


**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА
ООЦИТОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ИЗ
ЯИЧНИКОВ РАЗЛИЧНОГО
МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ
ПОСЛЕ СОЗРЕВАНИЯ *in vitro***

Докладчик – Сметанина Ирина Геннадьевна к.б.н.

ВНИИФБиП – филиал ВИЖ им. Л.К.Эрнста

Брянск – 2022



Процессы, происходящие при созревании яйцеклеток животных, - одна из ключевых проблем биологии развития. Долгое время исследования оогенеза 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 и, в частности, ооцитов КРС как *in vivo*, так и *in vitro*. Между тем, липиды также являются важным компонентом клеток животных. Однако, их роль и, в частности, роль ЖК в процессах созревания, оплодотворения и развития яйцеклеток млекопитающих изучена недостаточно.

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

Следует обратить внимание и на практическую значимость исследований в этой области, поскольку именно липиды во многом определяют резистентность ооцитов при криоконсервации. Липидный состав влияет на жизнеспособность ооцитов после криоконсервации посредством изменения целостности мембран. Ранее нами было показано, что способность морфологически нормальных ооцитов достигать *in vitro* стадии МII не зависит от МФС яичника.

Неизвестно, однако, влияет ли исходное МФС состояние яичника на биохимические процессы в ооцитах, в частности, на их химический состав.

Учитывая это, в данной работе впервые была предпринята попытка исследовать ЖКС общих липидов ооцитов КРС из яичников различного МФС после их созревания *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ 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 желтым телом от прошлого цикла, без доминирующего фолликула, со множеством фолликулов различного диаметра (<10 мм); 2) яичники с желтым телом от прошлого цикла, с доминирующим фолликулом диаметром более 10 мм и фолликулами различного диаметра (<10 мм); 3) яичники с большим функционирующим желтым телом и фолликулами различного диаметра (<10 мм); 4) яичники с фолликулярным кистозным образованием (>25 мм); 5) яичники с желтым 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. Ооциты по крайней мере с тремя слоями компактных кумулюсных клеток и ровной гранулированной цитоплазмой были использованы для экспериментов. Для созревания ооцитов использовали среду TCM-199 (Sigma) с добавлением 10% ЭС, 0.2 мМ пирувата Na (Serva, Германия), 1.5 мМ глутамина (Serva). 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) 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 МШ); 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), оснащенном 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%.

Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия t-Стьюдента.

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

Жирнокислотный состав	Наличие первого направительного тельца	
	Есть	Нет
C8:0 каприловая	0.31+0.05	0.22+0.02
C10:0 каприновая	0.87+0.12	0.80+0.06
C12:0 лауриновая	1.15+0.17	0.93+0.06
C14:0 миристиновая	1.29+0.11	1.18+0.05
C16:0 пальмитиновая	11.96+0.95***	7.34+0.51***
C18:0 стеариновая	7.37+0.42**	5.81+0.19**
C18:1 олеиновая	5.99+0.25**	4.63+0.25**
C18:2 линолевая	37.10+0.55***	39.50+0.26***
C18:3 линоленовая	27.03+0.88***	31.03+0.22***
C20:4 арахидоновая	6.33+0.33**	7.55+0.25**

Результаты

Удалось определить 15 ЖК, из них 10 - воспроизводимо, без «следовых» количеств. Показано, что содержание ЖК в ооцитах не зависело от МФС яичников. Установлено, что в основном ЖК представлены ненасыщенными формами, как в ооцитах с ПНТ, так и без ПНТ (76.68% и 83.15%, соответственно). Сходными являлись и основные составляющие жирнокислотного состава (ЖКС) ооцитов обеих групп. В ооцитах, выделивших в процессе созревания ПНТ, преобладали линолевая (37.1%), линоленовая (27.03%), пальмитиновая (11.96%), стеариновая (7.37%), арахидоновая (6.33%) и олеиновая (5.99%) кислоты. При этом наблюдались различия в содержании этих ЖК между ооцитами с ПНТ и без ПНТ. После объединения всех данных по яичникам всех пяти МФС эти различия были статистически достоверными. Так, ооциты с ПНТ содержали достоверно больше пальмитиновой, стеариновой и олеиновой кислот и достоверно меньше линолевой, линоленовой и арахидоновой кислот по сравнению с ооцитами без ПНТ.

Выводы

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, 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. Возможно, что именно посредством такого модулирования простагландины участвуют в процессах созревания ооцитов млекопитающих.

Спасибо за
внимание!