

Влияние диеты с повышенным содержанием жира на липидный профиль ооцитов мышей


Е.Ю. Брусенцев¹, Э.А. Чуйко^{1,2}, К.А. Окотруб³, Т.Н. Игонина¹, И.Н. Рожкова¹, Д.С. Рагаева¹, С.В. Раннева^{1,2}, В.А. Напримеров^{1,4}, С.Я. Амстиславский^{1,2} 

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Институт автоматики и электрометрии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁴ Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия


 e-mail: amstis@bionet.nsc.ru

Аннотация. Существуют предпосылки того, что у женщин с ожирением возможно снижение качества ооцитов. При этом остается неясным, как связано это изменение с ожирением: опосредованно или напрямую, через изменение содержания и/или состава липидов в ооцитах. Целью настоящей работы было изучение на мышах влияния богатой жирами диеты, применяемой к самкам-донорам, на качественный состав и общее количество липидов в незрелых и созревших *in vivo* ооцитах. Установлено, что диета, богатая липидами, приводит к увеличению массы тела самок мышей по сравнению с контролем ($p < 0.001$; 44.77 ± 1.46 и 35.22 ± 1.57 соответственно), а также уровня холестерина ($p < 0.05$; 2.06 ± 0.10 и 1.78 ± 0.10 соответственно) и триглицеридов ($p < 0.05$; 2.13 ± 0.23 и 1.49 ± 0.21 соответственно) в крови этих животных. Эта диета не повлияла на степень ненасыщенности внутриклеточных липидов незрелых (0.207 ± 0.004 в эксперименте и 0.206 ± 0.002 в контроле) и зрелых ооцитов (0.212 ± 0.005 в эксперименте и 0.211 ± 0.003 в контроле). При созревании ооцитов *in vivo* наблюдалось возрастание содержания внутриклеточных липидов. В зрелых ооцитах количество липидов было больше в экспериментальной группе по сравнению с контролем ($p < 0.01$; 8.15 ± 0.37 и 5.83 ± 0.14 соответственно). Выявлено увеличение количества внутриклеточных липидов при созревании ооцитов как после стандартной диеты ($p < 0.05$; 4.72 ± 0.48 и 5.83 ± 0.14 соответственно), так и после диеты, богатой жирами ($p < 0.001$; 3.45 ± 0.62 и 8.15 ± 0.37 соответственно). Таким образом, при созревании ооцитов мышей *in vivo* возрастает содержание внутриклеточных липидов, богатая жирами диета приводит к повышенному содержанию липидов в зрелых ооцитах.

Ключевые слова: мыши; диета; ооциты; внутриклеточные липиды; нильский красный; конфокальная лазерная сканирующая микроскопия; спектроскопия комбинационного рассеяния света.

Для цитирования: Брусенцев Е.Ю., Чуйко Э.А., Окотруб К.А., Игонина Т.Н., Рожкова И.Н., Рагаева Д.С., Раннева С.В., Напримеров В.А., Амстиславский С.Я. Влияние диеты с повышенным содержанием жира на липидный профиль ооцитов мышей. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(5):533-538. DOI 10.18699/VJ20.645

Effects of a high-fat diet on the lipid profile of oocytes in mice


E.Yu. Brusentsev¹, E.A. Chuyko^{1,2}, K.A. Okotrub³, T.N. Igonina¹, I.N. Rozhkova¹, D.S. Ragaeva¹, S.V. Ranneva^{1,2}, V.A. Naprimerov^{1,4}, S.Ya. Amstislavsky^{1,2} 

¹ Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia,

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Automation and Electrometry of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁴ Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

 e-mail: amstis@bionet.nsc.ru

Abstract. There are evidences that obese women exhibit a detrimental oocyte quality. However, it remains unclear how this change is associated with obesity, indirectly – or directly through a change in the content and/or composition of lipids in oocytes. The aim of this work was to study effects of a high-fat diet applied to female donor mice on the amount and qualitative composition of lipids of immature and *in vivo* matured oocytes. A high-fat diet caused larger body weight in female mice compared with the control ($p < 0.001$; 44.77 ± 1.46 and 35.22 ± 1.57 , respectively), and increased the blood levels of cholesterol ($p < 0.05$; 2.06 ± 0.10 and 1.78 ± 0.10 , respectively) and triglycerides ($p < 0.05$; 2.13 ± 0.23 and 1.49 ± 0.21 , respectively). At the same time, this diet does not affect the level of unsaturation of lipids in immature (0.207 ± 0.004 in the experiment and 0.206 ± 0.002 in the control) and matured oocytes (0.212 ± 0.005 in the experiment and 0.211 ± 0.003 in the control). Total lipid content increased during *in vivo* maturation of mouse oocytes. The amount of lipids was greater in mature oocytes in the experimental group compared to the control ($p < 0.01$; 8.15 ± 0.37 and 5.83 ± 0.14 , respectively). An increase in intracellular lipid amount during oocyte maturation was revealed both after a standard diet ($p < 0.05$; 4.72 ± 0.48 and 5.83 ± 0.14 , respectively) and after a

fat-rich diet ($p < 0.001$; 3.45 ± 0.62 and 8.15 ± 0.37 , respectively). Thus, during *in vivo* oocyte maturation in mice the content of intracellular lipids enhanced, the high-fat diet aggravated this dynamics of lipid increase during *in vivo* maturation of oocytes.

Key words: mice; diet; oocytes; intracellular lipids; Nile Red; confocal laser scanning microscopy; Raman spectroscopy.

For citation: Brusentsev E.Yu., Chuyko E.A., Okotrub K.A., Igonina T.N., Rozhkova I.N., Ragaeva D.S., Ranneva S.V., Naprimerov V.A., Amstislavsky S.Ya. Effects of a high-fat diet on the lipid profile of oocytes in mice. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(5):533-538. DOI 10.18699/VJ20.645 (in Russian)

Введение

Ооцит и клетки кумулюса, составляющие кумулюс-ооцитный комплекс (КОК), содержат липидные гранулы (ЛГ), которые связаны с другими органеллами, участвующими в клеточном метаболизме (Kruip et al., 1983; Dunning et al., 2014; Ellenrieder et al., 2016). Предыдущие исследования, проведенные при помощи световой и электронной микроскопии, выявили связь между эндоплазматическим ретикуломом, митохондриями и ЛГ в ооцитах крупного рогатого скота; эти кластеры назвали метаболическими единицами (Kruip et al., 1983). Тесная связь между этими органеллами способствует клеточному метаболизму, в частности β -окислению липидов (Ellenrieder et al., 2016). Цитоплазматические ЛГ являются хранилищами жиров, которые могут быть использованы в качестве энергетического субстрата (Thiam et al., 2013). Гидрофобное содержимое этих гранул, состоящее в основном из триацилглицеридов и сложных эфиров стеролов, таких как холестерин, окружено монослоем фосфолипидов (Walther, Farese, 2009). В настоящее время ЛГ считают активными внутриклеточными структурами, играющими важную роль в клеточном гомеостазе (Walther, Farese, 2009; Welte, Gould, 2017). Кроме того, недавние исследования показали их протекторную, а также регуляторную функцию, в частности их участие в белковом метаболизме и работе ядра (Welte, Gould, 2017).

Влияние ожирения на качество ооцитов – важный медицинский аспект. Избыточная масса тела отрицательно сказывается на репродуктивном здоровье людей, о чем свидетельствуют клинические данные, полученные при применении вспомогательных репродуктивных технологий – ВРТ (Robker, 2008; Souter et al., 2011; Dickey et al., 2012). Установлено, что у женщин с ожирением наблюдается снижение качества ооцитов в циклах ВРТ по сравнению с имевшими нормальный вес тела (Robker, 2008). Между тем не ясно, связано ли это с избыточной массой тела пациенток либо с изменением содержания и состава липидов в ооцитах (Pantasri et al., 2015).

Эффект обогащенной липидами диеты на развитие ооцитов подтверждается и в экспериментах на различных видах животных (Zeron et al., 2002; Minge et al., 2008; Wu et al., 2010; Dunning et al., 2014). Так, в работе на мышах, в которой самок держали на диете с повышенным содержанием жиров, продемонстрировано, что у особей с вызванным таким питанием ожирением было низкое качество ооцитов, а эмбрионы из них хуже развивались в культуре *in vitro* (Minge et al., 2008). Однако до сих пор остается неизвестным, что именно вызывает эти изменения. Цель нашей работы – изучение на мышах влияния богатой жирами диеты, применяемой к самкам-донорам, на качественный состав и общее количество внутриклеточных липидов незрелых и зрелых ооцитов мышей.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. В исследовании для получения незрелых и зрелых ооцитов использовано 56 самок-доноров мышей линии CD1 в возрасте 2.5 мес. (16 в контроле и 40 в экспериментальной группе) и 6 стерильных самцов этой же линии. Животных содержали в клетках с подстилкой из опилок в стандартных условиях конвенционального вивария Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия): при комфортной температуре 22–24 °С, свободном доступе к полнорационному сухому гранулированному корму для лабораторных грызунов «Чара» (ЗАО «Ассортимент-Агро», Россия) и очищенной воде, 12:12-часовом цикле дня:ночи. Все эксперименты на животных одобрены Комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 5 от 13.05.2011) и соответствуют Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей.

Оценка эффективности диеты. Самок-доноров содержали как на стандартной диете (контроль), так и на специализированной, когда дополнительно к обычному корму животным добавляли свиное сало и семена подсолнечника (экспериментальная группа). Пищевые добавки начинали давать с возраста пяти недель. Откормочный эксперимент длился в течение восьми недель. Для подтверждения эффективности диеты мышей обеих групп взвешивали перед эвтаназией, а также у самок натошак собирали кровь после декапитации, центрифугировали при 3250 об/мин (1000 g) в течение 5 мин, после чего собирали плазму и оценивали уровень холестерина и триглицеридов с использованием наборов Холестерин-Ново (АО «Вектор-Бест», Россия) и Триглицериды-Ново (АО «Вектор-Бест»), как рекомендовано производителем.

Незрелые ооциты получали от 10 самок в контрольной и 30 – в экспериментальной группе. Животных на стадии проэструса подвергали эвтаназии при помощи декапитации. Яичники извлекали и измельчали в среде Flushing Solution (FertiPro, Бельгия). Выделенные КОК оценивали под стереомикроскопом Leica S8 APO с увеличением $\times 80$ (Leica Microsystems, Германия). Для исследования брали только те КОК, в которых было не менее пяти слоев кумулюсных клеток, плотно прилегающих к прозрачной оболочке ооцита (Hillier et al., 1985). Если КОК имели существенные дефекты, то их отбраковывали.

Получение стерильных самцов. Стерилизацию самцов проводили путем вазэктомии не менее чем за две недели до начала эксперимента, как было описано ранее (Hogan et al., 1994). Самцов мышей линии CD1 в возрасте шести недель наркотизировали при помощи внутрибрюшинного введения 0.25 мг/кг препарата медетомедина гидрохлорида (Domitor 1 mg/mL, Orion-Corporation, Фин-

ляндия) и через 10 мин – 50 мг/кг препарата золетила (Zoletil, SA, Virbac Sante Animale, Франция). После наркотизации подкожно вводили антибиотик: 0.01 мл амоксициллина тригидрата 150 мг/мл (ОАО «Синтез», Россия). Затем животных помещали на подогреваемый столик, шерсть в зоне операционного поля сбрасывали, а кожу обрабатывали 70 % этиловым спиртом. При помощи хирургических ножниц делали горизонтальный надрез кожных покровов мошонки длиной ~5 мм. Подтягивали эпидидимисы к краю хирургической раны и разворачивали их так, чтобы были видны семенные канатики. Семявыносящие каналы отделяли от сопряженных тканей и пережигали раскаленным пинцетом в двух местах, удаляя участок канала между ними. Эпидидимисы возвращали в первоначальное положение. Затем в рану засыпали 2 мг амоксициллина тригидрата (ОАО «Синтез»). Зашивали надрезы наложением двух швов и обрабатывали их Рауносаном (ООО «Апи-Сан», Россия).

Получение зрелых ооцитов. Для выделения зрелых ооцитов проводили стерильное спаривание с использованием шести вазэктомированных самцов. В эксперименте участвовало 16 самок (6 в контроле и 10 в экспериментальной группе). Зрелые ооциты выделяли через 20–22 ч после стерильного спаривания. С этой целью выполняли эвтаназию самок-доноров при помощи декапитации, извлекали яичники с прилегающими к ним яйцеводами. Органы переносили в питательную среду M2 (Merck, Германия), разрезали ампулярную часть яйцевода и извлекали зрелые ооциты. Для удаления кумулюсных клеток использовали гиалуронидазу (Merck) в концентрации 80 МЕ/мл (Brinster, 1971).

Определение степени ненасыщенности липидов. Методом рамановской спектроскопии (комбинационного рассеяния света – КРС) было выполнено сравнение ненасыщенности липидов в незрелых и зрелых ооцитах. Для исследования изменений в степени ненасыщенности липидов измеряли спектры КРС в диапазоне от 1000 до 3000 см^{-1} . Для каждого ооцита измеряли от 30 до 60 спектров КРС от разных локальных областей клетки. Латеральный и продольный размеры областей, от которых измеряли комбинационное рассеяние света, составляли ~1 и 10 мкм соответственно. Для каждого отдельного набора данных с использованием метода главных компонент выделяли вклад липидов, аналогично подходу, применявшемуся ранее на эмбрионах мыши (Okotrub et al., 2017). Для характеристики ненасыщенности углеводородных цепочек липидов исследовали соотношение интенсивностей пиков КРС, относящихся к валентным колебаниям двойных C=C связей (~1660 см^{-1}) и симметричным валентным колебаниям метиленовых групп (2850 см^{-1}). Ооциты переносили в стеклянный контейнер с лункой, глубиной 300 мкм в капле среды KSOM (Merck), покрывали тонким листом слюды и герметизировали. Измерения осуществляли с использованием лабораторной экспериментальной установки, состоящей из модифицированного микроскопа (Orthoplan, Leitz, Германия) и решетчатого монохроматора SP2500i (Princeton Instruments, Trenton, NJ, США), оснащенного многоканальным детектором Spec-10:256E/LN (Princeton Instruments). Точность определения абсолютной частоты КРС была более чем 1 см^{-1} ; спектральное разрешение

составляло 2.5 см^{-1} . Для возбуждения КРС использовали излучение твердотельного лазера (Excelsior, Spectra Physics, США) с длиной волны 532.1 нм.

Оценка общего количества липидов ооцитов. Оценка изменения внутриклеточного состава липидов в ооцитах мышей после содержания самок-доноров на двух диетах проведена при помощи окрашивания флуорохромом Nile Red красным – Nile Red Staining Kit (Merck) с последующей конфокальной лазерной сканирующей микроскопией (КЛСМ). Метод подробно описан ранее (Romek et al., 2011), при этом нами внесены изменения. Ооциты перед исследованием были зафиксированы в 4 % параформальдегиде (Merck) на фосфатном буфере – PBS (Merck) в течение двух часов, затем трижды отмыты в 50 мкл PBS с содержанием одного мг/мл поливинилпирролидона (Merck) по 5 мин каждая. Стоковый раствор флуорохрома Nile Red (1 мг/мл) был приготовлен посредством разведения красителя в диметилсульфоксиде. Перед окрашиванием стоковый раствор разводили до рабочей концентрации 10 мкг/мл. Ооциты инкубировали в рабочем растворе в течение трех часов при 37 °С, чтобы добиться максимальной интенсивности окрашивания внутриклеточных липидов, как описано ранее (Genicot et al., 2005). Материал в капле PBS монтировали на предметные стекла.

Изображения образцов получали с помощью инвертированного конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 NLO Axio Observer Z1 (Zeiss, Германия) с применением программного обеспечения Zen 2012 (Black Edition) (Zeiss). Все образцы фотографировали объективом Plan-Apochromat $\times 20$ (0.8 NA), возбуждение флуорохрома проводили на длине волны 488 нм аргонным газовым лазером на мощности 0.1 % $\times 30$ мВт ≈ 30 мкВт, главное дихроичное зеркало было выбрано на 488 нм. Разрешение детектора 512 \times 512 пикселей, с задержкой на каждый пиксель в 3.15 мкс. Для детекции сигнала использовали GaAsP детектор (Gallium Arsenic Phosphorus). Полная трехмерная визуализация ооцитов была выполнена с помощью опции Z-stack, установленной на толщину оптического среза в 2.5 мкм. Спектры производили на длинах волн 494–687 нм, с шагом в 9 нм. Число оптических срезов – 40, общая толщина всех оптических срезов – 100 мкм. Все изображения были созданы детектированием в режиме счета фотонов. Итоговое изображение представляет из себя трехмерную матрицу, где для каждого элемента имеется информация о числе детектированных фотонов (абсолютное число фотонов – а. ч. ф.). Для вычитания фона делали три изображения на стекле, где отсутствует материал, при тех же условиях, что были описаны выше, с последующим вычислением среднего. Все оптические срезы (как образца, так и фона) суммировали с применением скрипта для ImageJ, чтобы сформировать итоговое изображение. Для вычитания фоновой флуоресценции использовали Python 3.8 с библиотекой OpenCV.

Статистический анализ. Данные анализировали посредством языка программирования R 3.6.2 и с графической оболочкой RStudio Desktop 1.1.463. Анализ на нормальность распределения данных проводили критерием согласия Андерсона–Дарлинга, с учетом коэффициентов эксцесса и асимметрии. Корреляцию между массой тела

и уровнем холестерина в крови самок-доноров ооцитов, а также между массой тела самок-доноров ооцитов и абсолютным числом фотонов оценивали с использованием ранговой корреляции Стьюдента. Значения представлены как среднее \pm SEM. Различия средних между группами оценивали *t*-критерием Стьюдента, а для неравных дисперсий – критерием Кохрана–Кокса. Уровень значимости принимали при $p < 0.05$.

Результаты

Данные по влиянию диеты на массу животных, уровень холестерина и триглицеридов в крови представлены в табл. 1. Установлено, что диета с высоким содержанием липидов статистически достоверно ($p < 0.001$) приводит к увеличению веса тела животных по сравнению с контролем. Диета с повышенным содержанием липидов достоверно ($p < 0.05$) вызывала повышение уровня холестерина и триглицеридов в крови по сравнению с контрольной группой. Имелась достоверная корреляция ($r = 0.68$; $p < 0.01$) между массой тела самок-доноров и уровнем холестерина в их крови.

Результаты по влиянию диеты на степень ненасыщенности липидов в незрелых и зрелых ооцитах приведены в табл. 2. В ходе исследований не выявлено достоверных различий по степени ненасыщенности липидов в незрелых и зрелых ооцитах после содержания самок-доноров на двух разных диетах.

Влияние диеты на содержание липидов в незрелых и зрелых ооцитах продемонстрировано на рис. 1 и 2. В результате проведенной работы не выявлено различий по количеству липидов в незрелых ооцитах после содержания самок-доноров на двух разных диетах. Но в зрелых ооцитах количество липидов было больше ($p < 0.01$) в группе мышей, бывших на диете, богатой жирами, по сравнению с контролем (8.15 ± 0.37 и 5.83 ± 0.14 млн фотонов соответственно). Кроме того, установлено возрастание количества внутриклеточных липидов у зрелых ооцитов, по сравнению с незрелыми, как у самок, находящихся на стандартной диете (5.83 ± 0.14 и 4.72 ± 0.48 млн фотонов соответственно, $p < 0.05$), так и у самок, содержащихся на диете, богатой жирами (8.15 ± 0.37 и 3.45 ± 0.62 млн фотонов соответственно, $p < 0.001$). Имелась достоверная корреляция ($r = 0.91$, $p < 0.001$) между массой тела самок-доноров и количеством внутриклеточных липидов в ооцитах.

Таблица 1. Влияние диеты на массу тела, концентрацию холестерина и триглицеридов в крови мышей линии CD1

Параметр	Группа (число животных)	
	Контроль (n = 16)	Жирная диета (n = 40)
Масса тела, г	35.22 \pm 1.57	44.77 \pm 1.46 ^{***}
Концентрация холестерина, мМ	1.78 \pm 0.10	2.06 \pm 0.10*
Концентрация триглицеридов, мМ	1.49 \pm 0.21	2.13 \pm 0.23*

* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ по сравнению с контролем.

Таблица 2. Степень ненасыщенности внутриклеточных липидов в незрелых и зрелых ооцитах мышей линии CD1 в зависимости от диеты

Ооциты	Группа (число ооцитов)	
	Контроль	Жирная диета
Незрелые (n)	0.206 \pm 0.002 (n = 3)	0.207 \pm 0.004 (n = 3)
Зрелые (n)	0.211 \pm 0.003 (n = 6)	0.212 \pm 0.005 (n = 10)

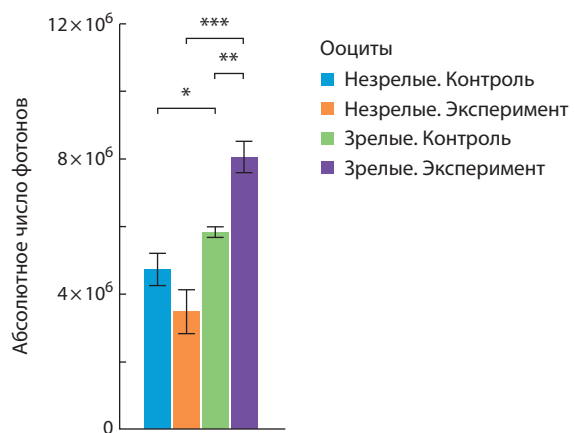


Рис. 1. Общая интенсивность флуоресценции липидов незрелых и зрелых ооцитов мышей линии CD1.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

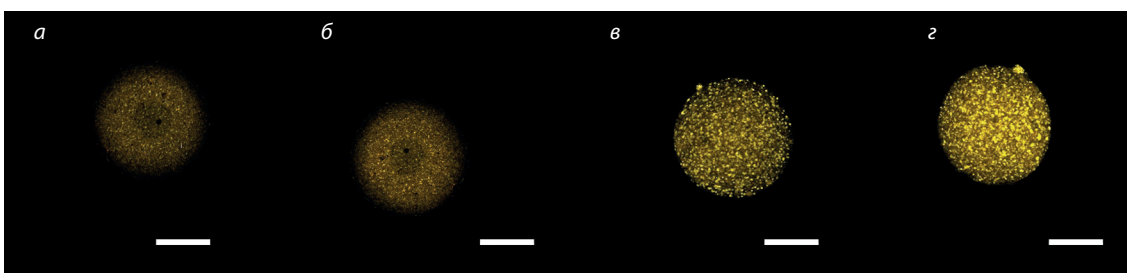


Рис. 2. Незрелые и зрелые ооциты мышей линии CD1 после окрашивания нильским красным с последующей конфокальной лазерной сканирующей микроскопией.

Незрелые ооциты: а – контрольная группа; б – экспериментальная; зрелые ооциты: в – контрольная группа; з – экспериментальная. Цвет соответствует длине волны свечения внутриклеточных липидов. Шкала 30 мкм.

Обсуждение

В ходе проведенных экспериментов установлено, что диета с повышенным содержанием липидов приводит к увеличению массы тела мышей, а также повышению уровня холестерина и триглицеридов в их крови, что соответствует данным других исследователей (Ma et al., 2012; Li et al., 2018). В настоящее время есть несколько работ, в которых ученые пытаются оценить липидный профиль ооцитов *in vivo* после влияния диеты (Zeron et al., 2002; Wu et al., 2010; Li et al., 2018). Результаты этих работ достаточно противоречивы.

Используемая нами диета не повлияла на качественный состав липидов в незрелых и зрелых ооцитах мышей от самок-доноров с ожирением. Эти данные могут быть обусловлены тем, что диета была сбалансирована по насыщенным и ненасыщенным жирным кислотам, поэтому никаких изменений качественного состава липидов в ооцитах не происходило, как описано ранее в экспериментах со сходным дизайном (Dunning et al., 2014; Amstislavsky et al., 2019). Более того, в работе, проведенной на овцах (Zeron et al., 2002), отмечено, что диета, богатая полиненасыщенными жирными кислотами (с добавлением рыбьего жира), влияла на изменение состава внутриклеточных липидов в клетках кумулюса, но не в незрелых ооцитах, что может быть связано с высоким содержанием в добавке ненасыщенных жирных кислот.

В нашем исследовании обнаружено, что при содержании самок-доноров на диете, богатой жирами, липидов в зрелых ооцитах становилось больше, чем в контроле, т.е. при применении стандартной диеты. Между тем в незрелых ооцитах не было различий по общему количеству липидов при содержании мышей на разных диетах. Некоторые исследования на мышах отмечают возрастание количества липидов в незрелых ооцитах при содержании мышей на жирной диете (Wu et al., 2010). Однако в недавно опубликованной работе (Li et al., 2018) продемонстрировано возрастание числа крупных липидных гранул в клетках кумулюса, но не в самих незрелых ооцитах. Возможно, наблюдаемое в нашем эксперименте отсутствие повышения общего уровня липидов в незрелых ооцитах после специальной обогащенной жирами диеты связано с тем, что эти липиды уходят в другие клетки, в частности кумулюса, в то время как на последующей стадии развития происходит накопление липидов непосредственно в ооцитах.

Противоречия в выводах описанных выше работ, выполненных разными группами исследователей, могут быть связаны с различиями между линиями, а также с тем, что употреблялись корма, отличающиеся по своему составу. В целом можно сказать, что, в отличие от многочисленных работ, в которых используется модель изменения качественного и количественного состава липидов в репродуктивных клетках, культивируемых *in vitro* (Брусенцев и др., 2019; Amstislavsky et al., 2019), аналогичные эксперименты в условиях *in vivo* сопряжены с воздействием большого числа различных факторов, что, по-видимому, и приводит к разнородности результатов.

Обнаружена динамика возрастания количества липидов от незрелых ооцитов к зрелым, наблюдавшаяся при обеих диетах. Но более выраженной эта зависимость была при

диете с повышенным содержанием жира. Действительно, жирные кислоты, имеющиеся в крови матери, ответственны за липидный профиль фолликулярной жидкости, из которой они поступают в ооцит через окружающую его клетки кумулюса (Valckx et al., 2014). Ранее с помощью микро- и спектроскопических методов были исследованы распределение, локализация и размер липидных гранул в процессе созревания ооцитов мышей (Dunning et al., 2014; Bradley et al., 2016). В частности, при использовании когерентного антистоксового комбинационного рассеяния выявлено возрастание размера и числа агрегированных ЛГ при созревании ооцитов мышей как *in vivo*, так и *in vitro* (Bradley et al., 2016). Сходная закономерность отмечена в работе на крупном рогатом скоте: полуколичественным методом с применением КЛСМ и флуорохрома BODIPY продемонстрировано достоверное возрастание внутриклеточных липидов при созревании ооцитов *in vitro*, хотя при созревании ооцитов *in vivo* наблюдалась лишь тенденция к такому возрастанию (Collado et al., 2017).

Однако в работе на свиньях показано снижение количества внутриклеточных липидов по мере развития ооцитов *in vivo*: на стадии герминального везикула содержание липидов было на 21 % выше, чем у созревших до стадии метафазы второго деления мейоза (Romek et al., 2011). Таким образом, имеются и видовые отличия в изменении содержания внутриклеточных липидов в ходе созревания ооцитов (Romek et al., 2011; Dunning et al., 2014; Bradley et al., 2016; Collado et al., 2017). В частности, у свиней снижение количества жиров в ходе созревания ооцитов, вероятней всего, связано с их активным расщеплением, так как у этого вида животных липиды могут выступать в качестве основного энергетического субстрата (Bradley, Swann, 2019).

Заключение

Результаты нашего исследования показывают, что увеличение содержания липидов по мере созревания *in vivo* ооцитов мышей может быть усилено при содержании самок-доноров на диете, богатой жиром. Есть вероятность того, что липиды в большом количестве поступают в ооцит мышши из клеток кумулюса при его созревании (Li et al., 2018). Большее количество липидов в зрелых ооцитах, полученных от самок-доноров, содержащихся на диете, богатой жирами, по сравнению с контролем, по всей видимости, может быть связано с накоплением энергетического субстрата и особенностями метаболизма ожиревших особей, например неспособностью клетки быстро утилизировать поступающие жиры. Имеются примеры того, что фактический состав жирных кислот в ЛГ ооцитов зависит от рациона матери, который определяет жирные кислоты, доступные для ооцита во время развития яйцников (Bradley, Swann, 2019).

Таким образом, диета, богатая липидами, приводит к увеличению массы тела самок мышей, а также повышает уровень холестерина и триглицеридов в крови этих животных. Содержание самок-доноров на такой диете не влияет на качественный состав липидов незрелых и зрелых ооцитов. При этом наблюдается повышение общего содержания липидов при созревании ооцитов мышшей *in vivo*. Диета, обогащенная жирами, приводит к большему накоплению липидов в зрелых ооцитах.

Список литературы / References

- Брусенцев Е.Ю., Мокроусова В.И., Игонина Т.Н., Рожкова И.Н., Амстиславский С.Я. Роль липидных гранул в развитии ооцитов и преимплантационных эмбрионов млекопитающих. *Онтогенез*. 2019;50(5):297-305. DOI 10.1134/S0475145019050100.
[Brusentsev E.Yu., Mokrousova V.I., Igonina T.N., Rozhkova I.N., Amstislavsky S.Ya. Role of lipid droplets in the development of oocytes and preimplantation embryos in mammals. *Rus. J. Devel. Biol.* 2019;50(5):230-237. <https://doi.org/10.1134/S1062360419050102>.]
- Amstislavsky S., Mokrousova V., Brusentsev E., Okotrub K., Comizoli P. Influence of cellular lipids on cryopreservation of mammalian oocytes and preimplantation embryos: a review. *Biopreserv. Biobank*. 2019;17(1):76-83. DOI 10.1089/bio.2018.0039.
- Bradley J., Pope I., Masia F., Sanusi R., Langbein W., Swann K., Borri P. Quantitative imaging of lipids in live mouse oocytes and early embryos using CARS microscopy. *Development*. 2016;143(12):2238-2247. DOI 10.1242/dev.129908.
- Bradley J., Swann K. Mitochondria and lipid metabolism in mammalian oocytes and early embryos. *Int. J. Dev. Biol.* 2019;63:93-103. DOI 10.1387/ijdb.180355ks.
- Brinster R.L. Measuring embryonic enzyme activity. In: Daniel J.C. Jr. (Ed.). *Method in Mammalian Embryology*. San Francisco: Freeman, 1971;215-227.
- Collado M., da Silveira J.C., Sangalli J.R., Andrade G.M., Sousa L.R.D.S., Silva L.A., Meirelles F.V., Perecin F. Fatty acid binding protein 3 and transzonal projections are involved in lipid accumulation during *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Sci. Rep.* 2017;7(1):2645. DOI 10.1038/s41598-017-02467-9.
- Dickey R.P., Xiong X., Gee R.E., Pridjian G. Effect of maternal height and weight on risk of preterm birth in singleton and twin births resulting from *in vitro* fertilization: a retrospective cohort study using the Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcome Reporting System. *Fertil. Steril.* 2012;97(2):349-354. DOI 10.1016/j.fertnstert.2011.11.017.
- Dunning K.R., Russell D.L., Robker R.L. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation. *Reproduction*. 2014;148(1):15-27. DOI 10.1530/REP-13-0251.
- Ellenrieder L., Opalinski L., Becker L., Kruger V., Mirus O., Straub S.P., Ebell K., Flinner N., Stiller S.B., Guiard B., Meisinger C., Wiedemann N., Schleiff E., Wagner R., Pfanner N., Becker T. Separating mitochondrial protein assembly and endoplasmic reticulum tethering by selective coupling of Mdm10. *Nat. Commun.* 2016;7:13021. DOI 10.1038/ncomms13021.
- Genicot G., Leroy J.L.M.R., Van Soom A., Donnay I. The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes. *Theriogenology*. 2005;63(4):1181-1194. DOI 10.1016/j.theriogenology.2004.06.006.
- Hillier S.G., Siddiquy A.K., Winston R.M. Fertilization *in vitro* of cumulus-enclosed mouse oocytes: effect of timing of the ovulatory hCG injection. *Int. J. Fertil.* 1985;30(2):34-38.
- Hogan B., Beddington R., Costantini F., Lacy E. *Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1994.
- Kruip T.A., Cran D.G., Van Beneden T.H., Dieleman S.J. Structural changes in bovine oocytes during final maturation *in vivo*. *Mol. Reprod. Dev.* 1983;8(1):29-47. DOI 10.1002/mrd.1120080105.
- Li J., Wang S., Wang B., Wei H., Liu X., Hao J., Duan Y., Hua J., Zheng X., Feng X., Yan X. High-fat-diet impaired mitochondrial function of cumulus cells but improved the efficiency of parthenogenetic embryonic quality in mice. *Anim. Cells Syst. (Seoul)*. 2018;22(4):243-252. DOI 10.1080/19768354.2018.1497707.
- Ma W., Yang X., Liang X. Obesity does not aggravate vitrification injury in mouse embryos: a prospective study. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2012;10:68. DOI 10.1186/1477-7827-10-68.
- Minge C.E., Bennett B.D., Norman R.J., Robker R.L. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone reverses the adverse effects of diet-induced obesity on oocyte quality. *Endocrinology*. 2008;149(5):2646-2656. DOI 10.1210/en.2007-1570.
- Okotrub K.A., Amstislavsky S.Y., Surovtsev N.V. Raman spectroscopy reveals the lipid phase transition in preimplantation mouse embryos during freezing. *Arch. Biochem. Biophys.* 2017;635:37-43. DOI 10.1016/j.abb.2017.10.001.
- Pantasi T., Wu L.L., Hull M.L., Sullivan T.R., Barry M., Norman R.J., Robker R.L. Distinct localisation of lipids in the ovarian follicular environment. *Reprod. Fertil. Dev.* 2015;27(4):593-601. DOI 10.1071/RD14321.
- Robker R.L. Evidence that obesity alters the quality of oocytes and embryos. *Pathophysiology*. 2008;15(2):115-121. DOI 10.1016/j.pathophys.2008.04.004.
- Romek M., Gajda B., Krzysztofowicz E., Kepczynski M., Smorag Z. New technique to quantify the lipid composition of lipid droplets in porcine oocytes and pre-implantation embryos using Nile Red fluorescent probe. *Theriogenology*. 2011;75(1):42-54. DOI 10.1016/j.theriogenology.2010.06.040.
- Souter I., Baltagi L.M., Kuleta D., Meeker J.D., Petrozza J.C. Women, weight, and fertility: the effect of body mass index on the outcome of superovulation/intrauterine insemination cycles. *Fertil. Steril.* 2011;95(3):1042-1047. DOI 10.1016/j.fertnstert.2010.11.062.
- Thiam A.R., Farese R.V. Jr., Walther T.C. The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013;14(12):775. DOI 10.1038/nrm3699.
- Valckx S.D., Arias-Alvarez M., De Pauw I., Fievez V., Vlaeminck B., Fransen E., Bols P.E., Leroy J.L. Fatty acid composition of the follicular fluid of normal weight, overweight and obese women undergoing assisted reproductive treatment: a descriptive cross-sectional study. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2014;12:13. DOI 10.1186/1477-7827-12-13.
- Walther T.C., Farese R.V. The life of lipid droplets. *Biochim. Biophys. Acta*. 2009;1791(6):459-466. DOI 10.1016/j.bbali.2008.10.009.
- Welte M.A., Gould A.P. Lipid droplet functions beyond energy storage. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*. 2017;1862(10):1260-1272. DOI 10.1016/j.bbali.2017.07.006.
- Wu L.L., Dunning K.R., Yang X., Russell D.L., Lane M., Norman R.J., Robker R.L. High-fat diet causes lipotoxicity responses in cumulus-oocyte complexes and decreased fertilization rates. *Endocrinology*. 2010;151(11):5438-5445. DOI 10.1210/en.2010-0551.
- 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. DOI 10.1002/mrd.1156.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке РФФИ, № 19-016-00025, а также бюджетных проектов ИЦиГ СО РАН, № 0324-2019-0041-C-01 и ИАиЭ СО РАН, № ААААА17-117052410033-9. Эксперименты по флуоресцентной микроскопии осуществлены в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН (Новосибирск) (<http://www.bionet.nsc.ru/labs/viv/index.php?id=113>). Эксперименты по измерению КРС проведены с использованием оборудования ЦКП «Высокоразрешающая спектроскопия газов и конденсированных сред» (ИАиЭ СО РАН, Новосибирск).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 20.02.2020. После доработки 22.05.2020. Принята к публикации 22.05.2020.