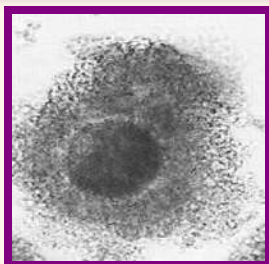




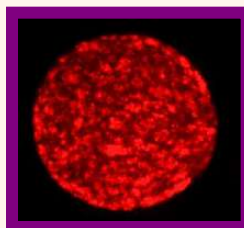
Молекулярно-клеточные механизмы функционирования структурных компонентов женской гаметы животных после воздействия сверхнизких температур

© КУЗЬМИНА Т.И.

от



ооцита



к



эмбриону

Санкт-Петербург
2025

Материалы и методы

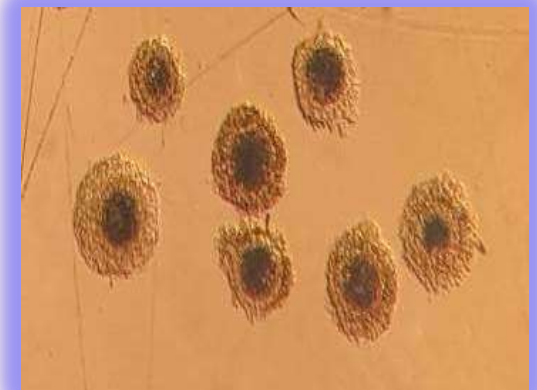
Объектом исследования служили ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК) из овариальных фолликулов свиней (ландрас, 6-8 месяцев) и коров, полученные путем рассечения стенок фолликулов диаметром 3-8 мм.



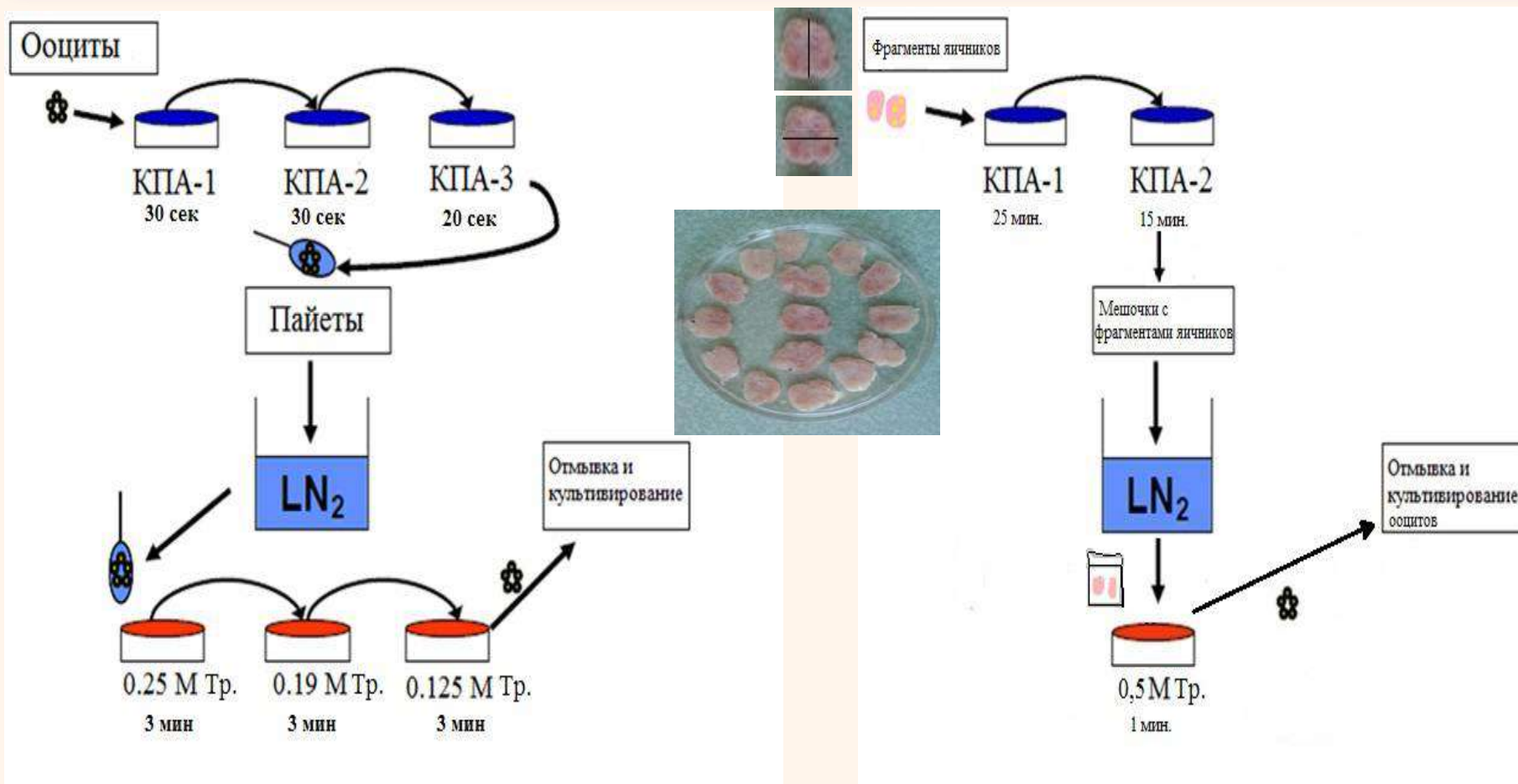
Яичники *Bos Taurus L.*



Яичник *Sus Scrofa Domestica L.*



Схемы экстра- (а) и интра-овариальной (б) витрификации/девитрификации



Базовой средой для всех КПА и растворов для девитрификации служила среда Т-199 с добавлением 20 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС)

Состав растворов КПА:

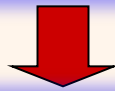
КПА-1: 0.7 М диметилсульфоксида (ДМСО) и 0.9 М этиленгликоля (ЭГ);
КПА-2: 1.4 М ДМСО и 1.8 М ЭГ;
КПА-3: 2.8 М ДМСО, 3.6 М ЭГ и 0.65 М Тр.

Состав растворов КПА:

КПА-1: 7.5 % диметилсульфоксида (ДМСО) и 7.5 % этиленгликоля (ЭГ);
КПА-2: 15 % ДМСО и 15 % ЭГ, 0.5 М сахарозы

Дизайн эксперимента

- Яичники, доставленные с мясокомбината
- Выделение ооцит-кумулюсных комплексов
- Селекция популяции ооцитов (морфология)
- ВСВ диагностика
- Витрификация
- Оттаивание



- MitoTracker CMTMRos Orange,
- Hoechst 33258
- Родамин-фаллоидин
- Nile red



- статус хроматина,
- уровень митохондриальной активности
- актиновый цитоскелет
- морфология и локализация липидных капель

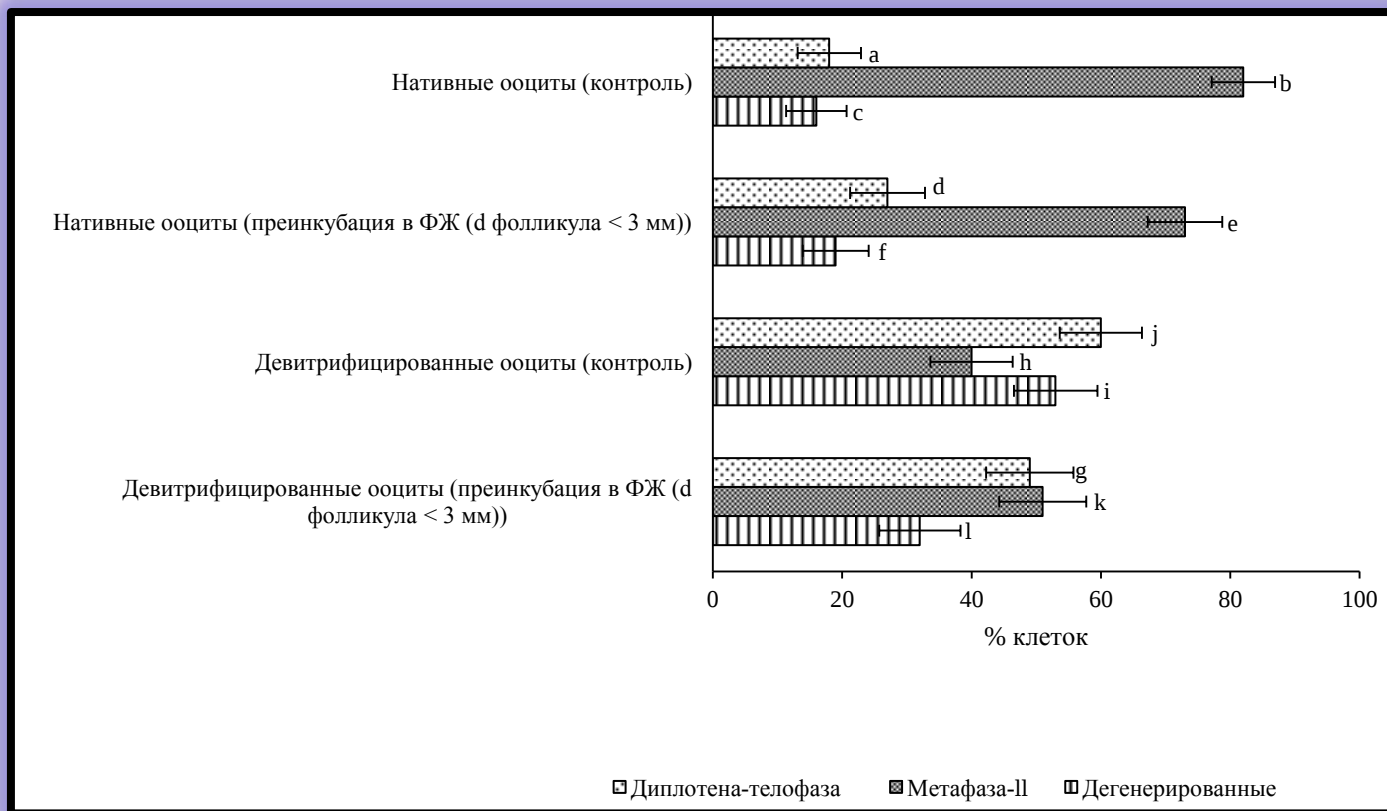
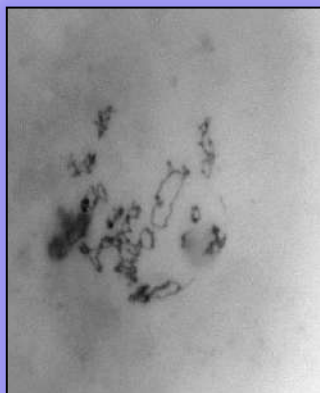
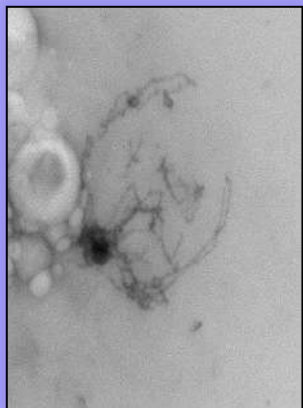


- In-vitro созревание ооцитов
- In-vitro оплодотворение
- культивирование эмбрионов



- дробление
- выход морул-бластоцист

ОЦЕНКА ПЕРСПЕКТИВ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГОМОЛОГИЧНОЙ ЖИДКОСТИ ИЗ ФОЛЛИКУЛОВ МЕНЕЕ 3ММ В КАЧЕСТВЕ КРИОПРОТЕКТОРНОГО АГЕНТА ПРИ ВИТРИФИКАЦИИ ООЦИТОВ СВИНЕЙ

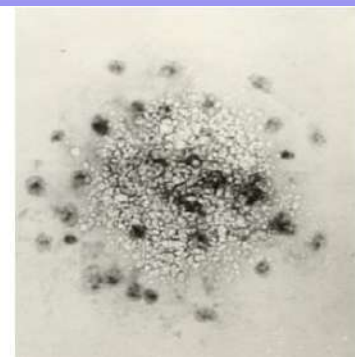
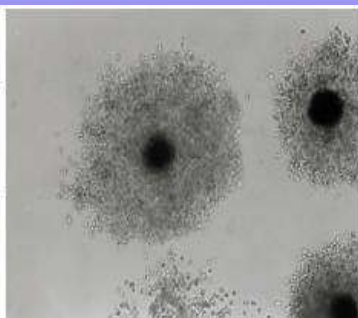
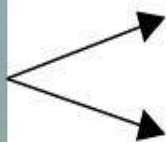


Статус хроматина нативных и девитрифицированных ооцитов свиней после 44 часов культивирования (число экспериментов – 3, число ооцитов – 470). χ^2 Пирсона: b:h; e:k $p < 0.01$, c:i; l $p < 0.05$.

Развитие доимплантационных эмбрионов из нативных и девитрифицированных ооцитов свиней (число ооцитов–736)

Группы эксперимента	Преинкубация в фолликулярной жидкости	n ооцитов	n (%) дробления	n (%) морул-бластоцист	n(%) дегенерированных(от дробящихся)
Нативные ооциты	-	189	91(48) ^a	62(33) ^e	17(19)
	+	176	83(47) ^b	40(23) ^f	12(14)
Девитрифицированные ооциты	-	198	24(12) ^c	8(4) ^j	6(25)
	+	173	40(23) ^d	12(7) ^k	9(23)

(критерий χ -квадрат) ^{a,c;b,c;a,d;b,d,e;j;e,k,f;j;} $P < 0.05$ Среда культивирования: NCSU 23 – синтетическая питательная среда+ 10М.Е.хорионического гонадотропина человека + 10 М.Е. хорионического гонадотропина лошади+10% фолликулярная жидкость (диаметр фолликулов 3-5 мм)+стенки фолликулов (диаметр фолликулов 3-5 мм).

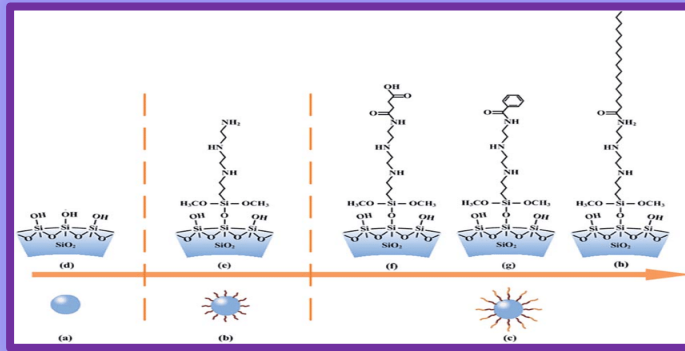


Показатели уровней дробления и выхода морул-бластоцист из нативных и девитрифицированных ооцитов коров (число ооцитов – 769, число экспериментов – 3)

Группы эксперимента	Обработка жидкостью фолликулов	n ооцитов	% дробления	% морул-бластоцист
Нативные ооциты	–	181	78±3.1 ^a	39±3.6 ^e
	+	198	71±3.2 ^b	21±2.9 ^f
Девитрифицированные ооциты	–	203	31±3.2 ^c	5±1.5 ^g
	+	187	49±3.7 ^d	12±2.3 ^h

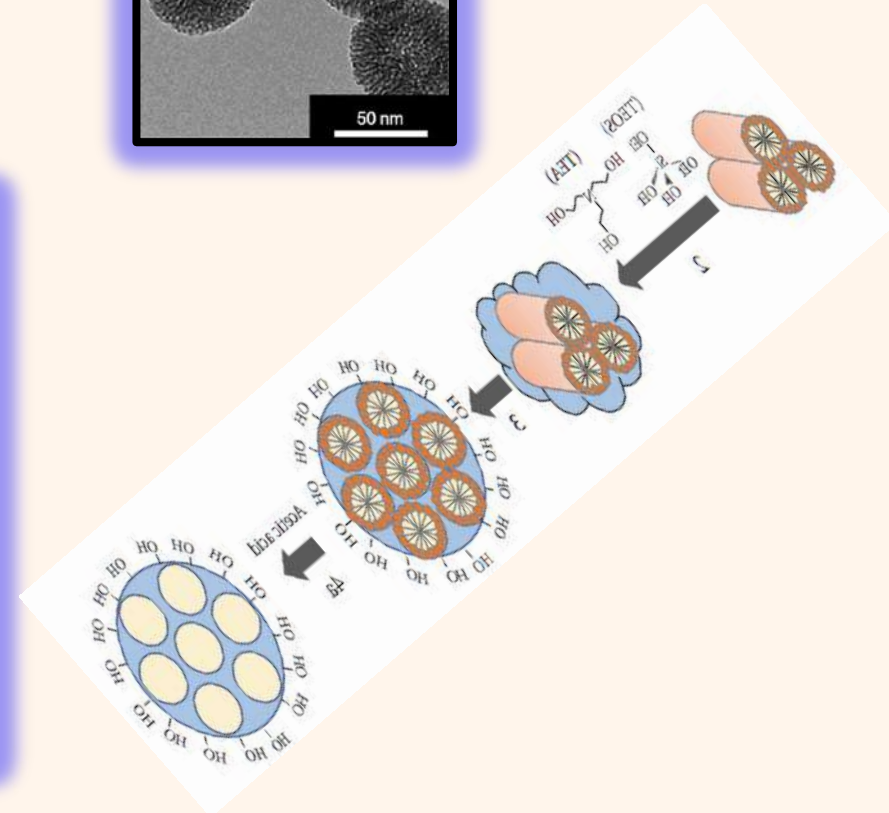
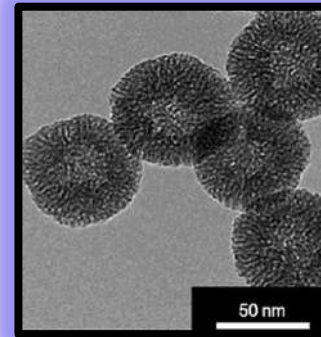
среда культивирования ооцитов – среда Т-199 +10% ЭБС +10⁶ клеток/мл гранулезы + 10 нг/мл рекомбинантного бычьего соматотропина. ^{a:c; e:g} $p < 0.001$; ^{c:d; b:d; e:f} $p < 0.01$; ^{g:h} $p < 0.05$ (критерий χ^2 Пирсона)



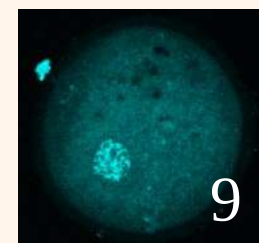
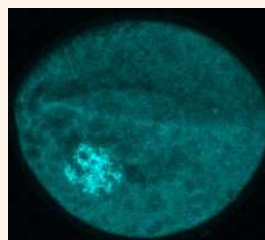
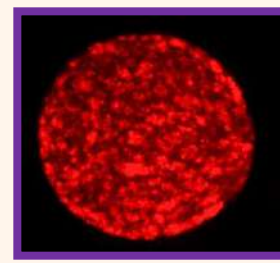
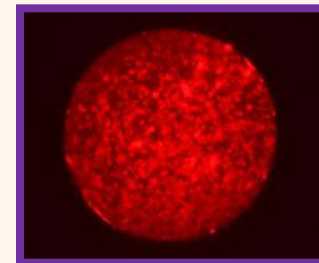
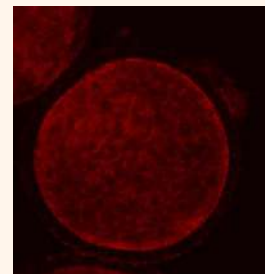
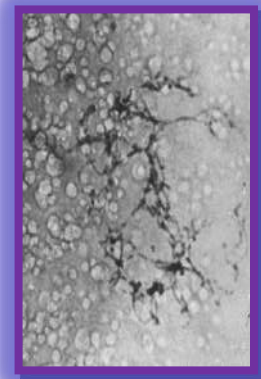


ЭФФЕКТЫ
НАНОЧАСТИЦ ЗАВИСЯТ
ОТ:

структуры наночастиц;
формы наночастиц;
размера наночастиц;
поверхностного заряда ;
концентрации;
типа клеток;
температуры растворов



Дизайн эксперимента



* IVM - Созревание in vitro

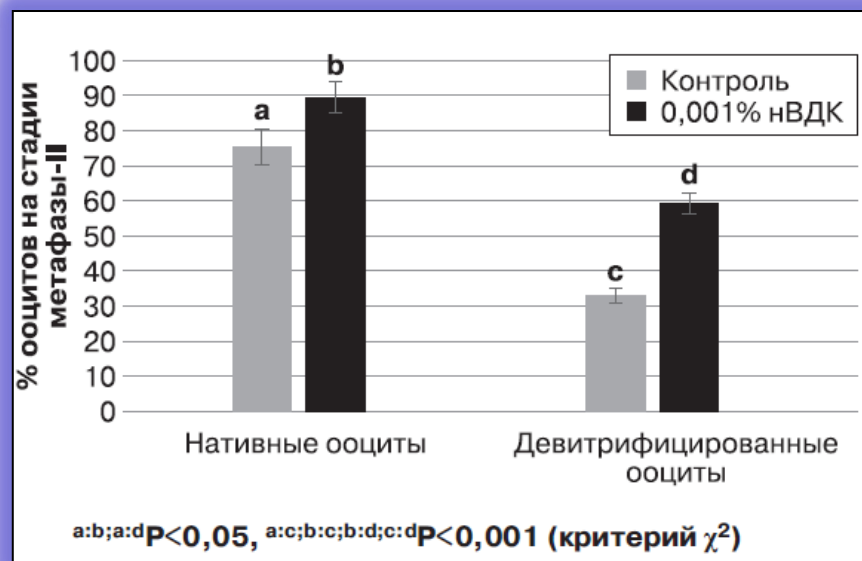
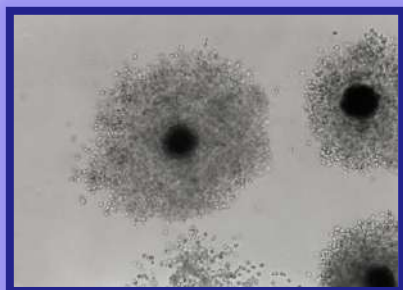
** МА – Митохондриальная активность

Влияние наночастиц высокодисперсного кремнезема (HDSns) на морфологию клеток кумулюса *Bos taurus* L. после замораживания / оттаивания (286 ооцит-кумулясных комплекса, в 3 повторностях)



обработка нВДК повышает долю девитрифицированных ооцитов с низкой степенью экспансии кумулюса

КРИОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ООЦИТОВ СВИНЕЙ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ нВДК



Хроматин ооцитов свиней на стадии телофаза – метафаза II

Влияние наночастиц высокодисперсного кремнезема на созревание *in vitro* нативных и девитрифицированных ооцитов свиней (время культивирования — 44 часа, n ооцитов — 267, в 3–5 повторностях)





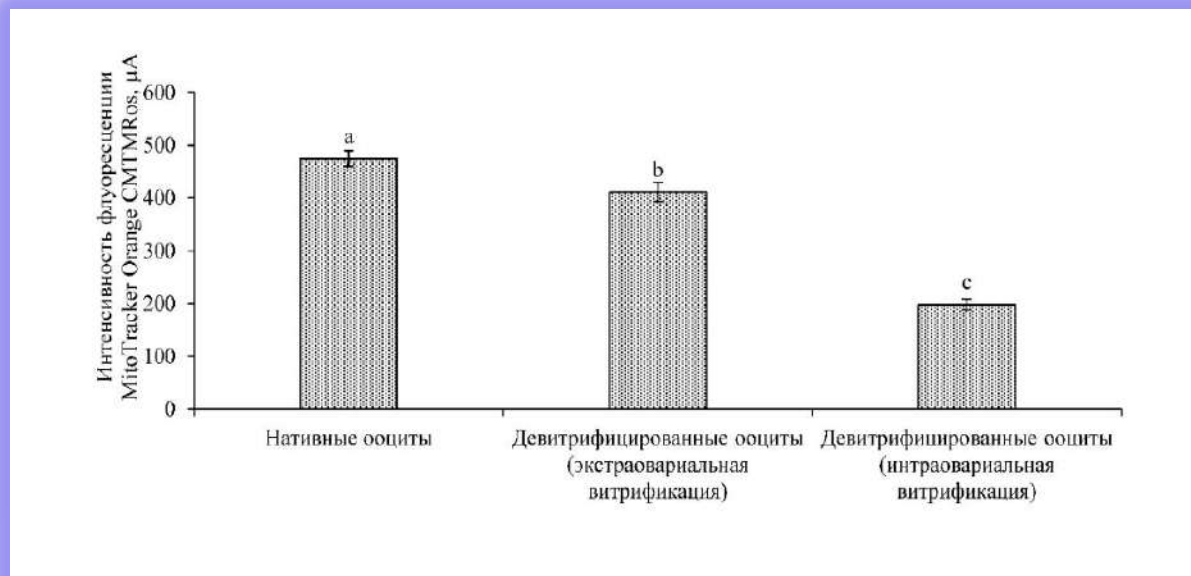
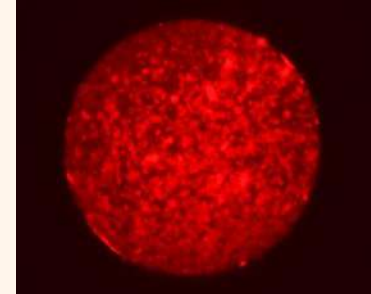
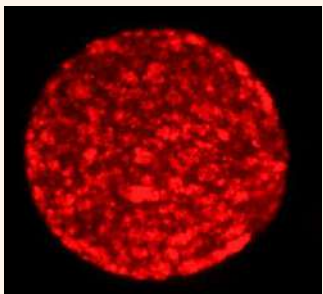
Компактный кумулюс



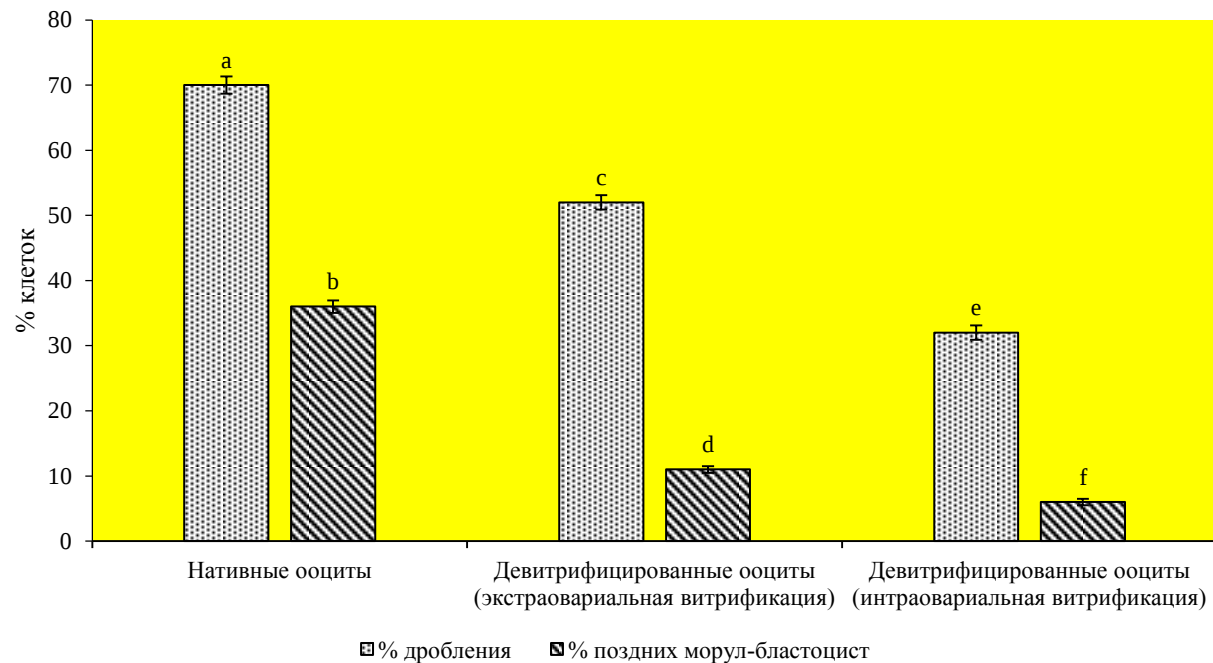
Влияние наночастиц высокодисперсного кремнезема и диметилглицеролата кремния (ДМГК) на развитие доимплантационных эмбрионов *BosTaurus* (n ооцитов – 461; повторностей – 3)

Группа экспериментов	n ооцитов	n (%)бластоцист
Контроль	199	55 (28) ^a
Контроль + нВДК	112	44 (39) ^b
Контроль +0,2% ДМГК	99	28 (28) ^a
Контроль +0,4% ДМГК	51	13 (25) ^a

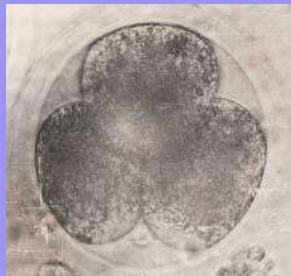
Контроль – среда созревания ооцитов: ТС-199 с глутамаксом-1+10% ФБС + β -эстрадиол + ФСГ. ^{a:b}P<0.05(χ^2 –test)



Показатели митохондриальной активности (интенсивности флуоресценции MitoTracker Orange CMTMRos) в нативных и девитрифицированных ооцитах *Bos taurus* при культивировании *in vitro* (n ооцитов – 103, n экспериментов – 3). t-критерий Стьюдента: b:c; a:c $P < 0.01$; a:b $P < 0.05$.



Развитие доимплантационных эмбрионов *Bos taurus* из нативных и девитрифицированных ооцитов (п ооцитов - 462, п экспериментов - 3). χ^2 Пирсона: b:f; a:e $P < 0.001$; a:c; c:e; b:d $P < 0.01$. (в состав криопротекторных и культуральных сред введены 0.001% нВДК).





БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ