста и созревания ооцита (Van Soom et al., 2002). Кумулюсные клетки прилегают к блестящей оболочке (*zona pelucida*) ооцита. Между плазматической мембраной ооцита и блестящей оболочкой существует перивителлиновое пространство, куда отходит полярное тело при созревании ооцита (Bedford, 2004; Duncan et al., 2020). В ооплазме располагаются ядерный материал, митохондрии, липидные гранулы, другие органеллы, цитоскелет и кортикальные гранулы (Рисунок 1).

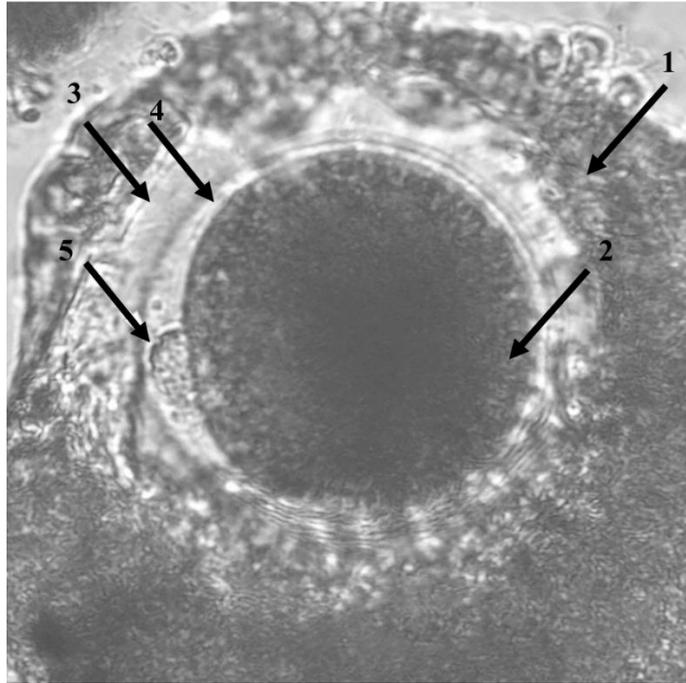


Рисунок 1. Зрелый ооцит домашней кошки (по Брусенцев и др., 2019).

Примечание: экспандированный кумулюс (1), темная ооплазма с многочисленными липидными гранулами (2), блестящая оболочка (3), перивителлиновое пространство (4), полярное тело (5).

Выделяют несколько стадий развития фолликулов в яичнике: примордиальные, первичные, вторичные, ранние антральные и антральные фолликулы (Duncan et al., 2020). На рисунке 2 схематично показано созревание ооцита млекопитающего.

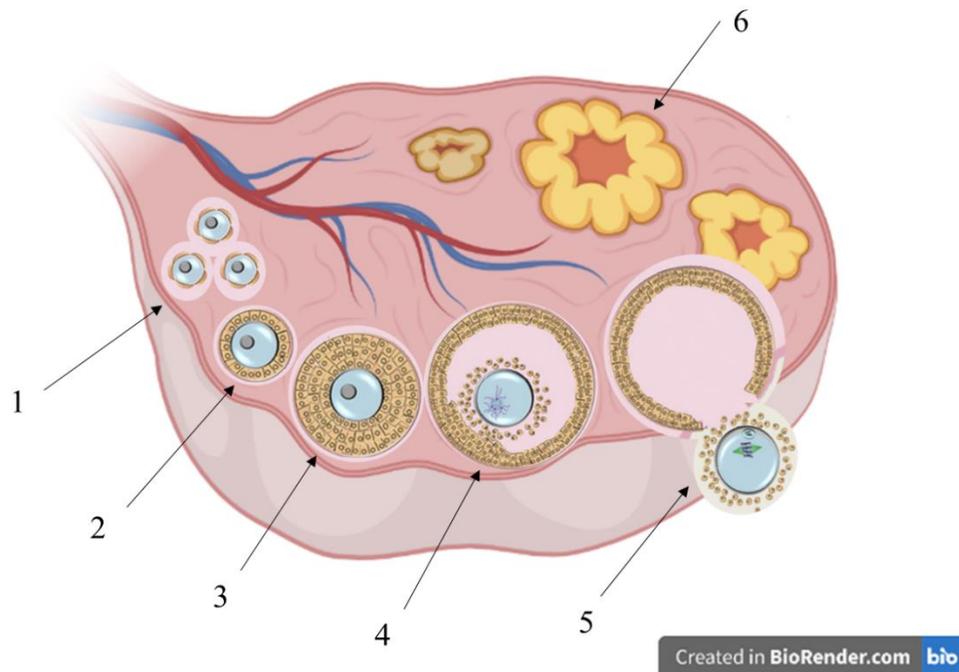


Рисунок 2. Созревание фолликулов в яичнике млекопитающего (по Fan, San, 2019).

Примечание: примордиальные фолликулы (1), первичный (2), вторичный(3), антральный фолликулы(4), выход ооцита из фолликула (5) (овуляция), желтое тело (6).

Изначально ооциты, после сбора материала из фолликулов яичника домашней кошки, находятся на стадии профазы I мейоза. Собранные ооциты содержат большое ядро, заключенное в собственную оболочку, содержащее двойной набор хромосом  $2n4c$  ( $n$  – число хромосом,  $c$  – число молекул ДНК). Эта стадия называется стадией зародышевого пузырька или герминального везикула (ГВ) (germinal vesicle – GV). В процессе дозревания *in vitro* ооциты домашней кошки проходят сложный процесс, который называется мейотическим созреванием и занимает 24-36 ч (Fan, Sun, 2019; Fernandes et al., 2021). Распад зародышевых пузырьков (Germinal vesicle breakdown – GVBD) является первым морфологическим признаком возобновления мейоза и характеризуется началом конденсации хроматина. После GVBD бивалентные хромосомы выстраиваются вдоль клетки, прикрепляясь к веретенам деления –

стадия метафазы I. Первое деление мейоза завершается образованием первого полярного тела. В ооците после отделения первого полярного тела остается одинарный набор хромосом, в котором каждая хромосома состоит из двух сестринских хроматид ( $1n2c$ ). Затем ооциты вступают во второй раунд мейоза, но останавливаются на этапе метафазы II (МII), который характеризуется наличием аппарата веретена деления и расположением хромосом в плоскости, перпендикулярной оси деления; именно на этой стадии происходит оплодотворение, после чего в яйцеклетке на короткое время остается одинарный набор хромосом, в котором каждая хромосома состоит из одной хроматиды  $1n1c$ , при этом выделяется второе полярное тело (De los Reyes et al., 2011; Fan, Sun, 2019). Процесс созревания ооцита схематично представлен на рисунке 3.

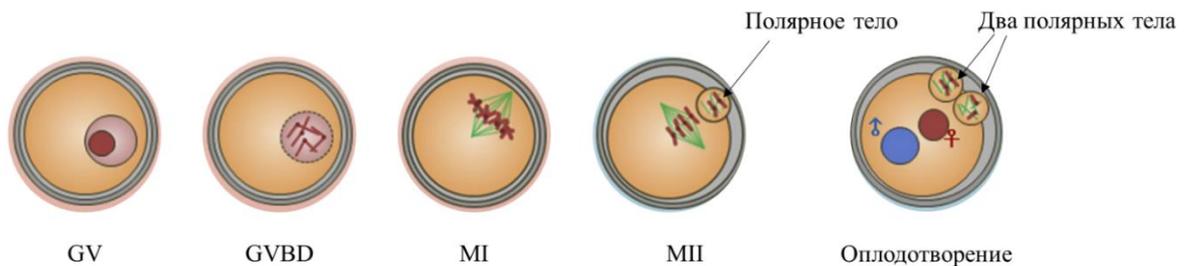


Рисунок 3. Созревание ооцита (по Fan, San, 2019).

Примечание: GV – зародышевый пузырек (germinal vesicle), GVBD – распад зародышевых пузырьков (germinal vesicle breakdown), MI – метафаза I, MII – метафаза II.

В среднем число собранных ооцитов с одного животного достигает двадцати и более (в среднем 23) в случае взрослой особи, сорока и более (в среднем 43) в случае молодой неполовозрелой кошки (Kochan et al., 2021a). Однако не все полученные ооциты подходят для дальнейшего использования, и имеют различный потенциал развития (Wood, Wildt, 1997; Kochan et al.,

2021a). Выделяют 4 класса ооцитов по качеству, а также по числу кумулюсных клеток (Wood, Wildt, 1997; Kochan et al., 2021a):

I – ооциты плотно окружены как минимум пятью слоями кумулюсных клеток,

II – ооциты окружены менее пятью слоями кумулюсных клеток,

III – ооциты окружены только лучистым венцом (*corona radiata*), т.е. слоем клеток непосредственно прилегающим к блестящей оболочке.

IV – деградирующий ооцит с морфологическими дефектами, поврежденной блестящей оболочкой, неправильной формой или фрагментированной цитоплазмой.

Выделяют также три группы ооцитов, основываясь на цвете ооплазмы (Wood, Wildt, 1997; Kochan et al., 2021a):

A – ооциты с очень темной и однородной цитоплазмой,

B – ооциты с темной, но мозаичной цитоплазмой,

C – ооциты с бледной цитоплазмой.

Примеры ооцитов различного качества представлены на рисунке 4.

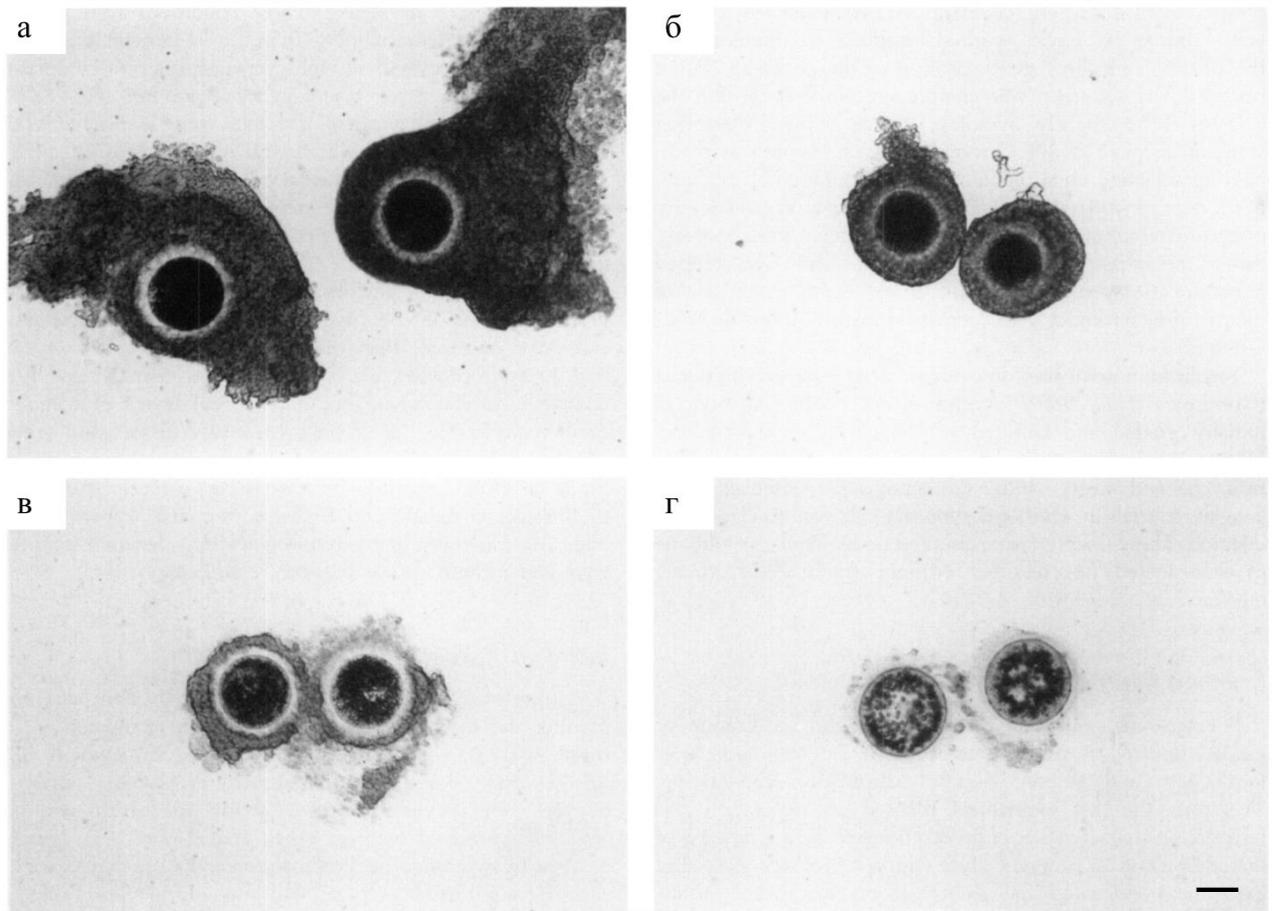


Рисунок 4. Кумулюс-ооцитные комплексы, полученные из яичников домашней кошки (по Wood, Wildt, 1997).

Примечание: (а) категория IA: ооциты с темной однородной цитоплазмой в сочетании с как минимум тремя слоями кумулюсных клеток. (б) категория IIА: ооциты имеют однородную темную цитоплазму, но менее пяти слоев кумулюсных клеток, (в) категория IIIБ: ооциты с темной, но мозаичной цитоплазмой, окружены лучистым венцом и небольшим числом кумулюсных клеток. (d) категория IVС: ооциты с бледной фрагментированной цитоплазмой и окруженные незначительным числом кумулюсных клеток; шкала 50 мкм.

Обычно для дозревания отбирают только ооциты хорошего качества, принадлежащие к категориям I, II, A, поэтому число гамет, взятых для IVМ, уменьшается примерно на 40-55% (Kochan et al., 2021a). Причем после

дозревания остается приблизительно 50% ооцитов, пригодных для оплодотворения (Kochan et al., 2021a). Время инкубации ооцитов кошачьих со сперматозоидами для оплодотворения *in vitro* обычно занимает 16-22 ч (Herrick et al., 2010; Kochan et al., 2021b). После этого периода начинается полное, асинхронное дробление зигот (Hasley et al., 2017). Первое дробление происходит через 17-38 ч после IVF. Однако время первого дробления очень важно для дальнейшего развития эмбриона: максимального развития *in vitro* достигают эмбрионы, дробление которых началось через 21-22 ч после оплодотворения (Kochan et al., 2021b; Klincumhom et al., 2012). Далее приблизительно каждые 24 ч, происходит очередное дробление бластомеров (Roth et al., 1994), так что через 74 ч после IVF появляются морулы (Ochota et al., 2017). Однако слишком быстрое формирование стадии морулы негативно сказывается на дальнейшем образовании бластоцист и хэтчинге (Ochota et al., 2017). В целом приблизительно половина (52%) образующихся эмбрионов *in vitro* оказываются хорошего качества, однако 48% имеют различные морфологические дефекты (Kochan et al., 2021b). Около 40% от всех оплодотворенных ооцитов начинает дробиться, причем 50% от дробящихся эмбрионов становятся морулами и 20% достигают стадии бластоцисты (Kochan et al., 2021b). В другом исследовании 70% ооцитов после ЭКО начинало дробиться, причем 40% от дробящихся эмбрионов становились морулами и 20% бластоцистами (Alam et al., 2019). В работе Верагуас с соавторами (2020), после дополнительной гормональной стимуляции самок домашней кошки, процент образовавшихся бластоцист был выше и составил 37% от дробящихся эмбрионов (Veraguas et al., 2020).

Образование бластоцели происходит через 127-167 ч после оплодотворения (Kochan et al., 2021b). Индикатором того, что эмбрион кошки достиг стадии бластоцисты также служит число ядер, например, в ранних бластоцистах насчитывают 51-100 ядер, в поздних бластоцистах 101-140 ядер, на стадии хэтчинга – 141 и более (Ochota et al., 2016). В 1994 г Росс, Свэнсон

и Вилдт провели сравнительный анализ развития эмбрионов домашней кошки, полученных *in vitro* и *in vivo*. Было показано, что, несмотря на то, что эмбрионы, полученные *in vitro*, быстрее дробятся и имеют сходный процент образования морул (61% и 77%) в сравнении с эмбрионами, полученными *in vivo*, они останавливают свое развитие приблизительно на пятые сутки, не образуя бластоцист (Roth et al., 1994).

За последние три десятилетия среды для культивирования эмбрионов кошачьих постоянно совершенствовались (Herrick et al., 2007; Colombo et al., 2021). Однако, несмотря на прогресс в культивировании кошачьих эмбрионов, эффективность получения кошачьих эмбрионов *in vitro* остается низкой по сравнению с другими видами животных, поскольку в среднем только 50% оплодотворенных ооцитов домашней кошки начинают дробиться, и меньше половины от них достигают стадии бластоцисты и хэтчинга (Kochan et al., 2021b; Alam et al., 2019). Прогресс в этой области будет зависеть от лучшего понимания механизмов оплодотворения и оптимизации условий культивирования *in vitro* для кошачьих эмбрионов (Herrick et al., 2007; Luvoni et al., 2018; Colombo et al., 2021).

### **1.2.2. Состав внутриклеточных липидов в ооцитах и эмбрионах различных видов млекопитающих**

Наряду с белками, нуклеиновыми кислотами и углеводами, важнейшими компонентами клетки являются липиды. Внутри клеток липиды накапливаются в специальных структурах – липидных гранулах. Липидная гранула представляет собой гидрофобное ядро, состоящее в основном из нейтральных липидов, таких как триацилглицерины, и сложных эфиров стеролов, в частности, холестерина. Ядро липидной гранулы окружено монослоем фосфолипидов с включениями белков (Walther and Farese, 2009; Welte and Gould, 2017). Липидные гранулы являются энергетическим депо клетки и хранилищем строительных блоков для биологических мембран

(Farese, Walther, 2009; Welte and Gould, 2017). Помимо функции накопления липидов, они принимают активное участие в их внутриклеточном метаболизме (Athenstaedt, Daum, 2006; Kuerschner et al., 2008), способны удерживать токсичные липофильные молекулы, упаковывая стеролы в эфиры стеролов, а также вовлечены в метаболизм белков (Farese, Walther, 2009). Липидные гранулы могут аккумулировать и хранить гидрофобные витамины, например, витамин Е и предшественник витамина А в виде ретинилового эфира (Welte and Gould, 2017). Эфиры холестерина, хранящиеся в липидных гранулах, являются важным источником холестерина для биосинтеза стероидных гормонов (Welte and Gould, 2017). Липидные гранулы также могут хранить предшественники эйкозаноидов, большое семейство сигнальных липидов, которое включает простагландины, тромбоксаны и лейкотриены (Welte and Gould, 2017). Липидные гранулы находятся в контакте с другими клеточными органеллами, и мутации во многих белках, расположенных в месте этих контактов, являются факторами наследственных неврологических и метаболических заболеваний (Herker et al., 2021). Таким образом, липидные гранулы выполняют разнообразные функции в различных биологических контекстах.

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 являются потенциальным резервуаром энергии для начального эмбрионального развития до активации эмбрионального генома (de Andrade Melo-Sterza, Roehland, 2021). Кумулюс-ооцитный комплекс, в частности, ооцит и кумулюсные клетки, содержат много липидных гранул (Dunning et al., 2014). Их размер обычно составляет от 0.1 до 1.0 мкм и более в зависимости от типа клеток (Fujimoto, Parton, 2011; Daemen et al., 2015). На стадии незрелых ооцитов для большинства исследованных видов млекопитающих диаметр липидных гранул составляет менее 1 мкм (Aardema et al., 2011; Bradley et al.,

2016), при созревании ооцитов и последующем эмбриональном развитии они становятся крупнее (Aardema et al., 2011), а на стадиях морулы и бластоцисты их размер становится более 1 мкм (Bradley et al., 2016). Увеличение размеров липидных гранул может происходить за счет их слияния (Walther, Farese, 2009). На эмбрионах крупного рогатого скота показано уменьшение числа липидных гранул при культивировании *in vitro* в различных условиях до стадии бластоцисты (Ordonez-Leon et al., 2014), что может быть объяснено активным потреблением запасов энергетического субстрата в период развития.

Существует видовая специфичность по количеству липидных гранул в ооцитах/эмбрионах и характеру их распределения по цитоплазме (Dunning et al., 2014). В исследовании с использованием красителя нильский красный и флуоресцентной микроскопии показано, 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). К видам с ооцитами и эмбрионами, богатыми липидами, относятся не только свинья, овца и крупный рогатый скот, но и различные представители отряда хищных (Reynaud et al., 2006; Martins et al., 2009; Apparicio et al., 2012; Amstislavsky et al., 2019). Ооциты богатые липидами выглядят более темными при наблюдении в световой микроскоп, что связано с интенсивным рассеянием света на липидных гранулах (Amstislavsky et al., 2019). На рисунке 5 представлены эмбрионы трех видов млекопитающих с различным содержанием внутриклеточных липидов.

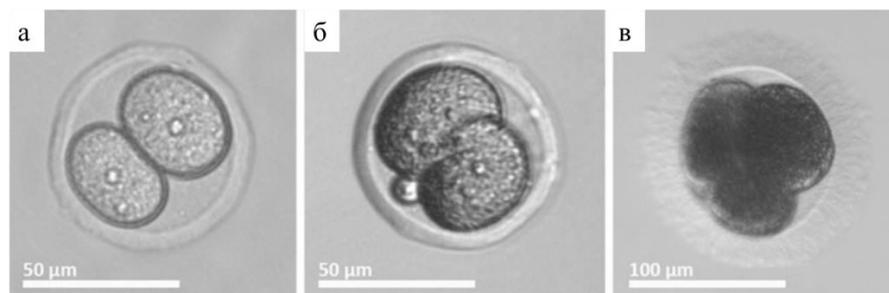


Рисунок 5. Эмбрионы с различным содержанием внутриклеточных липидов (по Amstislavsky et al., 2019).

Примечание: (а) эмбрион крысы (*Rattus norvegicus*), (б) мыши (*Mus musculus*) и (в) домашней кошки (*Felis silvestris catus*).

При помощи газовой хроматографии изучен количественный химический состав липидных гранул в ооцитах и преимплантационных эмбрионах у разных видов млекопитающих, в частности, мыши, крысы, кролика, свиньи, овцы, крупного рогатого скота, человека (см. Amstislavsky et al., 2019 в качестве обзора). Наибольшее количество липидов обнаружено в ооцитах свиньи по сравнению с другими изученными видами. Триацилглицерин является главной формой накопления нейтральных липидов внутри липидных гранул и их основным компонентом для всех изученных видов (Fujihira et al., 2004; Welte, Gould, 2017). Липидные гранулы незрелых ооцитов крупного рогатого скота содержат 57% триацилглицеринов, 16% фосфолипидов, 16% холестерина и 11% свободных жирных кислот (Kim et al., 2001). Для других видов состав может меняться, например, у свиньи жирные кислоты составляют 35% от липидного состава ооцитов (Fujihira et al., 2004). Такого же рода исследования состава и общего количества липидов в ооцитах/эмбрионах кошачьих до сих пор проведено не было, 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 комбинационного рассеяния света, показано, что

степень ненасыщенности липидов, т.е. соотношение числа ненасыщенных и насыщенных углеводородных цепочек, в ооцитах домашней кошки (*Felis silvestris catus*) довольно высока: выше, чем у свиньи, крупного рогатого скота, человека, кролика и овцы, и близка к значениям, полученным для ооцитов крыс и мышей (Okotrub et al., 2018; Amstislavsky et al., 2019).

Пространственная локализация липидных гранул в цитоплазме клетки может отличаться в незрелых и зрелых ооцитах, а также зависеть от вида млекопитающего (Dunning et al., 2014). Так, в ооцитах свиней липидные гранулы расположены преимущественно на периферии (Sturmey et al., 2006), а в незрелых ооцитах мыши они распределены по цитоплазме равномерно (Dunning et al., 2014). В ходе созревания в ооцитах мышей происходит смещение липидных гранул ближе к центру (Wood et al., 2008; Dunning et al., 2014). При созревании ооцитов собаки также показано различное распределение липидных гранул в цитоплазме (Ariu et al., 2016). Интересно, что развитие ооцитов, богатых липидами, в частности, развитие ооцитов крупного рогатого скота, в большей степени зависит от  $\beta$ -окисления, и, соответственно, преимущественным энергетическим субстратом для них являются липиды, в то время как ооциты с низким содержанием внутриклеточных липидов, в частности у мышей и человека, предпочитают пируват в качестве основного источника энергии, а метаболизм липидов у них довольно низкий (см. обзор Bradley and Swann, 2019).

Как следует из описания липиды могут занимать довольно большую часть клетки и играют весомую роль в ее жизнедеятельности, кроме того липиды могут оказывать влияние на результат криоконсервации клеток. Далее будет приведено сравнение замораживания ооцитов и эмбрионов с различным составом внутриклеточных липидов.

### **1.3. Криоконсервация ооцитов и эмбрионов как подход к сохранению генетических ресурсов млекопитающих**

Создание криобанков гамет, эмбрионов и соматических клеток различных видов млекопитающих позволяет сохранить генетическое разнообразие находящихся под угрозой исчезновения популяций и, наряду с сохранением живых особей, позволяет в наиболее полной мере осуществлять сохранение генетических ресурсов (Holt et al., 2008). В некоторых популяциях потеря всего одной особи приводит к серьезному сокращению и без того ограниченного генофонда, а сохранение его генетического материала предотвращает потерю бесценных генов. Кроме того, гаметы и соматические клетки, полученные от одной особи, можно использовать в течение многих лет после ее смерти. Криоконсервация репродуктивных клеток различных видов млекопитающих открывает возможности для успешного отсроченного экстракорпорального оплодотворения или клонирования редких животных (Kochan et al., 2019). В основном методы криобиологии сосредоточены на сохранении сперматозоидов (Luther et al., 2017; Thuwanut et al., 2017; Vansandt et al., 2018; Brusentsev et al., 2018), ооцитов (Fernandez-Gonzalez&Jewgenow 2017; Nowak et al., 2019), соматических клеткок (Gomez et al., 2008; Moro et al., 2015) и преимплантационных эмбрионов (Conforti et al., 2008; Pope et al., 2012b; Mokrousova et al., 2020b). В данной главе более подробно будут рассмотрены методы криоконсервации, процессы, происходящие внутри клеток в ходе замораживания, проблемы криоконсервации ооцитов и эмбрионов млекопитающих с акцентом на домашнюю кошку, так как именно она является объектом исследования данной диссертационной работы.

#### **1.3.1. Описание методов криоконсервации**

В процессе замораживания клеток существует высокая вероятность их повреждения; двухфакторная гипотеза Питера Мейзура является

классическим описанием зависимости рисков для клеток от скорости охлаждения (Mazur et al., 1972; Mazur, 1990): 1) при слишком медленном охлаждении при постепенном переходе воды из жидкой фазы в твердую происходит увеличение концентрации растворенных солей, что может привести к осмотическому шоку и, соответственно, гибели клетки; 2) при слишком быстром охлаждении происходит образование слишком больших кристаллов льда внутри клеток и его дальнейшая рекристаллизация после оттаивания, что приводит к механическому повреждению клеточных мембран, и, следовательно, необратимого разрушения структуры клетки.

Чтобы снизить вероятность криповреждений в протоколах криоконсервации применяют криопротекторы (Elliott et al., 2017), основное действие которых направлено на снижение концентрации электролитов (Lovelock et al., 1953), а также на предотвращение образования кристаллов льда за счет формирования водородных связей с молекулами воды (Best, 2015). Однако, криопротекторы обладают цитотоксичностью, и с повышением их концентрации возрастает вероятность гибели клеток (Luvoni, Pellizzari 2000; Kasai, 2002).

Криопротекторы разделяют на проникающие, наиболее известными из которых являются диметилсульфоксид (ДМСО), пропиленгликоль (ПГ), этиленгликоль (ЭГ) и глицерин, а также непроникающие (сахароза, раффиноза, трегалоза, фруктоза и другие) (Shaw, Jones, 2003; Амстиславский и др., 2021).

Криоконсервация клеток стала довольно рутинной процедурой в медицине и биологии, однако совершенствование протоколов замораживания все еще остается важной задачей (Vojic et al., 2021). В настоящее время существует два подхода криоконсервации гамет и эмбрионов млекопитающих: медленное замораживание, когда жидкая фаза воды переходит в твердую (кристаллическую), и витрификация, когда происходит стеклование образца без образования льда (Shaw, Jones, 2003; Vojic et al.,

2021). Из двухфакторной гипотезы Питера Мейзура следует, что существует оптимальная для каждого типа клеток и биологических образцов скорость охлаждения с точки зрения выживания клеток (Mazur et al., 1972; Mazur, 1990).

В процессе медленного замораживания, которое контролируется программным обеспечением, происходит постепенное снижение температуры приблизительно на  $0.3 - 2^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$  для того, чтобы вода успела покинуть клетки, и не произошло образование внутриклеточного льда. При этом используются криопротекторы с низкой концентрацией (1-2 М), которые проникают в клетки и препятствуют образованию льда, снижая температуру фазового перехода воды (Rall et al., 1985; Gomez et al., 2003; Shaw, Jones, 2003; Wojic et al., 2021). По достижении определенной температуры (для ооцитов и эмбрионов млекопитающих обычно это температура составляет  $-6^{\circ}\text{C}$  или  $-7^{\circ}\text{C}$ ) образец выдерживают 5 - 10 мин.; и в ходе этого термостатирования индуцируют кристаллизацию льда внутри носителя, содержащего замораживаемый образец – сидинг (англ. seeding) (Luvoni, Pellizzari, 2000; Leibo, Songsasen, 2002; Gomez et al., 2003). Вода, содержащаяся в растворе криопротектора окружающего замораживаемые объекты, начинает превращаться в лед, что приводит к выходу воды из клеток биологического образца. После сидинга наступает второй этап: более медленное охлаждение замораживаемого объекта. На этом этапе температура снижается обычно на  $0.3^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$  до температуры  $-30^{\circ}\text{C}$  или  $40^{\circ}\text{C}$  (Luvoni, Pellizzari, 2000; Leibo, Songsasen, 2002; Gomez et al., 2003). С понижением температуры вода в окружающем замораживаемый образец растворе все больше начинает переходить в лед, а клетки охлаждаемого образца все более обезвоживаются, и происходит существенное повышение концентрации криопротектора в том растворе, который все еще остается в жидкой фазе (Mazur, 1970). В этом концентрированном растворе начинает образовываться аморфная фаза (Jochem, Körber, 1987; Mazur, 1990; Жмакин, 2008). Кристаллы льда внутри клеток, как показали эксперименты, образуются при существенно более

низких температурах, чем вне клеток (Rall et al., 1985; Mazur, 1990). Быстрое завершение медленного охлаждения происходит путем погружения соломин с биоматериалом в жидкий азот (plunging). При этом внутриклеточные кристаллы льда образуются, но они настолько малы, что не могут существенно повредить клетки (Willadsen, 1977; Shaw, Jones, 2003).

Витрификация – альтернативный способ криоконсервации, при котором происходит стеклование объекта, т.е. переход в аморфную фазу при высоких скоростях охлаждения – более 500°C/мин. При проведении витрификации используют те же самые криопротекторы, что и при программном замораживании, но в концентрации от 4 до 7 М. Скорость оттаивания образцов также очень важна, так как этот процесс может вызывать рекристаллизацию льда, который может повредить клетки на этапе отогрева (Seki, Mazur, 2009; Wojc et al., 2021). Оттаивание, как и охлаждение, бывает двух типов: медленное и быстрое. Если образец был заморожен медленно, то оттаивание рекомендовано производить медленно, при быстром же способе замораживания рекомендовано и сравнительно быстрое оттаивание (Mazur, 1990). Например, скорость отогрева 300°C/мин. и выше после витрификации эмбрионов млекопитающих была существенно эффективнее по сравнению с медленным оттаиванием со скоростью 10°C/мин. (Shaw, Jones, 2003). При медленном охлаждении оптимальная скорость оттаивания составляет 20°C/мин. (Whittingham et al., 1972; Амстиславский и др., 2015).

Как сказано выше, помимо кристаллов льда и токсичности криопротекторов, источником повреждения клеток в процессе замораживания могут стать внутриклеточные липиды, которые претерпевают фазовый переход. В следующем разделе будут описаны особенности фазовых переходов липидов.

### **1.3.2. Фазовые переходы липидов при замораживании ооцитов и преимплантационных эмбрионов**

Фосфолипиды – являются основным компонентом клеточных мембран; длина углеводородной цепочки жирных кислот, наличие и число двойных связей влияют на свойства мембран (Stubbs and Smith, 1984; Arav et al., 2000; Casares et al., 2019). Высокая концентрация холестерина и полиненасыщенных жирных кислот делает мембраны более текучими, что снижает их чувствительность к криповреждениям (Quinn, 1985; White, 1993; Zeron et al., 2002). Состав мембранных липидов является индикатором изменений в текучести мембраны, которая зависит от состава фосфолипидов, степени ненасыщенности, уровня холестерина и наличия белков (Giraud et al., 2000). Поскольку снижение температуры приводит к потере тепловой энергии, понижается движение молекул в мембранном бислое липидов, что позволяет соседним липидным молекулам взаимодействовать, тем самым изменяя текучесть и, следовательно, функционирование мембраны.

Для описания фазового состояния липидов используют два параметра. Первый – упорядоченность ацильной цепи, который относится к числу конформаций Гоше в углеводородной цепи (Pink et al., 1980). Второй – относится к трансляционному порядку в расположении молекул липидов. В однокомпонентной липидной системе эти параметры порядка изменяются согласованным образом. В случае смесей липидов они могут быть независимыми, и становятся возможными промежуточные фазовые состояния, такие как жидкостно-упорядоченное состояние. В таком состоянии липидные ацильные цепи находятся в упорядоченном конформационном состоянии, но молекулы расположены беспорядочно, как и в жидком состоянии (Quinn, Wolf, 2009; Phillips et al., 1969). Биологические липидные структуры состоят из многокомпонентных липидных смесей. В результате описание фазового перехода усложняется. Может наблюдаться

одновременное сосуществование нескольких фаз (Rappolt et al., 2003). В процессе замораживания фосфолипиды трансформируются из неупорядоченного состояния с высокой вращательной и латеральной подвижностью в более упорядоченное, с ограниченной подвижностью (Ghetler et al., 2005). Помимо плазматической фосфолипидной мембраны в клетке содержатся липидные гранулы, которые состоят из монослоя фосфолипидов, триглицеридов и холестерина.

На сегодняшний момент существуют трудности с успешной криоконсервацией эмбрионов и ооцитов, богатых липидами (Amstislavsky et al., 2019). 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). Эти исследования свидетельствуют о том, что существуют другие механизмы повреждения клеток при их охлаждении (помимо тех, которые связаны с фазовыми переходами воды); эти механизмы связаны со свойствами липидных структур в клетках. Несмотря на то, что эти механизмы до конца не изучены, считается, что фазовые переходы липидов (ФПЛ) во многом ответственны за эти повреждения. Температура начала фазового перехода липидов ( $T^*$ ) взаимосвязана с повреждением клеток в процессе криоконсервации (Ghetler et al., 2005). Большое внимание уделяется исследованию низкотемпературных повреждений, связанных с мембранами (Quinn, 1985; Giugliarelli et al., 2016). Охлаждение клетки приводит к ФПЛ, которые изменяют свойства мембран: функционирование мембранных белков (van Meer et al., 2008), пространственное распределение липидов (Quinn, 1985) и мембранный транспорт (Elamrani et al., 1983).

### **1.3.3. Эффективность криоконсервации ооцитов и эмбрионов с различным содержанием внутриклеточных липидов**

#### **1.3.3.1. Сравнение эффективности криоконсервации ооцитов млекопитающих с различным составом внутриклеточных липидов**

Ооциты являются достаточно сложным объектом для замораживания, так как существует высокая вероятность повреждения аппарата веретена деления, блестящей оболочки и ДНК (Iussig et al., 2019). Кроме того, стадия развития ооцитов также имеет большое значение в процессе криоконсервации. До сих пор дискуссия о том, какая стадия развития ооцитов оптимальна для криоконсервации, остается открытой (Yurchuk, 2021).

Чаще всего для криоконсервации ооцитов применяют витрификацию. Эффективность витрификации зрелых ооцитов мышей, общее количество внутриклеточных липидов в которых равняется 3.83 нг на клетку, составляет 80-95% по числу эмбрионов, полученных в результате ЭКО, и 35-45% по числу родивших потомков после трансплантации таких эмбрионов (Nakagata et al., 2013). В другом исследовании эффективность витрификации зрелых ооцитов мышей составила 70-90% по числу дробящихся эмбрионов (Karami et al., 2017). Что касается ооцитов с большим содержанием внутриклеточных липидов, то эффективность их криоконсервации значительно ниже по сравнению с мышами. Например, при витрификации ооцитов крупного рогатого скота, которые содержат приблизительно 63 нг липидов, процент жизнеспособных ооцитов после отогрева равен 56% и 27%, соответственно, для незрелых и зрелых стадий развития. После оплодотворения таких ооцитов процент дробящихся эмбрионов составил 11 и 12%, причем эмбрионы не достигали стадии бластоцисты (Bulgarelli et al., 2017). Однако разрабатываются методики, повышающие эффективность криоконсервации ооцитов крупного рогатого скота, основанные, в частности, на воздействии цитопротекторных соединений *in vitro* (Кузьмина и др., 2020). В ооцитах

свиной содержится примерно 161 нг липидов, их криоконсервация долгое время была безуспешной (Zhou, Li, 2009). Между тем, недавно удалось достичь существенного прогресса в витрификации ооцитов свиной: в работе Ву с соавторами (2017) показано, что после отогрева незрелых ооцитов, подвергнутых витрификации, 84-90% из них достигают стадии МП, и процент дробления составляет 45-70% после оплодотворения, при чем 9-26% из них достигают стадии бластоцисты (Wu et al., 2017). Эти данные указывают на то, что эффективность криоконсервации ооцитов млекопитающих зависит не только от общего количества внутриклеточных липидов, но также и от их качественного состава.

Эффективность замораживания ооцитов кошачьих, которые также богаты внутриклеточными липидами, не высока. Использование смесей криопротекторов с содержанием высоких концентраций в разном соотношении ЭГ, ДМСО, фикола, трегалозы, декстрана или сахарозы для витрификации незрелых ооцитов приводит к созреванию 10-40% ооцитов, из которых после применения ИКСИ лишь 20-30% развиваются в эмбрионы (Fernandez-Gonzalez & Jewgenow, 2017). В другом исследовании применяли не ИКСИ, а ЭКО после созревания незрелых ооцитов домашней кошки, подвергавшихся витрификации, при этом 15-18% стали дробиться, из них 2-6% продолжили развитие до стадии морул/бластоцист (Colombo et al., 2019). Было показано, что витрификация является триггером для активации маркеров апоптоза, а именно увеличивается фрагментация ДНК и активность каспаз после отогрева и созревания ооцитов в течение 24 ч по сравнению со свежими ооцитами (Colombo et al., 2020). Незрелые ооциты на стадии GV считают более криотолерантными (Shaw et al., 2000) ввиду организации их ядра по сравнению с ооцитами на стадии МП. Однако Совинска с соавторами (2020) показали, что витрификация зрелых ооцитов приводит к большему проценту подходящих для ИКСИ гамет. Для ооцитов кошачьих программное замораживание применяют реже, чем витрификацию. Эффективность программного

замораживания ооцитов домашней кошки с использованием различных криопротекторов остается невысокой. Например, оплодотворение *in vitro* ооцитов, замороженных в 1.5 М ДМСО, привело к 12.8% и 14.1% эффективности ЭКО для незрелых и зрелых ооцитов, соответственно, однако ни один из полученных эмбрионов не продвинулся дальше 8ми клеточной стадии (Luvoni, Pellizzari, 2000). Более эффективным криопротектором оказался 1.5 М этиленгликоль. После криоконсервации зрелых ооцитов с использованием этого криопротектора и последующего ЭКО 38.7% эмбрионов стало дробиться, причем 11.3% из них продвинулись далее 8ми клеточной стадии. Для незрелых ооцитов эти проценты оказались гораздо ниже (Luvoni, Pellizzari, 2000).

Что касается эффективности криоконсервации ооцитов диких видов кошачьих, то она является предметом постоянных исследований, так как эффективность замораживания или витрификации ооцитов остается низкой. Витрификация ооцитов сервала (*Leptailurus serval*) и манула (*Otocolobus manul*) показала довольно неплохой результат жизнеспособности ооцитов (60 и 70%) по результатам окрашивания флуоресцеин диацетатом и бромистым этидием (Nowak et al., 2019). При этом, однако, следует иметь в виду, что окрашивание флуоресцеин диацетатом, в случае кошачьих, может приводить к ложноположительным результатам, и к этим цифрам следует относиться с осторожностью. Незрелые ооциты льва (*Panthera leo*) были витрифицированы в смеси этиленгликоля и ДМСО с использованием Cryotop в качестве носителя (Zahmel et al., 2021). Созревание ооцитов после криоконсервации, отогрева и IVM в течение 24 ч составило 49.2%. Оплодотворение этих ооцитов методом ИКСИ привело к дроблению эмбрионов, которое остановилось на стадии 4х клеток. Эффективность оплодотворения составила 24%.

В настоящее время имеется лишь две работы, в которых сообщается о рождении живых котят после витрификации ооцитов домашней кошки (Pore et al., 2012b; Galiguis et al. 2014), и это наглядно иллюстрирует тот факт, что

криоконсервация богатых липидами ооцитов кошачьих является серьезной проблемой. Поэтому поиск новых протоколов и повышение эффективности криоконсервации, особенно в случае ооцитов, полученных от ценных видов кошачьих, остается актуальным.

### **1.3.3.2. Особенности криоконсервации преимплантационных эмбрионов с различным составом внутриклеточных липидов**

Эффективность витрификации эмбрионов мышей составляет 84-90% по числу образованных бластоцист в результате культивирования *in vitro* и 50% по числу рожденных потомков (Mochida et al., 2011). После программного замораживания эмбрионов мышей процент развития до стадии бластоцисты *in vitro* составляет 70% (Igonina et al., 2021). Процент хэтчинга (освобождение от блестящей оболочки перед имплантацией) *in vitro* у эмбрионов крупного рогатого скота после витрификации составляет 46-67%, а процент отелов равен 40-65% (Martinez et al., 2002). После программного замораживания эмбрионов крупного рогатого скота, их оттаивания и культивирования *in vitro*, процент бластоцист составил 27-38% (Stoecklein et al., 2021). Выживаемость эмбрионов свиней после витрификации весьма высока: 51-94% эмбрионов достигают хэтчинга, и эффективность трансплантаций составила почти 30% по числу рожденных поросят (Cuello et al., 2016). Программное замораживание эмбрионов свиньи остается неэффективным, и только лишь при механическом удалении липидов процент развития эмбрионов *in vitro* повышается до 31-64% по числу бластоцист (Nagashima et al., 1995). Таким образом, эффективность замораживания эмбрионов также, как и в случае ооцитов, может зависеть как от количественного, так и от качественного состава липидов. Также большое значение имеет способ криоконсервации: анализ литературы показал, что витрификация более эффективна для эмбрионов, чем программное замораживание. Однако для сохранения эмбрионов кошачьих гораздо чаще применяют программное замораживание. Ранняя работа по сравнению

эффективности двух способов криоконсервации эмбрионов домашней кошки (Pedersen et al., 2008) показала, что программное замораживание дает более высокий процент бластоцист после оттаивания и культивирования *in vitro* по сравнению с витрификацией. В другой работе, которая выполнена недавно, не обнаружено различий по эффективности программного замораживания и витрификации (Mokrousova et al., 2020b). В данном исследовании эффективность криоконсервации эмбрионов кошки также оценивалась по их способности к развитию *in vitro* после криоконсервации.

Для витрификации также, как и для программного замораживания, в качестве криопротекторов применяют ДМСО, этиленгликоль, пропиленгликоль, сахарозу, декстран (Pedersen et al., 2008; Pope et al., 2012b; Mokrousova et al., 2020b). Эффективность витрификации кошачьих эмбрионов составляет 22-29% по числу бластоцист, образованных после оттаивания (Pedersen et al., 2008; Pope et al., 2012a; Mokrousova et al., 2020b). Однако трансплантация эмбрионов после витрификации показала, что постнатальная смертность чрезвычайно высока – выживает лишь 20% рожденных котят; при этом выживают все котята (100%), рожденные после трансплантации эмбрионов, подвергавшихся программному замораживанию (Pope et al., 2012a). Именно высокий уровень смертности котят после применения витрификации, видимо, является причиной того, все успешные работы по получению потомства после криоконсервации эмбрионов диких видов кошачьих выполнены с применением программного замораживания (Conforti et al., 2008; Pope et al., 2012a; Pope, 2014). Наиболее вероятным объяснением высокой постнатальной смертности в случае витрификации эмбрионов кошачьих является то, что при витрификации эмбрионы подвергаются воздействию существенно более высоких концентраций криопротекторов, чем при программном замораживании. Именно высокие концентрации криопротекторов являются, по каким-то причинам, особенно токсичными в отношении эмбрионов кошачьих, и могут приводить к их гибели, в том числе

и на более поздних стадиях развития. Данное предположение нуждается в экспериментальной проверке.

Программное замораживание преимплантационных эмбрионов домашней кошки проводится с использованием таких криопротекторов, как глицерин (Dresser et al., 1988), этиленгликоль (Swanson et al., 1999), пропиленгликоль (Pope et al., 1994; Gomez et al., 2003). В работе Гомец с соавторами (Gomez et al., 2003) описана криоконсервация преимплантационных эмбрионов на разных стадиях дробления (4-8 клеточные, ранние морулы и морулы). Было показано, что стадия развития не влияет на эффективность замораживания эмбрионов, т.к. процент бластоцист, образованных после оттаивания и культивирования для трех групп составляет 53-63% (Gomez et al., 2003). Однако эффективность трансплантаций оттаянных эмбрионов является довольно низкой: родилось только два живых котенка из 122 трансплантированных эмбрионов, замороженных на стадии морулы (Gomez et al., 2003). В других работах, где используют тот же самый протокол замораживания в отношении эмбрионов домашней кошки, эффективность криоконсервации по числу образовавшихся бластоцист после оттаивания и культивирования составляет примерно 20-40% (Pedersen et al., 2009; Pope et al., 2012a; Mokrousova et al., 2020b), а частота рождения котят трансплантации после эмбрионов составляет 22% (Pope et al., 2012a).

Были предприняты попытки криоконсервация эмбрионов нескольких диких видов кошачьих (Crichton et al., 2003; Conforti et al., 2008; Pope et al., 2012a). Эмбрионы каракала (*Caracal caracal*) были заморожены и оттаяны на 5й день развития (Pope et al., 2006a); при этом был использован протокол охлаждения тот же самый как в цитированной выше работе Гомец с соавторами (Gomez et al., 2003). После оттаивания и культивирования *in vitro* в общей сложности 109 эмбрионов были трансплантированы 9 реципиентам. У трех из девяти реципиентов подтверждена беременность, в итоге родились три котенка каракала (Pope et al., 2006a). Несмотря на то, что чаще используют

программное замораживание, витрификация 2х-4х клеточных эмбрионов Амурского тигра (*Panthera tigris altaica*) оказалась более эффективной. Развитие эмбрионов в течение 24 ч после отогрева составило 46%, в то время как после программного замораживания не наблюдалось дробления бластомеров ни в одном из случаев (Crichton et al., 2003); между тем, в данной работе не было произведено трансплантации эмбрионов, таким образом, сложно сделать однозначные выводы из этой работы. Эмбрионы оцелота (*Leopardus pardalis mitis*) были криоконсервированы при помощи программного замораживания в этиленгликоле, а затем оттаяны и трансплантированы самкам-реципиентам. В результате достигнута беременность у 33.3% самок (у трех из девяти самок). Эффективность трансплантации по проценту рожденных котят составила 12.5%, т.е. родилось три котенка из 24х трансплантированных эмбрионов (Conforti et al., 2008). Эффективность программного замораживания 2х клеточных эмбрионов черноногой кошки по упомянутому выше протоколу Голец с соавторами составила 14% по числу рожденных котят после оттаивания и эмбриотрансфера этих эмбрионов самкам-реципиентам домашней кошки (Pore et al., 2012a). Приведенные в этом разделе данные свидетельствуют о весьма невысокой эффективности криоконсервации эмбрионов и ооцитов кошачьих. 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**

Изучение роли липидов в криоустойчивости репродуктивных клеток при их криоконсервации является важной фундаментальной проблемой современной криобиологии (Amstislavsky et al., 2019; Брусенцев и др., 2019; Igonina et al., 2021; Idrissi et al., 2021, 2022; Брусенцев и др., 2022).

Цитоплазматические мембраны клеток и липидные гранулы негативно реагируют на понижение температуры, особенно это заметно на ооцитах и преимплантационных эмбрионах различных видов млекопитающих богатых липидами (Horvath, Seidel, 2006; Pereira, Marques, 2008). Изучение механизмов, лежащих в основе такой повышенной криочувствительности, является важной задачей (Amstislavsky et al., 2019; Idrissi et al., 2021, 2022). 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). Первый подход реализуют за счет частичного удаления липидных гранул при помощи делипидизации, которая бывает двух типов: физической и химической (Nagashima et al., 1995; Men et al., 2006; Paschoal et al., 2014; Amstislavsky et al., 2019; Oliveira et al., 2022). При физической делипидизации проводят поляризацию липидов в клетках путем центрифугирования, а затем удаляют их при помощи микроманипулятора; используя этот подход, удалось впервые достигнуть существенного прогресса в криоконсервации эмбрионов свиньи, которая известна обилием внутриклеточных липидов в ооцитах и преимплантационных эмбрионах (Nagashima et al., 1995). Выживаемость после криоконсервации была гораздо выше у делипидизированных дробящихся эмбрионов свиньи, чем у интактных (Nagashima et al., 1995). При химической делипидизации проводят модуляцию метаболизма липидов при помощи воздействия на клетки различными соединениями, в частности, дитерпеновым алкалоидом форсколином (Men et al., 2006; Paschoal et al., 2014; Oliveira et al., 2022). При этом есть данные о том, что форсколин снижает общее содержание внутриклеточных липидов и повышает выживаемость эмбрионов свиньи после процедур криоконсервации (Men et al., 2006). Второй способ основан на том, что с помощью экспериментальных воздействий на эмбрионы добиваются снижения  $T^*$ , которая зависит от степени

ненасыщенности липидов, что повышает устойчивость репродуктивных клеток при криоконсервации (Zeron et al., 2002; Igonina et al., 2021). Реализуют данную стратегию двумя способами: 1) при помощи диеты (Zeron et al., 2002) и 2) благодаря добавлению различных липофильных компонентов при созревании ооцитов и культивировании эмбрионов *in vitro* (Horvath, Seidel, 2006; Accorsi et al., 2016; Dias et al., 2020; Igonina et al., 2021; Брусенцев и др., 2022). Попытка модификации *in vivo* содержания липидов в ооцитах у животных, получавших специализированные диеты, была предпринята на овцах (Zeron et al., 2002). Было показано, что диета, богатая полиненасыщенными жирными кислотами, сохраняет целостность мембран незрелых ооцитов при охлаждении и снижает  $T^*$  (Zeron et al., 2002). Инкубирование ооцитов крупного рогатого скота с метил-бета-циклодекстрином, обогащенным холестерином *in vitro*, увеличивало скорость их дробления после криоконсервации и отогрева (Horvath, Seidel, 2006). Примечательно, что высокая концентрация холестерина в клеточных мембранах снижает чувствительность клеток к охлаждению, повышая их криоустойчивость (Horvath, Seidel, 2006). Холестерин из бета-циклодекстрина легко проникает в клетки кумулюса и в ооциты и повышает их выживаемость при витрификации (Horvath, Seidel, 2006). Добавление различных жирных кислот в культуральные среды для ооцитов и эмбрионов различных млекопитающих способно изменять состав их внутриклеточных липидов и оказывать влияние на эффективность криоконсервации и  $T^*$  (Lara et al., 2011; Aardema et al., 2011; Accorsi et al., 2016; Dias et al., 2020; Igonina et al., 2021). Поэтому 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. Подробнее влияние жирных кислот на ооциты и эмбрионы *in vitro* будут рассмотрены ниже.

#### **1.4.1. Влияние линолевой и стеариновой кислот на ооциты и преимплантационные эмбрионы млекопитающих**

##### **1.4.1.1. Транспорт жирных кислот в клетки и их роль в процессе развития ооцитов и преимплантационных эмбрионов млекопитающих**

Жирные кислоты не растворимы в воде, поэтому для их переноса в клетки требуется специальный транспортер. Альбумины, в том числе бычий сывороточный альбумин (БСА), могут выполнять эту функцию, связывая такие небольшие гидрофобные молекулы, как жирные кислоты (Alsabeeh et al., 2018). Молекула БСА имеет 6-7 сайтов связывания для транспортируемых молекул (Alsabeeh et al., 2018). Поэтому, для того, чтобы жирная кислота смогла проникнуть в клетку, ее добавляют в культуральные среды в комплексе с БСА.

Предполагается, что транспорт жирных кислот через плазматическую мембрану клетки регулируется транслоказой жирных кислот – трансмембранным гликопротеином CD36, который относится к суперсемейству scavenger receptors (Glatz and Luiken, 2018). Рецептор CD36 состоит из двух трансмембранных доменов, одного внеклеточного и внутриклеточных амино- и карбоксильного концов. Вне клетки CD36 функционирует как акцептор жирных кислот в области липидного рафта. Полярная карбоксильная часть жирной кислоты перемещается через биполярный слой мембраны и внутри клетки взаимодействует с цитоплазматическим белком, связывающим жирные кислоты – fatty acid-binding protein (FABP). На внутриклеточной стороне CD36 также может способствовать транспорту жирных кислот, предоставляя сайт стыковки для FABP или для ферментов, влияющих на жирные кислоты, таких как ацил-КоА-синтетаза (Glatz and Luiken, 2018). Последняя катализирует реакцию между жирными кислотами и КоА формируя ацил-КоА, необходимый для  $\beta$ -окисления и формирования липидных гранул. Для  $\beta$ -окисления ацил-КоА

транспортируется внутрь митохондрий для продукции АТФ (Dunning et al., 2014), в то время как в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) ацил-КоА и глицерин используются для формирования триглицеридов (Guo et al., 2009). Липиды, синтезируемые в ЭПР, формируют липидные гранулы. Ферменты, необходимые для синтеза триглицеридов обнаружены не только в ЭПР, но и на поверхности липидных гранул, что указывает на то, что они формируются и липидными гранулами (Wilfling et al., 2013). Таким образом, поглощение клеткой жирных кислот представляет собой сложный процесс, затрагивающий активность трансмембранных и цитоплазматических белков.

Жирные кислоты играют важную роль в процессе развития ооцитов и преимплантационных эмбрионов млекопитающих (McKeegan, Sturmeя, 2011; Dunning et al., 2014; Amstislavsky et al., 2019). Наиболее распространенными для ооцитов и эмбрионов млекопитающих являются пальмитиновая, олеиновая, стеариновая и арахидоновая кислоты (Dunning et al., 2014; Amstislavsky et al., 2019). Добавление различных жирных кислот в культуральные среды оказывает либо положительный, либо негативный эффект на развитие ооцитов или эмбрионов. Например, линоленовая, олеиновая и линолевая кислоты оказывали позитивный эффект на созревание ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* и на развитие дробящихся эмбрионов и бластоцист (Marei et al., 2010; Aardema et al., 2011; Fayezi et al., 2018; Karasahin, 2019). Арахидоновая, стеариновая и пальмитиновая кислоты, наоборот, были токсичными и приводили к угнетению развития эмбрионов (Leroy et al. 2005; Aardema et al., 2011).

В данной работе подробнее будет рассмотрена ненасыщенная линолевая кислота, так как она имеет достаточно низкую температуру фазового перехода (-5°C) и способна увеличивать текучесть клеточных мембран (Schmitz, Ecker, 2008), что может объяснить ее положительное влияние на криоконсервацию клеток. В работе также будет рассмотрено влияние на жизнеспособность ооцитов и эмбрионов до и после криоконсервации насыщенной стеариновой

кислоты, которая, напротив, имеет довольно высокую температуру фазового перехода (69.6°C).

#### **1.4.1.2. Линолевая кислота и ее роль в развитии ооцитов и эмбрионов млекопитающих**

Линолевая кислота (ЛК) является незаменимой полиненасыщенной жирной кислотой и имеет в углеродном скелете две двойные связи (C18:2 $\omega$ 6). Как и другие жирные кислоты ЛК является источником энергии в клетке, может быть этерифицирована в форму триглицеридов фосфолипидов, эфиров холестерина (Whelan and Fritsche, 2013). Как часть мембранных фосфолипидов, ЛК функционирует как структурный компонент клетки для поддержания текучести мембран (Whelan and Fritsche, 2013).

В ооцитах различных видов млекопитающих содержится от 1.5 до 18% ЛК (Amstislavsky et al., 2019). В исследовательских работах ЛК и ее изомеры активно используют для модификации липидного состава ооцитов и преимплантационных эмбрионов различных видов млекопитающих. При созревании ооцитов и культивировании преимплантационных эмбрионов млекопитающих *in vitro* добавление в питательную среду ЛК или ее изомеров оказывает различное влияние на их развитие в зависимости от вида животного (Marei et al., 2010; Lapa et al., 2011; Amini et al., 2016; Accorsi et al., 2016; Carvalho et al., 2019; Dias et al., 2020; Igonina et al., 2021). Добавление ЛК в культуральную среду с КОК крупного рогатого скота приводило к зависимому от дозы ингибированию роста клеток кумулюса и тормозило развитие ооцитов до стадии метафазы II (МII). Авторы также наблюдали снижение процента дробящихся эмбрионов и эмбрионов, достигнувших стадии бластоцисты, полученных из ооцитов, созревающих в среде с ЛК (Marei et al., 2010). Авторы указывают на то, что добавление ЛК в культуральную среду изменяет молекулярные механизмы, регулирующие созревание ооцитов (Marei et al., 2010). Они наблюдали, что в среде с добавлением ЛК происходит повышение

концентрации простагландина E<sub>2</sub>, снижение внутриклеточного цАМФ и фосфорилирования митоген-активируемой протеинкиназы 1 и протеинкиназы В (Marei et al., 2010). Похожий дозозависимый эффект был продемонстрирован на ооцитах и эмбрионах овец (Amini et al., 2016). Авторы связали такие результаты с повышением экспрессии генов, ассоциированных с активацией апоптоза (Amini et al., 2016). В работе Диас с соавт. (Dias et al., 2020) наблюдали снижение числа бластоцист крупного рогатого скота после воздействия конъюгированного изомера линолевой кислоты (КЛК) *in vitro* без изменения экспрессии генов, ассоциированных с апоптозом. Особняком стоит работа, где показан положительный эффект ЛК на развитие эмбрионов млекопитающих. Лапа с соавторами (2011) показали, что добавление КЛК в среду улучшает способность ооцитов крупного рогатого скота развиваться в эмбрионы высокого качества (Lara et al., 2011), объясняя это изменением метаболизма липидов после воздействия ненасыщенной жирной кислотой *in vitro*.

Помимо влияния на жизнеспособность и развитие ооцитов/эмбрионов в процессе культивирования *in vitro*, также исследуют воздействие ЛК на эффективность криоконсервации. В исследованиях Переиры с соавторами (2007) и Аккорси с соавторами (2016) добавление КЛК или ЛК в среду приводило к снижению общего содержания липидов в бластоцистах крупного рогатого скота (Pereira et al., 2007; Accorsi et al., 2016). Понижение общего количества липидов коррелировало с повышением числа реэкспандированных бластоцист после процедур криоконсервации и оттаивания (Pereira et al., 2007; Accorsi et al., 2016). Кроме того, увеличение дозы ЛК улучшало развитие эмбрионов крупного рогатого скота после витрификации (Karasahin, 2019). В исследовании Карвалхо с соавторами (2019) наблюдалось повышение или понижение общего числа липидов в эмбрионах крупного рогатого скота в зависимости от времени культивирования *in vitro* в среде с добавлением КЛК (Carvalho et al., 2019). При этом более длительное культивирование с КЛК

снижало уровень липидов в эмбрионах и повышало их устойчивость к процедуре криоконсервации (Carvalho et al., 2019). Между тем, Диас с соавторами (2020) не обнаружили значительного изменения в содержании липидов и эффективности криоконсервации в бластоцистах крупного рогатого скота после культивирования *in vitro* с добавлением КЛК (Dias et al., 2020).

Игоной с соавторами (2021) показано, что добавление ЛК в среду для культивирования эмбрионов мышей *in vitro* приводит к увеличению в них общего количества внутриклеточных липидов с повышением степени их ненасыщенности и снижением  $T^*$ . Однако такое изменение состава внутриклеточных липидов не привело к повышению криотолерантности эмбрионов в процессе программного замораживания (Igonina et al., 2021). Отсутствие выраженного эффекта на развитие эмбрионов после криоконсервации, возможно, обусловлено тем, что в мышинных эмбрионах мало липидов, и эти липиды не играют столь важной роли в раннем развитии мышей, какую они играют у видов животных, эмбрионы которых богаты липидами (Bradley, Swann, 2019).

Следует отметить важные методические характеристики перечисленных выше исследований. Практически во всех перечисленных выше работах оценивается изменение содержания общего количества липидов после воздействия ЛК и КЛК (Pereira et al., 2007; Accorsi et al., 2016; Carvalho et al., 2019; Dias et al., 2020). Между тем, лишь единичные работы оценивают, наряду с изменением общего уровня липидов под влиянием культивирования с ЛК, еще и изменение степени ненасыщенности липидов (Lara et al., 2011 и Igonina et al., 2021). Уровень ненасыщенности липидов в клетке является важным показателем, так как он может влиять на  $T^*$  и, соответственно, эффективность криоконсервации клеток (Zeron et al., 2002; Igonina et al., 2021). Кроме того, чаще проводят исследования на ооцитах и эмбрионах крупного рогатого скота или лабораторных мышей, в то время как на представителях семейства кошачьих таких работ совсем нет, поэтому требуется восполнить этот пробел.

### 1.4.1.3. Стеариновая кислота и ее роль в развитии ооцитов и эмбрионов млекопитающих

Стеариновая кислота (СК) является насыщенной жирной кислотой, не имеет в углеродном скелете двойных связей (C18:0), входит в состав различных липидов клетки и участвует в ее метаболизме, в частности, в синтезе олеиновой кислоты (Aardema et al., 2011; Aardema et al., 2017; Pawlak et al., 2020).

Насыщенные кислоты, в том числе СК в основном оказывают негативный эффект на жизнеспособность репродуктивных клеток и эмбрионов млекопитающих (Van Hoesck et al., 2011;2013). Эмбрионы крупного рогатого скота, полученные из ооцитов, созревших *in vitro* с добавлением больших доз стеариновой кислоты, имели меньшее число клеток и высокий индекс апоптоза, а также измененную транскрипционную активность нескольких генов, ассоциированных с развитием эмбриона (Van Hoesck et al., 2011). Было показано повышение экспрессии генов, связанных с энергетическим метаболизмом и оксидативным стрессом в ооцитах крупного рогатого скота, дозревавших в условиях с повышенным содержанием СК (Van Hoesck et al., 2013). В другой работе, проведенной на крупном рогатом скоте, показано, что воздействие СК в течение 23 ч при дозревании *in vitro* ооцитов снижает число и размер липидных гранул в них, что авторы связывают с неэффективным встраиванием насыщенных жирных кислот в триацилглицерины, а также с тем, что СК оказывает негативный эффект на развитие и качество эмбрионов, полученных *in vitro* из данных ооцитов (Aardema et al., 2011). В статье Лероя с соавторами (2007) был показан похожий негативный эффект СК на созревание ооцитов крупного рогатого скота, их оплодотворение и развитие эмбрионов (Leroy et al., 2007). Примечательно, что такой негативный эффект нивелировался при добавлении в среду ненасыщенной олеиновой кислоты (Aardema et al., 2011). Защитным

эффектом от негативного влияния СК обладают кумулюсные клетки. Было показано, что оплодотворение денудированных (освобожденных от кумулюсных клеток) ооцитов, созревающих в среде с добавлением СК, приводило к снижению развития эмбрионов по сравнению с нативными кумулюс-ооцитными комплексами, созревавшими в тех же условиях (Aardema et al., 2017). Это объясняется высокой экспрессией в кумулюсных клетках Stearoyl-CoA десатуразы, которая катализирует превращение насыщенных кислот в безвредные ненасыщенные (Aardema et al., 2017). Сами клетки кумулюса тоже подвергаются негативному влиянию СК. В частности, при добавлении СК в среду для дозревания КОК свиней: в них образуется множество мелких липидных гранул, в отличие от КОК, которые культивировали с добавлением олеиновой кислоты. Авторы объясняют это явление увеличением концентрации цАМФ в кумулюсных клетках, что приводит к активному липолизу, а также изменению экспрессии генов, ассоциированных с метаболизмом липидов. При этом на ооциты СК практически не воздействует (Pawlak et al., 2020).

Бластоцисты крупного рогатого скота, полученные после дозревания ооцитов *in vitro* с добавлением стеариновой кислоты, были плохого качества и имели сниженную криотолерантность (Shehab-El-Deen et al., 2009). Таким образом СК в основном оказывает негативный эффект на развитие ооцитов и эмбрионов либо не вызывает серьезных последствий для клеток. Исследование влияния СК на жизнеспособность ооцитов и эмбрионов семейства кошачьих до и после криоконсервации является актуальным. Следует также отметить, что исследований, связанных с влиянием СК на криотолерантность ооцитов и эмбрионов млекопитающих, крайне мало. Между тем, эти исследования должны представлять интерес для проверки гипотезы о том, что не только изменение общего уровня внутриклеточных липидов, но и изменение их степени ненасыщенности имеет важное значение для криобиологических характеристик репродуктивных клеток.

### 1.5. Заключение к литературному обзору

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. Большое количество липидных гранул в ооцитах и эмбрионах повышает их криочувствительность во время программного замораживания, кроме того, фазовый переход липидов в процессе замораживания может зависеть от качественного состава внутриклеточных жиров (степени ненасыщенности), поэтому модификация липидного состава может стать ключом к повышению эффективности криоконсервации.

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 исследования

Экспериментальная работа по культивированию гамет и эмбрионов домашней кошки *in vitro*, модификация липидного состава клеток и их криоконсервация выполнена на базе Федерального исследовательского центра «Института цитологии и генетики СО РАН» в секторе криоконсервации и репродуктивных технологий. Оценка жизнеспособности ооцитов и эмбрионов с применением флуоресцентной и конфокальной микроскопии была проведена в Центре коллективного пользования «Микроскопический анализ биологических объектов», ИЦиГ СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/labs/viv/index.php?id=113>), а также в Российском национальном центре генетических ресурсов лабораторных животных на базе SPF-вивария ИЦиГ СО РАН. Спектры комбинационного рассеяния света липидов в ооцитах и эмбрионах домашней кошки получали на базе Института автоматики и электрометрии СО РАН в центре коллективного пользования "Высокоразрешающая спектроскопия газов и конденсированных сред". Репродуктивные органы домашних кошек получали после операций овариогистерэктомии и орхиэктомии в Пункте льготной стерилизации животных г. Новосибирска (<http://плс-нск.рф>).

### 2.1. Животные

Семенники с эпидидимисами домашних котов, а также яичники кошек 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. Яичники немедленно после операции помещали в среду “Collect”: 50 мл M199 с добавлением 20 mM HEPES, 2.2 mM пирувата натрия, 2.2 mM лактата натрия,

3 г/л бычьего сывороточного альбумина – БСА, 50 мкг/мл гентамицина, и сохраняли в охлажденном состоянии при +4 °С до 4 ч. Семенники с эпидидимисами помещали в стерильные сухие пробирки и хранили при +4 °С до 24 ч с момента орхиэктомии. Все эксперименты на животных были одобрены Комитетом по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 22.2 от 30 мая 2014 г.) и соответствовали стандартам Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей.

## **2.2. Созревание ооцитов *in vitro***

Кумулюс-ооцитные комплексы выделяли из фолликулов в подогретой до 38.5 °С среде “Collect”, используя стереомикроскоп S8 APO (Leica Microsystems), как описано ранее (Mokrousova et al., 2020b). Ооциты с темной и гомогенной цитоплазмой, окруженные несколькими слоями клеток кумулюса (не менее пяти), промывали для удаления дебриса и отбирали для созревания *in vitro*. Среда для созревания включала 25 мл M199 с добавлением 15 mM бикарбоната натрия, 2.2 mM пирувата натрия, 2.2 mM лактата натрия, 3 г/л БСА, 50 мкг/мл гентамицина, 2 МЕ/мл хорионического гонадотропина лошади и 10 МЕ/мл хорионического гонадотропина человека. Затем КОК помещали на 24 ч в 4-луночный планшет в среду для созревания ооцитов (500 мкл на лунку), покрытую 400 мкл минерального масла, предварительно выдержанную не менее двух часов в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>, и инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе New Brunswick™ Galaxy 48R при 38.5 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 90% влажности.

## **2.3. Получение сперматозоидов и экстракорпоральное оплодотворение**

Сперматозоиды получали из эпидидимисов девяти взрослых беспородных домашних котов, как описано ранее (Brusentsev et al., 2018).

Каудальные части эпидидимисов извлекали, переносили в чашку Петри и измельчали в одном миллилитре среды “Collect”, подогретой до 38.5 °С. Раствор со сперматозоидами дважды центрифугировали при относительном ускорении центрифуги 850 со скоростью 3000 об/мин. в течение 5 мин в среде “Collect” и удаляли супернатант. Осадок смешивали с минимальным (5-10 мкл) количеством оставшегося супернатанта и сверху добавляли 200 мкл среды “Collect”. Пробирку помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 30 мин для всплытия сперматозоидов в верхний слой раствора, а затем их собирали и использовали для ЭКО. Концентрацию сперматозоидов и их подвижность оценивали в счетной камере Маклера. Оплодотворение проводили в среде для культивирования: 25 мл Ham’s F-10 в концентрации 9.8 г/л с добавлением 5% фетальной телячьей сыворотки (Fetal Calf Serum) – FCS и 50 мкг/мл гентамицина. Созревшие ооциты переносили в 4-луночный планшет со средой для культивирования (по 500 мкл на лунку) предварительно выдержанной не менее двух часов в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Сверху среда была покрыта 400 мкл минерального масла FertiCult (FertiPro, Бельгия). В чашку с 10-20 ооцитами на лунку объемом 500 мкл добавляли 8 мкл суспензии сперматозоидов с конечной концентрацией  $1 \cdot 10^6$  подвижных сперматозоидов/мл. Гаметы совместно инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе New Brunswick™ Galaxy 48R при 38.5 °С, 5% CO<sub>2</sub> и влажности 90% в течение 24 ч. Средний процент дробления *in vitro* оценивали, как число 2-клеточных эмбрионов, развивающихся из оплодотворенных зрелых ооцитов через 24 ч после ЭКО. Он составил 38.8%.

#### **2.4. Приготовление растворов жирных кислот**

Растворы ЛК, СК, дейтерированной СК (дСК), дейтерированной ОК (дОК) готовили по протоколу, описанному у Аардема с соавторами (2011) с модификациями (Aardema et al., 2011). Раствор 0.01 М линолеата калия получен путем взаимодействия ЛК с гидроксидом калия при 70 °С на водяной бане в течение 30 мин. Данный раствор инкубировали с 3.3 мМ БСА

свободным от жирных кислот для получения 5 мМ ЛК в комплексе ЛК-БСА в соотношении 3:1. Готовый раствор добавляли в среду для дозревания ооцитов или культивирования эмбрионов до получения финальной концентрации 400 мкМ. Раствор стеарата калия был получен путем нагревания СК с гидроксидом калия на водяной бане при 90 °С в течении 60 мин и ультразвуковой обработкой на Sonicator Q700 (Qsonica, США) в течение 60 мин. Периоды нагревания и обработки ультразвуком чередовали несколько раз в течение 5-6 ч до момента получения необходимой концентрации мыльного раствора. Далее полученный раствор смешивали с БСА, как описано выше, и добавляли в среду для дозревания ооцитов или культивирования эмбрионов до получения финальной концентрации 400 мкМ. Раствор дСК (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA) был приготовлен по аналогии с протонированной СК, как описано выше, с перерасчетом молярной массы. Данные растворы затем добавляли в среду для созревания ооцитов в концентрациях 50 мкМ, 100 мкМ, 200 мкМ, 400 мкМ. Раствор олеата калия получали путем нагревания на водяной бане при 40°С в течение 30 мин. Полученный раствор соединяли с 3.3 мМ БСА для получения 5 мМ дОК в комплексе дОК-БСА в соотношении 3:1. Далее раствор дОК-БСА добавляли в среду для созревания ооцитов в концентрации 400 мкМ.

## 2.5. Дизайн эксперимента

Исследовательский проект состоял из двух основных экспериментов. Первый из них посвящен изучению распределению дейтерированных жирных кислот внутри липидных гранул ооцитов домашней кошки при комнатной температуре и при замораживании. Данный блок посвящен модификации липидного состава ооцитов в более ненасыщенную или насыщенную сторону с целью изучения влияния степени ненасыщенности липидов на развитие ооцитов *in vitro*, на температуру фазового перехода ( $T^*$ ) и эффективность криоконсервации клеток.

Второй эксперимент посвящен модификации липидного состава эмбрионов домашней кошки с целью изучения влияния ненасыщенной ЛК и насыщенной СК на изменение  $T^*$  и развитие эмбрионов *in vitro* до и после криоконсервации.

### 2.5.1. Модификация липидного состава ооцитов домашней кошки

Дизайн эксперимента представлен на рисунке 6.

#### 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, связанной с БСА (дСК-БСА). КОКи инкубировали с дСК в соотношении дСК-БСА = 3:1 М в концентрации 50, 100, 200, 400 мкМ в течение 23 ч и 45 ч периода созревания. Каждый ооцит с определенной концентрацией дСК и временем

культивирования исследовали при помощи спектроскопии КРС. Непосредственно перед исследованием спектроскопии КРС ооциты отмывали от культуральной среды в двух-трех каплях среды KSOM (optimized simple potassium medium – оптимизированная простая среда, обогащенная калием), которая не дает лишнего фонового сигнала. Отмытые ооциты помещали в каплю 10 мкл KSOM на стекло с лункой и накрывали покровным стеклом. Для проверки токсического воздействия дейтерированных меток на созревание ооциты культивировали в среде без добавления ЖК (контроль), в среде с добавлением 200 мкМ протонированной СК или с добавлением 200 мкМ дСК. Соотношение с БСК для обеих кислот равнялось 3:1. Ооциты распределяли случайным образом между тремя группами и культивировали в течение 23 ч. После культивирования ооциты фиксировали в 4% формальдегиде и окрашивали DAPI, для оценки развития по числу стадий мейоза (GV, MI, MII), как будет описано ниже (пункт 2.9.1).

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 (состав приведен в 2.11.3), замораживали по протоколу, описанному ниже с применением метода спектроскопии комбинационного рассеяния света (пункт 2.11.3). Измеряли распределение липидов внутри липидных гранул ооцитов при замораживании, а также температуру фазового перехода липидов ( $T^*$ ) под воздействием ненасыщенной дОК и насыщенной дСК.

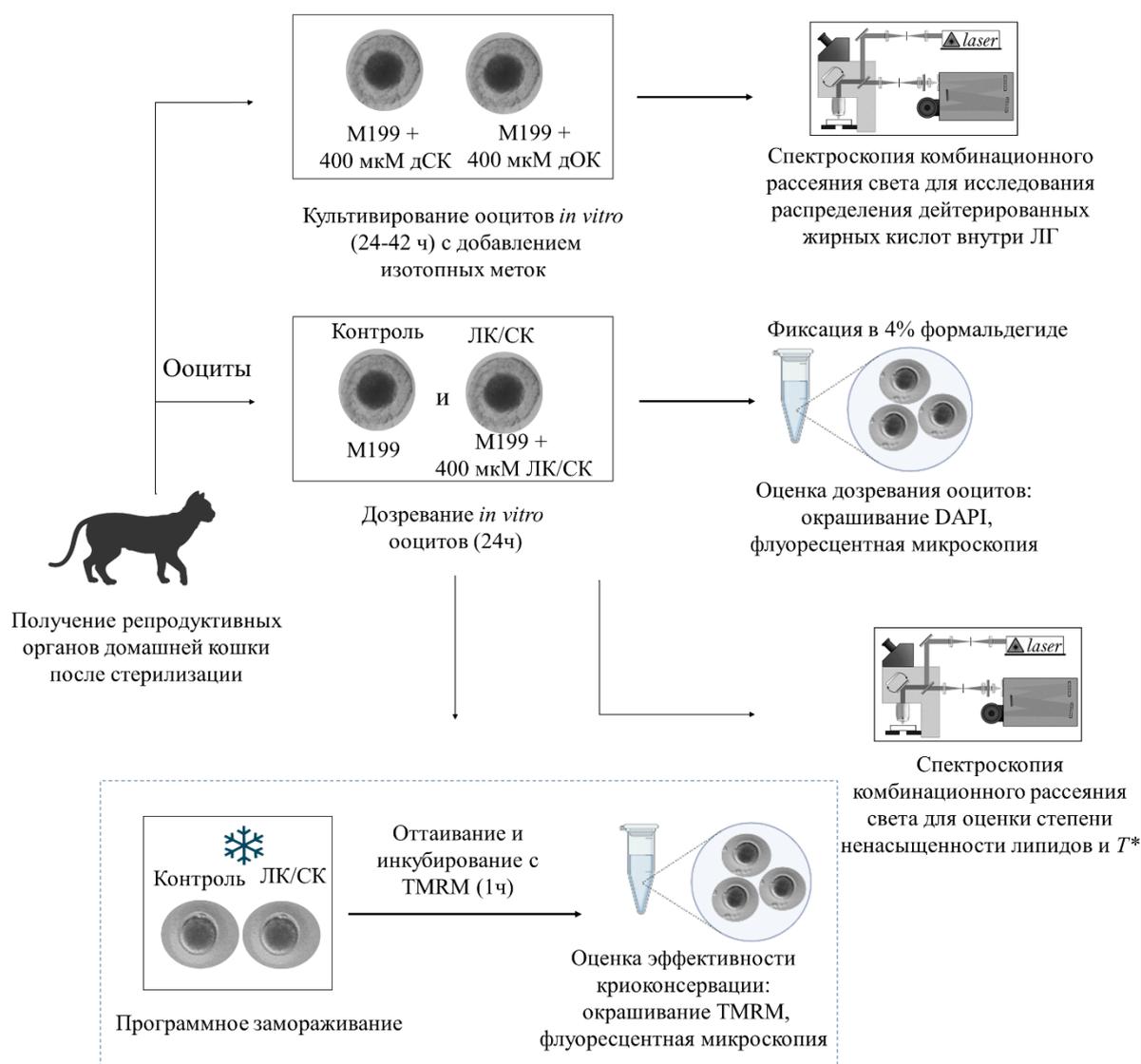


Рисунок 6. Модификация липидного состава ооцитов домашней кошки.  
 Примечание: ЛК – линолевая кислота, СК – стеариновая кислота, ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение,  $T^*$  – температура фазового перехода липидов, TMRM – тетраметилродамин, DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол (4',6-diamidino-2-phenylindole).

### **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 СК). Все группы культивировали в CO<sub>2</sub> инкубаторе Galaxy 48R при 38.5 °C, 5% CO<sub>2</sub> и влажности 90% в течение 24 ч. После дозревания *in vitro* некоторые ооциты случайным образом были отобраны для оценки при помощи спектроскопии комбинационного рассеяния света для измерения степени ненасыщенности внутриклеточных липидов и температуры фазового перехода липидов, как описано ниже (пункты 2.11.2 и 2.11.3). Для оценки развития некоторые ооциты после дозревания *in vitro* фиксировали в 4% забуференном параформальдегиде с рН 7.4-7.6, предварительно промыв их в трех каплях фосфатно-солевого буферного раствора (PBS) по три минуты в каждой. Стадии дозревания ооцитов определяли при помощи окрашивания DAPI и флуоресцентной микроскопии, как описано ниже (пункт 2.9.1). Оставшиеся ооциты после дозревания *in vitro* были криоконсервированы при помощи программного замораживателя, как описано ниже (параграф 2.7). Жизнеспособность ооцитов после криоконсервации оценивали при помощи окрашивания митохондрий тетраметилродамином (TMPM), как описано ниже (пункт 2.9.2).

### **2.5.2. Модификация липидного состава преимплантационных эмбрионов домашней кошки**

Дизайн эксперимента представлен на рисунке 7.

Двухклеточные эмбрионы домашней кошки, полученные в результате ЭКО, культивировали без добавления жирных кислот (контроль) и с

добавлением 400 мкМ ненасыщенной линолевой кислоты (ЛК группа) или насыщенной стеариновой кислоты (СК группа). В каждой экспериментальной группе был соответствующий контроль. В случае эксперимента с ЛК, эмбрионы контрольной группы культивировали в течение 66 ч в 20 мкл модифицированной среды Ham's F-10 с добавлением 5% FCS и 50 мкг/мл гентамицина, в то время как эмбрионы из группы ЛК культивировали в течение 66 ч в модифицированной среде Ham's F-10 с добавлением 400 мкМ ЛК-БСА. В случае эксперимента с СК, эмбрионы контрольной группы культивировали в течение 66 часов в среде CSCM-C (Continuous Single Culture Medium – Complete), в то время как эмбрионы из группы СК культивировали в среде CSCM-C с добавлением 400 мкМ СК-БСА.

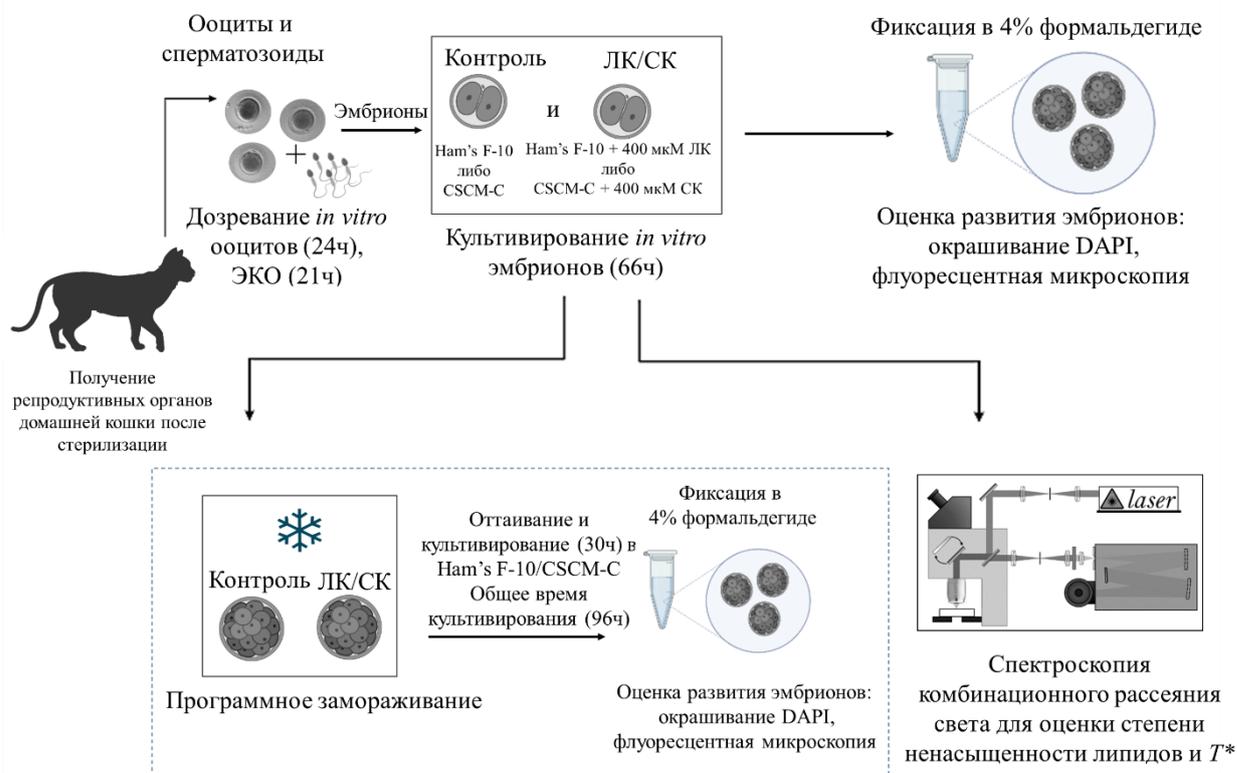


Рисунок 7. Модификация липидного состава преимплантационных эмбрионов домашней кошки.

Примечание: ЛК – линолевая кислота, СК – стеариновая кислота, ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение,  $T^*$  – температура фазового перехода липидов, DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол (4',6-diamidino-2-phenylindole).

После 66 ч культивирования некоторые из преимплантационных эмбрионов всех трех групп (контроль, ЛК, СК) были отобраны для анализа при помощи спектроскопии КРС для оценки степени ненасыщенности внутриклеточных липидов и  $T^*$ . Другие эмбрионы фиксировали в 400 мкл 4%-го раствора формальдегида на PBS при pH 7.4-7.6 для дальнейшей оценки числа клеток и уровня фрагментации ядер (после окраски DAPI и флуоресцентной микроскопии), либо для оценки общего уровня

внутриклеточных липидов (после окраски нильским красным и конфокальной микроскопии), как описано ниже (раздел 2.10). Остальные эмбрионы замораживали, оттаивали и культивировали *in vitro* в течение 30 ч. Затем оценивали стадию развития при помощи световой микроскопии, фиксировали в 400 мкл 4%-го раствора формальдегида на PBS при pH 7.4-7.6 и производили оценку числа клеток, а также фрагментации ядер при помощи окрашивания DAPI и флуоресцентной микроскопии. На момент фиксации общее время культивирования *in vitro* эмбрионов, подвергавшихся криоконсервации, составило 96 ч.

## 2.6. Криоконсервация ооцитов

Ооциты охлаждали по протоколу программного замораживания, описанному ранее Лювони и Пеллиццари (2000), с некоторыми модификациями (Luvoni, Pellizzari, 2000). Криопротекторная смесь (cryoprotectant solution – CPS) состояла из PBS (pH = 7.2-7.4) с добавлением 0.2 М сахарозы, 1.5 М этиленгликоля (ЭГ) и 20% FCS. Ооциты после дозревания *in vitro* с добавлением и без добавления жирных кислот выдерживали в CPS, разбавленном PBS в соотношении 1:2, в течение 2 мин, затем в растворе, разведенном 2:1, в течение 2 мин. и в CPS без разбавления в течение 16 мин. Ооциты переносили в 0.25 мл пластиковые соломины (Cryo Bio System, Франция) по 5-10 штук и помещали в программный замораживатель CL 8800 (Cryo Logic, Австралия). Образцы охлаждали со скоростью 2 °C/мин от +20 °C до –7 °C. Затем соломины выдерживали при –7 °C и индуцировали нуклеацию льда путем прикосновения пинцетом, предварительно охлажденным в жидком азоте, к соломине с образцом. Далее образцы охлаждали со скоростью 0.3 °C/мин. до –30 °C после чего помещали их в жидкий азот. Оттаивание ооцитов проводили, выдерживая соломины с ооцитами в течение 5 сек. на воздухе, а затем 10 сек. на водяной бане при +30 °C. Ооциты извлекали из соломины и в течение 5 мин. выдерживали в CPS. Далее их переносили в криопротекторную

смесь, разбавленную PBS в соотношении 1:1, на одну минуту, а затем в раствор, разведенный 1:2 на одну мин. После этого ооциты помещали в среду для культивирования, содержащую 5 мкМ TMPM, на один час перед микроскопическим анализом.

## **2.7. Криоконсервация эмбрионов**

Для замораживания эмбрионов использовали два протокола. Отличие протоколов заключалось в проводке образцов по растворам криопротекторов, программе замораживания, а также в процессе оттаивания клеток. Подробное описание протоколов представлено ниже.

### **2.7.1. Криоконсервация эмбрионов (протокол 1)**

Эмбрионы контрольной группы и после воздействия ЛК замораживали по протоколу Гомец с соавторами (2003) с модификациями (Gomez et al., 2003). Раствор криопротектора был приготовлен на среде “Collect” с добавлением 0.125 М сахарозы (Химмед, Россия), 10% пропиленгликоля – ПГ (Merck, Германия) и 10% FCS. Эмбрионы выдерживали в криопротекторной смеси, разбавленной средой “Collect” в соотношении 1:2, а затем в том же растворе, разбавленном в соотношении 2:1, по три минуты; после этого эмбрионы переносили в неразбавленный раствор криопротектора комнатной температуры (10% ПГ и 0.125 М сахарозы) на 15 мин. Далее образцы переносили в пластиковую соломинку объемом 0.25 мл, заполненную раствором для замораживания (три сектора, разделенные пузырьками воздуха); эмбрионы помещали в средний сектор. Соломины с эмбрионами помещали в ячейки программного замораживателя CL 8800 (Cryo Logic, Австралия) и охлаждали со скоростью 2 °С/мин. от +20 °С до –6 °С, а затем выдерживали при этой температуре 10 мин. В течение этого промежутка времени вручную инициировали нуклеацию льда, прикасаясь к соломинке предварительно охлажденным пинцетом к верхним менискам первого, а затем

второго секторов. Затем доводили охлаждение до  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $0.3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$  и выдерживали при этой температуре в течение 10 мин. После этого соломину погружали в жидкий азот. Для оттаивания соломину извлекали из жидкого азота и выдерживали на воздухе при комнатной температуре в течение двух минут, как рекомендовано ранее для данного протокола криоконсервации (Gomez et al., 2003). Эмбрионы отмывали от криопротектора путем переноса между каплями растворов с различной концентрацией ПГ/сахарозы на основе среды “Collect” (0.95 M/0.25 M; 0.95 M/0.125 M; 0.45 M/0.125 M; 0 M/0.125 M; 0 M/0.0625 M) по 3 мин. в каждой капле. Затем их переносили в среду для культивирования *in vitro* на 30 часов. После этого эмбрионы фиксировали и оценивали путем окрашивания DAPI с последующей флуоресцентной микроскопией, как описано ниже.

### **2.7.2. Криоконсервация эмбрионов (протокол 2)**

Эмбрионы контрольной группы и эмбрионы экспериментальной группы (после воздействия СК) замораживали по протоколу Гомец с соавторами (2003) с модификациями (Gomez et al., 2003). Для криоконсервации использовали раствор 10% ПГ, приготовленный на среде “Collect”. Сначала эмбрионы выдерживали в среде “Collect” в течение пяти минут, после чего переносили их в криопротекторную смесь, разбавленную средой “Collect” в соотношении 1:1, на пять минут. Затем эмбрионы помещали в неразбавленный раствор криопротектора (10% ПГ) на пять минут при комнатной температуре и переносили их в пластиковую соломинку объемом 0.25 мл, заполненную раствором для криоконсервации (три сектора, разделенные пузырьками воздуха); эмбрионы помещали в средний сектор. Соломинку с эмбрионами помещали в программный замораживатель CL 8800 (Cryo Logic, Австралия) при  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , и охлаждали со скоростью  $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$  до  $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ , а затем выдерживали при этой температуре пять минут. В течение этого периода вручную инициировали нуклеацию льда, прикасаясь к соломинке предварительно

охлажденным пинцетом к верхнему мениску первого и второго секторов. Затем доводили охлаждение до  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $0.3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$ , а затем до  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $6\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$  После этого соломину погружали в жидкий азот. Для оттаивания соломину извлекали из жидкого азота и выдерживали на воздухе при комнатной температуре в течение 40 сек., а затем 40 сек. на водяной бане при  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Renard, Vabinet, 1984). Эмбрионы отмывали от криопротектора путем переноса между каплями растворов с различным соотношением 10% ПГ и 1М сахарозы на основе среды "Collect", выдерживая их по шесть минут в каждой капле: 1) 40 мкл 10% ПГ и 20 мкл 1М сахарозы, 2) 40 мкл 10% ПГ, 20 мкл 1М сахарозы и 30 мкл "Collect" 3) 20 мкл 1М сахарозы и 60 мкл "Collect" 4) 50 мкл "Collect". Затем их переносили в среду для культивирования *in vitro* на 30 часов. После этого эмбрионы фиксировали и оценивали путем окрашивания DAPI с последующей флуоресцентной микроскопией, как описано ниже.

## **2.8. Флуоресцентная микроскопия**

### **2.8.1. Окрашивание 4',6-диамидино-2-фенилиндолом**

Фиксированные ооциты и эмбрионы трижды отмывали от формальдегида при комнатной температуре в PBS с добавлением 1 мг/мл поливинилпирролидона – ПВП (Merck, Германия) – в течение 5 мин., а затем инкубировали с 2 мг/мл 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) для окрашивания ядер. После этого их снова промывали таким же образом и помещали на предметные стекла. Образцы оценивали с помощью микроскопа Axio Imager M2 (Carl Zeiss, Германия) и цифровой камеры AxioCam 506 mono (Carl Zeiss, Германия). Образец возбуждали источником света с длиной волны 359 нм. Анализ изображений проводили в программе ImageJ (НИН, США). Окрашенные ооциты делили на три группы по стадиям созревания:

герминальный везикул (ГВ), метафаза I (MI), метафаза II (MII) (рис. 8). Подсчитывали число ооцитов на каждой стадии в процентах.

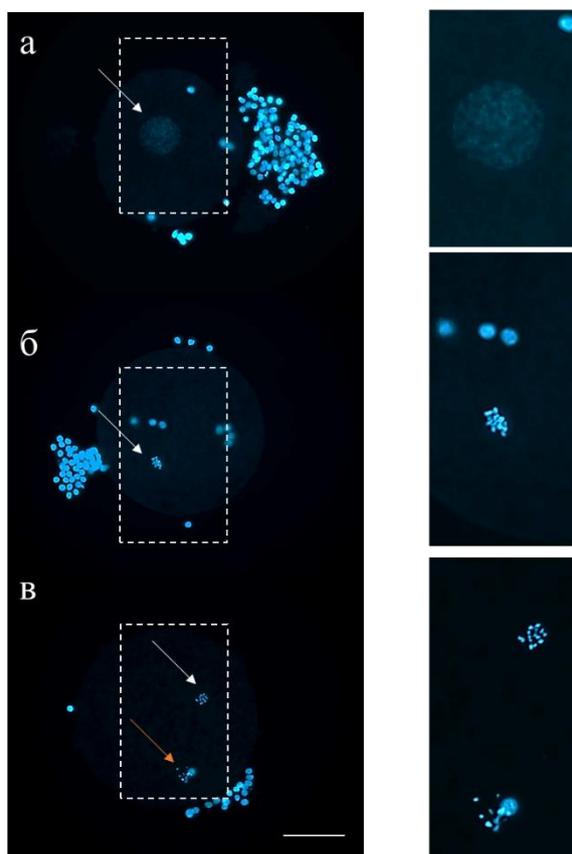


Рисунок 8. Стадии созревания ооцитов, окраска DAPI.

Примечание: а – герминальный везикул; б– метафаза I, в – метафаза II. Белые стрелки указывают на хромосомы, оранжевая стрелка указывает на полярное тело. Справа показаны увеличенные фрагменты изображений; шкала – 50 мкм.

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 (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).

### 2.8.2. Окрашивание тетраметилпродамином

Жизнеспособность клетки можно оценить по наличию активности митохондрий. Активность митохондрий является одним из биоиндикаторов криорезистентности ооцитов (Кузьмина и др., 2020; Чистякова, 2020). Мы использовали тетраметилпродамин (TMPM) (Abcam, Великобритания) – флуоресцентный, проникающий катионный краситель, который окрашивает функционирующие митохондрии. Тетраметилпродамин можно использовать в очень низких концентрациях, тем самым избегая влияния на функциональное состояние митохондрий (Creed, McKenzie, 2019). Данный краситель аккумулируется функционирующими, отрицательно заряженными митохондриями, придавая клеткам оранжевое свечение ( $E_x = 532$  нм;  $E_m = 579$  нм). Ооциты, демонстрирующие оранжевое свечение, считали позитивно мечеными (TMRM+) и, соответственно, живыми, то есть успешно перенесшими криоконсервацию. Снижение флуоресценции наблюдали, когда мембранный потенциал митохондрий нарушался. В этом случае ооциты считали негативно мечеными (TMRM-) и, соответственно, погибшими. Для негативного контроля использовали фиксированные в 4% параформальдегиде ооциты. Ооциты считали мертвыми (TMRM-), если не наблюдали разницы по флуоресцентному сигналу с негативным контролем. Раствор TMPM готовили, как описано ранее (Creed, McKenzie, 2019). Раствор 2 мкМ TMPM был приготовлен путем растворения 10 мМ вещества сначала в 100% метаноле и последующим разведением в дистиллированной воде. Ооциты после оттаивания выдерживали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение часа в заранее подготовленной среде для дозревания ооцитов, содержащей 5 мкМ TMPM. Окрашенный материал помещали на стекло с лункой. Образцы исследовали с помощью микроскопа Axio Imager M2 (Carl Zeiss) и камерой AxioCam 506 mono (Carl Zeiss).

## **2.9. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия с применением красителя нильский красный**

Оценку интенсивности окрашивания внутриклеточных липидов контрольных и культивированных в течение 66 ч с линолевой или стеариновой кислотой эмбрионов проводили с помощью окрашивания нильским красным (Nile Red) как описано ранее (Romek et al., 2011). Вкратце, фиксированные эмбрионы трижды отмывали от формальдегида в PBS, содержащем 1 мг/мл ПВП, по пять минут в каждой капле при комнатной температуре. Затем их выдерживали в растворе нильского красного с концентрацией 10 мкг/мл в течение трех часов при 37 °С для достижения максимальной интенсивности окрашивания внутриклеточных липидов, как описано ранее (Genicot et al., 2005). Образцы помещали на предметные стекла в PBS. Изображения получали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа 780 NLO Axio Observer Z1 (Carl Zeiss) с использованием программного обеспечения Zen 2012 (Carl Zeiss, Германия). Эмбрионы, окрашенные нильским красным, облучали газовым аргоновым лазером (максимальная мощность 30 мВт) при 0.1% от максимальной мощности на длине волны 488 нм. Спектры получали в диапазоне длин волн 494-687 нм с шагом 9 нм. Все изображения были получены в режиме подсчета фотонов – “photon counting”. Суммирование оптических срезов и вычитание фоновой флуоресценции выполняли с помощью программы ImageJ.

## **2.10. Спектроскопия комбинационного рассеяния света**

Изменение степени ненасыщенности липидов и температуру начала ФПЛ 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 комбинационного рассеяния света.

### 2.10.1. Экспериментальная установка

Спектроскопию комбинационного рассеяния света проводили на экспериментальной установке, состоящей из прямого микроскопа Orthoplan (Leitz), оснащенного сканирующим пьезопозиционером PXY-200. Использовали монохроматор SP2500i с многоканальным детектором Spec-10:2K/LN. Оптический криостат THMS350V использовали для проведения измерений спектров при различных температурах. Источником монохроматического излучения для возбуждения комбинационного рассеяния света служил твердотельный лазер Excelsior (Spectra-Physics, США) с длиной волны 532.1 нм. Лазерный луч фокусировали в область диаметром  $\sim 1$  мкм с помощью объектива  $\times 60$  CFI Plan Fluor 60XC (Nikon Instruments, Япония) с числовой апертурой 0.85. В случае исследования поглощения дСК в ЛГ лазерный луч фокусировали на образец с помощью объектива  $\times 100$  (PL Fluotar L; Leica Microsystems, Germany) с числовой апертурой 0.75. Мощность излучения после объектива составляла 20 мВт. Спектральное разрешение составляло  $2.5 \text{ см}^{-1}$ . Длины волн измеряемых спектров калибровали с помощью неоновой газоразрядной лампы. Спектры комбинационного рассеяния света измеряли в диапазоне от 800 до  $3200 \text{ см}^{-1}$ . Интенсивности линий КРС, соответствующие симметричным валентным колебаниям CD<sub>2</sub> и CH<sub>2</sub>, оценивали путем усреднения 7 пикселей в спектральных диапазонах 2104–2111  $\text{см}^{-1}$  и 2849–2855  $\text{см}^{-1}$ , соответственно.

### 2.10.2. Оценка степени ненасыщенности внутриклеточных липидов

По четыре ооцита из каждой группы (контроль, ЛК и СК), дозревавших в течение 24 часов, а также пять, шесть и три эмбриона из каждой группы (контроль, ЛК и СК, соответственно) исследовали при помощи спектроскопии КРС. Для изучения степени ненасыщенности липидов от каждого эмбриона и ооцита измерено по 100 спектров комбинационного рассеяния от разных

случайно выбранных локальных областей. Для выделения спектрального вклада липидов использовали метод главных компонент. Поскольку липидные гранулы содержат наибольшую часть клеточных липидов, мы предполагаем, что полученная спектральная составляющая липидов в основном связана именно с ними. Ранее был описан метод выделения вклада липидов в спектры комбинационного рассеяния света (Igonina et al., 2021). Чтобы извлечь вклад липидов, мы уменьшили размерность данных до трех главных компонент, связанных с вариацией в спектрах трех основных типов соединений: липидов, белков и воды. Эти соединения дают наиболее интенсивный вклад в измеряемые спектры комбинационного рассеяния света. Затем для каждого набора спектров, измеренного от отдельного эмбриона или ооцита, была найдена линейная комбинация главных компонент, для которой вклад белков и воды был бы минимален. Чтобы минимизировать вклад белков мы подбирали такую линейную комбинацию этих компонент, чтобы результирующий спектр был свободен от пика фенилаланина на  $1004\text{ см}^{-1}$ . Чтобы минимизировать вклад от воды проводилась минимизация интенсивности полосы соответствующей валентным колебаниям ОН-связей воды на частотах выше  $3050\text{ см}^{-1}$ . Поскольку в спектре комбинационного рассеяния света липидов отсутствуют линии на этих частотах, полученная комбинация главных компонент будет отражать липидный вклад в измеряемые спектры. Для оценки степени ненасыщенности липидов использовали соотношение интенсивностей линии валентных колебаний связей С=С при  $1657\text{ см}^{-1}$  к линии ножничных деформационных колебаний  $\text{CH}_2$  ( $\delta\text{CH}$ ). Интенсивность первой линии увеличивается с увеличением концентрации двойных связей С=С, интенсивность второй линии увеличивается с увеличением числа метиленовых групп. Для оценки ненасыщенности мы использовали спектры комбинационного рассеяния, измеренные при  $T = 25\text{ °C}$ .

### 2.10.3. Измерение температуры начала фазового перехода липидов

Для изучения зависимости фазового состояния липидов от температуры образцы помещали в раствор KSOM с добавлением 0.2 М сахарозы и 1.5 М ЭГ в случае ооцитов, либо 1.5 М ПГ в случае эмбрионов. При исследовании дСК и дОК в липидных гранулах в процессе охлаждения использовали 0.2 М сахарозы и 1.5 М ЭГ. Охлаждение образцов проводили сходным образом, как описано выше для основного эксперимента (разделы 2.7 и 2.8). Охлаждали образцы до  $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$ , затем инициировали нуклеацию льда, делали 10-минутную паузу для перекристаллизации льда. После этого образец охлаждали со скоростью  $0.3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$  В ходе охлаждения делали дополнительные паузы длительностью  $\sim 20$  мин для измерения спектров комбинационного рассеяния света. Температуру на нужном уровне поддерживали при помощи криостата. Изменение фазового состояния липидов отслеживали по соотношению интенсивностей антисимметричных (aCH) и симметричных (sCH) валентных колебаний  $\text{CH}_2$  на  $2880$  и  $2850\text{ см}^{-1}$ , соответственно. Увеличение числа aCH в спектрах комбинационного рассеяния света отражает изменение конформационного состояния липидов, происходящее при фазовом переходе. Из-за сложного состава липидов их фазовый переход в клетках размыт, т.е. происходит не при одной конкретной температуре, а в некотором температурном диапазоне, поэтому мы отслеживали температуру начала  $T^*$  при которой появляется пик aCH (Okotrub et al., 2018). В случае дейтрированных жирных кислот фазовый переход детектировался по соотношению изотопически смещенных линий комбинационного рассеяния света  $I_{2130}/I_{sCD_3}$  для дОК и ширине на полувысоте пика  $sCD_2$  (FWHM (full width at half maximum)  $sCD_2$ ) для дСК (Okotrub et. al., 2022). Предварительная обработка данных включала коррекцию всплесков интенсивности в измеренных спектрах и интерполяцию фона линейной функции. Спектры анализировали и обрабатывали, как

описано ранее (Okotrub et al., 2018; Igonina et al., 2021). Для получения зависимости фазового состояния липидов от температуры, на каждой температуре измерялось не менее 100 спектров на случайным образом выбранных точках на ооците с временем накопления 3 сек. на спектр. При изучении пространственного распределения липидов проводились эксперименты по картированию спектров комбинационного рассеяния света. При картировании клетки сканировались лазерным пучком с шагом 0,6 мкм и временем накопления одного спектра 3 с. При  $-170^{\circ}\text{C}$  картирование проводилось с разрешением 1 мм и временем накопления 6 сек.

### 2.11. Статистика

Все выборки проверяли на нормальное распределение с помощью 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. Доля стадий созревания ооцитов, выраженная в процентах, жизнеспособность ооцитов после криоконсервации между группами без и с добавлением жирных кислот сравнивали тестом Хи-квадрат. Эти данные представлены как доля от общего числа. Доля эмбрионов на разных стадиях развития до и после замораживания сравнивали с помощью критерия Хи-квадрат. Данные по фрагментации ядер представлены как медиана и 25%-75% квартили – Me [Q1;Q3] – и проанализированы с помощью U-критерия Манна – Уитни. Число клеток в морулах и поздних морулах до и после криоконсервации, интенсивность флуоресценции липидов (подсчет фотонов), а также степени ненасыщенности липидов и  $T^*$  представлены, как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $M \pm \text{SEM}$ ). Различия по этим параметрам между группами сравнивали с помощью t-критерия Стьюдента. Различия при  $p < 0.05$  считали статистически достоверными.

## 2.12. Список использованных материалов

Среды и их компоненты для культивирования и работы с гаметами и эмбрионами:

- M199 (Merck, Германия),
- Ham's F-10 (Merck, Германия),
- CSCM-C (Continuous Single Culture Medium – Complete, FUJIFILM Irvine Scientific, США)
- KSOM EmbryoMax (Merck, Германия),
- HEPES (Biofroxx, Германия),
- пируват натрия (Biofroxx, Германия),
- лактат натрия (Fisher Chemical, Германия),
- БСА (Merck, Германия),
- БСА, свободный от жирных кислот (Merck, Германия)
- гентамицин (PanReac Applichem, США),
- бикарбонат натрия (Merck, Германия),
- хорионический гонадотропин лошади (Фоллигон; Intervet international, B.V., Нидерланды),
- хорионический гонадотропин человека (Хорулон; Intervet international, B.V., Нидерланды),
- минеральное масло FertiCult (FertiPro, Бельгия),
- фетальная телячья сыворотка (Thermo fisher scientific, США),
- линолевая кислота, стеариновая кислота (Merck, Германия),
- дейтерированная стеариновая кислота, дейтерированная олеиновая кислота (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA),
- фосфатно–солевой буфер (Росмедбио, Россия),
- 10% формалин (Биовитрум, Россия),
- сахароза (Химмед, Россия),

- пропиленгликоль (Merck, Германия)
- этиленгликоль (Applichem Panreac, Испания)
- 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Abcam, Великобритания)
- tetramethylrhodamine (TMRM) (Abcam, Великобритания)
- нильский красный (Merck, Германия)

#### Расходные материалы:

- 4-луночные планшеты (SPL, Южная Корея),
- чашки Петри, 60, 30 мм (SPL, Южная Корея),
- наконечники для автоматической пипетки, 5 мл, 1000 мкл, 200 мкл, 20 мкл (Eppendorf, Германия),
- эппендорфы, 1.5 мл (Eppendorf, Германия),
- наконечники с фильтром 0.2 мкм (Eppendorf, Германия),
- цилиндрические пробирки, 5 мл, 15мл, 50 мл (Минимед, Россия),
- стеклянные капилляры (Минимед, Россия),
- стеклянная посуда (колбы, стаканы) (Минимед, Россия).

#### Оборудование:

- счетная камера Маклера (Merck, Германия),
- автоматические дозаторы Ленпипет (Thermo Fisher Scientific, USA),
- CO<sub>2</sub>-инкубатор New Brunswick™ Galaxy 48R (Eppendorf, Германия),
- стереомикроскоп S8 APO (Leica Microsystems, Германия),
- sonicator Q700 (Qsonica, США),
- программный замораживатель CL 8800 (CryoLogic, Австралия)
- микроскоп Axio Imager M2 (Carl Zeiss, Германия)

- камера для захвата изображений AxioCam 506 mono (Carl Zeiss, Германия),
- конфокальный лазерный сканирующий микроскоп 780 NLO Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия),
- программное обеспечение Zen 2012 (Carl Zeiss),
- программное обеспечение ImageJ (НИИ, США),
- прямой микроскоп Orthoplan (Leitz, Германия),
- сканирующий пьезопозиционер PXY-200 (Newport, США),
- монохроматор SP2500i (Princeton Instruments, США),
- детектор Spec-10:2K/LN (Princeton Instruments, США),
- криостат THMS350V (Linkam, Великобритания)

## **Глава 3. Результаты**

### **3.1. Направленная модификация внутриклеточных липидов и исследование роли липидов в развитии и криоконсервации ооцитов домашней кошки**

#### **3.1.1. Поглощение дейтерированных жирных кислот ооцитами и их распределение внутри липидных гранул**

##### **3.1.1.1. Влияние изотопных меток на дозревание ооцитов *in vitro***

Перед использованием меченых дейтерием жирных кислот в качестве меток для удобного маркера на спектрах комбинационного рассеяния света проводили проверку на токсичное воздействие дСК на ооциты в процессе их дозревания *in vitro*. Дозревание ооцитов *in vitro* с добавлением 200 мкМ дСК и 200 мкМ СК в течение 23 ч не повлияло на число ооцитов, достигших стадий GV, MI, MII (Таблица 1).

Таблица 1. Дозревание ооцитов *in vitro* с добавлением стеариновой кислоты и дейтерированной стеариновой кислоты

Группа	Доля ооцитов на стадии (%):		
	GV	МI	МII
<b>Контроль (n=33)</b>	7 (21.2)	14 (42.4)	12 (36.4)
<b>СК (n=26)</b>	3 (11.5)	12 (46.2)	11 (42.3)
<b>дСК (n=26)</b>	4 (15.4)	12 (46.1)	10 (38.5)

Примечание: общее число использованных самок – 8. Ооциты распределяли между группами случайным образом. СК – группа ооцитов, полученная после воздействия стеариновой кислоты. дСК – группа ооцитов, полученная после воздействия дейтерированной стеариновой кислоты. GV – germinal vesicle (зародышевый пузырек), МI – метафаза I, МII – метафаза II.

### 3.1.1.2. Накопление дейтерированной стеариновой кислоты в липидных гранулах ооцитов при комнатной температуре

Мы оценили молярную долю дСК, проникшей в липидные гранулы ооцита ( $\eta$ дСК), как отношение интенсивности линий, соответствующим симметричным колебаниям  $CD_2$  группы на спектрах КРС, к сумме интенсивностей линий, которые соответствуют симметричным колебаниям  $CD_2$ - и  $CH_2$ - групп. Формула выглядит так:  $\eta$ дСК  $\equiv$   $I_{sCD}/(I_{sCD} + I_{sCH})$ . На рисунке 9 показана зависимость средней доли накопленной дСК ( $\langle \eta$ дСК  $\rangle$ ) в ооците от концентрации дСК (50, 100, 200, 400 мкМ), добавленной в среду для культивирования. С увеличением времени культивирования увеличивается и  $\eta$ дСК внутри ооцита. Максимальное значение  $\eta$ дСК в ооците получено после культивирования ооцитов с дСК в течение 45 ч при максимальной концентрации (400 мкМ) и равно  $\approx$  10–12%. Данная концентрация (400 мкМ)

жирных кислот выбрана для модификации липидного состава ооцитов и эмбрионов в дальнейшем исследовании.

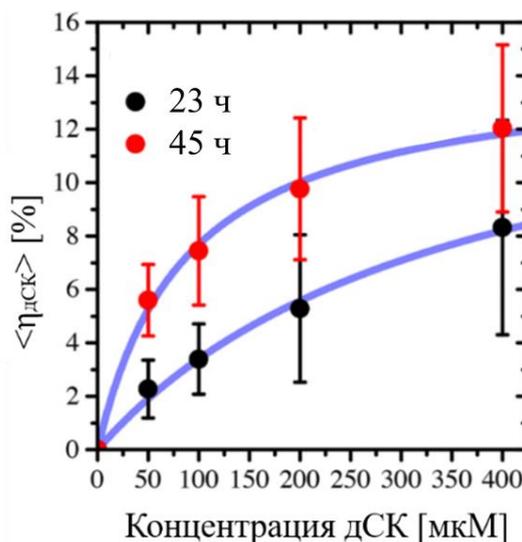


Рисунок 9. Зависимость средней доли накопленной дейтерированной стеариновой кислоты ( $\langle \eta_{\text{дСК}} \rangle$ ) в ооците от концентрации дСК (50, 100, 200, 400 мкМ), добавленной в среду для культивирования.

Примечание: синие линии описывают данные с прямоугольной гиперболой. Данные представлены как  $M \pm \text{SEM}$ . В эксперимент вошли ооциты от восьми взрослых аутбредных домашних кошек. Для каждой концентрации измеряли поглощение жирной кислоты от четырех ооцитов.

### 3.1.1.3. Распределение дейтерированной стеариновой кислоты в липидных гранулах ооцитов при комнатной температуре и при замораживании

На рисунке 10(б) изображена карта пространственного распределения дСК в липидных гранулах ооцита при комнатной температуре. Данная карта демонстрирует, что рядом расположенные гранулы содержат различные концентрации дСК, но жирная кислота распределяется равномерно внутри гранулы. Однако, при замораживании ооцитов происходит разделение фаз. На рисунке 10(в, г) изображены карты пространственного распределения

насыщенной дСК и ненасыщенной дОК внутри липидных гранул ооцита после охлаждения до  $-25^{\circ}\text{C}$ . Распределение дейтерированных жирных кислот показывает, что липиды, образованные из дСК, преимущественно локализируются на периферии липидных гранул (рис. 10(в)), в то время как липиды, сформированные из дОК, напротив, локализируются по центру гранулы (рис.10(г)). Из спектров КРС получены оценки молярных долей дСК в конформационно упорядоченной (квазикристаллической) и разупорядоченной (жидкой) фазах. Из оценок следует что молярная доля липидов с дСК в упорядоченном состоянии в два раза выше, чем в неупорядоченном (15% и 8.5% от общего содержания липидов, соответственно). В неупорядоченной фазе содержится больше ненасыщенных липидов. Молярная доля дОК в неупорядоченном состоянии выше в 1.34 раза, чем в упорядоченном (33.7% vs. 25%, соответственно).

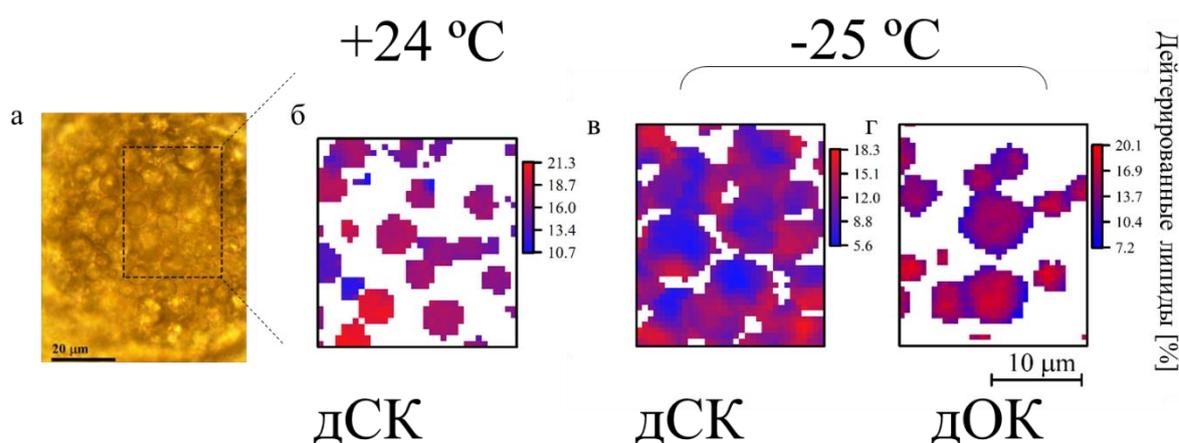


Рисунок 10. Примеры карт распределения дейтерированных жирных кислот в липидных гранулах, снятых с небольшого участка цитоплазмы ооцита (а).

Примечание: равномерное распределение дСК внутри липидных гранул ооцита при комнатной температуре (б); образование липидных фракций внутри липидных гранул при замораживании ооцита, после воздействия дСК (в) и дОК (г); белый цвет соответствует областям с низкой интенсивностью  $I_{sCD}$  и  $I_{sCH}$ , 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).

#### 3.1.1.4. Изменение фазовых переходов липидов внутри липидных гранул ооцитов в процессе их охлаждения

В процессе криоконсервации соотношение интенсивностей антисимметричных и симметричных колебаний линий  $CH_2$  групп ( $I(aCH_2)/I(sCH_2)$ ), 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°C. В случае дСК, соотношение  $I(aCH_2)/I(sCH_2)$  не является нулевым даже при оттаивании до 40°C (рис.11), 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. Изучая спектры КРС самих дейтерированных меток, можно сделать вывод, что фракция липидов, содержащих дОК, претерпевает фазовый переход в температурном интервале между  $-15$  и  $-10$  °С, что значительно ниже  $T^*$  липидов в ооците. В случае культивирования с дСК видно, что, когда ооциты только начинают замораживаться ( $+25$  °С) дСК находится в конформационно разупорядоченном состоянии, на что указывает спектральная характеристика FWHM (ширина на полувысоте пика) симметричных колебаний  $CD_2$  группы ( $sCD_2$ ), которое равно  $40$   $cm^{-1}$ . Охлаждение приводит к быстрому уменьшению FWHM  $sCD_2$ , что свидетельствует о конформационном упорядочении углеводородных цепочек и возможной кристаллизации липидов, содержащих дСК. При этом, во время отогрева до  $+40$  °С параметр FWHM  $sCD_2$  не превысил значения  $34$   $cm^{-1}$  что указывает на то, что часть, содержащих дСК насыщенных липидов остается в конформационно упорядоченном состоянии (рис. 11).

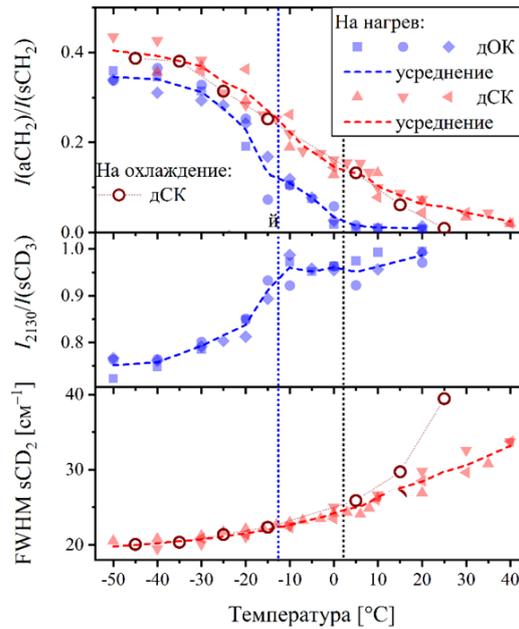


Рисунок 11. Температурные зависимости спектральных характеристик липидного вклада в спектры комбинационного рассеяния света липидов, полученные на кошачьих ооцитах, культивируемых с дСК или с дОК.

Примечание: красные пунктирные линии – линейно интерполированные усредненные данные; красные треугольники – экспериментальные данные для ооцитов, культивируемых с дСК; синие пунктирные линии – линейно интерполированные средние данные; синие символы – экспериментальные данные, измеренные при нагревании ооцитов, культивируемых с добавлением дОК; синяя вертикальная пунктирная линия – температура плавления дОК; черная вертикальная пунктирная линия –  $T^*$ , наблюдаемая в ооците с добавлением дОК;  $I(aCH_2)/I(sCH_2)$ ,  $I_{2130}/I_{sCD_3}$ ,  $FWHM_{sCD_2}$  – соотношения спектральных характеристик, используемых для измерения температуры фазового перехода протонированных липидов, и липидов с вкладом дОК или дСК, соответственно.

### 3.1.2. Влияние модификации липидного состава ооцитов на температуру фазового перехода липидов, развитие ооцитов *in vitro* и эффективность их криоконсервации

#### 3.1.2.1. Влияние линолевой и стеариновой кислот на дозревание ооцитов *in vitro*

Добавление 400 мкМ ЛК в среду IVM не повлияло на долю созревающих *in vitro* ооцитов. Не было отличий ( $p > 0.05$ ) по доле ооцитов на стадиях GV, MI и MII между исследуемыми группами (Таблица 2). Добавление 400 мкМ СК в среду IVM не повлияло ( $p > 0.05$ ) на процент созревающих *in vitro* ооцитов. Доля ооцитов на стадиях GV, MI и MII была одинаковой между исследуемыми группами (Таблица 3).

**Таблица 2.** Влияние линолевой кислоты на дозревание ооцитов *in vitro*

Группа <sup>1</sup>	Число ооцитов			
	Общее	GV (%)	MI (%)	MIИ (%)
Контроль	32	14 (43.75)	8 (25.00)	10 (31.25)
ЛК	34	8 (23.53)	7 (20.59)	16 (47.06)

Примечание: <sup>1</sup>общее число использованных самок – 16; число повторов – 5; ооциты распределяли между группами случайным образом; GV – зародышевый пузырек (germinal vesicle), MI – метафаза I, MIИ – метафаза II; ЛК – группа ооцитов, полученная после воздействия линолевой кислоты.

**Таблица 3.** Влияние стеариновой кислоты на дозревание ооцитов *in vitro*

Группа <sup>1</sup>	Число ооцитов			
	Общее	GV (%)	MI (%)	MII (%)
Контроль	37	5 (13.51)	11 (29.73)	20 (54.05)
СК	44	12 (27.27)	6 (13.64)	20 (45.45)

Примечание:<sup>1</sup>общее число использованных самок – 24; число повторов – 5; ооциты распределяли между группами случайным образом; GV – germinal vesicle (зародышевый пузырек), MI – метафаза I, MII – метафаза II; СК - группа ооцитов, полученная после воздействия стеариновой кислоты.

### 3.1.2.2. Влияние линолевой и стеариновой кислоты на степень ненасыщенности и температуру фазового перехода липидов при дозревании ооцитов *in vitro*

Для спектроскопии комбинационного рассеяния света были взяты ооциты контрольной (n=4), ЛК (n=4) и СК (n=3) групп после 24 часов дозревания *in vitro*. Установлено, что добавление в питательную среду 400 мкМ ЛК при дозревании *in vitro* ооцитов домашней кошки, не приводит к изменению степени ненасыщенности ( $1.11 \pm 0.06$ ) внутриклеточных липидов по сравнению с контролем ( $0.98 \pm 0.02$ ). При этом не выявлено изменения  $T^*$  ооцитов из ЛК группы ( $1.12 \pm 1.54$ ) по сравнению с контролем ( $-0.62 \pm 1.08$ ). Кроме того, установлено, что добавление в питательную среду 400 мкМ СК при дозревании *in vitro* ооцитов домашней кошки, не приводит к изменению степени ненасыщенности внутриклеточных липидов ( $0.92 \pm 0.04$ ) по сравнению с контролем ( $0.98 \pm 0.02$ ). При этом наблюдали достоверное ( $p < 0.01$ ) повышение  $T^*$  ооцитов после воздействия СК ( $10.12 \pm 1.78$ ) по сравнению с контролем ( $-0.62 \pm 1.08$ ) (Рисунок 12).

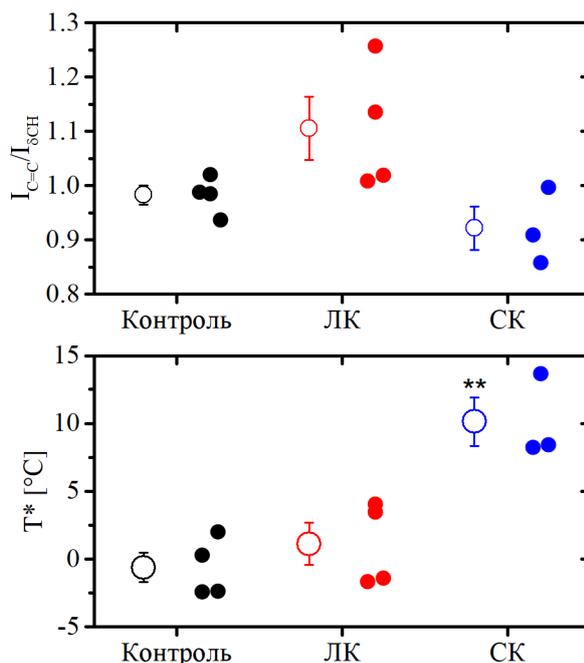


Рисунок 12. Степень ненасыщенности липидов (верхний график) и температура их фазового перехода ( $T^*$ ) (нижний график) в ооцитах домашней кошки.

Примечание: соотношение интенсивностей спектральных линий, соответствующих колебаниям C=C связей к деформационным колебаниям  $\text{CH}_2$  группы ( $I_{C=C}/I_{\delta\text{CH}}$ ), отражает степень ненасыщенности липидов; ЛК – ооциты после воздействия линолевой кислоты, СК – ооциты после воздействия стеариновой кислоты; круги с усами обозначают  $M \pm \text{SEM}$ , точки соответствуют значениям по каждому измеренному отдельному ооциту; \*\*  $p < 0.01$  по сравнению с контролем.

### 3.1.2.3. Эффективность криоконсервации ооцитов после воздействия линолевой и стеариновой кислот

Статистический анализ не выявил значительных различий по числу жизнеспособных ооцитов ( $\text{TMRM}^+$ ) между группой ЛК и контролем (Таблица 4, Рисунок 13). Кроме того, не обнаружено отличий по числу жизнеспособных ооцитов ( $\text{TMRM}^+$ ) между группой СК и контролем (Таблица 5, Рисунок 14).

**Таблица 4.** Влияние линолевой кислоты при дозревании ооцитов *in vitro* на их жизнеспособность после криоконсервации

Группа <sup>1</sup>	Число ооцитов		
	Общее	TMRM <sup>+</sup> (%)	TMRM <sup>-</sup> (%)
Контроль	32	15 (46.88)	17 (53.13)
ЛК	30	14 (46.67)	16 (53.33)

Примечание: <sup>1</sup>общее число использованных самок – 8; число повторов – 3; ооциты распределяли между группами случайным образом; TMRM<sup>+</sup> – живые ооциты, светящиеся красным после окрашивания флуоресцентным митохондриальным красителем тетраметилродамином; TMRM<sup>-</sup> – мертвые ооциты, не имеющие свечения после окрашивания флуоресцентным митохондриальным красителем тетраметилродамином; ЛК - группа ооцитов, полученная после воздействия линолевой кислоты.

**Таблица 5.** Влияние стеариновой кислоты при созревании ооцитов *in vitro* на их жизнеспособность после криоконсервации

Группа <sup>1</sup>	Число ооцитов		
	Общее	TMRM <sup>+</sup> (%)	TMRM <sup>-</sup> (%)
Контроль	31	11 (35.48)	20 (64.52)
СК	36	18 (50.00)	18 (50.00)

Примечание: <sup>1</sup>общее число использованных самок – 19; число повторов – 4; ооциты распределяли между группами случайным образом; TMRM<sup>+</sup> – живые ооциты, светящиеся красным после окрашивания флуоресцентным митохондриальным красителем тетраметилродамином; TMRM<sup>-</sup> – мертвые ооциты, не имеющие свечения после окрашивания флуоресцентным митохондриальным красителем тетраметилродамином; СК - группа ооцитов, полученная после воздействия стеариновой кислоты.



Рисунок 13. Ооциты, окрашенные тетраметилродамином (TMRM) после дозревания *in vitro* с (в, г, ж, з) и без (а, б, д, е) добавления линолевой кислоты.

Примечание: а, б, в, г – живые ооциты (светятся оранжевым) после их окрашивания TMRM; д, е, ж, з – мертвые ооциты (отсутствие свечения) после их окрашивания TMRM; изображения а, д, в, ж совмещают фильтр для TMRM и фазовый контраст; шкала – 100 мкм.

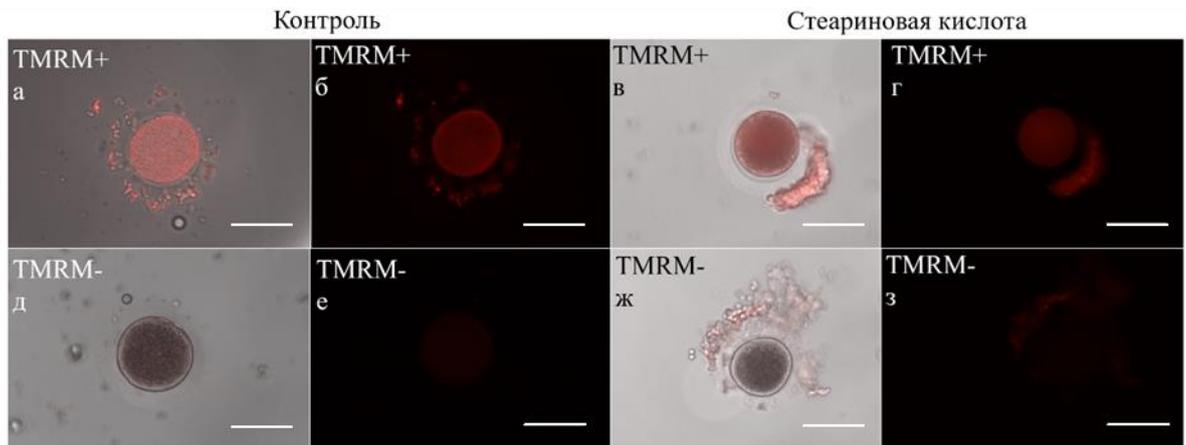


Рисунок 14. Ооциты, окрашенные тетраметилродамином (TMRM) после дозревания *in vitro* с (в, г, ж, з) и без (а, б, д, е) добавления стеариновой кислоты.

Примечание: а, б, в, г – живые ооциты (светятся оранжевым) после их окрашивания TMRM; д, е, ж, з – мертвые ооциты (отсутствие свечения) после их окрашивания TMRM; изображения а, д, в, ж совмещают фильтр для TMRM и фазовый контраст; шкала – 100 мкм.

### **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 ЛК в дозе 400 мкМ не влияло ( $p > 0.05$ ) ни на развитие эмбрионов, ни на фрагментацию их ядер (Таблица 6).

Достоверных различий между группой ЛК и контролем по числу интерфазных ядер (ИЯ) и общего числа ядер (ОЯ) через 66 ч культивирования не выявлено (Таблица 7, Рисунок 15). Кроме того, добавление в культуральную среду 400 мкМ СК также не влияло ( $p > 0.05$ ) ни на развитие эмбрионов, ни на фрагментацию их ядер (Таблица 8). Достоверных различий между группой СК и контролем по числу ядер через 66 ч культивирования не выявлено (Таблица 9, Рисунок 16).

**Таблица 6.** Общая характеристика развития эмбрионов домашней кошки *in vitro* в течение 66 ч при добавлении в культуральную среду линолевой кислоты

Параметры	Группы <sup>1</sup>	
	Контроль	ЛК
Число эмбрионов	39	43
Не развивающиеся эмбрионы (%)	1 (2.6)	4 (9.3)
Дробящиеся эмбрионы (%)	6 (15.4)	5 (11.6)
Морулы (%)	24 (61.5)	28 (65.1)
Поздние морулы (%)	8 (20.5)	6 (14.0)
Индекс фрагментации <sup>2</sup>	2.0 [0;4.2]	2.6 [0;6.1]

Примечание: <sup>1</sup>общее число использованных самок – 47; число повторов – 9; все эмбрионы были распределены между группами случайным образом; <sup>2</sup>число эмбрионов, взятых для подсчета индекса фрагментации, составило 32 и 34 для контроля и группы ЛК, соответственно. ЛК - группа эмбрионов, полученная после воздействия линолевой кислоты.

**Таблица 7.** Влияние добавления линолевой кислоты при культивировании *in vitro* на развитие эмбрионов домашней кошки до и после криоконсервации

<b>Число ядер до криоконсервации (культивирование <i>in vitro</i> – 66 ч.)</b>						
<b>Группа</b>	<b>Морулы</b>			<b>Поздние морулы</b>		
	<b>n</b>	<b>ОЯ</b>	<b>ИЯ</b>	<b>n</b>	<b>ОЯ</b>	<b>ИЯ</b>
<b>Контроль</b>	24	36.0 ± 2.2	31.7 ± 1.6	8	61.0 ± 2.9	58.5 ± 2.8
<b>ЛК</b>	28	32.3 ± 2.2	27.4 ± 1.7	6	65.8 ± 6.2	62.0 ± 5.2
<b>Число ядер после криоконсервации (культивирование <i>in vitro</i> – 96 ч)</b>						
<b>Контроль</b>	21	36.8 ± 2.9	33.9 ± 2.6	11	68.5 ± 5.3	62.6 ± 5.4
<b>ЛК</b>	21	27.7 ± 2.7*	25.7 ± 1.7*	16	97.0 ± 11	91.8 ± 10.7*

Примечание: \*  $p < 0.05$  по сравнению с контролем. n – число эмбрионов, ИЯ – число интерфазных ядер, ОЯ – общее число ядер. ЛК - группа эмбрионов, полученная после воздействия линолевой кислоты.

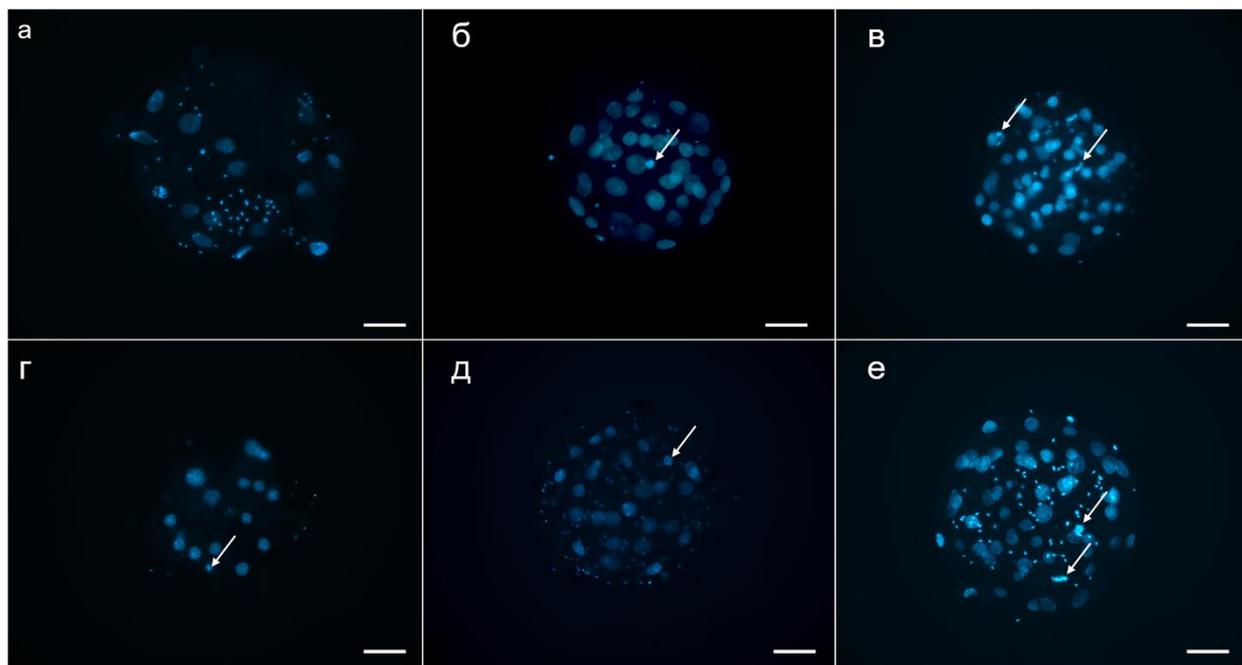


Рисунок 15. Стадии развития эмбрионов после культивирования *in vitro* в течение 66 ч без добавок (а, б, в) и с добавлением в культуральную среду линолевой кислоты (г, д, е).

Примечание: стадии дробления (а, г), морулы (б, д), поздние морулы (в, д); окрашивание 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI); белые стрелки – фрагментированные ядра; на изображениях видны многочисленные ядра сперматозоидов, особенно на «а» и «е»; масштаб – 50 мкм.

**Таблица 8.** Общая характеристика развития эмбрионов домашней кошки *in vitro* в течение 66 ч при добавлении в культуральную среду стеариновой кислоты

Параметры	Группы <sup>1</sup>	
	Контроль	СК
Число эмбрионов	17	19
Не развивающиеся эмбрионы (%)	0 (0)	1 (5.3)
Дробящиеся эмбрионы (%)	1 (5.9)	0 (0)
Морулы (%)	13 (76.5)	15 (78.9)
Поздние морулы (%)	3 (17.6)	3 (15.8)
Индекс фрагментации <sup>2</sup>	5.6 ± 1.3	6.9 ± 1.5

Примечание: <sup>1</sup>общее число использованных самок – 49; число повторов – 5; все эмбрионы были распределены между группами случайным образом; <sup>2</sup>число эмбрионов, взятых для подсчета индекса фрагментации, составило 16 и 18 для контроля и группы СК, соответственно; СК - группа эмбрионов, полученная после воздействия стеариновой кислоты.

**Таблица 9.** Влияние добавления стеариновой кислоты при культивировании *in vitro* на развитие эмбрионов кошки до и после криоконсервации

<b>Число ядер до криоконсервации (культивирование <i>in vitro</i> – 66 ч)</b>						
<b>Группа</b>	<b>Морулы</b>			<b>Поздние морулы</b>		
	<b>n</b>	<b>ОЯ</b>	<b>ИЯ</b>	<b>n</b>	<b>ОЯ</b>	<b>ИЯ</b>
<b>Контроль</b>	13	38.2 ± 2.4	35.0 ± 2.5	3	62.0 ± 3.5	56.7 ± 3.8
<b>СК</b>	15	36.1 ± 2.2	33.1 ± 2.3	3	66.0 ± 6.0	59.7 ± 3.3
<b>Число ядер после криоконсервации (культивирование <i>in vitro</i> – 96 ч)</b>						
<b>Контроль</b>	4	38.8 ± 4.1	22.3 ± 9.05	13	80.6 ± 3.5	58.9 ± 5.1
<b>СК</b>	8	36.5 ± 4.0	2.5 ± 1.4*	4	54.3 ± 0.8**	3.5 ± 1.3***

Примечание: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  по сравнению с контролем; ИЯ – число интерфазных ядер, ОЯ – общее число ядер; СК - группа эмбрионов, полученная после воздействия стеариновой кислоты; n – число эмбрионов.

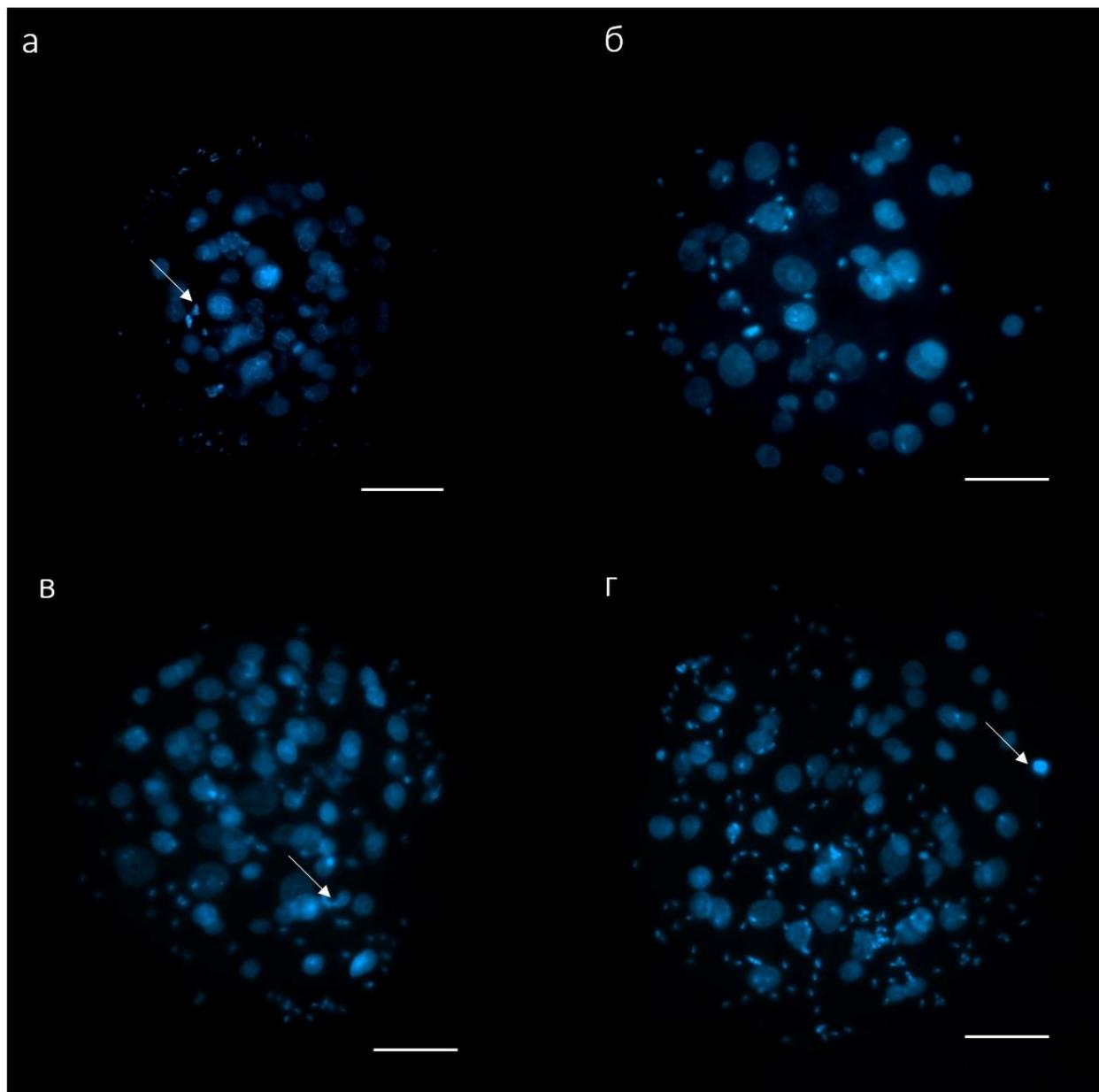


Рисунок 16. Стадии развития эмбрионов после культивирования *in vitro* в течение 66 ч без добавок (а, в) и с добавлением стеариновой кислоты (б, г).

Примечание: морулы (а, б), поздние морулы (в, г); окрашивание 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI); белые стрелки – фрагментированные ядра; на изображениях видны многочисленные ядра сперматозоидов, особенно на «б», «в» и «г»; масштаб – 50 мкм.

### 3.2.1.2. Влияние линолевой и стеариновой кислоты на степень ненасыщенности и температуру фазового перехода липидов при культивировании эмбрионов *in vitro*

Среднее отношение интенсивностей  $I_{C=C}/I_{\delta CH} = 0.96 \pm 0.03$  для эмбрионов, культивируемых без ЛК, а  $T^* = +1.6 \pm 0.8$  °С представлено на рисунке 17. Добавление 400 мкМ ЛК в культуральную среду вызывало достоверное увеличение ( $p < 0.05$ ) степени ненасыщенности ( $I_{C=C}/I_{\delta CH} = 1.08 \pm 0.02$ ), а также приводило к достоверному снижению ( $p < 0.01$ )  $T^*$  на 5 градусов до  $T^* = -3.6 \pm 1.2$  °С. Таким образом, воздействие ЛК на эмбрион значительно повышало степень ненасыщенности липидов и снижало  $T^*$ . Добавление 400 мкМ СК в культуральную среду вызывало достоверное снижение ( $p < 0.05$ ) степени ненасыщенности ( $I_{C=C}/I_{\delta CH} = 0.74 \pm 0.07$ ), а также приводило к достоверному повышению ( $p < 0.001$ )  $T^*$  более чем на 20 градусов,  $T^* > +25$  °С. Таким образом, воздействие СК на эмбрион значительно снижало степень ненасыщенности липидов и повышало  $T^*$ .

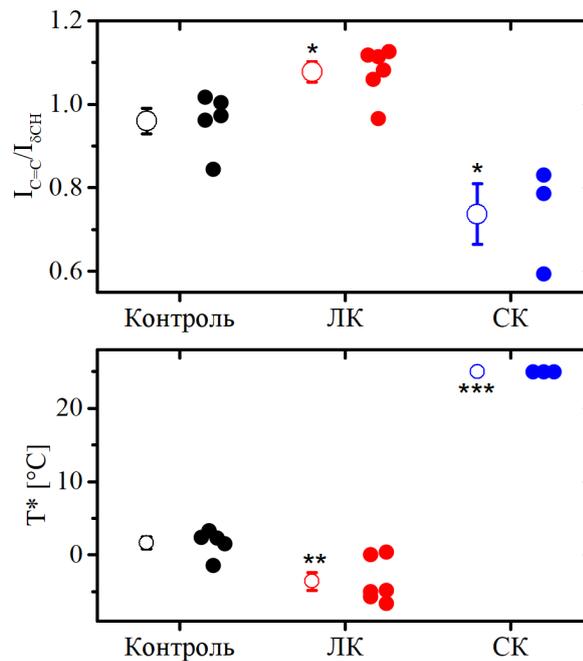


Рисунок 17. Степень ненасыщенности липидов (верхний график) и температура их фазового перехода ( $T^*$ ) (нижний график) в эмбрионах домашней кошки.

Примечание: соотношение интенсивностей линий, соответствующим колебаниям С=С связей к деформационным колебаниям  $CH_2$  группы ( $I_{C=C}/I_{\delta CH}$ ), отражает степень ненасыщенности липидов; ЛК – эмбрионы после воздействия линолевой кислоты; СК – эмбрионы после воздействия стеариновой кислоты; круги с усами обозначают  $M \pm SEM$ , точки соответствуют каждому измеренному эмбриону; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  по сравнению с контролем.

### 3.2.1.3. Оценка общего содержания внутриклеточных липидов в преимплантационных эмбрионах домашней кошки

Добавление в среду 400 мкМ ЛК и культивирование в течение 66 ч не влияло ( $p > 0.05$ ) на общее количество внутриклеточных липидов в эмбрионах кошек. Оценку общего содержания липидов в эмбрионах проводили от 4-5 самок на 8 и 13 эмбрионах, соответственно. Интенсивность флуоресценции,

измеренная по числу фотонов, в контроле у эмбрионов, культивированных без добавления кислоты ( $18.08 \cdot 10^6 \pm 1.38 \cdot 10^6$ ), и в группе ЛК ( $16.92 \cdot 10^6 \pm 0.97 \cdot 10^6$ ) достоверно не отличалась (Рисунок 18). Добавление в среду 400 мкМ СК и культивирование в течение 66 ч. не влияло ( $p > 0.05$ ) на общее количество липидов в эмбрионах кошек. Оценку общего содержания липидов в эмбрионах проводили от четырех самок на 11 и 13 эмбрионах, соответственно. Интенсивность флуоресценции, измеренная по числу фотонов, в контроле у эмбрионов, культивированных без добавления кислоты ( $6.4 \cdot 10^6$  [ $5.5 \cdot 10^6$ ;  $7.3 \cdot 10^6$ ]), и в группе СК ( $5.6 \cdot 10^6$  [ $5.2 \cdot 10^6$ ;  $6.1 \cdot 10^6$ ]) не отличалась.

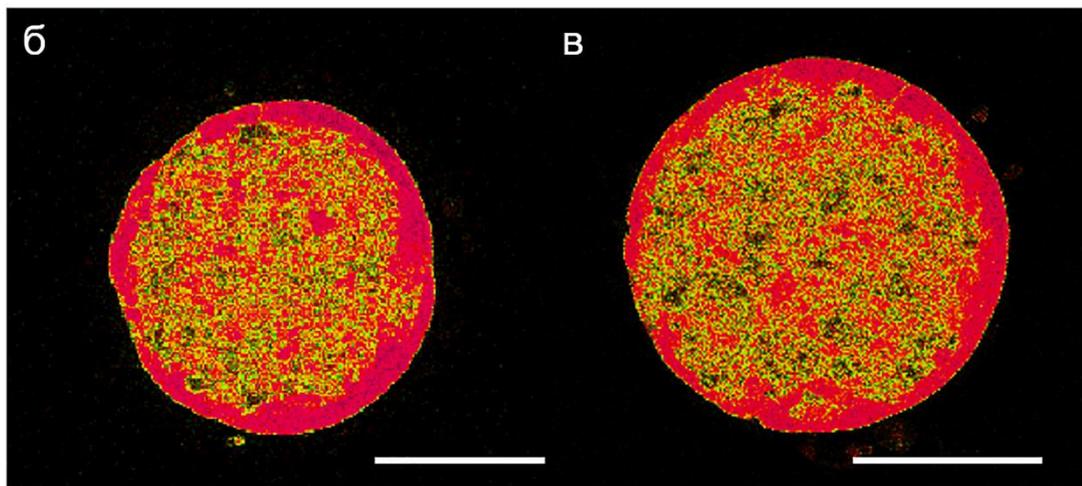
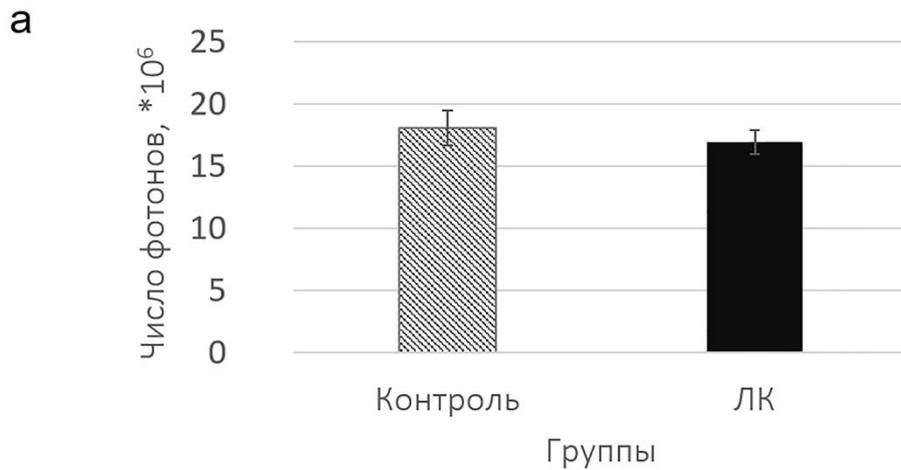


Рисунок 18. Интенсивность флуоресценции нильского красного после 66 часов культивирования *in vitro* эмбрионов без добавок и с добавлением линолевой кислотой.

Примечание: а – средняя интенсивность фотонов ( $M \pm SEM$ ); б, в – репрезентативные оптические срезы эмбрионов кошек, окрашенных нильским красным; изображения получены на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе, (б – контроль; в – после воздействия линолевой кислоты); цвет соответствует длинам доминирующих волн окрашенных липидов; нейтральные липиды (триглицериды) окрашены зеленым и желтым цветом, полярные липиды (фосфолипиды) – красным; масштаб – 50 мкм.

#### **3.2.1.4. Жизнеспособность эмбрионов с модифицированным липидным составом после криоконсервации**

Добавление 400 мкМ ЛК в культуральную среду не влияло ( $p > 0.05$ ) на долю эмбрионов, находящихся на разных стадиях развития, после оттаивания с последующим культивированием *in vitro* в течение 30 ч (Таблица 10). В полученных таким образом морулах общее число ядер было меньше ( $p < 0.05$ ), а также было меньше интерфазных ядер ( $p < 0.05$ ) после воздействия ЛК при культивировании *in vitro* по сравнению с контролем (Таблица 7). В поздних же морулах группы ЛК, напротив, обнаружено большее число интерфазных ядер ( $p < 0.05$ ) по сравнению с контролем (Таблица 7, Рисунок 19). Индекс фрагментации не отличался ( $p > 0.05$ ) между группами после криоконсервации (Таблица 10).

Добавление 400 мкМ СК значительно повлияло на долю эмбрионов, находящихся на разных стадиях развития, после оттаивания с последующим культивированием *in vitro* в течение 30 ч (Таблица 11). Доля морул, культивируемых с СК был достоверно больше ( $p < 0.05$ ) по сравнению с контролем после оттаивания, в то время как число поздних морул в этой группе было достоверно меньше ( $p < 0.05$ ) (Таблица 11). В полученных морулах общее число ядер не отличалось ( $p > 0.05$ ) между группами, однако число интерфазных ядер в группе СК было значительно меньше ( $p < 0.05$ ) по сравнению с контролем (Таблица 9). В поздних морулах СК группы общее число ядер ( $p < 0.01$ ) и число интерфазных ядер ( $p < 0.001$ ) было меньше по сравнению с контролем (Таблица 9, Рисунок 20). Кроме того, в эмбрионах группы СК наблюдалась практически 100% фрагментация ядер, и индекс фрагментации был достоверно больше ( $p < 0.001$ ) в этой группе по сравнению с контролем (Таблица 11).

**Таблица 10.** Общая характеристика развития эмбрионов домашней кошки *in vitro* в течение 96 ч при добавлении в культуральную среду линолевой кислоты и после криоконсервации

Параметры	Группы <sup>1</sup>	
	Контроль	ЛК
Число эмбрионов	36	43
Не развивающиеся эмбрионы (%)	3 (8.3)	4 (9.3)
Дробящиеся эмбрионы (%)	1 (2.8)	2 (4.7)
Морулы (%)	21 (58.3)	21 (48.8)
Поздние морулы (%)	11 (30.6)	16 (37.2)
Индекс фрагментации (Me [Q1;Q3]) <sup>2</sup>	6.0 [3.1;11.7]	4.5 [2.0;7.7]

Примечание: <sup>1</sup>общее число использованных самок – 47; число повторов – 9; все эмбрионы были распределены между группами случайным образом; <sup>2</sup>число эмбрионов, взятых для подсчета индекса фрагментации, составило 32 и 37 для контроля и ЛК, соответственно; ЛК - группа эмбрионов, полученная после воздействия линолевой кислоты.

**Таблица 11.** Общая характеристика развития эмбрионов домашней кошки *in vitro* в течение 96 ч при добавлении в культуральную среду стеариновой кислоты и после криоконсервации

Параметры	Группы <sup>1</sup>	
	Контроль	СК
Число эмбрионов	18	13
Не развивающиеся эмбрионы (%)	1 (5.6)	0 (0)
Дробящиеся эмбрионы (%)	0 (0)	1 (7.7)
Морулы (%)	4 (22.2)	8 (61.5)*
Поздние морулы (%)	13 (72)	4 (30.7)*
Индекс фрагментации (Me [Q1;Q3]) <sup>2</sup>	23.8 [12;42.9]	97.7 [90.6;100]***

Примечание: <sup>1</sup>общее число использованных самок – 49; число повторов – 5; все эмбрионы были распределены между группами случайным образом; <sup>2</sup>число эмбрионов, взятых для подсчета индекса фрагментации, составило 17 и 12 для контроля и СК, соответственно; \*  $p < 0.05$  по сравнению с контролем; \*\*\*  $p < 0.001$  по сравнению с контролем; СК - группа эмбрионов, полученная после воздействия стеариновой кислоты.

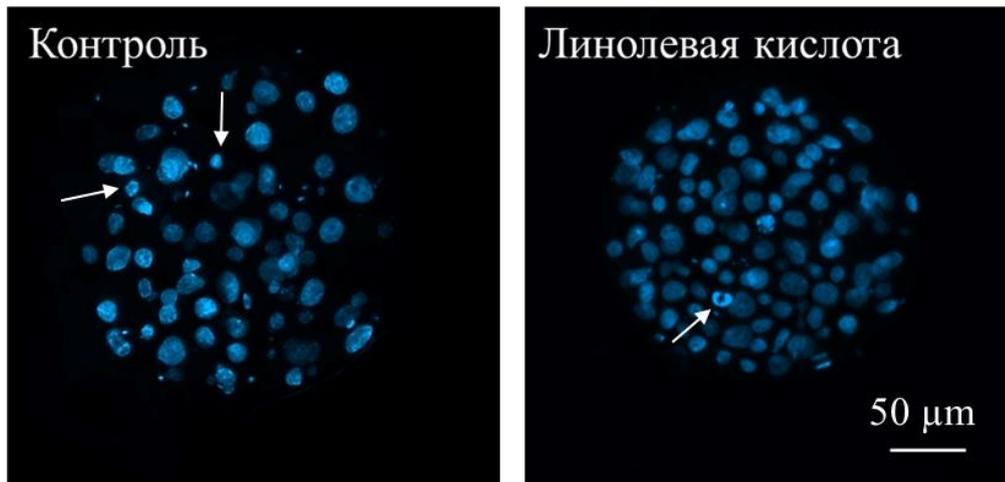


Рисунок 19. Развитие поздних морул после криоконсервации и культивирования *in vitro* в течение 30 ч: контроль (а) и с добавлением линолевой кислоты (б).

Примечание: белые стрелки – фрагментированные ядра; масштаб – 50 мкм.

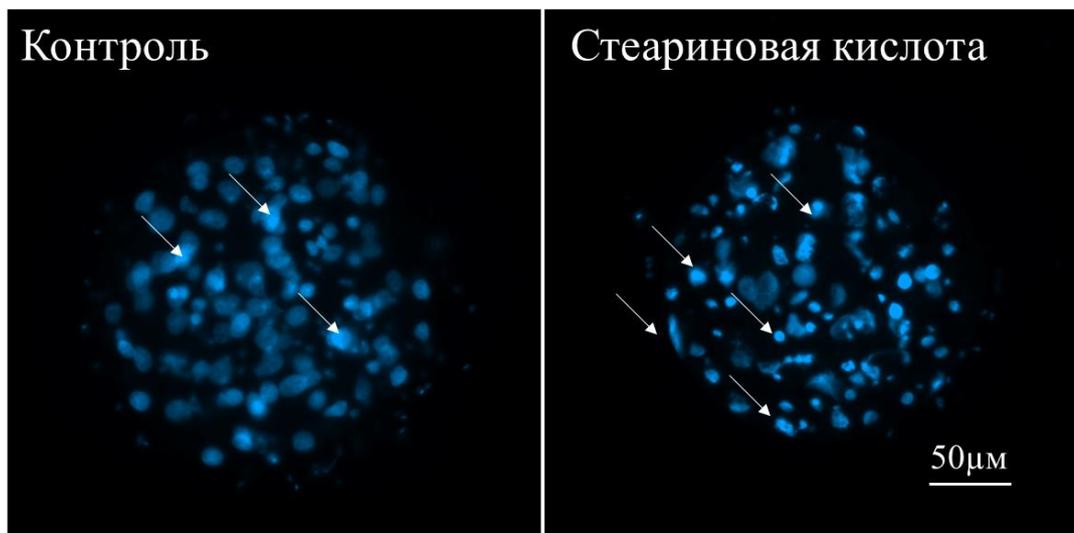


Рисунок 20. Развитие поздних морул после криоконсервации и культивирования *in vitro* в течение 30 ч: контроль (а) и с добавлением стеариновой кислоты (б).

Примечание: белые стрелки – фрагментированные ядра; масштаб – 50 мкм.

## Глава 4. Обсуждение

### 4.1. Роль липидного состава ооцитов домашней кошки в их развитии *in vitro* до и после криоконсервации

#### 4.1.1. Распределение жирных кислот внутри липидных гранул ооцитов домашней кошки при комнатной температуре

Раннее развитие млекопитающих, в частности созревание гамет и дробление преимплантационных эмбрионов, является важной частью онтогенеза живых организмов. Липидные гранулы, как составные компоненты клеток, на раннем развитии принимают важную роль, так как являются энергетическим депо и содержат строительные блоки для биологических мембран (Farese, Walther, 2009; Welte, Gould, 2017). Изучение состава липидных гранул и его модификация имеет большое значение для поддержания генетического разнообразия особенно тех видов млекопитающих, ооциты и преимплантационные эмбрионы которых богаты внутриклеточными липидами, а значит в целом для зоологии.

Для изучения липидных гранул в ооцитах домашней кошки мы применяли различные методы микроскопии, а также метод спектроскопии комбинационного рассеяния света. В нашей работе не выявлено существенных различий по стадиям созревания между ооцитами, которые культивировали без жирных кислот либо с добавлением СК или дСК (глава 3, таблица 2). Этот результат указывает на то, что дейтерированные метки, в частности дСК, при добавлении в культуральную среду, не оказывают токсического воздействия на развитие ооцитов домашних кошек. Таким образом, дСК можно применять как витальную изотопную метку в Рамановской спектроскопии для получения новой информации о распределении жирных кислот в клетках. Подобный подход с использованием спектроскопии КРС дейтерированных аминокислот применяли для изучения белкового метаболизма на клетках HeLa (Wei et al.,

2015). Однако, следует отметить, что по отношению к изучению ооцитов млекопитающих этот подход применен впервые. С использованием спектроскопии КРС мы проводили оценку эффективности проникновения дейтерированных жирных кислот, в частности дСК, в липидные гранулы ооцитов домашней кошки. На вторые сутки культивирования доля проникших в липидные гранулы жирных кислот становится больше, однако скорость проникновения снижается по сравнению с первым днем культивирования (глава 3, рисунок 9). Возможно, менее эффективное поглощение жирных кислот ооцитами после двух дней культивирования связано с ограничением мембранного транспорта, а именно с дефицитом рецептора CD36 – транслоказы жирных кислот на клеточной мембране. Известно, что экспрессия CD36 в сердце и скелетных мышцах регулируется с помощью ядерных рецепторов, активируемых пероксисомным пролифератором (Peroxisome proliferator-activated receptor) (Glatz, Luiken, 2018). Аналогичный механизм регуляции можно предположить и для ооцитов. Синтез РНК в ооците продолжается до 2 ч перед стадией распада зародышевых пузырьков (Rodman, Bachvarova, 1976), т. е. прекращается в течение первых суток культивирования *in vitro*. Это приводит к снижению синтеза белка во время мейотического созревания ооцитов (Schultz et al., 1978), поэтому можно предположить, что одной из причин менее эффективного накопления дСК в ооцитах на вторые сутки культивирования *in vitro* является неспособность созревших ооцитов синтезировать достаточное количество белков для поглощения жирных кислот и усиления липидного обмена. При использовании 400 мкМ дСК наблюдается большее накопление жирных кислот внутри липидных гранул в ооцитах, чем при меньших дозировках дСК (глава 3, рисунок 9).

Данные спектроскопии КРС свидетельствуют о том, что дСК включается во все липидные гранулы в ооцитах домашней кошки (предположительно в основном как компоненты триацилглицеринов). Такое распределение дСК на полученных рамановских картах (глава 3, рисунок 10б)

согласуется с гипотезой о синтезе триацилглицеринов на поверхности липидных гранул животных клеток (Wilfling et al., 2013). Нельзя также исключать, что дСК может накапливаться при слиянии гранул с новыми липидными гранулами, образующимися из эндоплазматического ретикулума. Установлено, что триацилглицерины, содержащие дСК, равномерно распределены внутри липидных гранул, в то время как концентрация липидов, содержащих дСК, различна между липидными гранулами (глава 3, рисунок 10б). Такое распределение липидов, содержащих дСК, между липидными гранулами является отражением неэквивалентности различных липидных гранул в ооцитах. Липидные гранулы в различных животных клетках могут различаться по поверхностным белкам, полярным липидам и поверхностному натяжению (Thiam et al., 2013). Разброс концентрации новых липидов может повлиять на эксперименты по модификации липидного состава с целью повышения криотолерантности ооцитов.

Спектры комбинационного рассеяния света жирных кислот чувствительны к фазовому состоянию липидов, поэтому жирные кислоты, меченные дейтерием, могут предоставить информацию о специфическом перераспределении липидов в липидных гранулах при криоконсервации.

#### **4.1.2. Распределение жирных кислот внутри липидных гранул ооцитов домашней кошки при замораживании**

Температура фазового перехода липидов меняется в зависимости от типа добавляемых в культуру жирных кислот (насыщенной дСК либо ненасыщенной дОК). В ооцитах, которые культивировали с добавлением дСК, в процессе охлаждения начало фазового перехода липидов происходит при температуре от 15 до 25°C (глава 3, рисунок 11). Дальнейшее охлаждение приводит к сосуществованию двух фаз с конформационно упорядоченными и неупорядоченными липидами. Снижение температуры постепенно увеличивает долю липидов в упорядоченном состоянии с образованием

доменов размером в пару микрон. Насыщенные липиды в основном находятся в упорядоченной фазе и распределяются на периферии липидных гранул (глава 3, рисунок 10в). Гипотетически избыточное распределение упорядоченной фазы вблизи поверхности липидных гранул может влиять на фазовое состояние и функциональные свойства поверхностного монослоя (Giraud et al., 2000). После охлаждения и при последующем нагревании некоторая часть насыщенных липидов внутри липидных гранул ооцитов остается в упорядоченном состоянии при температурах, превышающих 40°C (глава 3, рисунок 11), что выше даже оптимальной физиологической температуры для кошачьих ооцитов и эмбрионов (Herrick et al., 2019).

Можно предположить, что липиды должны находиться в неупорядоченном фазовом состоянии для участия в биологических процессах, упорядоченное состояние липидов при физиологических условиях может нарушать клеточные процессы. Это может быть одним из источников криотравм, связанных с липидными гранулами. Однако, при исследовании эмбрионов домашней кошки с 66-часовым культивированием в присутствии СК наблюдаются признаки частичной кристаллизации липидов (глава 3, рисунок 17), что указывает на то, что само по себе наличие липидов в упорядоченном конформационном состоянии не влияет на скорость развития эмбрионов (глава 3, таблица 9 и 10).

В ооцитах липиды, содержащие минимальное количество дОК, имеют  $T^*$  в интервале 0 – 5 °С, в то время как липиды, содержащие максимальное количество дОК, переходят в конформационно упорядоченное состояние при температурах между -15 и -10 °С (глава 3, рисунок 11). Наблюдаемое расхождение в температурах является экспериментальным подтверждением того, что фракции липидов с разной степенью ненасыщенности претерпевают фазовый переход на разных температурах и, соответственно, на разных этапах замораживания клеток. В случае ооцитов, которые культивировали с добавлением ненасыщенной дОК,  $T^*$  начинается между 0 и 5°C (глава 3,

рисунок 11). Это наблюдение иллюстрирует множественность и сложность фазовых переходов липидов в липидных гранулах, в которых состав упорядоченной и неупорядоченной фаз меняется с изменением температуры. В отличие от насыщенных липидов, ненасыщенные липиды более распространены в неупорядоченных фазах и располагаются в центре липидных гранул.

Использование дейтерированных меток значительно упростило наблюдение за распределением липидов внутри липидных гранул при комнатной температуре и при замораживании. Исходя из полученных данных о влиянии ненасыщенных и насыщенных жирных кислот на температуру фазового перехода и расположение липидов внутри липидных гранул при криоконсервации, мы модифицировали состав ооцитов и эмбрионов при помощи линолевой и стеариновой кислот и оценили их влияние на развитии клеток *in vitro* и эффективность их криоконсервации.

#### **4.1.3. Влияние линолевой и стеариновой кислот на созревание ооцитов домашней кошки *in vitro***

В результате проведенной работы было показано, что ЛК в дозе 400 мкМ не влияет на дозревание *in vitro* ооцитов домашней кошки (глава 3, таблица 3). Ранее в исследованиях на разных представителях млекопитающих оценивали влияние ЛК или конъюгированных изомеров ЛК на дозревание ооцитов *in vitro*. Результат зависел от вида животного и применяемой дозы (Absalon-Medina et al., 2014; Amini et al., 2016; Marei et al., 2010). В частности, воздействие конъюгированных изомеров ЛК в различных дозировках (50 мкМ, 100 мкМ, 200 мкМ) не повлияло на созревание ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* и на процент дробящихся эмбрионов и бластоцист после партеногенетической активации этих ооцитов (Absalon-Medina et al., 2014). Однако, в исследовании на ооцитах овец показано, что добавление ЛК в среду для созревания ооцитов имеет негативный эффект, а именно снижает процент

КОК с полностью экспандированным кумлюсом, а также снижает число зрелых ооцитов и скорость дробления, полученных из них эмбрионов. Причем с повышением дозировки эффект усиливается (Amini et al., 2016). Негативное влияние ЛК авторы связывают с увеличением экспрессии гена Вах (белок, ассоциированный с Bcl-2), который связан с активацией апоптоза, в бластоцистах, полученных в результате IVF ооцитов, которые созревали в среде с добавлением 200 мкМ ЛК (Amini et al., 2016). Сообщается, что добавление ЛК в высокой дозировке (>100 мкМ) в среду для дозревания *in vitro* ооцитов крупного рогатого скота способно изменять молекулярные механизмы при их дозревании, что снижает процент достижения ооцитами стадии МII и подавляет раннее эмбриональное развитие (Marei et al., 2010). В целом складывается картина, что ЛК/изомеры ЛК либо не влияют на развитие, либо приводят к негативным последствиям (в высоких концентрациях >100 мкМ) при развитии ооцитов парнокопытных животных. Однако в настоящей работе относительно большая дозировка ЛК (400 мкМ) не оказала существенного влияния на дозревание *in vitro* ооцитов домашней кошки. Данные различия могут быть объяснены различным составом внутриклеточных липидов, а также степенью их ненасыщенности, которая у кошачьих ооцитов более высокая по сравнению с другими видами млекопитающих с богатым содержанием липидов в ооцитах, в частности, в сравнении со свиньями, овцами и крупным рогатым скотом (см. обзор Amstislavsky et al., 2019).

Настоящее исследование показало, что ЛК не вызывает изменения степени ненасыщенности внутриклеточных липидов ооцитов домашней кошки в дозировке 400 мкМ (глава 3, рисунок 12). Однако, как показано в диссертационном исследовании (глава 3, рисунок 9) 24-48-часовой экспозиции дСК может быть достаточно для поглощения ее ооцитами. Отсутствие влияния ЛК на уровень ненасыщенности внутриклеточных липидов в ооцитах, наблюдаемое в данной работе, можно объяснить слишком

коротким временем воздействия ЛК на ооциты, а также различиями в поглощении СК и ЛК ооцитами домашней кошки. Ранее было продемонстрировано, что время воздействия важно для проявления эффектов конъюгированных изомеров ЛК: чем больше время воздействия, тем сильнее влияние жирных кислот на развитие ооцитов и эмбрионов крупного рогатого скота (Dias et al., 2020).

При помощи спектроскопии комбинационного рассеяния света можно определить, как степень ненасыщенности внутриклеточных липидов, так и  $T^*$  липидов в ооцитах и эмбрионах разных видов млекопитающих при их охлаждении (Okotrub et al., 2017 and 2018). Температура фазового перехода липидов в ооцитах домашней кошки, которые культивировали с добавлением ЛК не изменилась по сравнению с контролем (глава 3, рисунок 12). Более того, что воздействие ЛК во время дозревания *in vitro* ооцитов домашних кошек не повлияло на их жизнеспособность после процедур замораживания-оттаивания (глава 3, таблица 5, рисунок 13). Причиной того, что воздействие ЛК не привело к изменению степени ненасыщенности внутриклеточных липидов и  $T^*$  в изучаемых клетках может быть слишком малая продолжительность этого воздействия.

Добавление СК в среду для дозревания ооцитов *in vitro*, так же как в случае с ЛК не повлияло на развитие ооцитов (глава 3, таблица 3). Между тем, негативный эффект воздействия СК описан в ряде работ на ооцитах различных видов млекопитающих (Leroy et al., 2007; Aardema et al., 2011; Van Hoesck et al., 2011 and 2013). Отсутствие негативного эффекта после воздействия СК на ооциты кошки, по всей видимости, может быть связано с защитным эффектом кумулюсных клеток, которые окружают ооциты на этапе их дозревания (Aardema et al., 2017). Это объясняется высокой экспрессией в кумулюсных клетках стеароил-КоА-десатуразы, которая катализирует превращение насыщенных жирных кислот в ненасыщенные (Aardema et al., 2017). После дозревания ооцитов *in vitro* в течение 24 ч с насыщенной СК наблюдали

достоверное увеличение  $T^*$  (глава 3, рисунок 12). По-видимому, того количества СК, которое успело проникнуть в ооциты было достаточно для повышения  $T^*$ . Между тем, несмотря на то, что после дозревания *in vitro* ооцитов с добавлением насыщенной СК  $T^*$  значительно повысилась (на 10 градусов), эффективность криоконсервации ооцитов не изменилась по сравнению с контрольной группой (глава 3, таблица 6, рисунок 14). 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 (Okotrub et al., 2018), происходит компенсация увеличения  $T^*$ , и клетка справляется с негативным эффектом насыщенных жирных кислот.

#### **4.2. Роль липидного состава преимплантационных эмбрионов домашней кошки в их развитии *in vitro* до и после криоконсервации**

##### **4.2.1. Влияние линолевой кислоты на преимплантационные эмбрионы домашней кошки**

Линолевая кислота при ее добавлении в культуру *in vitro* в дозе 400 мкМ не повлияла на развитие преимплантационных эмбрионов домашних кошек (глава 3, таблица 7 и 8, рисунок 15). При подобной модификации липидного состава преимплантационных эмбрионов других видов животных, в частности крупного рогатого скота, влияние ЛК появляется лишь с увеличением концентрации. Причем с увеличением концентрации ЛК сначала увеличивается скорость развития эмбрионов, но при достижении слишком высоких значений концентрации развитие эмбрионов ухудшается (Nochi et al., 1999). В других работах после воздействия *in vitro* конъюгированных изомеров ЛК в дозе 100 мкМ эмбрионы крупного рогатого скота развивались быстрее, однако, этот эффект нивелировался с увеличением времени воздействия (Dias et al., 2020). Лапа с соавторами (2011) показали, что добавление КЛК в среду

улучшает способность ооцитов крупного рогатого скота развиваться в эмбрионы высокого качества (Lara et al., 2011). В нашем исследовании, возможно в силу видовой специфики, ЛК не являлась важным фактором, влияющим на ранний пренатальный онтогенез у домашних кошек, и этим можно объяснить отсутствие эффекта ЛК в данной дозе на развитие эмбрионов.

В настоящем исследовании уровень ненасыщенности внутриклеточных липидов повышался у эмбрионов кошек, полученных при помощи ЭКО, в течение 66 ч. культивирования *in vitro* с ЛК (глава 3, рисунок 17). Это наблюдение может свидетельствовать о том, что ЛК активно проникала в эмбриональные клетки в течение этого времени воздействия. Полученные данные хорошо согласуются с результатами более раннего исследования, выполненного в нашей группе, в котором сообщали об аналогичном повышении уровня ненасыщенности внутриклеточных липидов эмбрионов мышей после воздействия ЛК *in vitro* (Igonina et al., 2021). Следует отметить, что в отличие от работы Игониной с соавторами (2021), в которой наряду с увеличением степени ненасыщенности, было отмечено повышение общего количества внутриклеточных липидов в клетках эмбрионов мышей после воздействия на них ЛК *in vitro*, в нашей работе общее количество внутриклеточных липидов в эмбрионах домашней кошки не менялось (глава 3, рисунок 18). Отсутствие изменения общего количества внутриклеточных липидов в эмбрионах домашней кошки после воздействия ЛК, можно объяснить тем, что непрозрачность эмбрионов, связанная с интенсивным рассеянием света на липидных гранулах, затрудняет объемную интеграцию флуоресцентного сигнала для них при помощи красителя нильский красный, в отличие от гораздо более прозрачных эмбрионов мышей. Поэтому применение данной методики для определения общего количества липидов в эмбрионах кошачьих может быть затруднительно.

Фазовый переход липидов происходит в клетках при их достаточно медленном охлаждении. Существует гипотеза, что чем ниже  $T^*$ , тем более ооциты и эмбрионы криотолерантны, и тем выше их жизнеспособность после криоконсервации (Zeron et al., 2002; Amstislavsky et al., 2019). Полученный в нашей работе сдвиг  $T^*$ , который определялся, как отношение интенсивностей линий  $I_{aCH}$  и  $I_{sCH}$ , был аналогичен ранее описанному для ооцитов и эмбрионов кошек (Okotrub et al., 2018; Mokrousova et al., 2020a). Сдвиг температурной зависимости в сторону более низких температур наблюдался в эмбрионах домашней кошки, подвергавшихся воздействию ЛК (глава 3, рисунок 17). После 66-часового культивирования *in vitro* эмбрионов с 400 мкМ ЛК при помощи спектроскопии комбинационного рассеяния света выявлено снижение  $T^*$  примерно на 5 °С по сравнению с контролем, что может быть связано с повышением степени ненасыщенности внутриклеточных липидов. Такое предположение согласуется с работой Игониной с соавторами (2011), проведенной на эмбрионах мышей (Igonina et al., 2021).

Понижение  $T^*$  в эмбрионах кошек после воздействия ЛК во время культивирования *in vitro* привело к повышению эффективности криоконсервации эмбрионов, что было оценено по увеличенному числу клеток в развивающихся поздних морулах (глава 3, таблица 8, рисунок 19). Индекс ядерных фрагментаций в эмбрионах из ЛК группы после криоконсервации значительно не отличался от контроля. Таким образом, гипотеза о влиянии степени ненасыщенности и  $T^*$  на эффективность криоконсервации в данном случае подтвердилась. Похожие положительные эффекты ЛК или изомеров ЛК на развитие эмбрионов после криоконсервации были показаны на крупном рогатом скоте (Pereira, Marques, 2008; Accorsi et al., 2016; Dias et al., 2020). В частности, эмбрионы после воздействия ЛК и последующей криоконсервации восстанавливались быстрее, чем интактные (Pereira, Marques, 2008), хотя этот эффект был временным, как показало последующее исследование (Accorsi et al., 2016). Диас с соавторами (2020) также обнаружили положительное

влияние ЛК на эффективность криоконсервации эмбрионов крупного рогатого скота (Dias et al., 2020). Также интересно, что в работе Аккорси с соавторами (2016) ЛК представляют, как анти-липогенный агент, так как добавление этой кислоты в среду для культивирования эмбрионов крупного рогатого скота приводило к снижению общего содержания липидов. Авторы предполагают, что ЛК способна изменять метаболизм эмбрионов, что может влиять на их развитие *in vitro* (Accorsi et al., 2016). Известен также эффект повышения криоустойчивости богатых липидами эмбрионов свиней и крупного рогатого скота после их делипидации (Nagashima et al., 1995; Pereira, Marques, 2008). Кроме того, положительное влияние ЛК на эффективность замораживания можно объяснить тем, что добавление в культуральную среду этой жирной кислоты может привести к увеличению текучести мембраны за счет прямого включения ЛК в липидный бислой (Hochi et al., 1999).

Для дополнительной проверки гипотезы о влиянии степени ненасыщенности липидов на исход криоконсервации эмбрионов была выбрана стеариновая кислота, которая, в отличие от линолевой, является насыщенной и, соответственно, должна оказать противоположный эффект на развитие эмбрионов после криоконсервации.

#### **4.2.2. Влияние стеариновой кислоты на преимплантационные эмбрионы домашней кошки**

При проведении экспериментов с преимплантационными эмбрионами домашней кошки не было значительного влияния СК на их развитие, число бластомеров и индекс фрагментации (глава 3, таблица 9 и 10, рисунок 16). По литературным данным СК оказывает негативное влияние на развитие эмбрионов крупного рогатого скота при их культивировании *in vitro*, в частности, снижает число клеток в бластоцистах и повышает уровень апоптоза (Van Hoesck et al., 2011; Aardema et al., 2022). Такое расхождение результатов, полученных на домашней кошке, с литературными данными может быть

связано с отличиями в экспериментальном дизайне, так как в работе Ван Хоека с соавторами (2011) эмбрионы крупного рогатого скота культивировали в течение семи дней, а в работе Аардемы с соавторами (2022) – восемь дней. В настоящей же работе эмбрионы домашней кошки подвергались воздействию СК в течении лишь трех дней культивирования *in vitro*. Несмотря на то, что клетки эмбрионов крупного рогатого скота и домашней кошки богаты липидами, они могут отличаться по качественному составу жиров и степени их ненасыщенности (Amstislavsky et al., 2019). Это также может приводить к различным результатам. Показано, что воздействие СК в течение пяти дней на преимплантационные эмбрионы крупного рогатого скота приводит к снижению числа и размера липидных гранул, а также снижению общего количества липидов, что в свою очередь оказывает негативный эффект на развитие и качество эмбрионов до криоконсервации (Aardema et al., 2022). В настоящей работе не обнаружено влияния СК на общее содержание липидов в эмбрионах домашней кошки. Однако при помощи спектроскопии комбинационного рассеяния света было выявлено, что степень ненасыщенности липидов в эмбрионах, после культивирования *in vitro* с добавлением СК значительно снижается, в то время как упорядочивание липидов начинается уже при комнатной температуре, т.е.  $T^*$  в эмбрионах после воздействия СК значительно повышается (глава 3, рисунок 17).

В данном исследовании СК оказала негативное влияние на эффективность криоконсервации эмбрионов домашней кошки, что согласуется с результатами, полученными Шехаб-Эл-Дин с соавторами (2009), которые показали, что бластоцисты крупного рогатого скота, развивающиеся из оплодотворенных *in vitro* ооцитов после их дозревания *in vitro* с СК, были плохого качества и имели сниженную криотолерантность (Shehab-El-Deen et al., 2009). Более того, культивирование эмбрионов коров с добавлением СК в течение пяти дней также значительно снижало эффективность их криоконсервации, что было ассоциировано со снижением числа и размера

липидных гранул, а также снижением общего количества липидов (Aardema et al., 2022).

Одним из признаков разрушения эмбрионов является наличие фрагментированных ядер, как проявление апоптоза клеток (Cecchele et al., 2022). Этот процесс является эндогенным механизмом клеточной дегенерации и запрограммированной гибели (Wyllie et al., 1980). Апоптоз может возникать в бластомерах во время культивирования эмбрионов *in vitro*, в частности, из-за субоптимальных условий (Leese et al., 1998), а также может быть активирован в ответ на широкий спектр провоцирующих его факторов, например, воздействие криопротекторов и осмотического шока в процессе замораживания (Marquez-Alvarado et al., 2004; Rajaei et al., 2005). Апоптоз характеризуется уменьшением объема цитоплазмы, выпячиванием цитоплазматической мембраны и перераспределением фосфолипидов внутри ее липидного бислоя. Для апоптоза свойственна конденсация хроматина на внутренней ядерной мембране, что можно обнаружить при помощи окрашивания ДНК специфическими флуорохромами, такими как PI или DAPI (Cecchele et al., 2022).

В настоящем исследовании мы использовали окрашивание DAPI для обнаружения как интерфазных, так и фрагментированных ядер. В данной работе обнаружена практически полная гибель всех эмбрионов после криоконсервации, в том случае, если до криоконсервации их культивировали *in vitro* с добавлением СК в течении 66 ч, чего не наблюдали в контроле, то есть без воздействия СК (глава 3, таблица 11, рисунок 20). Гибель эмбрионов мы оценивали по увеличенному индексу фрагментации в эмбрионах, подвергавшихся воздействию СК до криоконсервации, по сравнению с контролем. Такой негативный эффект можно объяснить тем, что после аккумулялирования клетками насыщенной жирной кислоты, температура начала фазовых переходов липидов значительно повышается. Более того, как мы показали, после оттаивания и нагревания до физиологических температур

некоторые насыщенные липиды остаются в упорядоченном конформационном состоянии (глава 3, рисунок 11), а также располагаются по периферии липидных гранул при замораживании (глава 3, рисунок 10в), что, вероятно, губительно сказывается на дальнейшем развитии эмбрионов.

Таким образом добавление СК в среду для культивирования *in vitro* эмбрионов привело к обратному эффекту в сравнении с воздействием ЛК на развивающиеся *in vitro* эмбрионы. Насыщенная СК значительно снизила степень ненасыщенности липидов эмбрионов домашней кошки, что в свою очередь, в полном соответствии с нашей гипотезой, отразилось на повышении  $T^*$  липидов, и существенно снизило эффективность криоконсервации эмбрионов.

#### **4.3. Рекомендации по сохранению генетических ресурсов диких кошачьих**

Основываясь на данных, полученных по результатам диссертационного исследования на модельном объекте *Felis silvestris catus*, который относится к подсемейству малых кошек (Felinae) семейства кошачьих (Felidae), в данном подразделе будут приведены рекомендации по сохранению генетического разнообразия представителей Felidae, имеющих соответствующий охранный статус, в частности, исчезающих, уязвимых, находящихся в состоянии близком к угрожаемому представителей подсемейства Felinae, а также тех представителей этого семейства, статус которых не известен.

Получаемые ооциты и эмбрионы могут быть разного качества и иметь разный липидный состав в зависимости от сезона и физиологического состояния животных, поэтому первым шагом на пути реализации программы сохранения генетического материала исчезающих представителей Felinae предлагается проверить степень ненасыщенности липидов в эмбрионах кошачьих при помощи метода КРС перед их замораживанием. Рамановская спектроскопия является неинвазивной методикой, которая позволяет

определять интенсивность колебаний связей молекул, содержащихся в живых объектах. В исследовании Переведенцевой с соавторами (2019) продемонстрировано, что после получения спектров КРС от двухклеточных эмбрионов мышей не было обнаружено негативного влияния данной процедуры, и впоследствии эмбрионы развивались в бластоцисты хорошего качества (Perevedentseva et al., 2019). Таким образом, существует возможность получать спектры КРС от липидного вклада в эмбрионах кошачьих и изучать степень их ненасыщенности без потери ценного материала, полученного от диких и находящихся под угрозой исчезновения кошачьих.

Степень ненасыщенности липидов в эмбрионах различных представителей *Felinae* не изучена, поэтому предлагается изначально ориентироваться на степень ненасыщенности липидов в эмбрионах домашней кошки. Мы показали, что в контрольной среде без добавления жирных кислот, показатель степени ненасыщенности липидов в эмбрионах домашней кошки равен  $0.96 \pm 0.03$ , а после культивирования с добавлением линолевой кислоты он значительно повышался и составлял  $1.08 \pm 0.02$ . Если показатель степени ненасыщенности липидов в эмбрионах диких представителей *Felinae* приближен к последнему значению, то предлагается заморозить эмбрионы в таком состоянии. Однако, несмотря на то, что домашняя кошка является близкородственным видом и относится к подсемейству малых кошек, качественный состав липидов в эмбрионах может варьировать от вида к виду, поэтому экспериментальный подбор необходимого значения степени ненасыщенности липидов может присутствовать для каждого конкретного вида.

Если степень ненасыщенности липидов того или иного представителя *Felinae* низкая, то вторым шагом на пути к успешной криоконсервации генетического материала диких представителей кошачьих может стать модификация липидного состава ооцитов и эмбрионов, получаемых от животных, в сторону их большей ненасыщенности. Для достижения этой цели

существует два способа: первый – модификация липидного состава *in vivo*, т.е. использование специальной диеты, обогащенной ненасыщенными жирами, и второй – модификация липидного состава *in vitro*.

В работе Брусенцева с соавторами (2019) показано, что диета с повышенным содержанием жиров влияет на общее содержание липидов в зрелых ооцитах мышей. Кроме того, диета с добавлением полиненасыщенных жирных кислот улучшала качество ооцитов овец, целостность их мембран после охлаждения (Zeron et al., 2002). Кроме того, обогащенная полиненасыщенными жирными кислотами диета приводила к увеличению доли полученных *in vitro* бластоцист высокого качества у крупного рогатого скота (Freret et al., 2019). Однако в данных работах (Zeron et al., 2002; Брусенцев и др., 2019) не обнаружено влияния диеты на состав липидов в ооцитах, в частности, на степень их ненасыщенности. Кроме того, не встречается работ о влиянии диеты, обогащенной ненасыщенными жирами, на качество эмбрионов млекопитающих, все работы такого рода до сих пор проводили лишь на ооцитах. Известно, что для семейства Felidae содержание домашних кошек на диете с повышенным содержанием полиненасыщенных жирных кислот сопровождалось возрастанием концентрации жирных кислот в сыворотке крови, а также приводила к снижению содержания кальция и кристаллов оксалатов в моче домашних кошек, что способствовало снижению риска развития мочекаменной болезни (Hall et al., 2017). Также на состав крови может оказывать место обитания животных, как показано в исследовании Хванга с соавторами (2016) на одичавших кошках (Hwang et al., 2016). Однако ничего не известно о влиянии жиров, поступающих с пищей, на липидный состав ооцитов и преимплантационных эмбрионов кошачьих.

Модифицировать диету в условиях дикой природы у таких хищников, как кошачьи, представляется достаточно проблематичным. Рацион диких кошачьих варьирует в зависимости от их размеров. Большие кошки такие как львы и тигры, охотятся, преимущественно, на крупных млекопитающих,

причем только 2-3 вида составляют основную часть их рациона. В рационе кошачьих среднего размера таких как пума, снежный барс и леопард в рационе присутствует большее количество различных видов. Малые кошачьи охотятся на мелких млекопитающих, птиц, рептилий, амфибий и насекомых (Lamberski, 2015). Соответственно, у каждого представителя семейства свои особенности и пищевые привычки, на которые крайне сложно повлиять.

Рационы кошачьих, находящихся в неволе разрабатываются на основе рекомендаций диетологов, в частности, диетологов Европейской ассоциации зоопарков и аквапарков (European Association of Zoos and Aquaria (EAZA) Nutrition Group). Такие программы обеспечивают сбалансированную по питательным веществам диету, которая разумно стимулирует естественное пищевое поведение, является практичным и экономичным (Lamberski, 2015). Большинство кошачьих, содержащихся в неволе, получают сбалансированные диеты. Такой рацион может быть дополнен мясными тушами. Если мышечное мясо или субпродукты составляют основную часть рациона, могут потребоваться дополнительные добавки, включая кальций (Lamberski, 2017). В зоопарках обычно внимательно подходят к кормлению животных, т.е. учитывают их физиологическое состояние, беременность, лактацию, а также индивидуальные особенности животного, возрастные и половые различия (Кормление диких животных, 2006). В зависимости от сезона меняется и количество потребляемой пищи. Например, у самок манула (*O. manul*) в конце лета – осенью масса тела интенсивно увеличивается. Это связано с физиологической особенностью этого вида – накопление жира, которое следует рассматривать как приспособление организма к терморегуляции, обеспечивающее зимой снижение теплоотдачи и расхода энергии. К концу зимы (февраль), после гона у животных наблюдается некоторое снижение массы тела. По окончании гона (февраль) потребность в кормах у самок значительно ниже по сравнению с самцами (Кормление диких животных, 2006). Таким образом рацион кошачьих, содержащихся в неволе,

соответствует четким рекомендациям и согласуется с физиологическим состоянием животных. Таким образом, существенно менять диету с целью модификации липидного состава ооцитов и эмбрионов может представляться проблематичным. Более того, даже при содержании животных на диетах с разным составом липидов, в частности, ненасыщенных, благодаря сложным механизмам поддержания гомеостаза, сложно поменять состав ооцитов *in vivo* (Zeron et al., 2002; Брусенцев и др., 2019).

Альтернативным способом модификации липидного состава ооцитов и эмбрионов является культивирование их с добавлением ненасыщенных жирных кислот, непосредственно перед замораживанием. Наши результаты, представленные в данной диссертации, свидетельствуют, что многообещающим и перспективным способом является получение эмбрионов *in vitro* путем ЭКО и затем их культивирование с добавлением жирных кислот. В качестве источника ненасыщенных жиров могут выступать линолевая кислота, которая использована в нашей работе, а также олеиновая кислота, которую применяли для этих целей в работе других исследователей на крупном рогатом скоте (Aardema et al., 2011; Fayezi et al., 2018; Karasahin et al., 2019). Культивирование с жирными кислотами может занять минимум трое суток (как было в нашем исследовании), но в случае диких животных также важно провести экспериментальный подбор времени культивирования с учетом специфики каждого конкретного вида кошачьих. После данной процедуры эмбрионы могут быть заморожены и помещены в криобанк с целью консервации генетических ресурсов.

## Заключение

Криоконсервация гамет и преимплантационных эмбрионов является одним из важных методов сохранения генетического разнообразия животных. Между тем, в настоящее время нет эффективных протоколов криоконсервации ооцитов и эмбрионов диких видов кошачьих. Кроме того, до настоящего исследования не было известно, каким образом, происходит, в процессе замораживания, повреждение ооцитов и эмбрионов, богатых внутриклеточными липидами.

В данной работе, при помощи жирных кислот, меченых дейтерием, и Рамановской спектроскопии изучено распределение липидов (при комнатной температуре и при замораживании) внутри липидных гранул ооцитов домашней кошки (*Felis silvestris catus*).

Впервые сделана попытка направленно модифицировать липидный состав ооцитов и преимплантационных эмбрионов домашней кошки при помощи ненасыщенной линолевой кислоты и насыщенной стеариновой кислоты. В ходе диссертационной работы подтверждена гипотеза о том, что степень ненасыщенности липидов играет важную роль в криоустойчивости ооцитов и эмбрионов домашней кошки. При помощи спектроскопии комбинационного рассеяния света было показано, что добавление в культуральную среду ненасыщенной ЛК приводит к значительному повышению степени ненасыщенности липидов в преимплантационных эмбрионах домашней кошки, а добавление насыщенной СК к достоверному снижению степени ненасыщенности липидов без изменения общего содержания липидов. Такого эффекта не обнаружено на ооцитах домашней кошки, что возможно связано с меньшим временем воздействия жирных кислот, а также с различным метаболизмом липидов в ооцитах и эмбрионах. Повышение степени ненасыщенности липидов в эмбрионах после влияния ЛК привело к снижению  $T^*$ , что положительно отразилось на криотолерантности эмбрионов. Снижение степени ненасыщенности липидов в эмбрионах под

воздействием СК, наоборот, повысило  $T^*$  и снизило эффективность криоконсервации эмбрионов.

Впервые продемонстрированная зависимость эффективности криоконсервации ооцитов и эмбрионов домашней кошки от степени ненасыщенности их внутриклеточных липидов может внести важный вклад в фундаментальную и прикладную криобиологию. Полученные результаты являются важными для понимания роли липидов в развитии ооцитов и преимплантационных эмбрионов представителей Felidae: Felinae и, в частности, домашней кошки (*Felis silvestris catus*), а также с точки зрения сохранения биоразнообразия, так как помогут разработке новых протоколов криоконсервации эмбрионов диких кошачьих.

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, возможно, 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

Основные результаты работы отражены в следующих пунктах:

1. Дейтерированные жирные кислоты проникают в липидные гранулы ооцитов домашней кошки и распределяются внутри них равномерно при комнатной температуре, а при охлаждении до  $-25^{\circ}\text{C}$  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 созревания 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  $5^{\circ}\text{C}$ ), 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  $11^{\circ}\text{C}$ ), так и в эмбрионах домашней кошки ( $>20^{\circ}\text{C}$ ).

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 сокращений

- CPS – cryoprotectant solution (криопротекторная смесь)
- CSCM-C – continuous single culture vedium – complete (среда для непрерывного культивирования - полная)
- DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole (4',6-диамидино-2-фенилиндол)
- EN – endangered (вымирающие)
- FAPB – fatty acid-binding protein (белок, связывающий жирные кислоты)
- FDA – fluorescein diacetate (флуоресцеин диацетат)
- FWHM – full width at half maximum (ширина на полувысоте пика)
- GV – germinal vesicle (зародышевый пузырек)
- GVBD – germinal vesicle breackdown (распад зародышевых пузырьков)
- HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (4-(2-гидроксиэтил)-1 пиперазинэтансульфоновая кислота)
- ICSI (ИКСИ) – intracytoplasmic sperm injection (интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида)
- IVC – *in vitro* culture (культивирование *in vitro*)
- IVF – *in vitro* fertilization (оплодотворение *in vitro*)
- IVM – *in vitro* maturation (дозревание *in vitro*)
- IUCN – International Union for Conservation of Nature (международный союз охраны природы)
- LC – least concer (вызывающие наименьшее опасение)

MI – метафаза I

M II – метафаза II

NT – near threatened (близкие к уязвимому положению)

PB – polar body (полярное тело)

PBS – phosphate-buffered saline (фосфатно-солевой буфер)

PI – propidium iodide (пропидий йодид)

$T^*$  – температура фазового перехода липидов

TMRM – tetramethylrhodamine (тетраметилродамин)

VU – vulnerable (уязвимые)

BCA – бычий сывороточный альбумин

ГВ – герминальный везикул

ДМСО – диметилсульфоксид

дОК – дейтерированная олеиновая кислота

дСК – дейтерированная стеариновая кислота

ИЯ – интерфазные ядра

КОК – кумулюс-ооцитный комплекс

КРС – комбинационное рассеяние света

ЛК – линолевая кислота

ОЯ – общее число ядер

ПГ – пропиленгликоль

СК – стеариновая кислота

ФПЛ – фазовый переход липидов

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ХГЧ – хорионический гонадотропин человека

ЭГ – этиленгликоль

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

## Список литературы

1. Амстиславский, С. Я., Брусенцев, Е. Ю., Окотруб, К. А., Рожкова, И. Н. Криоконсервация эмбрионов и гамет для сохранения генетических ресурсов лабораторных животных // Онтогенез. – 2015. – Т. 46. – № 2. – С. 67–81.
2. Амстиславский, С., Брусенцев, Е., Петрова, О., Напримеров, В., Левинсон, А. Развитие и старение репродуктивной системы млекопитающих // Онтогенез. – 2020. – Т.51. – № 1. – С. 51–63.
3. Амстиславский, С.Я., Мокроусова, В.И., Кожевникова, В.В., Кизилова, Е.А., Брусенцев, Е.Ю., Окотруб, К.А., Напримеров, В.А., Найдено, С.В. Криобанк генетических ресурсов кошачьих // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2017. – V. 21. – № 5. – Р. – 561–568.
4. 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.
5. Брусенцев, Е.Ю., Мокроусова, В.И., Игонина, Т.Н., Рожкова, И.Н., Амстиславский, С.Я. Роль липидных гранул в развитии ооцитов и преимплантационных эмбрионов млекопитающих // Онтогенез. – 2019. – Т. 50. – № 5. – С. 297–305.
6. Брусенцев, Е.Ю., Игонина, Т.Н., Окотруб, С. В., Чуйко, Э.А., Амстиславский, С.Я. Влияние линолевой кислоты на эффективность витрификации эмбрионов мышей // Онтогенез. – 2022. – Т. 53. – № 1. – Р. 58–62.
7. Жмакин, А. Физические основы криобиологии // Успехи физических наук. – 2008. – Т. 178. – № 3. – С. 243–266.
8. Кормление диких животных / Сост. В.В. Спицин. С Межвед. сб. научн. и научн.-метод. тр. – Московский зоопарк. – 2006. – 208 с.

9. Кузьмина, Т.И., Чистякова И.В., Татарская Д.Н. Функциональная активность митохондрий и статус хроматина нативных и девитрифицированных ооцитов *Bos taurus* под воздействием наночастиц высокодисперсного кремнезема // С.-х. биол. – 2020. – Т. 55. – №4.
10. Найденко, С.В. Биология размножения кошачьих: механизмы повышения репродуктивного успеха: Дис. докт. биол. наук: 03.03.04 / Г.В. Рожнов. В. – Московский государственный педагогический университет. Москва, 2015. – 276 с.
11. Чистякова И.В. биоиндикаторы криорезистентности ооцит-кумулюсных комплексов *Bos taurus* и *Sus scrofa domesticus*: диссертация ... кандидата биологических наук: 03.01.06. — Санкт-Петербург-Пушкин, 2020. — 140 с.
12. Aardema, H., Bertijn, I., van Tol, H., Rijneveld, A., Vernooij, J., Gadella, B. M., & Vos, P. Fatty Acid Supplementation During in vitro Embryo Production Determines Cryosurvival Characteristics of Bovine Blastocysts // *Frontiers in cell and developmental biology*. – 2022. – V. 10. – P. 837405.
13. Aardema, H., van Tol H., Wubbolts, R., Brouwers, J., Gadella, B., Roelen, B. Stearoyl-CoA desaturase activity in bovine cumulus cells protects the oocyte against saturated fatty acid stress // *Biol. Reprod.* – 2017. – V. 96. – № 5. – P. 982–992.
14. Aardema, H., Vos, P., Lolicato, F., Roelen, B., Knijn, H., Vaandrager, A., Helms, J., Gadella, B. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence // *Biol. Reprod.* – 2011. – V. 85. – № 1. – P. 62–69.
15. Absalon-Medina, V., Bedford-Guaus, S., Gilbert, R., Siqueira, L., Esposito, G., Schneider, A., Cheong, S., Butler, W. The effects of conjugated linoleic acid isomers cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 on in vitro bovine embryo production and cryopreservation // *J. Dairy. Sci.* – 2014. – V. 97. – P. 6164–6176.
16. Accorsi, M., Leao, B., Rocha-Frigoni, N., Perri, S., Mingoti, G. Reduction in cytoplasmic lipid content in bovine embryos cultured in vitro with linoleic acid in

semi-defined medium is correlated with increases in cryotolerance // *Zygote*. – 2016. – V. 24. – P. 485–494.

17. Alam, M., Iwata, J., Fujiki, K., Tsujimoto, Y., Kanegi, R., Kawate, N., Tamada, H., Inaba, T., Sugiura, K., Hatoya, S. Feline embryo development in commercially available human media supplemented with fetal bovine serum // *J. Vet. Med Sci.* – 2019. – V. 81. – № 4. – P. 629–635.

18. Alminana, C., Cuello, C. What is new in the cryopreservation of embryos? // *Anim. Reprod.* – 2015. – V.12. – N.3. – P. 418–427.

19. Alsabeeh, N., Chausse, B., Kakimoto, P.A., Kowaltowski, A.J., Shirihai, O. Cell culture models of fatty acid overload: Problems and solutions // *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell. Biol. Lipids.* – 2018. – V. 1863 – № 2. – P. 143–151.

20. Amini, E., Asadpour, R., Roshangar, L., Jafari-Joozani, R. Effect of linoleic acid supplementation on in vitro maturation, embryo development and apoptotic related gene expression in ovine // *Int. J. Reprod. Biomed.* – 2016. – V. 14. – № 4. – P. 255–262.

21. Amstislavsky, S., Brusentsev, E., Kizilova, E. Mokrousova, V., Kozhevnikova, V. Abramova, T., Rozhkova, I., Naidenko, S. Sperm cryopreservation in the Far-Eastern wildcat (*Prionailurus bengalensis euphilurus*) // *Reprod. Domest. Anim.* – 2018. – V. 53. – № 5. – P. 1219–1226.

22. Amstislavsky, S., Lindeberg, H., Luvoni, G.C. Reproductive technologies relevant to the genome resource bank in Carnivora // *Reprod. Dom. Anim.* – 2012. – V. 47. – № 1. – P. 164–175.

23. Amstislavsky, S., Mokrousova, V., Brusentsev, E., Okotrub, K., Comizzoli, P. Influence of Cellular Lipids on Cryopreservation of Mammalian Oocytes and Preimplantation Embryos: A Review // *Biopreserv. Biobank.* – 2019. – V. 17. – № 1. – P. 76–83.

24. Apparicio, M., Ferreira, C., Vicente, W. Chemical composition of lipids present in cat and dog oocyte by matrix-assisted desorption ionization mass

- spectrometry (MALDI- MS) // *Reprod. Domest. Anim.* – 2012. – V. 47. – P. 113–117.
25. Arav, A., Pearl, M., Zeron, Y. Does membrane lipid profile explain chilling sensitivity and membrane lipid phase transition of spermatozoa and oocytes? // *Cryo. Lett.* – 2000. – V. 21. – P. 179–186.
26. Arena, R., Bisogno, S., Gąsior, Ł., Rudnicka, J., Bernhardt, L., Haaf, T., Zacchini, F., Bochenek, M., Fic, K., Bik, E., Barańska, M., Bodzoń-Kułakowska, A., Suder, P., Depciuch, J., Gurgul, A., Polański, Z., Ptak, G. Lipid droplets in mammalian eggs are utilized during embryonic diapause // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2021. – V. 118. – № 10. – P. e2018362118.
27. Ariu, F., Strina, A., Murrone, O., Falchi, L., Bebbere D., Ledda, S., Zedda, M., Pau, S., Bogliolo, L. Lipid droplet distribution of immature canine oocytes in relation to their size and the reproductive stage // *Anim. Sci. J.* – 2016. – V. 87. – № 1. – P. 147–150.
28. Athenstaedt, K., Daum, G. The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation // *Cell Mol. Life Sci.* – 2006. – V. 63. – № 12. – P. 1355–1369.
29. Baldassare, H., Requena, L., Carelli, J., Salomão Júnior, J., Rodrigues, M., Ferreira, S., Traldi, A., Jorge Neto, P.N. Laparoscopic ovum pick-up is a safe procedure for the collection of oocytes for preservation efforts in Pumas (*Puma concolor*). // *Animal Reproduction.* – 2017. – V. 14. – P. 780.
30. Bedford, J. Enigmas of mammalian gamete form and function // *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* – 2004. – V. 79. – № 2. – P. 429–460.
31. Best, B. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions // *Rejuvenation Res.* – 2015. – V. 18. – № 5. – P. 422–436.
32. Bojic, S., Murray, A., Bentley, B., Spindler, R., Pawlik, P., Cordeiro, J., Bauer, R., de Magalhães, J. Winter is coming: the future of cryopreservation // *BMC Biol.* – 2021. V. 19. – № 1. – P. 56.

33. Borges, E., Vireque, A. Updating the Impact of Lipid Metabolism Modulation and Lipidomic Profiling on Oocyte Cryopreservation // *European medical journal*. – 2019. – V. 4. – P. 79–87.
34. Borini, A., Bianchi, V. Cryopreservation of Mature and Immature Oocytes // *Clinical Obstetrics and Gynecology*. – 2010. – V. 53. – № 4. – P. 763–774.
35. Bradley, J., Pope, I., Masia, F., Sanusi, R., Langbein, W., Swann, K., Borri, P. Quantitative imaging of lipids in live mouse oocytes and early embryos using CARS microscopy // *Development*. – 2016. – V. 143. – № 12. – P. 2238–2247.
36. Bradley J., Swann K. Mitochondria and lipid metabolism in mammalian oocytes and early embryos // *Int. J. Dev. Biol.* – 2019. – V. 63. – P. 93–103.
37. Brusentsev, E., Kizilova, E., Mokrousova, V., Kozhevnikova, V., Rozhkova, I., Amstislavsky, S. Characteristics and fertility of domestic cat epididymal spermatozoa cryopreserved with two different freezing media // *Theriogenology*. – 2018. – V. 110. – P. 148–152.
38. Buarprung, S., Tharasanit, T., Comizzoli, P., Techakumphu, M. Feline spermatozoa from fresh and cryopreserved testicular tissues have comparable ability to fertilize matured oocytes and sustain the embryo development after intracytoplasmic sperm injection // *Theriogenology*. – 2013. – V. 79. – P. 149–158.
39. Bulgarelli, D., Vireque, A., Pitangui-Molina, C., Silva-de-Sá, M., de Sá Rosa-E-Silva, A. Reduced competence of immature and mature oocytes vitrified by Cryotop method: assessment by in vitro fertilization and parthenogenetic activation in a bovine model // *Zygote*. – 2017. – V. 25(2). – P. 222–230.
40. Buranaamnuay, K. Protocols for sperm cryopreservation in the domestic cat: A review // *Anim. Reprod. Sci.* – 2017. – V. 183. – P. 56–65.
41. Carvalho, B., Costa, F., Detoni, D., Rosa, F., Dias, A. Use of conjugated linoleic acid (trans 10, cis 12) to cultivate bovine embryos: effect on cryoresistance and lipid content // *Rev. Bras. Zoot.* – 2019. – V. 48. – P. e20180322.
42. Casares, D., Escribá, P. V., Rosselló, C. A. Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization

- and Therapeutic Avenues // International journal of molecular sciences. – 2019. – V. 20. – № 9. – P. 2167.
43. Cecchele A., Cermisoni G., Giacomini E., Pinna M., Vigano P. Cellular and Molecular Nature of Fragmentation of Human Embryos // Int. J. Mol. Sci. – 2022 – V. 23. – № 3. – P. 1349.
44. Cocchia, N., Ciani, F., El-Rass, R., Russo, M., Borzacchiello, G., Esposito, V., Montagnaro, S., Avallone, L., Tortora, G., Lorizio, R. Cryopreservation of feline epididymal spermatozoa from dead and alive animals and its use in assisted reproduction // Zygote. – 2010. – V. 18. – № 1. – P. 1–8.
45. Colombo, M., Alkali, I., Prochowska, S., Luvoni, G. Fighting Like Cats and Dogs: Challenges in Domestic Carnivore Oocyte Development and Promises of Innovative Culture Systems // Animals (Basel). – 2021. – V. 11. – № 7. – P. 2135.
46. Colombo, M., Morselli, M., Tavares, M., Apparicio, M., Luvoni, G. Developmental Competence of Domestic Cat Vitrified Oocytes in 3D Enriched Culture Conditions. Animals (Basel). – 2019. – V. 9. – № 6. – P. 329.
47. Colombo, M., Zahmel, J., Jänsch, S., Jewgenow, K., Luvoni, G. Inhibition of Apoptotic Pathways Improves DNA Integrity but Not Developmental Competence of Domestic Cat Immature Vitrified Oocytes // Front. Vet. Sci. – 2020. – V. 7. – P.588334.
48. Comizzoli, P., Holt, W. Breakthroughs and new horizons in reproductive biology of rare and endangered animal species // Biology of Reproduction. – 2019. – V. 101. – № 3. – P. 514–525.
49. Conforti, V., Adania, C., Gonzalez, P., de Oliveira, C., Swanson, W. Novel recipient synchronization regimens for successful embryo transfer in the Brazilian ocelot following long-term frozen embryo storage // Reprod. Fertil. Dev. – 2008. – V. 21. – № 1. – P. 176–177.
50. Creed, S., McKenzie, M. Measurement of Mitochondrial Membrane Potential with the Fluorescent Dye Tetramethylrhodamine Methyl Ester (TMRM) // Methods Mol. Biol. – 2019. – V. 1928. – P. 69–76.

51. Cuello, C., Martinez, C., Nohalez, A., Parrilla, I., Roca, J., Gil, M., Martinez, E. Effective vitrification and warming of porcine embryos using a pH-stable, chemically defined medium // *Sci. Rep.* – 2016. – V. 6. – P. 33915
52. Daemen, S, van Zandvoort, M., Parekh, S., Hesselink, M. Microscopy tools for the investigation of intracellular lipid storage and dynamics // *Mol. Metab.* – 2015. – V. 5. – № 3. – P. 153–163.
53. De Andrade Melo-Sterza, F., Poehland, R. Lipid Metabolism in Bovine Oocytes and Early Embryos under In Vivo, In Vitro, and Stress Conditions // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – V. 22(7). – P. 3421.
54. De los Reyes, M., Palomino, J., Parraguez, V. H., Hidalgo, M., Saffie, P. Mitochondrial distribution and meiotic progression in canine oocytes during in vivo and in vitro maturation // *Theriogenology*, – 2011. – V. 75. – P. 346–353.
55. Dias, L., Leme, L., Spricigo, J., Pivato, I., Dode, M. Effect of delipidant agents during in vitro culture on the development, lipid content, gene expression and cryotolerance of bovine embryos // *Reprod. Dom. Anim.* – 2020. – V. 55. – P. 11–20.
56. Dmitriev, A., Surovtsev, N. Temperature-dependent hydrocarbon chain disorder in phosphatidylcholine bilayers studied by Raman spectroscopy // *J. Phys. Chem.* – 2015. – V. 119. – P.15613–15622.
57. Donoghue, A., Johnston, L., Seal, U., Armstrong, D., Tilson, R., Wolf, P., Petrini, L., Simmons, T., Groos, T., Wildt, D. In vitro fertilization and embryo development in vitro and in vivo in the tiger (*Panthera tigris*) // *Biol. Reprod.* – 1990. – V. 43. – P. 733–744.
58. Dresser, B., Gelwicks, E., Wachs, K., Keller, G. First successful transfer of cryopreserved feline (*Felis catus*) embryos resulting in live offspring // *J. Exp. Zool.* – 1988. – V. 246. – № 2. – P. 180–186.
59. Duncan, F., Schindler, K., Schultz, R., Blengini, C., Stein, P., Stricker, S., Wessel, G., Williams, C. Unscrambling the oocyte and the egg: clarifying

- terminology of the female gamete in mammals // *Molecular Human Reproduction*. – 2020. – V. 26. – № 11. – P. 797–800.
60. Dunning, K., Russell, D., Robker, R. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and  $\beta$ -oxidation // *Reproduction*. – 2014. – V. 48. – № 1. – P. R15–27.
61. Elamrani, K., Blume, A. Effect of the lipid phase transition on the kinetics of  $H^+/OH^-$  diffusion across phosphatidic acid bilayers // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1983. – V. 727. – P. 22–30.
62. Elliott, G., Wang, S, Fuller, B. Cryoprotectants: a review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures // *Cryobiology*. – 2017. – V. 76. – P. 74–91.
63. Erdmann, R., Blank, M., Ribeiro, R., José de Oliveira, M., Cubas, Z., Pradiee, J., Goularte, K., Moreira, N. Cryopreservation of margay (*Leopardus wiedii*) spermatozoa: Effects of different extenders and frozen protocols // *Theriogenology*. – 2020. – V. 143. – P. 27–34.
64. Fan, H-Y., Sun, Q-Y. *The Ovary (Third Edition)* // Chapter 12: Oocyte Meiotic Maturation / Ed. P. Leung, E. Adashi. – Academic Press, 2019. – P. 181–203.
65. Farese, R., Walther, T. Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T // *Cell* – 2009. – V. 139. – № 5. – P. 855–60.
66. Fayezi, S., Leroy, J., Novin, M., Darabi, M. Oleic acid in the modulation of oocyte and preimplantation embryo development // *Zygote*. – 2018. – V. 26. – № 1. – P. 1–13.
67. Fernandez-Gonzalez, L., Jewgenow, K. Cryopreservation of feline oocytes by vitrification using commercial kits and slush nitrogen technique // *Reprod. Domest. Anim.* – 2017. – V. 52. – P. 230–234.
68. Fernandez-Gonzalez, L., Kozhevnikova, V., Brusentsev, E., Jansch, S., Amstislavsky, S., Jewgenow, K. IGF-I Medium Supplementation Improves Singly

Cultured Cat Oocyte Maturation and Embryo Development in vitro // Animals (Basel). – 2021. V V. 11. – № 7. – P. 1909.

69. Fernandes, D., Santos, F., Macêdo, L., Izzo, R., Barbosa, B., Pimentel, M. M., Pereira, A., Bezerra, M. In Vitro Maturation Of Domestic Cat Oocytes Subjected To Different Incubation Times // Research, Society And Development. – 2021. – V. 10. – N. 3. – P. e15710313074.

70. Freret, S., Oseikria, M., Bourhis, D., Desmarchais, A., Briant, E., Desnoes, O., Dupont, M., Le Berre, L., Ghazouani, O., Bertevello, P., Teixeira-Gomes, A., Labas, V., Uzbekova, S., Salvetti, P., Maillard, V., Elis, S. Effects of a n-3 polyunsaturated fatty acid-enriched diet on embryo production in dairy cows // Reproduction. – 2019. – V. 158(1). – P. 71–83.

71. Fujihira, T., Kinoshita, M., Sasaki, M., Ohnishi, M., Ishikawa, H., Ohsumi, S., Fukui, Y. Comparative studies on lipid analysis and ultrastructure in porcine and southern minke whale (*Balaenoptera bonaerensis*) oocytes // J. Reprod. Dev. – 2004. – V. 50. – № 5. – P. 525–532.

72. Fujimoto, T., Parton, R. Not just fat: the structure and function of the lipid droplet // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2011. – V. 3. – № 3. – P. a004838.

73. Furthner, E., Cordonnier, N., Le Dudal, M., Fontbonne, A., Freiche, V. Is electroejaculation a safe procedure in cats? An endoscopic and histological prospective blinded study // Theriogenology. – 2018. – V. 119. – P. 69–75.

74. Ganan, N., González, R., Garde, J., Martínez, F., Vargas, A., Gomendio, M., Roldan, E. Assessment of semen quality, sperm cryopreservation and heterologous IVF in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*) // Reprod. Fertil. Dev. – 2009a. – V. 21. – № 7. – P. 848–859.

75. Ganan, N., González, R., Sestelo, A., Garde, J., Sánchez, I., Aguilar, J., Gomendio, M., Roldan, E. Male reproductive traits, semen cryopreservation, and heterologous in vitro fertilization in the bobcat (*Lynx rufus*) // Theriogenology. – 2009b. – V. 72. – № 3. – P. 341–352.

76. Galiguis, J., Gómez, M.C., Leibo, S.P., Pope, C.E. Birth of a domestic cat kitten produced by vitrification of lipid polarized in vitro matured oocytes // *Cryobiology*. – 2014. – V. 68. – № 3. – P. 459–466.
77. Genicot, G., Leroy, J., Soom, A., Donnay, I. The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes // *Theriogenology*. – 2005. – V. 63. – № 4. – P. 1181–1194.
78. Ghetler, Y., Saar, Y., Ruth, S., Amir, A. The effect of chilling on membrane lipid phase transition in human oocytes and zygotes // *Human Reproduction*. – 2005. – V. 20. – N. 12. – P. 3385–3389.
79. Giraud, M., Motta, C., Boucher, D., Grizard, G. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa // *Hum Reprod*. – 2000. – V. 15. – P. 2160–2164.
80. Giugliarelli, A., Sassi, P., Morresi, A. Cryopreservation of cells: FT-IR monitoring of lipid membrane at freeze-thaw cycles // *Biophys. Chem*. – 2016. – V. 208. – P. 34–39.
81. Glatz, J., Luiken, J. Dynamic role of the transmembrane glycoprotein CD36 (SR-B2) in cellular fatty acid uptake and utilization // *Journal of lipid research*. – 2018. – V. 59. – № 7. – P. 1084–1093
82. Gomez, M., Pope, C., Giraldo, A., Lyons, L., Harris, R., King, A., Cole, A., Godke, R., Dresser, B. Birth of African wildcat cloned kittens born from domestic cats // *Clon. Stem Cells*. – 2004. V. 6. – P. 247–258.
83. Gomez, M., Pope, C., Harris, R., Davis, A., Mikota, S., Dresser, B. Births of kittens produced by intracytoplasmic sperm injection of domestic cat oocytes matured in vitro // *Reproduction, Fertility and Development*. – 2000. – V. 12. – P. 423–433.
84. Gomez, M., Pope, E., Harris, R., Mikota, S., Dresser, BL. Development of in vitro matured, in vitro fertilized domestic cat embryos following cryopreservation, culture and transfer // *Theriogenology*. – 2003. – V. 60(2). – P.:239–251.

85. Gomez, M., Pope, C., Kutner, R., Ricks, D., Lyons, L., Ruhe, M., Dumas, C., Lyons, J., López, M., Dresser, B., Reiser, J. Nuclear transfer of sand cat cells into enucleated domestic cat oocytes is affected by cryopreservation of donor cells // *Clon. Stem. Cells.* – 2008. – V. 10. – P. 469–483.
86. Goodrowe, K., Wall, R., O'Brien, S., Schmidt, P., Wildt, D. Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization in vitro // *Biol. Reprod.* – 1988. – V. 39. – P. 355–372.
87. Guo, Y., Cordes, K. R., Farese, R. V., Walther, T. Lipid droplets at a glance // *Journal of cell science.* – 2009. – V. 122. – № Pt 6. – P. 749–752.
88. Guraya S.S. A histochemical analysis of lipid yolk deposition in the oocytes of cat and dog // *J. Exp. Zoo.* – 1965. – V. 160. – № 1. – P. 123–135.
89. Hall, J., Brockman, J., Davidson, S., MacLeay, J., Jewell, D. Increased dietary long-chain polyunsaturated fatty acids alter serum fatty acid concentrations and lower risk of urine stone formation in cats // *PLoS One.* – 2017. – V. 12(10). P. e0187133.
90. Hasley, A., Chavez, S., Danilchik, M., Wühr, M., Pelegri, F. Vertebrate Embryonic Cleavage Pattern Determination // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2017. – V. 953. – P. 117–171.
91. Hast, M. The larynx of roaring and non-roaring cats // *Journal of Anatomy.* – 1989. – V. 163. – P. 117–121.
92. Herker, E., Vieyres, G., Beller, M., Kraemer, N., Bohnert, M. Lipid Droplet Contact Sites in Health and Disease // *Trends Cell Biol.* – 2021. – V. 31. – № 5. – P. 345–358.
93. Herrick, J. In Vitro Culture of Embryos from Domestic Cats // *Methods Mol Biol.* – 2019. – P. 229–246.
94. Herrick, J., Bond, J., Magarey, G., Bateman, H., Krisher, R., Dunford, S., Swanson, W. Toward a feline-optimized culture medium: impact of ions, carbohydrates, essential amino acids, vitamins, and serum on development and

- metabolism of in vitro fertilization-derived feline embryos relative to embryos grown in vivo // *Biol. Reprod.* – 2007. – V. 76. – № 5. – P. 858–870.
95. Herrick, J. Assisted reproductive technologies for endangered species conservation: developing sophisticated protocols with limited access to animals with unique reproductive mechanisms // *Biol. Reprod.* – 2019. – V. 100(5). – P. 1158–1170.
96. Herrick, J., Campbell, M., Levens, G., Moore, T., Benson, K., D'Agostino, J., West, G., Okeson, D., Coke, R., Portacio, S., Leiske, K., Kreider, C., Polumbo, P., Swanson, W. In Vitro Fertilization and Sperm Cryopreservation in the Black-Footed Cat (*Felis nigripes*) and Sand Cat (*Felis margarita*) // *Biology of Reproduction.* – 2010. – V. 82. – №. 3. – P. 552–562.
97. Hochi, S., Kimura, K., Hanada, A. Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of in vitro-produced bovine morulae // *Theriogenology.* – 1999. – V. 52. – P. 497–504.
98. Holt, W. Cryobiology, wildlife conservation and reality // *Cryo. Letters.* – 2008. – V. 29. – P. 43–52.
99. Horvath, G., Seidel, G. Vitrification of bovine oocytes after treatment with cholesterol-loaded methyl-beta-cyclodextrin // *Theriogenology.* – 2006. – V. 66. – № 4. – P. 1026–1033.
100. Hwang, J., Gottdenker, N., Min, M., Lee, H., Chun, M. Evaluation of biochemical and haematological parameters and prevalence of selected pathogens in feral cats from urban and rural habitats in South Korea // *J. Feline Med. Surg.* – 2016. – V. 18(6). – P. 443–451.
101. Ibayashi, M., Aizawa, R., Mitsui, J., Tsukamoto, S. Homeostatic regulation of lipid droplet content in mammalian oocytes and embryos // *Reproduction.* – 2021. – V. 162. – № 6. – P. R99-R109.
102. Idrissi, J., Le Bourhis, D., Lefevre, A., Emond, P., Le Berre, L., Desnoës, O., Joly, T., Buff, S., Maillard, V., Schibler, L., Salvetti, P., Elis, S. Lipid profile of

bovine grade-1 blastocysts produced either in vivo or in vitro before and after slow freezing process // *Sci. Rep.* – 2021. – V. 11. – № 1. – P. 11618.

103. Idrissi, J., Le Bourhis, D., Lefevre, A., Emond, P., Le Berre, L., Desnoës, O., Joly, T., Buff, S., Freret, S., Schibler, L., Salvetti, P., Elis, S. Effects of the donor factors and freezing protocols on the bovine embryonic lipid profile // *Biol. Reprod.* – 2022. – V. 106. – № 3. – P. 597–612.

104. Igonina, T., Okotrub, K., Brusentsev, E., Chuyko, E., Ragaeva, D., Ranneva, S., Amstislavsky, S. Alteration of the lipid phase transition during mouse embryos freezing after in vitro culture with linoleic acid // *Cryobiology.* – 2021. – V.99. – P. 55–63.

105. IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2022. РЕЖИМ доступа: <https://www.iucnredlist.org>.

106. Iussig, B., Maggiulli, R., Fabozzi, G., Bertelle, S., Vaiarelli, A., Cimadomo, D., Ubaldi, F., Rienzi, L. A brief history of oocyte cryopreservation: Arguments and facts // *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* – 2019. – V. 98. – № 5. – P. 550–558.

107. Izawa, M., Doi, T., Nakanishi, N., Teranishi, A. Ecology and conservation of two endangered subspecies of the leopard cat (*Prionailurus bengalensis*) on Japanese islands // *Biological Conservation.* – 2009. – V. 142. – № 9. – P. 1884–1890.

108. Jeong, D., Kim, J., Na, K. Characterization and cryopreservation of Amur leopard cats (*Prionailurus bengalensis euptilurus*) semen collected by urethral catheterization // *Theriogenology.* – 2018. – V. 119. – P. 91–95.

109. Jewgenow, K., Braun B., Dehnhard, M., Zahmel, J., Goeritz, F. Research on reproduction is essential for captive breeding of endangered carnivore species // *Reprod. Domest. Anim.* – 2017. – V. 52(2). – P. 18–23.

110. Jochem, M., Korber, C. Extended phase diagrams for the ternary solutions H<sub>2</sub>O NaCl hydroxyethylstarch (HES) determined by DSC // *Cryobiology.* – 1987. – V. 24. – P. 513–536.

111. Karami, A., Bakhtiari, M., Azadbakht, M., Ghorbani, R., Khazaei, M., Rezaei, M. Impact of prolonged oocyte incubation time before vitrification on oocyte

survival, embryo formation, and embryo quality in mice // *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* – 2017. – V. 53(6). – P. 525–531.

112. Karasahin, T. The effect of oleic and linoleic acid addition to the culture media on bovine embryonic development following vitrification // *Pol. J. Vet. Sci.* – 2019. – V. 22. – № 4. – P. 661–666.

113. Kasai, M. Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: Development of ultrarapid vitrification // *Reprod. Med. Biol.* – 2002. – V. 16. – N. 1(1). – P. 1–9.

114. Khan, A., Patel, K., Shukla, H., Viswanathan, A., van der Valk, T., Borthakur, U., Nigam, P., Zachariah, A., Jhala, Y., Kardos, M., Ramakrishnan, U. Genomic evidence for inbreeding depression and purging of deleterious genetic variation in Indian tigers // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2021. – V. 118. – № 49. – P. e2023018118.

115. Kheirkhah, M., Mollapour Sisakht, M., Mohammadsadegh, M., Moslemi, H. Sperm evaluation of Jungle Cat (*Felis chaus*) obtained by urethral catheterization (CT) after medetomidine administration // *Theriogenology.* – 2017. – V. 91. – P. 17–20.

116. Kim, J., Kinoshita, M., Ohnishi, M., Fukui, Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes // *Reproduction.* – 2001. – V. 122. – № 1. – P. 131–138.

117. Kitchener, A., Breitenmoser-Würsten, Ch., Eizirik, E., Gentry, A., Werdelin, L., Wilting, A., Yamaguchi, N., Abramov, A., Christiansen, P., Driscoll, C., Duckworth, J., Johnson, W., Luo, S.-J., Meijaard, E., O'Donoghue, P., Sanderson, J., Seymour, K., Bruford, M., Groves, C., Hoffmann, M., Nowell, K., Timmons, Z., Tobe, S.. A revised taxonomy of the Felidae // *Cat News Special Issue.* – 2017. – V. 11. – P. 80 pp.

118. Kleinman-Ruiz, D., Soriano, L., Casas-Marce, M., Szychta, C., Sánchez, I., Fernández, J., Godoy, J. Genetic evaluation of the Iberian lynx ex situ conservation programme // *Heredity (Edinb).* – 2019. – V. 123. – № 5. – P. 647–661.

119. Klincumhom, N., Thongphakdee, A., Techakumphu, M., Chatdarong, K. Time of the First Embryonic Cleavage Indicates Cat Blastocyst Quality // *Thai. J. Vet. Med.* – 2012. – V. 42. – № 1. – P. 67–72.
120. Kochan, J., Nizański, W., Nei, M., Zalmir, C., Nowak, S., Prochowska, A., Partyka, S., Młodawska, A., Skotnicki, J. ARTs in wild felid conservation programmes in Poland and in the world // *Journal of Veterinary Research.* – 2019. – V. 63. – N. 3. – P. 457–464.
121. Kochan, J., Nowak, A., Młodawska, W., Prochowska, S., Partyka, A., Skotnicki, J., Nizanski, W. Comparison of the Morphology and Developmental Potential of Oocytes Obtained from Prepubertal and Adult Domestic and Wild Cats // *Animals.* – 2021a. – V. 11. – N. 20.
122. Kochan, J., Nowak, A., Kij, B., Prochowska, S., Nizański, W. Analysis of Morphokinetic Parameters of Feline Embryos Using a Time-Lapse System // *Animals (Basel).* – 2021b. – V. 11. – № 3. – P. 748.
123. Kuerschner, L., Moessinger, C., Thiele, C. Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets // *Traffic.* – 2008. – V. 9. – № 3. – P. 338–352.
124. Lamberski, N. Felidae // *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine.* – 2015. – V. 8. – P. 467–76.
125. Lapa, M., Marques, C., Alves, S., Vasques, M., Baptista, M., Carvalhais, I., Pereira, S., Horta, M., Bessa, A., Pereira, R.,. Effect of trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid on bovine oocyte competence and fatty acid composition // *Reprod. Domest. Anim.* – 2011. – V. 46. – № 5. – P. 904–910.
126. Leese H., Donnay I., Thompson J. Human assisted conception: a cautionary tale. Lessons from domestic animals. – *Hum. Reprod.* – 1998 – V. 4. – P. 184–202.
127. Lehocka, K., Black, S., Harland, A., Kadlečík, O., Kasarda, R., Moravčíková, N. Genetic diversity, viability and conservation value of the global captive population of the Moroccan Royal lions // *PLoS One.* – 2021. – V. 16. – № 12. – P. e0258714.

128. Leibo, S., Songsasen, N. Cryopreservation of gametes and, embryos of nondomestic species // *Theriogenology*. – 2002. – V. 57. – P. 303–326.
129. Leroy, J., Vanholder, T., Mateusen, B., Christophe, A., Opsomer, G., de Kruif, A., Genicot, G., Van Soom, A. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro // *Reproduction*. – 2005. – V. 130. – № 4. – P. 485–495.
130. Lewis, J., Tomlinson, A., Gilbert, M., Alshinetski, M., Arzhanova, T., Goncharuk, M., Goodrich, J., Kerley, L., Korotkova, I., Miquelle, D., Naidenko, S., Sulikhan, N., Uphyrkina, O. Assessing the health risks of reintroduction: The example of the Amur leopard, *Panthera pardus orientalis* // *Transbound. Emerg. Dis.* – 2020. – V. 67. – № 3. – P. 1177–1188.
131. Lovelock, J. The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1953. – V. 11. – № 1. – P. 28–36.
132. Lueders, I., Ludwig, C., Schroeder, M., Mueller, K., Zahmel, J., Dehnhard, M. Successful nonsurgical artificial insemination and hormonal monitoring in an Asiatic golden cat (*Catopuma temmincki*) // *J. Zoo Wildl. Med.* – 2014. – V. 45. – P. 372–379.
133. Lueders, I., Luther, G., Scheepers, G., van der Horst. Improved semen collection method for wild felids: Urethral catheterization yields high sperm quality in African lions (*Panthera leo*) // *Theriogenology*. – 2012. – V. 78. – N. 3. – P. 696–701.
134. Luther, I., Jakop, U., Lueders, I., Tordiffe, A., Franz, C., Schiller, J., Kotze, A., Müller, K. Semen cryopreservation and radical reduction capacity of seminal fluid in captive African lion (*Panthera leo*) // *Theriogenology*. – 2017. – V. 89. – P. 295–304.
135. Luvoni, G., Colombo, M. Cold case: Small animal gametes cryobanking // *Theriogenology*. – 2020. – V. 150. – P. 445–451.

136. Luvoni, G., Colombo, M., Morselli, M. The never-ending search of an ideal culture system for domestic cat oocytes and embryos // *Reprod. Domest. Anim.* – 2018. – V. 53. – № 3. – P. 110–116.
137. Luvoni, G., Pellizzari, P. Embryo development in vitro of cat oocytes cryopreserved at different maturation stages // *Theriogenology*. – 2000. – V. 53. – № 8. – P. 1529–1540.
138. Marei, W., Wathes, D., Fouladi-Nashta, A. Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development // *Reproduction* – 2010. – V. 139. – P. 979–988.
139. Marquez-Alvarado Y., Galina C., Castilla B., León H., Moreno-Mendoza N. Evidence of damage in cryopreserved and fresh bovine embryos using the Tunel technique // *Reprod. Domest. Anim.* – 2004. – V. 39. – № 3. – P. 141–145.
140. Martinez, A., Valcárcel, A., de las Heras, M., de Matos, D., Furnus, C., Brogliatti, G. Vitrification of in vitro produced bovine embryos: in vitro and in vivo evaluations // *Anim. Reprod. Sci.* – 2002. – V. 16; 73(1-2). – P. 11–21.
141. Martins, L., Fernandes, C., Minto, B., Landim-Alvarenga, F., Lopes, M. Ultrastructural characteristics of non-matured and in vitro matured oocytes collected from pre-pubertal and adult domestic cat ovaries // *Reprod. Domest. Anim.* – 2009. – V. 44. – № 2. – P. 251–254.
142. Matson, P., Graefling, J., Junk, S., Yovich, J., Edirisinghe, W. Cryopreservation of oocytes and embryos: use of a mouse model to investigate effects upon zona hardness and formulate treatment strategies in an in-vitro fertilization programme // *Hum. Reprod.* – 1997. – V. 12. – № 7. – P. 1550–1553.
143. Mazur, P. Equilibrium, quasi equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos // *Cell. Biophys.* – 1990. – V. 17. – P. 53–92.
144. Mazur, P., Leibo, S., Chu, E. A two-factor hypothesis of freezing injury: evidence from chinese hamster tissue-culture cells // *Exp. Cell Res.* – 1972. – V. 71(2). – P. 345–355.

145. McKeegan, P., Sturmey, R. The role of fatty acids in oocyte and early embryo development // *Reprod. Fertil. Dev.* – 2011. – V. 24. – № 1. – P. 59–67.
146. Men, H., Agca, Y., Riley, L., Critser, J. Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis // *Theriogenology*. – 2006. – V. 66. – № 8. – P. 2008–2016.
147. Mochida, K., Hasegawa, A., Taguma, K., Yoshiki, A., Ogura, A. Cryopreservation of mouse embryos by ethylene glycol-based vitrification // *J. Vis. Exp.* – 2011. – V. 18(57). – P. 3155.
148. Mokrousova, V., Okotrub, K., Amstislavsky, S., Surovtsev, N. Raman spectroscopy evidence of lipid separation in domestic cat oocytes during freezing // *Cryobiology*. – 2020a. – V. 95. – P. 177–182.
149. Mokrousova, V., Okotrub, K., Brusentsev, E., Kizilova, E., Surovtsev, N., Amstislavsky, S. Effects of slow freezing and vitrification on embryo development in domestic cat // *Reprod. Domest. Anim.* – 2020b. – V. 55. – № 10. – P. 1328–1336.
150. Moro, L., Jarazo, J., Buemo, C., Hiriart, M., Sestelo, A., Salamone, D. Tiger, Bengal, and domestic cat embryos produced by homospecific and interspecific zona-free nuclear transfer // *Reprod. Domest. Anim.* – 2015. – V. 50. – P. 849–857.
151. Nagashima, H., Kashiwazaki, M., Nottle, B. Cryopreservation of porcine embryos // *Nature*. – 1995. – V. 374. – P. 416.
152. Nakagata, N., Takeo, T., Fukumoto, K., Kondo, T., Haruguchi, Y., Takeshita, Y., Nakamuta, Y., Matsunaga, H., Tsuchiyama, S., Ishizuka, Y., Araki, K. Applications of cryopreserved unfertilized mouse oocytes for in vitro fertilization // *Cryobiology*. – 2013. – V. 67(2). – P. 188–192.
153. Napolitano, C., Díaz, D., Sanderson, J., Johnson, W., Ritland, K., Ritland, C., Poulin, E. Reduced Genetic Diversity and Increased Dispersal in Guigna (*Leopardus guigna*) in Chilean Fragmented Landscapes // *J. Hered.* – 2015. – V. 106. – № 1. – P. 522–536.

154. Nowak, A., Kochan, J., Prochowska, S., Partyka, A., Młodawska, W., Witarski, W., Skotnicki, J., Grega, T., Pałys, M., Nizanski, W. The viability of serval (*Leptailurus serval*) and pallas cat (*Felis manul*) oocytes after cryopreservation using the Rapid-I method // *Cryo Letters*. – 2019. – V. 40. – N. 4. – P. 226–230.
155. Ochota, M., Nizański, W. Time of early cleavage affects the developmental potential of feline preimplantation embryos in vitro // *Theriogenology*. – 2017. – V. 89. – P. 26–31.
156. Ochota, M., Wojtasik, W. Nizanski. Total cell number and its allocation to trophectoderm and inner cell mass in in vitro obtained cats' blastocysts // *Reprod. Dom. Anim.* – 2016. – V. 51. – P. 339–345.
157. Okotrub, K., Amstislavsky, S., Surovtsev, N. Raman spectroscopy reveals the lipid phase transition in preimplantation mouse embryos during freezing // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2017. – V. 635. – P. 37–43.
158. Okotrub, K., Mokrousova, V., Amstislavsky, S., Surovtsev, N. Lipid Droplet Phase Transition in Freezing Cat Embryos and Oocytes Probed by Raman Spectroscopy // *Biophys. J.* – 2018. – V. 115. – № 3. – P. 577–587.
159. Okotrub, K., Shamaeva, D., Surovtsev, N. Raman spectra of deuterated hydrocarbons for labeling applications. *J. Raman Spectrometry*. – 2022. – V. 53(2). – P. 297–309.
160. Oliveira, C., Feuchard, V., Marques, S., Saraiva, N. Modulation of lipid metabolism through multiple pathways during oocyte maturation and embryo culture in bovine // *Zygote*. – 2022. – V. 30. – № 2. – P. 258–266.
161. Ordonez-Leon, E., Merchant, H., Medrano, A., Kjelland, M., Romo, S. Lipid droplet analysis using in vitro bovine oocytes and embryos // *Reprod. Domest. Anim.* – 2014. – V. 49. – № 2. – P. 306–314.
162. Paschoal, D., Sudano, M., Guastali, M., Dias Maziero, R., Crocomo, L., Oña Magalhães, L., da Silva Rascado, T., Martins, A., da Cruz Landim-Alvarenga, F. Forskolin effect on the cryosurvival of in vitro-produced bovine embryos in the

- presence or absence of fetal calf serum // *Zygote*. – 2014. – V. 22. – № 2. – P. 146–157.
163. Pawlak, P., Natalia Malyszka, I., Szczerbal, P., Kolodziejcki, P. Fatty acid induced lipolysis influences embryo development, gene expression and lipid droplet formation in the porcine cumulus cells // *Biology of Reproduction*. – 2020. – V. 103. – № 1. – P. 36–48.
164. Pedersen, M., Watson, C., Blevins, B., Loskutoff, N. Domestic cat (*Felis catus*) embryo cryopreservation: slow-cooling versus vitrification // *Reproduction, Fertility and Development*. – 2008. – V. 21. – P. 180–181.
165. Pereira, R., Baptista, M., Vasques, M., Horta, A., Portugal, P., Bessa, R., Silva, J., Pereira, M., Marques, C. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t,12c CLA) // *Anim. Reprod. Sci.* – 2007. – V. 98. – № 3-4. – P. 293–301.
166. Pereira, R., Marques, C. Animal oocyte and embryo cryopreservation // *Cell. Tissue. Bank*. – 2008. – V. 9. – P. 267–277.
167. Perevedentseva, E., Krivokharchenko, A., Karmenyan, A.V. Chang, H-H., Cheng, C-L. Raman spectroscopy on live mouse early embryo while it continues to develop into blastocyst *in vitro* // *Sci. Rep.* – 2019 – V.9. – P. 6636.
168. Phillips, M., Williams, M., Chapman, D. On the nature of hydrocarbon chain motions in lipid liquid crystals // *Chem. Phys. Lipids*. – 1969. – V. 3. – P. 234–244.
169. Piltti, K., Lindeberg, H., Aalto, J., Korhonen, H. Live cubs born after transfer of OPS vitrified-warmed embryos in the farmed European polecat (*Mustela putorius*) // *Theriogenology*. – 2004. – V. 61. – № 5. – P. 811–820.
170. Pink, D., Green, T., Chapman, D. Raman scattering in bilayers of saturated phosphatidylcholines. Experiment and theory. *Biochemistry*. – 1980. – V. 19. – P. 349–356.
171. Pope, C. Aspects of *in vivo* oocyte production, blastocyst development, and embryo transfer in the cat // *Theriogenology*. – 2014. – V. 81. – P. 126–137.

172. Pope, C., Gómez, M., Cole, A., Dumas C., Dresser, B. Oocyte recovery, in vitro fertilization and embryo transfer in the serval (*Leptailurus serval*) // *Reprod. Fertil. Develop.* – 2006b. – V. 18. – P. 223–224.
173. Pope, C. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids // *Theriogenology.* – 2000. – V. 53. – P. 163–174.
174. Pope, M., Gómez, M., Galiguis, J., Dresser, B. Applying Embryo Cryopreservation Technologies to the Production of Domestic and Black-Footed Cats // *Reprod. Dom. Anim.* – 2012a. – V. 47. – № 6. – P. 125–129.
175. Pope, C., Gomez, M., Kagawa, N., Kuwayama, M., Leibo, S., Dresser, B. In vivo survival of domestic cat oocytes after vitrification, intracytoplasmic sperm injection and embryo transfe // *Theriogenology.* – 2012b. – V. 77. – P. 531–538.
176. Pope, C., Gomez, M., Dresser, B. In vitro embryo production and embryo transfer in domestic and non-domestic cats // *Theriogenology.* – 2006a. – V. 66. – № 6-7. – P. 1518–1524.
177. Pope, C., Johnson, C., McRae, M., Keller, G., Dresser, B. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes // *Anim. Reprod. Sci.* – 1998. – V. 53. – № 1-4. – P. 221–236.
178. Pope, C., McRae, M., Plair, B., Keller, G., Dresser, B. Successful in vitro and in vivo development of in vitro fertilized two- to four-cell cat embryos following cryopreservation, culture and transfer // *Theriogenology.* – 1994. – V. 42. – № 3. – P. 513–525.
179. Praxedes, E., Borges, A., Santos, M., Pereira, A. Use of somatic cell banks in the conservation of wild felids. // *Zoo Biol.* – 2018.
180. Premier, J., Gahbauer, M., Leibl, F., Heurich, M. In situ feeding as a new management tool to conserve orphaned Eurasian lynx (*lynx lynx*) // *Ecol. Evol.* – 2021. – V. 11. – № 7. – P. 2963–2973.
181. Pritchard, D., Fa, J., Oldfield, S., Harrop, S. Bring the captive closer to the wild: Redefining the role of ex situ conservation // *Oryx.* – 2012. – V. 46(1). – P. 18–23.

182. Prochowska, S., Nizański, W., Partyka, A., Kochan, J., Młodawska, W., Nowak, A., Skotnicki, J., Grega, T., Pałys, M. Influence of the type of semen and morphology of individual sperm cells on the results of ICSI in domestic cats // *Theriogenology*. – 2018. – V. 131. – P. 140–145.
183. Quinn, P. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes // *Cryobiology*. – 1985. – V. 22(2). – P. 128–146.
184. Quinn, P., Wolf, C. The liquid-ordered phase in membranes // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2009. – V. 1788. – P. 33–46.
185. Rajaei F., Karja N., Agung B., Wongsrikeao P., Taniguchi M., Murakami M., Sambuu R., Nii M., Otoi T. Analysis of DNA fragmentation of porcine embryos exposed to cryoprotectants // *Reprod. Domest. Anim.* – 2005. – V. 40. – № 5. – P. 429–432.
186. Rall, W., Fahy, G. Ice free cryopreservation of mouse embryos at –196 degrees C by vitrification // *Nature*. – 1985. – V. 313. – P. 573–575.
187. Rao, B., Mahesh, Y., Charan, S., Venu; K., Nath, R., Rao, K. Meiotic maturation of oocytes recovered from the ovaries of Indian big cats at postmortem // *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. – 2015. – V. 51. – № 1. – P. 19–25.
188. Renard, J., Babinet, C. High survival of mouse embryos after rapid freezing and thawing inside plastic straws with 1-2 propanediol as cryoprotectant // *J. Exp. Zool.* – 1984. – V. 230. – № 3. – P. 443–448.
189. Reynaud, K., Fontbonne, A., Marseloo, N., Viaris de Lesegno, C., Saint-Dizier, M., Chastant-Maillard, S. In vivo canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: a review // *Theriogenology*. – 2006. – V. 66. – № 6-7. – P. 1685–1693.
190. Rappolt, M., Vidal, P. Laggner. Structural, dynamic and mechanical properties of POPC at low cholesterol concentration studied in pressure/temperature space // *Eur. Biophys. J.* – 2003. – V. 31. – P. 575–585.
191. Rodman, T., Bachvarova, R. RNA synthesis in preovulatory mouse oocytes // *J. Cell Biol.* – 1976. – V. 70. – P. 251–257,

192. Roth, T., Swanson, W., Wildt, D. Developmental competence of domestic cat embryos fertilized in vivo versus in vitro // *Biology of reproduction*. – 1994. – V. 51. – № 3 – P. 441–451.
193. Schmidt, K., Ratkiewicz, M., Konopiński, M. The importance of genetic variability and population differentiation in the Eurasian lynx (*Lynx lynx*) for conservation, in the context of habitat and climate change // *Mammal. Rev.* – 2011. – V. 41. – P. 112–124.
194. Schmitz, G., Ecker, J. The Opposing Effects of n-3 and n-6 Fatty Acids // *Progress in Lipid Research*. – 2008. – V. 47. – P. 147–155.
195. Schultz, R., LaMarca, M., Wassarman, P.M. Absolute rates of protein synthesis during meiotic maturation of mammalian oocytes in vitro // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1978. – V. 75. – P. 4160–4164.
196. Seki, S, Mazur, P. The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure // *Cryobiology*. – 2009. – V. 59. – № 1. – P. 75–82.
197. Shaw, J., Jones, G. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos // *Hum. Reprod. Update*. – 2003. – V. 9. – № 6. – P. 583–605.
198. Shaw, J., Oranratnachai, A., Trounson, A. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue // *Theriogenology*. – 2000. – V. 53. – № 1. – P. 59–72.
199. Shehab-El-Deen, M., Leroy, J., Maes, D., Van Soom, A. Cryotolerance of bovine blastocysts is affected by oocyte maturation in media containing palmitic or stearic acid // *Reprod. Domest. Anim.* – 2009. – V. 44. – № 1. – P. 140–142.
200. Shin, T., Kraemer, D., Pryor, J., Liu, L., Rugila, J., Howe, L., Buck, S., Murphy, K., Lyons, L., Westhusin, M. A cat cloned by nuclear transplantation // *Nature*. – 2002. – V. 415. – P. 859.

201. Sowinska, N., Zahmel, J., Nizański, W., Hribal, R., Fernandez-Gonzalez, L., Jewgenow, K. Meiotic Status Does Not Affect the Vitrification Effectiveness of Domestic Cat Oocytes // *Animals (Basel)*. – 2020. – V. 10. – № 8. – P. 1371.
202. Stoecklein, K., Ortega, M., Spate, L., Murphy, C., Prather, R. Improved cryopreservation of in vitro produced bovine embryos using FGF2, LIF, and IGF1 // *PLoS ONE*. – 2021. – V. 16(2). – P. e0243727.
203. Stubbs, C., Smith A. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1984. – V. 779. – P. 89–137.
204. Sturmey, R., O'Toole, P., Leese, H. Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial: lipid association in the porcine oocyte // *Reproduction*. – 2006. – V. 32. – N. 6. – P. 829–837.
205. Swanson, W. Application of assisted reproduction for population management in felids: the potential and reality for conservation of small cats // *Theriogenology*. – 2006. – V. 66. – № 1. – P. 49–58.
206. Swanson, W. Practical application of laparoscopic oviductal artificial insemination for the propagation of domestic cats and wild felids // *Reprod. Fertil. Dev.* – 2018. – V. 31. – № 1. – P. 27–39.
207. Swanson, W., Brown, J. International training programs in reproductive sciences for conservation of Latin American felids // *Anim. Reprod. Sci.* – 2004. – V. 82-83. – P. 21–34.
208. Swanson, W., Magarey, G., Herrick, J. Sperm cryopreservation in endangered felids: developing linkage of in situ-ex situ populations // *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* – 2007. – V. 65. – P. 417–432.
209. Swanson, W., McRae, M., Wildt, D., Rall, W. Cryoprotectant toxicity and cryopreservation success in IVF-derived domestic cat embryos after embryo transfer // *Theriogenology*. – 1999. – V. 51. – P. 174.
210. Terrell, K., Wildt, D., Anthony, N., Bavister, B., Leibo, S., Penfold, L., Marker, L., Crosier, A. Different patterns of metabolic cryo-damage in domestic cat

- (*Felis catus*) and cheetah (*Acinonyx jubatus*) spermatozoa // *Cryobiology*. – 2012. – V. 64. – № 2. – P. 110–117.
211. Tharasanit, T., Techakumphu, M. The effect of chemical delipidation on cryopreservability of cat embryos // *Reprod. Fertil. Dev.* – 2011. – V. 23(1). P. 153.
212. Thiam, A., Farese Jr., R., Walther, T. The biophysics and cell biology of lipid droplets // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2013. – V. 14. – P. 775–786.
213. Thongphakdee, A., Sukparangsi, W., Comizzoli, P., Chatdarong, K. Reproductive biology and biotechnologies in wild felids // *Theriogenology*. – 2020. – V. 150. – P. 360–373.
214. Thuwanut, P., Tipkantha, W., Siriaroonrat, B., Comizzoli, P., Chatdarong, K. Beneficial effect of extracellular adenosine 5'-triphosphate treatment on the Indochinese leopard (*Panthera pardus delacouri*) sperm quality after cryopreservation // *Reprod. Dom. Anim.* – 2017. – V. 52. – P. 269–274.
215. Van Hoeck, V., Leroy, J., Arias Alvarez, M., Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Schnorbusch, K., Bols, P., Leese, H., Sturmey, R. Oocyte developmental failure in response to elevated nonesterified fatty acid concentrations: mechanistic insights // *Reproduction* – 2013. – V. 145. – № 1. – P. 33–44.
216. Van Hoeck, V., Sturmey, R., Bermejo-Alvarez, P., Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Leese, H., Bols, P., Leroy, J. Elevated non-esterified fatty acid concentrations during bovine oocyte maturation compromise early embryo physiology // *PloS one*. – 2011. – V. 6. – № 8. – P. e23183.
217. Vansandt, L.M., Moresco, A., Gonzalez, R., Miller, A. Sperm cryopreservation with a soy lecithin-based medium in blackfooted cats (*Felis nigripes*) and sand cats (*Felis margarita*) // *Reprod. Fertil. Devel.* – 2018. – V. 31. – P. 177–177.
218. Van Meer, G., Voelker, D., Feigenson, G. Membrane lipids: where they are and how they behave // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2008 – V. 9. – P. 112–124.

219. Van Soom, A., Tanghe, S., De Pauw, I., Maes, D., de Kruif, A. Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization // *Reprod. Domest. Anim.* – 2002. – V. 37. – № 3. – P. 144–151.
220. Veprintsev, B., Rott, N. Conserving genetic resources of animal species // *Nature.* – 1979. – V. 280. – P. 633–634.
221. Walther, T., Farese, R. The life of lipid droplets // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – V. 1791. – № 6. – P. 459–466.
222. Wei, L., Shen, Y., Xu, F., Hu, F., Harrington, J., Targoff, K., Min, W. Imaging complex protein metabolism in live organisms by stimulated Raman scattering microscopy with isotope labeling // *ACS Chem. Biol.* – 2015. – V. 10(3). – P. 901–908.
223. Welte, M., Gould, A. Lipid droplet functions beyond energy storage // *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Biol. Lipids.* – 2017. – V. 1862. – № 10 Pt B. – P. 1260–1272.
224. Whelan, J., Fritsche, K. Linoleic acid // *Adv. Nutr.* – 2013. – V. 4(3). – P. 311–312.
225. Wildt, D., Steven, L. Monfort, A., Donoghue, M., Leslie A., Howard, J. Embryogenesis in conservation biology — Or, how to make an endangered species embryo // *Theriogenology.* – 1992. – V. 37. – N. 1. – P. 161–184.
226. Wildt, D., Roth, T. Assisted reproduction for managing and conserving threatened felids // *Int. Zoo Yb.* – 1997. – V. 35. – P. 164–172.
227. Wilfling, F., Wang, H., Haas, J., Krahmer, N., Gould, T., Uchida, A., Cheng, J., Graham, M., Christiano, R., Fröhlich, F., Liu, X., Buhman, K., Coleman, R., Bewersdorf, J., Farese Jr., R., Walther, T. Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocating from the ER to lipid droplets // *Dev. Cell.* – 2013. – V. 24. – P. 384–399.
228. Willadsen, S. Factors affecting the survival of sheep embryos during freezing and thawing // *Ciba. Found. Symp.* – 1977. – V. 52. – P. 175–201.

229. White, I. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review // *Reprod. Fertil. Dev.* – 1993. – V. 5. – P.639–658.
230. Whittingham, D., Leibo, S., Mazur, P. Survival of mouse embryos frozen to –196 degrees and –269 degrees C // *Science.* – 1972. – V. 178. – P. 411–414.
231. Wilfling, F., Wang, H., Haas, J., Krahmer, N., Gould, T., Uchida, A., Cheng, J., Graham, M., Christiano, R., Fröhlich, F., Liu, X., Buhman, K., Coleman, R., Bewersdorf, J., Farese Jr., R., Walther, T. Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocalizing from the ER to lipid droplets // *Dev. Cell.* – 2013. – V. 24. – P. 384–399.
232. Wood, B., Chernenko, T., Matthäus, C., Diem, M., Chong, C., Bernhard, U., Jene, C., Brandli, A., McNaughton, D., Tobin, M., Trounson, A., Lacham-Kaplan, O. Shedding new light on the molecular architecture of oocytes using a combination of synchrotron Fourier transform-infrared and Raman spectroscopic mapping // *Anal. Chem.* – 2008. – V. 80. – № 23. –P. 9065–9072.
233. Wood, T., Wildt, D. Effect of the quality of the cumulusoocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts in vitro // *J. Reprod. Fertil.* – 1997. – V. 110. – N. 2. – P. 355–360.
234. Wu, G., Jia, B., Quan, G., Xiang, D., Zhang, B., Shao, Q., Hong, Q. Vitrification of porcine immature oocytes: Association of equilibration manners with warming procedures, and permeating cryoprotectants effects under two temperatures // *Cryobiology.* – 2017. – V. 75. – P.21–27.
235. Wyllie A., Kerr J., Currie A. Cell death: the significance of apoptosis // *Int. Rev. Cytol.* – 1980. – V. 68. – P. 251–306.
236. Yurchuk, T. Cryopreservation of Immature Oocytes at Germinal Vesicle Stage. When Gamete Maturation Performance Seems to Be Most Appropriate? // *Probl. Cryobiol. Cryomed.* – 2021. – V. 31. – № 2. – P. 161–167.
237. Zahmel, J., Jansch, S., Jewgenow, K., Sandgreen, D., Skalborg Simonsen, K., Colombo, M. Maturation and fertilization of African lion (*Panthera leo*) oocytes after vitrification // *Cryobiology.* – 2021. – V. 98. – P. 146–151.

238. Zambelli, D., Prati, F., Cunto, M., Iacono, E., Merlo, B. Quality and in vitro fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration // *Theriogenology*. – 2008. – V. 69. – P. 485–490.
239. Zeron, Y., Sklan, D., Arav, A. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes // *Mol. Reprod. Dev.* – 2002. – V. 61. – № 2. – P. 271–278.

## Приложение 1

Таблица 12. Таксономия семейства кошачьих (Mammalia: Carnivora, Felinidae), характеристики видов и охранный статус (по Kitchener et al., 2017 и IUCN, 2022)

Виды	Масса, кг	Ареал обитания	Статус	Численность
Род Кошки – <i>Felis</i>				
Барханный кот – <i>F. margarita</i>	1.3-2.4	Северная Африка, Аравия, Азия	LC	–
Лесной кот – <i>F. silvestris</i>	5-8	Европа, Африка, Азия	LC	↓
Черноногая кошка – <i>F. nigripis</i>	1.3-2.3	Южная Африка	VU	↓
Китайская кошка – <i>F. bieti</i>	4.5-5.9	Китай, Монголия	VU	↓
Камышовый кот – <i>F. chaus</i>	3-16	Северная Африка, Индокитай, Шри-Ланка	LC	↓
Род Пантера – <i>Panthera</i>				
Тигр – <i>P. tigris</i>	65-306	Азия	EN	↓
Леопард – <i>P. pardus</i>	23-91	Африка, Азия	VU	↓
Ягуар – <i>P. onca</i>	30-121	Южная Африка, центральная Америка	NT	↓
Ирбис – <i>P. uncia</i>	25-75	Азия	VU	↓
Лев – <i>P. leo</i>	120-250	Африка, Азия	VU	↓
Род Южноамериканские кошки – <i>Leopardus</i>				
Оцелот – <i>L. pardalis</i>	8-18	Американские континенты	LC	↓

Продолжение таблицы 12

Виды	Масса, кг	Ареал обитания	Статус	Численность
Онцилла – <i>L. tigrinus</i>	1.5-3	Центральная, Южная Америка	VU	↓
Андская кошка – <i>L. jacobita</i>	Около 4	Южная Америка	EN	↓
Пампасская кошка – <i>L. colocolo</i>	3-7	Центральная, Южная Америка	NT	↓
Длиннохвостая кошка – <i>L. wiedii</i>	2.6-4	Центральная, Южная Америка	NT	↓
Кошка Жоффруа – <i>L. geoffroyi</i>	2-5	Южная Америка	LC	—
Южный Тигровый кот – <i>L. guttulus</i>	1.9-2.4	Южная Америка	VU	↓
Чилийская кошка – <i>L. guigna</i>	2-2.5	Южная Америка	VU	↓
Род Рыси – <i>Lynx</i>				
Рыжая рысь – <i>L. rufus</i>	4-18	Северная Америка	LC	—
Пиренейская рысь – <i>L. pardinus</i>	9-27	Юг Европы	EN	↑
Обыкновенная рысь – <i>L. lynx</i>	18-30	Европа, Азия	LC	—
Канадская рысь – <i>L. canadensis</i>	8-18	Северная Америка	LC	—
Род Восточные кошки – <i>Prionailurus</i>				
Кошка-рыболов – <i>P. viverrinus</i>	5-16	Южная, Юго-Восточная Азия	VU	↓
Бенгальская кошка – <i>P. bengalensis</i>	3-7	Южная, Восточная Азия	LC	—

## Продолжение таблицы 12

Виды	Масса, кг	Ареал обитания	Статус	Численность
Ржавая кошка – <i>P. rubiginosus</i>	0.9-1.6	Индия, Шри-Ланка	NT	↓
Суматранская кошка – <i>P. planiceps</i>	1.5-2.5	Борнео, Суматра, Малайя	EN	↓
Род Каракалы – <i>Caracal</i>				
Каракал – <i>C. caracal</i>	9-18	Африка, Арабия, Азия	LC	–
Золотая кошка – <i>C. aurata</i>	5.5-16	Западная, Центральная Африка	VU	↓
Род Гепарды – <i>Acynonux</i>				
Гепард – <i>C. jubatus</i>	35-72	Африка, Средний Восток	VU	↓
Род Дымчатые леопарды – <i>Neofelis</i>				
Дымчатый леопард – <i>N. nebulosa</i>	15-23	Азия	VU	↓
Борнейский дымчатый леопард – <i>N. diardi</i>	15-30	Азия	VU	↓
Род Сервалы – <i>Leptailurus</i>				
Сервал – <i>L. serval</i>	7-18	Африка	LC	—
Род Котопумы - <i>Catopuma</i>				
Калимантанская кошка – <i>C. badia</i>	3-4	Борнео	EN	↓
Кошка Темминка – <i>C. temminckii</i>	9-16	Юго- восточная Азия	NT	↓
Род <i>Pardofelis</i>				

## Продолжение Таблицы 12

Мраморная кошка – <i>P. marmorata</i>	2-5	Южная, Юго- восточная Азия	NT	↓
Род Манулы – <i>Otocolobus</i>				
Манул – <i>O. manul</i>	2.5-4.5	От Ирана до Китая	LC	↓
Род <i>Herpailurus</i>				
Ягуарунди – <i>H. yagouarundi</i>	3.5-10	Американские континенты	LC	↓
Род Пумы – <i>Puma</i>				
Пума – <i>P. concolor</i>	29-100	Американские континенты	LC	↓

Примечание:

LC – least concern (вызывающие наименьшее опасение), NT – near threatened (близкие к уязвимому положению), VU – vulnerable (уязвимые), EN – endangered (вымирающие)

снижение численности: ↓ увеличение численности: ↑ стабильная численность —