

Т. И. Кузьмина, Д. А. Старикова

Модернизация состава криопротекторных сред для интраовариальной витрификации женских гамет *Sus scrofa domestica*

Аннотация.

Цель: Комплексный анализ морфофункционального состояния соматических (кумулюс) и половых (ооциты) клеток *Sus scrofa domestica*, подвергшихся интраовариальной витрификации с использованием диметилглицеролата кремния (ДМГК).

Материалы и методы. Фрагменты яичников (ФЯ) свиней размером 15х20 мм поэтапно выдерживали в приготовленных на фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ) с 20 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС) криопротекторных агентах (КПА): 25 мин в КПА-1, состава 7,5 % ЭГ (этиленгликоль) с 7,5 % ДМСО (диметилсульфоксид) и 15 мин в КПА-2 (15 % ЭГ с 15 % ДМСО и 0,5 М сахарозы). Состав опытной группы КПА-2 модифицировали введением диметилглицеролата кремния в концентрациях 2 %, 6 % или 10 %. ФЯ хранили в жидком азоте. Девитрифицировали ФЯ экспонированием в растворе 1 (80 % ФСБ, 20 % ФБС, 0,5 моль/л сахарозы) – 1 мин и растворе 2 (80 % ФСБ, 0,25 моль/л сахарозы) 5 минут. Анализу подвергались следующие показатели криорезистентности девитрифицированных ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК): степень экспансии клеток кумулюса, морфология ооцитов и функциональный статус липидома женских гамет (интенсивность флуоресценции комплекса Nile red/липидная капля – ИФЛК)

Результаты. Введение в состав криопротекторных сред ДМГК снижало уровень денудированных ооцитов после витрификации. Распределение долей гамет по степени экспансии клеток кумулюса (низкая, средняя, высокая) в опытной группе с 10 % ДМГК имело тенденцию к распределению выше обозначенного показателя в группе нативных клеток. Уровень нативных ооцитов с признаками морфологической дегенерации (7,7 %) не имел достоверных различий с уровнем интраовариально витрифицированных с 10 % ДМГК (11 %) гамет. Доля нативных гамет с низкой ИФЛК (38,9%) превысила уровень ооцитов с вышеуказанным показателем, подвергшихся витрификации в контрольной (16,5%) и опытных группах клеток с введением 6 % ДМГК (4,8 %) и 10 % ДМГК (11,8 %, $P < 0,001$).

Заключение. В целом, комплексный мониторинг показателей криорезистентности ОКК *Sus scrofa domestica*, подвергшихся интраовариальной витрификации, выявил криопротекторные свойства ДМГК. Эффект носил дозозависимый характер и выражался в стабилизации ооцит-кумулюсной коммуникации, снижении уровня ооцитов с признаками морфологической дегенерации и особенностях функционирования липидома в интраовариально витрифицированных с использованием ДМГК в различных концентрациях женских гамет.

Ключевые слова: ооцит-кумулюсные комплексы; *Sus scrofa domestica*; липидные капли; интраовариальная витрификация, диметилглицеролат кремния.

Авторы:

Кузьмина Т. И. – доктор биологических наук, профессор; e-mail: prof.kouzmina@mail.ru;

Старикова Д. А. – кандидат биологических наук; e-mail: live8avis@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. В животноводстве для получения и сохранения высококачественных женских гамет широко применяют вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ). Цикл ВРТ включает извлечение ооцитов, созревание in vitro (IVM), экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) или интрацитоплазматическую инъекцию спермато-

зоидов (ИКСИ), трансплантацию эмбрионов (ТЭ), а также криоконсервацию гамет или эмбрионов [1]. Криоконсервация – уникальный метод для сохранения половых клеток различных видов млекопитающих, ценных пород сельскохозяйственных животных в условиях стремительного снижения биоразнообразия. Несмотря на мно-

гочисленные усилия по оптимизации протоколов как экстра-, так и интраовариальной криоконсервации показатели качества и выживаемости декриоконсервированных ооцитов остаются низкими [2, 3]. Наиболее щадящей считается криообработка при сверхвысоких скоростях снижения температуры или витрификация. При этом метод интраовариальной витрификации предпочтителен за счет снижения риска непосредственного воздействия криопротекторов на гаметы, а также контаминации гамет микроорганизмами, устойчивыми к сверхнизким температурам [4]. Также витрификация фрагментов яичника позволяет сохранять большее количество женских гамет, поскольку яичник содержит огромный пул ооцитов в преантральных и антральных фолликулах [5].

Несмотря на значительные достижения в вышеописанном методе, применение высоких концентраций криопротекторов, температурный шок от воздействия жидкого азота (-196°C) и осмотический стресс вызывают структурные изменения в клетках, а также снижают потенциал развития девитрифицированных ооцитов млекопитающих [6]. В связи с этим моделирование составов криопротекторных сред, направленных на обеспечение сохранности морфофункциональных показателей качества ооцитов, является определяющим фактором оптимизации технологии витрификации.

В настоящее время в исследовательской практике применяются биологически активные соединения на основе кремния, представителем которых является диметилглицеролат кремния $(\text{CH}_3)_2\text{Si}(\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_3)_2\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ (Институт органического синтеза им. Постовского УрО РАН, Екатеринбург). Для получения диметилглицеролата кремния (ДМГК) используются смеси мономерного и олигомерных глицеролатов, образуемые при реакции переэтерификации тетраэтоксисилана глицерином с выделением этанола [7]. ДМГК проявляет антимикробные свойства, обладает регенерирующим и ранозаживляющим свойствами, транскутанной активностью [8]. ДМГК является производным классического криопротектора глицерина, что позволяет ему проявлять криопротекторные качества [9]. Кроме того, в ряде работ показана эффективность позитивного влияния на ооциты сельскохозяйственных животных диметилглицеролата кремния в концентрациях от 0,2 % до 2 % [9-11].

В связи с вышесказанным, **цель** настоящего исследования — оценка морфофункционального состояния соматических (кумулюс) и половых (ооциты) клеток *Sus scrofa domesticus*, подвергшихся интраовариальной витрификации с использованием диметилглицеролата кремния (ДМГК).

Материалы и методы. Постмортальные яичники свиней (6-8 мес.) породы ландрас на стадии фолликулярного роста были получены в ООО «Мясоперерабатывающий комбинат «Тосненский»» (Ленинградская область, п. Тельмана). Яичники разделяли на фрагменты размером 15x20 мм. Ооцит-кумулюсные комплексы, выделенные из фрагментов нативных яичников, незамедлительно подвергались морфологическому и флуоресцентному анализу. Для витрификации фрагментов заранее были подготовлены криопротекторные агенты (КПА-1 и КПА-2), приготовленные на фосфатно-солевом буферном растворе Дюльбекко (ФСБ) с добавлением 20% фетальной бычьей сыворотки (ФБС). КПА-1 содержал 7,5 % ЭГ (этиленгликоль) и 7,5 % ДМСО (диметилсульфоксид), а КПА-2 — 15 % ЭГ, 15 % ДМСО и 0,5 М сахарозы. При формировании экспериментальных групп (концентрация ДМГК) руководствовались рекомендациями разработчиков ДМГК из Института органического синтеза УрО РАН им. И. Я. Постовского [12]. В опытные КПА-2 добавляли ДМГК в концентрациях 2 %, 6 % или 10 %. Образцы последовательно экспонировали в КПА-1 25 мин, затем в КПА-2 15 мин. Фрагменты яичников помещали в стерильные марлевые мешочки и моментально опускали в жидкий азот (-196°C) — открытый способ витрификации.

Не менее, чем через сутки ФЯ девитрифицировали, последовательно помещая их в раствор 1 следующего состава: 80 % ФСБ, 20 % ФБС, 0,5 моль/л сахарозы, а затем в раствор 2 — 80 % ФСБ, 0,25 моль/л сахарозы на 1 мин и 5 мин, соответственно. Выделенные в ФСБ из фрагментов яичников ооцит-кумулюсные комплексы оценивали по степени экспансии кумулюсных клеток и морфологии ооцитов. ОКК ранжировали по степени экспансии кумулюса: низкая степень экспансии — от 8 и более компактных слоев КК; средняя степень экспансии — неоднородный (компактный и рыхлый) кумулюс; высокая степень экспансии — более 8 рыхлых слоев КК. К дегенерированным ооцитам относили гаметы с поврежденной или неравномерной по ширине зоной пеллюцида, гетерогенной, вакуолизированной ооплазмой (рис. 1).

В нативных ооцитах, имеющих гомогенную ооплазму, равномерную по ширине зону пеллюцида и окруженных компактным кумулюсом, оценивали функциональный статус липидома (интенсивность флуоресценции комплекса Nile red/липидная капля — ИФЛК). Для этого гаметы окрашивали в темноте 5 мин при 24°C флуоресцентным красителем Nile red в концентрации 1 μM ($\text{Ex}/\text{Em} = 552/636 \text{ nm}$). Затем клетки отмывали, переносили на предметное стекло, окру-

жали каплями глицерина с DABCO (3:1) и накрывали покровным стеклом.

Для оценки интенсивности флуоресценции комплекса Nile red/липидная капля использовали флуоресцентный микроскоп Carl Zeiss Axio Imager.A2m. Зафиксированные микрофотографии анализировали с помощью программы JMicroVision 1.2.7., применяя цветовую модель RGB. Количество пикселей, превышающее половину площади ооцита определенного диапазона по ИФЛК, было основой для следующей классификации женских гамет: с низкой ИФЛК — от 0 до 80 пикселей; со средней ИФЛК — от 80 до 120 пикселей; с высокой ИФЛК — от 120 до 255 пикселей (рис. 2).

Результаты и обсуждение. На рисунке 3 представлены результаты морфологической оценки нативных и девитрифицированных после интраовариальной витрификации ооцитов.

Наименьший уровень денудированных ооцитов обнаружен в группе нативных гамет (26,6 %), что достоверно ($P < 0,01$) ниже долей денудированных гамет в остальных группах эксперимента: без внесения в КПА-2 ДМГК (51,1 %); с введением во второй криопротектор ДМГК в концентрациях: 2 % (48,2 %), 6 % (44,2%) и 10 % (46,6 %). Уровень гамет с низкой степенью экспансии КК, полученных из нативных фрагментов яичника, достоверно превышал уровень интраовариально витрифицированных с 2 % ДМГК гамет (29,3 % против 21,9 %, соответственно, $P < 0,05$). Уровень гамет с низкой степенью экспансии клеток кумулюса, обработанных КПА-2 с 6 % ДМГК, составил 32,5 %, что достоверно ниже доли ооцитов контрольной (23,3 %, $P < 0,05$) и опытной с 2 % ДМГК (21,9 %, $P < 0,01$) групп. Уровень ооцитов со средней степенью экспансии клеток кумулюса из нативных яичников (25,9 %) был выше долей группы гамет из витрифицированных без ДМГК яичников (15,7 %, $P < 0,01$) и с 6 % ДМГК (16,9 %, $P < 0,01$). Доля нативных гамет с высокой степенью экспансии (18,2 %) достоверно ($P < 0,01$) превосходила уровни ооцитов контрольной группы (9,9 %) и опытных групп эксперимента с вне-

сением в криопротектор 2 % (8,4 %) или 6 % ДМГК (6,8 %). При этом уровень гамет с высокой степенью экспансии клеток кумулюса из фрагментов яичника витрифицированных с 6 % ДМГК был достоверно ниже доли ооцитов из замороженных с 10 % ДМГК фрагментов (6,8 % против 10,6 %, $P < 0,05$).

Уровни денудированных женских гамет из оттаянных фрагментов яичников увеличились, что демонстрирует негативное воздействие витрификации на ооцит-кумуляные коммуникации. Однако при этом распределение долей гамет по степени экспансии клеток кумулюса в опытной группе с 10 % ДМГК имеет тенденцию к распределению вышеобозначенного показателя в группе нативных клеток. Также высокий процент ДМГК оказывает положительное влияние на сохранность кумулюсных клеток, окружающих ооцит.

Как известно, увеличение в растворе концентрации криопротекторов воздействует при охлаждении на его вязкость и осмотическое давление, что влияет на уровень дегидратации клеток до замораживания, температуру эквлектики, количество и структуру образующихся кристаллов [13]. Представленные нами результаты можно объяснить проникновением выделяющихся при распаде в водном растворе мономеров глицерина в фолликулярную жидкость и цитоплазму клетки [9]. В то же время полимерные молекулы, включающие кремний, вероятно, уплотняют структуру, делают её более вязкой и снижают кристаллизацию КПА, что способствует сохранности ооцит-кумуляных комплексов.

Результаты анализа морфологии гамет представлены на рисунке 4. Выявлено, что уровень дегенерированных гамет из невитрифицированных яичников (7,7 %) достоверно ниже доли ооцитов, полученных после витрификации как в контрольной (27,7 %, $P < 0,001$), так и в опытных группах с добавлением 2 % ДМГК (13,9 %, $P < 0,05$), с добавлением 6 % ДМГК (20,9 %, $P < 0,005$). Доля дегенерированных ооцитов (27,7 %), полученных из витрифицированных без обработки ДМГК фрагментов яичника, достоверно превышала уровни интраовариально витрифици-

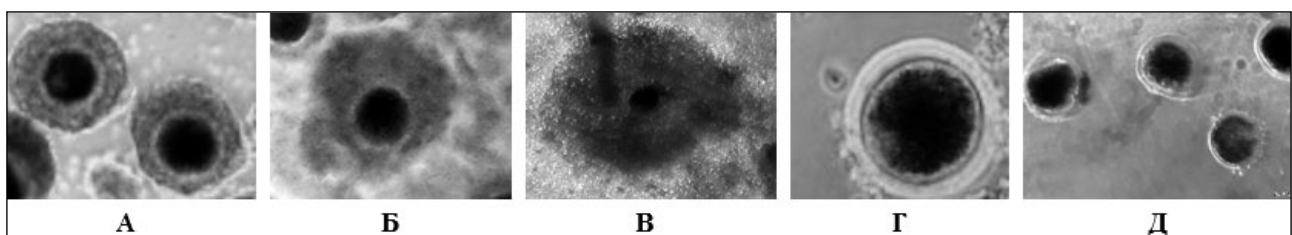


Рис. 1. Ооциты с разной степенью экспансии кумулюсных клеток и дегенерированные ооциты. А – ооцит с низкой степенью экспансии КК, Б – ооцит со средней экспансией КК, В – ооцит с высокой экспансией КК, Г – денудированные ооциты, Д – дегенерированные ооциты.

рованных с 2 % (13,9 %, $P < 0,05$) или 10 % (11%, $P < 0,001$) ДМГК гамет.

В целом, представленные данные демонстрируют негативное воздействие интраовариальной витрификации на морфологию кумулюсных клеток и ооцитов. Моделирование состава криопротекторов путем внесения в них диметилглицерола кремния в исследуемых концентрациях снижает доли дегенерированных гамет после интраовариальной витрификации.

Экстремальные условия окружающей среды, например, тепловой стресс, как показано de Andrade Melo-Sterza F и др. (2021), оказывают влияние на функционирование созревающего ооцита, сопровождающегося увеличением концентрации АТФ, связанным, по мнению ряда авторов, с повышенным бета-окислением жирных кислот [14]. Вышесказанное объясняет интерес

исследователей к проблеме функционирования липидома в условиях сверхнизких температур. Логично предположить, что процедурам витрификации и оттаивания сопутствует расходование АТФ, что может отражаться на количестве триглицеридов, содержащихся в липидных каплях. В наших исследованиях оценена интенсивность флуоресценции ЛК с помощью флуоресцентного красителя Nile red, являющегося селективным красителем для триглицеридов (рис. 5).

Доля нативных ооцитов с низкой ИФЛК (38,9 %) достоверно ($P < 0,001$) превысила уровень половых клеток с вышеуказанным показателем, обработанных сверхнизкими температурами как в контрольной (16,5 %), так и в опытных группах клеток с введением 6 % ДМГК (4,8 %) и 10 % ДМГК (11,8 %). Также отмечено, что доля контрольных гамет с низкой ИФЛК без обработки

ДМГК достоверно превышает уровень девитрифицированных с 6 % ДМГК гамет (16,5% против 4,8 %, соответственно, $P < 0,01$). Аналогично, уровень женских гамет также с низкой ИФ опытной группы с введением 2 % ДМГК достоверно превышает долю ооцитов, полученных после витрификации с ДМГК в концентрации 10 % (22,2 % против 11,8 %, соответственно, $P < 0,001$).

Доля нативных гамет с высокой ИФЛК (5,3 %) оказалась достоверно ни-

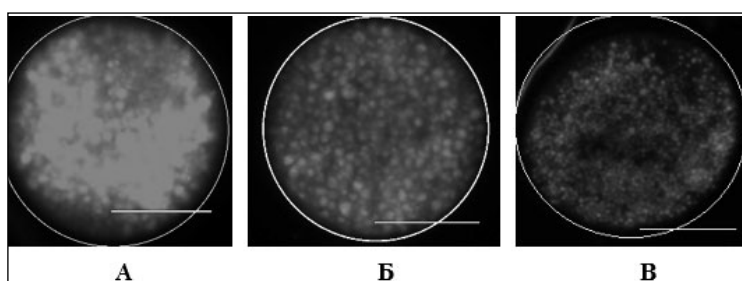


Рис. 2. Классификация ооцитов по интенсивности флуоресценции комплекса Nile red/липидная капля. А – ооцит с высокой ИФЛК, Б – ооцит со средней ИФЛК, В – ооцит с низкой ИФЛК. Примечание: шкала 50 μm .

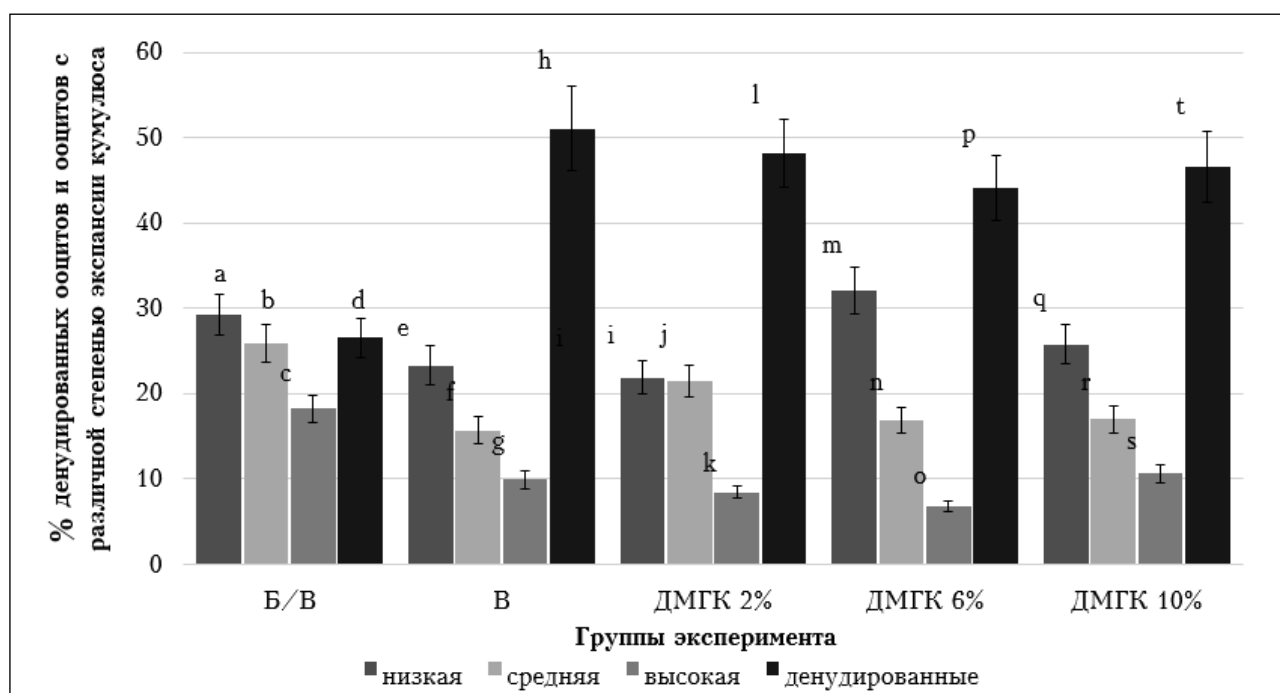


Рис. 3. Влияние витрификации на морфологию кумулюса ооцитов свиней (доля денудированных ооцитов и уровень гамет с различной степенью экспансии кумулюса) (1215 ооцитов, три повторности).

Группы эксперимента: Б/В – фрагменты яичников без витрификации; В – витрификация в контрольных условиях; ДМГК 2% – витрификация с введением в КПА-2 2% ДМГК; ДМГК 6% – витрификация с введением в КПА-2 6% ДМГК; ДМГК 10% – витрификация с введением в КПА-2 10% ДМГК. Достоверные различия по критерию Фишера: $b:f, b:n, c:g, c:k, c:o, d:h, d:l, d:p, d:t, i:m, j:n, o:s$ $P < 0,01$; $a:i, e:m, f:j$ $P < 0,05$.

же уровней девитрифицированных ооцитов с высокой ИФЛК в контрольной группе (17,6 %, $P < 0,005$), а также при введении в КПА-2 ДМГК в концентрациях 2 % (18,5 %, $P < 0,005$), 6% (30,9%, $P < 0,001$) или 10 % (39,5 %, $P < 0,001$). Кроме того, уровень женских гамет с высокой ИФЛК опытной группы (2 % ДМГК) был достоверно ниже доли гамет, полученных после витри-

фикации с ДМГК в концентрации 10 % (39,5 % против 18,5 %, соответственно, $P < 0,005$).

В процессе замораживания могут быть инициированы механизмы, детерминирующие повреждение гамет, связанные с фазовыми переходами и затрагивающие функционирование липидных капель [15]. В нативных гаметах интенсивное расходование триглицеридов липидных капель выражается снижением ИФЛК в клетке. В девитрифицированных ооцитах сразу после оттаивания падает значение уровней гамет с низкой интенсивностью флюоресценции во всех исследуемых группах.

Такие результаты можно связать с медленной активацией интрацитоплазматических процессов после девитрификации, включающей расходование триглицеридов и требующей определенного времени. К тому же наблюдается рост уровня интраовариально витрифицированных гамет с высокой ИФЛК в зависимости от концентрации ДМГК. Можно предположить, что триглицериды, полученные из молекул глицерина, накапливаются в липидных каплях в процессе замораживания/оттаивания.

Данное наблюдение согласуется с вышесказанным предположением о механизме действия ДМГК и подтверждается

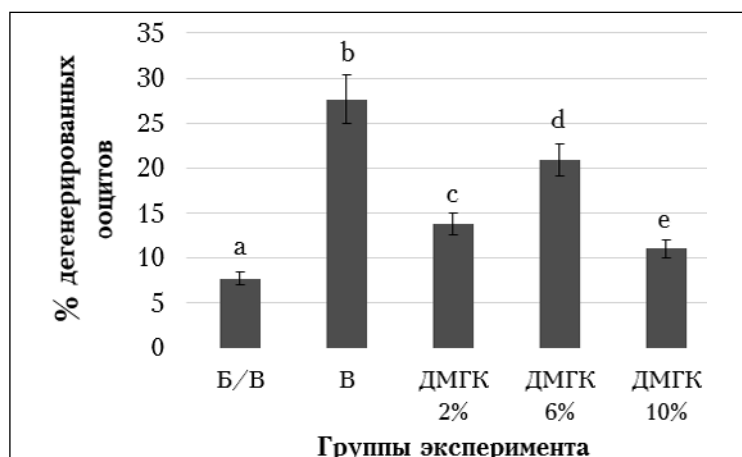


Рис. 4. Влияние витрификации на морфологию нативных и девитрифицированных ооцитов свиней (1215 ооцитов, три повторности). Примечание: группы эксперимента: Б/В – фрагменты яичников без витрификации; В – витрификация в контрольных условиях; ДМГК 2% – витрификация с введением в КПА-2 2% ДМГК; ДМГК 6% – витрификация с введением в КПА-2 6% ДМГК; ДМГК 10% – витрификация с введением в КПА-2 10% ДМГК. Достоверные различия по критерию χ^2 : a,b, b:e $P < 0,001$, a:d $P < 0,005$, a:c, b:c $P < 0,05$.

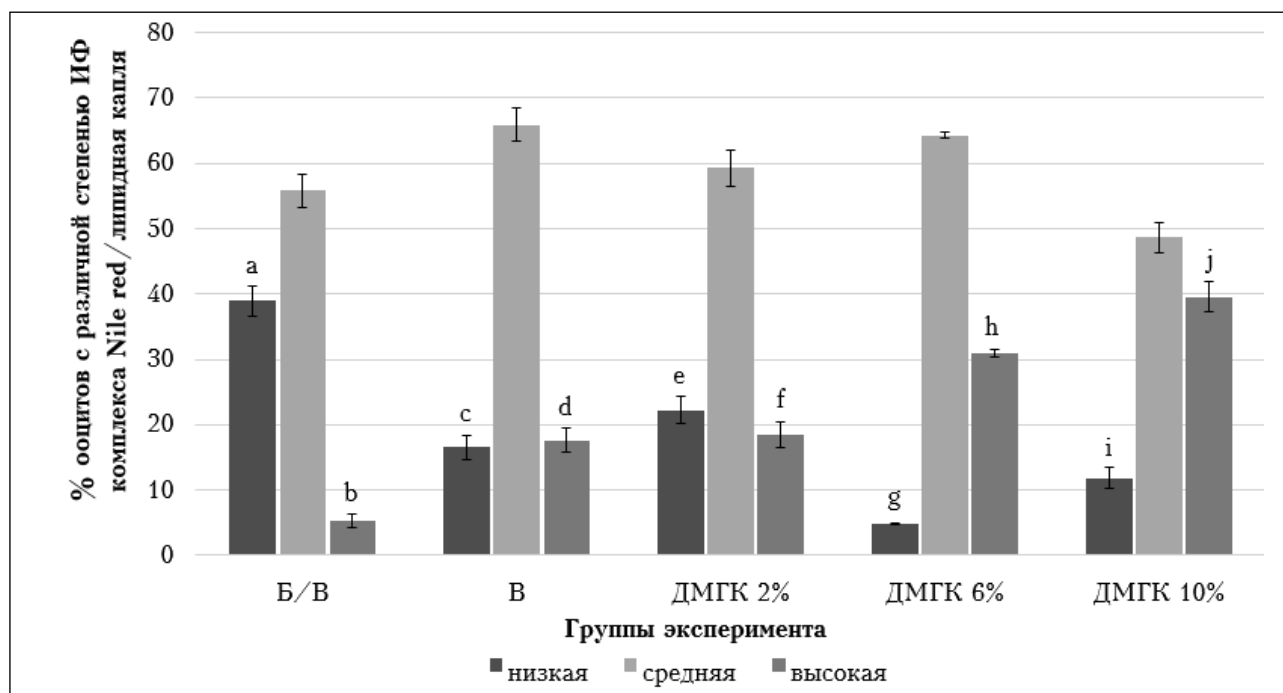


Рис. 5. Влияние ДМГК на интенсивность флюоресценции комплекса Nile red/липидная капля в нативных и девитрифицированных ооцитах свиней (476 ооцитов; три повторности).

Примечание: группы эксперимента: Б/В – фрагменты яичников без витрификации; В – витрификация в контрольных условиях; ДМГК 2% – витрификация с введением в КПА-2 2% ДМГК; ДМГК 6% – витрификация с введением в КПА-2 6% ДМГК; ДМГК 10% – витрификация с введением в КПА-2 10% ДМГК. Достоверные различия по критерию χ^2 : a:c, a:g, a:i, e:i, b:h, b:j $P < 0,001$, b:d, b:f, f:j $P < 0,005$, c:g $P < 0,01$.

полученными нами данными. Так, наибольшая доля гамет с низкой ИФЛК, витрифицированных с 2 % ДМГК, вероятно, свидетельствует о том, что данная группа гамет готова к активации нуждающихся в АТФ процессов и коммуникации внутриклеточных органелл раньше, чем остальные опытные группы. Однако для того, чтобы окончательно убедиться, что 2 % концентрация ДМГК в составе криопротекторных сред является наиболее эффективной при интраовариальной витрификации, необходимо детально изучить ИФЛК и другие показатели функциональной активности липидных капель (морфология, локализация) в динамике культивирования гамет.

Заключение. В исследовании в сравнительном аспекте проанализированы морфофункциональные показатели качества нативных и интраовариально витрифицированных с введением диметилглицеролата кремния ооцит-кумулясных комплексов *Sus scrofa domestica*. Выявлен до-

зависимый эффект ДМГК как потенциального составляющего криопротекторных сред, используемых для витрификации женских гамет *Sus scrofa domestica*. Полученные данные свидетельствуют о криопротекторных свойствах ДМГК, выразившихся в уменьшении уровня денудированных ооцитов и гамет с признаками морфологической дегенерации. При этом, наиболее сильно эффекты проявлялись при введении в криопротекторные среды 10 % ДМГК. Оценка одного из показателей функционирования липидома в гаметах (ИФЛК) выявила позитивное влияние ДМГК в концентрации 2 % на функциональную активность липидных капель в ооцитах, подвергшихся воздействию ультранизких температур. В целом, модификация состава криопротекторных сред путем введения ДМГК оказала благоприятное влияние на сохранность ооцитов *Sus scrofa domestica* после интраовариальной витрификации.

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Министерства науки и высшего образования РФ (ГЗ № 121052600350-9).*

Литература

1. Karcz A. Development of a Microfluidic Chip Powered by EWOD for In Vitro Manipulation of Bovine Embryos / A. Karcz, A. Van Soom, K. Smits, S. Van Vlierberghe, R. Verplancke, O.B. Pascottini, E. Van den Abbeel, J. Vanfleteren, // Biosensors. — 2023 — V. 13. — № 4. — P. 419.
2. Makarevich A. Possibilities of cattle ovarian tissue conservation: a mini-review / A. Makarevich, M. Foldesiova, L. Olexikova, E. Kubovicova, P. Chrenek // Slovak Journal of Animal Science. — 2017. — V. 50 (3). — P. 128-133.
3. Chen H. Advantages of vitrification preservation in assisted reproduction and potential influences on imprinted genes / H. Chen, L. Zhang, L. Meng, L. Liang, C. Zhang // Clinical Epigenetics. — 2022. — V.14. — P. 141. Doi: 10.1186/s13148-022-01355-y.
4. Campos L.B. Vitrification of collared peccary ovarian tissue using open or closed systems and different intracellular cryoprotectants / L. B. Campos, A. M. da Silva, E. C. G. Praxedes // Cryobiology. — 2019. — № 91. — P. 77-83.
5. Santos R.R. Cryopreservation of ovarian tissue: an emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds / R.R. Santos, C. Amorim, S. Cecconi, M. Fassbender, M. Imhof, J. Lornage, M. Paris, V. Schoenfeldt, B. Martinez-Madrid // Animal reproduction science. — 2010. — V. 122(3-4). — P. 151-163. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.08.010.
6. Succu S. Vitrification of In Vitro Matured Oocytes Collected from Adult and Prepubertal Ovaries in Sheep / S. Succu, E. Serra, S. Gadau, A. Varcasia, F. Berlinguer // Journal of visualized experiments: JoVE. — 2021. — 173: 10.3791/62272. Doi: 10.3791/62272.
7. Исакова М. Н. Разработка новых лекарственных композиций на основе бактериоцина-низина, с последующей оценкой их антимикробной активности / М. Н. Исакова, Я. Ю. Лысова, Т. Г. Хонина // Ветеринария. — 2023. — №7. — С. 43-49. Doi: 10.30896/0042-4846.2023.26.7.43-49.
8. Шадрина Е. В. Синтез и свойства полиолатов кремния и гидрогелей на их основе: автореф. дис. ... канд. хим. наук: 02.00.03 / Е. В. Шадрина; Ин-т орган. синтеза им. И. Я. Постовского Урал. отделения Рос. акад. наук. — Екатеринбург, 2011. — 36 с. — Библиогр.: с. 24-26 (21 назв.).
9. Старикова Д. А. Особенности функциональной активности липидома в ооцитах *Sus scrofa domestica* при интраовариальной витрификации / Д. А. Старикова, Т. И. Кузьмина // Аграрный вестник Урала. — 2022. — № 12 (227). — С. 62-72. Doi: 10.32417/1997-4868-2022-227-12-62-72.

10. Станиславович Т. И. Влияние интраовариальной витрификации на показатели криорезистентности ооцит-кумулюсных комплексов свиней / Т. И. Станиславович, Т. И. Кузьмина, А. В. Молчанов // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. — 2019. — №4. — С. 65-69.
11. Алимова А. Д. Влияние диметилглицеролата кремния на ооцит-кумулюсные комплексы свиней при культивировании *in vitro* / А. Д. Алимова, Т. И. Кузьмина // Ветеринария. — 2020. — № 9. — С. 46–49. Doi: 10.30896/0042-4846.2020.23.9.46-49.
12. Патент RU 2322448 C2 / 10.01.2006 Сольватокмплесы глицератов кремния и титана, обладающие транскутанной активностью, и глицерогели на их основе // Патент России № 2322448 C2 / Хонина Т. Г., Чупахни О. Н., Ларионов Л. П., Бояковская Т. Г., Суворов А. Л.
13. Грачева И.В. Низкотемпературная консервация коллекционных штаммов холерных вибрионов / И.В. Грачева, А.В. Осин // Проблемы особо опасных инфекций. — 2014. — №. 4. — С. 39-42.
14. de Andrade Melo-Sterza F. Lipid Metabolism in Bovine Oocytes and Early Embryos under In Vivo, In Vitro, and Stress Conditions / F. de Andrade Melo-Sterza, R. Poehland // International journal of molecular sciences. — V. 22(7):3421. Doi: 10.3390/ijms22073421.
15. Okotrub K. A. Lipid Droplet Phase Transition in Freezing Cat Embryos and Oocytes Probed by Raman Spectroscopy / K. A. Okotrub, V. I. Mokrousova, S. Y. Amstislavsky, N. V. Surovtsev // Biophysical journal. — 2018. — V.115. — № 3. — P. 577-587. Doi: 10.1016/j.bpj.2018.06.019.

Kuzmina T., Starikova D.

Modernization of the cryoprotective medium compoud for intraovarian vitrification of female gametes of *Sus scrofa domesticus*

Abstract.

Aim. Comprehensive analysis of the morphofunctional state of somatic (cumulus) and germ cells (oocytes) of *Sus scrofa domesticus* subjected to intraovarian vitrification using silicon dimethylglycerolate (SDMG) are presented.

Materials and methods. Fragments of porcine ovaries (FsPO) 15×20 mm in size were gradually kept in cryoprotective agents (CPA) prepared in phosphate-buffered saline (PBS) with 20% fetal bovine serum (FBS): 25 min. in CPA-1 [7.5 % EG (ethylene glycol) with 7.5 % DMSO (dimethyl sulfoxide)] and 15 min. in CPA-2 [15 % EG with 15 % DMSO and 0.5 M sucrose]. The composition of the CPA-2 in experimental groups was modified by addition of SDMG (at concentrations of 2 %, 6 %, or 10 %). FsPO were stored in liquid nitrogen. FsPO were devitrified by exposure 1 minute in solution 1 (80 % PBS, 20 % FBS, 0.5 mol/l sucrose) and 5 minutes in solution 2 (80 % PBS, 0.25 mol/l sucrose). The following indicators of cryoresistance of devitrified cumulus-oocyte complexes (COCs) were analyzed: degree of cumulus cells expansion; oocyte morphology and the functional status of lipidome in female gametes (fluorescence intensity of Nile red /lipid droplets complex - FILDs).

Results. The addition of SDMG into cryoprotective media reduced the level of denuded oocytes after vitrification. The level of gamete with different degree of cumulus cells expansion (low, medium, high) in the experimental group with 10 % SDMG tended to indicators in the group of native cells. The level of native oocytes with the signs of morphological degeneration (7.7%) had no significant differences with the level of intraovarian vitrified gametes with 10 % SDMG (11 %). The proportion of native oocytes with low FILDs (38.9 %) exceeded the level of oocytes with the above indicator in vitrified oocytes of the control (16.5 %) group and in experimental groups of cells with the addition of 6 % SDMG (4.8 %) and 10 % SDMG (11.8 %, $P < 0.001$).

Conclusion. In general, comprehensive monitoring of indicators cryoresistance of COCs in *Sus scrofa domesticus* subjected to intraovarian vitrification revealed the cryoprotective properties of SDMG. The effects were dose-dependent and were expressed in the stabilization of oocyte-cumulus communication, a decrease in the level of oocytes with the signs of morphological degeneration, and features of the lipidome functioning in intraovarian vitrified female gametes using SDMG at various concentrations.

Key words: cumulus-oocyte complexes; *Sus scrofa domesticus*; lipid droplets; intraovarian vitrification; silicon dimethylglycerolate.

Authors:

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

Starikova D. — PhD (Biol. Sci.), e-mail: live8avis@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. Karcz A. Development of a Microfluidic Chip Powered by EWOD for In Vitro Manipulation of Bovine Embryos / A. Karcz, A. Van Soom, K. Smits, S. Van Vlierberghe, R. Verplancke, O.B. Pascottini, E. Van den Abbeel, J. Vanfleteren, // Biosensors. — 2023 — V. 13. — № 4. — P. 419.
2. Makarevich A. Possibilities of cattle ovarian tissue conservation: a mini-review / A. Makarevich, M. Foldesiova, L. Olexikova, E. Kubovicova, P. Chrenek // Slovak Journal of Animal Science. — 2017. — V. 50 (3). — P. 128-133.
3. Chen H. Advantages of vitrification preservation in assisted reproduction and potential influences on imprinted genes / H. Chen, L. Zhang, L. Meng, L. Liang, C. Zhang // Clinical Epigenetics. — 2022. — V.14. — P. 141. Doi: 10.1186/s13148-022-01355-y.
4. Campos L.B. Vitrification of collared peccary ovarian tissue using open or closed systems and different intracellular cryoprotectants / L.B. Campos, A.M. da Silva, E.C.G. Praxedes // Cryobiology. — 2019. — № 91. — P. 77-83.
5. Santos R.R. Cryopreservation of ovarian tissue: an emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds / R.R. Santos, C. Amorim, S. Cecconi, M. Fassbender, M. Imhof, J. Lornage, M. Paris, V. Schoenfeldt, B. Martinez-Madrid // Animal reproduction science. — 2010. — V. 122(3-4). — P. 151-163. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.08.010.
6. Succu S. Vitrification of In Vitro Matured Oocytes Collected from Adult and Prepubertal Ovaries in Sheep / S. Succu, E. Serra, S. Gadau, A. Varcasia, F. Berlinguer // Journal of visualized experiments: JoVE . — 2021. — 173: 10.3791/62272. Doi: 10.3791/62272.
7. Isakova M.N. Development of new medicinal compositions based on bacteriocin-nisin, with subsequent evaluation of their antimicrobial activity / M.N. Isakova, Ya.Yu. Lysova, T.G. Chonin // Veterinaria. — 2023. — No7. — P. 43-49. Doi: 10.30896/0042-4846.2023.26.7.43-49.
8. Shadrina E.V. Synthesis and properties of silicon polyolates and hydrogels based on them: author. dis. ... cand. chem. Sciences: 02.00.03 / E.V. Shadrina; Institute of organ. synthesis them. I. Ya. Postovsky Ural. Department of Ros. acad. Sciences. — Yekaterinburg, 2011. — 36 p. — Bibliography: p. 24-26 (21 titles).
9. Starikova D.A. Features of functional activity of lipidoma in *Sus scrofa domestica* oocytes during intraovarian vitrification / D.A. Starikova, T.I. Kuzmina // Agrarnii vestnik Urala. — 2022. — No. 12 (227). — P. 62–72. Doi: 10.32417/1997-4868-2022-227-12-62-72.
10. Stanislavovich T.I. Influence of intraovarian vitrification on indicators of cryoresistance of pig oocyte-cumulus complexes / T.I. Stanislavovich, T.I. Kuzmina, A.V. Molchanov // Voprosi normativno-pravovogo regulirovaniya v veterinarii — 2019. — №. 4. — P. 65-69.
11. Alimova A.D. Influence of silicon dimethylglycerolate on oocyte-cumulus complexes of pigs during in vitro cultivation / A.D. Alimova, T.I. Kuzmina // Veterinaria. — 2020. — No. 9. — P. 46–49. Doi: 10.30896/0042-4846.2020.23.9.46-49
12. Patent RU 2322448 C2 / 10.01.2006 Solvate complexes of silicon and titanium glycerates with transcutaneous activity, and glycerogels based on them // Patent of Russia No. 2322448 C2 / Khonina T. G., Chupakhni O. N., Larionov L. P., Boyakovskaya T. G., Suvorov A. L.
13. Gracheva I.V. Low-temperature conservation of collection strains of vibrio cholerae / I.V. Gracheva, A.V. Osin // Problemi osobo opasnich infekzii. — 2014. — №. 4. — P. 39-42.
14. de Andrade Melo-Sterza F. Lipid Metabolism in Bovine Oocytes and Early Embryos under In Vivo, In Vitro, and Stress Conditions / F. de Andrade Melo-Sterza, R. Poehland // International journal of molecular sciences. — V. 22(7):3421. Doi: 10.3390/ijms22073421.
15. Okotrub K. A. Lipid Droplet Phase Transition in Freezing Cat Embryos and Oocytes Probed by Raman Spectroscopy / K. A. Okotrub, V. I. Mokrousova, S. Y. Amstislavsky, N. V. Surovtsev // Biophysical journal. — 2018. — V.115. — № 3. — P. 577-587. Doi: 10.1016/j.bpj.2018.06.019.