

Т. И. Кузьмина, Н. О. Соколова

Анализ показателей криорезистентности кумулюса ооцитов *Ovis Aries* после интра- или экстра-овариальной витрификации

Аннотация.

Цель: идентификация эффектов наночастиц высокодисперсного кремнезема на показатели криорезистентности клеток кумулюса (уровень экспансии и статус хроматина) ооцитов *Ovis Aries* в условиях интра- или экстраовариальной витрификации.

Материалы и методы. Ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК), предназначенные для ЭОВ, обрабатывали растворами криопротекторов (КПА), приготовленных на ТС-199 с 10% ФБС (фетальной бычьей сывороткой): КПА-1-0.7 М диметилсульфоксид (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. ОКК поэтапно экспонировали в течение 30 сек в КПА-1, 30 сек в КПА-2 и 20 сек в КПА-3. При ИОВ яичники животных делили на фрагменты и помещали в стерильных марлевых емкостях в КПА, приготовленных на основе Дюльбекко (PBS) с 20% ФБС: КПА-1 - 7,5% ЭГ + 7,5% ДМСО (25 мин), затем в КПА-2 - 15% ЭГ, 15% ДМСО и 0,5 М сахарозы (15 мин). В КПА и среды для оттаивания опытных групп вносили 0,001% нВДК (ИХП им. А.А. Чуйко НАН Украины). Пайеты с биоматериалом хранили в жидком азоте не менее 24 часов. ОКК извлекали из пайет после оттаивания и помещали последовательно на 3 мин: в 0,25 М раствор трегалозы в Т-199 с 10% ФБС при 37°C, затем в 0,19 М и, наконец, в 0,125 М трегалозу. ОКК из оттаянных фрагментов последовательно обрабатывали 0,5 М (1 мин) и 0,25 М (5 мин) растворами сахарозы в PBS с 20% ФБС. Финальную отмывку всех ОКК проводили в ТС-199 с 10% ФБС.

Результаты. Результаты морфологического (характер ооцит-кумулюсных коммуникаций) и цитологического мониторинга (статус хроматина клеток кумулюса) выявили положительный эффект 0,001% нВДК на показатели криорезистентности ОКК как при ЭОВ, так и ИОВ. Доля клеток с компактным кумулюсом в группе ЭОВ гамет с использованием нВДК значительно превысило таковую в их отсутствии (69% против 51%, $P<0,05$). Аналогичная тенденция обнаружена при ИОВ (35% против 20%, $P<0,05$). Уровень апоптотических (TUNEL-test) клеток в группе ЭОВ (44% против 32%, $P<0,05$) и ИОВ (72% против 51%, $P<0,001$) гамет резко снижался при введении в состав криопротекторных сред нВДК, а доля пикнотических клеток уменьшилась при ЭОВ (с 31% до 21%, $P<0,05$), при ИОВ (с 58% до 41%, $P<0,05$). В целом полученные результаты свидетельствуют о целесообразности использования 0,001% нВДК в протоколах ИОВ и ЭОВ женских гамет *Ovis Aries*.

Ключевые слова: кумулюс; витрификация; пикноз; апоптоз; наночастицы высокодисперсного кремнезема; *Ovis Aries*

Авторы:

Кузьмина Татьяна Ивановна — доктор биологических наук, профессор; e-mail: prof.kouzmina@mail.ru;

Соколова Наталья Олеговна — научный сотрудник; e-mail: natalita-natalita@mail.ru.

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных - филиал ФГБНУ «ФИЦ животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»; 196601, Россия, г. Санкт-Петербург, п. Тярлево, Московское шоссе, 55а.

Введение. Криоконсервация генетического материала, включая ооциты, сперму и эмбрионы, имеет первостепенное значение для совершенствования вспомогательных репродуктивных технологий, интенсификации внедрения методов клеточной и генетической инженерии в практику животноводства, сохранения генофонда и генетического разнообразия существующих и исче-

зающих пород [1, 2]. В то время, как технологии криоконсервации сперматозоидов и эмбрионов крупного рогатого скота разработаны и достаточно широко используются в разведении и селекции, результаты по криоконсервации женских гамет у жвачных, особенно у мелких жвачных, не столь успешны [3]. Витрификация, как метод сверхбыстрого охлаждения и нагревания ооци-

тов, в настоящее время считается стандартным способом криоконсервации ооцитов домашнего скота. У мелких жвачных витрификация ооцитов все еще считается относительно новым способом, а эффективный стандартный метод витрификации ооцитов *Ovis Aries* еще предстоит разработать. Криорезистентность у ооцитов животных значительно ниже, чем у зиготы или эмбрионов на более поздних стадиях развития. Во время завершения фазы роста ооцит млекопитающих становится самой крупной клеткой организма, диаметр которой составляет около 120 мкм. Размер ооцита, а также специфика локализации интрацитоплазматических компартментов в цитоплазме влекут за собой значительные проблемы для разработки эффективной методики криоконсервации женских гамет.

На результаты витрификации ооцитов млекопитающих влияют многие факторы: модель витрификации (интра- или экстраовариальная), состав криопротекторных агентов, качество донорских ооцитов, их функциональное состояние в момент витрификации (растущий или завершивший фазу роста), стадия мейотического созревания гаметы, наличие или отсутствие кумулюсных клеток, видовые особенности метаболизма, например, накопление липидов в ооцитах свиней [4, 5]. Все вышеперечисленные факторы следует учитывать при разработке эффективных моделей витрификации и их видовой адаптации, чтобы оптимизировать методы и адаптировать их к ооцитам различных видов животных.

Витрификация женских гамет осуществляется в комплексе со структурными компонентами овариальных фолликулов — клетками кумулюса. Клетки кумулюса поддерживают непрерывные и реципрокные связи с ооцитом и участвуют в мейотическом созревании ооцитов, обеспечивая приобретение ими компетенции к оплодотворению [6, 7]. Учитывая их важность в процессе созревания ооцитов, определяющем, априори, качество эмбрионов, морфологические показатели функционирования кумулюсных клеток обычно используются в клеточных репродуктивных технологиях как один из критериев для оценки компетентности к развитию как нативных, так и девитрифицированных ооцитов [8]. Сохранение жизнеспособности и функциональной активности клеток кумулюса после воздействия сверхнизких температур обеспечивает завершение формирования яйцеклетки *in vitro*.

Модернизация этапов технологии витрификации/девитрификации путем введения наночастиц различных химических элементов — это стремительно развивающийся раздел био- и нанотехно-

логий, основывающийся на ряде свойств наночастиц, способствующих снижению криоповреждающего действия сверхнизких температур на биологические объекты [9-11]. В настоящее время известны криозащитные эффекты наночастиц высокодисперсного кремнезема на жизнеспособность соматических и половых клеток овариальных фолликулов *Bos Taurus*, *Sus scrofa domestica* и развивающихся из них эмбрионов [12, 13].

Цель исследований — идентификация эффектов наночастиц высокодисперсного кремнезема на показатели криорезистентности клеток кумулюса (уровень экспансии и статус хроматина) ооцитов *Ovis Aries* в условиях интра- или экстраовариальной витрификации.

Материалы и методы. Материалом для исследований служили ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК), выделенные из антральных фолликулов яичников овец *post mortem*. ОКК аспирировали из фолликулов диаметром от 3 до 8 мм. Для витрификации использовали ооциты с гомогенной цитоплазмой, окружённые 5- и более слоями кумулюсных клеток. ОКК, предназначенные для ЭОВ, обрабатывали растворами криопротекторов (КПА), приготовленных на ТС-199 с 10% ФБС (фетальной бычьей сыворотки): КПА-1-0.7 М диметилсульфоксид (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. ОКК поэтапно экспонировали в течение 30 секунд в КПА-1, 30 секунд в КПА-2 и 20 секунд в КПА-3. При ИОВ яичники животных делили на фрагменты (1/2 часть) и помещали в стерильных марлевых емкостях (мешочках) в КПА, приготовленных на основе Дюльбекко (PBS) с 20% ФБС: КПА-1 - 7,5% ЭГ + 7,5% ДМСО (25 мин), затем в КПА-2 — 15% ЭГ, 15% ДМСО и 0,5 М сахарозы (15 минут). В КПА и среды для оттаивания опытных групп вносили 0,001% нВДК (ИХП им. А. А. Чуйко НАН Украины).

При выборе концентрации основывались на данных, представленных разработчиками [14]. Пайеты с биоматериалом хранили в жидком азоте не менее 24 часов. ОКК извлекали из пайет после оттаивания и помещали последовательно на 3 мин при 37°C: в 0,25 М раствор трегалозы в ТС-199 с 10 % ФБС, затем в 0,19 М и, наконец, в 0,125 М трегалозу. ОКК из оттаянных фрагментов последовательно обрабатывали 0,5 М (1 мин) и 0,25 М (5 мин) растворами сахарозы в PBS с 20 % ФБС. Финальную отмывку всех ОКК проводили в ТС-199 с 10 % ФБС.

Уровень клеток кумулюса с ядрами в состоянии пикноза оценивали методом Тарковского [15]. С этой целью ооцит-кумулюсные комплексы

помещали на 5-10 мин в теплый (37°C) 0,9 %-ный гипотонический раствор 3-х замещенного цитрата натрия и с помощью препаровальной иглы механически очищали гаметы от кумулюса (ооциты). Затем клетки кумулюса индивидуально от каждого ооцита переносили на сухое обезжиренное стекло, фиксировали смесью метанола (ХЧ, Химмед, Россия) и уксусной кислоты (ХЧ, Химмед, Россия) в соотношении 3:1. Высушенные препараты окрашивали 4%-ым раствором Романовского—Гимза (азур-эозин) в течение 3-4 минут и обрабатывали 70% этанолом (ХЧ, Химмед, Россия).

Подсчет уровня пикнозов проводили в 100 клетках кумулюса от каждого ооцита. Определение апоптозов в клетках кумулюса проводили в следующей последовательности: помещали на покрытые poly-L-lysine предметные стекла и подсушивали на воздухе; фиксировали в растворе формалина в течение 30 мин; промывали в PBS (Sigma); помещали на 2 мин в 10% раствор Тритона X-100 на 0,1% цитрате натрия; отмывали в PBS (Sigma). Затем добавляли к клеткам реактив TUNEL (Kit from Boehringer Mannheim Cat.No.1684795) и инкубировали в темноте в течение 60 мин при 37°C.

После инкубации клетки отмывали в PBS и инкубировали в 1 мг/мл растворе пропидиум йодида, вновь промывали в PBS, оставляли в темноте при комнатной температуре на 1 час, затем помещали в холодильник и хранили в горизонтальном положении до микроскопирования. Об-

разцы анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Carl Zeiss Axio Imager A 2m.

Все использованные в исследовании реагенты, за исключением обозначенных, производства фирмы Sigma-Aldrich. Эксперименты проводили в 3-5 повторностях. Для сравнения результатов использовали критерии χ^2 -тест (статистическая программа Sigma Stat). Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали при трех уровнях значимости: $P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$.

Результаты и обсуждение. Начальный этап технологии получения нативных или реконструированных эмбрионов *in vitro* из девитрифицированных ооцитов животных — культивирование донорских ооцитов в синтетических питательных средах, смоделированных в соответствии с имеющимися сведениями о физиологии созревания женской гаметы. В фолликуле ооцит формируется в тесной коммуникации половой и соматических клеток. В литературе нет сведений об успешном культивировании ооцитов, лишенных клеток кумулюса. В результате воздействия сверхнизких температур разрушаются ооцит-кумулюсные связи. На рис. 1 представлены данные, характеризующие морфологию кумулюса и целостность ооцит-кумулюсных коммуникаций при различных способах витрификации: экстра- или интраовариальной.

Так как для культивирования пригодны лишь ооциты с многослойным компактным кумулюсом с не менее, чем 5-6 слоями клеток, одним из конт-

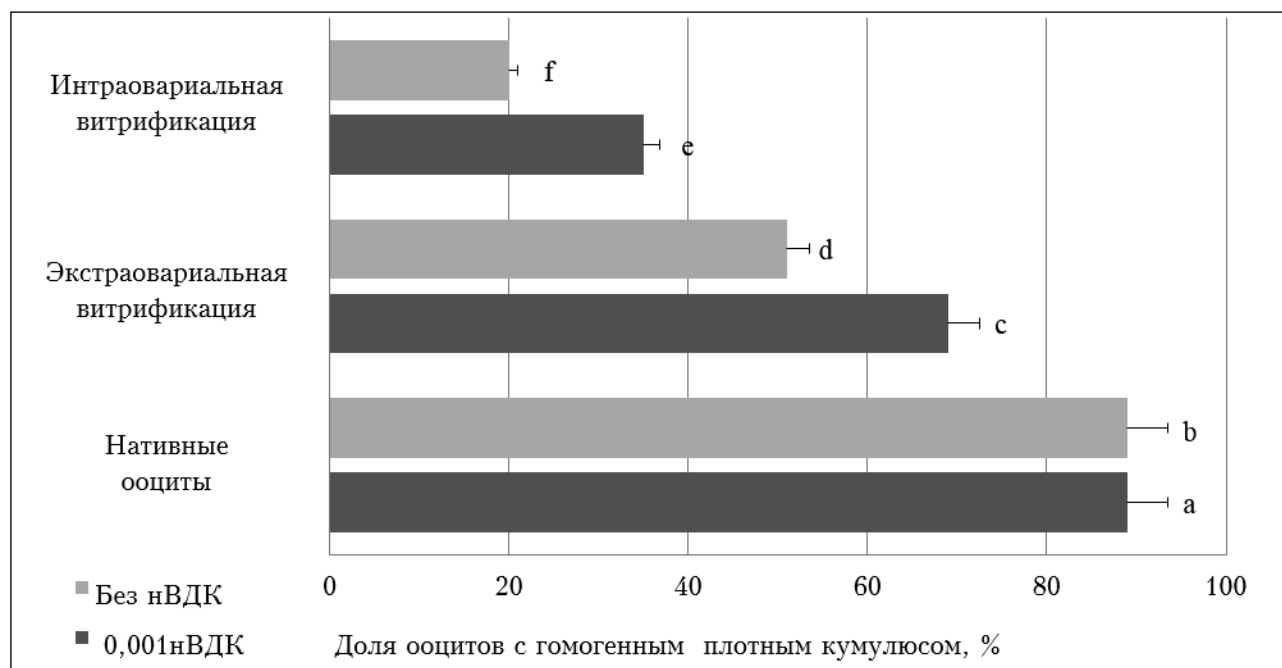


Рис. 1. Морфологии клеток кумулюса после интра- или экстраовариальной витрификации (число ооцитов - 734, 5 повторностей). a:c; a:e;b:d; b:f;d:f $P < 0,001$; c:d; e:f;c:e $P < 0,05$ (критерий χ -квадрат).

ролируемых параметров оценки исследуемым способом витрификации служил уровень (%) ОКК с вышеуказанными показателями пригодности гамет для культивирования. Доля ОКК (89 %) с положительными качественными характеристиками в контрольной группе (нативные ооциты) значительно превышала долю ооцитов в группах экстра- (51 %) и интраовариально (20 %) витрифицированных ооцитов ($P < 0.01$).

Введение в криопротекторные среды 0.001 % нВДК значительно увеличило уровень девитрифицированных ооцитов с гомогенным плотным кумулюсом в группе интра- (с 20 % до 35 %, $P < 0.05$) и экстра- (с 51 % до 69 %, $P < 0.05$) овариально витрифицированных женских гамет.

Значительные различия по морфологии окружающих ооциты клеток кумулюса выявлены между группами ОКК витрифицированных экстра- или интра-овариально. Условия ИОВ пагубно сказались на криорезистентности донорских ооцитов, что выражалось в резком увеличении доли частично и полностью денудированных ооцитов и ооцитов с рыхлым кумулюсом и включениями. Доля клеток с вышеуказанными патологиями в этой группе эксперимента составила 80 %.

Воздействию сверхнизких температур подвергаются также и структурные компартменты соматических клеток овариальных фолликулов, в частности, хроматин ядра. Анализ дегенерационных процессов хроматина кумулюса посвящена следующая серия экспериментов настоящего исследования. На рис. 2 представлены

результаты оценки уровня апоптотических клеток в кумулюсе, подвергшихся интра- или экстраовариальной витрификации. Использование обеих моделей витрификации спровоцировало резкий подъем уровня апоптотических клеток, при ИОВ - с 17 % в контроле до 72 % ($P < 0.001$), при ЭОВ - с 17 % в контроле до 44 % ($P < 0.001$). Введение в протоколы витрификации нВДК способствовало повышению криорезистентности кумулюсных клеток, вне зависимости от модели витрификации. Так, уровень апоптотических клеток, подвергшихся ЭОВ, при применении нВДК снизился с 44 % до 32 % ($P < 0.05$), а в группе клеток, витрифицированных интраовариально, с 72 % до 51 % ($P < 0.001$).

Результаты оценки популяции кумулюсных клеток после витрификации с учетом доли клеток в состоянии пикноза представлены на рис. 3. В обеих экспериментальных группах отмечен высокий уровень клеток с ядрами в состоянии пикноза по сравнению с популяцией клеток кумулюса в контроле. Так, в группе интраовариально витрифицированных клеток уровень пикнотических клеток составил 58 %, а при экстраовариальной витрификации достиг лишь 31 % ($P < 0.001$). Положительно сказалось введение в криопротекторные среды 0,001 % нВДК. При этом доля пикнотических клеток в популяции, подвергнутой ИОВ, снизилась с 58 % до 41 % ($P < 0.05$), а в группе ЭОВ клеток вышеуказанный показатель уменьшился на 10 % (31 % против 21 %, $P < 0.05$). Эффекты воздействия сверхнизких температур вызывают полифункциональные

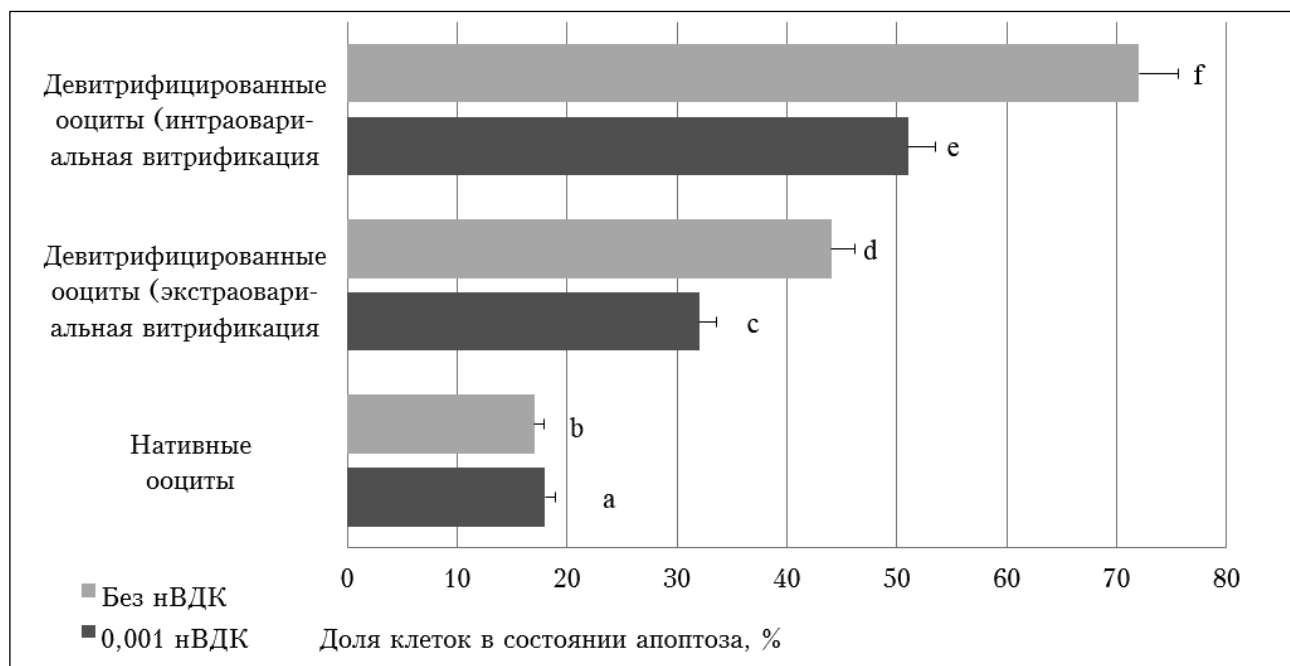


Рис. 2. Апоптотические процессы в клетках кумулюса ооцитов овец при интра- или экстраовариальной витрификации (число клеток кумулюса - 34800, 3 повторности). a:e; b:d; b:f; e; d:f $P < 0.001$, a:c; c:e; c:d $P < 0.05$ (критерий χ^2 -квадрат).

ответы клеточных органелл. Так, нарушение коммуникации ооцит-кумулюс индуцирует повреждения «трансоновых мостов», образованных щелевыми контактами и осуществляющих коммуникацию за счет передачи паракринных сигналов [16]. Увеличение доли клеток в состоянии пикноза, вероятно, обуславливается дегидратацией клетки, что приводит к патологической конденсации хромосом [17, 18]. Резкий рост апоптотических процессов в группе ИОВ клеток может являться результатом значительного снижения митохондриальной активности, по сравнению с ЭОВ, ввиду недостаточности насыщения тканей яичников криопротекторами [19, 20].

Снижение митохондриального потенциала при воздействии сверхнизких температур на митохондрии в процессе витрификации может быть связано с увеличением концентрации активных форм кислорода. В связи с вышеизложенным, положительное влияние нВДК на показатели криорезистентности кумулюсных клеток, обнаруженное в нашем исследовании, может найти объяснение с учетом его антиоксидантных свойств.

Закключение. Разработка эффективной технологии витрификации генетических ресурсов (орган, ткань, клетка) на основе использования инновационных материалов, в т.ч. и наночастиц различных элементов, с акцентом на их потенциальных возможностях как криопротекторных агентов — актуальная проблема эмбриотехнологий и криобиологии. Использование нВДК в составе криопротекторных и культуральных сред обеспечило увеличение доли девитрифицированных как интра-, так и экстра- ооцитов с гомогенным, плотным кумулюсом, снижение доли апоптотических и пикнотических клеток. Представленные в настоящем исследовании данные, свидетельствующие о возможности сохранения жизнеспособности соматических клеток овариальных фолликулов овец и позитивном влиянии нВДК на показатели криорезистентности (коммуникация комплекса ооцит-кумулюс, деструктивные изменения хроматина клеток кумулюса), свидетельствуют о комплексном эффекте нВДК на функционирование клеточных компартов в условиях сверхнизких температур.

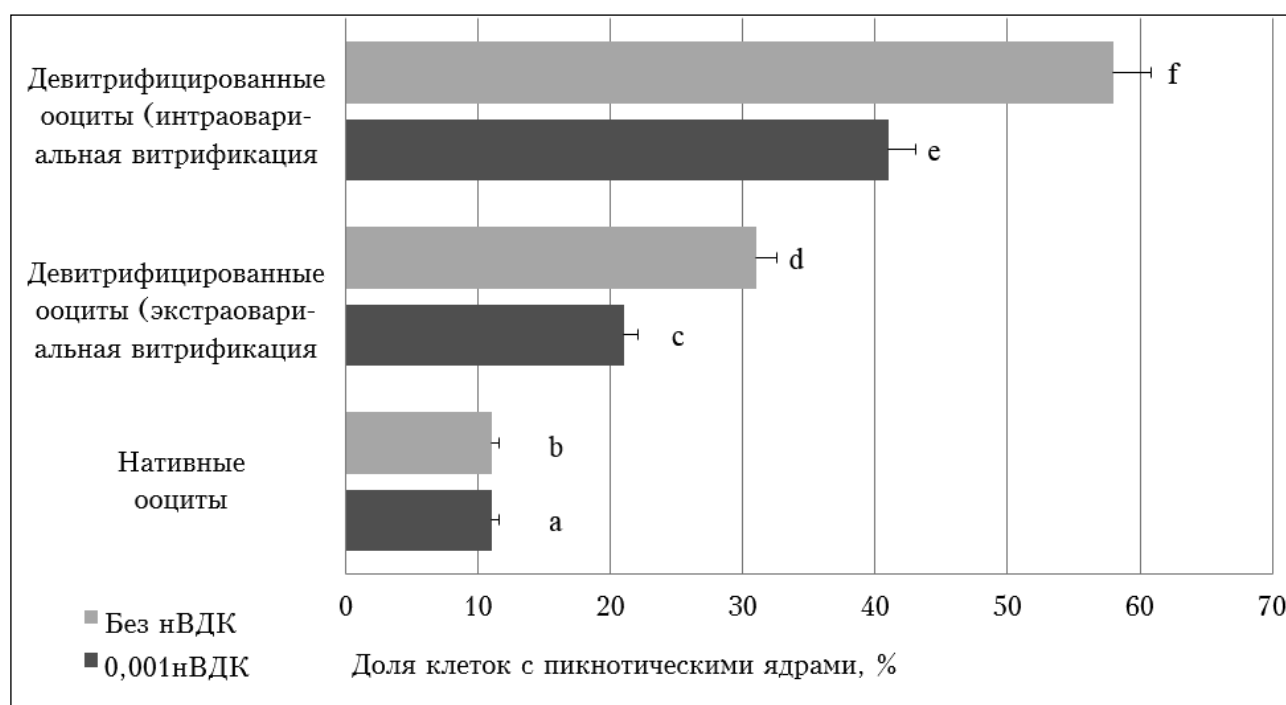


Рис. 3. Статус хроматина в клетках кумулюса после интра- или экстраовариальной витрификации (число клеток кумулюса - 73100, 3 повторности). a:e; b:f; d:f; c:e $P < 0,001$ a:c; b:d; e:f: c:d $P < 0,05$ (критерий χ^2 -квадрат).

Исследования проведены в рамках выполнения Госзадания Минобрнауки РФ по теме 0445-2021-0005

Литература

1. Hiemstra S. J. The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies / Hiemstra S. J., T. van der Lende, Woelders H. // The role of Biotechnology. — Villa Gualino, Turin, Italy — 2005. — P. 25-36.

2. Fryc K. Morphokinetic changes in vitrified and non-vitrified in vitro derived ovine embryos / K. Fryc, A. Nowak, B. Kij-Mitka, J. Kochan, P. M. Bartlewski, M. Murawski // Theriogenology. — 2022. — Vol. 187. — P. 58-63. doi: 10.1016/j.tdoi.org/ 10.1016/ j. theriogenology. 2022.04.027.
3. Falchi L. Embryo biotechnologies in sheep: Achievements and new improvements / L. Falchi, S. Ledda, M. T. Zedda // Reprod in Domestic Animals. — 2022. — Vol. 47(5). — P. 865-871.
4. Moawad A. R. Campbell Caffeine and oocyte vitrification: Sheep as an animal model / A. R. Moawad, I. Choi, J. Zhu, A. Abou Bakr, E. L. Wishy, D. Amarnath, W. Chen, H. S. Keith // International Journal of Veterinary Science and Medicin. — 2018. — P. 41-48. doi: 10.1016/j.ijvsm.2018.01.004.
5. Tharasanit T. Oocyte cryopreservation in domestic animals and humans: principles, techniques and updated outcomes / T. Tharasanit, P. Thuwanut // Animals. — 2021. — Vol. 11. — P. 2949.
6. Robert C. Nurturing the egg: the essential connection between cumulus cells and the oocyte / C. Robert // Reproduction, Fertility and Development. — 2022. — Vol. 34(1-2). — P. 149-159.
7. Marchais M. Mammalian cumulus oocyte complex communication: a dialog through long and short distance messaging / M. Marchais, I. Gilbert, A. Bastien, A. Macaulay, C. Robert // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. — 2022. — Vol. 39(5). — P. 1011-1025. doi.org/ 10.1007/ s10815 – 022 – 02438 – 8.
8. Maside C. Oocyte morphometric assessment and gene expression profiling of oocytes and cumulus cells as biomarkers of oocyte competence in sheep / C. Maside, I. Sanchez-Ajoferin, D. Medina-Chavez, B. Alves, J. J. Garde and A. J. Soler // Animals. — 2021. — Vol. 11(10). — P. 2818. doi.org/ 10.3390/ ani11102818.
9. Liberman A. Synthesis and surface functionalization of silica nanoparticles for nanomedicine / A. Liberman, N. Mendeza, W. C. Troglerrb, and A. C. Kummelb // Surf Sci Rep. — 2014. — Vol. 69 (2-3). — P. 132-158. doi: 10.1016/j.surfrep.2014.07.001.
10. Shi Xi Chena Silver nanoparticles induce oocyte maturation in zebrafish (*Danio rerio*) / Shi Xi Chena, Xiao Zhen Yanga, Ying Denga, Jing Huang, Yan Lib, Qian Sunb, Chang-Ping Yub, Yong Zhua, and Wan Shu Honga // Chemosphere. — 2017. — Vol. 170. — P. 51-60. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.12.016.
11. Lucas Caroline G. Applications of omics and nanotechnology to improve pig embryo production in vitro / Lucas Caroline G., Paula R. Chen, Fabiana K. Seixas, Randall S. Prather, Tiago Collares // Mol Reprod Dev. — 2019. — Vol. 86(11). — P. 1531-1547. doi:10.1002/mrd.23260.
12. Кузьмина Т. И. Влияние витрификации на статус хроматина ооцит-кумулюсных комплексов *Sus Scrofa Domestica* / Т. И. Кузьмина, Т. И. Станиславович // Генетика и разведение животных. — 2019. — №1. — С. 27-33. doi: 10.31043/2410-2733-2019-1-27-33.
13. Кузьмина Т. И. Влияние наночастиц высокодисперсного кремнезёма на апоптоз в нативных и девитрифицированных клетках гранулёзы овариальных фолликулов *Bos Taurus* / Т. И. Кузьмина, И. В. Чистякова // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. — 2019. — № 3 (43). — С. 8-12.
14. Галаган Н. П. Влияние дисперсности нанокремнеземов на их биоактивность по отношению к гаметам быка / Н. П. Галаган, В. М. Гунько, Н. Г. Порхун, Е. А. Новикова, В. В. Туров // Доповіді Національної академії наук України. — 2012. — № 5. — С. 126-133.
15. Tarkowski A. An air-drying method for chromosomal preparation from mouse eggs / A. Tarkowski // Cytogenetic. — 1966. — Vol. 1 — P. 394-400.
16. Appeltant R. Effects of vitrification of cumulus-enclosed porcine oocytes at the germinal vesicle stage on cumulus expansion, nuclear progression and cytoplasmic maturation / R. Appeltant, T. Somfai, E. C. S. Santos, T. Q. Dang-Nguyen, T. Nagai, K. Kikuchi // Reprod. Fertil. Dev. — 2017. — Vol. 29(12). — P. 2419-2429.
17. Wei J. H. Caspase activity and oxidative stress of granulosa cells are associated with the viability and developmental potential of vitrified immature oocytes / J. H. Wei, X. Y. Yuan, J. M. Zhang, J. Q. Wei // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. — 2016. — Vol. 198. — P. 22-26. doi: 10.1016/j.ejogrb. 2015.12.010.
18. Kokotsaki M. Impact of vitrification on granulosa cell survival and gene expression / M. Kokotsaki, M. Mairhofer, C. Schneeberger, J. Marschalek, D. Pietrowski // Cryobiology. — 2018. — Vol. 85. — P. 73-78. doi: 10.1016/j.cryobiol. 2018.09.006.
19. Кузьмина Т. И. Оценка компетентности к развитию ооцит-кумулюсных комплексов *Sus Scrofa Domestica* (L.) после интра- и экстраовариальной витрификации / Т. И. Кузьмина, И. В. Чистякова // Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2021. — Т. 25(6). — С. 613-619.
20. Кузьмина Т. И. Функциональная активность митохондрий и статус хроматина нативных и девитрифицированных ооцитов *Bos Taurus* под воздействием наночастиц высокодисперсного кремнезёма / Т. И. Кузьмина, И. В. Чистякова, Д. Н. Татарская // Сельскохозяйственная биология. — 2020. — Т. 55. — № 4. — С. 784-793. doi: 10.15389/agrobiol.2020.4.784rus.

Kuzmina T., Sokolova N.

Analysis of cryoresistance of cumulus of *Ovis Arias* oocytes after intra- or extra-ovarian vitrification

Abstract.

The **aim** of this study was to identify the effects of highly dispersed silica nanoparticles (HDSNs) on the cryoresistance of *Ovis Arias* cumulus of oocytes in conditions of intra-(IOV) or extra-(EOV) ovarian vitrification.

Materials and methods. Cumulus-oocyte complexes (COC) intended for EOV were treated with solutions of cryoprotectants (CPA) prepared on TC-199 with 10% FBS (fetal bovine serum): CPA-1-0.7 M dimethyl sulfoxide (DMSO) + 0.9 M ethylene glycol (EG); CPA-2-1.4 M DMSO + 1.8 M EG; CPA-3- 2.8 M DMSO + 3.6 M EG + 0.65 M trehalose. The COC was gradually exposed for 30 seconds in CPA-1, 30 seconds in CPA-2, and 20 seconds in CPA-3. At the IOV, the ovaries of the animals were divided into fragments and placed in sterile gauze containers in CPAs prepared on the basis of Dulbecco (PBS) with 20% FBS: CPA-1 - 7.5% EG + 7.5% DMSO (25 min), then in CPA-2 - 15% EG+15% DMSO + 0.5 M sucrose (15 min). 0.001% HDSNs (A.A. Chuiko ICP of the National Academy of Sciences of Ukraine) were added to the CPAs and media for thawing of the experimental groups. The straws with the biomaterial were stored in liquid nitrogen for at least 24 hours. The COCs were removed from the straws after thawing and placed successively at 3 min: in a 0.25 M solution of trehalose in TC-199 with 10% FBS at 37°C, then in 0.19 M, and finally in 0.125 M trehalose. COCs from the thawed fragments were sequentially treated with 0.5 M (1 min) and 0.25 M (5 min) solutions of sucrose in PBS with 20% FBS. The final washing of all COCs was carried out in TC-199 with 10% FBS.

Results. The results of morphological (the character of oocyte-cumulus communications) and cytological monitoring (the status of cumulus cells chromatin) revealed a positive effect of 0.001% HDSNs on the parameters of cryoresistance of COC both at EOV and IOV. The proportion of cells with compact cumulus in the group of EOV of gametes with HDSNs significantly exceeded that in their absence (69 % vs. 51 %, $P<0.05$). A similar trend was shown in IOV of oocytes (35 % vs. 20 %, $P<0.05$). The level of apoptotic (TUNEL-test) cells in the group of EOV (44 % vs. 32 %, $P<0.05$) and IOV (72 % vs. 51 %, $P<0.001$) of gametes sharply decreased when HDSNs were added to cryoprotective media, and the proportion of pyknotic cells decreased during EOV (from 31 % to 21 %, $P<0.05$) and IOV (from 58 % to 41 %, $P<0.05$). In general, the obtained results indicate the expediency of using 0.001 % HDSNs in the protocols of IOV and EOV of female gametes *OVIS ARIAS*.

Key words: cumulus; vitrification; pycnosis; apoptosis; nanoparticles of highly dispersed silica; *Ovis Arias*

Authors:

Kuzmina T. – Dr. Habil. (Biol. Sci.); Professor, e-mail: prof.kouzmina@mail.ru;

Sokolova N. – researcher; e-mail: natalita-natalita@mail.ru.

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding — Branch of the L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry; 196625, Russia, St. Petersburg, pos. Tyarlevo, Moscow highway, 55a

References

1. Hiemstra S. J. The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies / Hiemstra S. J., T. van der Lende, Woelders H. // The role of Biotechnology. — Villa Gualino, Turin, Italy — 2005. — P. 25-36.
2. Fryc K. Morphokinetic changes in vitrified and non-vitrified in vitro derived ovine embryos / K. Fryc, A. Nowak, B. Kij-Mitka, J. Kochan, P. M. Bartlewski, M. Murawski // Theriogenology. — 2022. — Vol. 187. — P. 58-63. doi: 10.1016/j.tdoi.org/ 10.1016/ j. theriogenology. 2022.04.027.
3. Falchi L. Embryo biotechnologies in sheep: Achievements and new improvements / L. Falchi, S. Ledda, M. T. Zedda // Reprod in Domestic Animals. — 2022. — Vol. 47(5). — P. 865-871.
4. Moawad A. R. Campbell Caffeine and oocyte vitrification: Sheep as an animal model / A. R. Moawad, I. Choi, J. Zhu, A. Abou Bakr, E. L. Wishy, D. Amarnath, W. Chen, H. S. Keith // International Journal of Veterinary Science and Medicin. — 2018. — P. 41-48. doi: 10.1016/j.ijvsm.2018.01.004.
5. Tharasanit T. Oocyte cryopreservation in domestic animals and humans: principles, techniques and updated outcomes / T. Tharasanit, P. Thuwanut // Animals. — 2021. — Vol. 11. — P. 2949.

6. Robert C. Nurturing the egg: the essential connection between cumulus cells and the oocyte / C. Robert // *Reproduction, Fertility and Development*. — 2022. — Vol. 34(1–2). — P. 149–159.
7. Marchais M. Mammalian cumulus oocyte complex communication: a dialog through long and short distance messaging / M. Marchais, I. Gilbert, A. Bastien, A. Macaulay, C. Robert // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. — 2022. — Vol. 39(5). — P. 1011–1025. doi.org/ 10.1007/ s10815 – 022 – 02438 – 8.
8. Maside C. Oocyte morphometric assessment and gene expression profiling of oocytes and cumulus cells as biomarkers of oocyte competence in sheep / C. Maside, I. Sanchez-Ajoferin, D. Medina-Chavez, B. Alves, J. J. Garde and A. J. Soler // *Animals*. — 2021. — Vol. 11(10). — P. 2818. doi.org/ 10.3390/ ani11102818.
9. Liberman A. Synthesis and surface functionalization of silica nanoparticles for nanomedicine / A. Liberman, N. Mendeza, W. C. Troglor, and A. C. Kummel // *Surf Sci Rep*. — 2014. — Vol. 69 (2–3). — P. 132–158. doi: 10.1016/j.surfrep.2014.07.001.
10. Shi Xi Chena Silver nanoparticles induce oocyte maturation in zebrafish (*Danio rerio*) / Shi Xi Chena, Xiao Zhen Yanga, Ying Denga, Jing Huang, Yan Lib, Qian Sunb, Chang-Ping Yub, Yong Zhua, and Wan Shu Honga // *Chemosphere*. — 2017. — Vol. 170. — P. 51–60. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.12.016.
11. Lucas Caroline G. Applications of omics and nanotechnology to improve pig embryo production in vitro / Lucas Caroline G., Paula R. Chen, Fabiana K. Seixas, Randall S. Prather, Tiago Collares // *Mol Reprod Dev*. — 2019. — Vol. 86(11). — P. 1531–1547. doi:10.1002/mrd.23260.
12. Kuzmina T. I. The influence of vitrification on the status of chromatin oocyte complexes *Sus Scrofa Domesticus* / T. I. Kuzmina, T. I. Stanislavovich // *Genetics and breeding of animals*. — 2019. — № 1. — P. 27–33. doi: 10.31043/2410-2733-2019-1-27-33.
13. Kuzmina T. I. Effect of highly dispersed silica nanoparticles on apoptosis in native and devitrified *Bos Taurus* ovarian follicle granulosa cells / T. I. Kuzmina, I. V. Chistyakov // *Actual issues of veterinary biology*. — 2019. — № (43). — P. 8–12.
14. Galagan N. P. The influence of the dispersion of nmarezems on their bioactivity in relation to the gametes of the bull / N. P. Galagan, V. M. Gunkko, N. G. Porkhun, E. A. Novikova, V.V. Turov // *Dopovidi National Academic Academy of Sciences of Ukraine*. — 2012. — № 5. — P. 126–133.
15. Tarkowski A. An air-drying method for chromosomal preparation from mouse eggs / A. Tarkowski // *Cytogenetic*. — 1966. — Vol. 1 — P. 394–400.
16. Appeltant R. Effects of vitrification of cumulus-enclosed porcine oocytes at the germinal vesicle stage on cumulus expansion, nuclear progression and cytoplasmic maturation / R. Appeltant, T. Somfai, E. C. S. Santos, T. Q. Dang-Nguyen, T. Nagai, K. Kikuchi // *Reprod. Fertil. Dev*. — 2017. — Vol. 29(12). — P. 2419–2429.
17. Wei J. H. Caspase activity and oxidative stress of granulosa cells are associated with the viability and developmental potential of vitrified immature oocytes / J. H. Wei, X. Y. Yuan, J. M. Zhang, J. Q. Wei // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol*. — 2016. — Vol. 198. — P. 22–26. doi: 10.1016/j.ejogrb. 2015.12.010.
18. Kokotsaki M. Impact of vitrification on granulosa cell survival and gene expression / M. Kokotsaki, M. Mairhofer, C. Schneeberger, J. Marschalek, D. Pietrowski // *Cryobiology*. — 2018. — Vol. 85. — P. 73–78. doi: 10.1016/j.cryobiol. 2018.09.006.
19. Kuzmina T. I. Evaluation of developmental competence of *Sus scrofa domestica* (L.) oocyte-cumulus complexes after intra- and extraovarian vitrification / T. I. Kuzmin, I. V. Chistyakov // *Vavilovsky Journal of Genetics and Selection*. — 2021. — Vol. 25 (6). — P. 613–619. doi 10.18699/VJ21.069
20. Kuzmina T. I. The influence of highly dispersed silica nanoparticles on the functional activity of mitochondria and chromatin state in native and devitrified *Bos taurus* oocytes / T. I. Kuzmin, I. V. Chistyakova, D. N. Tatarskaya // *Agricultural Biology*. — 2020. — Vol. 55. — № 4. — P. 784–793. doi: 10.15389/Agrobiol.2020.4.784.