

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Оценка компетентности к развитию ооцит-кумулюсных комплексов *Sus scrofa domesticus* (L.) после интра- и экстраовариальной витрификации

Т.И. Кузьмина, И.В. Чистякова 

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального исследовательского центра животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия
 prof.kouzmina@mail.ru;  itjere7@gmail.com

Аннотация. Цель настоящей работы – идентификация влияния экстра- (ЭОВ) и интраовариальной витрификации (ИОВ) на митохондриальную активность (МА), состояния хроматина в ооцитах свиней в процессе созревания *in vitro*. При ЭОВ ооциты свиней обрабатывали растворами криопротекторов (КПР): КПР-1 – 0.7 М диметилсульфоксида (ДМСО) + 0.9 М этиленгликоля (ЭГ); КПР-2 – 1.4 М ДМСО + 1.8 М ЭГ; КПР-3 – 2.8 М ДМСО + 3.6 М ЭГ + 0.65 М трегалозы. При ИОВ фрагменты яичников опускали в КПР-1 – 7.5 % ЭГ + 7.5 % ДМСО, затем в КПР-2 – 15 % ЭГ, 15 % ДМСО и 0.5 М сахарозы. Пайеты с ооцитами и фрагменты яичников погружали и хранили в LN₂. Для девитрификации ЭОВ ооциты экспонировали в 0.25, 0.19 и 0.125 М растворах трегалозы, ИОВ – в 0.5 и 0.25 М трегалозы. Ооциты культивировали в среде NCSU-23 с 10 % жидкости фолликулов, их стенками, гормонами. Все среды дополняли 0.001 % наночастиц высокодисперсного кремнезема (Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины, Украина). Режимы оплодотворения и культивирования эмбрионов представлены нами в методических рекомендациях. Митохондриальную активность и статус хроматина оценивали MitoTracker Orange CMTMRos и цитогенетическим методом. Выявлены достоверные различия в уровне ооцитов с высокоэкспандированным кумулюсом между контрольной и витрифицированными группами (81 % против 59 и 52 % соответственно, $p \leq 0.001$). Доля пикнотических клеток у нативных ооцитов составила 19 %, у ЭОВ и ИОВ ооцитов – 39 и 49 % соответственно. Стадии метафазы II достигли 86 % нативных ооцитов, и только 48 % ЭОВ и 33 % ИОВ ооцитов завершили созревание ($p \leq 0.001$). Отмечена достоверная разница в МА между группами, подвергнутыми ИОВ и ЭОВ (89.4 ± 7.5 и 149.2 ± 11.3 мкА соответственно, $p < 0.05$). Впервые получены доимплантационные эмбрионы из ооцитов свиней, подвергнутых интраовариальной витрификации.
Ключевые слова: ооцит; витрификация; экстраовариальная; интраовариальная; митохондрии; *Sus scrofa domesticus* (L.).

Для цитирования: Кузьмина Т.И., Чистякова И.В. Оценка компетентности к развитию ооцит-кумулюсных комплексов *Sus scrofa domesticus* (L.) после интра- и экстраовариальной витрификации. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(6):613-619. DOI 10.18699/VJ21.069

Evaluation of developmental competence of *Sus scrofa domesticus* (L.) oocyte-cumulus complexes after intra- and extraovarian vitrification

T.I. Kuzmina, I.V. Chistyakova 

All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals – Branch of L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Pushkin, St. Petersburg, Russia
 prof.kouzmina@mail.ru;  itjere7@gmail.com

Abstract. The aim of the present study was to identify the influence of extra- (EOV) and intraovarian vitrification (IOV) on mitochondrial activity (MA) and chromatin state in porcine oocytes during maturation *in vitro*. During EOV porcine oocytes were exposed in cryoprotective solutions (CPS): CPS-1 – 0.7 M dimethyl sulfoxide (DMSO) + 0.9 M ethylene glycol (EG); CPS-2 – 1.4 M DMSO + 1.8 M EG; CPS-3 – 2.8 M DMSO + 3.6 M EG + 0.65 M trehalose. At IOV the ovarian fragments were exposed in CPS-1 – 7.5 % EG + 7.5 % DMSO, then in CPS-2 – 15 % EG, 15 % DMSO and 0.5 M sucrose. Straws with oocytes and ovarian fragments were plunged into LN₂ and stored. For devitrification, the EOV oocytes were washed in solutions of 0.25 M, 0.19 M and 0.125 M of trehalose, the IOV – in 0.5 M and 0.25 M trehalose. Oocytes were cultured in NCSU-23 medium with 10 % fluid of follicles, follicular walls, hormones. 0.001 % of highly dispersed silica nanoparticles (ICP named after A.A. Chuyko of the NAS of Ukraine) were added to all media. The methods of fertilization and embryo culture are presented in the guidelines developed by us. MA and chromatin state were measured by MitoTracker Orange CMTMRos and the cytogenetic method. Significant differences in the level of oocytes with high-expanded cumulus between control and experimental vitrified groups (81 % versus

59 % and 52 %, respectively, $p \leq 0.001$) were observed. The percentage of pyknotic cells in native oocytes was 19 %, EOY or IOY oocytes were 39 % and 49 %, respectively. After culture, the level of matured native oocytes was 86 %, 48 % EOY and 33 % IOY cells finished the maturation ($p \leq 0.001$). Differences were also observed in the level of MA between groups treated by EOY and IOY ($89.4 \pm 7.5 \mu\text{A}$ and $149.2 \pm 11.3 \mu\text{A}$, respectively, $p \leq 0.05$). For the first time, pre-implantation embryos were obtained from oocytes treated by IOY.

Key words: oocyte; vitrification; extraovarian; intraovarian; mitochondria; *Sus scrofa domesticus* (L.).

For citation: Kuzmina T.I., Chistyakova I.V. Evaluation of developmental competence of *Sus scrofa domesticus* (L.) oocyte-cumulus complexes after intra- and extraovarian vitrification. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(6):613-619. DOI 10.18699/VJ21.069

Введение

Разработка метода витрификации для криоконсервации репродуктивных клеток – наиболее значимое достижение для вспомогательных репродуктивных технологий человека и животных в последние 70 лет (Coello et al., 2018). Однако за более чем полувековые исследования этой области результаты по получению жизнеспособных эмбрионов из девитрифицированных ооцитов остаются неоднозначными (Mullen, Fahy, 2012). В первую очередь, это связано с медленно развивающимся прогрессом в области модернизации протоколов (параметров) экстра- или интраовариальной технологии замораживания/оттаивания (Yurchuk et al., 2018).

При экстраовариальной витрификации женских гамет с применением открытых систем замораживания, таких как соломины, криотопы, криолупы, насыщение клеток криопротекторами достигается за короткие сроки при сравнительно невысоком времени экспозиции в витрифицирующих растворах, так же как и переход клеток в витрифицированное состояние. При закрытой интраовариальной (внутрифолликулярной) системе время экспозиции в криопротекторах значительно увеличивается, а скорость перехода воды в ооцитах в «стеклоподобную» фазу медленнее из-за повышения точки эвтектики (Obata et al., 2018). За счет удлинения времени фазового перехода воды возникает опасность образования вне- и внутриклеточного льда, оказывающего повреждающее действие на клетки (Амстиславский и др., 2015). Однако при использовании открытого способа витрификации существует риск инвазивирования витрифицируемой среды и ооцит-кумулясных комплексов, что впоследствии может повлиять на компетентность клеток к оплодотворению и последующему эмбриональному развитию (Joaquim et al., 2017). В таком случае интраовариальная витрификация может стать альтернативной закрытой системой, нивелирующей воздействие резистентных криогенных микроорганизмов и грибов на ткани яичника и ооциты (Bielanski, 2012). Между тем применение обеих моделей витрификации предполагает возникновение температур- и осмотически-зависимых повреждений субклеточных компартментов половых и соматических клеток (Buderatska, Petrushko, 2016).

Наиболее чувствительными органеллами являются цитоскелет, митохондрии и ядерный аппарат, которые играют важную роль в процессе пролиферации соматических клеток, а также созревания и дальнейшего развития женских гамет (Lai et al., 2014). В результате криогенных фазово-структурных переходов и перекисного окисления аннулярных липидов барьерные свойства митохондриальной мембраны нарушаются, происходит утечка транс-

портируемых ионов, в том числе Ca^{2+} и H^{+} , и метаболитов как через систему активного транспорта, так и путем пассивной диффузии через трансмембранные эффекты (неспецифические поры высокой проницаемости), которая обуславливает снижение энергоснабжения ооцита в период развития и способствует возникновению условий для запуска реакций апоптоза (Кузьмина и др., 2019). Низкотемпературное повреждение ядерного аппарата ооцитов характеризуется главным образом снижением его матричной активности (синтеза ДНК и РНК), вследствие криоденатурации и потери функциональной активности ферментов (Pereira et al., 2019).

Таким образом, создание оптимальной и эффективной технологии витрификации, способной максимально сохранить архитектуру и функциональную активность клеточных компартментов, которые обеспечивают формирование яйцеклетки, компетентной к оплодотворению, – одна из основных задач, стоящих перед репродуктологами и криобиологами, занимающимися проблемами низкотемпературного сохранения половых клеток.

Цель настоящей работы – идентифицировать характер влияния различных моделей (экстра- и интраовариальной) витрификации на функциональную активность митохондрий (интенсивность флуоресценции MitoTracker Orange CMTRos) и статус хроматина в нативных и девитрифицированных ооцитах *Sus scrofa domesticus* (L.) при экстракорпоральном созревании женских гамет и развитие из них доимплантационных эмбрионов.

Материалы и методы

Все реагенты, задействованные при выполнении экспериментов, за исключением обозначенных в тексте, – производства компании Sigma-Aldrich (США). Пластиковая лабораторная посуда – фирмы BD Falcon™ (США).

В экспериментах использовали ооцит-кумулясные комплексы (ОКК), аспирированные из антральных фолликулов яичников *S. scrofa domesticus* (L.) (свинья домашняя) породы ландрас. Яичники свиней после овариоэктомии животных доставляли в лабораторию в 0.9 % растворе NaCl при температуре 30–35 °С, содержащем антибиотики. Для экспериментов брали ооциты, окруженные не менее чем пятью компактными слоями кумулюсных клеток с равномерной по ширине зоной пеллюцида гомогенной ооплазмы. Денудированные ооциты и ооциты с рыхлым кумулюсом не брали.

Клетки, предназначенные для экстраовариальной витрификации, обрабатывали тремя растворами криопротекторов (КПА), приготовленными на основе среды ТС-199 с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС, HyClone, Великобритания): КПА-1 – 0.7 М диметилсуль-

фосфида (ДМСО)+0.9 М этиленгликоля (ЭГ); КПА-2 – 1.4 М ДМСО+1.8 М ЭГ; КПА-3 – 2.8 М ДМСО+3.6 М ЭГ+0.65 М трегалозы. Ооцит-кумуляные комплексы поэтапно экспонировали в течение 30 с в КПА-1, затем 30 с в КПА-2 и 20 с – в КПА-3. При интраовариальной витрификации препарированные яичники животных делили на 6–8 секций (15×20 мм), помещали в стерильные марлевые мешочки и опускали в растворы КПА, приготовленные на основе фосфатного буферного раствора Дюльбекко (ФБР) с добавлением 20 % ФБС: КПА-1 – 7.5 % ЭГ+7.5 % ДМСО (15 мин), затем в КПА-2 – 15 % ЭГ, 15 % ДМСО и 0.5 М сахарозы (2 мин). Пайеты с ооцитами и стерильные марлевые мешочки с фрагментами яичников погружали в сосуды Дьюара с LN₂ (–196 °С) не менее чем на 1 ч. Экстраовариально витрифицированные ОКК извлекали из пайет после оттаивания и экспонировали в 0.25 М растворе трегалозы (3 мин) на основе среды ТС-199 с добавлением 10 % ФБС при 37 °С, отмывали последовательно в 0.19 М растворе (3 мин) и затем в 0.125 М растворе трегалозы (3 мин). Аспирированные ооциты из фрагментов после оттаивания последовательно обрабатывали 0.5 М (1 мин) и 0.25 М (5 мин) растворами трегалозы, приготовленными на основе ФБР с 20 % содержанием ФБС. Финальную отмывку клеток проводили в среде ТС-199 с добавлением 10 % ФБС. Все среды для витрификации/девитрификации дополняли наночастицами высокодисперсного кремнезема (нВДК) в концентрации 0.001 % (Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины, Украина). При выборе концентрации руководствовались данными, полученными разработчиками (Галаган и др., 2010).

Нативные и девитрифицированные ОКК культивировали в атмосфере с 5 % CO₂ при 90 % влажности, температуре 38 °С, в среде North Carolina State University-23 (NCSU-23), в которую добавляли 10 % фолликулярной жидкости (из фолликулов диаметром 3–6 мм), 10 МЕ хорионического гонадотропина человека, 10 МЕ хорионического гонадотропина лошади, фрагменты стенок фолликулов (размером 600×900 мкм), 50 мкг/мл гентамицина и 0.001 % наночастиц ВДК (Abeydeera et al., 1998). Режимы оплодотворения ооцитов и культивирования эмбрионов представлены в методических рекомендациях (Кузьмина и др., 2008).

Для оценки митохондриальной активности в нативных и девитрифицированных ооцитах применяли флуоресцентный зонд MitoTracker Orange CMTRos (ThermoFisher Scientific, Великобритания). Ооцит-кумуляные комплексы помещали в капли 500 нМ раствора зонда и инкубировали в темноте при температуре 37 °С 30 мин. Затем ооциты отмывали в ФБР с добавлением 0.3 % бычьего сывороточного альбумина. Отмытые ооциты очищали от кумулюсных клеток путем инкубации в 0.1 % растворе трипсина при 37 °С в течение 5–10 мин, переносили в раствор Хенкса, содержащий 3.7 % параформальдегида, затем фиксировали (15 мин, 37 °С). После фиксации ооциты отмывали в ФБР, помещали на стекла Super frost.

Для анализа статуса хроматина очищенные (от кумулюса) ооциты и клетки кумулюса помещали на 5–10 мин в теплый 0.9 % гипотонический раствор 3-замещенного цитрата натрия. Затем клетки фиксировали смесью мета-

нола и уксусной кислоты (3:1). Суховоздушные препараты окрашивали 4 % раствором Романовского–Гимзе 3–4 мин (Tarkowski, 1966).

Измерение интенсивности флуоресценции MitoTracker Orange CMTRos и оценку ядерного созревания в нативных и девитрифицированных ооцитах, уровня пикноза в клетках кумулюса проводили с помощью микроскопа Axio Imager A2 (Carl Zeiss, Германия) и фотометра (Nikon, Германия). Длины волн возбуждения для MitoTracker Orange CMTRos – 554 нм, излучения – 576 нм. Интенсивность флуоресценции MitoTracker Orange CMTRos измеряли в мкА.

Результаты обрабатывали с помощью статистической программы SigmaStat (Jandel Scientific Software, США). Данные представлены как средние значения (М) и стандартные ошибки средних (± SEM), а также в виде частотных переменных значений. Для оценки достоверности различий между значениями использовали *t*-критерий Стьюдента и критерий χ^2 Пирсона. Значимость различий оценивали при следующих уровнях: $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ и $p \leq 0.001$ для трех-пяти независимых экспериментов.

Результаты и обсуждение

Трудности в создании эффективных методов замораживания яйцеклеток обусловлены прежде всего структурно-функциональными особенностями организации ооцита, а также внутри- и межклеточными сигнальными взаимодействиями в девитрифицированных ооцитах (Moussa et al., 2014).

В наших исследованиях выявлено, что доля интактных ооцитов, окруженных высокоэкспандированным кумулюсом, значительно превышала таковые в группах, где культивировали ооциты, предварительно девитрифицированные, независимо от модели витрификации (81 % против 59 и 52 % соответственно, $p \leq 0.001$) (рис. 1 и 2). Достоверных различий между группами ооцитов, витрифицированных вне (экстра-) или внутри (интра-) фрагментов яичника, по вышеуказанному показателю не наблюдалось (см. рис. 1). Анализ деструктивных процессов в кумулюсных клетках нативных и девитрифицированных ооцитов продемонстрировал значительные различия по уровню пикнозов в представленных группах (см. рис. 1). Наименьшие показатели деструкции хроматина клеток кумулюса обнаружены в контрольной нативной группе (19 %). Достоверных различий между долями клеток кумулюса с пикнотическими ядрами, окружающими экстра- или интраовариально девитрифицированные ооциты, не установлено (39 и 49 % соответственно).

В процессе культивирования девитрифицированных и интактных ооцитов *in vitro* показано, что после экстраовариальной витрификации 68 % клеток реиницировали мейоз, при интраовариальной витрификации этот показатель составил 58 %, что оказалось значительно ниже, чем в группе нативных ооцитов (89 %, $p \leq 0.001$) (рис. 3 и 4). Около половины ооцитов, витрифицированных экстраовариально (49 %), достигли завершающей стадии созревания (метафаза II), при интраовариальной витрификации доля созревших клеток была 33 %, при этом эти показатели оказались достоверно ниже процента завершающих свое созревание нативных клеток (86 %, $p \leq 0.001$).

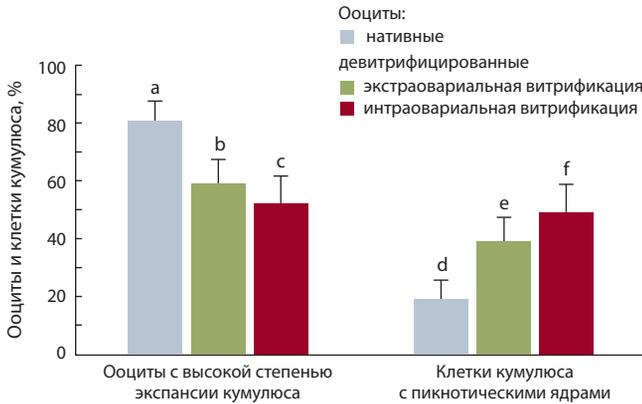


Рис. 1. Анализ показателей криорезистентности соматических клеток фолликула (кумулюс) *S. scrofa domestica* (L.) при использовании различных моделей витрификации (интра- и экстраовариальная, количество ооцитов – 379, число экспериментов – 3).

Статистическая значимость различий (критерий χ^2 Пирсона): a,b; a,c; d,f $p \leq 0.001$; d,e $p \leq 0.01$.

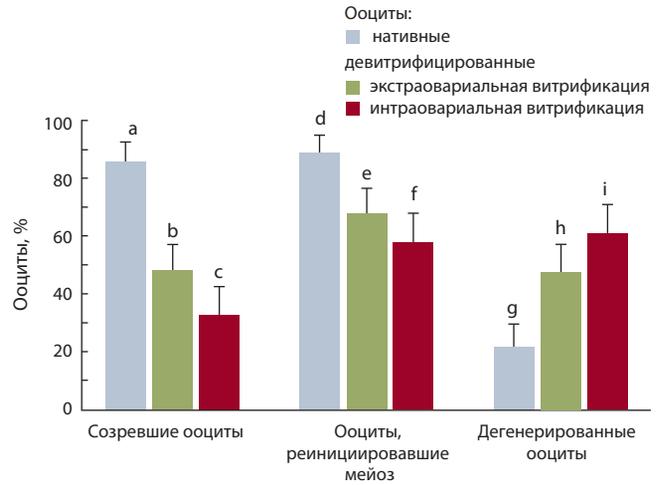


Рис. 3. Статус хроматина нативных и девитрифицированных ооцитов *S. scrofa domestica* (L.) после культивирования *in vitro* при использовании различных моделей витрификации (интра- и экстраовариальная, количество ооцитов – 323; число экспериментов – 3).

Статистическая значимость различий (критерий χ^2 Пирсона): a,b; a,c; d,e; d,f; g,h; g,i $p \leq 0.001$; b,c $p \leq 0.05$.

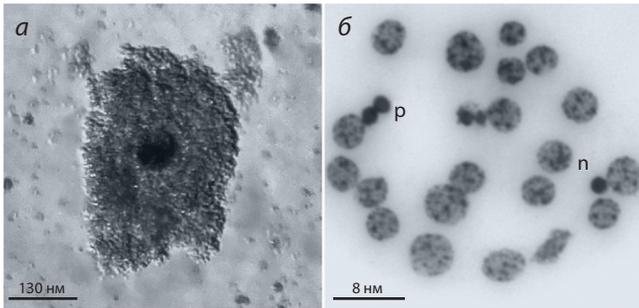


Рис. 2. Ооцит-кумулюсный комплекс с высокой степенью экспансии кумулюсных клеток (a) и клетки кумулюса *S. scrofa domestica* (L.) с нормальными, n, и пикнотическими, p, ядрами (b) после экстраовариальной витрификации.

$p \leq 0.001$). Доля клеток с признаками деструкции хроматина достигла 22 % среди нативных ооцитов, 48 % – среди экстра- и 61 % – среди интраовариально витрифицированных ооцитов свиней ($p \leq 0.001$).

Митохондрии обеспечивают клетку аденозинтрифосфатом, необходимым для завершения мейотического созревания, особенности их функционирования – один из биомаркеров функционального состояния гаметы и ее качества (Al-Zubaidi et al., 2019). В группе интраовариально витрифицированных ооцитов митохондриальный потенциал (интенсивности флуоресценции MitoTracker Orange CMTMRos) был значительно снижен по сравнению с ооцитами, витрифицированными экстраовариально (89.4 ± 7.5 против 149.2 ± 11.3 мкА соответственно, $p \leq 0.05$) (рис. 5 и 6). В группе нативных ооцитов показатель интенсивности флуоресценции MitoTracker Orange CMTMRos составил 161.2 ± 10.8 мкА.

Во всех экспериментальных группах были получены эмбрионы, в том числе и на завершающей стадии доимплантационного развития – стадии бластоцисты (рис. 7 и 8). После оплодотворения экспериментальных групп ооцитов доли раздробившихся клеток при экстра- и

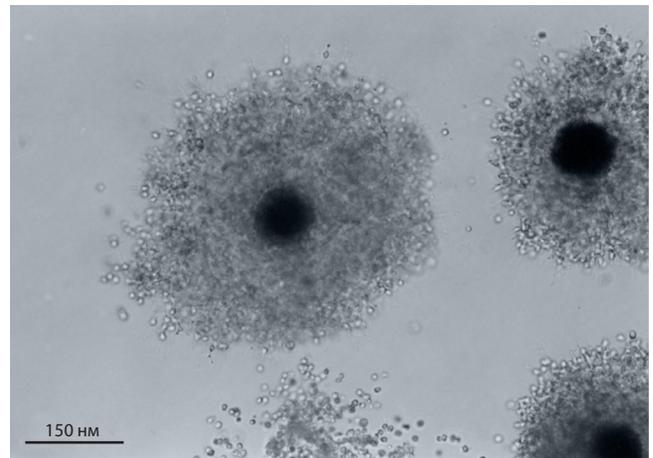


Рис. 4. Интраовариально витрифицированные ооциты *S. scrofa domestica* (L.) после 44 ч культивирования *in vitro*.

интраовариальной витрификации составили 27 и 21 % соответственно, что все же оказалось достоверно ниже процента оплодотворенных клеток в интактной нативной группе (49 %, $p \leq 0.001$). Выход эмбрионов свиней на стадиях поздней морулы, бластоцисты, развившихся из ооцитов, витрифицированных интра- и экстраовариально, составил 5 и 8 % соответственно.

Основным из косвенных признаков, по которому можно судить о зрелости и компетентности ооцита к развитию, является степень экспансии кумулюсных клеток (Spricigo et al., 2011). В проведенном нами анализе степени экспансии кумулюсных клеток после 44 ч культивирования нативных и девитрифицированных ооцитов *S. scrofa domestica* (L.) показано, что наибольшее количество ооцитов, обладающих низкой степенью экспансии, находится среди экстра- или интраовариально витрифицированных

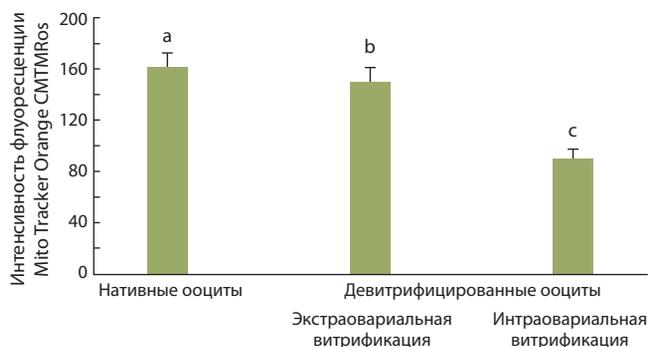


Рис. 5. Интенсивность флуоресценции MitoTracker Orange CMTMRos в нативных и девитрифицированных ооцитах *S. scrofa domestica* (L.) ($M \pm SEM$, количество ооцитов – 103, число экспериментов – 3).

Статистическая значимость различий (t-критерий Стьюдента):
a;c; b:c $p \leq 0.05$.

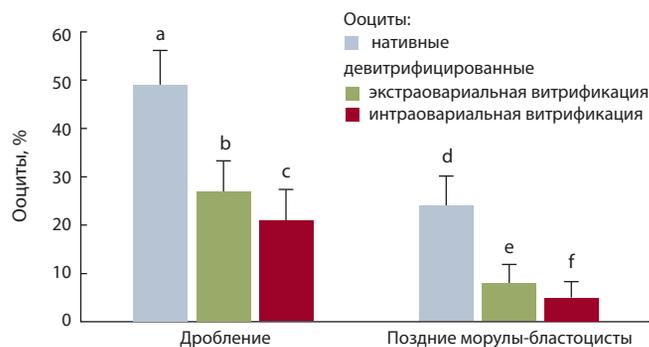


Рис. 7. Развитие доимплантационных эмбрионов *S. scrofa domestica* (L.), полученных из девитрифицированных ооцитов (количество ооцитов – 556, число экспериментов – 3).

Статистическая значимость различий (критерий χ^2 Пирсона):
a;c; d:f $p \leq 0.001$; a;b; d:e $p \leq 0.01$.

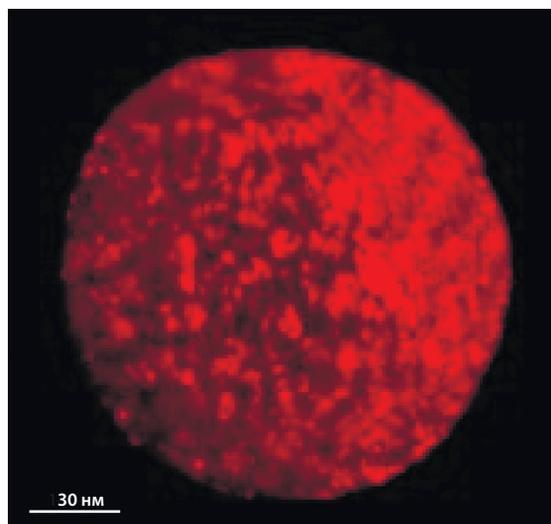


Рис. 6. Ооцит *S. scrofa domestica* (L.) с высокой степенью интенсивности флуоресценции MitoTracker Orange CMTMRos после экстраовариальной витрификации.

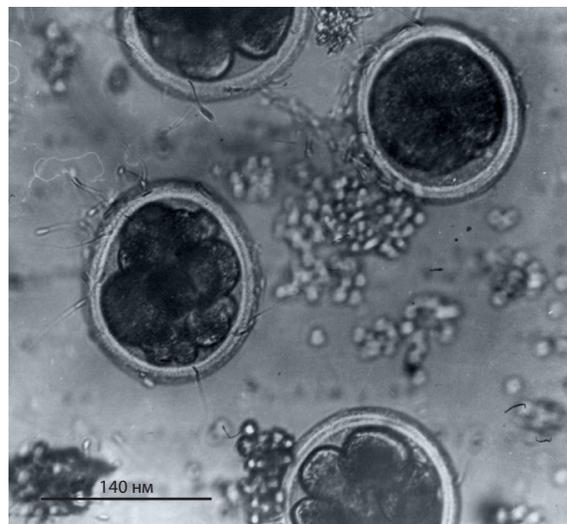


Рис. 8. Раздробившиеся эмбрионы, полученные из экстраовариально витрифицированных ооцитов *S. scrofa domestica* (L.).

ооцитов в сравнении с контрольной интактной группой (59 и 52 % против 86 %, $p \leq 0.001$). При обработке ооцитов свиней сверхнизкими температурами происходит снижение степени экспансии клеток кумулюса из-за повреждения так называемых «трансзональных мостов», образованных щелевыми контактами и осуществляющих коммуникацию за счет передачи паракринных сигналов (Appelant et al., 2017). Усиление процесса пикнотизации ядер девитрифицированных клеток кумулюса можно объяснить тем, что в процессе криоконсервации (а именно дегидратации клетки при обработке растворами криопротекторов) наблюдается чрезмерная конденсация хромосом, приводящая к «сморщиванию» клеточного ядра, которое обуславливает снижение числа нормально функционирующих клеток кумулюса (Wei et al., 2016; Kokotsaki et al., 2018).

Клетки кумулюса обеспечивают поступление в ооцит циклического гуанозин-монофосфата, который предотвращает разрушение циклического аденозин-монофосфата

цАМФ через ингибирование его гидролиза фосфодиэстеразой PDE3A (Mehlmann, 2005), и таким образом, поддерживает арест первого мейотического деления на стадии профазы I. При последующем снижении уровня цАМФ и активации фактора, способствующего созреванию (maturation promoting factor, MPF) за счет дефосфорилирования *p34cdc2* и синтеза циклина В происходит стимуляция реинициации мейоза (Yang et al., 2010). В наших исследованиях показано, что при использовании обеих моделей витрификации (экстра- или интраовариальной) отмечается ингибирование реинициации мейоза у более чем половины девитрифицированных ооцитов (см. рис. 2), что может быть обусловлено термозависимым разрывом связи клеток кумулюса с ооцитом и, как следствие, нарушением концентрационного баланса внутриклеточного цАМФ (Mehlmann, 2005).

В течение культивирования экстра- или интраовариально витрифицированных ооцитов резко снижается доля созревших ооцитов с нормальным хроматином, возраст

тает уровень клеток с дегенерацией хроматина по сравнению с такими показателями контрольной группы, что по-видимому, опосредовано разрушением нуклеотидов, появлением одно- и двухнитевых разрывов ДНК (Pereira et al., 2019). Возрастание количества дегенерированных клеток во время культивирования также может быть обусловлено смещением равновесия между полимеризацией и деполимеризацией анафазного веретена в процессе прохождения ооцитами стадий метафазы I и анафазы, последующим нарушением его сборки, которое влияет на сегрегацию хромосом при первом мейотическом делении (Yang et al., 2012).

При воздействии ультранизких температур ввиду повышения цитозольной концентрации ионов Ca^{2+} в клетке митохондрии подвергаются чрезмерной нагрузке ионизированной формой Ca^{2+} (Shahsavari et al., 2019). В результате такой нагрузки открываются неспецифические поры высокой проницаемости (НПВП), что неизбежно ведет к гибели ооцитов по апоптотическому механизму (Новодережкина и др., 2016). Определяющую роль в открытии НПВП при заморозке играет окислительный стресс, опосредованный накоплением активных форм кислорода, который приводит к разрушению структуры мембранных белков и снижению трансмембранного потенциала митохондрий (Заводник, 2016).

Таким образом, снижение митохондриального потенциала при воздействии сверхнизких температур на митохондрии в процессе витрификации может быть связано с увеличением концентрации активных форм кислорода и, как следствие, повышением уровня внутриклеточного Ca^{2+} и образованием НПВП. Значительное снижение митохондриальной активности в группе интраовариально витрифицированных ооцитов, по сравнению с экстраовариально витрифицированными, может быть обусловлено дополнительными процессами рекристаллизации тканей ввиду недостаточности насыщения тканей яичников криопротекторами (Кузьмина, Чистякова, 2020).

Снижение процента раздробившихся клеток и выхода эмбрионов из интра-/экстраовариально витрифицированных ооцитов, возможно, связано с тем, что в процессе криоконсервации ооцитов при обработке криопротекторами и замораживания происходит временный подъем внутриклеточной концентрации ионов кальция в ооцитах (Larman et al., 2006), что приводит к экзоцитозу кортикальных гранул (Kline D., Kline J.T., 1992) и преждевременному уплотнению зоны пеллюциды, препятствующему оплодотворению яйцеклетки.

Заключение

Криобанки как источники биологического сырья имеют большое значение для последующего использования ооцитов животных или их оопластов в клеточной и генетической инженерии, в частности в широко практикуемой методике геномного редактирования CRISPR-cas9, а также в сохранении генофонда исчезающих пород и генетического разнообразия. Разработка эффективной технологии витрификации на основе применения различных подходов, в том числе использования веществ различного (природного или синтетического) происхо-

ждения, обладающих криопротекторными свойствами, – одно из основных практических направлений развития репродуктивной биологии.

В нашем исследовании проанализированы показатели ядерно-цитоплазматического созревания донорских ооцитов, подвергнутых воздействию сверхнизких температур, в том числе статус хроматина и уровень митохондриальной активности гамет. Выявленные особенности в функционировании обозначенных выше клеточных компарментов позволили дополнить имеющиеся в литературе данные о характере деструктивных процессов, проводимых процедурами витрификации/девитрификации. Воздействие сверхнизких температур обусловило снижение уровня ооцитов, завершивших ядерное созревание, и уменьшение интенсивности флуоресценции MitoTracker Orange CMTMRos (маркера функциональной активности митохондрий).

Продемонстрирована также важность коммуникации ооцита с соматическими клетками овариального фолликула (кумулюс). Морфология кумулюсных клеток после процедуры (витрификация/девитрификация) во многом определяла «судьбу» самого ооцита – завершение ядерного созревания (достижение ооцитом стадии метафазы II) и функциональную активность митохондрий. Представленные в работе протоколы интра- и экстраовариальной витрификации/девитрификации, модернизированные введением в состав криопротекторных и культуральных сред наночастиц высокодисперсного кремнезема, позволили впервые получить доимплантационные эмбрионы свиней (*S. scrofa domestica* (L.)) из фрагментов девитрифицированных яичников.

Список литературы / References

- Амстиславский С.Я., Брусенцев Е.Ю., Окотруб К.А., Рожкова И.Н. Криоконсервация эмбрионов и гамет для сохранения генетических ресурсов лабораторных животных. *Онтогенез*. 2015;46(2): 67-81. DOI 10.7868/S0475145015020020.
[Amstislavsky S.Y., Brusentsev E.Y., Rozhkova I.N., Okotrub K.A. Embryo and gamete cryopreservation for genetic resources conservation of laboratory animals. *Russ. J. Dev. Biol.* 2015;46(2):47-59. DOI 10.1134/S1062360415020022.]
- Галаган Н.П., Клименко Н.Ю., Орел И.Л., Новикова Е.А., Туров В.В. Биофункциональные наноматериалы на основе высокодисперсного кремнезема, белка и аминокислот. *Biopolym. Cell.* 2010;26(3):205-213. DOI 10.7124/bc.000158.
[Galagan N.P., Klymenko N.Y., Orel I.L., Novikova E.A., Turov V.V. Biofunctional nanomaterials based on ultrafine silica, protein and aminocarbohydrates. *Biopolym. Cell.* 2010;26(3):205-213. DOI 10.7124/bc.000158.]
- Заводник И.Б. Митохондрии, кальциевый гомеостаз и кальциевая сигнализация. *Биомед. химия*. 2016;62(3):311-317. DOI 10.18097/PBMC20166203311.
[Zavodnik I.B. Mitochondria, calcium homeostasis and calcium signaling. *Biomeditsinskaya Khimiya = Biomedical Chemistry*. 2016; 62(3):311-317. DOI 10.18097/PBMC20166203311. (in Russian)]
- Кузьмина Т.И., Альм Х., Торнер Х. Методы получения эмбрионов свиней *in vitro*: методические рекомендации. СПб., 2008.
[Kuzmina T.I., Alm H., Tomer H. Methods of Porcine Embryo Production *in vitro*. St. Petersburg, 2008. (in Russian)]
- Кузьмина Т.И., Епишко О.А., Усенбеков Е.С. Влияние витрификации на митохондриальную активность ооцитов свиней при созревании *in vitro*. *Ветеринария*. 2019;4:38-41. DOI 10.30896/0042-4846.2019.22.4.38-41.

- [Kuzmina T.I., Epishko O.A., Usenbekov E.S. Effect of vitrification on mitochondrial activity of oocytes during *in vitro* maturation. *Veterinariya = Veterinary*. 2019;4:38-41. DOI 10.30896/0042-4846.2019.22.4.38-41. (in Russian)]
- Кузьмина Т.И., Чистякова И.В. Оценка компетентности к развитию ооцитов *Bos taurus* после интра- или экстраовариальной витрификации. *Достижения науки и техники АПК*. 2020;34(2):61-64. DOI 10.24411/0235-2451-2020-10213.
- [Kuzmina T.I., Chistyakova I.V. Assessment of competence for the development of *Bos taurus* oocytes after intra- or extraovarial vitrification. *Dostizheniya Nauki i Tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC*. 2020;34(2):61-64. DOI 10.24411/0235-2451-2020-10213. (in Russian)]
- Новодережкина Е.А., Животовский Б.Д., Гогвадзе В.Г. Индукция неспецифической проницаемости митохондриальной мембраны и ее роль в гибели клеток. *Молекуляр. биология*. 2016;50(1):51-68. DOI 10.7868/S002689841601016X.
- [Novoderezhkina E.A., Zhivotovsky B.D., Gogvadze V.G. Induction of unspecific permeabilization of mitochondrial membrane and its role in cell death. *Mol. Biol.* 2016;50(1):43-58. DOI 10.1134/S0026893316010167.]
- Abeydeera L.R., Wang W.H., Cantley T.C., Prather R.S., Day B.N. Presence of beta-mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured *in vitro* and the rate of blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Theriogenology*. 1998;50:747-756. DOI 10.1016/S0093-691X(98)00180-0.
- Al-Zubaidi U., Liu J., Cinar O., Robker R.L., Adhikari D., Carroll J. The spatio-temporal dynamics of mitochondrial membrane potential during oocyte maturation. *Mol. Hum. Rep.* 2019;25(11):695-705. DOI 10.1093/molehr/gaz055.
- Appeltant R., Somfai T., Santos E.C.S., Dang-Nguyen T.Q., Nagai T., Kikuchi K. Effects of vitrification of cumulus-enclosed porcine oocytes at the germinal vesicle stage on cumulus expansion, nuclear progression and cytoplasmic maturation. *Reprod. Fertil. Dev.* 2017;29(12):2419-2429. DOI 10.1071/RD16386.
- Bielanski A. A review of the risk of contamination of semen and embryos during cryopreservation and measures to limit cross-contamination during banking to prevent disease transmission in ET practices. *Theriogenology*. 2012;77(3):467-482. DOI 10.1016/j.theriogenology.2011.07.043.
- Buderatska N.O., Petrushko M.P. Oocytes as alternative to embryos in cryopreservation applied in assisted reproductive technologies. *Probl. Cryobiol. Cryomed.* 2016;26(4):375-382. DOI 10.15407/cryo26.04.375.
- Coello A., Pellicer A., Cobo A. Vitrification of human oocytes. *Minerva Ginecol.* 2018;70(4):415-423. DOI 10.23736/S0026-4784.18.04218-1.
- Joaquim D.C., Borges E.D., Viana I.G.R., Navarro P.A., Vireque A.A. Risk of contamination of gametes and embryos during cryopreservation and measures to prevent cross-contamination. *BioMed Res. Int.* 2017;4:1-11. DOI 10.1155/2017/1840417.
- Kline D., Kline J.T. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev. Biol.* 1992;149:80-89. DOI 10.1016/0012-1606(92)90265-i.
- Kokotsaki M., Mairhofer M., Schneeberger C., Marschalek J., Pietrowski D. Impact of vitrification on granulosa cell survival and gene expression. *Cryobiology*. 2018;85:73-78. DOI 10.1016/j.cryobiol.2018.09.006.
- Lai D., Ding J., Smith G.W., Smith G.D., Takayama S. Slow and steady cell shrinkage reduces osmotic stress in bovine and murine oocyte and zygote vitrification. *Hum. Rep.* 2014;30(1):37-45. DOI 10.1093/humrep/deu284.
- Larman M.G., Sheehan C.B., Gardner D.K. Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes. *Reproduction*. 2006;131:53-61. DOI 10.1530/rep.1.00878.
- Mehlmann L.M. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*. 2005;130(6):791-799. DOI 10.1530/rep.1.00793.
- Moussa M., Shu J., Zhang X., Zeng F. Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: current problems and future perspective. *Sci. China Life Sci.* 2014;57(9):903-914. DOI 10.1007/s11427-014-4689-z.
- Mullen S.F., Fahy G.M. A chronologic review of mature oocyte vitrification research in cattle, pigs, and sheep. *Theriogenology*. 2012;78:1709-1719. DOI 10.1016/j.theriogenology.2012.06.008.
- Obata R., Nakamura Y., Okuyama N., Sasaki C. Comparison of residual dimethyl sulfoxide (DMSO) and ethylene glycol (EG) concentration in bovine ovarian tissue during warming steps between slow freezing and vitrification. *Cryo Lett.* 2018;39(4):251-254. PMID: 30963170.
- Pereira B.C., Ortiz I., Dorado J.M., Diaz-Jimenez M.A., Consuegra C., Gosalvez J., Hidalgo M. Effect of permeable cryoprotectant-free vitrification on DNA fragmentation of equine oocyte-cumulus cells. *Reprod. Domest. Anim.* 2019;54(3):53-56. DOI 10.1111/rda.13491.
- Shahsavari M.H., Moghaddam G., Daghighi Kia H. Effects of new synthetic cryoprotectant agents on histological characteristics of various classes of vitrified bovine pre-antral follicles. *Vet. Res. Forum*. 2019;10(1):9-16. DOI 10.30466/vrf.2019.34306.
- Spricigo J., Rumpf R., Dode M.A.N. Vitrification of bovine oocytes: effect of the meiotic stage on nuclear and cytoplasmic maturation. *Biol. Reprod.* 2011;85(1):721. DOI 10.1093/biolreprod/85.s1.721.
- Tarkowski A.K. An air-drying method for chromosomal preparation from mouse eggs. *Cytogenetic*. 1966;1:394-400.
- Wei J.H., Yuan X.Y., Zhang J.M., Wei J.Q. Caspase activity and oxidative stress of granulosa cells are associated with the viability and developmental potential of vitrified immature oocytes. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2016;198:22-26. DOI 10.1016/j.ejogrb.2015.12.010.
- Yang C.R., Miao D.Q., Zhang Q.H., Guo L., Tong J.S., Wei Y., Huang X., Hou Y., Schatten H., Liu Z., Sun Q.Y. Short-term preservation of porcine oocytes in ambient temperature: novel approaches. *PLoS One*. 2010;5(12):e14242. DOI 10.1371/journal.pone.0014242.
- Yang C.R., Wei Y., Qi S.T., Chen L., Zhang Q.H., Ma J.Y., Luo Y.B., Wang Y.P., Hou Y., Schatten H., Liu Z.H., Sun Q.Y. The G protein coupled receptor 3 is involved in cAMP and cGMP signaling and maintenance of meiotic arrest in porcine oocytes. *PLoS One*. 2012;7(6):e38807. DOI 10.1371/journal.pone.0038807.
- Yurchuk T., Petrushko M., Fuller B. Science of cryopreservation in reproductive medicine – Embryos and oocytes as exemplars. *Early Hum. Dev.* 2018;126:6-9. DOI 10.1016/j.earlhumdev.2018.08.016.

ORCID ID

T.I. Kuzmina orcid.org/0000-0002-4218-6080
I.V. Chistyakova orcid.org/0000-0001-7229-5766

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Министерства высшего образования и науки Российской Федерации (№ 0445-2021-0005 и 121052600350-9).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 27.04.2021. После доработки 15.06.2021. Принята к публикации 17.06.2021.