

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ОБЩИХ ЛИПИДОВ
В СОЗРЕВШИХ *in vitro* ООЦИТАХ КОРОВ В СВЯЗИ С РАЗНЫМ
МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫМ СОСТОЯНИЕМ ЯИЧНИКОВ**

¹Сметанина И.Г., ²Кривохарченко А.С.

*ВНИИ физиологии, биохимии и питания животных – филиал
ФИЦ животноводства – ВИЖ им. Л.К. Эрнста», Боровск Калужской обл.;*
² *Научно-производственная фирма «Иммунобиотех», Kursk, Russia Federation*

Процессы, происходящие при созревании яйцеклеток животных, - одна из ключевых проблем биологии развития. являются важным компонентом клеток животных. Роль жирных кислот в процессах созревания, оплодотворения и развития яйцеклеток млекопитающих изучена недостаточно. Ранее авторами было показано, что способность морфологически нормальных ооцитов достигать *in vitro* стадии метафаза II не зависит от морфофункционального состояния яичника коров. Неизвестно, однако, влияет ли исходное морфофункциональное состояние яичника на биохимические процессы в ооцитах, в частности, на их химический состав. Для определения жирнокислотного состава общих липидов ооцитов в связи с процессом ядерного созревания в данной работе объединяли данные по всем пяти морфофункциональным состояниям яичников у коров. Показано, что морфофункциональное состояние яичников существенно не влияло на жирнокислотный состав общих липидов ооцитов. Установлено, что жирные кислоты в основном представлены ненасыщенными формами, как в ооцитах с первым направительным тельцем, так и без него (76,7 и 83,1% соответственно). Ооциты с первым направительным тельцем содержали существенно больше пальмитиновой (12,0 vs 7,3%), стеариновой (7,37 vs 5,81%) и олеиновой кислот (6,00 vs 4,63%) и меньше линолевой (37,1 vs 39,5%), линоленовой (27,0 vs 31, 3%) и арахидоновой кислот (6,33 vs 7,55%) по сравнению с ооцитами без первого направительного тельца. Выявлены устойчивые изменения в жирнокислотном составе общих липидов ооцитов крупного рогатого скота в связи с процессом ядерного созревания *in vitro*. Это позволяет говорить о наличии некоего универсального механизма, регулирующего процесс ядерного созревания.

Ключевые слова: ооциты, созревание in vitro, первое направительное тельце, жирные кислоты, морфофункциональное состояние яичника

Проблемы биологии продуктивных животных. 2021, 2: 66-74

Введение

В течение длительного времени изучение процесса созревания яйцеклеток животных были сфокусированы на ядерных преобразованиях, тогда как биохимические процессы, происходящие в ооцитах в период созревания, изучены недостаточно. Были выявлены изменения в белковом синтезе в процессе ядерного созревания ооцитов млекопитающих (Turathum, Sroyraya, 2017), в частности, ооцитов крупного рогатого скота (КРС) как *in vivo*, так и *in vitro* (Kastrop et al., 1990, 1991; Coenen et al., 2004; Memili et al., 2007; Peddinti et al., 2010). В целом, хотя липиды являются важным компонентом клеток животных, недостаточно изучена роль жирных кислот (ЖК) в процессах созревания, оплодотворения и развития яйцеклеток млекопитающих. Согласно современным представлениям, метаболизм ЖК в ооцит-кумулясных комплексах (ОКК) млекопитающих регулируется как материнской физиологией, так и их непосредственным окружением; и это важно для процессов созревания и развития ооцитов (Dunning et al., 2014; Сметанина, 2020).

Богатые липидами ооциты КРС могут быть подходящей моделью для понимания роли липидов и метаболизма ЖК в ходе созревания ооцитов млекопитающих и их влияния на последующее оплодотворение и преимплантационное развитие эмбрионов.

Анализируя литературные данные по жирнокислотному составу (ЖКС) ооцитов различных видов млекопитающих (Homa et al., 1986; Khandoker et al., 1996, 1997a; Wang et al., 1998; Matorras et al., 1998; McEvoy et al., 2000), можно прийти к выводу, что обнаружены выраженные межвидовые различия. Так, например, в ооцитах мыши преобладающей является арахидоновая кислота, в ооцитах крыс и кроликов - олеиновая, в ооцитах КРС, свиней, овец - пальмитиновая и олеиновая, в ооцитах человека – стеариновая.

Вместе с тем, противоречивыми являются данные, полученные на яйцеклетках одного вида. Так, был определён ЖКС общих липидов, ооцитов КРС, извлеченных из антральных фолликулов, (Khandoker et al., 1997b), при этом преобладающими были олеиновая и пальмитиновая кислоты, что в принципе совпадает с вышеприведенными данными (McEvoy et al., 2000). Однако, по данным японских ученых (Sata et al., 1999), преобладающей была миристиновая кислота. Пальмитиновая, стеариновая и олеиновая кислоты были наиболее преобладающими в ооцитах коров, свиней и овец и в более поздних исследованиях (Genicot et al., 2005).

Показано, что ОКК КРС содержат больше насыщенных ЖК по сравнению с клетками гранулёзы (Adamiak et al., 2006). Это может свидетельствовать как о селективном поглощении и/или *de novo* синтезе ЖК в ооцитах, так и о специфическом энергетическом аккумулировании и особенностях метаболизма.

Вместе с тем, хотя установлено, что ЖКС доимплантационных эмбрионов млекопитающих может значительно меняться в зависимости от стадии развития (Khandoker et al., 1997a; Wang 1998 et al.; Sata et al., 1999; Menezo et al., 1982; Khandoker et al., 1998), данных по динамике содержания ЖК в период созревания яйцеклеток ещё недостаточно. Особый интерес представляют работы, в которых исследуется роль липидов, а, именно - отдельных ЖК, в процессе созревания ооцитов *in vitro*.

Индивидуальные ЖК влияют на созревание ооцитов и их компетенцию к развитию. Показано (Homa, Brown, 1992), что линолевая кислота является единственной ЖК (из тестированных), которая значительно ингибировала разрушение зародышевого пузырька в освобожденных от кумулюса ооцитах КРС.

Обработка ооцитов КРС стеариновой или пальмитиновой кислотами (в относительно высоких дозах, основанных на уровне таковых в фолликулярной жидкости лактирующих коров) в процессе созревания, ингибировали расширение кумулюса, повышая апоптоз в кумулюсных клетках и снижая прогрессию до стадии метафаза II (МII) (Leroy et al., 2005). Вместе с тем, обработка ОКК КРС линолевой кислотой улучшала созревание ооцитов до стадии МII и стимулировала эмбриональное развитие. Этот эффект был обусловлен её способностью влиять на продукцию простагландинов (Marie, 2009). Однако, линолевая кислота при повышенных концентрациях снижает расширение кумулюса и ухудшает созревание ооцитов КРС (Marie, et al., 2009, 2010).

Показано также, что созревание ооцитов *in vitro* в присутствии конъюгированной (?) линолевой кислоты в последующем улучшает морфологию бластоцист КРС (Lara et al., 2011).

В то же время ОКК КРС, культивировавшиеся в среде с пальмитиновой и стеариновой кислотами в процессе созревания, имели сниженный размер липидных гранул, и их число уменьшалось по сравнению с контролем. Причем, олеиновая кислота делает обратимыми эти эффекты и при высоких концентрациях даже стимулирует накопление липидов, т.е. повышает размер гранул и их число (Aardema et al., 2011). Однако, когда ОКК были обработаны смесью этих трёх кислот (пальмитиновой, стеариновой, олеиновой) в процессе созревания *in vitro*, состав липидов ооцитов не изменялся даже через кумулюсные клетки, проявляющие способность аккумулировать липиды (Aardema et al., 2016). При этом обработка ооцитов КРС смесью пальмитиновой/стеариновой/олеиновой кислот в ходе созревания *in vitro* активирует гены, участвующие в энергетическом метаболизме и окислительном стрессе (Van Hoesck et al., 2013).

Позднее было показано, что альфа-линоленовая кислота нивелирует негативное действие свободных ЖК (пальмитиновой, стеариновой, олеиновой) на компетенцию ооцитов к развитию (Marei et al., 2017).

Следует обратить внимание и на практическую значимость исследований в этой области, поскольку липиды во многом определяют резистентность ооцитов при криоконсервации (Liebermann et al., 2002; Isachenko et al., 2003). Липидный состав влияет на жизнеспособность ооцитов после

криоконсервации посредством изменения целостности мембран (Zhang et al., 2012). Обнаружено, что линолевая кислота, добавляемая в среду созревания ооцитов КРС, улучшает компетенцию к развитию заморожено-оттаянных ооцитов за счёт снижения проницаемости мембран для воды и действия криопротекторов (Matos et al., 2015).

Вместе с тем, описана возможность использования химических субстанций для модулирования липидного состава ооцитов и эмбрионов с целью повышения криорезистентности, а также влияния на процессы их развития. Более того, эти способы изменения липидного состава могут применяться не только для криоконсервации яйцеклеток и эмбрионов в животноводстве, но также для биомедицинских фундаментальных исследований (Prates et al., 2014).

Исходя из вышесказанного, исследование состава, метаболизма и биологической роли липидов (и, особенно, ЖК) несомненно может приблизить к пониманию сложных биохимических процессов, протекающих при созревании яйцеклеток.

Ранее нами было показано, что способность морфологически нормальных ооцитов достигать *in vitro* стадии МП не зависит от морфофункционального состояния (МФС) яичника (Сметанина и др., 2002). Неизвестно, однако, влияет ли исходное МФС яичника на биохимические процессы в ооцитах, в частности, на их химический состав.

Цель работы - исследовать жирнокислотный состав общих липидов созревающих *in vitro* ооцитов КРС с учётом морфо-функционального состояния яичников.

Материал и методы

Яичники коров были собраны немедленно после забоя животных на мясокомбинате и хранились при 30°C в среде Дюльбекко (ПанЭко, Россия) во время транспортировки. После доставки в лабораторию, яичники были отмыты в среде Дюльбекко при 30°C и затем классифицированы в соответствии с их МФС: 1) яичники с жёлтым телом от прошлого цикла, без доминирующего фолликула, со множеством фолликулов различного диаметра (<10 мм); 2) яичники с жёлтым телом от прошлого цикла, с доминирующим фолликулом диаметром более 10 мм и фолликулами различного диаметра (<10 мм); 3) яичники с большим функционирующим жёлтым телом и фолликулами различного диаметра (<10 мм); 4) яичники с фолликулярным кистозным образованием (>25 мм); 5) яичники с жёлтым телом от прошлых циклов и маленькими (1-2 мм) фолликулами - предположительно с ослабленной гормональной функцией.

ОКК были выделены с поверхности яичника рассечением в пластиковые чашки Петри диаметром 90 мм в течение 4 ч. после того как животные были забиты. ОКК выделялись из фолликулов диаметром 2-8 мм. ОКК 3-4 раза отмывались в среде для сбора ооцитов - Дюльбекко, дополненной 5% эстральной сыворотки (ЭС) КРС нашего приготовления и затем были отмыты 2-3 раза в среде TCM199 NEPES (Sigma, США), дополненной 10% ЭС. Для экспериментов были использованы ооциты по крайней мере с тремя слоями компактных кумулюсных клеток и ровной гранулированной цитоплазмой. Для созревания ооцитов использовали среду TCM-199 (Sigma, США) с добавлением 10% ЭС, 0,2 мМ пирувата Na (Serva, Германия), 1,5 мМ глутамин (Serva, Германия). ОКК культивировали в микрокаплях, 20 ОКК на 100 мкл среды, под парафиновым маслом (Fluka, Швейцария). Культивирование проводили в течение 24 ч при температуре 38,5°C, газовая фаза - 5% CO₂ в воздухе.

После созревания кумулюсные клетки были удалены с помощью 0,5% р-ра гиалуронидазы (Sigma, США) и механического пипетирования. Денудированные ооциты были трижды отмыты в среде Дюльбекко для полного удаления следов сыворотки. Денудированные яйцеклетки каждого из пяти вариантов (различное МФС яичников) распределяли по двум группам : 1) с ПНТ (стадия МП); 2) без ПНТ. Материал собирали с 4-5 опытов - каждый вариант в отдельную пробирку. Образцы хранили при -20°C до проведения анализов. Анализ каждого варианта проводился в двух повторах методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ).

В связи с ограниченным количеством биологического материала, предварительной экстракции общих липидов ооцитов КРС не проводили. Полученные ооциты обрабатывали 10 мл смеси хлороформ-метанол в соотношении 2:1, через 12 ч. добавляли 10 мл дистиллированной воды и после полного расслоения фракций декантировали нижнюю фазу в пробирку. После упаривания хлороформа

в пробирку вносили метилирующую смесь (MeOH : HCl, 1:1) и помещали в термостат при 80°C на 4 ч., после чего экстрагировали метиловые эфиры ЖК 3 мл гексана. Гексан упаривали под вакуумом до 0,2 мл, затем проводили анализ. ЖКС ооцитов определяли на газожидкостном хроматографе Chrom-5 (Чехословакия), оснащенный интегратором CI-100. Анализ проводили на набивной стеклянной колонке L=300 см; d=0,3 см. Твердый носитель - Chromaton AWHMDS 125-140 меш. Жидкая неподвижная фаза диэтиленгликольянтарат - 12%.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены данные по ЖКС общих липидов ооцитов КРС из яичников различного МФС после ядерного созревания *in vitro*. Удалось определить 15 ЖК, из них 10 - воспроизводимо, без «следовых» количеств.

В целом, состав ЖК в ооцитах КРС существенно не отличался в яичниках различных МФС. Также схожи были и основные составляющие ЖКС состава ооцитов выделивших и не выделивших ПНТ после культивирования в среде созревания, что совпадает с данными (Lara et al., 2011). При этом наблюдались заметные различия по содержанию некоторых ЖК между ооцитами с ПНТ и без него. Так, в случае с пальмитиновой кислотой можно говорить о значительно большем содержании этой кислоты в ооцитах с ПНТ. Также наблюдалось большее содержание стеариновой и олеиновой кислот в ооцитах, выделивших ПНТ. В то же время в ооцитах с ПНТ было отмечено меньшее содержание некоторых ненасыщенных ЖК - линолевой, линоленовой и арахидоновой.

Поскольку МФС яичников не влияло на ЖКС ооцитов, для определения статистической значимости различий между ооцитами с ПНТ и без ПНТ, данные по всем пяти МФС были объединены, при этом основную массу составляли ненасыщенные ЖК (табл. 2). Независимо от степени зрелости ооцитов, этот показатель составил 76,4% для ооцитов, выделивших ПНТ и 82,7% для ооцитов без ПНТ. Как следствие, индекс насыщенности ЖК был выше для ооцитов первой группы. Основными составляющими липидов ооцитов с ПНТ были линолевая (37,1%), линоленовая (27,0%), пальмитиновая (12,0%), стеариновая (7,37%), арахидоновая (6,33%) и олеиновая (5,99%) кислоты. Ооциты, выделившие ПНТ после культивирования в среде созревания, содержали существенно больше пальмитиновой, стеариновой, олеиновой кислот и меньше линолевой, линоленовой и арахидоновой кислот по сравнению с ооцитами без ПНТ (табл. 2).

Опубликован ряд работ, в которых изучался ЖКС липидов в незрелых ооцитах КРС (McEvoy et al., 2000; Sata et al., 1999; Lara et al., 2011; Kim 2001; Reis et al., 2003), и представленные в них данные согласуются с полученными нами результатами в том смысле, что несколько ЖК являются преобладающими (каждая занимает 5% от суммы всех кислот). Однако, сами эти кислоты и их процентное содержание различаются в упомянутых работах.

Так, сообщалось, что в незрелых ооцитах КРС преобладают миристиновая и докозогексаеновая кислоты (C22:6) (Sata et al., 1999) Однако другие авторы установили, что преобладающими являются пальмитиновая (C16:0), стеариновая (C18:0) и олеиновая (C18:1) ЖК, хотя они и отличались по степени возрастания содержания (McEvoy et al., 2000; Lara et al., 2013; Kim 2001; Reis et al., 2003). Так, в работе (McEvoy et al., 2000) было выявлено наибольшее содержание пальмитиновой кислоты (32,0%), далее шли олеиновая (25,1%) и стеариновая кислоты (14,2), а в другом исследовании (Reis et al., 2003) сообщалось, что преобладающей была пальмитиновая кислота, затем шли стеариновая и олеиновая кислоты.

Таблица 1. Жирнокислотный состав общих липидов яйцеклеток крупного рогатого скота из яичников различного морфофункционального состояния после созревания *in vitro*, % от суммы всех кислот

Жирные кислоты	Морфофункциональное состояние яичника (с учётом наличия или отсутствия в яйцеклетках первого направительного тельца)					
	1Д	1Н	2Д	2Н	3Д	3Н
C _{8:0} каприловая	0,11±0,01	0,24±0,01	0,26±0,02	0,32±0,02	0,39±0,02	0,17±0,02
C _{10:0} каприновая	0,29±0,03	0,59±0,03	0,83±0,04	0,99±0,04	1,09±0,03	0,68±0,06
C _{12:0} лауриновая	0,37±0,02	0,77±0,03	1,46±0,51	1,16±0,02	1,28±0,03	0,88±0,04
C _{14:0} миристиновая	0,90±0,03	1,14±0,11	1,20±0,04	1,40±0,06	1,63±0,10	1,10±0,07
C _{16:0} пальмитиновая	12,32±0,56	9,01±0,08	7,15±0,02	6,11±0,13	13,66±0,38	8,66±0,37
C _{16:1} пальмитоолеиновая	0,13±0,02	0,17±0,02	следы	0,18±0,01	следы	0,11±0,02
C _{17:0} гептадекановая	0,11±0,02	0,25±0,04	следы	следы	следы	0,24±0,04
C _{18:0} стеариновая	6,47±0,07	5,60±0,28	6,14±0,09	5,15±0,27	7,12±0,07	5,76±0,28
C _{18:1} олеиновая	6,43±0,16	5,89±0,15	5,14±0,26	4,09±0,04	5,32±0,22	4,10±0,09
C _{18:2} линолевая	36,65±0,23	38,67±0,40	39,69±0,29	40,29±0,28	36,83±0,83	38,84±0,39
C _{18:3} линоленовая	28,52±0,13	30,13±0,08	30,62±0,37	31,20±0,15	25,84±0,56	31,66±0,36
C _{19:0} нонадекановая	0,21±0,06	0,50±0,02	следы	0,31±0,04	0,21±0,03	0,26±0,02
C _{20:0} арахидиновая	0,10±0,01	0,15±0,01	следы	следы	0,18±0,02	0,20±0,04
C _{20:3} эйкозотриеновая	0,17±0,02	0,31±0,06	0,31±0,08	0,21±0,03	0,32±0,02	0,31±0,03
C _{20:4} арахидоновая	7,25±0,18	6,63±0,22	7,23±0,20	8,62±0,12	6,22±0,21	7,24±0,19

Продолжение таблицы 1

Жирные кислоты	4Д	4Н	5Д	5Н
C _{8:0} каприловая	0,52±0,01	0,20±0,02	0,41±0,02	0,17±0,02
C _{10:0} каприновая	1,34±0,03	0,91±0,03	1,05±0,04	0,90±0,01
C _{12:0} лауриновая	1,56±0,15	0,89±0,03	1,28±0,04	0,97±0,02
C _{14:0} миристиновая	1,84±0,07	1,05±0,08	1,55±0,10	1,17±0,08
C _{16:0} пальмитиновая	14,21±0,37	6,26±0,16	13,61±0,53	6,26±0,08
C _{16:1} пальмитоолеиновая	0,09±0,01	0,25±0,02	следы	0,20±0,02
C _{17:0} гептадекановая	0,16±0,02	0,21±0,03	следы	0,14±0,03
C _{18:0} стеариновая	8,57±0,09	6,11±0,37	9,16±0,14	6,57±0,07
C _{18:1} олеиновая	6,79±0,20	4,22±0,12	6,67±0,16	4,67±0,22
C _{18:2} линолевая	34,84±0,42	39,88±0,28	36,37±0,36	40,00±0,05
C _{18:3} линоленовая	23,48±0,38	31,65±0,25	24,92±0,47	30,84±0,42
C _{19:0} нонадекановая	0,35±0,04	0,23±0,02	0,21±0,03	0,13±0,01
C _{20:0} арахидиновая	0,42±0,02	0,21±0,03	следы	0,15±0,04
C _{20:3} эйкозотриеновая	0,16±0,04	0,10±0,04	следы	0,27±0,03
C _{20:4} арахидоновая	5,67±0,16	7,83±0,17	4,95±0,07	7,59±0,16

Примечание: Д – наличие первого направительного тельца; Н – отсутствие первого направительного тельца; 1-5 – морфофункциональное состояние яичника.

В работе (Lara et al., 2011) не обнаружено различия между ЖК составом липидов в незрелых ооцитах и ооцитах, созревших *in vitro* в присутствии сыворотки. Вместе с тем, ЖКС липидов у этих ооцитов отличался от ЖК состава сыворотки, добавленной в культуральную среду. В другом исследовании (Kim et al., 2001) сообщалось, что ЖК *in vitro* созревших ооцитов, культивированных в среде, содержащих сыворотку или поливинилалкоголь, были схожими по составу, однако созревшие ооциты имели сниженные концентрации линолевой (C_{18:2}) и арахидоновой кислот (C_{20:4}), по сравнению с незрелыми ооцитами, что совпадает с нашими результатами. Данные, представленные в работе (Lara et al., 2011), также показали снижение арахидоновой кислоты (C_{20:4}) в результате созревания (что совпадает с нашими результатами), но только для ооцитов, созревших с конъюгированной линолевой кислотой.

Таблица 2. Содержание основных жирных кислот в общих липидах ооцитов крупного рогатого скота после их созревания *in vitro* (% от суммы всех кислот)

Жирные кислоты	Наличие первого направительного тельца	
	есть	нет
C8:0	0,31±0,05	0,22±0,02
C10:0	0,87±0,12	0,80±0,06
C12:0	1,15±0,17	0,93±0,06
C14:0	1,29±0,11	1,18±0,05
C16:0	11,96±0,95***	7,34±0,51***
C18:0	7,37±0,42**	5,81±0,19**
C18:1	5,99±0,25**	4,63±0,25**
C18:2	37,10±0,55***	39,50±0,26***
C18:3	27,03±0,88***	31,03±0,22***
C20:4	6,33±0,33**	7,55±0,25**
Другие	0,60	1,01

Примечания: минорные компоненты жирных кислот общих липидов ооцитов крупного рогатого скота (другие) содержали C16:1, C17:0, C19:0, C20:0, C20:3 кислоты. ** P<0,01, P<0,001 по *t*-критерию

В нашей работе мы впервые изучили ЖКС созревших *in vitro* ооцитов КРС из яичников различного МФС. Нами показано, что ни МФС яичника, ни наличие или отсутствие ПНТ принципиально не влияет на ЖКС общих липидов ооцитов. Преобладающими во всех случаях являлись линолевая кислота – 34,8-40,0% и линоленовая – 23,5-31,7%. Из насыщенных ЖК преобладали пальмитиновая – 6,11-14,21% и стеариновая – 5,15-9,16%.

Полученные нами результаты отличаются от опубликованных ранее данных. Возможно, что причиной различий послужили генетически разные породы и возраст использованных в опытах животных, рацион кормления, а также культуральная система, применяемая для созревания ооцитов КРС вне организма.

Однако, нами выявлены устойчивые изменения в ЖКС общих липидов ооцитов КРС в связи с процессом ядерного созревания *in vitro*, независимые от морфофункционального состояния яичника, из которого эти ооциты получены. Это позволяет говорить о наличии некоего универсального механизма, регулирующего процесс ядерного созревания.

Можно предположить, что завершение первого мейотического деления связано с повышением “энергоемкости” общих липидов, которое необходимо для последующих этапов развития яйцеклетки. Как известно, запасные липиды животных тканей в качестве доминирующей кислоты содержат олеиновую (Gurr, Harwood, 1991), а пальмитиновая, стеариновая и олеиновая кислоты связаны общей синтетической цепочкой.

Уменьшение содержания линолевой, линоленовой и арахидоновой кислот (также объединенных общей синтетической цепочкой) может свидетельствовать увеличении синтеза простагландинов. Арахидоновая кислота, как известно, является непосредственным предшественником простагландинов. Основная физиологическая функция простагландинов состоит в модулировании активности аденилатциклазы. Простагландины повышают уровень цАМФ в тромбоцитах, щитовидной железе, желтом теле яичника, костной ткани плода, передней доле гипофиза и легких и снижают активность цАМФ в клетках почечных канальцев (Марри и др., 1993). Возможно, что именно посредством такого модулирования простагландины участвуют в процессах созревания ооцитов млекопитающих.

Как следует из наших результатов, содержание как линолевой, так и арахидоновой кислот меняется, возможно, именно в связи с процессом выделения ПНТ. Причем, если предположить, что линолевая кислота, согласно литературным данным, ингибирует разрушение зародышевого пузырька в ооцитах КРС, то в ооцитах без ПНТ её должно быть больше, что мы и наблюдали в наших

исследованиях с существенной разницей. В то же время, если допустить, на основании опубликованных работ, что дериваты арахидоновой кислоты принимают участие в индукции созревания ооцитов КРС, то в этом случае ооциты с ПНТ будут содержать существенно меньше арахидоновой кислоты, что также наблюдалось в наших опытах.

Хотя по результатам нашего исследования нельзя точно оценить роль отдельных ЖК в процессе ядерного созревания ооцитов КРС, можно предположить, что метаболизм ЖК, вероятно, играет важную роль на самых ранних преимплантационных стадиях развития. Дальнейшие исследования состава, метаболизма и биологической роли липидов (и, особенно, ЖК) в ооцитах млекопитающих могли бы, на наш взгляд, способствовать более глубокому пониманию механизмов оогенеза. Вместе с тем они могут иметь и практическое значение для определения оптимальных культуральных потребностей созревающих *in vitro* ооцитов (Dubeibe et al., 2019) и разработки эффективных методов их криоконсервации.

Список литературы

1. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека. М.: Мир, 1993.
2. Сметанина И.Г., Кривохарченко А.С., Иванова Л.Б., Журавлева Н.И. Созревание ооцитов крупного рогатого скота, взятых из яичников различного морфофункционального состояния. // Онтогенез. 2002. Т. 33. С. 201-205.
3. Aardema H., Vos P.L., Lolicato F. et al. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocytes developmental competence. // Biol. Reprod. 2011. Vol. 85. P. 62-69.
4. Aardema H., Lolicato F., van de Lest C.H. et al. Bovine cumulus cells protect maturing oocytes from increased fatty acid levels by massive intracellular lipid storage. // Biol. Reprod. 2013. Vol. 88. P. 164.
5. Adamiak S.J., Powell K., Rooke J.A. et al. Body composition, dietary carbohydrates and fatty acids determine post-fertilisation development of bovine oocytes in vitro. // Reproduction. 2006. Vol. 131. P. 247-258.
6. Coenen K., Massicotte L., Sirard M.A. Study of newly synthesized proteins during bovine oocyte maturation in vitro using image analysis of two-dimensional gel electrophoresis. // Mol. Reprod. Dev. 2004. Vol. 67. P. 313-322.
7. Dubeibe Marin D.F., da Costa N.N., di Paula Bessa Santana P. et al. Importance of lipid metabolism on oocyte maturation and early embryo development: Can we apply what we know to buffalo? // Anim. Reprod. Sci. 2019. Vol. 211. P. 106220-3.
8. Dunning K.R., Russell D.L., Robker R.L. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation. // Society for Reprod. and Fert. 2014. Vol. 148. P. 15-27.
9. Genicot G., Leroy J.L., Soom A.V., Donnay I. The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes. // Theriogenology. 2005. Vol. 63. P. 1181-1194.
10. Gurr M.I., Harwood J.L. Lipid Biochemistry. London-New York-Tokio-Melburne-Madras: Chapman and Hall, 1991.
11. Homa S.T., Racowsky C., McGaughey R.W. Lipid analysis of immature pig oocytes. // J. Reprod. Fertil. 1986. Vol. 77. P. 425-434.
12. Homa S.T., Brown C.A. Changes in linoleic acid during follicular development and inhibition of spontaneous breakdown of germinal vesicles in cumulus-free bovine oocytes. // J. Reprod. Fertil. 1992. Vol. 94. P. 153-160.
13. Isachenko V., Isachenko E., Rahimi G. et al. Ultra-structure of intracellular lipid vesicles of porcine GV-oocytes after in vitro fertilization and parthenogenetic activation. // Anat. Hystol. Embryo. 2003. Vol. 32. P. 126-128.
14. Kastrop P.M.M., Bevers M.M., Destree O.H.J., Kruij T.A.M. Analysis of protein synthesis in morphologically classified bovine follicular oocytes before and after maturation in vitro. // Mol. Reprod. Dev. 1990. Vol. 26. P. 222-226.
15. Kastrop P.M.M., Bevers M.M., Destree O.H.J., Kruij T.A.M. Protein synthesis and phosphorylation patterns of bovine oocytes maturing in vivo. // Mol. Reprod. Dev. 1991. Vol. 29. P. 271-275.
16. Khandoker M.Y., Tsujii H., Karasawa D. Fatty acid analysis of oocytes, oviductal and uterine fluids of rabbit. Anim. Sci. Technol. 1996; 67. P. 549-553.
17. Khandoker M.Y., Tsujii H., Karasawa D. Fatty acid composition of blood serum, oocytes, embryos and reproductive tract fluids of rat and comparison with BSA. // Anim.Sci.Technol. 1997a. Vol. 68. P. 1070-1074.
18. Khandoker M.Y., Tsujii H., Karasawa D. Fatty acid compositions of oocytes, follicular, oviductal and uterine fluids of pig and cow. // Asian-Australian J. Anim. Sci. 1997b. Vol. 10. P. 523-527.
19. Khandoker M.Y., Tsujii H., Karasawa D. A kinetic study of fatty acid composition of embryos, oviductal and uterine fluids in the rabbit. // Asian-Australian J. Anim. Sci. 1998. Vol. 11. P. 60-64.

20. Kim J.Y., Kinoshita M., Obnishi M., Fukui Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. // *Reproduction*. 2001. Vol. 122. P. 131-138.
21. Lapa M., Marques C.C., Alves S.P. et al. Effect of trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid on bovine oocyte competence and fatty acid composition. // *Reprod. Domest. Anim.* 2011. Vol. 46. P. 904-910.
22. Leroy J.L., Vanholder T., Mateusen B. et al. Non-esterified fatty acid in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. // *Reproduction*. 2005. Vol. 130. P. 485-495.
23. Liebermann J., Nawroth F., Isachenko V. et al. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. // *Biol. Reprod.* 2002. Vol. 67. P. 1671-1680.
24. Marei W.F., Wathes D.C., Fouladi-Nashta A.A. The effect of linolenic acid on bovine oocyte maturation and development. // *Biol. Reprod.* 2009. Vol. 81. P. 1064-1072.
25. Marei W.F., Wathes D.C., Fouladi-Nashta A.A. Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. // *Reproduction*. 2010. Vol. 139. P. 979-988.
26. Marei W.F.A., De Bie J., Mohey-Elsaeed O.J. et al. Alpha-linolenic acid protects the developmental capacity of bovine cumulus-oocyte complexes matured under lipotoxic conditions in vitro. // *Biol. Reprod.* 2017. Vol. 96. P. 1181-1196.
27. Matorras R., Ruiz J.I., Mendoza R. et al. Fatty acid composition of fertilization-failed human oocytes. // *Hum. Reprod.* 1998. Vol. 13. P. 2227-30.
28. Matos J.E., Marques C.C., Moura T.F. et al. Conjugated linoleic acid improves oocytes cryosurvival through modulation of the cryoprotectants influx rate // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2015. Vol. 13. P. 60.
29. McEvoy T.G., Coull G.D., Broadbent P.J. et al. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. // *J. Reprod. Fertil.* 2000. Vol. 118. P. 163-70.
30. Memili E., Peddinti D., Shack L.A. et al. Bovine germinal vesicle oocyte and cumulus cell proteomics. *Reproduction*. 2007; 33: 1107-20 Menezo Y., Renard J.P., Delobel B., Pageaux J.F. Kinetic study of fatty acid composition of day 7 to day 14 cow embryos. // *Biol. Reprod.* 1982. Vol. 26. P. 787-90.
31. Peddinti D., Memili E., Burgess S.C. Proteomics-based systems biology modeling of bovine germinal vesicle stage oocyte and cumulus cell interaction. // *Plos One*. 2010. Vol. 5. P. 1-13.
32. Prates E.G., Nunes J.T., Pereira R.M. A role of lipid metabolism during cumulus-oocyte complex maturation: impact of lipid modulators to improve embryo production. // *Mediat. Inflamm.* 2014. P. 692067-78.
33. Reis A., Rooke J.A., McCallum G.J. et al. Consequences of exposure to serum, with or without E supplementation, in terms of the fatty acid content and viability of bovine blastocysts produced in vitro. // *Reprod. Fertil. Dev.* 2003. Vol. 15. P. 275-84.
34. Sata R., Tsujii H., Abe H. et al. Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serum-free and serum-containing medium during early embryonic development. // *J. Reprod. Dev.* 1999. Vol. 45: 97-103.
35. Turathum B., Sroyraya M. Protein profile involved in mammalian oocytes maturation, fertilization and early embryogenesis (pre-implantation). // *Cell. Dev. Biol.* 2017. Vol. 6. P. 1-9.
36. Van Hoeck V., Leroy J.L., Arias Alvarez M. et al. Oocyte developmental failure in response to elevated nonesterified fatty acid concentrations: mechanistic insights. // *Reproduction*. 2013. Vol. 145. P. 33-44.
37. Wang G., Tsujii H., Khandoker M.Y. Fatty acid compositions of mouse embryo, oviduct and uterine fluid. // *Anim. Sci. Technol.* 1998. Vol. 69. P. 923-8.
38. Zhang W., Yi K., Yan H., Zhou X. Advances on in vitro production and cryopreservation of porcine embryos. // *Anim. Reprod. Sci.* 2012. Vol. 132. P. 115-22.

References (for publication in Russian)

1. Smetanina I.G., Krivokharchenko A.S., Ivanova L.B., Zhuravleva N.I. [Maturation of bovine oocytes taken from ovaries of various morphological and functional states]. *Ontogenez - Developmental Biology*. 2002. 33: 201-205.
2. Smetanina I.G. [The role of fatty acids in oocyte maturation in mammals: a review]. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology*. 2021. 2: 5-21.
3. Marri R., Grenner D., Meies P., Roduell V. *Biokhimiya cheloveka (Human biochemistry)*. Moscow: Mir Publ., 1993.

DOI: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2021.2.66-74

Study of fatty acid composition of total lipids in maturing *in vitro* cow's oocytes in relation to morpho-functional state of the ovary

¹Smetanina I.G., ²Krivokharchenko A.S.

¹*Institute of Animal Physiology, Biochemistry and Nutrition – Branch of Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Borovsk, Kaluga oblast;*

²*Immunobiotech Co, Kursk, Russia Federation*

ABSTRACT. The processes occurring during the maturation of animal oocytes is one of the key problems in developmental biology. are an essential component of animal cells. The role of fatty acids in the processes of maturation, fertilization and development of mammalian oocytes has been insufficiently studied. Previously, the authors showed that the ability of morphologically normal oocytes to reach the metaphase II stage *in vitro* does not depend on the morphofunctional state of the cow ovary. It is not known, however, whether the initial morphological and functional state of the ovary affects biochemical processes in oocytes, in particular, their chemical composition. To determine the fatty acid composition of the total lipids of oocytes in connection with the process of nuclear maturation, this study combined data on all five morphofunctional states of the ovaries in cows. It was shown that the morphofunctional state of the ovaries did not significantly affect the fatty acid composition of the total lipids of oocytes. It was found that fatty acids are mainly represented by unsaturated forms, both in oocytes with and without the first targeting body (76.7 and 83.1%, respectively). Oocytes with the first targeting body contained significantly more palmitic (12.0 vs 7.3%), stearic (7.37 vs 5.81%) and oleic acids (6.00 vs 4.63%) and less linoleic (37.1 vs 39, 5%), linolenic (27.0 vs 31.3%) and arachidonic acids (6.33 vs 7.55%) compared to oocytes without the first targeting body. Stable changes in the fatty acid composition of the total lipids of cattle oocytes were revealed in connection with the process of nuclear maturation *in vitro*. This allows us to speak about the presence of a certain universal mechanism that regulates the process of nuclear maturation.

Keywords: oocytes, maturation in vitro, first directional body, fatty acids, morphofunctional state of the ovary, cattle

Problemy biologii produktivnykh zhyvotnykh - Problems of Productive Animal Biology, 2021, 2: 66-74

Поступило в редакцию: 03.06.2021

Получено после доработки: 10.06.2021

Сметанина Ирина Геннадьевна, н.с., к.б.н.; 8(961)006-90-49; 8-(48438)-4-32-34);
sme.irina2011@yandex.ru

Кривохарченко Александр Сергеевич, н.с., к.б.н.