

УДК 612.67;591.3;611.81;592/599

РОЛЬ ЛИПИДНЫХ ГРАНУЛ В РАЗВИТИИ ООЦИТОВ И ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© 2019 г. Е. Ю. Брусенцев^а, В. И. Мокроусова^{а, б}, Т. Н. Игонина^а,
И. Н. Рожкова^а, С. Я. Амстиславский^{а, *}

^аФГБНУ “ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН”, пр. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090 Россия

^бФГАОУ ВО “Новосибирский национальный исследовательский государственный университет” (НГУ),
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: amstis@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.02.2019 г.

После доработки 07.05.2019 г.

Принята к публикации 15.05.2019 г.

Липиды являются одними из самых распространенных и важных компонентов клеток. В частности, цитоплазматические липидные гранулы (ЛГ) играют решающую роль в клеточном энергетическом обмене. Основными направлениями данного обзора являются: рассмотрение способов изучения внутриклеточных липидов, их состава и роли в период созревания ооцитов и раннего эмбрионального развития. Недавние исследования показывают, что ЛГ в ооцитах и эмбрионах являются не только хранилищами энергетического субстрата, но и активными внутриклеточными структурами, выполняющими множество других функций.

Ключевые слова: липидные гранулы, ооциты, преимплантационные эмбрионы

DOI: 10.1134/S0475145019050100

ВВЕДЕНИЕ

Липиды являются одними из наиболее распространенных и важных химических компонентов клеток, играющих важную роль в их строительстве, метаболизме и регуляции (Farese, Walther, 2009; Walther, Farese, 2009; Dunning et al., 2014; Welte, Gould, 2017). Липидные гранулы (ЛГ) традиционно известны как внутриклеточные структуры, наполненные гидрофобными липидами. ЛГ являются резервуарами для хранения энергетического субстрата, а также обеспечивают клетки строительным материалом для мембран различных органелл и, возможно, выполняют другие функции (Walther, Farese, 2012; Thiam et al., 2013). Гидрофобное ядро ЛГ, окруженное фосфолипидным монослоем, в основном состоит из триацилглицеринов и сложных эфиров стеролов, таких как холестерин (Walther, Farese, 2009). Также в состав ЛГ входят различные белки (Thiam et al., 2013).

В отличие от раннего представления о ЛГ как исключительно о хранилищах липидов, в последнее время их рассматривают как активные внутриклеточные структуры, играющие важную роль как в гомеостазе клетки, так и других процессах (Walther, Farese, 2009; Welte, Gould, 2017). Например, ЛГ служат центрами, продуцирующими не-

которые специфические липиды (Kuerschner et al., 2008). ЛГ тесно связаны с эндоплазматическим ретикуломом, митохондриями и другими субклеточными элементами (Kuerschner et al., 2008; Thiam et al., 2013; Welte, Gould, 2017). ЛГ содержат ферменты синтеза триглицеридов, а также целого ряда различных липидов, что указывает на их активное участие во внутриклеточном метаболизме последних (Athenstaedt, Daum, 2006). ЛГ также выполняют функцию детоксикации клетки, удерживая токсичные липофильные молекулы (Welte, Gould, 2017). Общие аспекты биохимии и биофизики ЛГ обсуждаются в работах Вальтера и Фаресе (Walther, Farese, 2009, 2012), а также Тиам с соавторами (Thiam et al., 2013). В данной статье рассматриваются современные подходы к изучению ЛГ и их влияние на развитие ооцитов и преимплантационных эмбрионов млекопитающих.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИПИДНЫХ ГРАНУЛ ООЦИТОВ И ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНОВ

Классическая световая и флуоресцентная конфокальная лазерная сканирующая микроскопия CLSM (confocal laser scanning microscopy) часто используются для изучения внутриклеточных ЛГ,

а также их локализации в ооцитах различных видов млекопитающих (Dunning et al., 2014; Daemen et al., 2015). Проникающие флуорохромы BODIPY и нильский красный (Nile Red – NR) используют для визуализации ЛГ в ооцитах/эмбрионах млекопитающих с последующей оценкой их содержания при помощи флуоресцентной микроскопии или CLSM (Genicot et al., 2005; Barcelo-Fimbres, Seidel, 2011; Aardema et al., 2011; Romek et al., 2011). В частности, с помощью окрашивания NR ооцитов и эмбрионов крупного рогатого скота (КРС) было продемонстрировано, что содержание липидов при развитии в условиях *in vitro* меняется (Leroy et al., 2005). Также для исследования ЛГ используют методы микроскопии сверхвысокого разрешения (Daemen et al., 2015). Флуоресцентная микроскопия в режиме реального времени STED (stimulated emission depletion) и FRET (fluorescence resonance energy transfer) обеспечивают разрешение в несколько десятков нанометров и очень полезны для изучения ЛГ и их взаимодействия с другими клеточными структурами (Sturmeijer et al., 2006; Daemen et al., 2015).

Наряду с флуоресцентной микроскопией, электронная микроскопия традиционно используется для исследования ЛГ в ооцитах млекопитающих (Guraya, 1965). В частности, просвечивающая электронная микроскопия ТЕМ (transmission electron microscopy) позволяет визуализировать форму и локализацию ЛГ. Этот метод был успешно применен по отношению к ооцитам разных видов млекопитающих, например, КРС (Ordonez-Leon et al., 2014), свиньи (Pedersen et al., 2016) и кролика (Chrenek et al., 2014).

Традиционными подходами для изучения внутриклеточных липидов являются газовая и тонкослойная хроматография (Henault, Killian, 1993; Dunmore-Buyze et al., 1995). Эти методы, в частности газовая хроматография, были успешно применены для оценки общего количества липидов и соотношения определенных жирных кислот (ЖК) в ооцитах и преимплантационных эмбрионах различных видов млекопитающих (Schie et al., 2013; Warzych et al., 2017). Однако этот подход является дорогостоящим, требующим специального оборудования, а также большого количества (несколько сотен) ооцитов или преимплантационных эмбрионов (Wang et al., 1998; McEvoy et al., 2000).

Масс-спектрометрия MS (mass spectrometry) является еще одним подходом, при помощи которого можно оценить содержание липидов в ооцитах и ранних эмбрионах. Этот метод основан на ионизации молекул образца и дальнейшей сортировке образующихся ионов по соотношению между массой и зарядом ионов. Для биологических исследований чаще всего используют мяг-

кую ионизацию (Ferreira et al., 2015): десорбционную электрораспылительную ионизацию DESI (desorption electrospray ionization) и матричную лазерную десорбцию/ионизацию MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization). MALDI может быть реализован с пространственным разрешением в несколько микрон и использоваться для визуализации образцов (Buchberger et al., 2017). С другой стороны, считается, что DESI подходит для количественного анализа, в то время как MALDI дает качественные данные о химическом составе. В отличие от газовой хроматографии MS предоставляет информацию не только о содержании ЖК, но и о любом интересующем липиде. Преимущество MS заключается в том, что для анализа требуется меньшее количество образца по сравнению с хроматографией, и его можно применять к отдельному ооциту или эмбриону (Ferreira et al., 2012). Однако масс-спектры биологических клеток содержат большое количество информации, поэтому при их анализе часто используют многомерные подходы (Ferreira et al., 2015). На практике, MS применяли для изучения липидов в ооцитах лошади (Sessions-Bresnahan et al., 2016), а также в ооцитах и эмбрионах КРС (Leao et al., 2015; Sudano et al., 2016; Goncalves et al., 2016).

Большинство из рассмотренных выше экспериментальных подходов (электронная микроскопия, хроматография, масс-спектрометрия) требуют фиксации образца или даже его разрушения. Инфракрасная (ИК) спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния света (рамановская спектроскопия), являются неинвазивными методами и применяются для мониторинга живых клеток (Zoladek et al., 2011; Ishigaki et al., 2016). Оба подхода основаны на взаимодействии молекул с квантами света, что обусловлено передачей энергии между фотонами и колебательными энергетическими состояниями молекулы. В случае ИК-спектроскопии молекула поглощает фотоны с энергией, эквивалентной энергии перехода электрона. В случае рамановской спектроскопии энергетический переход происходит за счет неупругого рассеяния света на молекулах.

ИК- и рамановские спектры могут быть использованы для оценки степени ненасыщенности липидов (Hosokawa et al., 2014) и для анализа упорядоченности и конформационных состояний липидных структур (Da Silva, Rousseau, 2008). Кроме того, эти методы являются эффективным инструментом для *in situ* и *in vivo* исследований фазовых переходов липидов в клетках (Sieme et al., 2015) и даже могут быть применены для исследований отдельных клеток (Hale, Querry, 1973; Arav et al., 1996; Sassi et al., 2015; Okotrub et al., 2017). Причем рамановская микроскопия может быть

реализована с субмикронным пространственным разрешением, сравнимым с разрешением конфокального микроскопа (Okotrub et al., 2017, 2018).

Когерентное антистоксово комбинационное рассеяние CARS (coherent anti-stokes Raman scattering) и вынужденное комбинационное рассеяние SRS (stimulated Raman scattering) являются передовыми подходами, основанными на нелинейном взаимодействии молекул и двух импульсных лазерных лучей, разность энергий фотонов которых соответствует энергетической щели между колебательными состояниями молекулы (Evans, Xie, 2008; Cheng, Xie, 2016). Если в традиционном методе рамановской спектроскопии комбинационное рассеяние происходит спонтанно, когерентные рамановские подходы используют эффект стимулированных процессов, что приводит к усилению сигнала примерно на четыре порядка (Muller, Schins, 2002). Следовательно, измерения CARS намного эффективнее, чем традиционная комбинационная спектроскопия. На практике, CARS был применен для детального анализа распределения липидов в живых ооцитах и эмбрионах мыши (Bradley et al., 2016).

СОСТАВ И ФУНКЦИИ ЛИПИДНЫХ ГРАНУЛ ООЦИТОВ И ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНОВ

Ооциты в кумулюс-ооцитных комплексах (КОК), а также кумулюсные клетки содержат достаточно много ЛГ (Dunning et al., 2014). Для большинства клеток млекопитающих диаметр ЛГ обычно варьирует в диапазоне 0.1–1.0 мкм (Fujimoto, Parton, 2011; Daemen et al., 2015). Исследования с использованием ТЕМ, CARS и CLSM показали, что диаметр ЛГ на стадии незрелых ооцитов для большинства исследованных видов млекопитающих составляет менее 1 мкм (Guraya, 1965; Aardema et al., 2011; Bradley et al., 2016), а увеличение их размера наблюдается во время созревания ооцитов и последующего эмбрионального развития (Aardema et al., 2011). На стадиях морулы и бластоцисты появляются более крупные (>1 мкм) ЛГ (Bradley et al., 2016). Механизм укрупнения существующих ЛГ путем их слияния хорошо документирован для разных клеток (Walther, Farese, 2009). Число ЛГ снижается во время эмбрионального развития, как было показано в экспериментах *in vitro* на эмбрионах КРС, культивированных в различных условиях до стадии бластоцисты (Ordóñez-Leon et al., 2014). Это объясняется тем, что ЛГ являются хранилищем внутриклеточных липидов в ооцитах и преимплантационных эмбрионах (McKeegan, Sturney, 2011), и эти запасы активно

потребляются в период развития эмбрионов благодаря повышенному липолизу.

Липиды имеют показатель преломления ($n \approx 1.45$), что выше, чем у водных растворов. Несовпадение показателей преломления ЛГ и цитоплазмы приводит к интенсивному рассеянию света на липидных каплях, что делает цитоплазму богатых липидами ооцитов визуально более темной при наблюдении в световой микроскоп. Существует видовая специфичность по количеству ЛГ в ооцитах/эмбрионах и характеру их распределения (Dunning et al., 2014). Так, электронно-микроскопическое исследование позволило выявить различия в числе ЛГ в ооцитах двух близкородственных видов полорогих: *Bos taurus*, *Bos indicus* и их гибридов (Ordóñez-Leon et al., 2014). Использование NR с последующей флуоресцентной микроскопией показало, что ооциты свиньи содержат в 2.4 раза больше липидов, чем ооциты КРС (Genicot et al., 2005). Кроме того, согласно этому исследованию, мышинные ооциты содержат в 6.8 раза меньше липидов, чем ооциты свиньи, и в 2.8 раза меньше, чем ооциты КРС. К видам с ооцитами и эмбрионами, богатыми липидами, относятся не только свинья, КРС и овца, но и представители отряда хищных, например, кошка и собака (Guraya, 1965; Reynaud et al., 2006; Martins et al., 2009; Apparicio et al., 2012; Amstislavsky et al., 2012). Ооциты и преимплантационные эмбрионы этих видов выглядят темными под световым микроскопом из-за рассеяния света на ЛГ (Amstislavsky et al., 2019).

Различное число ЛГ объясняет разницу в прозрачности ооцитов, даже тех, которые были собраны из одного яичника (Dunning et al., 2014). Если ооциты какого-либо вида млекопитающего содержат меньше ЛГ, чем для них характерно в норме, то под световым микроскопом они выглядят более “светлыми”, что в свою очередь может свидетельствовать об их деградации и низком качестве (рис. 1). Эта закономерность была продемонстрирована на ооцитах собаки (Durrant et al., 1998), ооцитах КРС (Nagano et al., 2006; Jeong et al., 2009), а также в наших собственных экспериментах на ооцитах домашней кошки. В частности, на КРС было показано, что более “темные” ооциты содержат больше липидов, что является признаком хорошего потенциала развития, в то время как “светлые” ооциты коррелируют с плохим потенциалом развития (Nagano et al., 2006; Jeong et al., 2009). В существующих практических работах с ооцитами кошки, для дозревания *in vitro* отбирают лишь КОК с “темными” ооцитами и более пяти слоев кумулюсных клеток (Wood, Wildt, 1997). Комплексы же со “светлыми” ооцитами и малым числом слоев кумулюса обычно не

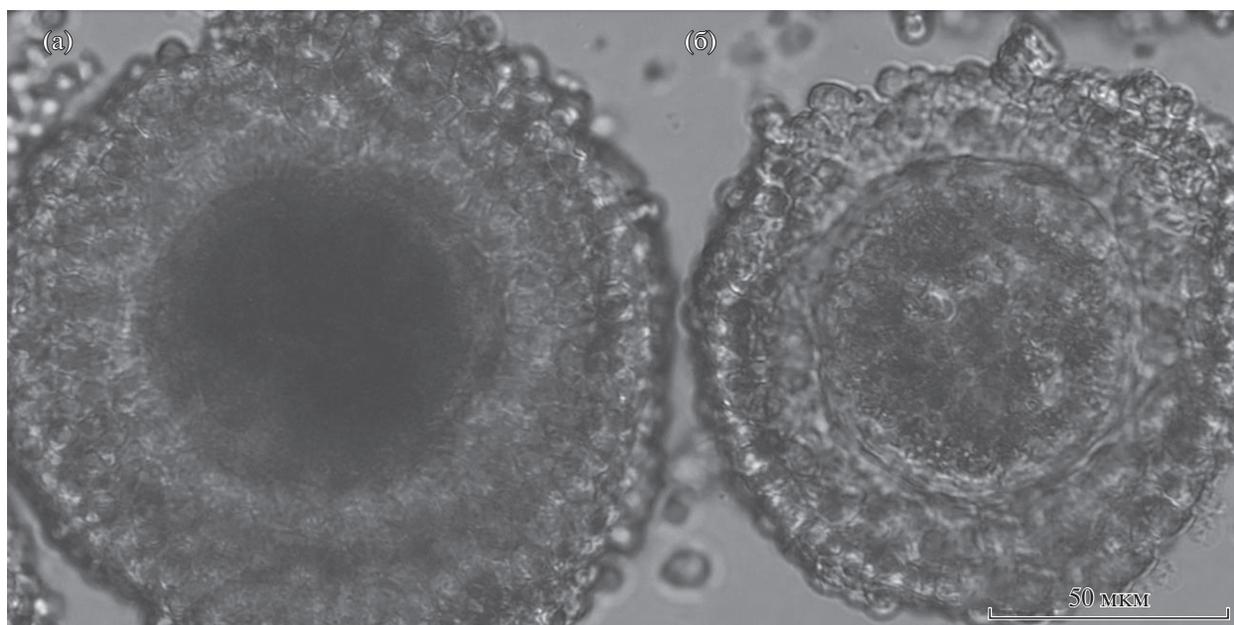


Рис. 1. Незрелые ооциты домашней кошки: (а) – хорошего качества (“темный”), (б) – плохого качества (“светлый”).

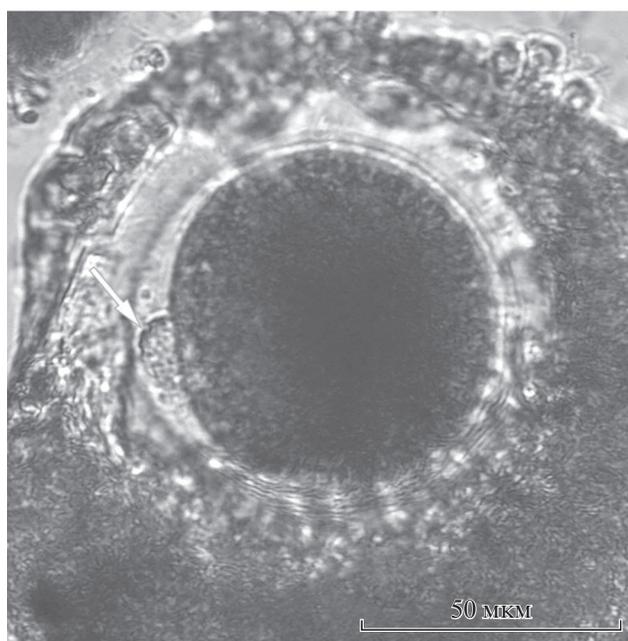


Рис. 2. Зрелый ооцит домашней кошки через 24 ч после IVM. Стрелкой показано полярное тело.

берут для созревания *in vitro*. При правильно подобранных условиях, КОК с “темными” ооцитами дозревают в течение 24–48 ч с выделением полярного тела (рис. 2).

Состав ЛГ в ооцитах и преимплантационных эмбрионах изучен у таких млекопитающих, как мышь, крыса, кролик, свинья, овца, КРС, домашняя кошка, собака и человек (Loewenstein, Cohen,

1964; Khandoker et al., 1996, 1997; Matorras et al., 1998; Wang et al., 1998; McEvoy et al., 2000; Kim et al., 2001; Fujihira et al., 2004). Например, ЛГ незрелых ооцитов КРС состоят из приблизительно 57% триацилглицеринов, около 16% фосфолипидов, 16% холестерина и 11% свободных ЖК (Kim et al., 2001). Тем не менее, процент ЖК гораздо выше для некоторых других изученных видов, напри-

мер, у свиньи он составляет 34.7% (Fujihira et al., 2004). Это может быть объяснено видовой специфичностью, однако во всех случаях триацилглицерин является либо основным компонентом ЛГ в ооцитах, либо одним из наиболее распространенных наряду со свободными ЖК (Fujihira et al., 2004). Триаилглицерин является главной формой накопления нейтральных липидов внутри ЛГ (Welte, Gould, 2017).

ЖК играют важную роль в процессе развития ооцитов и преимплантационных эмбрионов (McKeegan, Sturmey, 2011). В работе Dunning et al. (2014) проанализировано двенадцать ЖК, встречающихся в ооцитах млекопитающих; из них олеиновая, пальмитиновая, стеариновая и арахидоновая являются наиболее распространенными. Профиль ЖК в ооцитах обладает высокой видоспецифичностью. Например, было показано, что в одноклеточных эмбрионах крыс (Khandoker et al., 1997), также, как в ооцитах кроликов (Khandoker et al., 1996) и овец (McEvoy et al., 2000), преобладающей является олеиновая кислота. Пальмитиновой кислоты меньше всего в ооцитах мышей (Wang et al., 1998) и крыс (Khandoker et al., 1997), а больше всего в ооцитах КРС и свиньи (McEvoy et al., 2000). Стеариновая кислота является наиболее распространенной в ооцитах человека (Matorras et al., 1998), а арахидоновая кислота — в ооцитах мыши (Wang et al., 1998). Ооциты перечисленных видов бедны такими ЖК, как миристиновая — у овец (McEvoy et al., 2000), стеариновая — у кролика (Khandoker et al., 1996), линоленовая — у КРС (McEvoy et al., 2000), свиньи (McEvoy et al., 2000) и человека (Matorras et al., 1998).

Олеиновая, пальмитиновая и стеариновая кислоты являются тремя наиболее распространенными ЖК в незрелых ооцитах свиней, овец и КРС (McEvoy et al., 2000). Тем не менее, в исследовании Kim et al. (2001) было показано, что соотношение различных ЖК отличается в ооцитах разного качества: олеиновая кислота была наиболее распространенной в ооцитах высокого качества, тогда как стеариновая была наиболее распространенной в ооцитах низкого качества (Kim et al., 2001). Более того, липидный состав ооцитов может существенно зависеть от времени года и других факторов. Было показано, что летом ооциты КРС содержат фосфолипиды, состоящие примерно из 80% насыщенных ЖК, в то время как зимой эта доля составляет всего 40% (Zeron et al., 2001). Изменения условий созревания *in vitro* (IVM) также могут оказывать влияние на содержание ЛГ в ооцитах. Так, в работе на свиньях было продемонстрировано увеличение числа ЛГ в ооцитах и повышение их качества при добавлении в среду для созревания *in vitro* (IVM) фолли-

кулярной жидкости препубертатных свиней, которая богата ЖК (Pawlak et al., 2018). Увеличение числа ЛГ в клетках кумулюса можно наблюдать при IVM КОК мышей, если в среду добавить водный экстракт семян укропа, при этом качество созревания ооцитов будет снижаться (Monsefi et al., 2018). Данный эффект может быть связан со снижением β -окисления липидов в митохондриях и, как следствие, чрезмерным накоплением не утилизируемого субстрата в ЛГ (Monsefi et al., 2018). В работе на мышях было показано, что диета, богатая липидами, также может приводить к накоплению ЛГ в клетках кумулюса, но в самих ооцитах изменяться незначительно (Li et al., 2018). Однако в работе Ma et al. (2012) было показано, что насыщенная липидами диета приводит не только к увеличению веса тела и изменению биохимических показателей крови самок-доноров эмбрионов, но, самое главное, к повышению содержания липидов в преимплантационных эмбрионах, полученных от таких мышей. Помимо мышей, группой Амира Арава было продемонстрировано влияние диеты с повышенным содержанием полиненасыщенных жирных кислот на качественный состав липидов в ооцитах овец (Zeron et al., 2002).

ЛГ связаны с другими клеточными структурами, участвующими в метаболизме. Наиболее часто упоминается совместная локализация ЛГ с митохондриями и эндоплазматическим ретикулумом (Fleming, Saacke, 1972; Kruip et al., 1983; Sturmey et al., 2006, 2009; Thiam et al., 2013; Prates et al., 2014; Welte, Gould, 2017). Ранние исследования, основанные на данных световой и электронной микроскопии, показали тесную пространственную связь между эндоплазматическим ретикулумом, митохондриями и ЛГ в ооцитах КРС (Fleming, Saacke, 1972; Kruip et al., 1983). Основываясь на этих наблюдениях, Kruip et al. (1983) предположили функциональную взаимосвязь между этими тремя элементами, и назвали эти кластеры “метаболическими единицами”, которые, по мнению этих авторов, активны на некоторых стадиях фолликулогенеза/оогенеза, а затем распадаются (Kruip et al., 1983). Исследователи предположили, что тесная связь между ЛГ, эндоплазматическим ретикулумом и митохондриями способствует клеточному метаболизму. В последнее время эти классические представления были подтверждены микроскопическим анализом с использованием современных методов конфокальной микроскопии. Так, при помощи метода FRET была показана тесная связь между митохондриями и ЛГ в ооцитах свиньи (Sturmey et al., 2006). Исследователи показали, что расстояние между митохондриями и ЛГ в ооцитах свиньи на-

ходится в диапазоне 6–10 нм, что эквивалентно толщине клеточной мембраны. Эти данные указывают на то, что большое количество ЛГ ооцитов связано с митохондриями, и что “метаболические единицы” являются достаточно стабильными комплексами (Sturmeу et al., 2006). Совместная локализация ЛГ и митохондрий в ооцитах свиньи была продемонстрирована с помощью ТЕМ (Pedersen et al., 2016). Функциональная взаимосвязь между ЛГ и митохондриями была также подтверждена при изучении ооцитов свиньи (He et al., 2018). Исследователи показали увеличение размера ЛГ в ооцитах свиньи при добавлении мелатонина в среду для ИVM, что, по всей видимости, было связано со снижением активности митохондрий и, как следствие, уменьшением потребления энергетического субстрата из ЛГ (He et al., 2018).

Пространственное распределение ЛГ в цитоплазме отличается у незрелых и зрелых ооцитов. Существуют данные о выраженных видовых особенностях в структуре распределения ЛГ (Dunning et al., 2014). В ооцитах свиней ЛГ расположены в основном на периферии, что особенно заметно после ИVM (Sturmeу et al., 2006), в то время как в незрелых ооцитах мыши ЛГ распределены по цитоплазме равномерно (Dunning et al., 2014). В ходе созревания в ооцитах мышей происходит пространственная реорганизация ЛГ с тенденцией к центральному агрегированию во время созревания (Wood et al., 2008; Dunning et al., 2014). На ооцитах собаки при помощи окрашивания NR с последующей флуоресцентной микроскопией также было показано различное распределение ЛГ в цитоплазме в зависимости от стадии их созревания (Ariu et al., 2016).

В настоящее время имеются ограниченные знания о связи между метаболизмом липидов во время созревания ооцитов и последующим развитием эмбрионов. Существуют данные, свидетельствующие о том, что метаболизм липидов, в результате бета-окисления в КОК перед оплодотворением, влияет на последующий потенциал развития ооцитов (McKeegan, Sturmeу, 2011). Следует отметить, что, по крайней мере, у КРС количество ЛГ снижается на стадии бластоцисты по сравнению с ооцитом (Ordonez-Leon et al., 2014). Это можно объяснить побочным эффектом активного липолиза, обеспечивающего энергию для эмбрионального развития. На партеногенетических преимплантационных эмбрионах свиней было продемонстрировано активное участие гена *SCD1* в образовании ЛГ и развитии эмбрионов в целом (Lee et al., 2018). Ингибируя данный ген, исследователи наблюдали снижение образования ЛГ в партеногенетических эмбрионах свиней, а добавление в среду для культивирования олеиновой кислоты

(100 μ M) нейтрализовало неблагоприятные эффекты ингибитора *SCD1* и приводило к значительному увеличению скорости образования бластоцист, размера и числа ЛГ (Lee et al., 2018).

Таким образом, в отличие от традиционной концепции о том, что липидные гранулы являются лишь хранилищем энергетического субстрата в клетках, современные данные существенно изменили представления о функциях этих активных внутриклеточных структур. Между тем, знания о роли ЛГ в клетках млекопитающих далеки от завершенности. Развитие современных методов микроскопии и спектроскопии, представленных в данном обзоре, позволит интенсифицировать исследования в данной области и внести ясность в понимание о структуре и функциях ЛГ в развитии ооцитов и эмбрионов млекопитающих.

Работа выполнена при поддержке РФФИ № 19-016-00025 и бюджетного проекта ИЦиГ СО РАН № 0324-2019-0041.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aardema H., Vos P.L., Lolicato F. et al. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence // *Biol. Reprod.* 2011. V. 85. № 1. P. 62–69.
- Amstislavsky S., Lindeberg H., Luvoni G.C. Reproductive technologies relevant to the genome resource bank in Carnivora // *Reprod. Dom. Anim.* 2012. V. 47. № 1. P. 164–175.
- Amstislavsky S., Mokrousova V., Brusentsev E. et al. Influence of cellular lipids on cryopreservation of mammalian oocytes and preimplantation embryos: a review // *Biopreserv. Biobank.* 2019. V. 17. № 1. P. 76–83.
- Apparicio M., Ferreira C.R., Tata A. et al. Chemical composition of lipids present in cat and dog oocyte by matrix-assisted desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS) // *Reprod. Dom. Anim.* 2012. V. 47. P. 113–117.
- Arav A., Zeron Y., Leslie S.B. et al. Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes // *Cryobiology.* 1996. V. 33. № 6. P. 589–599.
- Ariu F., Strina A., Murrone O. et al. Lipid droplet distribution of immature canine oocytes in relation to their size and the reproductive stage // *Anim. Sci. J.* 2016. V. 87. № 1. P. 147–150.
- Athenstaedt K., Daum G. The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation // *Cell. Mol. Life Sci.* 2006. V. 63. № 12. P. 1355–1369.
- Barcelo-Fimbres M., Seidel G.E., Jr. Cross-validation of techniques for measuring lipid content of bovine oocytes and blastocysts // *Theriogenology.* 2011. V. 75. № 3. P. 434–444.
- Bradley J., Pope I., Masia F. et al. Quantitative imaging of lipids in live mouse oocytes and early embryos using CARS microscopy // *Development.* 2016. V. 143. № 12. P. 2238–2247.

- Buchberger A.R., DeLaney K., Johnson J. et al.* Mass spectrometry imaging: a review of emerging advancements and future insights // *Analyt. Chem.* 2017. V. 90. № 1. P. 240–265.
- Coherent Raman Scattering Microscopy / Eds. Cheng J.X., Xie X.S. CRC press. 2016.
- Chrenek P., Makarevich A.V., Popelkova M. et al.* Ultrastructure of vitrified rabbit transgenic embryos // *Zygote*. 2014. V. 22. № 4. P. 558–564.
- Daemen S., van Zandvoort M.A., Parekh S.H., Hesselink M.K.* Microscopy tools for the investigation of intracellular lipid storage and dynamics // *Mol. Metabol.* 2015. V. 5. № 3. P. 153–163.
- Da Silva E., Rousseau D.* Molecular order and thermodynamics of the solid-liquid transition in triglycerides via Raman spectroscopy // *Phys. Chem.* 2008. V. 10. № 31. P. 4606–4613.
- Dunmore-Buyze J., Boughner D.R., Macris N., Vesely I.* A comparison of macroscopic lipid content within porcine pulmonary and aortic valves. Implications for bioprosthetic valves // *J. Thor. Cardiovas. Surg.* 1995. V. 110. № 6. P. 1756–1761.
- Dunning K.R., Russell D.L., Robker R.L.* Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation // *Reproduction*. 2014. V. 148. № 1. P. 15–27.
- Durrant B.S., Pratt N.C., Russ K.D. et al.* Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles // *Theriogenology*. 1998. V. 49. № 5. P. 917–932.
- Evans C.L., Xie X.S.* Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: chemical imaging for biology and medicine // *An. Rev. Analyt. Chem.* 2008. V. 1. P. 883–909.
- Farese R.V., Jr., Walther T.C.* Lipid droplets finally get a little RESPECT // *Cell*. 2009. V. 139. № 5. P. 855–860.
- Ferreira C.R., Eberlin L.S., Hallett J.E. et al.* Single oocyte and single embryo lipid analysis by desorption electrospray ionization mass spectrometry // *J. Mass Spec.* 2012. V. 47. № 1. P. 29–33.
- Ferreira C.R., Jarmusch A.K., Pirro V. et al.* Ambient ionisation mass spectrometry for lipid profiling and structural analysis of mammalian oocytes, preimplantation embryos and stem cells // *Reprod. Fertil. Dev.* 2015. V. 27. № 4. P. 621–637.
- Fleming W.N., Saacke R.G.* Fine structure of the bovine oocyte from the mature graafian follicle // *J. Reprod. Fertil.* 1972. V. 29. P. 203–213.
- Fujihira T., Kinoshita M., Sasaki M. et al.* Comparative studies on lipid analysis and ultrastructure in porcine and southern minke whale (*Balaenoptera bonaerensis*) oocytes // *J. Reprod. Dev.* 2004. V. 50. № 5. P. 525–532.
- Fujimoto T., Parton R.G.* Not just fat: the structure and function of the lipid droplet // *Cold Spring Har. Persp. Biol.* 2011. V. 3. № 3. a004838.
- Genicot G., Leroy J.L.M.R., Van Soom A. et al.* The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes // *Theriogenology*. 2005. V. 63. № 4. P. 1181–1194.
- Goncalves R.F., Ferreira M.S., de Oliveira D.N. et al.* Analysis and characterisation of bovine oocyte and embryo biomarkers by matrix-assisted desorption ionisation mass spectrometry imaging // *Reprod. Fertil. Dev.* 2016. V. 28. № 3. P. 293–301.
- Hale G.M., Querry M.R.* Optical constants of water in the 200-nm to 200- μ m wavelength region // *Appl. Opt.* 1973. V. 12. № 3. P. 555–563.
- He B., Yin C., Gong Y. et al.* Melatonin-induced increase of lipid droplets accumulation and *in vitro* maturation in porcine oocytes is mediated by mitochondrial quiescence // *J. Cell. Physiol.* 2018. V. 233. № 1. P. 302–312.
- Guraya S.S.* A histochemical analysis of lipid yolk deposition in the oocytes of cat and dog // *J. Exp. Zoo.* 1965. V. 160. № 1. P. 123–135.
- Henault M.A., Killian G.J.* Composition and morphology of lipid droplets from oviduct epithelial cells // *Anatom. Rec.* 1993. V. 237. № 4. P. 466–474.
- Hosokawa M., Ando M., Mukai S. et al.* *In vivo* live cell imaging for the quantitative monitoring of lipids by using Raman microspectroscopy // *Analyt. Chem.* 2014. V. 86. № 16. P. 8224–8230.
- Ishigaki M., Kawasaki S., Ishikawa D. et al.* Near-infrared spectroscopy and imaging studies of fertilized fish eggs: *in vivo* monitoring of egg growth at the molecular level // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 20066.
- Jeong W.J., Cho S.J., Lee H.S. et al.* Effect of cytoplasmic lipid content on *in vitro* developmental efficiency of bovine IVP embryos // *Theriogenology*. 2009. V. 72. № 4. P. 584–589.
- Khandoker M.Y., Tsujii H., Karasawa D.* Fatty acid analysis of oocytes, oviductal and uterine fluids of rabbit // *Anim. Sci. Technol.* 1996. V. 67. P. 549–553.
- Khandoker M.Y., Tsujii H., Karasawa D.* Fatty acid composition of blood serum, oocytes, embryos and reproductive tract fluids of rat and comparison with BSA // *Nihon. Chikusan. Gakkaiho.* 1997. V. 68. P. 1070–1074.
- Kim J.Y., Kinoshita M., Ohnishi M. et al.* Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and *in vitro* matured bovine oocytes // *Reproduction*. 2001. V. 122. № 1. P. 131–138.
- Kruip T.A., Cran D.G., Van Beneden T.H. et al.* Structural changes in bovine oocytes during final maturation *in vivo* // *Mol. Reprod. Dev.* 1983. V. 8. № 1. P. 29–47.
- Kuerschner L., Moessinger C., Thiele C.* Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets // *Traffic*. 2008. V. 9. № 3. P. 338–352.
- Leao B.C., Rocha-Frigoni N.A., Cabral E.C. et al.* Membrane lipid profile monitored by mass spectrometry detected differences between fresh and vitrified *in vitro*-produced bovine embryos // *Zygote*. 2015. V. 23. P. 732–741.
- Lee D.K., Choi K.H., Hwang J.Y. et al.* Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 is required for lipid droplet formation in pig embryo // *Reproduction*. 2018. pii: REP-18-0556.R1.
- Leroy J.L., Genicot G., Donnay I., Van Soom A.* Evaluation of the lipid content in bovine oocytes and embryos with

- nile red: a practical approach // *Reprod. Dom. Anim.* 2005. V. 40. № 1. P. 76–78.
- Li J., Wang S., Wang B. et al. High-fat-diet impaired mitochondrial function of cumulus cells but improved the efficiency of parthenogenetic embryonic quality in mice // *Anim. Cells. Syst. (Seoul)*. 2018. V. 22. № 4. P. 243–252.
- Loewenstein J.E., Cohen A.I. Dry mass, lipid content and protein content of the intact and zona-free mouse ovum // *Development*. 1964. V. 12. № 1. P. 113–121.
- Ma W., Yang X., Liang X. Obesity does not aggravate vitrification injury in mouse embryos: a prospective study // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2012. V. 10. P. 68.
- Martins L.R., Tirloni R.R., Landim-Alvarenga F. et al. Ultrastructural cytoplasmic characteristics of domestic cat (*Felis catus*) oocytes according to ovarian status and *in vitro* maturation // *Cur. Mic. Adv. Sci. Tech.* 2012. P. 302–308.
- Matorras R., Ruiz J.I., Mendoza R. et al. Fatty acid composition of fertilization-failed human oocytes // *Hum. Reprod.* 1998. V. 13. № 8. P. 2227–2230.
- McEvoy T.G., Coull G.D., Broadbent P.J. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida // *J. Reprod. Fert.* 2000. V. 118. № 1. P. 163–170.
- McKeegan P.J., Sturme R.G. The role of fatty acids in oocyte and early embryo development // *Reprod. Fert. Dev.* 2011. V. 24. № 1. P. 59–67.
- Monsefi M., Khalifeh B., Nikeghbal S. Effects of *Anethum graveolens* L. on *in vitro* matured mouse oocytes and granulosa cells // *Avicenna J. Med. Biotechnol.* 2018. V. 10. № 4. P. 220–226.
- Muller M., Schins J.M. Imaging the thermodynamic state of lipid membranes with multiplex CARS microscopy // *J. Phys. Chem. B.* 2002. V. 106. № 14. P. 3715–3723.
- Nagano M., Katagiri S., Takahashi Y. Relationship between bovine oocyte morphology and *in vitro* developmental potential // *Zygote*. 2006. V. 14. № 1. P. 53–61.
- 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. V. 635. P. 37–43.
- Okotrub K.A., Mokrousova V.I., Amstislavsky S.Y., Surovtsev N.V. Lipid droplet phase transition in freezing cat embryos and oocytes probed by Raman spectroscopy // *Biophys. J.* 2018. P. 1–11.
- Ordóñez-Leon E.A., Merchant H., Medrano A. et al. Lipid droplet analysis using *in vitro* bovine oocytes and embryos // *Reprod. Dom. Anim.* 2014. V. 49. № 2. P. 306–314.
- Pawlak P., Warzych E., Cieslak A. et al. The consequences of porcine IVM medium supplementation with follicular fluid become reflected in embryo quality, yield and gene expression patterns // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 15306.
- Pedersen H.S., Callesen H., Lovendahl P. et al. Ultrastructure and mitochondrial numbers in pre- and postpubertal pig oocytes // *Reprod. Fert. Dev.* 2016. V. 28. № 5. P. 586–598.
- Prates E.G., Nunes J.T., Pereira R.M. A role of lipid metabolism during cumulus-oocyte complex maturation: impact of lipid modulators to improve embryo production // *Med. Inflamm.* 2014. P. 2014.
- Reynaud K., Fontbonne A., Marseloo N. et al. *In vivo* canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: A review // *Theriogenology*. 2006. V. 66. № 6. P. 1685–1693.
- Romek M., Gajda B., Krzysztofowicz E. et al. New technique to quantify the lipid composition of lipid droplets in porcine oocytes and pre-implantation embryos using Nile Red fluorescent probe // *Theriogenology*. 2011. V. 75. № 1. P. 42–54.
- Sassi P., Caponi S., Ricci M. et al. Infrared versus light scattering techniques to monitor the gel to liquid crystal phase transition in lipid membranes // *J. Ram. Spectr.* 2015. V. 46. № 7. P. 644–651.
- Schie I.W., Nolte L., Pedersen T.L. et al. Direct comparison of fatty acid ratios in single cellular lipid droplets as determined by comparative Raman spectroscopy and gas chromatography // *Analyst*. 2013. V. 138. № 21. P. 6662–6670.
- Sessions-Bresnahan D.R., Schauer K.L., Heuberger A.L. et al. Effect of obesity on the preovulatory follicle and lipid fingerprint of equine oocytes // *Biol. Reprod.* 2016. V. 94. № 1. P. 1–12.
- Sieme H., Oldenhof H., Wolkers W.F. Sperm membrane behaviour during cooling and cryopreservation // *Reprod. Dom. Anim.* 2015. V. 50. P. 20–26.
- Sturme R.G., O'Toole P.J., Leese H.J. Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial: lipid association in the porcine oocyte // *Reproduction*. 2006. V. 32. № 6. P. 829–837.
- Sturme R.G., Reis A., Leese H.J. et al. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development // *Reprod. Dom. Anim.* 2009. V. 44. P. 50–58.
- Sudano M.J., Marinho L.S.R., Costa C.B., Cancian R. Cryopreservation of bovine embryos / Eds. Seneda M., Silva-Santos K., Marinho L.S.R. *Biotech. Anim. Reprod.* New-York: Nova Science Publishers. 2016. P. 193–216.
- Thiam A.R., Farese Jr R.V., Walther T.C. The biophysics and cell biology of lipid droplets // *Mol. Cell Biol.* 2013. V. 33. № 12. P. 775.
- Walther T.C., Farese R.V. The life of lipid droplets // *Biochim. Biophys. Act. (BBA) Mol. Cell Biol. Lipids*. 2009. V. 1791. № 6. P. 459–466.
- Walther T.C., Farese R.V. Lipid droplets and cellular lipid metabolism // *An. Rev. Biochem.* 2012. V. 81. P. 687–714.
- Wang G., Tsujii H., Khandoker M.Y. Fatty acid compositions of mouse embryo, oviduct and uterine fluid // *Nih. Chik. Gak.* 1998. V. 69. P. 923–928.
- Warzych E., Pawlak P., Pszczola M. et al. Interactions of bovine oocytes with follicular elements with respect to lipid metabolism // *J. Anim. Sci.* 2017. V. 88. № 10. P. 1491–1497.
- Welte M.A., Gould A.P. Lipid droplet functions beyond energy storage // *Biochim. Biophys. Act. (BBA) Mol. Cell Biol. Lipids*. 2017. V. 1862. № 10. P. 1260–1272.

- Wood B.R., Chernenko T., Matthaus C. *et al.* Shedding new light on the molecular architecture of oocytes using a combination of synchrotron Fourier transform-infrared and Raman spectroscopic mapping // *Analyt. Chem.* 2008. V. 80. № 23. P. 9065–9072.
- Wood T.C., Wildt D.E. Effect of the quality of the cumulus-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts *in vitro* // *J. Reprod. Fertil.* 1997. V. 110. P. 355–360.
- Zeron Y., Ocheretny A., Kedar O. *et al.* Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles // *Reproduction.* 2001. V. 121. № 3. P. 447–454.
- Zeron Y., Sklan D., Arav A. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chillingsensitivity of ewe oocytes // *Mol. Reprod. Dev.* 2002. V. 61. P. 271–278.
- Zoladek A., Pascut F.C., Patel P. *et al.* Non-invasive time-course imaging of apoptotic cells by confocal Raman micro-spectroscopy // *J. Ram. Spectr.* 2011. V. 42. № 3. P. 251–258.

The Role of Lipid Droplets for the Development of Oocytes and Preimplantation Embryos in Mammals

E. Yu. Brusentsev¹, V. I. Mokrousova^{1,2}, T. N. Igonina¹, I. N. Rozhkova¹, and S. Ya. Amstislavsky^{1,*}

¹*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

²*Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia*

**e-mail: amstis@yandex.ru*

Received February 27, 2019; revised May 7, 2019; accepted May 15, 2019

Lipids are among the most common and important cell components. In particular, cytoplasmic lipid droplets (LDs) play a crucial role in cellular energy metabolism. The main emphasizes of this review are made on the modern approaches to study intracellular lipids, their composition and the role of LDs in the oocyte maturation and the early embryonic development. Recent studies show that LDs in oocytes and embryos functioning not only as storage of the energy substrate, but may be considered as active intracellular structures that perform many other functions.

Keywords: lipid droplets, oocytes, preimplantation embryos