

ОБЩИЕ ПРОБЛЕМЫ, ОБЗОРЫ

УДК 636.2:591.465.12:57.085.2:577.115.3

DOI: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2021.2.5-21

РОЛЬ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В СОЗРЕВАНИИ ООЦИТОВ

У МЛЕКОПИТАЮЩИХ (обзор)

Сметанина И.Г.

*ВНИИ физиологии, биохимии и питания животных – филиал ФИЦ
животноводства – ВИЖ им. Л.К. Эрнста», Боровск Калужской обл.,
Российская Федерация*

Известно, что культивирование ооцитов в среде с повышенным содержанием неэтерифицированных жирных кислот в период созревания действует на генетическую экспрессию и фенотип эмбрионов, которые получают из этих ооцитов. Показано, что жирнокислотный состав общих липидов в ооцитах в и эмбрионах очень лабилен и зависит от физиологического окружения *in vivo* и от культуральных кондиций *in vitro*. Цель обзора – систематизация литературных данных и результатов собственных исследований, касающихся жирнокислотного состава (ЖКС) липидов яйцеклеток и влияния отдельных жирных кислот (ЖК) на созревание ооцитов. Основные разделы – жирнокислотный состав общих липидов в ооцитах млекопитающих, изменения ЖКС липидов в ооцитах и эмбрионах в зависимости от стадии развития; роль жирных кислот в созревании и развитии эмбрионов млекопитающих *in vitro*; влияние жирных кислот на метаболизм эмбрионов и экспрессию генов; эффекты жирнокислотного состава липидов при криоконсервации эмбрионов. В исследованиях автора показано, что содержание ЖК в ооцитах не зависело от морфофункционального статуса (МФС) яичников. В ооцитах, выделивших в процессе созревания первое направляющее тельце первого направляющего тельца (ПНТ), преобладали линолевая, линоленовая и пальмитиновая кислоты, при этом ооциты с ПНТ содержали больше пальмитиновой, стеариновой и олеиновой кислот и меньше линолевой, линоленовой и арахидоновой кислот по сравнению с ооцитами без ПНТ. Уменьшение содержания линолевой, линоленовой и арахидоновой кислот может свидетельствовать об усилении синтеза простагландинов. Практическая значимость исследований в этой области обусловлена, в частности, тем, что липиды во многом определяют резистентность ооцитов при криоконсервации.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, ооциты, созревание *in vitro*, жирные кислоты, морфофункциональный статус яичника

Проблемы биологии продуктивных животных. 2021, 2: 5-21

Введение

Используемые сокращения: ЖК – жирные кислоты; КРС – крупный рогатый скот; МФС – морфофункциональный статус; ПНТ – первое направляющее тельце; ОКК – ооцит-кумуляционный комплекс; ЭС – эстральная сыворотка; МП – метафаза II; цАМФ – циклический аденозинмонофосфат; IVF – оплодотворение *in vitro*; НЭЖК – неэтерифицированные ЖК; мРНК – матричная РНК; β-МА - β-меркаптоацетат; SA - стеариновая кислота; PA – пальмитиновая кислота; OA – олеиновая кислота; ЛДГ – лактатдегидрогеназа; GADPH – глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа; SLC2A1 – транспортер глюкозы 1; G6PD – глюкоза-6-фосфат дегидрогеназа; NMT3A – ДНК цитозин-5-метилтрансфераза 3A; CPT1A – карнитин-пальмитоил трансфераза; PLIN₂ – адипофиллин 2; ACSC1 – синтетаза жирных кислот; ACCA – ацетил-СоА карбоксилаза; TFAM – транскрипционный фактор А митохондрий; MNSOD – Mg-супероксид дисмутаза.

Введение

Процессы, происходящие при созревании яйцеклеток животных, – одна из ключевых проблем биологии развития. В течение многих лет исследования оогенеза были сфокусированы на ядерных

преобразованиях, тогда как биохимические процессы, происходящие в ооцитах в период созревания, изучены недостаточно. В последние годы были выявлены изменения в синтезе белков у млекопитающих в процессе ядерного созревания ооцитов (Turathum, Sroyraya, 2017), в частности, ооцитов КРС в условиях *in vivo* и *in vitro* (Kastrop et al., 1990; Kastrop et al., 1991; Coenen et al., 2004; Memili et al., 2007; Peddinti et al., 2010). Липиды также являются важным компонентом клеток животных, однако, роль липидов, в частности, роль жирных кислот (ЖК) в процессах созревания, оплодотворения и развития яйцеклеток у млекопитающих изучена недостаточно. Согласно современным представлениям, метаболизм ЖК в ооцит-кумулюсных комплексах (ОКК) млекопитающих регулируется как материнской физиологией, так и их непосредственным окружением; и это важно для понимания процессов созревания и развития ооцитов (Dunning et al., 2014). Богатые липидами культивируемые 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 предимплантационное развитие эмбрионов.

Цель данной работы – систематизация литературных данных и результатов собственных исследований, касающихся жирнокислотного состава яйцеклеток и влияния отдельных жирных кислот на созревание ооцитов у млекопитающих.

Жирнокислотный состав ооцитов млекопитающих

В течение последних десятилетий различными авторами изучался ЖКС липидов у эмбрионов, а также в тканях и жидкостях репродуктивных органов (клеток кумулюса, гранулёзы, фолликулярной жидкости, жидкостей репродуктивного тракта и др.) у различных видов животных. При этом найдены выраженные межвидовые различия (Homa et al., 1986; Khandoker et al., 1996; Khandoker et al., 1997; Wang et al., 1998; Matorras et al., 1998). Так, например, в ооцитах мыши преобладающей является арахионовая кислота, в ооцитах крыс – олеиновая, в ооцитах свиней – олеиновая и пальмитиновая.

Первое детальное исследование ЖКС общих липидов у незрелых ооцитов у свиней (Homa, 1986) показало, что наибольшую долю составляла пальмитиновая кислота; всего на долю насыщенных ЖК приходилось 61%, а ненасыщенных – 39%. Оказалось, что триацилглицеролы, свободные ЖК и, главным образом, фосфолипиды, особенно фосфатидилэтаноламин, значительно обогащены *n-6* ненасыщенными ЖК кислотами, особенно линолевой, арахионовой и адреновой кислотами. По мнению автора, это может свидетельствовать о способности ооцитов синтезировать простагландины и лейкотриены.

Был проанализирован ЖКС общих липидов незрелых ооцитов кроликов (Khandoker et al., 1996). Наивысшим было содержание олеиновой и пальмитиновой кислот, затем линолевой и стеариновой. Позднее определили, что в незрелых ооцитах крыс преобладающей являлась олеиновая кислота, затем лигноцерининовая и миристиновая кислоты (Khandoker et al., 1997b). Таким образом, можно отметить, что представленные в вышеупомянутых работах данные в определенной степени близки.

С использованием капиллярной газовой хроматографии анализировали содержание ЖК в неоплодотворенных человеческих ооцитах (Matorras et al., 1998). Большинство ЖК оказались насыщенными (79%), из них стеариновая (39%) и пальмитиновая (33) оказались преобладающими. Из моновенасыщенных ЖК преобладающей была олеиновая кислота (10%); полиненасыщенные ЖК составляли 6.5% от всех ЖК. Можно сделать вывод, что большинство ЖК в неоплодотворенных ооцитах человека представлено насыщенными формами.

Противоречивыми являются данные, полученные и на яйцеклетках одного вида. ЖКС состав общих липидов, извлечённых из антральных фолликулов ооцитов КРС, был определён в 1997-1999 гг (Khandoker et al., 1997b). В этом исследовании преобладающими были олеиновая и пальмитиновая кислоты, что в принципе совпадает с данными (McEvoy et al., 2000). А по данным японских ученых (Sata et al., 1999) преобладающей является миристиновая кислота. Был определён ЖКС общих липидов незрелых ооцитов КРС, свиней и овец с интактной зоной пеллюцида (McEvoy et al., 2000). Всего удалось определить 24 ЖК, причем пальмитиновая (25-35%), стеариновая (14-16%) и олеиновая (22-26%) были наиболее преобладающими у всех трех видов. При этом авторами не были выявлены

выраженные межвидовые различия. Следует отметить, что в опыт брали ооциты, предварительно отобранные по диаметру, что, возможно, сказалось на результатах.

Пальмитиновая, стеариновая и олеиновая кислоты были наиболее преобладающими в ооцитах коров, свиней и овец (Genicot et al., 2005). Неэтерифицированные (свободные) ЖК – важный энергетический источник для большинства клеток вследствие их высокого энергетического потенциала. В клетках ЖК активируются через прикрепление CoA групп, и после активации они могут быть полностью окислены в митохондриях и конвертированы в химическую энергию через β -окисление и последующее окислительное фосфорилирование.

Используя различные методические подходы, многие исследователи определяли количественное содержание липидов в ооцитах и определили, что триацилглицеролы – их главная составляющая (Sturney et al., 2009).

В нашем исследовании (Сметанина, 2021) был определён ЖКС общих липидов в созревших *in vitro* ооцитах КРС из яичников разного морфофункционального состояния (МФС) в зависимости от наличия или отсутствия первого направительного тельца (ПНТ). Показано, что ни МФС яичника, ни наличие или отсутствие ПНТ принципиально не влияет на ЖКС состав общих липидов ооцитов. Преобладающими во всех случаях были линолевая кислота – 34.84-40.00% , линоленовая – 23.48-31.66%: из насыщенных ЖК преобладали пальмитиновая – 6.11- 14.21% и стеариновая – 5.15-9.16%.

Следует особо отметить, что в обсуждаемой работе впервые был определён ЖКС состав общих липидов в ооцитах КРС после культивирования *in vitro*. Полученные результаты не совпадают с данными авторов, согласно которым пальмитиновая и олеиновая кислоты в незрелых ооцитах КРС представлены в самых высоких концентрациях (Khandoker et al., 1997a), и с результатами (Sata et al., 1999), согласно которым преобладающей в незрелых ооцитах КРС является миристиновая кислота (59.6%). Это несоответствие может объясняться несколькими причинами: 1) разными стадиями развития ооцитов (вышеупомянутые авторы анализировали незрелые ооциты КРС, полученные из антральных фолликулов яичника); 2) различным возрастом и породами животных; 3) особенностями состава среды созревания, используемой в обсуждаемых экспериментах. В частности, было показано (Sata et al., 1999), что включение сыворотки в среду культивирования эмбрионов КРС в значительной степени влияет на ЖКС состав их общих липидов. В то же время наблюдается сходство ЖКС липидов фолликулярной жидкости КРС, отмеченное в работе (Homa, Brown, 1992), с результатами, полученными в нашем исследовании. Линолевая кислота была основной составляющей ЖК (около трети от всех) общих липидов фолликулярной жидкости, а насыщенные ЖК составляли менее 30% от всего состава.

В то же время следует подчеркнуть, что мы анализировали ЖКС ооцитов после их созревания *in vitro*, в то время как вышеупомянутые авторы использовали незрелые ооциты КРС, полученные из антральных фолликулов яичника. Поэтому можно предположить, что ооциты разных стадий развития имеют различный ЖКС состав общих липидов.

ЖКС состав общих липидов в ооцитах млекопитающих может зависеть и от других факторов. ЖКС состав фосфолипидов ооцитов КРС зависит от сезона года (Zeron et al., 2001). Показано, что летом имеется более высокий процент насыщенных ЖК и что процент мононенасыщенных и полиненасыщенных ЖК был выше в ооцитах зимой. Добавление в корм овец полиненасыщенных ЖК изменяет ЖКС состав ооцитов, влияет на их качество и выживаемость при криоконсервации (Zeron et al., 2002).

Учитывая данные литературы, согласно которым ЖКС липидов в ооцитах и эмбрионах очень лабилен и зависит от физиологического окружения *in vivo* и от культуральных кондиций *in vitro*, можно сделать вывод, что в наших исследованиях морфофункциональное состояние яичника не оказало принципиального влияния на ЖКС состав общих липидов ооцитов КРС, хотя по некоторым ЖК наблюдаются существенные различия между отдельными морфофункциональными состояниями яичников. В то же время 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.

Уменьшение содержания линолевой, линоленовой и арахидоновой кислот (также объединенных общей синтетической цепочкой) может свидетельствовать об усилении 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, жёлтом 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.

Линолевая кислота сама по себе может ингибировать разрушение зародышевого пузырька в ооцитах КРС (Homa, Brown, 1992). В этом случае в ооцитах с ПНТ ее должно быть больше, что мы и наблюдаем в нашем исследовании. В то же время, если предположить, что согласно литературным данным дериваты арахидоновой кислоты принимают участие в индукции созревания ооцитов КРС, то в этом случае ооциты с ПНТ, возможно, будут содержать меньше арахидоновой кислоты, что также наблюдается в наших исследованиях.

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

Также у коров установлено сходство между ЖКС общих липидов ооцитов, фолликулярной жидкости и жидкостями репродуктивного тракта (Khandoker et al., 1997a), а у кроликов (Khandoker et al., 1996) и в несколько меньшей степени у крыс (Khandoker et al., 1997b) между ЖКС составом общих липидов ооцитов, сыворотки крови и жидкостями репродуктивного тракта.

В целом, есть основание предполагать, что ЖКС общих липидов в ооцитах и эмбрионах млекопитающих очень лабилен и зависит от многих факторов, в частности, от стадии развития, физиологического окружения *in vivo* и от культуральных кондиций *in vitro*. Возможно, в нашем случае на ЖКС состав ооцитов КРС оказали влияние специфические особенности используемой в среде созревания эстральной сыворотки. Это предположение требует дальнейших экспериментальных исследований.

Таким образом, полученные данные показывают, что ядерное созревание ооцитов КРС *in vitro* связано с некоторыми изменениями в ЖКС общих липидов. Для некоторых ЖК эти изменения устойчивы, не зависят от морфофункционального состояния яичника, из которого получены ооциты, и, следовательно, могут быть отнесены непосредственно к биохимическим механизмам, регулирующим процесс первого мейотического деления.

Изменения ЖКС общих липидов в ооцитах и эмбрионах в зависимости от стадии развития

Хотя ранее в опытах на КРС, крысах и мышах (Menezo et al., 1982; Khandoker et al., 1997; Wang et al., 1998) было установлено, что ЖКС липидов в доимплантационных эмбрионах *in vivo* может значительно меняться в зависимости от стадии развития, практически отсутствуют данные по динамике содержания ЖК в период созревания яйцеклеток. Неясной остаётся и роль липидов в процессе мейоза. Можно привести лишь отдельные работы, выполненные на яйцеклетках животных разных видов. Интересно, что линолевая, линоленовая и арахидоновая кислоты на стадии незрелых ооцитов у крыс не были обнаружены, но начинали в заметных количествах появляться в одноклеточных эмбрионах (зиготах).

В то же время установлено, что как в ооцитах, так и в 1-клеточных эмбрионах мышей наивысшим было содержание арахидоновой кислоты (30 и 60% соответственно) а за ней следовала олеиновая кислота (21 и 15%, соответственно) (Wang et al., 1998), а с 2-х клеточной стадии наблюдались значительные изменения в содержании ЖК по сравнению с ооцитами и 1-клеточными эмбрионами.

Фолликулярная жидкость также содержит свободные ЖК, с которыми кумулюсные клетки вступают в непосредственный контакт. По-видимому, кумулюсные клетки представляют только барьер между свободными ЖК в фолликулярной жидкости и ооцитом. Кумулюсные клетки экспрессируют CD36 транспортер ЖК, свидетельствуя, что они способны инкорпорировать ЖК из окружающей среды. Данные о составе теки, гранулёзы и кумулюсных клеток свидетельствуют, что повышение концентрации свободных ЖК может быть рискованным для ооцитов. Важно понимать, что повышение содержания свободных ЖК в окружении созревающего ооцита может существенно влиять на качество ооцитов и на их оплодотворяемость. Повышенная концентрация свободных ЖК в крови отражается на составе фолликулярной жидкости и может непосредственно оказывать влияние на ооцит-кумуляный комплекс (Aardema et al., 2013).

У кроликов (Khandoker et al., 1996) и в несколько меньшей степени – у крыс (Khandoker et al., 1997b) установлено сходство между ЖКС липидов в ооцитах, сыворотке крови и жидкостях репродуктивного тракта, а у коров – между ЖКС составом в ооцитах, фолликулярной жидкости и жидкостях репродуктивного тракта (Khandoker et al., 1997a). В фолликулярной жидкости КРС линолевая кислота была основной составляющей ЖК (около трети от всех ЖК), а насыщенные ЖК составляли менее 30% от всего содержания ЖК (Homa, Brown, 1992),

В целом, можно сделать предварительное заключение, что ЖКС общих липидов в ооцитах и эмбрионах очень лабилен и зависит от физиологического окружения *in vivo* и от культуральных кондиций *in vitro*. Возможно, в нашей работе на ЖКС состав липидов в ооцитах КРС оказали влияние специфические особенности используемой в среде созревания эстральной сыворотки, которые отчасти обусловили несовпадение полученных результатов с данными других авторов (Khandoker, 1997). С другой стороны, имеет место сходство результатов изучения ЖКС липидов фолликулярной жидкости КРС в работе (Homa, Brown, 1992) с нашими данными. Линолевая кислота у этих авторов была основной составляющей ЖК в фолликулярной жидкости, а насыщенные ЖК составляли менее 30% от всего содержания ЖК, что совпадает с нашими результатами. Вышесказанное подтверждает возможное наличие значительных межвидовых различий по ЖКС липидов яйцеклеток, а также внутривидовое сходство между ЖКС липидов в яйцеклетках и гомологичной фолликулярной жидкости. В исследованиях по изучению липидов фолликулярной жидкости в преовуляторной стадии у человека (Menezo et al., 1984) показано, что содержание ЖК в фолликулярной жидкости ниже, чем в сыворотке, т.е. основным источником липидов в этом случае является сыворотка. Соотношение различных ЖК (кроме стеариновой), в фолликулярной жидкости было такое же, как в сыворотке. В отличие от свиной фолликулярной жидкости, в фолликулярной жидкости человека не выявлено высокой концентрации арахидоновой кислоты.

Если предположить, что дериваты арахидоновой кислоты принимают участие в индукции созревания ооцитов КРС (по аналогии с морскими звёздами, Meijer et al., 1986), то в этом случае ооциты с полярными тельцами должны содержать меньше арахидоновой кислоты (что мы и наблюдаем, причем с существенной разницей).

Таким образом, полученные данные показывают, что ядерное созревание ооцитов КРС *in vitro* связано с определёнными изменениями в ЖКС составе общих липидов. Причем, для некоторых ЖК эти изменения устойчивы, не зависят от морфофункционального состояния яичника, из которого получены ооциты, и, следовательно, могут быть отнесены непосредственно к биохимическим механизмам, регулирующим процесс первого мейотического деления.

Изучение биохимических преобразований в ооцитах млекопитающих в процессе созревания *in vivo* и *in vitro*, может иметь важное значение как в понимании механизмов оогенеза, так и в определении оптимальных условий культивирования ооцитов *in vitro*.

Роль неэтерифицированных жирных кислот в созревании и развитии эмбрионов млекопитающих *in vitro*

Линолевая кислота была единственной неэтерифицированной (свободной) ЖК (из тестированных), которая значительно ингибировала разрушение зародышевого пузырька в освобождённых от кумулюса ооцитах КРС (Homa, Brown, 1992). Некоторые продукты (дериваты)

липоксигеназного окисления арахидоновой кислоты являются потенциальными индукторами созревания яйцеклеток у морских звёзд (Meijer et al., 1986a)

Есть некоторое количество данных, раскрывающих роль свободных ЖК в метаболизме яйцеклеток. Установлено, что линолевая кислота была единственной ЖК (из тестированных), которая значительно ингибировала разрушение зародышевого пузырька в освобождённых от кумулюса ооцитах КРС (Homa, Brown, 1992). Показано, что использование сыворотки с низкой концентрацией ЖК в средах дозревания и культивирования ооцитов и эмбрионов КРС повышает процент дробления и развития до бластоцист (Boediono et al., 1994). У одних видов морских звёзд (*Astropecten armatus*, *Astropecten irregularis*, *Astropecten auranciacus*, *Asterina pectinifera*, *Patiria miniata*) ЖК не влияют на созревание ооцитов, а у других видов (*Marthasterias glacialis*, *Asterias rubens*, *Luida ciliaris*) арахидоновая, эйкозопентаеновая, гидрооксйкозанта тетраеновая кислоты стимулировали созревание ооцитов (Meijer et al., 1986b). При этом процесс созревания ооцитов идёт в несколько этапов – увеличение фосфолирирования белков, появление цитоплазматического фактора «активатора созревания», разрушение зародышевого пузырька. В то же время исследование, проведенное на позвоночных (*Xenopus laevis*), не подтвердило эти данные (Hawkins, Brash, 1989). Авторы обнаружили высокую активность липоксигеназы и ее дериватов, которые тем не менее не индуцировали созревание ооцитов. Обнаружено, что продукты липоксигеназного окисления арахидоновой кислоты участвуют в разрыве стенки фолликула у крыс (Reuven, 1983).

Позднее появились данные о том, что отдельные ЖК предположительно участвуют в процессе созревания ооцитов животных. В частности, при изучении ингибирования спонтанного разрушения зародышевого пузырька в свободных от кумулюса ооцитах КРС линолевая кислота (18:2) была единственной из тестированных ЖК, которая существенно ингибировала разрушение зародышевого пузырька (Homa, Brown, 1992). Эффект был дозозависимым и наивысшим при концентрации линолевой кислоты порядка 50 мкМ.

Различия в составе свободных ЖК могут отражать некоторые биохимические эффекты в развитии преимплантационных эмбрионов КРС. Есть сообщения, связывающие липидный метаболизм с развитием преимплантационных эмбрионов млекопитающих. Установлено, что экзогенные ЖК могут непосредственно ассимилироваться мышинными эмбрионами (Pratt, 1978; Flynn, Hillman, 1980). Изучали эффект экзогенных ЖК на развитие 8-клеточных эмбрионов крыс до стадии бластоцисты. Олеиновая, линолевая и арахидоновая кислоты улучшали развитие эмбрионов крыс от 8 клеток до стадии бластоцисты. Особенно эффективна была в этом отношении олеиновая кислота. Пальмитиновая кислота не улучшала и даже несколько ухудшала развитие эмбрионов до стадии бластоцисты. Добавление смеси четырёх ЖК было более эффективно для развития эмбрионов крыс, чем дополнение культуральной среды какой-либо одной из кислот (Khandoker, Tsujii, 1999). Установили, что существует ингибирующий эффект некоторых экзогенных ЖК (в частности, линолевой) на развитие ранних мышинных эмбрионов, который может генерироваться перекислением липидов (Nonogaki et al., 1994). Использование сыворотки с низкой концентрацией ЖК в средах созревания ооцитов и культивирования эмбрионов КРС повышает уровень дробления и развития до стадии бластоцисты (Boediono et al., 1994). Охарактеризован метаболизм экзогенной пальмитиновой кислоты преимплантационными эмбрионами кроликов (Khandoker, Tsujii, 1998).

Обнаружены изменения в содержании линолевой кислоты в процессе фолликулярного роста и ингибирование спонтанного разрушения зародышевого пузырька в свободных от кумулюса ооцитах КРС. Был исследован состав свободных ЖК фолликулярной жидкости из малых и больших развивающихся фолликулов, а также действие насыщенных и ненасыщенных ЖК на спонтанное разрушение зародышевого пузырька. Линолевая кислота являлась основной составляющей (около трети от всех ЖК фолликулярной жидкости), затем идет олеиновая кислота (18.9 и 16.9% в малых и больших фолликулах, соответственно). Насыщенные ЖК составляют менее 30% от всего состава ЖК. Имеется явное отсутствие тетраеновой кислоты в малых и больших фолликулах. Пропорции линолевой кислоты были существенно ниже в фолликулярной жидкости от больших фолликулов (31% от всех ЖК), чем от малых фолликулов (34.8% от всех ЖК); наблюдалась значительная корреляция между диаметром фолликула и процентом линолевой кислоты в фолликулярной жидкости. Не наблюдалось каких-либо изменений в содержании других жирных кислот в ходе фолликулярного роста

(Homa, Brown, 1992). Если линолевая кислота (следуя этим данным) ингибирует разрушение зародышевого пузырька, то, вероятно, в яйцеклетках без ПНТ её должно быть больше, что мы и наблюдали в наших исследованиях (Сметанина, Кривохарченко, 2021).

Линолевая кислота и её метаболиты используются как пластический материал для построения субклеточных и клеточных мембран, а при недостатке линолевой кислоты появляются так называемые "ненормальные" мембраны, нарушается их проницаемость (Noble et al., 1978). Учитывая наши результаты, можно сделать вывод, что ядерное созревание, а именно – выделение первого полярного тельца связано с увеличением хрупкости мембраны, так как в яйцеклетках с полярным тельцем линолевой кислоты в общих липидах содержится существенно меньше.

Входя в состав фосфолипидов, линолевая кислота выполняет важную функцию в клеточных мембранах. В последнее время в связи с развитием молекулярной биологии всё больше внимания уделяется роли линолевой кислоты и её производных в структуре и функциях мембран. Включение незаменимых ЖК определяет некоторые физико-химические свойства мембран клеток и клеточных органелл – митохондрий, лизосом, микросом. Возможно, что избирательная проводимость мембран митохондрий существенно зависит от природы ЖК, входящих в состав фосфолипидов (Gvarnieri, Johnson, 1971; Volpo et al., 1973; Страйер, 1985; Бохински, 1987).

В отличие от растительных тканей, ткани животных обладают весьма ограниченной способностью превращать насыщенные ЖК в ненасыщенные. Незаменимыми ненасыщенными ЖК являются линолевая, альфа-линоленовая и арахидоновая. Незаменимые ЖК входят в состав структурных липидов клетки, они важны для формирования структуры митохондриальных мембран и в больших количествах обнаружены в органах размножения. Точка плавления, а следовательно, и текучесть жиров зависят от содержания в них ненасыщенных ЖК. Фосфолипиды клеточных мембран содержат ненасыщенные кислоты, которые играют важную роль в обеспечении текучести мембран. Помимо того, что незаменимые ЖК используются в качестве предшественников в биосинтезе простагландинов, они по-видимому выполняют ещё ряд других функций, которые полностью пока не выяснены.

Как следует из наших результатов, содержание линолевой и арахидоновой кислот изменяется, вероятно, именно в связи с процессом выделения ПНТ (Сметанина, Кривохарченко, 2021). Причём, если линолевая кислота ингибирует разрушение зародышевого пузырька в ооцитах КРС, то в ооцитах без ПНТ её должно быть больше, что мы и наблюдали в наших исследованиях. В то же время, если предположить, что, согласно литературным данным, дериваты арахидоновой кислоты принимают участие в индукции созревания ооцитов КРС, то в этом случае ооциты с ПНТ будут содержать меньше арахидоновой кислоты, что также наблюдается в наших опытах.

Уменьшение содержания линолевой, линоленовой и арахидоновой кислот в ооцитах с ПНТ может свидетельствовать об увеличении синтеза простагландинов. Арахидоновая кислота, как известно, является непосредственным предшественником простагландинов.

Простагландины были первоначально обнаружены в семенной жидкости, но затем найдены в составе практически всех тканей млекопитающих; они обладают целым рядом важных физиологических и фармакологических свойств. Они синтезируются *in vivo* путём циклизации участка в центре углеродной цепи 20-С (эйкозановых) полиненасыщенных ЖК (например, арахидоновой кислоты) с образованием циклопентанового кольца. Простагландины являются гормонами местного действия; при необходимости они быстро синтезируются и действуют в непосредственной близости от места их синтеза. Основная физиологическая функция простагландинов состоит в модулировании активности аденилатциклазы. Простагландины повышают уровень цАМФ в тромбоцитах, щитовидной железе, жёлтом теле яичника, костной ткани плода, передней доле гипофиза и легких и снижают активность цАМФ в клетках почечных канальцев (Марри и др., 1993). Возможно, что посредством такого модулирования простагландины участвуют в процессах созревания ооцитов животных. Поскольку содержание вышеназванных трёх кислот уменьшается в ооцитах с первым направляющим тельцем и практически не зависит от морфофункционального состояния яичника из которого получены эти ооциты, можно предположить существование некоего общего биохимического механизма, лежащего в основе процессов первого мейотического деления. В пользу этого говорят и

полученные нами ранее данные (Сметанина и др., 2002) о независимости процесса выделения ПНТ от МФС яичника из которого получены ооциты.

Влияние жирных кислот на метаболизм эмбрионов и экспрессию генов

Предполагается, что кумулюсные клетки напрямую влияют на отложение в ооцитах триацилглицероов и содержание свободных ЖК, подобно их роли в контроле содержания холестерина в ооцитах (Su et al., 2008). Созревание ооцитов КРС в отсутствие кумулюсных клеток приводит к снижению внутриклеточного содержания липидов (Auclair et al., 2013), свидетельствуя о том, что в отсутствие метаболитов кумулюсных клеток ооцит менее способен к отложению липидов и с меньшей скоростью утилизирует внутриклеточные липидные запасы для своих энергетических нужд. Активация гормоночувствительной липазы и снижение уровня триацилглицеролоов в ходе созревания ооцитов, оплодотворения и раннего эмбрионального развития свидетельствуют о том, что запасы жира расходуются на энергетическую поддержку этих процессов. Ферменты липидного метаболизма, в том числе синтеза *de novo* ЖК, также и как ферментные системы, участвующие в процессах транскрипции и синтеза белка, экспрессируются в ооцитах (Auclair et al., 2013).

Мышечные ооциты с плохим потенциалом к развитию содержат больше липидных гранул по сравнению с нормально развивающимися ооцитами, но нужно отметить, что “плохие” ооциты имеют и другие фундаментальные цитоплазматические отличия (Monti et al., 2013). Жирнокислотный состав липидов влияет на выживаемость ооцитов после криоконсервации за счёт изменения целостности мембраны, при этом большую роль играет содержание олеиновой кислоты которая влияет на текучесть клеточной мембраны (Zhang et al., 2012).

Дактирующие коровы, получавшие с кормом повышенное содержание линолевой кислоты, имели повышенное содержание этой ЖК в фолликулярной жидкости и ОКК, в то время как коровы, получавшие с кормом повышенное количество α -линоленовой кислоты, имели более высокое содержание этой кислоты в фолликулярной жидкости, гранулёзных клетках и аспирированных ОКК, также как и повышенный уровень дробления после IVF (Zachut et al., 2010).

У КРС ОКК имеют более высокое содержание насыщенных НЭЖК по сравнению с клетками гранулёзы и плазмой крови, свидетельствуя о селективном поглощении и/или *de novo* синтезе ЖК в ооцитах для обеспечения энергетических потребностей. Тёлки со средним индексом упитанности имели меньше ЖК в аспирированных ОКК по сравнению с тёлками, которые имели низкую упитанность; при этом включение липидных добавок в рацион в течение 35 дней повышало общее содержание ЖК в ОКК (Adamiak et al., 2006).

В зависимости от того, является ли ЖК насыщенной или нет, она по-разному влияет на созревание ооцитов. Ненасыщенные ЖК обычно оказывают благоприятный эффект на последующее эмбриональное развитие. Добавление конъюгированной линолевой кислоты (t10, c12CLA) к ОКК в период созревания повышает у КРС содержание t10, c12CLA как в кумулюсных клетках, так и в ооцитах, но не изменяет общий уровень ЖК в ОКК (Lara et al., 2011). Показано, что созревание *in vitro* в присутствии конъюгированной линолевой кислоты улучшает у КРС морфологию бластоцист (Lara et al., 2011). Аналогично, обработка ОКК линолевой кислотой повышает созревание до стадии метафаза II (МII) и стимулирует эмбриональное развитие. Этот эффект обусловлен её способностью влиять на продукцию простагландинов (Marei et al., 2009) и повышать активность MAPK сигнала (Marei et al., 2010). Однако, даже ненасыщенные ЖК могут оказывать угнетающий эффект в высоких концентрациях, так как линолевая кислота при повышении дозы снижает расширение кумулюса и ухудшает созревание (Marei et al., 2009, 2010). Подобно этим данным, выдержка созревающих ооцитов с высоким содержанием олеиновой кислоты (1 мМ в присутствии 10% сыворотки) снижает прогрессию до МII и снижает последующее дробление и эмбриональное развитие (Jorritsma et al., 2004).

В течение 44 дней после рождения уровень НЭЖК в фолликулярной жидкости повышается так же как в сыворотке, но фолликулярная жидкость селективно обогащена пальмитиновой, олеиновой и линолевой ЖК (Leroy et al., 2005a). Эти исследования чётко показывают, что уровень сывороточных НЭЖК динамичен, существенно повышаясь при рождении. В течение лактации уровень НЭЖК в фолликулярной жидкости также повышается, но они имеют свой особый профиль по сравнению с сывороткой. Индивидуальные ЖК влияют на созревание ооцитов и их компетенцию к развитию.

Обработка в процессе созревания ооцитов КРС стеариновой или пальмитиновой кислотами (в относительно высоких дозах, сравнимых с их уровнем в фолликулярной жидкости у лактирующих коров) ингибировала расширение кумулюса, повышая апоптоз в кумулюсных клетках и снижая прогрессию до стадии МП (Leroy et al., 2005a).

Ооциты КРС, созревшие *in vitro*, показывают заметное повышение количества липидных гранул по сравнению с ооцитами на стадии зародышевого пузырька. У ОКК, культивируемых в среде с пальмитиновой и стеариновой кислотой в ходе созревания, наблюдалось снижение размеров липидных гранул и уменьшение их количества по сравнению с контролем. Причем, добавка олеиновой кислоты делает обратимыми эти эффекты и при высоких концентрациях даже стимулирует накопление липидов, то есть повышает размеры гранул и их количество (Aardema et al., 2011). Однако, когда ОКК были обработаны смесью этих трёх кислот (пальмитиновой, стеариновой и олеиновой) в ходе созревания *in vitro*, состав липидов ооцитов не изменялся даже в кумулюсных клетках, проявляющих способность аккумулировать липиды (Aardema et al., 2013). Липазные ферменты обнаруживаются в ОКК, и их активность, по-видимому, изменяется в процессе созревания. Основываясь на их роли в этих клетках, можно предположить, что экстраклеточные липазы могут опосредовать перенос ЖК из липопротеинов фолликулярной жидкости в кумулюсные клетки, а внутриклеточные липазы через взаимодействие с белками липидных гранул, такими как Perilipin-2, который экспрессируется в ооцитах (Aardema et al., 2011), освобождают ЖК из депонированных липидов ооцитов.

Повышенная концентрация НЭЖК в плазме крови, связанная с такими отклонениями в материнском организме, как ожирение или диабет II типа, изменяет микроокружение в фолликуле и вызывает понижение фертильности, связанной со снижением компетенции ооцитов к развитию. Были проведены исследования для ответа на вопрос о том, влияет ли повышенная концентрация НЭЖК в ходе созревания ооцита на развитие или физиологию зигот, формирующихся из этих ооцитов, используя в качестве модели ооциты КРС (Van Hoek et al., 2011). Зиготы дорастивали до бластоцист, которые оценивали по их качеству в отношении общего числа клеток, апоптоза, экспрессии ключевых генов, аминокислотного и энергетического обмена. Созревание ооцитов при повышенной концентрации свободных ЖК приводило к получению бластоцист с существенно сниженным количеством клеток, повышенным процентом апоптозных клеток и сниженным уровнем мРНК генов DNMT3A, IGF2R и SLC2A1. Кроме того, в этих бластоцистах снижалось поглощение кислорода, пирувата и глюкозы, повышалось поглощение лактата и утилизация аминокислот. Эти данные свидетельствуют о том, что культивирование созревающих ооцитов в среде с повышенной концентрацией свободных ЖК оказывает негативное влияние на показатели оплодотворяемости не только через снижение способности ооцитов к развитию, но также через ухудшение качества ранних эмбрионов и их жизнеспособности. Созревание ооцитов с повышенным содержанием свободных ЖК отражается на экспрессии геномных паттернов полученных бластоцист.

Существенное повышение относительного содержания мРНК в High Combi эмбрионах (созревших с повышенным содержанием стеариновой, пальмитиновой и олеиновой ЖК) было выявлено для гена SLC2A1, который является классическим индикатором клеточного стресса. Такой же эффект наблюдался и для гена DNMT3A, который кодирует ДНК метилтрансферазу, функция которой необходима в ходе преимплантационного развития для правильной установки эпигенетических маркеров. Среди эпигенетических событий, происходящих в ходе преимплантационного развития, установление геномного импринтинга является критичным для последующего эмбрионального развития. IGF2R хорошо известен как материнский импринтный ген, чья дисрегуляция является причиной нарушения плацентации и фетального роста. Авторы обнаружили, что этот ген в данном исследовании был значительно более активен в эмбрионах High Combi по сравнению с другими обработками.

Культивирование ооцитов в среде с повышенным содержанием НЭЖК в ходе созревания действует на их генетическую экспрессию и фенотип эмбрионов, которые получают из этих ооцитов, особенно через нарушение окислительного метаболизма (Van Hoek et al., 2013).

В работе (Van Hoek et al. 2013) определяли экспрессию следующих генов:

- 1) SLC2A1, LDHA, GADPH, G6PD, участвующие в регуляции метаболизма;

- 2) ACSL1, ACCA, кодирующие синтез ЖК;
- 3) DNMTA3, кодирующий *de novo* метилирование ДНК;
- 4) MNSOD, GPX1, кодирующие реакции окислительного стресса;
- 5) CPT1A, кодирующий транспорт ЖК;
- 6) PLIN2, ответственный за контроль общего содержания липидов;
- 7) TFAM, транскрипционный фактор А митохондрий;

В данном исследовании использовали следующие обработки:

- 1) Контроль: физиологические концентрации НЭЖК (всего 150 мкМ НЭЖК = 25 мкМ SA + 50 мкМ PA + 75 мкМ OA);
- 2) High SA: повышенная концентрация SA (75 мкМ);
- 3) High Combi: комбинация повышенных концентраций отдельных НЭЖК (425 мкМ общих НЭЖК = 75 мкМ SA + 150 мкМ PA + 200 мкМ OA).

Ооциты, выдержанные в High Combi среде, показали значительное повышение мРНК генов LDHA и GADPH (ключевых генов, включенных в энергетический метаболизм) по сравнению с контрольными ооцитами. Повышение GADPH экспрессии также наблюдалось в High SA ооцитах. Показано, что в High SA-обработанных кумулюсных клетках, по сравнению с контрольными ОКК, была снижена экспрессия генов, связанных с метаболизмом глюкозы (SLC2A1, LDHA, G6PD). По контрасту, экспрессия GADPH была значительно выше в High SA-обработанных кумулюсных клетках. Кумулюсные клетки, собранные от ОКК, созревших в High Combi условиях, показали значительное снижение экспрессии LDHA, GADPH и G6PD. Экспрессия GPX1 и DNMTA3 была ниже в кумулюсных из ОКК, созревших в High SA и High Combi условиях, по сравнению с контрольными ОКК. Вдобавок, CPT1A и PLIN2 экспрессия была снижена в кумулюсных клетках, собранных от High SA-ОКК.

Была также проанализирована экспрессия четырёх генов в 7-дневных бластоцистах, полученных из ооцитов, созревших в различных условиях. Экспрессия ACSL1 была существенно повышена в эмбрионах, полученных из ооцитов, созревших в High Combi условиях, по сравнению с эмбрионами, полученными из контрольных и High SA ооцитов. ACCA экспрессия была значительно выше в группе, созревшей в High Combi условиях, по сравнению с контролем. Наконец, экспрессия генов, связанных с митохондриальным биогенезом и окислительным стрессом (TFAM, MNSOD), имеет тенденцию к повышению в High Combi эмбрионах.

Наличие β -МА (β -mercaptoacetate) – ингибитора β -окисления ЖК, не оказывало существенного эффекта на дробление и процент бластоцист, полученных из оплодотворённых ооцитов, созревших в контрольной среде созревания. Однако, процент бластоцист из ооцитов, созревших в присутствии β -МА и High Combi НЭЖК, был выше, чем в отсутствие β -МА.

Не наблюдалось существенной разницы в средних величинах поглощения кислорода зиготами, полученными из ооцитов, созревших в контрольных условиях и в условиях High Combi. Электронно-микроскопическое исследование созревших ооцитов не выявило каких-либо существенных межгрупповых различий в пространственном распределении митохондрий. Также и конфокальный анализ не выявил большой разницы в активности митохондрий в зиготах, полученных из различных обработок, хотя наблюдалась тенденция к повышению соотношения высоко и низко поляризованных митохондриальных мембран в High НЭЖК зиготах. Одним из возможных объяснений этого факта может являться метаболическая пластичность ранних эмбрионов. Измерение поглощения кислорода и соотношение высоко и низко поляризованных митохондриальных мембран даёт информацию об общем энергетическом обмене с точки зрения синтеза АТФ, начиная с окислительного фосфорилирования, однако в таких экспериментах невозможно идентифицировать основной субстрат, окисляемый для образования АТФ.

Тем не менее, тот факт, что ингибирование β -окисления в ходе созревания восстанавливает компетенцию к развитию в НЭЖК-обработанных ооцитах, чётко свидетельствует о том, что метаболические пути, характерные для ранних эмбрионов, генерирующих субстраты для окисления, критичны для жизнеспособности эмбрионов, и они могут определяться условиями, в которых ооциты созревают. Если ооциты неспособны окислять ЖК для генерирования АТФ, можно предположить, что

изменяется их метаболизм в отношении окисления альтернативных экзогенных субстратов, таких как пируват, лактат и глюкоза (Sutton-McDowall et al., 2010).

Фолликулярное микроокружение перед оплодотворением критично для созревающих ооцитов. По существу, используя ооциты КРС как модель для получения эмбрионов *in vitro*, мы можем продемонстрировать, что повышенная концентрация НЭЖК в ходе финальной фазы созревания ооцитов ухудшает дальнейшее развитие и может вызывать сдвиги в экспрессии ряда генов в получаемых эмбрионах, что ранее было показано в ряде работ (Leroy et al., 2005, Van Hoesck et al., 2011). Была выдвинута гипотеза о том, что компетенция к развитию ооцитов у высокопродуктивных коров определяется их биохимическим окружением в течение длительного периода (вплоть до 80 дней) фолликулярного роста перед овуляцией (Britt, 1994). Пока, исследования, определяющие эффект длительной выдержки с НЭЖК в ходе фолликулогенеза и оогенеза не проводились, этот фактор может быть критичным в определении конечной судьбы ооцитов, находящихся в НЭЖК-выдержанных фолликулах.

Авторы выдвинули гипотезу, что эти изменения в эмбрионах являются последствием модификаций энергетического метаболизма в ооцитах. Чтобы это исследовать, созревание ОКК проводили с повышенным содержанием НЭЖК и затем оценивали экспрессию генов, связанных с энергетическим обменом – митохондриальную функцию и ультраструктурные изменения. Было обнаружено, что экспрессия генов, связанных с поддержанием REDOX, была изменена в НЭЖК-обработанных ооцитах, кумулюсных клетках и получаемых на выходе бластоцистах. Более того, экспрессия генов, связанных с синтезом ЖК в эмбрионах, которые развивались из НЭЖК-обработанных ооцитов, была повышена. Что касается функциональной перспективы, ингибирование вызванной β -окислением ЖК в созревающих ооцитах, выдержанных с повышенной концентрацией НЭЖК, восстанавливало компетенцию к развитию. Не было чёткой разницы в митохондриальной морфологии или в поглощении кислорода между обработками, хотя наблюдалась тенденция к повышению потенциала мембран в зиготах, полученных из НЭЖК-обработанных ооцитов. Эти данные показывают, что снижение митохондриального β -окисления ЖК имеет решающее влияние на развитие НЭЖК-обработанных ооцитов. Более того, данные по генетической экспрессии свидетельствуют, что полученные эмбрионы адаптируются через изменение путей метаболизма, что может объяснить эффект абберантного энергетического метаболизма, ранее наблюдаемый в эмбрионах, полученных из НЭЖК-обработанных созревающих ооцитов.

Ооциты, выдержанные в среде High Combi, показали значительное повышение экспрессии мРНК генов ЛДГ (лактат дегидрогеназы) и GADPH (глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы) – ключевых генов, включённых в энергетический метаболизм, по сравнению с контрольными ооцитами. Повышение экспрессии GADPH наблюдалось также в High SA ооцитах (Van Hoek et al., 2013).

Показано, что в High SA обработанных кумулюсных клетках, по сравнению с контрольными ОКК, была существенно снижена экспрессия генов, связанных с метаболизмом глюкозы – SLC2A1 (glucose transporter 1), лактатдегидрогеназа и глюкоза-6-фосфатдегидрогеназа. По контрасту, экспрессия мРНК GADPH была значительно выше в High SA кумулюсных клетках. Кумулюсные клетки, собранные от ОКК, созревших в High Combi условиях, показали значительное снижение экспрессии ЛДГ, GADPH, и G6PD. Экспрессия GPX1 и DNMT3A (DNA cytosine-5-methyltransferase 3A) была ниже в кумулюсных клетках из ОКК, созревших в условиях High Combi, по сравнению с контрольными ОКК. Кроме того, экспрессия CPT1A (carnitine palmitoyl transferase) и PLIN₂ (adipophilin 2) была снижена в кумулюсных клетках, собранных из High SA-ОКК.

Экспрессия четырёх генов анализировалась в 7-дневных бластоцистах, полученных из ооцитов, созревших в различных условиях. Во-первых, экспрессия ACSC1 (fatty acid synthetase) была существенно повышена в эмбрионах, полученных из ооцитов, созревших в High Combi условиях, по сравнению с эмбрионами, выросшими из контрольных и High SA ооцитов. Во-вторых, экспрессия ACCA (acetyl CoA carboxylase) была существенно выше в группе, созревшей в High Combi условиях, по сравнению с контрольными эмбрионами. Наконец, экспрессия генов, связанных с митохондриальным биогенезом и окислительным стрессом (TFAM-transcription factor A mitochondria; MNSOD – manganese superoxide dismutase) имела тенденцию к повышению в High Combi эмбрионах.

Обработка ооцитов КРС смесью пальмитиновой/стеариновой/олеиновой кислот в ходе созревания *in vitro* активирует гены, участвующие в энергетическом метаболизме и окислительном стрессе (Van Hoek et al., 2013). Оплодотворение подобных ооцитов приводит к повышению процента бластоцист, у которых существенно ниже количество клеток и выше апоптоз (Van Hoek et al., 2011). Эмбрионы КРС, полученные из ооцитов, которые созревали с высокими концентрациями комбинированных ЖК (пальмитиновой, стеариновой и олеиновой), имели измененную транскрипционную активность некоторых генов – повышенную экспрессию гена “транспортёра глюкозы” SLC2A1 (Van Hoek et al., 2011) и двух генов, включенных в синтез ЖК, ACSL1 и GPR3 (Van Hoek et al., 2013). Они не потребляют больше глюкозы, но проявляют измененный аминокислотный обмен и проблемный окислительный метаболизм, что является индикаторами пониженного качества эмбрионов и жизнеспособности (Van Hoek et al., 2011).

Олеиновая кислота делает обратимыми ухудшающие эффекты пальмитиновой и стеариновой кислот на дробление, развитие до 8-клеточной стадии и стадии бластоцисты (Aardema et al., 2011). Однако, насыщенные ЖК оказывают отрицательный эффект при высоких дозировках, также как линолевая кислота при повышенных концентрациях снижает расширение кумулюса и ухудшает созревание ооцитов КРС (Marei et al., 2009, 2010).

Олеиновая кислота защищает ооциты от индуцированного ЖК липотоксического эффекта (Lolicato et al., 2015). Помимо ветеринарного значения для высокопродуктивных коров и проблем с фертильностью, эти феномены имеют значение и в медицине человека. Недавние исследования показали связь между избыточным весом и ожирением у матерей с изменённым ЖКС липидов фолликулярной жидкости и накоплением липидов, а также с пониженной фертильностью. В исследовании показана роль кумулюсных клеток в инкорпорировании ЖК. Ооциты, культивируемые вместе со своими кумулюсными клетками, показали низкие уровни инкорпорирования ЖК после 4-х часов созревания *in vitro*. Механическое удаление кумулюсных клеток значительно повышало процент включения аналога ЖК. Инкорпорирование ЖК в интактных ОКК было меньше на 25% от того, что ЖК поглощали денудированные ооциты. Сниженное поглощение ЖК ооцитами в присутствии кумулюсных клеток свидетельствует о том, что кумулюсные клетки активно влияют на обеспечение ЖК ооцитов. Существует вероятность того, что экзогенные ЖК абсорбируются кумулюсными клетками и хранятся как триацилглицеролы в липидных гранулах.

Согласно современным представлениям, метаболизм ЖК в ОКК комплексах млекопитающих регулируется материнской физиологией и окружением *in vitro*, и это важно для формирования компетенции ооцитов к развитию. Наше понимание механизмов, которые контролируют отложение липидов в ооцитах, находится ещё на начальном этапе. Таким образом, дальнейшие работы несомненно нужны для понимания того, может ли липидный состав ооцитов (или кумулюсных клеток) являться биомаркером компетенции и, что более важно, как физиологические факторы или изменения *in vitro* в липидном составе ОКК могут влиять на эмбриональное развитие (Dunning et al., 2014).

Стандартной моделью для исследования преимплантационного развития являются мыши, которые издавна используются для изучения механизмов развития. Инбредные линии этих животных обеспечивают получение большого числа высокоомогенных зигот, фактически все из которых в умелых руках доходят до бластоцисты. Являясь адекватной моделью для изучения взаимосвязи процессов метаболизма и развития, мышинные эмбрионы используют для оценки влияния изменений в питании или в окружающей среде на дальнейшее развитие. Однако, помимо этого достоинства, мышинная модель также имеет и недостатки в том отношении, что у мышей процессы метаболизма ооцитов более чувствительны к изменениям в питании, по сравнению с ооцитами и эмбрионами КРС и, вероятно, человека (Leese, 2012). Это иллюстрируется экспериментами, в которых ооциты или эмбрионы лишали питательных веществ и затем оценивали их последующее развитие. Например, показано, что мышинные ооциты блокируются в течение 15 ч культивирования без питательных веществ (Downs, Hudson, 2000), и есть сообщения о том, что мышинные зиготы дегенерируют в течение 10 ч (Manser et al., 2004; цитировано по: Ferguson, Leese., 2006).

По контрасту, кроличьи зиготы могли полностью завершать три деления дробления при полном отсутствии нутриентов (Kane, 1987). Имеются аналогичные данные для зигот КРС (Ferguson, Leese, 2006; Sturney et al., 2009a). Основываясь на ранней работе (Kane, 1979), авторы объясняют этот феномен

за счёт наличия эндогенной энергии, особенно, содержания жира в эмбрионах крупных животных. Например, ооциты свиней содержат 37.3 нг жира/н литр объёма ооцита; овец – 21.2 нг и коров – 15 нг по сравнению с 6.25 нг у мышей. Эти различия являются отражением потребления корма в целом – у мышей он составляет 120 г корма/кг массы тела в сутки по сравнению с 6 г/ кг у человека. Это делает мышей и других грызунов чувствительными к модификациям диеты. Одной из гипотез, объясняющих большее количество липидных гранул в ооцитах КРС и свиней, по сравнению с ооцитами мышей и человека, является наличие более длительного периода между оплодотворением и имплантацией эмбрионов у коров и свиней, т.е. ЖК обеспечивают депонирование энергии для преимплантационного развития (Genicot et al., 2005). Поэтому исследование состава, метаболизма и биологической роли липидов (особенно, ЖК) в процессах эмбрионеза у КРС может способствовать лучшему пониманию сложных биохимических и физиологических процессов, протекающих при созревании яйцеклеток.

Эффекты жирнокислотного состава липидов при криоконсервации эмбрионов

Практическая значимость исследований в этой области, в частности, состоит в том, что резистентность ооцитов при криоконсервации во многом определяется ЖКС липидов (Liebermann et al., 2002; Isachenko et al., 2003; Shehab-El-Deen et al., 2009). В исследованиях (Kim et al., 2001) определяли ЖКС липидов в незрелых и созревших *in vitro* ооцитах КРС, культивированных в среде с сывороткой крови или без неё, а также незрелых ооцитов после замораживания. Все ооциты были разделены на два класса – А и В в зависимости от качества цитоплазмы. Пальмитиновая кислота была наиболее преобладающей ЖК в незрелых ооцитах (А – 35, В – 36%) и в созревших *in vitro* ооцитах (с ПНТ), культивированных в среде, содержащей сыворотку (А – 36, В – 35%) или поливинилалкоголь (А – 33, В – 36%). Олеиновая кислота была второй наиболее преобладающей ЖК во всех ооцитах категории А, в то время как стеариновая кислота была второй наиболее преобладающей ЖК во всех ооцитах категории В. Выявлены существенные различия по линолевой и арахидоновой кислотам между незрелыми ооцитами категории А и В. Созревшие *in vitro* ооциты (с ПНТ) имели более низкое содержание линолевой и арахидоновой кислот, чем незрелые ооциты (что совпадает с нашими результатами) независимо от условий культивирования. Созревшие ооциты, культивированные в среде, содержащей фетальную сыворотку телят или поливинилалкоголь, были схожи по ЖКС липидов. В ЖКС липидов фетальной культуральной сыворотки преобладала линолевая кислота (37.6%), что совпадает с нашими результатами на ооцитах. У криоконсервированных незрелых ооцитов было значительно снижено общее содержание ЖК и доля арахидоновой кислоты по сравнению со свежизвлечёнными незрелыми ооцитами. Результаты свидетельствуют о том, что липиды пригодны для использования в качестве энергетического источника для созревания, и что сывороточные липидные компоненты включаются в цитоплазму ооцитов в ходе созревания *in vitro* (ооциты, созревавшие с сывороткой, содержали существенно больше триацилглицеролов и общего холестерина по сравнению с ооцитами, созревавшими с поливинилалкоголем, однако по фосфолипидам и свободным ЖК существенной разницы не было). Изменения в ЖКС липидов наблюдаются также после криоконсервации незрелых ооцитов. Эти данные свидетельствуют о том, что изменения в ЖКС липидов ооцитов КРС могут быть связаны с процессом созревания (с выделением ПНТ) и криотолерантностью.

Заключение

В исследованиях процессов преимплантационного развития традиционно используются мыши, однако у этого вида процессы метаболизма ооцитов более чувствительны к изменениям в питании, по сравнению с ооцитами и эмбрионами КРС. Известно, что среди эпигенетических событий, происходящих в ходе преимплантационного развития, установление геномного импринтинга является критичным для последующего эмбрионального развития. При использовании ооцитов КРС в качестве модели для получения эмбрионов *in vitro*, было показано, что повышенная концентрация НЭЖК в течение финальной фазы созревания ооцитов изменяет микроокружение в фолликуле и вызывает понижение фертильности, связанной со снижением компетенции ооцитов к развитию и изменением экспрессии ряда генов в получаемых эмбрионах. Незаменимые ЖК входят в состав структурных

липидов клетки, они важны для формирования структуры митохондриальных мембран и в больших количествах обнаружены в органах размножения. Незаменимые ЖК используются в качестве предшественников в биосинтезе простагландинов и выполняют ряд других функций, которые полностью пока не выяснены.

Поэтому исследование жирнокислотного состава, метаболизма и биологической роли липидов в ооцитах КРС может способствовать более глубокому пониманию механизмов оогенеза. Результаты этих исследований могут иметь и практическое значение для определения оптимальных культуральных потребностей ооцитов *in vitro* и разработки эффективных методов их криоконсервации.

References

1. Aardema H., Vos P.L., Lolicato F., Roelen B.A., Knijn H.M., Vaandrager A.B., Helms J.B., Gadella B.M. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocytes developmental competence. *Biol. Reprod.* 2011. 85: 62-69.
2. Aardema H., Lolicato F., van de Lest C.H., Brouwers J.F., Vaandrager A.B., van Tol H.T., Roelen B.A., Vos P.L., Helms J.B., Gadella B.M. Bovine cumulus cells protect maturing oocytes from increased fatty acid levels by massive intracellular lipid storage. *Biol. Reprod.* 2013. 88: 164.
3. Adamiak S.J., Powell K., Rooke J.A., Webb R., Sinclair K.D. Body composition, dietary carbohydrates and fatty acids determine post-fertilisation development of bovine oocytes in vitro. *Reproduction.* 2006. 131: 247-258.
4. Auclair S., Uzbekov R., Elis S., Sanchez L., Kireev I., Lardic L., Dalbies-Tran R., Uzbekova S. Absence of cumulus cells during in vitro maturation affects lipid metabolism in bovine oocytes. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism.* 2013. 304: 599-613.
5. Britt J.H. Follicular development and fertility: potential impacts of negative energy balance. *Proceedings of the National Reproduction Symposium.* 1994. 103-112.
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. 67: 313-322.
7. Downs S.M., Hudson E.D. Energy substrates and the completion of spontaneous meiotic maturation. *Zygote.* 2000. 8: 339-351.
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 Reproduction and Fertility.* 2014. 148: 15-27.
9. Ferguson E.M., Leese H.J. A potential role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. *Mol. Reprod. Devel.* 2006. 73: 1195-1201.
10. 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. 63: 1181-1194.
11. Hawkins D.J., Brash A.R. Lipooxygenase metabolism of polyunsaturated fatty acid in oocytes of the frog *Xenopus laevis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 1989. 268: 447-455.
12. Homa S.T., Racowsky C., McGaughey R.W. Lipid analysis of immature pig oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 1986. 77: 425-434.
13. Homa S.T., Brown C.A. 1992. Changes in linoleic acid during follicular development and inhibition of spontaneous breakdown of germinal vesicles in cumulus-free bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 1992. 94: 153-160.
14. Isachenko V., Isachenko E., Rahimi G., Mallmann P., Krivokharchenko A., Nawroth F. Ultra-structure of intracellular lipid vesicles of porcine GV-oocytes after in vitro fertilization and parthenogenetic activation. *Anat. Hystol. Embryol.* 2003. 32: 126-128.
15. Jorritsma R., Cesar M.L., Hermans J.T., Kruitwagen C.L., Vos P.L., Kruip T.A. Effects of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cells and developmental potential of oocytes in vitro. *Animal Reproduction Science.* 2004. 81: 225-235.
16. Kane M.T. Fatty acids as energy source for culture of one-cell rabbit ova to viable morulae. *Biol. Reprod.* 1979. 20: 323-332.
17. Kane M.T. Minimal nutrient requirements for culture of one-cell rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 1987. 37: 775-778.
18. Kastrop P.M.M., Bevers M.M., Destree O.H.J., Kruip T.A.M. 1990a. Analysis of protein synthesis in morphologically classified bovine follicular oocytes before and after maturation in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 1990a. 26: 222-226.
19. Kastrop P.M.M., Bevers M.M., Destree O.H.J., Kruip T.A.M. Changes in protein synthesis and phosphorylation patterns during bovine oocyte maturation in vitro. *J. Reprod. Fert.* 1990b. 90: 305-310.
20. Kastrop P.M.M., Bevers M.M., Destree O.H.J., Kruip T.A.M. Protein synthesis and phosphorylation patterns of bovine oocytes maturing in vivo. *Mol. Reprod. Dev.* 1991. 29: 271-275.
21. Khandoker M.Y., Tsujii H., Karasawa D. Fatty acid analysis of oocytes, oviductal and uterine fluids of rabbit. *Anim. Sci. Technol (jpn).* 1996. 67: 549-553.

22. 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. 68: 1070-1074.
23. 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. 10: 523-527.
24. 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. 11: 60-64.
25. Khandoker M.Y., Tsujii H. The metabolism of exogenous fatty acids by preimplantation rat embryos. *Asian-Australian J. Anim. Sci.* 1999. 12: 1181-1187.
26. 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. 122: 131-138.
27. Lapa M., Marques C.C., Alves S.P., Vasques M.I., Baptista M.C., Carvalhais I., Silva Pereira M., Horta A.E., Bessa R.J., Pereira R.M. Effect of trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid on bovine oocyte competence and fatty acid composition. *Reproduction in Domestic Animals.* 2011. 46: 904-910.
28. Leese H.J. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. *Reproduction.* 2012. 143: 417-427.
29. Leroy J.L., Vanholder T., Mateusen B., Christophe A., Opsomer G., de Kruif A., Genicot G., Van Soom A. Non-esterified fatty acid in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. *Reproduction.* 2005a. 130: 485-495.
30. Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Tucker MJ. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol. Reprod.* 2002. 67: 1671-1680.
31. Lolicato F., Brouwers J.F., Van de Lest C.H.A., Wubbolts R., Aaderma H., Priore P., Roelen B.A.J., Helms J.B., Gadella B.M. The cumulus cell layer protects the bovine maturing oocyte against fatty acid-induced lipotoxicity. *Biol. Reprod.* 2015. 92: 1-16.
32. Manser R., Leese H., Houghton F. Effect of inhibition of nitric oxide production on mouse preimplantation embryo development and metabolism. *Biol. Reprod.* 2004. 71: 528-533.
33. Marei W.F., Wathes D.C., Fouladi-Nashta A.A. The effect of linolenic acid on bovine oocyte maturation and development. *Biol. Reprod.* 2009. 81: 1064-1072.
34. Marei W.F., Wathes D.C., Fouladi-Nashta A.A. Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. *Reproduction.* 2010. 139: 979-988.
35. Matorras R., Ruiz J.I., Mendoza R., Ruiz N., Sanjurjo P., Rodriguez - Escudero F.J. Fatty acid composition of fertilization-failed human oocytes. *Hum. Reprod.* 1998. 13: 2227-2230.
36. McEvoy T.G., Coull G.D., Broadbent P.J., Hutchinson J.S.M., Speak B.K. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.* 2000. 118: 163-170.
37. McKeegan P.J., Sturney R.G. The role of fatty acids in oocytes and early embryo development. *Reprod. Fert. Develop.* 2012. 24: 59-67.
38. Meijer L., Maclouf J., Bryant R.W. Arachidonic acid metabolism in starfish oocytes. *Dev. Biol.* 1986a. 114: 22-33.
39. Meijer L., Maclouf J., Bryant R.W. Contrasting effects of fatty acids on oocytes maturation in several starfish species. *Prostaglandin Leukotrien and Med.* 1986b. 23: 179-184.
40. Memili E., Peddinti D., Shack L.A., Nanduri B., McCarthy F., Sagirkaya H., Burgess S.C. Bovine germinal vesicle oocyte and cumulus cell proteomics. *Reproduction.* 2007. 33: 1107-1120.
41. Menezes 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. 26: 787-790.
42. Monti M., Zannoni M., Calligaro A., Ko M.S., Mauri P., Redi C.A. Developmental arrest and mouse antral not-surrounded nucleolus oocytes. *Biol. Reprod.* 2013. 88: 2.
43. Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. Harper's biochemistry. Norwalk, Connecticut/San Mateo, California: by Appleton & Lange, a Publishing Division of Prentice Hall. 1988.
44. 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. 5: 1-13.
45. 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. *Mediators of Inflammation.* 2014. 692067-78.
46. Sata R., Tsujii H., Abe H., Yamashita S., Hoshi H. Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serum-free and serum-containing medium during early embryonic development. *J. Reprod. Dev.* 1999. 45: 97-103.
47. Shamsuddin M., Rodriguez-Martinez H. Fine structure of bovine blastocysts developed either in serum-free medium or in conventional co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Vet. Med., Series A.* 1994. 41: 307-316.
48. Shehab-El-Deen M.A., Leroy J.L.M.R., Maes D., Van Soom A. Cryotolerance of bovine blastocyst is affected by oocyte maturation in media containing palmitic or stearic acid. *Reprod. Domest. Anim.* 2009. 44: 140-142.
49. Smetanina J.G., Krivokharchenko A.S., Ivanova L.B., Zhuravleva N.I. In vitro maturation of cattle oocytes taken from ovaries with different morphofunctional state. *Ontogenez.* 2002. 33: 201-205.

50. Smetanina I.G., Krivokharchenko A.S. Study of fatty acid composition of total lipids in maturing *in vitro* cow's oocytes in relation with morpho-functional state of the ovary. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology*. 2020. 2: 5-21. (In Russian)
51. Sturmey R.C., Reiss A., Leese H.J., McEvoy T.G. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. *Reprod. Domest. Anim.* 2009a. 44 (Suppl 3): 50-58.
52. Su Y.Q., Sugiura K., Wigglesworth K., O'Brien M.J., Affourtit J.P. et al. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development*. 2008. 135: 111-121.
53. Thompson J.G., Gardner D.K., Pugh P.A., McMillan W.H., Tervit H.R. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during *in vitro* preelongation development of ovine embryos. *Biol. Reprod.* 1995. 53: 1385-1391.
54. Turathum B., Sroyraya M. Protein profile involved in mammalian oocytes maturation, fertilization and early embryogenesis (pre-implantation). *Cell. Dev. Biol.* 2017. 6: 1-9.
55. Van Hoeck V., Sturmey R.G., Bermejo-Alvarez P., Rizos D., Gutierrez-Adan A., Leese H.J., Bols P.E., Leroy J.L. Elevated non-esterified fatty acid concentrations during bovine oocyte maturation compromise early embryo physiology. *Plos One*. 2011. 6 e23183.
56. Van Hoeck V., Leroy J.L., Arias Alvarez M., Rizos D., Gutierrez-Adan A., Schnorbusch K., Bols P.E., Leese H.J., Sturmey R.G. Oocyte developmental failure in response to elevated nonesterified fatty acid concentrations: mechanistic insights. *Reproduction*. 2013. 145: 33-44.
57. Wang G., Tsujii H., Khandoker M.Y. Fatty acid compositions of mouse embryo, oviduct and uterine fluid. *Anim. Sci. Technol.* 1998. 69: 923-928.
58. Wonnacott K.E., Kwong W.Y., Hughes J., Salter A.M., Lea R.G., Garnsworthy P.C., Sinclair K.D. Dietary omega-3 and -6 polyunsaturated fatty acids affect the composition and development of sheep granulosa cells, oocytes and embryos. *Reproduction*. 2010. 139: 57-69.
59. Yang Z., Miron P., Gu Z., Cortvrindt R., Smith J., Van Steirteghem A., Goff A. Changes in protein synthesis during *in vitro* maturation of human and bovine oocytes. (Abstract). *Hum. Reprod.* 1997. 12: 15.
60. Zachut M., Dekel J., Lehrer H., Arieli A., Arav A., Livshitz L., Yakoby S., Moallem U. Effects of dietary fats differing in n-6 : n-3 ratio fed to high-yielding dairy cows on fatty acid composition of ovarian compartments, follicular status, and oocyte quality. *J. Dairy Sci.* 2010. 93: 529-545.
61. Zeron Y., Ocheretny A., Kedar O., Borochoy A., Sklan D., Arav A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction*. 2001. 121: 447- 454.
62. Zeron Y., Sklan D., Arav A. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 2002. 61: 271-278.
63. Zhang W., Yi K., Yan H., Zhou X. Advances on *in vitro* production and cryopreservation of porcine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* . 2012. 132: 115-122.

DOI: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2021.2.5-21

Role of fatty acids in oocyte maturing in mammals: a review

Smetanina I.G.

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

ABSTRACT. It is known that the cultivation of oocytes in a medium with an increased content of non-esterified fatty acids during maturation affects the genetic expression and phenotype of embryos that are obtained from these oocytes. It has been shown that the fatty acid composition (FAC) of total lipids in oocytes and embryos is very labile and depends on the physiological environment *in vivo* and on cultural conditions *in vitro*. The aim of the review was to systematize the literature data and the results of author's studies concerning FAC of total lipids in oocyte and the effect of individual fatty acids (FA) on oocyte maturation. The main sections are the fatty acid composition of total lipids in mammalian oocytes, changes in the FAC of lipids in oocytes and embryos, depending on the stage of development; the role of FA in the maturation and development of mammalian embryos *in vitro*, the effect of FA on embryonic metabolism and gene expression; effects of FAC of lipids during cryopreservation of embryos. In the author's studies, it was shown that the FA content in oocytes did not depend on the morphofunctional status (MFS) of the ovaries. Linoleic, linolenic, and palmitic acids prevailed in oocytes that secreted the first targeting body (FTB) during maturation, while oocytes with FTB contained more palmitic, stearic, and oleic acids and less linoleic, linolenic, and arachidonic acids than oocytes without FTB. A decrease in the content of linoleic, linolenic and arachidonic acids may indicate an increase in the synthesis of prostaglandins. The practical significance of research in this area is due, in particular, to the fact that lipids largely determine the resistance of oocytes during cryopreservation.

Keywords: mammals, oocytes, in vitro maturation, fatty acids, first targeting body, ovary status

Problemy biologii productivnykh zivotnykh - Problems of Productive Animal Biology, 2021, 2: 5-21

Поступило в редакцию: 03.06.2021

Получено после доработки: 11.06.2021

Сметанина Ирина Геннадьевна: к.б.н., снс, 8(961)006-90-49, sme.irina2011@yandex.ru