

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Роль наночастиц высокодисперсного кремнезема в реализации эффектов гранулы на компетентность к созреванию и оплодотворению ооцитов *Sus scrofa domestica*

Т.И. Кузьмина¹✉, И.В. Чистякова¹, А.О. Притужалова¹✉, Д.Н. Татарская²

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального научного центра животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

² Ленинградский государственный университет им. А.С. Пушкина, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

✉ prof.kouzmina@mail.ru; aklevakina14@mail.ru

Аннотация. Репродуктивные технологии являются одним из ключевых направлений в условиях необходимости сохранения и отбора выдающихся по хозяйственно полезным признакам особей сельскохозяйственных животных. Совершенствование имеющихся моделей созревания ооцитов *in vitro* в различных вариациях способствует решению проблемы низкого выхода эмбрионов свиней на завершающих стадиях доимплантационного развития. В настоящем исследовании с использованием технологии созревания и оплодотворения донорских ооцитов свиней *in vitro* предложена модель среды для культивирования гамет (NCSU-23 с 10% гомологичной фолликулярной жидкостью, 10 МЕ ХГЧ и 10 МЕ ХГ лошади), модернизированная введением 1 · 10⁶ клеток гранулы (КГ) на 1 мл среды и 0.001% наночастиц высокодисперсного кремнезема (нВДК). Анализ статуса хроматина ооцитов по методу Тарковского и оценка уровня деструктивных изменений хроматина соматических клеток овариальных фолликулов (апоптоз, пикноз) выявили значительное повышение показателей ядерного созревания гамет и снижение доли клеток гранулы с дегенерированным хроматином при применении разработанной системы культивирования. Обнаружено позитивное влияние совместного введения КГ и нВДК в систему дозревания, позволившего увеличить показатели мейотического созревания и оплодотворяемости ооцитов. Оптимальные показатели фертильности ооцитов достигнуты при сочетанном использовании в системе дозревания КГ и нВДК (доля созревших клеток достигла 89%, уровень ооцитов с дегенерацией хромосом составил 12%, 39% эмбрионов достигли завершающей стадии доимплантационного развития). Положительный эффект нВДК на показатели оплодотворяемости ооцитов сопровождался резким снижением деструктивных процессов в КГ при их культивировании в присутствии нВДК. Уровень пикнозов составил 32%, а уровень апоптозов (TUNEL-test) – 21% по сравнению с контролем (43 и 31% соответственно, $p < 0.01$). Таким образом, выявлена высокая эффективность системы созревания ооцитов свиней в условиях совместного кокультивирования гамет с КГ и нВДК, что позволяет рекомендовать модель разработанной среды в технологии экстракорпорального созревания женских гамет *Sus scrofa domestica* для повышения качества донорских яйцеклеток, используемых в клеточной и генетической инженерии.

Ключевые слова: ооциты свиней; созревание *in vitro*; наночастицы высокодисперсного кремнезема; апоптоз; гранула.

Для цитирования: Кузьмина Т.И., Чистякова И.В., Притужалова А.О., Татарская Д.Н. Роль наночастиц высокодисперсного кремнезема в реализации эффектов гранулы на компетентность к созреванию и оплодотворению ооцитов *Sus scrofa domestica*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2022;26(3):234-239. DOI 10.18699/VJGB-22-30

The role of highly dispersed silica nanoparticles in the realization of the effects of granulosa on the maturation and fertilization competence of *Sus scrofa domestica* oocytes

T.I. Kuzmina¹✉, I.V. Chistyakova¹, A.O. Prituzhalova¹✉, D.N. Tatarskaya²

¹ Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding – Branch of the L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Pushkin, St. Petersburg, Russia

² Pushkin Leningrad State University, Pushkin, St. Petersburg, Russia

✉ prof.kouzmina@mail.ru; aklevakina14@mail.ru

Abstract. Reproductive technologies are some of the key directions in the context of the need to preserve and select highly productive farmed animals in terms of economically useful traits. Improvements of the existing models of the *in vitro* oocyte maturation system help to solve the problem of low yield of porcine embryos at the final stages of preimplantation development. In the present study, a model of culture medium for gametes (NCSU-23 with 10%

homologous follicular fluid, 10 IU hCG and 10 IU eCG) modernized by the addition of $1 \cdot 10^6$ granulosa cells (GCs) per ml and 0.001 % of highly dispersed silica nanoparticles (HDSn) is proposed for use in the IVM and IVF technology of donor porcine oocytes. Analysis of the oocyte chromatin status by the Tarkowsky method and assessment of the level of destructive changes in chromatin (apoptosis, pyknosis) revealed a significant percentage increase in matured oocytes and a decrease in the proportion of granulosa cells with degenerated chromatin when using the original culture system. The positive effects of a joint addition of GCs and HDSn to the maturation system have made it possible to increase the indicators of the meiotic maturation and fertilization of oocytes. Optimal results of developmental competence of oocytes were achieved with the joint use of GCs and HDSn in the maturation system (the proportion of matured cells reached 89 %, the level of oocytes with chromosome degeneration was 12 %, 39 % of embryos reached the final stage of preimplantation development). The positive effect of HDSn on oocyte fertilization was accompanied by an abrupt decrease in destructive processes in GCs during culture in the presence of HDSn. The level of somatic cells with pyknotic nuclei was 32 % and the level of apoptosis (TUNEL-test), 21 %, compared with the control (43 and 31 %, $p < 0.01$, respectively). Thus, a high efficiency of the porcine oocyte maturation system in the joint culture of gametes with GCs and HDSn was revealed. It makes it possible to recommend a model of this culture medium at the IVM of female gametes of *Sus scrofa domestica* for improving the quality of donor oocytes used in cell and genetic engineering.

Key words: porcine oocytes; maturation *in vitro*; highly dispersed silica nanoparticles; apoptosis; granulosa.

For citation: Kuzmina T.I., Chistyakova I.V., Prituzhalova A.O., Tatarskaya D.N. The role of highly dispersed silica nanoparticles in the realization of the effects of granulosa on the maturation and fertilization competence of *Sus scrofa domestica* oocytes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(3):234-239. DOI 10.18699/VJGB-22-30

Введение

Клеточные репродуктивные и ДНК-биотехнологии играют важную роль в интенсификации селекционного процесса в животноводстве, поскольку они являются инструментом для увеличения числа выдающихся по хозяйственно полезным признакам особей (Romar et al., 2019). Биотехнологический интерес к виду *Sus scrofa domestica* возрос из-за возможности его использования в биомедицине, в силу особенностей физиологии (близость к виду *Homo sapiens*), для ксенотрансплантации органов. Производство *in vitro* жизнеспособных нативных и реконструированных (клонированных, трансгенных) эмбрионов свиньи в массовых масштабах возможно, однако в настоящее время отдельные этапы технологии экстракорпорального созревания яйцеклеток *S. scrofa domestica* и их оплодотворения требуют совершенствования (Fowler et al., 2018). Разработка стандартизированных протоколов методологии получения эмбрионов свиней *in vitro* необходима, чтобы в полной мере использовать возможности инновационных клеточных репродуктивных технологий в свиноводстве и биомедицине, в том числе для создания генетически модифицированных свиней.

Эффективность различных этапов экстракорпорального получения эмбрионов свиней неоднозначна. Решения проблем требуют разработка систем дозревания ооцитов, низкое процентное содержание моноспермных зигот и зигот, которые развиваются до завершающей стадии доимплантационного развития – бластоцисты (Martinez et al., 2019). На данный момент существует множество исследований по разработке унифицированной системы созревания донорских ооцитов свиней *in vitro*, но выход эмбрионов на завершающих стадиях доимплантационного развития до сих пор не превышает 45–50 % (Soriano-Úbeda et al., 2017).

Вышеизложенное позволяет определить задачу моделирования состава культуральных сред для завершения мейотического созревания свиных ооцитов вне организ-

ма как высокоактуальную. В организме формирование яйцеклетки проходит в тесной взаимосвязи с соматическими клетками овариального фолликула (кумулюс, гранулеза), которые продуцируют ряд биоактивных молекул, вовлеченных в процессы роста и созревания ооцитов. Пионерные работы L.R. Abeydeera показали эффективность использования стенок фолликула и фолликулярной жидкости в составе систем дозревания ооцитов (Abeydeera et al., 1998). Однако процедуры по препарированию фолликула, объективность оценки его качества эмбриотехнологом пролонгируют длительность первого этапа технологии получения эмбрионов. Использование в системе дозревания гамет животных *in vitro* инновационных материалов, в том числе их наноразмерных частиц, – стремительно развивающаяся отрасль бионанотехнологий (Remião et al., 2018). Рядом исследователей проведены оценки цито- и генотоксичности наночастиц различного происхождения на половых клетках млекопитающих (Roy et al., 2020).

В наших работах ранее выявлены положительные эффекты наночастиц высокодисперсного кремнезема (нВДК) на функционирование клеточных компартов нативных и девитрифицированных женских гамет сельскохозяйственных животных, деструктивные процессы хроматина в ядрах половых и соматических клеток овариальных фолликулов (Кузьмина и др., 2017, 2020). Следуя вышесказанному, логичным представляется введение в состав базовых культуральных сред клеток гранулезы как потенциального поставщика биологически активных веществ природного происхождения, в первую очередь стероидов, и наночастиц различного происхождения.

Цель настоящего исследования – оценить роль наночастиц высокодисперсного кремнезема в реализации эффектов введения клеток гранулезы в систему экстракорпорального дозревания ооцитов свиней на показатели фертильности гамет.

Материалы и методы

Все реагенты, использованные при выполнении экспериментов, за исключением обозначенных в тексте, производства компании Sigma-Aldrich (США). Пластиковая лабораторная посуда фирмы BD Falcon™ (США).

Ооцит-кумулясные комплексы (ОКК) были выделены из антральных фолликулов яичников *S. scrofa domestica* породы ландрас *post mortem* в возрасте 6–8 месяцев. Животных овариоэктомировали на мяскокомбинате, яичники доставляли в лабораторию в растворе 0.9 % NaCl при температуре 30–35 °С, содержащем 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0.25 нг/мл амфотерицина. ОКК аспирировали из антральных фолликулов (с высоким тургором, диаметром от 3 до 6 мм, высокой степенью васкуляризации). В экспериментах использовали ооциты с гомогенной ооплазмой, равномерной по ширине зоной пеллюцида, окруженные компактным слоем кумулюсных клеток (не менее 5–6 слоев).

После морфологической оценки ОКК в количестве 40–50 шт. помещали в капли (объем 500 мкл) сред для культивирования следующего состава: группа I – синтетическая питательная среда North Carolina State University-23 (NCSU-23) + 10 МЕ хорионического гонадотропина человека + 10 МЕ хорионического гонадотропина лошади + 10 % фолликулярной жидкости (диаметр фолликулов 3–6 мм); группа II – синтетическая питательная среда NCSU-23 + 10 МЕ хорионического гонадотропина человека + 10 МЕ хорионического гонадотропина лошади + 10 % фолликулярной жидкости (диаметр фолликулов 3–6 мм) + 0.001 % нВДК; группа III – синтетическая питательная среда NCSU-23 + 10 МЕ хорионического гонадотропина человека + 10 МЕ хорионического гонадотропина лошади + 10 % фолликулярной жидкости (диаметр фолликулов 3–6 мм) + $1 \cdot 10^6$ клеток гранулезы (КГ) на 1 мл среды; группа IV – синтетическая питательная среда NCSU-23 + 10 МЕ хорионического гонадотропина человека + 10 МЕ хорионического гонадотропина лошади + 10 % фолликулярной жидкости (диаметр фолликулов 3–6 мм) + $1 \cdot 10^6$ КГ на 1 мл среды + 0.001 % нВДК. нВДК синтезированы в Институте прикладной химии им. А.А. Чуйко НАН Украины. При выборе концентрации руководствовались рекомендациями разработчиков (Зюсюн и др., 2015). ОКК комплексы культивировали 22 ч при температуре 38.5 °С, в атмосфере 5 % CO₂ в вышеобозначенных средах, затем проводили смену сред с исключением во всех исследуемых группах гормональных добавок и последующим культивированием еще в течение 22 ч.

Для оценки статуса хроматина при мейотическом созревании ооцитов и уровня пикноза в клетках гранулезы использовали цитологический метод (Кузьмина и др., 2008). ОКК помещали на 5–10 мин в теплый (37 °С) 0.9 % гипотонический раствор 3-замещенного цитрата натрия и очищали от кумулюса, затем клетки переносили на сухое обезжиренное стекло и фиксировали смесью метанола и уксусной кислоты (3:1). Высохшие образцы ооцитов и суховоздушные препараты клеток гранулезы окрашивали 4 % раствором Романовского–Гимза (азур-эозином) в течение 3–4 мин.

Уровень апоптоза в КГ после их культивирования на протяжении 22 ч в среде NCSU-23 с 10 МЕ хориониче-

ского гонадотропина человека, 10 МЕ хорионического гонадотропина лошади, 10 % фолликулярной жидкости (диаметр фолликулов 3–6 мм) и через 22 ч (общее время культивирования 44 ч) после смены состава среды (исключение гормональных добавок) оценивали методом TUNEL (Janowski et al., 2012). Опытная группа дополнялась введением в состав контрольной 0.001 % нВДК на всех этапах культивирования.

Для экстракорпорального оплодотворения использовали модифицированную среду mTBM, содержащую 113.1 mM NaCl, 3.0 mM KCl, 7.5 mM CaCl₂ · 2H₂O, 20.0 mM Трис, 11.0 mM глюкозы, 5.0 mM натрия пирувата, 1 mM кофеина и 0.1 % BSA. Через 44 ч культивирования ооциты механически (пипетированием) освобождали от клеток кумулюса. Затем в количестве 10 шт. помещали в капли среды mTBM (объемом 90 мкл под парафиновым маслом) в 35 мм чашки для культивирования на 30 мин в CO₂-инкубатор для эквипирации. Оплодотворяли ооциты нативной спермой (исходная концентрация в разбавителе $3 \cdot 10^9$ сперматозоидов на 1 мл). После трехкратного центрифугирования 10 мл суспензии сперматозоидов (80 г в течение 3 мин при комнатной температуре) осадок ресуспендировали в 10 мл DPBS с 0.1 % BSA и доводили концентрацию сперматозоидов до $2 \cdot 10^6$ кл./мл. 16 мкл суспензии сперматозоидов добавляли в капли с ооцитами объемом 90 мкл и культивировали в CO₂-инкубаторе при 38.5 °С в атмосфере 5 % CO₂ и 90 % влажности. Через 6 ч после инкубирования со сперматозоидами ооциты были перенесены в 500 мкл среды NCSU-23 с 0.4 % BSA для культивирования в CO₂-инкубаторе в течение 7 дней при температуре 38.5 °С в атмосфере 5 % O₂, 5 % CO₂ и 90 % N₂ со сменой среды через каждые 48 ч культивирования (Egerszegi et al., 2010).

Чтобы определить уровень апоптозов в КГ, их суспензию помещали на покрытые poly-L-lysine предметные стекла и подсушивали на воздухе. Далее тестирование уровня апоптозов проводили в соответствии с инструкцией фирмы-производителя и методом, адаптированным к клеткам гранулезы, представленным в (Janowski et al., 2012). Для этого КГ фиксировали в 4 % (v/v) растворе параформальдегида в течение 30 мин, выдерживали 2 мин в 10 % растворе Тритона X-100 на 0.1 % цитрате натрия. Затем КГ инкубировали с реагентом TUNEL (Roche Diagnostics, GmbH, Германия) 60 мин при 37 °С, в темноте. После инкубации клетки промывали в растворе DPBS, окрашивали в растворе 0.1 % (w/v) пропидиум йодида (экспозиция 20 мин), вновь промывали в DPBS и экспонировали 1 ч в темноте при комнатной температуре. Хранили образцы в холодильнике при температуре от +3 до +5 °С. Образцы анализировали при помощи флуоресцентного микроскопа ZEISS AxioLab. A1 (Carl Zeiss, Германия).

Результаты обрабатывали в пакете статистической программы SigmaStat (Jandel Scientific Software, США). Для оценки достоверности переменных частотных значений использовали критерий χ^2 Пирсона. Значимость различий сравниваемых значений оценивали при следующих уровнях: $p < 0.05$, $p < 0.01$ и $p < 0.001$ для трех-пяти независимых экспериментов.

Результаты и обсуждение

Клетки гранулезы и кумулюса секретируют огромное количество ростовых и иных факторов, детерминирующих формирование яйцеклетки и последующее развитие эмбрионов (Sapiragi, 2000). Наночастицы различных химических соединений, в том числе ВДК, способны синхронизировать ядерно-цитоплазматическое созревание ооцитов животных и защищать внутриклеточные компоненты от губительных для их функционирования факторов, включая активные формы кислорода (АФК) (Кузьмина и др., 2017, 2020). На рис. 1 представлены данные анализа статуса хроматина ооцитов свиней при культивировании с клетками гранулезы и нВДК.

Введение нВДК в среду для дозревания способствовало реинициации и завершению мейоза (рис. 2) в ооцитах, прокультивированных без КГ, по сравнению с клетками контрольной группы (79 и 75 % против 89 и 84 %, $p < 0.05$). Более того, стимулирующий эффект нВДК на созревание ооцитов наблюдали и при кокультивировании гамет с КГ (85 и 79 % против 93 и 89 %, $p < 0.05$). Важно отметить, что добавление нВДК обеспечило снижение доли дегенерированных ооцитов в опытных группах в сравнении с контрольными, прокультивированными с или без соматических клеток (15 и 12 % против 25 и 18 %, $p < 0.01$).

Во второй серии экспериментов мы оценили влияние нВДК на деструктивные процессы в КГ при культивировании *in vitro* (рис. 3). Показан ингибирующий эффект

наночастиц ВДК на деструктивные процессы хроматина (апоптоз, пикноз) в клетках гранулезы при пролонгированном культивировании. Так, через 22 ч культивирования доля клеток с пикнотическими ядрами была ниже на 7 % в группе, прокультивированной с нВДК, по сравнению с контролем (21 и 28 %, $p < 0.01$), а доля апоптотических клеток – ниже на 6 % (13 и 19 %, $p < 0.05$). После 44 ч культивирования доля клеток в состоянии пикноза в контрольной группе достигла 43 % ($p < 0.01$), в состоянии апоптоза – 31 % ($p < 0.01$). В опытной группе эти показатели оказались значительно ниже: 32 и 21 % ($p < 0.01$).

Результаты анализа показателей фертильности ооцитов, созревших в различных системах, представлены на рис. 4. При обогащении среды для дозревания нВДК выявлено повышение компетентности ооцитов к оплодотворению, выразившееся в увеличении доли раздробившихся клеток на 12 % (51 %, $p < 0.05$) и выхода доимплантационных эмбрионов на стадии бластоцисты на 11 % (23 %, $p < 0.01$) в сравнении с контрольной группой (39 и 12 % соответственно). При этом максимальные показатели оплодотворяемости отмечены среди ооцитов, прокультивированных совместно с клетками гранулезы и нВДК (61 и 39 % соответственно, $p < 0.01$ относительно контрольных групп).

Оксидативный стресс является одним из основных факторов, снижающих компетентность к развитию ооцитов при культивировании (Wei et al., 2016). Положительное влияние наночастиц на созревание ооцитов, возможно,

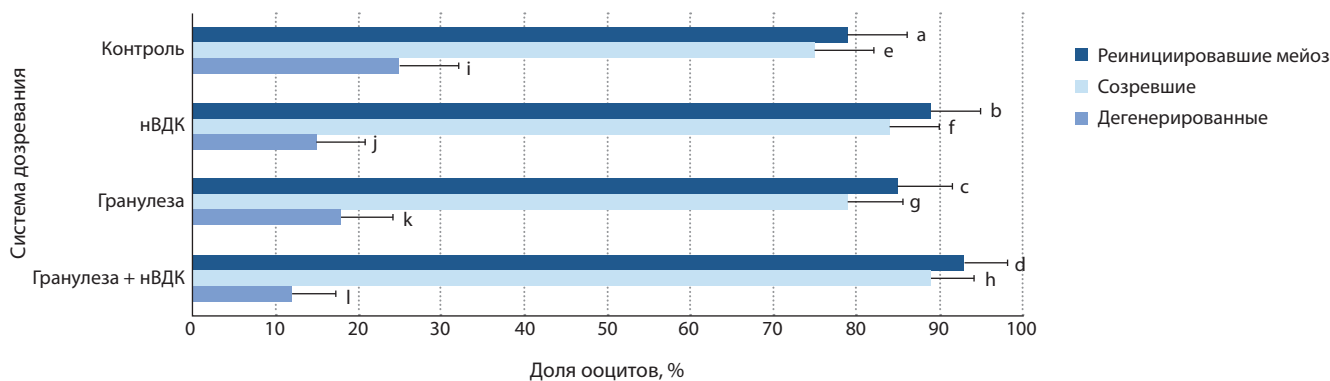


Рис. 1. Показатели статуса хроматина ооцитов свиней после культивирования с клетками гранулезы и нВДК (время культивирования 44 ч, число ооцитов – 600).

Статистическая значимость различий (критерий χ^2 Пирсона): a:b; c:d; e:f; g:h; i:j – $p < 0.05$; a:d; e:h; i:l – $p < 0.1$.

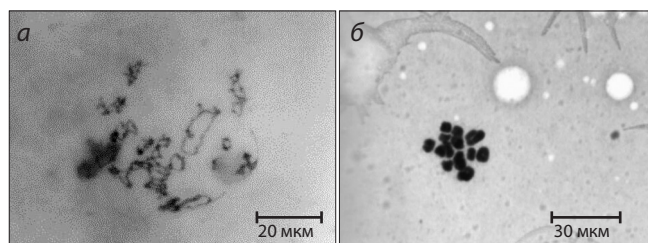


Рис. 2. Репрезентативное изображение хроматина ооцитов *S. scrofa domestica* на стадиях диплотены (а) и метафазы II (б).

Цитологический препарат, окрашивание азур-эозином по Романовскому-Гимзе; микроскоп ZEISS Axio Lab. A1 (Carl Zeiss).

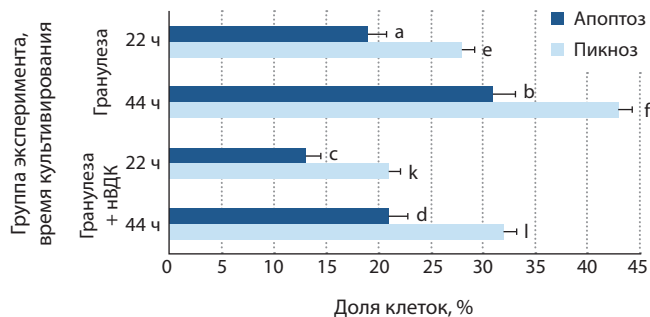


Рис. 3. Деструктивные процессы хроматина в клетках гранулезы овариальных фолликулов свиней (число клеток – 7539).

Статистическая значимость различий (критерий χ^2 Пирсона): a:c; a:d; e:l – $p < 0.05$; a:b; b:c; b:d; c:d; e:f; e:k; f:l; k:l – $p < 0.01$.

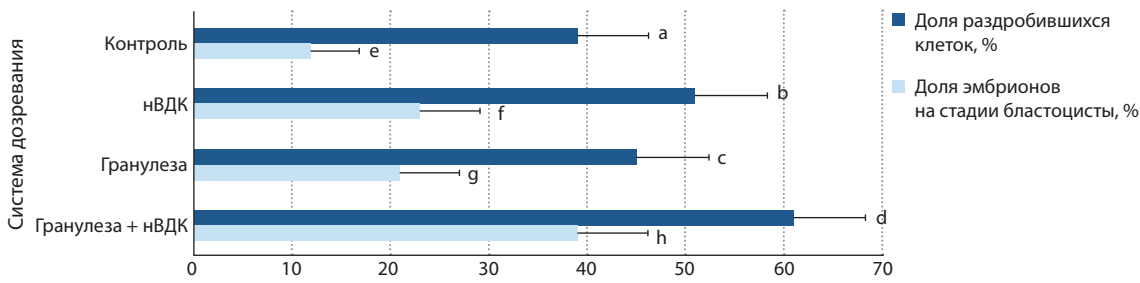


Рис. 4. Анализ показателей оплодотворяемости ооцитов *S. scrofa domesticus*, созревших в различных системах культивирования (число ооцитов – 736).

Статистическая значимость различий (критерий χ^2 Пирсона): a : b, e : g – $p < 0.05$; a : d, c : d, e : f, e : h, f : h, g : h – $p < 0.01$.

объясняется способностью нВДК нивелировать разрушающее действие свободно-радикальных процессов в процессе культивирования клеток путем снижения образования продуктов окислительной модификации белков (Савченко, 2013). Кроме того, в результате влияния окислительного стресса на клетки в эндоплазматическом ретикулуме происходит синтез и сборка липидных капель, детерминирующих цитопротекторный эффект при действии реактивных форм кислорода на мембранные структуры органелл, а также снабжающих митохондрии жирными кислотами для производства АТФ (Lee et al., 2012; Zhang X., Zhang K., 2012). Известно, что внутриклеточная форма липидных капель в виде «гранул» и их диффузное расположение обеспечивают мобилизацию жирных кислот, способствуя нормальному созреванию ооцит-кумулясных комплексов (Bradley et al., 2019). В наших ранних исследованиях было показано, что нВДК способствуют накоплению и формированию в ооцитах свиней в процессе созревания *in vitro* липидных капель с диффузной локализацией, что обеспечивает нормальное развитие гамет (Новичкова, Кузьмина, 2019).

Известно, что коммуникация КГ, как и клеток кумулюса с ооцитом, детерминирует рост и формирование женской гаметы. Успешное созревание ооцитов и дальнейшее эмбриональное развитие зависят от действия определенных гормонов, в частности прогестерона и эстрадиола, секретируемых гранулезными клетками. В свою очередь, влияние указанных гормонов на ооциты опосредуется клетками лучистого венца, экспрессирующими FSHR (рецептор фолликулостимулирующего гормона), контролирующего процессы пролиферации кумулюсных клеток и развития гаметы (Okazaki et al., 2003). Было показано, что введение в культуральную среду прогестерона и β -эстрадиола способствует увеличению уровня экспрессии FSHR, выживаемости кумулюсных клеток и снижению уровня апоптоза (Okamoto et al., 2016). нВДК предотвращают апоптоз в соматических клетках и мужских гаметах животных путем стимуляции работы антиоксидантной системы, взаимодействуя с рецепторами на поверхности клетки (Бойцева и др., 2017; Кузьмина и др., 2017).

Заключение

Разработка эффективных протоколов получения нативных и реконструированных эмбрионов *S. scrofa domesticus in vitro* позволит значительно интенсифицировать этапы инновационных клеточных репродуктивных технологий,

используемых в животноводстве, ветеринарии, биомедицине. Настоящее исследование направлено на совершенствование систем экстракорпорального дозревания донорских ооцитов свиней для получения яйцеклеток, компетентных к оплодотворению и развитию эмбрионов. С учетом значимости соматических клеток овариальных фолликулов в формировании зрелого ооцита в экспериментах использовали кокультивирование ооцит-кумулясных комплексов с клетками гранулезы. Систему дозревания модернизировали путем введения в среду нВДК.

При проведении экспериментов обнаружено положительное влияние разработанной системы на показатели фертильности ооцитов (выход созревших ооцитов, уровень дробления и достижение эмбрионами завершающей стадии доимплантационного развития). Позитивный эффект максимально выражался при совместном использовании в системе культивирования нВДК и клеток гранулезы. Высокие показатели фертильности ооцитов, созревших в среде с нВДК, вероятно, обусловлены снижением уровня деструктивных изменений в окружающих их клетках кумулюса (субпопуляция клеток гранулезы).

В исследовании обнаружено, что введение нВДК в среду культивирования вызывает снижение уровня апоптозов и пикнозов в клетках гранулезы, что априори свидетельствует об увеличении количества жизнеспособных клеток, их гормонсинтезирующей активности и обеспечивает физиологичность процессов, вовлеченных в формирование яйцеклеток с высокой фертильностью. Наиболее значимым показателем при оценке эффективности любой разработанной системы дозревания является выход эмбрионов. В наших исследованиях выход эмбрионов на завершающей стадии доимплантационного развития при совместном использовании в системе дозревания нВДК и клеток гранулезы был максимальным (39 %), что позволяет рекомендовать предложенную систему культивирования для экстракорпорального созревания донорских ооцитов *S. scrofa domesticus*.

Список литературы / References

- Бойцева Е.Н., Бычкова Н.В., Кузьмина Т.И. Влияние наночастиц высокодисперсного кремнезема на апоптоз сперматозоидов *Bos taurus*. *Цитология*. 2017;5(59):375-380.
[Boyitseva E.N., Bychkova N.V., Kuzmina T.I. Effects of highly dispersed silica nanoparticles on the apoptosis of *Bos taurus* spermatozoa. *Tsitologiya = Cytology*. 2017;5(59):375-380. (in Russian)]
Зюсюн А.Б., Щербак О.В., Осипчук О.С., Ковтун С.И., Дзіцюк В.В. Застосування наноматеріалу в ембріогенетичній системі *in vitro*

- отримання ембріонів свиней. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2015;17:164-168.
- [Zyuzyn A.B., Shcherbak O.V., Osypchuk O.S., Kovtun S.I., Dzit-syuk V.V. Using of nanomaterials in embryogenetic system for receiving pig's embryos *in vitro*. *Faktyory Eksperimentalnoi Evolutsii Organizmov = Factors in Experimental Evolution of Organisms*. 2015;17:164-168. (in Ukrainian)]
- Кузьмина Т.И., Альм Х., Торнер Х. Методы получения эмбрионов свиней *in vitro*: методические рекомендации. СПб.; Пушкин, 2008. [Kuzmina T.I., Alm H., Torner H. Methods of Porcine Embryos Production *in vitro*. St. Petersburg; Puskin, 2008. (in Russian)]
- Кузьмина Т.И., Новичкова Д.А., Чистякова И.В., Епишко О.А. Воздействие наночастиц высокодисперсного кремнезема на хроматин соматических клеток фолликулов свиньи. *Ветеринария*. 2017;2:43-45.
- [Kuzmina T.I., Novichkova D.A., Chistyakova I.V., Epishko O.A. Effects of highly dispersed silica nanoparticles on the chromatin in somatic cells of porcine follicles. *Veterinariya = Veterinary Medicine Journal*. 2017;2:43-45. (in Russian)]
- Кузьмина Т.И., Чистякова И.В., Татарская Д.Н. Функциональная активность митохондрий и статус хроматина нативных и девитрифицированных ооцитов *Bos taurus* под воздействием наночастиц высокодисперсного кремнезема. *С.-х. биология*. 2020;55(4):784-793. DOI 10.15389/agrobiology.2020.4.784rus.
- [Kuzmina T.I., Chistyakova I.V., Tatarskaya D.N. The influence of highly dispersed silica nanoparticles on the functional activity of mitochondria and chromatin state in native and devitrified *Bos taurus* oocytes. *Sel'skokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2020;55(4):784-793. DOI 10.15389/agrobiology.2020.4.784eng.]
- Новичкова Д.А., Кузьмина Т.И. Влияние наночастиц высокодисперсного кремнезема на функционирование липидома в ооцитах *Sus scrofa domesticus*. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2019;S1:30-34.
- [Novichkova D.A., Kuzmina T.I. Effect of highly dispersed silica nanoparticles on the functioning of lipidome in *Sus scrofa domesticus* oocytes. *Meditsina Ekstremal'nykh Situatsiy = Medicine of Extreme Situations*. 2019;S1:30-34. (in Russian)]
- Савченко Д.С. Изучение антиоксидантных свойств наноконструкта высокодисперсного кремнезема с наночастицами серебра. *Медицина и образование в Сибири*. 2013;6:23-30.
- [Savchenko D.S. Studyng of antioxidatic properties of nanocomposite of highly dispersive silicon dioxide with silver nanoparticles. *Meditsina i Obrazovanie v Sibiri = Medicine and Education in Siberia*. 2013;6:23-30. (in Russian)]
- Abeydeera L.R., Wang W.H., Cantley T.C., Rieke A., Day B.N. Coculture with follicular shell pieces can enhance the developmental competence of pig oocytes after *in vitro* fertilization: relevance to intracellular glutathione. *Biol. Reprod.* 1998;58(1):213-218. DOI 10.1095/biolreprod58.1.213.
- Bradley J., Pope I., Wang Y., Langbein W., Borri P., Swann K. Dynamic label-free imaging of lipid droplets and their link to fatty acid and pyruvate oxidation in mouse eggs. *J. Cell Sci.* 2019;132(13):jcs228999. DOI 10.1242/jcs.228999.
- Canipari R. Oocyte-granulosa cell interactions. *Hum. Reprod. Update*. 2000;6(3):279-289. DOI 10.1093/humupd/6.3.279.
- Egerszegi I., Alm H., Rátky J., Heleil B., Brüssow K.P., Torner H. Meiotic progression, mitochondrial features and fertilisation characteristics of porcine oocytes with different G6PDH activities. *Reprod. Fertil. Dev.* 2010;22(5):830-838. DOI 10.1071/RD09140.
- Fowler K.E., Mandawala A.A., Griffin D.K., Walling G.E., Harvey S.C. The production of pig preimplantation embryos *in vitro*: current progress and future prospects. *Reprod. Biol.* 2018;18(3):203-211. DOI 10.1016/j.repbio.2018.07.001.
- Janowski D., Salilew-Wondim D., Torner H., Tesfaye D., Ghanem N., Tomek W., El-Sayed A., Schellander K., Holker M. Incidence of apoptosis and transcript abundance in bovine follicular cells is associated with the quality of the enclosed oocyte. *Theriogenology*. 2012;78(3):656-669. DOI 10.1016/j.theriogenology.2012.03.012.
- Lee J.S., Mendez R., Heng H.H., Yang Z.Q., Zhang K. Pharmacological ER stress promotes hepatic lipogenesis and lipid droplet formation. *Am. J. Transl. Res.* 2012;4(1):102-113.
- Martinez E.A., Martinez C.A., Cambra J.M., Maside C., Lucas X., Vazquez J.L., Vazquez J.M., Roca J., Rodriguez-Martinez H., Gil M.A., Parrilla I., Cuello C. Achievements and future perspectives of embryo transfer technology in pigs. *Reprod. Domest. Anim.* 2019;54(4):4-13. DOI 10.1111/rda.13465.
- Okamoto A., Ikeda M., Kaneko A., Kishida C., Shimada M., Yamashita Y. The novel pig *in vitro* maturation system to improve developmental competence of oocytes derived from atretic non-vascularized follicle. *Biol. Reprod.* 2016;95(4):7. DOI 10.1095/biolreprod.116.138982.
- Okazaki T., Nishibori M., Yamashita Y., Shimada M. LH reduces proliferative activity of cumulus cells and accelerates GVBD of porcine oocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2003;209:43-50. DOI 10.1016/j.mce.2003.08.002.
- Remião M.H., Segatto N.V., Pohlmann A., Guterres S.S., Seixas F.K., Collares T. The potential of nanotechnology in medically assisted reproduction. *Front. Pharmacol.* 2018;8:994. DOI 10.3389/fphar.2017.00994.
- Romar R., Canovas S., Matas C., Gadea J., Coy P. Pig *in vitro* fertilization: where are we and where do we go? *Theriogenology*. 2019;137:113-121. DOI 10.1016/j.theriogenology.2019.05.045.
- Roy P.K., Qamar A.Y., Fang X., Kim G., Bang S., Zoysa M., Shin S.T., Cho J. Chitosan nanoparticles enhance developmental competence of *in vitro*-matured porcine oocytes. *Reprod. Domest. Anim.* 2020;56(2):342-350. DOI 10.1111/rda.13871.
- Soriano-Úbeda C., García-Vázquez F.A., Romero-Aguirregomez-corta J., Matas C. Improving porcine *in vitro* fertilization output by simulating the oviductal environment. *Sci. Rep.* 2017;7:43616. DOI 10.1038/srep43616.
- Wei J.H., Yuan X.Y., Zhang J.M., Wei J.Q. Caspase activity and oxidative stress of granulosa cells are associated with the viability and developmental potential of vitrified immature oocytes. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2016;198:22-26. DOI 10.1016/j.ejogrb.2015.12.010.
- Zhang X., Zhang K. Endoplasmic reticulum stress-associated lipid droplet formation and type II diabetes. *Biochem. Res. Int.* 2012;2012:247275. DOI 10.1155/2012/247275.

ORCID ID

T.I. Kuzmina orcid.org/0000-0002-4218-6080
I.V. Chistyakova orcid.org/0000-0001-7229-5766
A.O. Prituzhalova orcid.org/0000-0002-2865-9582
D.N. Tatarskaya orcid.org/0000-0002-8834-1912

Благодарности. Работа поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (проекты № 0445-2021-0005 и 121052600350-9).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 08.11.2021. После доработки 09.01.2022. Принята к публикации 11.01.2022.