

ВЛИЯНИЕ СТЕАРИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ЭМБРИОНОВ ДОМАШНЕЙ КОШКИ (*FELIS SILVESTRIS CATUS*)

© 2024 г. Е. Ю. Брусенцев*, С. В. Окотруб*, Д. А. Лебедева*, **, ***, К. А. Окотруб**,
Т. А. Рахманова*, **, ***, С. Я. Амстиславский*, **, @

*Институт цитологии и генетики (ИЦиГ) СО РАН, просп. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090 Россия

**Институт автоматики и электрометрии (ИАиЭ) СО РАН, просп. Коптюга, 1, Новосибирск, 630090 Россия

***Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
ул. Пирогова, 1, Новосибирск, 630090 Россия

@E-mail: amstis@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.02.2023 г.

После доработки 02.05.2023 г.

Принята к публикации 04.05.2023 г.

Данная работа направлена на изучение воздействия насыщенной стеариновой кислоты (СК) в условиях культивирования *in vitro* на эмбрионы домашней кошки (*Felis silvestris catus*) и оценку того, как изменение состава внутриклеточных липидов отражается на результатах криоконсервации. Добавление СК в культуральную среду не влияло на развитие эмбрионов кошек *in vitro* до криоконсервации. Также не было выявлено изменений по общему количеству липидов в эмбрионах после воздействия СК. Между тем степень ненасыщенности липидов была снижена в эмбрионах после культивирования *in vitro* с СК. Более того, температура начала фазового перехода липидов (T^*) выше по сравнению с контролем у эмбрионов, подвергнутых воздействию СК. Снижение эффективности криоконсервации эмбрионов при культивировании с СК было ассоциировано с уменьшением степени ненасыщенности внутриклеточных липидов и повышением T^* . Результаты могут иметь значение для консервации генетических ресурсов видов подсемейства Felinae.

Ключевые слова: Felidae, экстракорпоральное оплодотворение, раннее развитие, культивирование *in vitro*, внутриклеточные липиды, жирные кислоты, программное замораживание, спектроскопия комбинационного рассеяния света

DOI: 10.31857/S1026347024010083, EDN: LPLLRN

У ряда млекопитающих, в частности у таких важных сельскохозяйственных животных, как свинья (*Sus scrofa*, L., 1758), лошадь (*Equus caballus*, L., 1758), а также у всех изученных представителей отряда Carnivora ооциты и преимплантационные эмбрионы содержат большое количество внутриклеточных липидов (Genicot *et al.*, 2005; Amstislavsky *et al.*, 2019; Lawson *et al.*, 2022). Для большинства из этих видов существуют проблемы, связанные с криоконсервацией их эмбрионов (Nagashima *et al.*, 1995; Amstislavsky *et al.*, 2019; Borges, Vireque, 2019; Idrissi *et al.*, 2021). Поиск механизмов, лежащих в основе низкой криоустойчивости эмбрионов богатых липидами, важен для зоологии и сравнительной эмбриологии, а в практическом плане необходим для успешной консервации генетических ресурсов ряда видов млекопитающих (Abe *et al.*, 2002; Амстиславский и др., 2017; Amstislavsky *et al.*,

2019; Borges, Vireque, 2019; Idrissi *et al.*, 2021; Igonina *et al.*, 2021).

Семейство Felidae включает множество уязвимых и исчезающих видов (IUCN, 2021). Домашняя кошка (*Felis silvestris catus*, L., 1758) является модельным объектом для исследований, направленных на реализацию концепции сохранения генетических ресурсов диких видов кошачьих путем криоконсервации гамет и эмбрионов (Amstislavsky *et al.*, 2018; Mokrousova *et al.*, 2020a; 2020b; Окотруб и др., 2022). В ооцитах и преимплантационных эмбрионах исследованных видов кошачьих содержится большое количество внутриклеточных липидов (Crichton *et al.*, 2003; Kochan *et al.*, 2021; Zahmel *et al.*, 2021). Эксперименты, проводимые на домашней кошке, могут способствовать пониманию особенностей криоконсервации эмбрионов других представителей семейства кошачьих.

Внутриклеточные липидные гранулы (ЛГ) чувствительны к охлаждению и могут подвергаться негативному влиянию криоконсервации (Abe *et al.*, 2002; Amstislavsky *et al.*, 2019; Okotrub *et al.*, 2021), хотя механизмы криоповреждений в эмбрионах, богатых липидами, остаются слабо изученными. Известно, что фазовый переход воды во время процесса охлаждения связан с повреждением клеток и снижением их жизнеспособности (Mazur, 1990). Подобно кристаллизации водного раствора при охлаждении, в клетках эмбрионов происходит и фазовый переход липидов (ФПЛ), которые содержатся в больших количествах в ЛГ (Amstislavsky *et al.*, 2019). Это может инициировать повреждения, связанные с перераспределением и упорядочением молекул липидов (Okotrub *et al.*, 2018). Одной из стратегий снижения повреждения клеток является полное или частичное удаление из них внутриклеточных липидов (Nagashima *et al.*, 1995; Galiguis *et al.*, 2014; Borges, Vireque, 2019). Другая стратегия состоит в том, чтобы изменить липидный состав ЛГ и тем самым улучшить результаты криоконсервации ооцитов и преимплантационных эмбрионов. В некоторых исследованиях показано, что воздействие *in vitro* ненасыщенными жирными кислотами (ЖК), в частности линолевой (ЛК) и олеиновой кислот (ОК), улучшает развитие эмбрионов и повышает их жизнеспособность после криоконсервации у разных видов млекопитающих (Fayez *et al.*, 2018; Karasahin, 2019; Yousif *et al.*, 2020). Насыщенные ЖК оказывают противоположное влияние на развивающиеся эмбрионы млекопитающих (Shehab-el-Deen *et al.*, 2009; Van Hoeck *et al.*, 2011; Aardema *et al.*, 2022). Например, воздействие *in vitro* пальмитиновой (ПК) и/или стеариновой кислот (СК) увеличивает уровень апоптоза и уменьшает число клеток у эмбрионов крупного рогатого скота и негативно влияет на их развитие (Van Hoeck *et al.*, 2011; Desmet *et al.*, 2016; Aardema *et al.*, 2022). Более того, криоустойчивость эмбрионов крупного рогатого скота значительно ниже после созревания *in vitro* ооцитов и/или при культивировании *in vitro* таковых с СК (Shehab-el-Deen *et al.*, 2009; Aardema *et al.*, 2022).

В работе на ооцитах домашней кошки показано, что во время их охлаждения внутриклеточные ЛГ подвергаются фазовому переходу и фазовой сепарации. После охлаждения более насыщенные липиды в составе ЛГ подвергаются фазовой сепарации раньше, чем ненасыщенные (Mokrousova *et al.*, 2020a). В недавней работе на ооцитах домашних кошек было показано, что после добавления СК во время их созревания *in vitro* и последующей криоконсервации при помощи программного замораживания, часть насыщенных липидов может оставаться в упорядоченном конформационном состоянии после оттаивания (Okotrub *et al.*, 2021). Тем не менее влияние СК в ходе культивирования *in vitro* эмбрионов домашних кошек на их

жизнеспособность после криоконсервации проверено не было.

Существуют отдельные наблюдения, показывающие, что снижение температуры начала ФПЛ (T^*) повышает криоустойчивость репродуктивных клеток (Zeron *et al.*, 2002). На нескольких видах млекопитающих выявлено, что T^* зависит от степени ненасыщенности липидов (Zeron *et al.*, 2002; Igonina *et al.*, 2021; Окотруб и др., 2022). В нашей работе на эмбрионах домашней кошки показано, что воздействие на них ЛК при культивировании *in vitro* вызывает увеличение степени ненасыщенности внутриклеточных липидов, что в свою очередь приводит к снижению T^* и более эффективной криоконсервации эмбрионов домашних кошек (Окотруб и др., 2022). В настоящей работе мы планируем проверить, как сдвиг в противоположном направлении — в сторону более насыщенных внутриклеточных липидов — будет влиять на T^* и на эффективность криоконсервации эмбрионов домашних кошек.

Целью данного исследования являлось: 1) определить общее содержание и степень ненасыщенности внутриклеточных липидов эмбрионов домашней кошки после культивирования *in vitro* с насыщенной СК; 2) измерить T^* во время охлаждения эмбрионов домашней кошки после воздействия СК; 3) оценить влияние СК на развитие эмбриона *in vitro*; 4) исследовать эффективность криоконсервации эмбрионов домашней кошки после культивирования *in vitro* с СК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

Семенники с эпидидимисами котов, а также яичники кошек получены после плановой орхиэктомии/овариогистерэктомии в центре льготной стерилизации животных г. Новосибирска и доставлены в лабораторию в течение двух часов. Яичники немедленно помещали в среду Collect, т.е. среду M199 (Merck, Германия) с добавлением 20 мМ буфера HEPES (Merck, Германия), 2,2 мМ пирувата натрия (Merck, Германия), 2,2 мМ лактата натрия (Merck, Германия), 3 г/л бычьего сывороточного альбумина — БСА (Merck, Германия) и 50 мкг/мл гентамицина (Синтез АКО, Россия); хранили при 4°C не более четырех часов. Семенники с эпидидимисами немедленно помещали в стерильные сухие пробирки и хранили при 4°C до 24 ч с момента операции. Все исследования соответствовали Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (ETS № 123).

Дозревание ооцитов *in vitro*

Кумулус-ооцитные комплексы (КОК) выделяли из фолликулов яичников взрослых беспородных

кошек ($n = 49$), как описано ранее (Mokrousova *et al.*, 2020б; Окотруб и др., 2022), в подогретую до 38.5°C среду Collect с использованием стереомикроскопа S8 APO (Leica Microsystems, Германия). Ооциты с темной и гомогенной цитоплазмой, окруженные пятью или более слоями клеток кумулюса, промывали для удаления дебриса и отбирали для созревания *in vitro*. Дозревание осуществляли в среде M199 с добавлением 15 мМ бикарбоната натрия (Merck, Германия), 2.2 мМ пирувата натрия, 2.2 мМ лактата натрия, 3 г/л БСА, 50 мкг/мл гентамицина, 2 МЕ/мл гонадотропина сыворотки жеребых кобыл – “Фоллигон” (Intervet, Нидерланды) и 10 МЕ/мл хорионического гонадотропина человека – “Хорулон” (Intervet, Нидерланды). Далее КОКи (по 10–15 на лунку) переносили в 4-луночные планшеты (Nunc, США) с предварительно уравновешенной средой для созревания под минеральным маслом FertiCult Mineral Oil (FertiPro, Бельгия) и помещали в CO_2 -инкубатор New Brunswick™ Galaxy 48R (Eppendorf, Германия) при 38.5°C , 5% CO_2 и влажности 90% на 24 ч.

Получение сперматозоидов и экстракорпоральное оплодотворение

Сперматозоиды были получены из каудальных частей эпидидимисов взрослых беспородных котов ($n = 5$), как описано ранее (Brusentsev *et al.*, 2018). Каудальные части эпидидимисов извлекали, переносили на чашку Петри (Corning, США) в 1000 мкл среды Collect и измельчали при 38.5°C . Образцы эпидидимального семени наносили на верхний мениск среды Isolate Sperm Separation Medium (FUJIFILM Irvine Scientific, США) с градиентом плотности 40: 80% и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 20 мин. Осадок собирали и перемешивали с 1000 мкл среды Collect, центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин для удаления оставшихся коллоидных частиц. Супернатант удаляли, а осадок со сперматозоидами использовали для экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Концентрацию сперматозоидов и их подвижность определяли в счетной камере Маклера – Makler Chamber (Origio, Дания). Созревшие ооциты переносили в 4-луночные планшеты с предварительно уравновешенной средой Ham’s F-10 (Merck, Германия) с добавлением 5% фетальной телячьей сыворотки (Merck, Германия) и 50 мкг/мл гентамицина под минеральным маслом FertiCult Mineral Oil (FertiPro, Бельгия). Суспензию сперматозоидов с концентрацией $1 \cdot 10^6$ подвижных сперматозоидов/мл добавляли к 10–15 ооцитам в лунку планшета объемом 500 мкл и инкубировали в CO_2 -инкубаторе New Brunswick™ Galaxy 48R (Eppendorf, Германия) при 38.5°C , 5% CO_2 и влажности 90% в течение 21 ч.

Приготовление раствора стеариновой кислоты

Раствор стеариновой кислоты готовили в соответствии с опубликованным ранее протоколом (Ranneva *et al.*, 2020) с небольшими модификациями. Смешивали 0.01 М СК (Merck, Германия) с 0.01 М гидроксидом калия (“ХимМед”, Россия) на водяной бане при 90°C в течение 60 мин с последующей гомогенизацией ультразвуком (60 мин) на Sonicator Q700 (Qsonica, США) с получением 0.01 М раствора стеарата калия. Сеансы нагревания и гомогенизации ультразвуком чередовали несколько раз в течение 5–6 ч до достижения необходимой консистенции мыльного раствора. Полученный раствор инкубировали с 3.3 мМ БСА (свободного от ЖК) с получением 5 мМ раствора СК-БСА в соотношении 3: 1. Приготовленную смесь добавляли в культуральную среду до конечной концентрации 400 мкМ.

Культивирование эмбрионов in vitro

Дизайн эксперимента представлен графически на рис. 1.

Двухклеточные эмбрионы, полученные после ЭКО, были случайным образом распределены между двумя группами: контрольной ($n = 48$) и экспериментальной (СК; $n = 46$). Культивирование проводили в 20 мкл среды CSCM–C (FUJIFILM Irvine Scientific, США) с добавлением 400 мкМ СК (СК-группа) и без нее (контроль) в CO_2 -инкубаторе Galaxy 48R (Eppendorf, Германия) при 38.5°C , 5% CO_2 и влажности 90% в течение 66 ч. Сразу после этого периода культивирования *in vitro* 17 и 19 эмбрионов (из контрольной и СК-группы соответственно) фиксировали в 400 мкл 4%-го параформальдегида (“ХимМед”, Россия), pH 7.4–7.6, разведенного в фосфатно-солевом буфере – PBS (“Росмедбио”, Россия), с предварительной отмывкой в трех каплях PBS (по 3 мин в каждой капле). Развитие эмбрионов оценивали с помощью окрашивания DAPI с последующей флуоресцентной микроскопией. После культивирования *in vitro* в течение 66 ч с СК ($n = 8$) или без нее ($n = 11$) в эмбрионах оценивали общее содержание липидов с помощью окрашивания нильским красным (Nile Red) и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ). Восемь эмбрионов (пять из контрольной и три из СК-группы) использовали для изучения степени ненасыщенности липидов и T^* с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния света (КРС).

Эмбрионы как в контрольной группе ($n = 18$), так и в СК-группе ($n = 13$) после 66 ч культивирования *in vitro* замораживали, затем оттаивали, культивировали в течение дополнительных 30 ч и фиксировали, как описано выше. Общее время культивирования этих эмбрионов составило 96 ч.

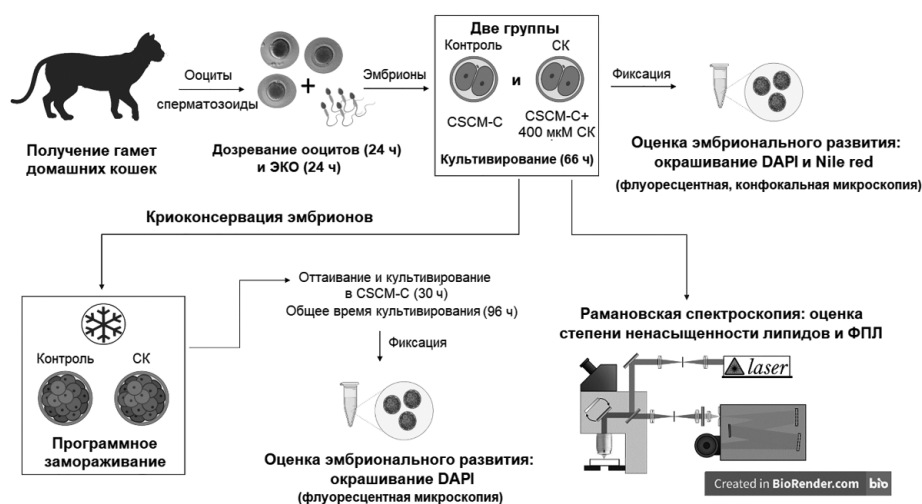


Рис. 1. Дизайн эксперимента. ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение; ФПЛ – фазовый переход липидов.

Развитие эмбрионов до и после криоконсервации оценивали с помощью окрашивания DAPI с последующей флуоресцентной микроскопией.

Криоконсервация эмбрионов

Для программного замораживания эмбрионов использовали раствор криопротектора, содержащий 10% пропиленгликоля – ПГ (“ХимМед”, Россия) в среде Collect. Эмбрионы как контрольной, так и СК-группы переносили в среду Collect на 5 мин, после чего переносили в раствор криопротектора, разбавленный средой Collect в соотношении 1:1 на 5 мин; затем в неразбавленный раствор криопротектора еще на 5 мин, после чего помещали в 0.25-мл пластиковую соломинку (CryoBioSystem, Франция). Все эти процедуры уравнивания проводили при комнатной температуре. Соломинку с эмбрионами помещали в программный замораживатель CL-8800 (CryoLogic, Австралия) при 0°C, охлаждали со скоростью 2°C/мин до –8°C и выдерживали в течение 5 мин. В этот период прикасались к верхней части соломинки (под пыжом и к верхнему мениску второго сектора) предварительно охлажденным в жидком азоте (LN₂) пинцетом для инициации кристаллизации льда. Затем охлаждение возобновляли со скоростью 0.3°C/мин до –40°C, после чего со скоростью 6°C/мин до –80°C. После этого соломинки с эмбрионами помещали в LN₂. Для оттаивания соломинки извлекали из LN₂, выдерживали на воздухе при комнатной температуре в течение 40 с, а затем в течение 40 с на водяной бане при 30°C, как описано ранее (Renard, Babinet, 1984). Эмбрионы отмывали от криопротектора, перенося их между каплями растворов с разным соотношением 10% ПГ и 1М сахарозы (“ХимМед”,

Россия) на основе среды Collect (по шесть минут в каждой капле): 1) 40 мкл 10% ПГ и 20 мкл 1 М сахарозы, 2) 40 мкл 10% ПГ, 20 мкл 1 М сахарозы и 30 мкл Collect, 3) 20 мкл 1 М сахарозы и 60 мкл Collect, 4) 50 мкл Collect.

Окрашивание эмбрионов DAPI и флуоресцентная микроскопия

Фиксированные эмбрионы трижды отмывали от параформальдегида при комнатной температуре в PBS с добавлением 1 мг/мл поливинилпирролидона – ПВП (Merck, Германия) в течение 5 мин, а затем инкубировали с 2 мг/мл DAPI в течение 5 мин. После этого эмбрионы снова отмывали и переносили на предметные стекла (“МиниМед”, Россия). Образцы оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Imager.M2 (Carl Zeiss, Германия) с фильтром, подходящим для окрашивания DAPI, камеры AxioCam 506 mono (Carl Zeiss, Германия) и программы ImageJ (США). Работу проводили в Центре коллективного пользования SPF-вивария Института цитологии и генетики – ИЦиГ СО РАН (<http://spf.bionet.nsc.ru>).

Для каждого эмбриона подсчитывали число интерфазных ядер (ИЯ), фрагментированных ядер (ФЯ) и общее число ядер (ОЯ), т.е. сумму ИЯ, ФЯ и митозов. Индекс фрагментации (ИФ) оценивали как долю ядерных фрагментов к общему числу ядер. По общему числу ядер (Roth *et al.*, 1994; Swanson *et al.*, 1994; Mokrousova *et al.*, 20206) эмбрионы были разделены на следующие группы: неразвивающиеся, остановившиеся в своем развитии (менее 8 ядер), эмбрионы на стадии дробления (9–16 ядер), ранние морулы (17–50 ядер) и поздние морулы (более 50 ядер).

*Окрашивание нильским красным
и конфокальная микроскопия*

Оценку изменений внутриклеточного содержания липидов у эмбрионов домашней кошки через 66 ч культивирования *in vitro* с СК и в контроле (без СК) проводили с использованием флуорохрома нильского красного — Nile Red (Merck, Германия) с последующей КЛСМ, как описано ранее (Genicot *et al.*, 2005; Igonina *et al.*, 2021; Окотруб и др., 2022). Фиксированные эмбрионы трижды отмывали от параформальдегида в PBS, содержащем 1 мг/мл ПВП, по 5 мин в каждой капле при комнатной температуре. Исходный раствор нильского красного (1 мг/мл) готовили при помощи разбавления красителя в диметилсульфоксиде (“ХимМед”, Россия) и разбавляли до рабочей концентрации 10 мкг/мл перед исследованием. Эмбрионы инкубировали в рабочем растворе в течение трех часов при 37°C для достижения максимальной интенсивности окрашивания внутриклеточных липидов, как описано ранее (Genicot *et al.*, 2005). Образцы помещали на предметные стекла (Thermo Fisher Scientific, США) в PBS. Изображения получали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 NLO Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием программного обеспечения Zen 2012 Black Edition (Carl Zeiss, Германия). Эмбрионы, окрашенные нильским красным, облучали аргоновым газовым лазером с длиной волны 488 нм (максимальная мощность 30 мВт) при 0.1% максимальной мощности, которая оставалась постоянной во время процедуры. Спектры получали в диапазоне длин волн 494–687 нм с шагом 9 нм. Изображения получали с помощью 32-канального фотоумножителя с использованием режима сканирования Z-stack и Lambda. Все изображения получали в режиме подсчета фотонов (photon counting), подсчитывали сумму всех фотонов со ста оптических срезов на каждый эмбрион. Суммирование оптических срезов и вычитание фоновой флуоресценции выполняли с помощью программы ImageJ. Работу проводили в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН (<https://ckp.icgen.ru/ckpmabo>).

Спектроскопия комбинационного рассеяния света

Спектроскопию КРС проводили на экспериментальной установке, состоящей из прямого микроскопа Orthoplan (Leitz, Германия), оснащенного сканирующим пьезопозиционером PXY-200 (Newport, США) и монохроматором SP2500i (Princeton Instruments, США), снабженным зарядным устройством, сопряженным с инструментальным детектором Spec-10:2K/LN (Princeton Instruments, США). Оптический криостат THMS350V (Linkam Scientific, Великобритания)

использовали для проведения измерений КРС при разных температурах. Источником монохроматического излучения для возбуждения комбинационного рассеяния света служил твердотельный лазер Excelsior (Spectra-Physics, США) с длиной волны 532.1 нм. Фокусировку лазерного луча в пятно диаметром ~1 мкм осуществляли с помощью $\times 60$ объектива CFI Plan Fluor 60XC (Nikon Instruments, Япония) с числовой апертурой 0.85. Мощность облучения после объектива составляла 20 мВт. Спектральное разрешение экспериментальной установки составляло 2.5 см^{-1} . Длины волн всех измеренных спектров калибровали с помощью неоновой газоразрядной лампы. Спектры комбинационного рассеяния света измеряли в диапазоне от 800 до 3200 см^{-1} .

Оценка вклада и степени ненасыщенности липидов

Пять контрольных и три эмбриона СК-группы, культивированных в течение 66 ч, исследовали методом спектроскопии комбинационного рассеяния света. Для изучения внутриклеточных липидов было исследовано 100 спектров комбинационного рассеяния от разных случайно выбранных локальных областей внутри эмбрионов. Из полученного набора данных, используя метод главных компонент, был извлечен вклад липидов. Поскольку наиболее интенсивный сигнал комбинационного рассеяния света исходит от липидных гранул, мы предполагаем, что полученная спектральная составляющая липидов в основном связана именно с ними. Метод выделения вклада липидов в спектры комбинационного рассеяния света был описан в нашей более ранней работе (Igonina *et al.*, 2021). Его принцип следующий: чтобы извлечь вклад липидов, мы уменьшили размерность данных КРС до трех основных главных компонент, связанных с вариацией в спектрах трех основных типов соединений: липидов, белков и воды, которые дают наиболее интенсивный вклад в измеряемые спектры. Затем подбирали такую линейную комбинацию этих компонент, чтобы результирующий спектр был свободен от пика фенилаланина при 1004 см^{-1} и полосы валентных колебаний ОН-группы воды на частотах выше 3050 см^{-1} . Поскольку в спектре комбинационного рассеяния света липидов отсутствуют линии на этих частотах, полученная комбинация главных компонент будет отражать липидный вклад в измеряемые спектры. Для оценки степени ненасыщенности липидов использовали соотношение интенсивностей линии валентных колебаний связей $\text{C}=\text{C}$ при 1657 см^{-1} к линии ножничных деформационных колебаний CH_2 (δCH). Интенсивность первой линии увеличивается с увеличением числа двойных связей $\text{C}=\text{C}$, интенсивность второй линии увеличивается с увеличением числа метиленовых групп. Для

характеристики ненасыщенности были использованы спектры комбинационного рассеяния, измеренные при $T = 25^\circ\text{C}$.

Измерение температуры начала фазового перехода липидов при охлаждении эмбрионов

Для изучения зависимости фазового состояния липидов от температуры эмбрионы помещали в раствор EmbryoMax KSOM (Merck, Германия) с добавлением 0.2 М сахарозы и 1.5 М ПГ. Охлаждение проводили до -7°C со скоростью $1^\circ\text{C}/\text{мин}$, затем инициировали образование льда, делали 10-минутную паузу для перекристаллизации льда. После этого образец охлаждали со скоростью $0.3^\circ\text{C}/\text{мин}$. При охлаждении делали дополнительные паузы ~20 мин для измерения спектров КРС. За изменением фазового состояния липидов следили по соотношению интенсивностей антисимметричных (aCH) и симметричных (sCH) валентных колебаний CH_2 при 2880 и 2850 см^{-1} соответственно. Эта особенность в спектрах КРС отражает изменение конформационного состояния липидов, происходящее при фазовом переходе. Поскольку фазовый переход уширен, отслеживали температуру начала фазового перехода (T^*), т.е. температуру, при которой появляется пик (Okotrub *et al.*, 2018). Предварительная обработка данных включала коррекцию всплесков интенсивности в измеренных спектрах и вычитание фона по линейной функции. Спектры анализировали и обрабатывали, как описано ранее (Okotrub *et al.*, 2018; Igonina *et al.*, 2021).

Статистический анализ

Данные проверяли на нормальное распределение с помощью критерия Шапиро – Уилка и анализировали с помощью стандартного пакета программ STATISTICA v 8.0 (StatSoft Inc., США). Группы с нормальным распределением сравнивали по t-критерию Стьюдента, в противном случае по U-критерию Манна – Уитни. Такие параметры, как доля эмбрионов на разных стадиях развития до и после замораживания, сравнивали с помощью критерия хи-квадрат. Данные по индексу фрагментации ядер до криоконсервации, числу клеток в морулах и бластоцистах до и после криоконсервации, степени ненасыщенности липидов и температуры начала фазового перехода липидов представляли в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего ($M \pm \text{SEM}$). Различия по этим параметрам между группами сравнивали с помощью t-критерия Стьюдента. Данные по индексу фрагментации ядер после криоконсервации и интенсивности флуоресценции липидов (по числу фотонов) представлены в виде медианы и 25–75%-х квартилей – Me [Q1; Q3]. В этих случаях сравнения проводили по U-критерию Манна – Уитни. Различия при

$p < 0.05$ считали статистически значимыми. Для создания графиков использовали пакеты OriginPro (OriginLab Corporation, США) и Biorender (<https://www.biorender.com>).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культивирование эмбрионов in vitro с добавлением стеариновой кислоты

Добавление в культуральную среду 400 мкМ СК не влияло ни на скорость развития эмбрионов, ни на индекс фрагментации ядер (табл. 1).

Статистический анализ не выявил достоверных различий по числу интерфазных ядер в эмбрионах через 66 ч культивирования *in vitro* между СК-группой и контролем (табл. 2, рис. 2).

Анализ фазового перехода липидов и степени их ненасыщенности

Влияние СК на степень ненасыщенности липидов и T^* показано на рис. 3.

Степень ненасыщенности внутриклеточных липидов составила $I_{\text{C=C}}/I_{\text{CH}} = 0.96 \pm 0.03$, а $T^* = 1.6 \pm 0.8^\circ\text{C}$ для эмбрионов, культивируемых без ЖК. Добавление 400 мкМ СК в культуральную среду приводило к достоверному снижению ($p < 0.05$) степени ненасыщенности липидов ($I_{\text{C=C}}/I_{\text{CH}} = 0.74 \pm 0.07$) по сравнению с контролем; и достоверному увеличению T^* ($p < 0.001$) более чем на 20°C по сравнению с контролем. Измерения спектров проводили при температуре 25°C и ниже. Точное значение T^* не оценивали, поскольку даже при комнатной температуре фракция липидов

Таблица 1. Влияние стеариновой кислоты (СК) при культивировании *in vitro* на развитие эмбрионов домашней кошки (*Felis silvestris catus*) и фрагментацию ядер до криоконсервации

Параметры	Группы ¹	
	Контроль	СК
Число эмбрионов	17	19
Неразвивающиеся (%)	0 (0)	1 (5.3)
Дробящиеся (%)	1 (5.9)	0 (0)
Ранние морулы (%)	13 (76.5)	15 (78.9)
Поздние морулы (%)	3 (17.6)	3 (15.8)
ИФ ²	5.6 ± 1.3	6.9 ± 1.5

Примечание. ¹Общее число использованных самок – 49. Число повторов – пять. Эмбрионы были случайным образом распределены между группами.

²Данные по индексу фрагментации (ИФ) представлены в виде $M \pm \text{SEM}$ для эмбрионов контрольной и СК-группы ($n = 16$ и $n = 18$ соответственно).

Таблица 2. Влияние стеариновой кислоты (СК) при культивировании *in vitro* на развитие эмбрионов домашней кошки (*Felis silvestris catus*) до и после криоконсервации

Группы	Число ядер до криоконсервации, культивирование <i>in vitro</i> – 66 ч					
	Ранние морулы			Поздние морулы		
	Число эмбрионов	ОЯ	ИЯ	Число эмбрионов	ОЯ	ИЯ
Контроль	13	38.2 ± 2.4	35.0 ± 2.5	3	62.0 ± 3.5	56.7 ± 3.8
СК	15	36.1 ± 2.2	33.1 ± 2.3	3	66.0 ± 6.0	59.7 ± 3.3
Число ядер после криоконсервации, культивирование <i>in vitro</i> – 96 ч						
Контроль	4	38.8 ± 4.1	22.3 ± 9.1	13	80.6 ± 3.5	58.9 ± 5.1
СК	8	36.5 ± 4.0	2.5 ± 1.4*	4	54.3 ± 0.8**	3.5 ± 1.3***

Примечание. Данные представлены как М ± SEM.
ОЯ – общее число ядер; ИЯ – интерфазные ядра.
p* < 0.05; *p* < 0.01; ****p* < 0.001 по сравнению с контролем.

находилась в конформационно-упорядоченном состоянии. Таким образом, воздействие СК на эмбрионы кошек *in vitro* снижало степень ненасыщенности липидов и повышало *T**.

Оценка содержания внутриклеточных липидов

Культивирование *in vitro* в течение 66 ч с добавлением в питательную среду 400 мкМ СК не влияло на общее количество липидов в эмбрионах домашних кошек (рис. 4).
Интенсивность флуоресценции, измеренная как число фотонов, не отличалась между контрольной – $6.4 \cdot 10^6$ [$5.5 \cdot 10^6$; $7.3 \cdot 10^6$] и СК-группой – $5.6 \cdot 10^6$ [$5.2 \cdot 10^6$; $6.1 \cdot 10^6$].

Жизнеспособность эмбрионов после криоконсервации

Добавление в питательную среду 400 мкМ СК оказывало влияние (*p* < 0.05) на развитие эмбрионов после их криоконсервации и дополнительного культивирования *in vitro* в течение 30 ч (табл. 2, 3). Доля ранних морул была выше (*p* < 0.05), тогда как доля эмбрионов на стадии поздних морул была ниже (*p* < 0.05) в СК-группе по сравнению с контролем, что свидетельствует об угнетающем влиянии СК на развитие эмбрионов. Общее число ядер в ранних морулах этих групп не различалось (табл. 2). Однако число интерфазных ядер в ранних морулах СК-группы было меньше (*p* < 0.05) по сравнению с контролем (табл. 2). Общее число ядер (*p* < 0.01), а также число интерфазных ядер (*p* < 0.001) в поздних морулах СК-группы было меньше, чем в контроле (табл. 2, рис. 5).
Кроме того, большинство ядер (97.7%) были фрагментированы в СК-группе, а индекс фрагментации был значительно выше (*p* < 0.001) в этой группе по сравнению с контролем (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании было измерено общее количество внутриклеточных липидов в эмбрионах домашних кошек, однако различий между контрольной и СК-группой установлено не было. В нашей предыдущей работе, как и в данном исследовании, нами не было обнаружено изменений общего количества внутриклеточных липидов в эмбрионах домашних кошек после их культивирования *in vitro* с добавлением другой жирной кислоты, а именно ненасыщенной линолевой кислоты (Окотруб и др., 2022). Ранее другими авторами было показано, что содержание нейтральных липидов в ооцитах мышей было выше после витрификации и отогрева с применением среды, содержащей 1% липидный концентрат, в который входила СК (Ohata *et al.*, 2021). Мы предполагаем, что наблюдаемое в нашем исследовании отсутствие различий по общему количеству внутриклеточных липидов в преимплантационных эмбрионах домашней кошки после воздействия *in vitro* СК может быть вызвано изначально высоким содержанием липидов в ооцитах и эмбрионах данного вида млекопитающих (Galiguis *et al.*, 2014; Amstislavsky *et al.*, 2019). Непрозрачность эмбрионов, связанная с интенсивным рассеянием света на липидных гранулах, затрудняет объемную интеграцию флуоресцентного сигнала после окрашивания нильским красным, в отличие от гораздо более прозрачных эмбрионов мыши, содержащих меньше внутриклеточных липидов (Amstislavsky *et al.*, 2019; Igonina *et al.*, 2021). Между тем воздействие *in vitro* в дозе 25 мкМ СК на преимплантационные эмбрионы крупного рогатого скота в течение пяти дней приводило к снижению общего количества внутриклеточных липидов (Aardema *et al.*, 2022). Следует отметить, что в данном исследовании на крупном рогатом скоте использовали окрашивание флуорохромом LD540,

тогда как в нашем исследовании эмбрионов кошек мы использовали нильский красный. Эти методические различия, а также видовая специфика могли быть причиной того, что выводы, полученные в нашей работе и в исследовании Аардерма с соавторами (Aardema *et al.*, 2022), различаются.

Несмотря на то что в настоящем исследовании мы не обнаружили изменений по общему количеству внутриклеточных липидов после воздействия СК *in vitro*, были выявлены изменения в степени их ненасыщенности и T^* , что свидетельствует о проникновении СК в клетки преимплантационных эмбрионов домашней кошки. Полученные в данной работе результаты хорошо согласуются с нашим предыдущим исследованием, в котором было показано, что воздействие на ооциты домашней кошки в дозах 50–400 мкМ СК в течение 23–45 ч их созревания *in vitro* было достаточным для насыщения клеток данной ЖК (Ranneva *et al.*, 2020). При этом молекулы СК проникли во все липидные гранулы клеток. Интересно отметить, что насыщенная СК снижала степень ненасыщенности внутриклеточных липидов эмбрионов кошки, а воздействие ненасыщенной ЛК в аналогичных условиях приводило к обратному эффекту (Око-труб и др., 2022).

В настоящем исследовании при использовании СК в дозе 400 мкМ не было обнаружено ее влияния на скорость развития эмбриона, число blastomeres и индекс фрагментации ядер при культивировании *in vitro* без криоконсервации. Мы полагаем, что доза, использованная в нашем исследовании, а также продолжительность воздействия кислоты являются оптимальными для эмбрионов домашних кошек, и это послужило причиной того, что скорость развития *in vitro* эмбрионов до криоконсервации не снижалась, несмотря на признаки проникновения СК внутрь клеток. В других работах оценивали влияние СК на скорость развития эмбрионов разных видов млекопитающих (Nonogaki *et al.*, 1994; Van Hoesck *et al.*, 2011; Pawlak *et al.*, 2020; Aardema *et al.*, 2022). По литературным данным, СК в дозе 75 мкМ подавляла развитие *in vitro* эмбрионов крупного рогатого скота; в частности, было обнаружено меньше клеток в blastocysts и повышение в них уровня апоптоза (Van Hoesck *et al.*, 2011), хотя дозировка 25 мкМ не вызвала подобных изменений (Aardema *et al.*, 2022). У мышей при использовании доз 200–300 мкМ темпы развития эмбрионов *in vitro* существенно замедлялись (Nonogaki *et al.*, 1994). Было показано, что воздействие на ооциты свиньи 150 мкМ СК во время созревания *in vitro* не влияет на последующее развитие полученных из них эмбрионов (Pawlak *et al.*, 2020). В совокупности эти исследования показывают, что СК по-разному влияет на развитие эмбрионов разных видов млекопитающих, эффекты её воздействия зависят от используемой

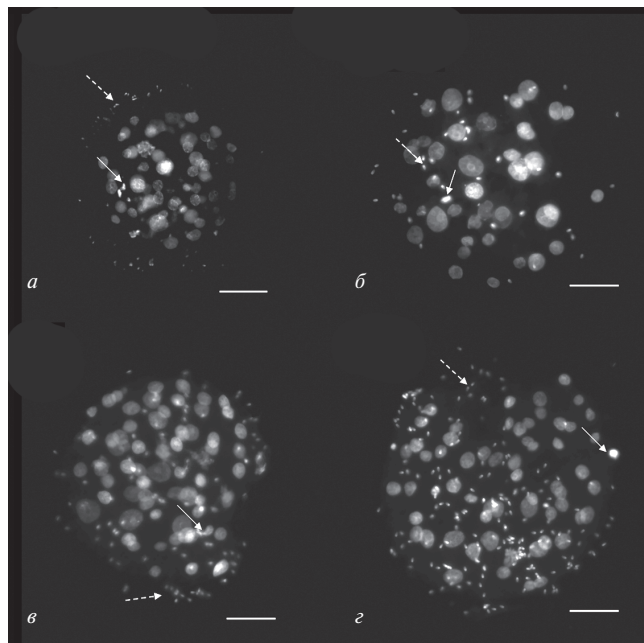


Рис. 2. Стадии развития эмбрионов домашней кошки (*Felis silvestris catus*) после 66 ч культивирования *in vitro* без (а, в) или со стеариновой кислотой –СК (г, д): ранние морулы (а, б) и поздние морулы (г, д); окрашивание DAPI и флуоресцентная микроскопия. Белые стрелки – фрагментации, стрелки пунктиром – сперматозоиды. Шкала – 50 мкм.

дозы и видовой специфики исследуемого объекта (Nonogaki *et al.*, 1994; Van Hoesck *et al.*, 2011; Pawlak *et al.*, 2020; Aardema *et al.*, 2022).

В нашем исследовании установлено, что T^* у эмбрионов после воздействия СК достоверно увеличивается. Это наблюдение находится в полном соответствии с гипотезой о том, что не только общее количество внутриклеточных липидов, но и их качественный состав может быть одним из ключевых факторов, влияющих на криоустойчивость ооцитов и преимплантационных эмбрионов (Amstislavsky *et al.*, 2019). Ранее было показано, что качественный и количественный состав ЖК в ооцитах и преимплантационных эмбрионах специфичен для разных видов млекопитающих (Amstislavsky *et al.*, 2019). Более того, в исследовании на людях было показано, что ооциты и эмбрионы высокого качества содержат больше ненасыщенных ЖК и меньше насыщенных ЖК по сравнению с ооцитами и эмбрионами более низкого качества (Haggarty *et al.*, 2006). Настоящее исследование показывает, что воздействие СК во время культивирования *in vitro* изменяет состав внутриклеточных липидов в сторону их большей насыщенности, что может повлиять на эффективность криоконсервации эмбрионов. Этот результат хорошо согласуется с нашими недавно опубликованными

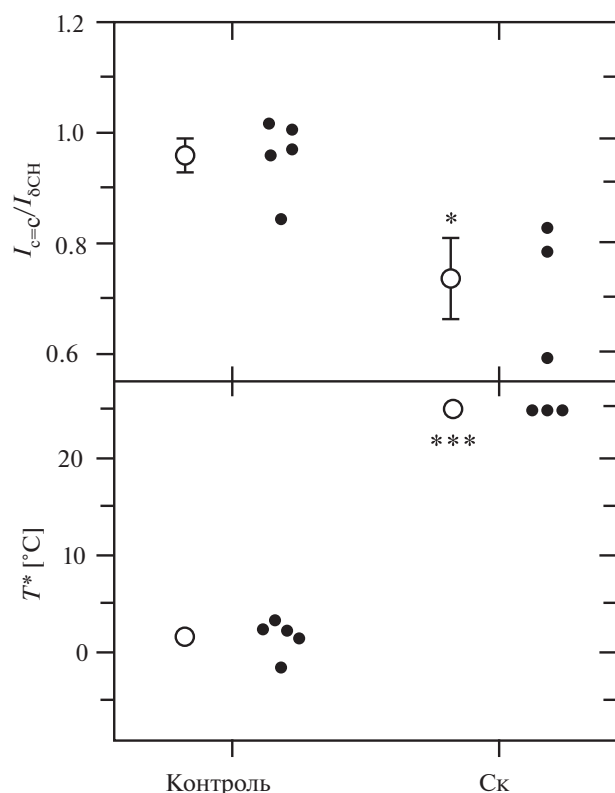


Рис. 3. Влияние стеариновой кислоты (СК) на степень ненасыщенности липидов (вверху) и T^* (внизу) в клетках преимплантационных эмбрионов домашней кошки (*Felis silvestris catus*). Данные представлены как $M \pm SEM$. Каждая точка соответствует одному эмбриону. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ по сравнению с контролем.

наблюдениями о более высокой степени ненасыщенности внутриклеточных липидов и улучшении эффективности криоконсервации эмбрионов домашних кошек после обратного воздействия — их культивирования *in vitro* с ненасыщенной ЛК (Окотруб и др., 2022).

В нашем исследовании СК действительно негативно повлияла на эффективность криоконсервации эмбрионов домашней кошки. Данный результат согласуется с более ранней работой, в которой показано, что созревание *in vitro* ооцитов крупного рогатого скота с добавлением СК и последующее их оплодотворение приводило к получению blastocysts низкого качества с повышенной криочувствительностью (Shehab-El-Deen *et al.*, 2009). В более поздней работе подтвердили, что культивирование *in vitro* эмбрионов крупного рогатого скота в течение пяти дней в среде с добавлением СК также значительно снижало их криоустойчивость (Aardema *et al.*, 2022). Одним из признаков разрушения эмбриона является наличие ядерных фрагментов, которые обусловлены клеточным

апоптозом (Cecchele *et al.*, 2022). В нашем исследовании индекс фрагментации ядер эмбрионов, подвергшихся воздействию СК в процессе культивирования *in vitro*, был значительно выше по сравнению с контролем после криоконсервации. Наблюдали практически полную гибель всех оттаянных эмбрионов, культивированных *in vitro* в присутствии СК в течение 66 ч до криоконсервации. Такой негативный эффект можно объяснить тем, что после накопления эмбриональными клетками насыщенных ЖК значительно возрастает T^* . Высокая температура начала фазового перехода внутриклеточных липидов рассматривается как фактор повреждения клеток при их охлаждении ниже физиологического оптимума, но выше точки заморозания (Zeron *et al.*, 2002; Amstislavsky *et al.*, 2019). Согласно данным, полученным с помощью спектроскопии КРС, в процессе замораживания насыщенные ЖК в упорядоченной фазе имеют тенденцию распределяться на периферии липидных гранул (Okotrub *et al.*, 2021). Гипотетически избыточное распределение упорядоченных липидов вблизи поверхности ЛГ может влиять на фазовое состояние и функциональные свойства поверхностного монослоя, окружающего ядро ЛГ, поскольку ненасыщенные липиды остаются заключенными в центре данных структур и не имеют доступа к периферии (Okotrub *et al.*, 2021). Более того, после оттаивания клеток до физиологических температур некоторые насыщенные липиды остаются в упорядоченном конформационном состоянии (Okotrub *et al.*, 2021), что, вероятно, оказывает пагубное влияние на дальнейшее развитие эмбрионов. Если предположить, что в норме при физиологических температурах внутриклеточные липиды должны находиться в неупорядоченном фазовом состоянии для участия в биологических процессах, то молекулы в упорядоченном конформационном состоянии в физиологических условиях могут эти процессы нарушать.

Возможно, воздействие ЖК *in vitro* также может влиять на преимплантационные эмбрионы через эпигенетические механизмы. Существует предположение, что воздействие различных ЖК *in vitro* может влиять на уровень экспрессии генов и метилирования ДНК в ооцитах, в клетках кумулюса и преимплантационных эмбрионов (Desmet *et al.*, 2016; Barrera *et al.*, 2018; Pawlak *et al.*, 2020; Ohata *et al.*, 2021). В частности, культивирование *in vitro* эмбрионов в среде с добавлением смеси 425 мкМ неэтерифицированных ЖК, содержащей 75 мкМ СК, 150 мкМ ПК и 200 мкМ ОК, приводило к изменению метилирования ДНК в клетках 7.5-дневных blastocysts крупного рогатого скота (Desmet *et al.*, 2016). Использование раствора для отогрева, содержащего 1% липидный концентрат, в том числе СК, приводило к повышению экспрессии генов *Acaa2* и *Hadha* у эмбрионов мышей (Ohata *et al.*, 2021).

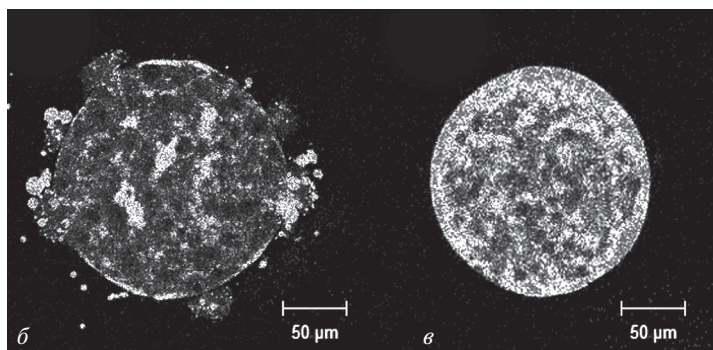
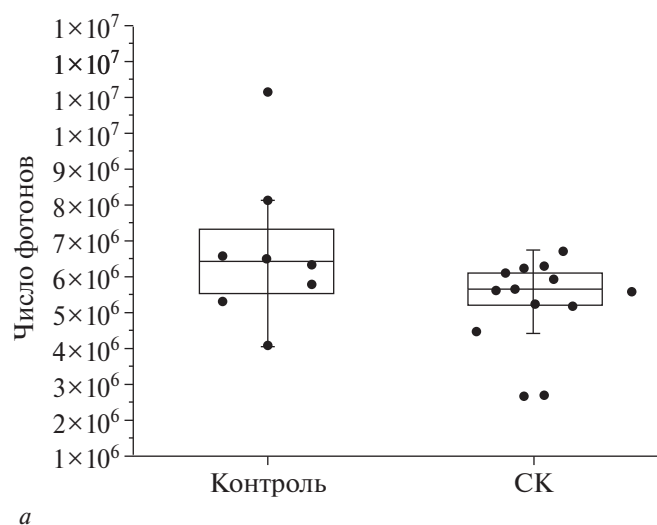


Рис. 4. Интенсивность флуоресценции эмбрионов домашней кошки (*Felis silvestris catus*), окрашенных нильским красным, через 66 ч культивирования *in vitro* без и со стеариновой кислотой (СК). а – число фотонов (Me [Q1; Q3]), каждая точка соответствует одному эмбриону; б, в – репрезентативные оптические срезы КЛСМ эмбрионов домашней кошки, окрашенных нильским красным. б – без СК; в – с СК. Шкала – 50 мкм.

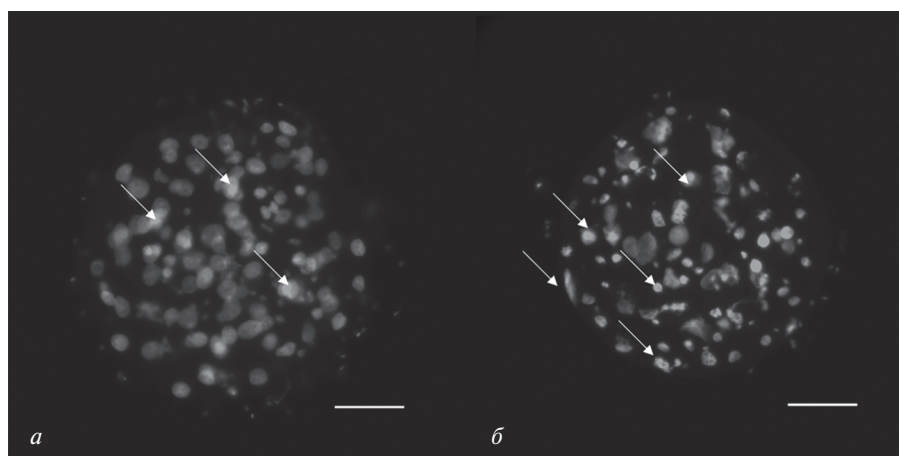


Рис. 5. Поздние морулы домашней кошки (*Felis silvestris catus*) после замораживания-оттаивания и последующего культивирования *in vitro* в течение 30 ч (общее время – 96 ч): контрольная (а) и СК (б) группы; окрашивание DAPI. Стрелки указывают на фрагментированные ядра. Шкала – 50 мкм.

Таблица 3. Влияние стеариновой кислоты (СК) при культивировании *in vitro* на развитие эмбрионов домашней кошки (*Felis silvestris catus*) и фрагментацию ядер после криоконсервации

Параметры	Группы ¹	
	Контроль	СК
Число эмбрионов	18	13
Неразвивающиеся (%)	1 (5.6)	0 (0)
Дробящиеся (%)	0 (0)	1 (7.7)
Морулы (%)	4 (22.2)	8 (61.5)*
Поздние морулы (%)	13 (72)	4 (30.7)*
ИФ ²	23.8 [12; 42.9]	97.7 [90.6; 100]***

Примечание. ¹Общее число использованных самок – 49. Число повторов – пять. Эмбрионы были случайным образом распределены между группами.
²Данные по индексу фрагментации (ИФ) представлены в виде Ме [Q1; Q3] для эмбрионов контрольной и СК-группы (n = 17 и n = 12 соответственно).
p* < 0.05; **p* < 0.001 по сравнению с контролем.

Кроме того, в ооцитах овец, которые дозревали *in vitro* в среде с добавлением делипидированной сыворотки и затем витрифицировали, наблюдали повышенную экспрессию маркеров стресса эндоплазматического ретикулума: генов *Atf4*, *Atf6*, *Grp78* и *Chop10*; эти изменения могут влиять и на метаболизм липидов (Barrera *et al.*, 2018). Экспрессия генов *Acaca*, *Scd*, *Plin2*, *Fads1* и *Fads2* повышалась в кумулюсных клетках и ооцитах свињи после воздействия ЖК (Pawlak *et al.*, 2020). Можно предположить, что воздействие СК на преимплантационные эмбрионы кошек *in vitro* вызывает изменения в экспрессии генов, связанных с криочувствительностью клеток, что может приводить к низкой криоустойчивости эмбрионов после воздействия СК.

Ранее с помощью спектроскопии КРС было установлено, что добавление ненасыщенной ЛК в культуральную среду приводит к увеличению степени ненасыщенности липидов в преимплантационных эмбрионах домашней кошки (Окотруб и др., 2022). Эти изменения приводили к снижению *T**, что положительно отражалось на криоустойчивости эмбрионов (Окотруб и др., 2022). Напротив, как показало представляемое в данной статье исследование, добавление в культуральную среду насыщенной СК приводит к значительному снижению степени ненасыщенности липидов без изменения общего их содержания, что в свою очередь, в полном соответствии с нашей гипотезой, приводит к увеличению *T** и, следовательно, к низкой эффективности криоконсервации эмбрионов. Таким образом, настоящее исследование вместе

с нашим предыдущим результатом (Окотруб и др., 2022) подтверждают гипотезу о том, что степень ненасыщенности внутриклеточных липидов играет важную роль в криочувствительности эмбрионов домашних кошек.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наши результаты свидетельствуют о том, что культивирование *in vitro* эмбрионов домашней кошки с добавлением стеариновой кислоты привело к уменьшению степени ненасыщенности внутриклеточных липидов, но не повлияло на их общее количество и скорость развития эмбрионов до криоконсервации. Тем не менее снижение степени ненасыщенности липидов привело к значительному увеличению температуры начала фазового перехода липидов и подавлению последующего развития эмбрионов *in vitro* после криоконсервации. Вместе с нашими более ранними результатами по воздействию *in vitro* ненасыщенной линолевой кислоты на эмбрионы домашних кошек эта работа демонстрирует роль липидного состава в криотолерантности эмбрионов домашней кошки и подтверждает взаимосвязь между *T**, степенью ненасыщенности липидов и эффективностью криоконсервации. Эти результаты важны для выбора способа сохранения генетических ресурсов тех видов млекопитающих, ооциты и эмбрионы которых отличаются высоким содержанием внутриклеточных липидов. Речь идет о некоторых сельскохозяйственных животных, в частности о свиньях, а также о представителях отряда хищных, к которому относятся редкие и исчезающие виды кошачьих.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке РНФ № 21-74-10108 с использованием оборудования ЦКП “Центр генетических ресурсов лабораторных животных” ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62119X0023). Микроскопические работы выполнены в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН.

ЭТИЧЕСКОЕ ОДОБРЕНИЕ

Все исследования проводились в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и другие научные цели (СЭД № 123). Исследование одобрено Комитетом по биоэтике (протокол № 144 от 29 марта 2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Амстиславский С.Я., Мокроусова В.И., Кожевникова В.В., Кизилова Е.А., Брусенцев Е.Ю., Окотруб К.А., Напимеров В.А., Найдено С.В. Криобанк генетических ресурсов кошачьих // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. Т. 21. № 5. С. 561–568.
<https://doi.org/10.18699/10.18699/VJ17.27-o>
- Окотруб С.В., Лебедева Д.А., Окотруб К.А., Чуйко Э.А., Брусенцев Е.Ю., Рахманова Т.А., Амстиславский С.Я. Влияние линолевой кислоты на криоконсервацию полученных путем ЭКО эмбрионов домашней кошки // Онтогенез. 2022. Т. 53. № 5. С. 345–357.
<https://doi.org/10.31857/S0475145022050068>
- Aardema H., Bertijn I., van Tol H., Rijnveld A., Vernooij J., Gadella B.M., Vos P. Fatty acid supplementation during in vitro embryo production determines cryosurvival characteristics of bovine blastocysts // Front. Cell. Dev. Biol. 2022. V. 10. P. 837405.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2022.837405>
- Abe H., Yamashita S., Satoh T., Hoshi H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media // Mol. Reprod. Dev. 2002. V. 61. P. 57–66.
<https://doi.org/10.1002/mrd.1131>
- Amstislavsky S., Mokrousova V., Brusentsev E., Okotrub K., Comizzoli P. Influence of cellular lipids on cryopreservation of mammalian oocytes and preimplantation embryos: a review // Biopreserv. Biobanking. 2019. V. 17. P. 76–83.
<https://doi.org/10.1089/bio.2018.0039>
- Amstislavsky S., Brusentsev E., Kizilova E., Mokrousova V., Kozhevnikova V., Abramova T., Rozhkova I., Naidenko S. Sperm cryopreservation in the Far-Eastern wildcat (*Prionailurus bengalensis euptilurus*) // Reprod. Domest. Anim. 2018. V. 53. P. 1219–1226.
<https://doi.org/10.1111/rda.13230>
- Barrera N., Dos Santos Neto P.C., Cuadro F., Bosolasco D., Mulet A.P., Crispo M., Menchaca A. Impact of delipidated estrous sheep serum supplementation on in vitro maturation, cryotolerance and endoplasmic reticulum stress gene expression of sheep oocytes // PLoS One. 2018. V. 13. e0198742.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198742>
- Borges E., Vireque A. Updating the impact of lipid metabolism modulation and lipidomic profiling on oocyte cryopreservation // EMJ. 2019. V. 4. P. 79–87.
<https://doi.org/10.33590/emj/10310074>
- Brusentsev E., Kizilova E., Mokrousova V., Kozhevnikova V., Rozhkova I., Amstislavsky S. Characteristics and fertility of domestic cat epididymal spermatozoa cryopreserved with two different freezing media // Theriogenology. 2018. V. 110. P. 148–152.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.12.038>
- Cecchele A., Cermisoni G., Giacomini E., Pinna M., Viganò P. Cellular and molecular nature of fragmentation of human embryos // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 1349.
<https://doi.org/10.3390/ijms23031349>
- Crichton E., Bedows E., Miller-Lindholm A., Baldwin D.M., Armstrong D.L., Graham L.H., Ford J.J., Gjørret J.O., Hyttel P., Pope C.E., Vajta G., Loskut-off N.M. Efficacy of porcine gonadotropins for repeated stimulation of ovarian activity for oocyte retrieval and in vitro embryo production and cryopreservation in Siberian tigers (*Panthera tigris altaica*) // Biol. Reprod. 2003. V. 68. P. 105–113.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.101.002204>
- Desmet K.L., van Hoeck V., Gagne D., Fournier E., Thakur A., O'Doherty A.M., Walsh C.P., Sirard M.A., Bols P.E., Leroy J.L. Exposure of bovine oocytes and embryos to elevated non-esterified fatty acid concentrations: integration of epigenetic and transcriptomic signatures in resultant blastocysts // BMC Genomics. 2016. V. 17. P. 1004.
<https://doi.org/10.1186/s12864-016-3366-y>
- Fayezi S., Leroy J., Ghaffari Novin M., Darabi M. Oleic acid in the modulation of oocyte and preimplantation embryo development // Zygote. 2018. V. 26. P. 1–13.
<https://doi.org/10.1017/S0967199417000582>
- Galiguis J., Gomez M., Leibo S., Pope C. Birth of a domestic cat kitten produced by vitrification of lipid polarized in vitro matured oocytes // Cryobiology. 2014. V. 68. P. 459–466.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.02.012>
- Genicot G., Leroy J., van Soom A., Donnay I. The use of a fluorescent dye Nile red to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes // Theriogenology. 2005. V. 63. P. 1181–1194.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2004.00556.x>
- Haggarty P., Wood M., Ferguson E., Hoad G., Srikantharajah A., Milne E., Hamilton M., Bhattacharya S. Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos // Hum. Reprod. 2006. V. 21. P. 766–773.
<https://doi.org/10.1093/humrep/dei385>
- Idrissi S., Bourhis D., Lefevre A., Emond P., Le Berre L., Desnoes O., Joly T., Buff S., Maillard V., Schibler L., Salvetti P., Elis S. Lipid profile of bovine grade-1 blastocysts produced either in vivo or in vitro before and after slow freezing process // Sci. Rep. 2021. V. 11. P. 11618.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-90870-8>
- Igonina T., Okotrub K., Brusentsev E., Chuyko E.A., Ragayeva D.S., Ranneva S.V., Amstislavsky S.Y. Alteration of the lipid phase transition during mouse embryos freezing after in vitro culture with linoleic acid // Cryobiology. 2021. V. 99. P. 55–63.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.01.014>
- IUCN Red List of Threatened Species // IUCN. 2021. [Электронный ресурс]. <https://www.iucnredlist.org/search?taxonomies=101738&searchType=species>
- Kochan J., Nowak A., Młodawska W., Prochowska S., Partyka A., Skotnicki J., Nizanski W. Comparison of the morphology and developmental potential of oocytes

- obtained from prepubertal and adult domestic and wild cats // *Animals*. 2021. V. 11. P. 20.
<https://doi.org/10.3390/ani11010020>
- Karasahin T. The effect of oleic and linoleic acid addition to the culture media on bovine embryonic development following vitrification // *Pol. J. Vet. Sci.* 2019. V. 22. P. 661–666.
<https://doi.org/10.24425/pjvs.2019.129978>
- Lawson E.F., Grupen C.G., Baker M.A., Aitken R.J., Swegen A., Pollard C.L., Gibb Z. Conception and early pregnancy in the mare: lipidomics the unexplored frontier // *Reprod. Fertil.* 2022. V. 3. R1–R18.
<https://doi.org/10.1530/RAF-21-0104>
- Mazur P. Equilibrium, quasiequilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos // *Cell. Biophys.* 1990. V. 17. P. 53–92.
<https://doi.org/10.1007/BF02989804>
- Mokrousova V., Okotrub K., Amstislavsky S., Surovtsev N. Raman spectroscopy evidence of lipid separation in domestic cat oocytes during freezing // *Cryobiology*. 2020a. V. 95. P. 177–182.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.03.005>
- Mokrousova V., Okotrub K., Brusentsev E., Kizilova E.A., Surovtsev N.V., Amstislavsky S.Y. Effects of slow freezing and vitrification on embryo development in domestic cat // *Reprod. Dom. Anim.* 2020b. V. 55. P. 1328–1336.
<https://doi.org/10.1111/rda.13776>
- Nagashima H., Kashiwazaki N., Ashman R., Grupen C.G., Nottle M.B. Cryopreservation of porcine embryos // *Nature*. 1995. V. 374. P. 416.
<https://doi.org/10.1038/374416a0>
- Nonogaki T., Noda Y., Goto Y., Kishi J., Mori T. Developmental blockage of mouse embryos caused by fatty acids // *J. Assist. Reprod. Genet.* 1994. V. 11. P. 482–488.
<https://doi.org/10.1007/BF02215713>
- Ohata K., Ezoe K., Miki T., Kouraba S., Fujiwara N., Yabuuchi A., Kobayashi T., Kato K. Effects of fatty acid supplementation during vitrification and warming on the developmental competence of mouse, bovine and human oocytes and embryos // *Reprod. Biomed. Online*. 2021. V. 43. P. 14–25.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.03.022>
- Okotrub K., Okotrub S., Mokrousova V., Amstislavsky S.Y., Surovtsev N.V. Lipid phase transitions in cat oocytes supplemented with deuterated fatty acids // *Biophys. J.* 2021. V. 120. P. 5619–5630.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.11.008>
- Okotrub K., Mokrousova V., Amstislavsky S., Surovtsev N. Lipid droplet phase transition in freezing cat embryos and oocytes probed by Raman spectroscopy // *Biophys. J.* 2018. V. 115. P. 577–587.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.06.019>
- Pawlak P., Malyszka N., Szczerbal I., Kolodziejewski P. Fatty acid induced lipolysis influences embryo development, gene expression and lipid droplet formation in the porcine cumulus cells // *Biol. Reprod.* 2020. V. 103. P. 36–48.
<https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa045>
- Ranneva S., Okotrub K., Amstislavsky S., Surovtsev N. Deuterated stearic acid uptake and accumulation in lipid droplets of cat oocytes // *Arch. Biochem. Biophys.* 2020. V. 692. P. 108532.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108532>
- Renard J.P., Babinet C. High survival of mouse embryos after rapid freezing and thawing inside plastic straws with 1–2 propanediol as cryoprotectant // *J. Exp. Zool.* 1984. V. 230. P. 443–448.
<https://doi.org/10.1002/jez.1402300313>
- Roth T., Swanson W., Wildt D. Developmental competence of domestic cat embryos fertilized in vivo versus in vitro // *Biol. Reprod.* 1994. V. 51. P. 441–451.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod51.3.441>
- Shehab-El-Deen M., Leroy J., Maes D., van Soom A. Cryotolerance of bovine blastocysts is affected by oocyte maturation in media containing palmitic or stearic acid // *Reprod. Domest. Anim.* 2009. V. 44. P. 140–142.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01084.x>
- Swanson W.F., Roth T.L., Wildt D.E. In vivo embryogenesis, embryo migration, and embryonic mortality in the domestic cat // *Biol. Reprod.* 1994. V. 51. P. 452–464.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod51.3.452>
- van Hoeck V., Sturmey R., 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. V. 6. e23183.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023183>
- Yousif M., Calder M., Du J., Ruetz K.N., Crocker K., Urquhart B.L., Betts D.H., Rafea B.A., Watson A.J. Oleic acid counters impaired blastocyst development induced by palmitic acid during mouse preimplantation development: understanding obesity-related declines in fertility // *Reprod. Sci.* 2020. V. 27. P. 2038–2051.
<https://doi.org/10.1007/s43032-020-00223-5>
- Zahmel J., Jansch S., Jewgenow K., Sandgreen D.M., Skalborg Simonsen K., Colombo M. Maturation and fertilization of African lion (*Panthera leo*) oocytes after vitrification // *Cryobiology*. 2021. V. 98. P. 146–151.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.11.011>
- 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. V. 61. P. 271–278.
<https://doi.org/10.1002/mrd.1156>

Effects of Stearic Acid on the Cryotolerance of the Domestic Cat (*Felis silvestris catus*) Embryos

E. Yu. Brusentsev¹, S. V. Okotrub¹, D. A. Lebedeva^{1, 2, 3}, K. A. Okotrub²,
T. A. Rakhmanova^{1, 2, 3}, S. Ya. Amstislavsky^{1, 2, #}

¹*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
prosp. Lavrentyeva 10, Novosibirsk, 630090 Russia*

²*Institute of Automation and Electrometry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
prosp. Koptiyuga 1, Novosibirsk, 630090 Russia*

³*Novosibirsk State University, Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia*

[#] *e-mail: amstis@yandex.ru*

The current work aimed to study the effect of domestic cat (*Felis silvestris catus*) embryos *in vitro* exposure to saturated stearic acid (SA) and to evaluate how the change in lipid content affects the cryopreservation results. The addition of SA to the culture medium did not affect the development of cat embryos *in vitro* before cryopreservation. The total lipid amount in the SA-treated embryos was not changed as well. However, the lipid unsaturation degree was lower in embryos after *in vitro* exposure to SA. Moreover, the lipid phase transition onset temperature (T^*) was higher in SA-treated embryos as compared with controls. These changes of intracellular lipids unsaturation degree and T^* were associated with the impairment of embryo cryopreservation effectiveness. The results obtained may be of importance for the applying Genome Resource Banking concept to the Felinae species.

Keywords: Felidae; *in vitro* fertilization; early development; *in vitro* culture; intracellular lipids; fatty acids; program freezing; Raman spectroscopy