



## АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК ГРАНУЛЕЗЫ ОВАРИАЛЬНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ СВИНЕЙ

Кузьмина Т.И., (✉)Притужалова А.О., Ширяев Г.В., Старикова Д.А.,  
Курочкин А.А., Баранова Е.И., Соколова Н.О.

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения  
сельскохозяйственных животных – филиал Всероссийского института животноводства  
им. академика Л.К. Эрнста  
Санкт-Петербург, п. Тярлево, Россия  
(✉)e-mail: aklevakina14@mail.ru

Функционирование клеток гранулезы овариальных фолликулов (ОФ) животных детерминирует рост и развитие ОФ и формирующегося в нем ооцита, что определяет их использование при моделировании состава сред для созревания ооцитов *in vitro* в клеточных репродуктивных технологиях. Цель исследования – с использованием комплексного тестирования показателей жизнеспособности клеток гранулезы (уровень апоптозов, продукция активных форм кислорода, функциональная активность митохондрий и липидома) и гормонального статуса жидкости фолликулов (уровень эстрадиола, тестостерона, антимюллерова гормона) определить особенности функциональной активности гранулезных клеток в фолликулах разного диаметра (< 3, 3–5, 5–8 мм) с целью оптимизации состава культуральных сред для экстракорпорального созревания ооцитов свиней. В ходе экспериментов обнаружено, что доля апоптотических клеток в ОФ возрастает в процессе роста диаметра ОФ (на 11% в ОФ диаметром 5–8 мм, на 4% в ОФ диаметром < 3 мм). Отмечено увеличение числа клеток с высоким содержанием активных форм кислорода (на 10% в ОФ диаметром 5–8 мм по сравнению с ОФ диаметром < 3 мм) и высокой митохондриальной активностью (на 12% в ОФ диаметром 5–8 мм по сравнению с ОФ диаметром < 3 мм). Обнаружены корреляции между группой клеток с высокой генерацией активных форм кислорода и уровнем апоптозов (0,500,  $p < 0,05$ ), а также с высоким уровнем митохондриальной активности (0,500,  $p < 0,05$ ). Концентрация эстрадиола в фолликулярной жидкости по мере роста ОФ повышалась (1,50 нг/мл в ОФ диаметром < 3 мм и 2,09 нг/мл в ОФ диаметром 3–5 мм,  $p < 0,01$ ), почти не меняясь в ОФ диаметром 5–8 мм (2,11 нг/мл), как и концентрация тестостерона. Выявлены корреляции между долей клеток с высокой ИФ NileRed/ЛК (маркер функциональной активности липидных капель) и уровнем эстрадиола (0,998,  $p < 0,05$ ), тестостерона (0,500,  $p < 0,05$ ), антимюллерова гормона (–0,500,  $p < 0,05$ ) в динамике фолликулогенеза, а также между концентрацией эстрадиола и долей клеток с высокой митохондриальной активностью (0,746,  $p < 0,05$ ). Обнаружены корреляции между концентрациями эстрадиола и антимюллерова гормона, тестостерона и антимюллерова гормона (–1,000,  $p < 0,05$ ), между уровнем апоптотических клеток и концентрацией антимюллерова гормона в фолликулярной жидкости (–1,000,  $p < 0,05$ ). Результаты проведенного мониторинга показателей жизнеспособности и функциональной активности клеток гранулезы ОФ свиней дополняют имеющиеся сведения об особенностях их функционирования в динамике фолликулогенеза и могут быть использованы при моделировании систем экстракорпорального дозревания донорских ооцитов *Sus Scrofa Domestica*.

**Ключевые слова:** гранулеза, *Sus Scrofa Domestica*, митохондрии, активные формы кислорода, апоптоз, стероидные гормоны, антимюллеров гормон, липидные капли

## ANALYSIS OF FUNCTIONAL ACTIVITY OF GRANULOSA CELLS OF PORCINE OVARIAN FOLLICLES

Kuzmina T.I., (✉)Prituzhalova A.O., Shiryayev G.V., Starikova D.A.,  
Kurochkin A.A., Baranova E.I., Sokolova N.O.

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding – Branch of the L.K. Ernst Federal  
Research Center for Animal Husbandry

Tyarlevo, Saint Petersburg, Russia

(✉)e-mail: aklevakina14@mail.ru

Functioning of the granulosa cells of animal ovarian follicles (OF) determines the growth and development of the OF and the oocyte formed in it, which determines their use in modeling the composition of media for oocyte maturation *in vitro* in cell reproductive technologies. The purpose of the study is to determine the peculiarities of functional activity of granulosa cells in follicles of different diameters (< 3, 3–5, 5–8 mm) using complex testing of granulosa cell viability parameters (apoptosis level, production of reactive oxygen species, functional activity of mitochondria and lipidome) and hormonal status of follicle fluid (estradiol, testosterone, anti-Müllerian hormone level) in order to optimize the composition of the culture media for *in vitro* maturation of pig oocytes. The experiments found that the proportion of apoptotic cells in the OF increased as the diameter of the OF increased (by 11% in OFs 5–8 mm in diameter, by 4% in OFs < 3 mm in diameter). There was an increase in the number of high reactive oxygen species cells (by 10% in 5–8 mm diameter OF compared with < 3 mm diameter OF) and high mitochondrial activity (by 12% in 5–8 mm diameter OF compared with < 3 mm diameter OF). Correlations were found between the group of cells with high generation of reactive oxygen species and the level of apoptosis (0.500,  $p < 0.05$ ), as well as with high levels of mitochondrial activity (0.500,  $p < 0.05$ ). Estradiol concentration in follicular fluid increased as the OF grew (1.50 ng/ml in OF < 3 mm diameter and 2.09 ng/ml in OF 3–5 mm diameter,  $p < 0.01$ ), being almost unchanged in OF 5–8 mm diameter (2.11 ng/ml), as was the testosterone concentration. Correlations were found between the proportion of the cells with high NileRed/LD FI (a marker of lipid droplet functional activity) and the levels of estradiol (0.998,  $p < 0.05$ ), testosterone (0.500,  $p < 0.05$ ), and anti-Müllerian hormone (–0.500,  $p < 0.05$ ) in the dynamics of folliculogenesis, as well as between estradiol concentration and the proportion of cells with high mitochondrial activity (0.746,  $p < 0.05$ ). Correlations were detected between the concentrations of estradiol and anti-Müllerian hormone, testosterone and anti-Müllerian hormone (–1.000,  $p < 0.05$ ), between the level of apoptotic cells and the concentration of anti-Müllerian hormone in follicular fluid (–1.000,  $p < 0.05$ ). The results of the monitoring of the viability and functional activity of porcine OF granulosa cells supplement the available data on the peculiarities of their functioning in the dynamics of folliculogenesis and can be used in modeling the systems of *in vitro* maturation of donor oocytes of *Sus Scrofa Domesticus*.

**Keywords:** granulosa, *Sus Scrofa Domesticus*, mitochondria, ROS, apoptosis, steroid hormones, anti-Müllerian hormone, lipid drops

**Для цитирования:** Кузьмина Т.И., Притужалова А.О., Ширяев Г.В., Старикова Д.А., Курочкин А.А., Баранова Е.И., Соколова Н.О. Анализ функциональной активности клеток гранулезы овариальных фолликулов свиней // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2023. Т. 53. № 12. С. 68–81. <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2023-12-8>

**For citation:** Kuzmina T.I., Prituzhalova A.O., Shiryayev G.V., Starikova D.A., Kurochkin A.A., Baranova E.I., Sokolova N.O. Analysis of functional activity of granulosa cells of porcine ovarian follicles. *Sibirskii vestnik sel'skokhozyaistvennoi nauki* = *Siberian Herald of Agricultural Science*, 2023, vol. 53, no. 12, pp. 68–81. <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2023-12-8>

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### Благодарность

Работа поддержана Российским научным фондом, проект № 22-16-00084.

### Acknowledgements

The work was supported by the Russian Scientific Foundation, project No. 22-16-00084.

## ВВЕДЕНИЕ

Клеточные репродуктивные ДНК-технологии – одно из значимых направлений в свиноводческой отрасли, включающее тиражирование высокоценных особей путем клонирования, сохранение генофонда существующих и исчезающих пород, создание криобанка гамет. Развитие указанного направления, в частности методик редактирования генома, обусловило повышение интереса к виду *Sus Scrofa Domestica* со стороны биотехнологов по причине возможности применения данного вида как модельного объекта для понимания течения различных заболеваний у человека, тестирования фармакологических препаратов, устройств медицинского назначения в рамках гуманной медицины, ксенотрансплантации органов и т.д. [1]. Для создания интактных, трансгенных и клонированных эмбрионов необходимо наличие донорских ооцитов с высоким качеством оопласта, что достигается созданием *in vitro* адекватных условий созревания женской гаметы *in vivo*.

Фолликулярный рост и созревание яйцеклеток в яичниках млекопитающих представляют собой процессы клеточной дифференцировки, сопровождающиеся комплексом морфологических, биохимических и молекулярных трансформаций различных компонентов фолликула, а именно: ооцита и соматических клеток. Знание механизмов и особенностей взаимодействия и функционирования структурных компонентов фолликула *in vivo* позволит создать модель среды, отвечающей физиологическим «запросам» развивающейся женской гаметы [2]. Разработанные до настоящего времени системы дозревания донорских ооцитов свиней обеспечивают получение не более 40–45% эмбрионов на завершающей стадии бластоцисты, что сви-

детельствует о недостаточной эффективности состава культуральных сред<sup>1</sup>. Лучшие результаты достигаются при использовании в системах культивирования структурных компонентов фолликулов (стенка фолликулов, клетки гранулезы)<sup>2</sup>. Однако в техническом исполнении получение стенок фолликулов, предварительно отселектированных по морфологическим критериям, достаточно трудоемкий процесс, что усложняет работу эмбриотехнологов. Применение клеток гранулезы позволяет восполнить культуральные среды продуктами их секреции. Так как высокими потенциями к оплодотворению *in vitro* обладают, как показано в многочисленных исследованиях, ооциты из фолликулов диаметром 3–5 мм, значительный интерес представляют гормональный профайлинг жидкости, выделенной из фолликулов разного диаметра, и выявление характера апоптотических процессов, генерации активных форм кислорода в совокупности с анализом активности клеточных компартментов гранулезных клеток.

Созревание ооцита – сложный процесс, являющийся результатом гормональных взаимодействий, поддающийся регулированию и включающий в себя координацию множества событий, которые позволяют возобновить мейоз и приобрести компетентность к дальнейшему оплодотворению в условиях *in vivo*. Создание *in vitro* условий, максимально приближенных к описанным выше, имеет свои сложности, требующие модификации. Одним из методов моделирования систем экстракорпорального созревания донорских ооцитов является использование структурных компонентов антральных овариальных фолликулов, в частности клеток гранулезы, что позволяет значительно повысить показатели оплодотворяемости созревшего *in vitro* ооцита<sup>3,4</sup>.

<sup>1</sup>Soriano-Úbeda C., García-Vázquez F.A., Romero-Aguirregomez Corta J., Matas C. Improving porcine *in vitro* fertilization output by simulating the oviductal environment // Scientific Reports. 2017. Vol. 7. Art. 43616.

<sup>2</sup>Abeydeera L.R., Wang W.H., Cantley T.C., Rieke A., Day B.N. Coculture with follicular shell pieces can enhance the developmental competence of pig oocytes after *in vitro* fertilization: relevance to intracellular glutathione // Biology of reproduction. 1998. Vol. 58 (1). P. 213–218.

<sup>3</sup>Кузьмина Т.И., Стефанова В.Н., Альм Х., Торнер Х. Мониторинг цитоморфологических параметров развития доимплантационных эмбрионов коров, полученных из ооцитов, созревших в модифицированных средах // Конкурентоспособность и качество животноводческой продукции: материалы науч.-практ. конф. Жодино, 2014. С. 81–85.

<sup>4</sup>Кузьмина Т.И., Скотти О.С., Кибардина Т.В. Использование кондиционированных сред в технологии получения эмбрионов коров *in vitro* // Стратегия развития зоотехнической науки: тез. докл. междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 60-летию зоотехнической науки Беларуси (Жодино, 15–16 октября 2009 г.) / Редкол.: И.П. Шейко (гл. ред.) [и др.]. Жодино, 2009. С. 99–100.

Клетки гранулезы – компонент многомерной биологической системы в фолликулах. Работая через паракринные факторы, а также передачу сигналов с помощью целевых соединений, они принимают непосредственное участие в формировании необходимого микроокружения для роста и созревания ооцита [3, 4]. Кроме того, клетки гранулезы выступают главными продуцентами стероидных гормонов в процессе фолликулогенеза, увеличивая выработку эстрадиола путем ароматизации андрогенов, полученных из тека-клеток [5], преобразовывая поступивший холестерин посредством ферментативных превращений в стероидные гормоны с помощью митохондрий [6]. Помимо холестерина, клетки гранулезы содержат и другие производные липидов, которые находятся в составе мембран клетки и клеточных органелл (фосфолипиды, гликолипиды, нейтральные липиды) [7], а также хранятся в клетках в виде энергетических запасов (триацилглицериды), выступая, при необходимости, мощным источником энергии [8].

Выработка аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) в качестве энергетического субстрата посредством митохондриального окислительного фосфорилирования необходима для пролиферации гранулезных клеток в процессе фолликулогенеза [9]. При этом побочный продукт фосфорилирования в виде активных форм кислорода (АФК) в физиологически приемлемых концентрациях играет жизненно важную роль в физиологической активности яичников в качестве вторичного мессенджера для передачи клеточных сигналов [10], участвует в регуляции овариального цикла, в том числе мейоза [11], овуляции<sup>5</sup>, поддержании желтого тела [12] и регрессии [13]. В избыточном количестве АФК способны вызвать повреждение митохондриальной и ядерной ДНК, окисление некоторых аминокислот и перекисное окисление липидов, что, в свою очередь, может индуцировать клеточную гибель [14].

Цель исследования – с использованием комплексного тестирования показателей жиз-

неспособности клеток гранулезы (уровень апоптозов, продукция АФК, функциональная активность митохондрий и липидома) и гормонального статуса жидкости фолликулов (уровень содержания эстрадиола, тестостерона, антимюллерова гормона) идентифицировать особенности функциональной активности гранулезных клеток в фолликулах разного диаметра с целью оптимизации состава культуральных сред для экстракорпорального созревания ооцитов свиней.

В соответствии с поставленной целью в исследовании решались следующие задачи:

1) оценка показателей жизнеспособности клеток гранулезы (апоптоз, генерация АФК), отобранных из фолликулов разного диаметра (< 3, 3–5, 5–8 мм);

2) анализ функциональной активности липидома и митохондрий клеток гранулезы из фолликулов указанного диаметра;

3) проведение гормонального профайлинга (эстрадиол, тестостерон, антимюллеров гормон) жидкости фолликулов заявленного диаметра.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали 64 постмортальных яичника от 32 6–8-месячных свинок породы ландрас. Яичники получены на мясоперерабатывающем комбинате «Тосненский» (Ленинградская область), после чего доставлены в лабораторию Всероссийского научно-исследовательского института генетики и разведения сельскохозяйственных животных. Материал отбирали на стадии фолликулярного роста. Использовали яичники без патологических изменений. По результатам замеров с помощью электронного штангенциркуля 2275 фолликулов были ранжированы по диаметру < 3, 3–5, 5–8 мм. Фолликулярную жидкость и клетки гранулезы аспирировали из 20–30 фолликулов каждого яичника, объединяя их в группы по диаметру, затем центрифугировали 6 мин при 300 об./мин. Далее осадок, содержащий клетки гранулезы, суспендировали в фосфат-

<sup>5</sup>Shkolnik K., Tadmor A., Ben-Dor S., Nevo N., Galiani D., Dekel N. Reactive oxygen species are indispensable in ovulation // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2011. Vol. 108 (4). P. 1462–1467.



но-солевом буфере (PBS) для дальнейшего цитогенетического анализа. Супернатант в виде фолликулярной жидкости распределяли на аликвоты и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  до последующего иммуноферментного анализа для гормонального профайлинга (определение уровня тестостерона, эстрадиола и антимюллерова гормона).

Определение доли мертвых клеток проводили с помощью флуорохрома пропидия йодид (PI). Клетки гранулезы дважды отмывали в PBS-буфере с осаждением при центрифугировании на 1200 об./мин в течение 7 мин. Клетки анализировали сразу после добавления PI к исследуемым образцам до получения конечной концентрации 5 мкг/мл. Образцы исследовали на проточном цитометре CytoFlex (Beckman Coulter Life Sciences, США).

Содержание внутриклеточного  $\text{H}_2\text{O}_2$  определяли методом проточной цитометрии с применением проточного цитометра CytoFlex. Для этого клетки гранулезы дважды отмывали в PBS-буфере (1200 об./мин, 7 мин) и добавляли 2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетат (DCFH-DA) в конечной концентрации 5 мкМ/мл с последующей инкубацией в течение 30 мин при температуре  $38,5^{\circ}\text{C}$ . Затем осадок дважды отмывали от остатков флуорохрома (1200 об./мин, 7 мин). При анализе флуоресценции на проточном цитометре выделяли две популяции клеток – с высоким и низким содержанием пероксида водорода<sup>6</sup>.

Активность митохондрий клеток гранулезы оценивали с помощью флуоресцентного красителя TMRE (tetramethylrhodamine ethyl ester perchlorate) с применением проточного цитометра CytoFlex. Этиловый эфир тетраметилродамина (TMRE) представляет собой проницаемый для клеток положительно заряженный красно-оранжевый краситель (max возбуждения 549 нм, эмиссии 574 нм), который накапливается в активных митохондриях из-за их относительно отрицательного заряда. Неактивные или деполяризованные митохондрии имеют пониженный мем-

бранный потенциал ( $\Delta\psi\text{M}$ ) и, следовательно, не могут удерживать TMRE, демонстрируя низкий сигнал флуоресценции. Клетки гранулезы дважды отмывали в PBS-буфере с последующим центрифугированием на 1200 об./мин в течение 7 мин. Осадок клеток ресуспендировали в PBS и инкубировали с TMRE в конечной концентрации 1 мкМ в течение 30 мин при температуре  $38,5^{\circ}\text{C}$ . Концентрация для исследуемых образцов подбиралась эмпирически и в соответствии с рекомендациями производителя (Lumiprobe RUS Ltd, Россия). После инкубации клетки отмывали от остатков флуорохрома. При анализе флуоресценции на проточном цитометре выделяли две популяции клеток – с высоким и низким мембранным потенциалом.

Функциональную активность липидома оценивали по интенсивности флуоресценции комплекса Nile Red/липидная капля (ИФ NileRed/ЛК). Для определения ИФ NileRed/ЛК в клетках гранулезы применяли краситель Nile Red (Sigma-Aldrich, США), позволяющий визуализировать нейтральные и полярные липиды. После добавления красителя триглицериды флуоресцируют желтым цветом (580–596, пик флуоресценции – 590 нм), полярные липиды (фосфолипидные бислои) – в оранжевом спектре (597–620, пик – 600 нм)<sup>7</sup>.

После отмывки гранулезы в PBS-буфере клетки ресуспендировали и фиксировали в 1%-м параформальдегиде при комнатной температуре в течение 10 мин. Фиксированные клетки дважды промывали холодным PBS и добавляли краситель Nile Red до рабочей концентрации 10 мкМ, далее инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин в темноте. Окрашенные клетки дважды промывали холодным буфером, затем ресуспендировали в холодном PBS. При анализе выделяли три группы клеток – с высокой, средней и низкой интенсивностью флуоресценции.

<sup>6</sup>Dikalov S., Harrison D. Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species // *Antioxidants and Redox Signaling*. 2014. Vol. 20 (2). P. 372–382.

<sup>7</sup>Genicot G., Leroy J.L., Soom A.V., Donnay I. The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes // *Theriogenology*. 2005. Vol. 63 (4). P. 1181–1194.

Концентрацию тестостерона, эстрадиола и антимюллерова гормона (АМГ) определяли в фолликулярной жидкости с помощью набора реагентов «СтероидИФА-тестостерон», «СтероидИФА-эстрадиол» (Алкор Био, Россия) и ELISA Kit for Anti-Mullerian Hormone для свиней (Cloud-Clone Corp., КНР). Эксперимент проводили в шести повторностях. Все использованные в исследовании реагенты, за исключением обозначенных выше, произведены фирмой Sigma-Aldrich, пластиковая лабораторная посуда – фирмой BD Falcon™ (США).

Результаты обрабатывали с помощью статистической программы Sigma Stat. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали с помощью критерия  $\chi^2$  при трех уровнях значимости:  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ , а также коэффициента Спирмена и критерия Стьюдента.

Схема эксперимента представлена на рис. 1.

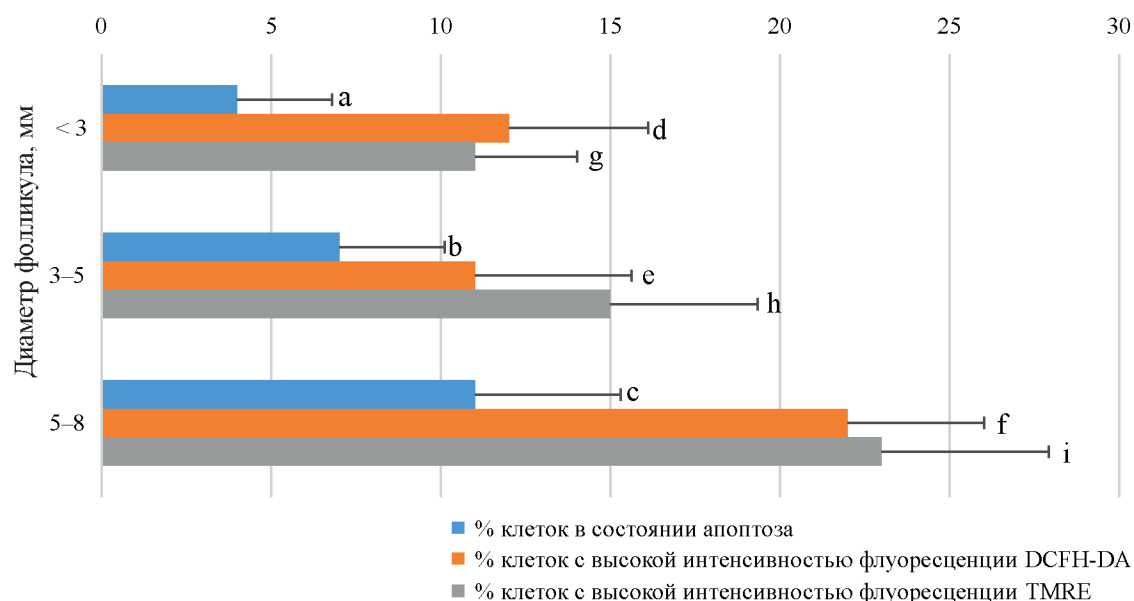
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования установлено, что в процессе роста и развития фолликулов происходит снижение показателей жизнеспособности клеток гранулезы, выражающееся в повышении уровня клеток с признаками апоптоза (4% клеток на стадии апоптоза в фолликулах диаметром  $< 3$  мм, 11% в фолликулах диаметром 5–8 мм,  $p < 0,05$ ) (см. рис. 2). При этом доля клеток с высоким содержанием АФК имела тенденцию к росту (в фолликулах диаметром 5–8 мм данный показатель увеличился на 10% по сравнению с фолликулами диаметром  $< 3$  мм,  $p < 0,05$ ), как и группа клеток с высокой митохондриальной активностью (увеличение на 12% в фолликулах диаметром 5–8 мм по сравнению с фолликулами диаметром  $< 3$  мм,  $p < 0,05$ ). Помимо этого, выявлены достоверные положительные корреляции между ростом доли клеток с высокой генерацией АФК и долей



Рис. 1. Структурно-логическая схема эксперимента

Fig. 1. Structural and logical diagram of the experiment



**Рис. 2.** Апоптотические процессы, генерация АФК и митохондриальная активность в клетках гранулезы из фолликулов разного диаметра:

a:c; a:d; a:e; a:g; d:f; d:i; e:f; f:g; c:f; g:i –  $p < 0,05$ ; e:i –  $p < 0,01$ ; a:f; a:h; a:i; b:f; b:i –  $p < 0,001$ ;  $n = 125,434$ . Корреляция по Спирмену: a, b, c : d, e, f 0,500 ( $p < 0,05$ ); d, e, f : g : h : i 0,500 ( $p < 0,05$ )

**Fig. 2.** Apoptotic processes, ROS generation and mitochondrial activity in granulosa cells from follicles of different diameters:

a:c; a:d; a:e; a:g; d:f; d:i; e:f; f:g; c:f; g:i –  $p < 0,05$ ; e:i –  $p < 0,01$ ; a:f; a:h; a:i; b:f; b:i –  $p < 0,001$ ;  $n = 125,434$ . Spearman correlation: a, b, c : d, e, f 0,500 ( $p < 0,05$ ); d, e, f : g : h : i 0,500 ( $p < 0,05$ )

апоптотических клеток (0,500,  $p < 0,05$ ), а также группой клеток с высокой митохондриальной активностью (0,500,  $p < 0,05$ ).

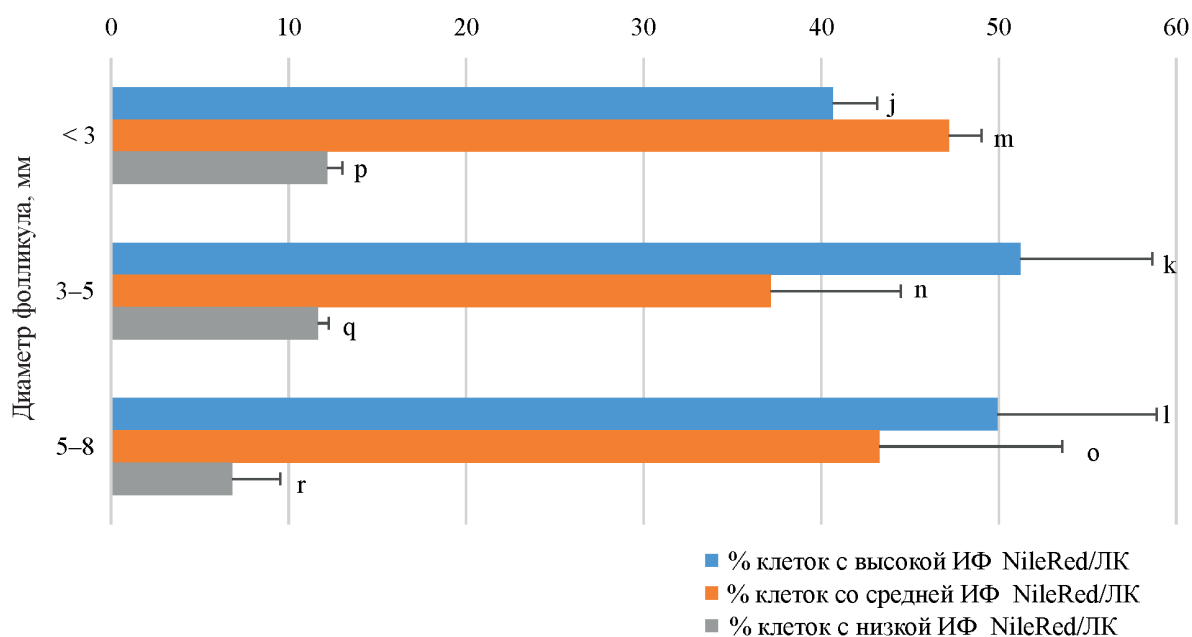
В клетках разных тканей липидные капли, как правило, состоят из нейтральных липидов (в основном триглицеридов и сложных эфиров холестерина), являются субстратами для производства энергии, выступают в качестве сигнальных липидов, служат структурными компонентами для клеточных мембран [15].

На начальной стадии фолликулогенеза наблюдалось повышение ИФ NileRed/ЛК (увеличение доли клеток с высокой интенсивностью флуоресценции на 10%,  $p < 0,05$ ) (см. рис. 3). При этом число клеток, имеющих среднюю ИФ NileRed/ЛК, достоверно снижалось на 10% к этапу роста фолликула до 3–5 мм ( $p < 0,05$ ). Кроме того, отмечена отрицательная корреляция между группами клеток с высокой и средней ИФ NileRed/ЛК (–1,000,  $p < 0,05$ ). Данные значения могут указывать на активное накопление липидных капель к моменту активной пролиферации клеток гранулезы, их слияние в клетках

и, как следствие, увеличение интенсивности флуоресценции. Доля клеток с самой низкой ИФ NileRed/ЛК не показала достоверных различий на всех этапах роста и развития фолликулов.

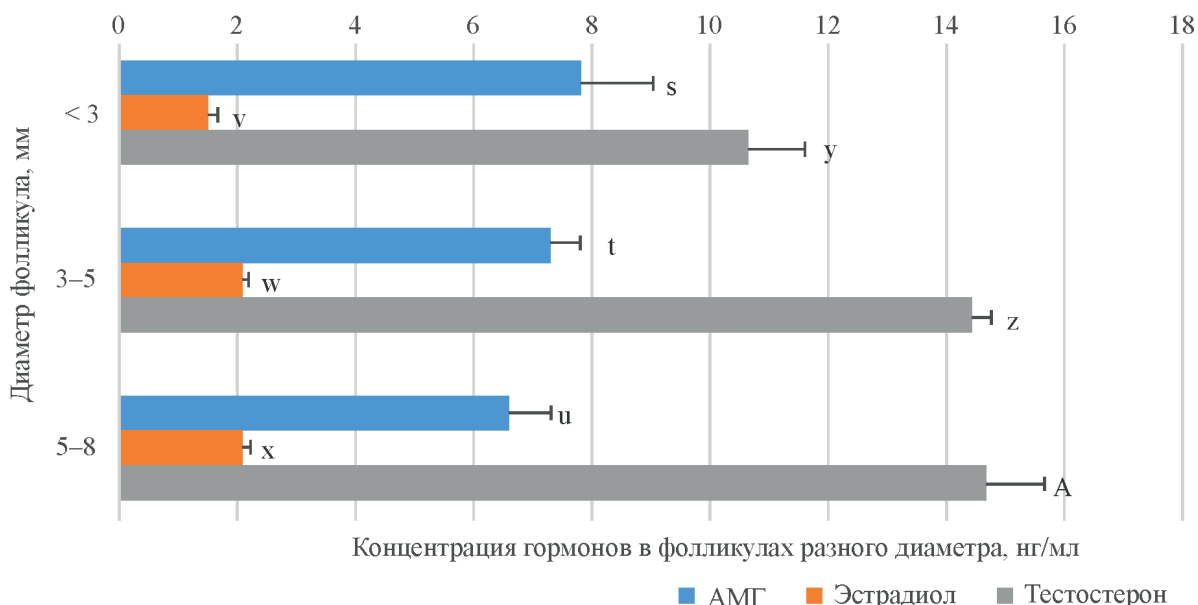
Липиды – один из основных источников энергии во время созревания ооцитов, оплодотворения и предимплантационного развития. В частности, холестерин играет важную роль в качестве предшественника в стероидогенезе [16]. Продукция стероидных гормонов (эстрадиол, тестостерон) является неотъемлемым этапом в формировании необходимых условий для созревания ооцита и его дальнейшей овуляции.

Обнаружено, что концентрация эстрадиола в фолликулярной жидкости овариальных фолликулов в процессе роста и развития повышается (1,50 нг/мл в фолликулах диаметром < 3 мм и 2,09 нг/мл в фолликулах диаметром 3–5 мм,  $p < 0,01$ ), почти не меняясь к завершению роста фолликула (2,11 нг/мл,  $p < 0,01$ ) (см. рис. 4). Схожая тенденция наблюдается и в изменении концентрации те-



**Рис. 3.** Показатели функционирования липидома (интенсивность флуоресценции комплекса NileRed/ЛПК) в клетках гранулезы в фолликулах разного диаметра: j:k; j:l; m:n –  $p < 0,05$ ; j:p; j:q; j:r; k:p; k:q; k:r; l:p; l:q; l:r; m:p; m:q; m:r; n:p; n:q; n:r –  $p < 0,001$ ;  $n = 83,884$ . Корреляция по Спирмену: j, k, l : m, n, o –1,000 ( $p < 0,05$ )

**Fig. 3.** Indicators of lipidome functioning (fluorescence intensity of NileRed/lipid droplet complex) in granulosa cells in follicles of different diameters: j:k; j:l; m:n –  $p < 0,05$ ; j:p; j:q; j:r; k:p; k:q; k:r; l:p; l:q; l:r; m:p; m:q; m:r; n:p; n:q; n:r –  $p < 0,001$ ;  $n = 83,884$ . Spearman correlation: j, k, l : m, n, o –1.000 ( $p < 0,05$ )



**Рис. 4.** Гормональный профиль жидкости из фолликулов разного диаметра: v:w; v:x; y:A –  $p < 0,01$ ; y:z –  $p < 0,001$ . Корреляция по Спирмену: a, b, c : d, e, f – функциональная обратная (–1,000); a, b, c : g : h : i – функциональная обратная (–1,000); d, e, f : g : h : i – функциональная прямая (1,000)

**Fig. 4.** Fluid hormonal profile from follicles of different diameters: v:w; v:x; y:A –  $p < 0,01$ ; y:z –  $p < 0,001$ . Spearman correlation: a, b, c : d, e, f – functional inverse (–1.000); a, b, c : g : h : i – functional inverse (–1.000); d, e, f : g : h : i – functional line (1.000)



стостерона – зафиксирован рост на 3,8 нг/мл в фолликулах диаметром 3–5 мм и на 4,02 нг/мл в фолликулах диаметром свыше 5 мм по сравнению с фолликулами диаметром < 3 мм ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ ). При этом не выявлено достоверных различий в уровне АМГ.

Фолликулогенез является энергоемким процессом и требует биоэнергетической поддержки в клетках гранулезы в связи с интенсивной пролиферацией, в том числе посредством функциональной активности митохондрий, участвующей в клеточном цикле, обеспечивая большую часть клеточной АТФ путем окислительного фосфорилирования. Однако при этом активные окислительные процессы могут выступать инициаторами клеточной гибели посредством интенсивной выработки АФК [17]. В нашем исследовании наблюдался достоверный рост клеток с высоким уровнем АФК в фолликулах диаметром < 3, 3–5 и 8 мм ( $p < 0,05$ ) и высокой митохондриальной активностью ( $p < 0,05$ ), выявлена достоверная корреляция между данными показателями (0,500,  $p < 0,05$ ), что может указывать на интенсивный энергообмен в клетках гранулезы в процессе созревания фолликула.

В растущих антральных фолликулах клетки гранулезы и тека-клетки активно пролиферируют и секретируют различные факторы, продуцируют гормоны и поглощают большое количество липидов и холестерина из плазмы<sup>8</sup> [18]. Нейтральные липиды, такие как триацилглицеролы и стеридовые эфиры, служат предшественниками половых гормонов. В нашем исследовании выявлены достоверные корреляции между долей клеток с высокой ИФ NileRed/ЛК в гранулезных клетках и концентрацией эстрадиола (0,998,  $p < 0,05$ ), тестостерона (0,500,  $p < 0,05$ ) и АМГ (–0,500,  $p < 0,05$ )

в процессе роста фолликулов, отмечена прямая корреляция между концентрацией эстрадиола и долей клеток с высокой митохондриальной активностью (0,746,  $p < 0,05$ ), что подтверждает данные D.B. Sreerangaraja Urs et al. [19].

Антимюллеров гормон представляет собой димерный гликопротеин надсемейства трансформирующего фактора роста бета (TGF-β), продуцируемого непосредственно гранулезными клетками преантральных и ранних антральных фолликулов диаметром до 5–6 мм [20]. АМГ играет ингибирующую роль в рекрутировании примордиальных фолликулов, регулируя рост преантральных и малых антральных фолликулов, ослабляя их реакцию на фолликулостимулирующий гормон [21]. АМГ высоко экспрессируется в гранулезных клетках преантральных и мелких антральных фолликулов.

Доказано, что АМГ является хорошим эндокринным маркером овариального резерва у крупного рогатого скота<sup>9</sup> и кобыл [22], а также прогностическим маркером суперовуляторных ответов для извлечения ооцитов и производства эмбрионов *in vitro* у крупного рогатого скота<sup>10</sup> и коз<sup>11</sup>. В яичниках свиней АМГ имеет тот же паттерн экспрессии и локализации, что и в яичниках людей, грызунов и крупного рогатого скота [23]. Обнаружено, что белок AMHR2 экспрессируется в клетках гранулезы и тека-клетках преантральных и антральных фолликулов человека и свиньи [24].

Наши данные выявили обратную функциональную корреляцию между концентрациями эстрадиола и АМГ, тестостерона и АМГ (–1,000,  $p < 0,05$ ). Кроме того, нами выявлена обратная функциональная корреляция между долей гранулезных клеток в состоянии апоптоза и содержанием АМГ в фолликулярной жидкости (–1,000,  $p < 0,05$ ). По дан-

<sup>8</sup>Петров И.А., Дмитриева М.Л., Тихоновская О.А., Петрова М.С., Логвинов С.В. Тканевые и молекулярные основы фолликулогенеза. Механизмы раннего фолликулярного роста // Проблемы репродукции. 2017. Вып. 23 (5). С. 33–41.

<sup>9</sup>Ireland J.L., Scheetz D., Jimenez-Krassel F., Themmen A.P., Ward F., Lonergan P., Smith G.W., Perez G.I., Evans A.C., Ireland J.J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle // Biology of reproduction. 2008. Vol. 79. P. 1219–1225.

<sup>10</sup>Souza A.H., Carvalho P.D., Rozner A.E., Vieira L.M., Hackbart K.S., Bender R.W., Dresch A.R., Verstegen J.P., Shaver R.D., Wiltbank M.C. Relationship between circulating anti-Mullerian hormone (AMH) and superovulatory response of high producing dairy cows // Journal of dairy science. 2015. Vol. 98. P. 169–178.

<sup>11</sup>Monniaux D., Baril G., Laine A.L., Jarrier P., Poulin N., Cognié J., Fabre S. Anti-Mullerian hormone as a predictive endocrine marker for embryo production in the goat // Reproduction. 2011. Vol. 142. P. 845–854.

ным K.J. Hong et al. [25], уровень АМГ коррелирует с общим количеством извлеченных ооцитов и частотой успеха экстракорпорального оплодотворения. При этом показано, что число зрелых ооцитов положительно и сильно коррелирует с уровнем АМГ в сыворотке ( $r = 0,719$ ,  $p < 0,01$ ), но не с уровнем внутрифолликулярного АМГ. Считается, что содержание АМГ в фолликулярной жидкости положительно коррелирует с уровнем АМГ в сыворотке. K.J. Hong et al. [25] обнаружены примерно одинаковые уровни АМГ в фолликулярной жидкости фолликулов разного диаметра, что соотносится с полученными нами данными.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате серии экспериментов по оценке функциональной активности клеток гранулезы *in vivo* и *in vitro* выявлены особенности их функционирования в процессе роста антральных овариальных фолликулов свиней.

Число апоптотических клеток в ОФ повышалось в зависимости от диаметра фолликулов (на 4% в ОФ диаметром  $< 3$  мм, на 11% в ОФ диаметром 5–8 мм). Отмечено увеличение доли клеток с высоким уровнем АФК (на 12% в ОФ диаметром  $< 3$  мм, на 22% в ОФ диаметром 5–8 мм) и высокой митохондриальной активностью (на 12% в ОФ диаметром 5–8 мм по сравнению с ОФ диаметром  $< 3$  мм). Обнаружены корреляции между группой клеток с высокой генерацией АФК и высоким уровнем апоптозов (0,500,  $p < 0,05$ ), а также с высокой митохондриальной активностью (0,500,  $p < 0,05$ ). Выявлены увеличение доли клеток с высокой ИФ NileRed/ЛК (на 41% в ОФ диаметром  $< 3$  мм, на 50% в ОФ диаметром 5–8 мм,  $p < 0,05$ ) и снижение количества клеток, имеющих среднюю ИФ NileRed/ЛК (на 47% в ОФ диаметром  $< 3$  мм, на 37% в ОФ диаметром 3–5 мм). Показана отрицательная корреляция между группами клеток с высокой и средней ИФ NileRed/ЛК ( $-1,000$ ,  $p < 0,05$ ).

Концентрация эстрадиола в фолликулярной жидкости по мере роста ОФ повышалась

в зависимости от диаметра (1,50 нг/мл в ОФ диаметром  $< 3$  мм и 2,09 нг/мл в ОФ диаметром 3–5 мм,  $p < 0,01$ ), почти не меняясь в ОФ диаметром 5–8 мм (2,11 нг/мл). Изменение концентрации тестостерона имело схожую тенденцию. Данный показатель увеличивался по мере роста фолликула (10,65 нг/мл в ОФ диаметром  $< 3$  мм и 14,43 нг/мл в ОФ диаметром 3–5 мм,  $p < 0,01$ ) и оставался практически на том же уровне в ОФ диаметром 5–8 мм (10,67 нг/мл). Выявлены корреляции между долей клеток с высокой ИФ NileRed/ЛК (маркер функциональной активности липидных капель) и концентрациями эстрадиола (0,998,  $p < 0,05$ ), тестостерона (0,500,  $p < 0,05$ ), АМГ ( $-0,500$ ,  $p < 0,05$ ) в динамике фолликулогенеза, а также между концентрацией эстрадиола и долей клеток с высокой митохондриальной активностью (0,746,  $p < 0,05$ ). Обнаружены корреляции между концентрациями эстрадиола и АМГ, тестостерона и АМГ ( $-1,000$ ,  $p < 0,05$ ), между уровнем апоптотических клеток и концентрацией АМГ в фолликулярной жидкости ( $-1,000$ ,  $p < 0,05$ ).

Выявленные особенности гормонального гомеостаза и функциональной активности гранулезных клеток свиней в ОФ разного диаметра дополняют имеющиеся сведения об их роли в формировании яйцеклетки, компетентной к оплодотворению, характере взаимодействия стероидных гормонов и АМГ, апоптотических процессов и генерации АФК, а также функционировании клеточных компартментов (митохондрии, липидные капли) гранулезы при пролонгированном культивировании. Исходя из имеющихся сведений о высоких компетенциях к созреванию *in vitro* донорских ооцитов свиней, выделенных из фолликулов диаметром более 3 мм, [26] и базируясь на полученных в исследовании результатах, рекомендуем при моделировании системы культивирования для экстракорпорального созревания использовать популяцию клеток гранулезы из фолликулов диаметром 3–5 мм с добавлением гормонов (эстрадиол, тестостерон) в концентрациях, детерминирующих высокие показатели их жизнеспособности (2,9 и 14,43 нг/мл соответственно).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chen P.R., Uh K., Redel B.K., Reese E.D., Prather R.S., Lee K.* Production of Pigs From Porcine Embryos Generated *in vitro* // *Frontiers in Animal Science*. 2022. Vol. 3. Art. 826324. DOI: 10.3389/fanim.2022.826324.
2. *Fowler K.E., Mandawala A.A., Griffin D.K., Walling G.E., Harvey S.C.* The production of pig preimplantation embryos *in vitro*: current progress and future prospects // *Reproductive biology*. 2018. Vol. 18 (3). P. 203–211. DOI: 10.1016/j.repbio.2018.07.001.
3. *Shah J.S., Sabouni R., Vaught K.C.C., Owen C.M., Albertini D.F., Segars J.H.* Biomechanics and mechanical signaling in the ovary: a systematic review // *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2018. Vol. 35 (7). P. 1135. DOI: 10.1007/s10815-018-1180-y.
4. *Eppig J.J.* Reproduction: Oocytes Call, Granulosa Cells Connect // *Current Biology*. 2018. Vol. 28 (8). P. 354. DOI: 10.1016/j.cub.2018.03.005.
5. *Wu G., Li C., Tao J., Liu Z., Li X., Zang Z., Fu C., Wei J., Yang Y., Zhu Q., Zhang J.Q., Shen M., Liu H.* FSH mediates estradiol synthesis in hypoxic granulosa cells by activating glycolytic metabolism through the HIF-1 $\alpha$ -AMPK-GLUT1 signaling pathway // *The Journal of biological chemistry*. 2022. Vol. 298 (5). Art. 101830. DOI: 10.1016/j.jbc.2022.101830.
6. *Sreerangaraja Urs D.B., Wu W.H., Komrskova K., Postlerova P., Lin Y.F., Tzeng C.R., Kao S.H.* Mitochondrial Function in Modulating Human Granulosa Cell Steroidogenesis and Female Fertility // *International journal of molecular sciences*. 2020. Vol. 21 (10). Art. 3592. DOI: 10.3390/ijms21103592.
7. *Renne M.F., Hariri H.* Lipid Droplet-Organellar Contact Sites as Hubs for Fatty Acid Metabolism, Trafficking, and Metabolic Channeling // *Frontiers in cell and developmental biology*. 2021. Vol. 9. Art. 726261. DOI: 10.3389/fcell.2021.726261.
8. *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 // *Biology of Reproduction*. 2020. Vol. 103 (1). P. 36–48. DOI: 10.1093/biolre/iaaa045.
9. *Hoque S.A.M., Kawai T., Zhu Z., Shimada M.* Mitochondrial protein turnover is critical for granulosa cell proliferation and differentiation in antral follicles // *Journal of the Endocrine Society*. 2019. Vol. 3. P. 324–339. DOI: 10.1210/js.2018-00329.
10. *Aitken R.J., Bromfield E.G., Gibb Z.* Oxidative stress and reproductive function: The impact of oxidative stress on reproduction: a focus on gametogenesis and fertilization // *Reproduction*. 2022. Vol. 164 (6). P. 79–94. DOI: 10.1530/REP-22-0126.
11. *Jamil M., Debbbarh H., Aboulmaouahib S., Aniq Filali O., Mounaji K., Zarqaoui M., Saadani B., Louanjli N., Cadi R.* Reactive oxygen species in reproduction: Harmful, essential or both // *Zygote*. 2020. Vol. 28 (4). P. 255–269. DOI: 10.1017/S0967199420000179.
12. *Likszo P., Skarzynski D.J., Moza Jalali B.* Changes in Porcine Corpus Luteum Proteome Associated with Development, Maintenance, Regression, and Rescue during Estrous Cycle and Early Pregnancy // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22 (21). Art. 11740. DOI: 10.3390/ijms222111740.
13. *Yan F., Zhao Q., Li Y., Zheng Z., Kong X., Shu C., Liu Y., Shi Y.* The role of oxidative stress in ovarian aging: a review // *Journal of ovarian research*. 2022. Vol. 15 (1). Art. 100. DOI: 10.1186/s13048-022-01032-x.
14. *Villalpando-Rodriguez G.E., Gibson S.B.* Reactive oxygen species (ROS) regulates different types of cell death by acting as a rheostat // *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2021. Vol. 2021. P. 1–17. DOI: 10.1155/2021/9912436.
15. *Bertevello P.S., Teixeira-Gomes A.P., Seyer A., Vitorino Carvalho A., Labas V., Blache M.C., Banliat C., Cordeiro L.A.V., Duranthon V., Papillier P., Maillard V., Elis S., Uzbekova S.* Lipid Identification and Transcriptional Analysis of Controlling Enzymes in Bovine Ovarian Follicle // *International Journal of molecular sciences*. 2018. Vol. 19 (10). Art. 3261. DOI: 10.3390/ijms19103261.
16. *Raviv S., Hantisteanu S., Sharon S.M., Atzmon Y., Michaeli M., Shalom-Paz E.* Lipid droplets in granulosa cells are correlated with reduced pregnancy rates // *Journal of Ovarian Research*. 2020. Vol. 13. Art. 4. DOI: 10.1186/s13048-019-0606-1.
17. *Nolfi-Donagan D., Braganza A., Shiva S.* Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement // *Redox biology*. 2020. Vol. 37. Art. 101674. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101674.



18. Abreu J.M., Santos G.B., Carvalho M.G.S., Mencarelli J.M., Cândido B.R.M., Prado B.B.P., Caixeta E.S., Pereira Neto S.O., Corsetti P.P., Oliveira N.M.S., Garcia E.K.I., Silvério A.C.P., Anjos J.A., Alves L.R.C., Garcia J.A.D. Dyslipidemia's influence on the secretion ovarian's steroids in female mice // *Research, Society and Development*. 2021. Vol. 10. Art. 13. DOI: 10.33448/rsd-v10i13.21369.
19. Sreerangaraja Urs D.B., Wu W.H., Komrskova K., Postlerova P., Lin Y.F., Tzeng C.R., Kao S.H. Mitochondrial Function in modulating human granulosa cell steroidogenesis and female fertility // *International journal of molecular sciences*. 2020. Vol. 21. P. 3592. DOI: 10.3390/ijms21103592.
20. Rudnicka E., Kunicki M., Calik-Ksepka A., Suchta K., Duszewska A., Smolarczyk K., Smolarczyk R. Anti-Müllerian Hormone in Pathogenesis, Diagnostic and Treatment of PCOS // *International journal of molecular sciences*. 2021. Vol. 22 (22). Art. 12507. DOI: 10.3390/ijms222212507.
21. Silva M.S.B., Giacobini P. New insights into anti-Müllerian hormone role in the hypothalamic–pituitary–gonadal axis and neuroendocrine development // *Cellular and molecular life sciences*. 2021. Vol. 78. P. 1–16. DOI: 10.1007/s00018-020-03576-x.
22. Ball B.A., El-Sheikh Ali H., Scoggin K.E., Riddle W.T., Schnobrich M., Bradekamp E., Agnew M., Squires E.L., Troedsson M.H.T. Relationship between anti-Müllerian hormone and fertility in the mare // *Theriogenology*. 2019. Vol. 125. P. 335–341.
23. Almeida F.R.C.L., Costermans N.G.J., Soede N.M., Bunschoten A., Keijer J., Kemp B., Teerds K.J. Presence of anti-Müllerian hormone (AMH) during follicular development in the porcine ovary // *Plos One*. 2018. Art. 13.
24. Cheon K.Y., Chung Y.J., Cho H.H., Kim M.R., Cha J.H., Kang C.S., Lee J.Y., Kim J.H. Expression of Müllerian Inhibiting Substance/Anti-Müllerian Hormone Type II Receptor in the Human Theca Cells // *Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2018. Vol. 103. P. 3376–3385.
25. Hong K.J., Lin J.-J., Lin L.H., Lai T.H. The intrafollicular concentration of leptin as a potential biomarker to predict oocyte maturity in *in vitro* fertilization // *Scientific Reports*. 2022. Vol. 12. Art. 19573. DOI: 10.1038/s41598-022-23737-1.
26. Lee J.B., Lee M.G., Lin T., Shin H.Y., Lee J.E., Kang J.W., Jin D.I. Effect of oocyte chromatin status in porcine follicles on the embryo development *in vitro* // *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2019. Vol. 32 (7). P. 956–965. DOI: 10.5713/ajas.18.0739.

## REFERENCES

1. Chen P.R., Uh K., Redel B.K., Reese E.D., Prather R.S., Lee K. Production of Pigs From Porcine Embryos Generated in vitro. *Frontiers in Animal Science*, 2022, vol. 3, art. 826324. DOI: 10.3389/fanim.2022.826324.
2. Fowler K.E., Mandawala A.A., Griffin D.K., Walling G.E., Harvey S.C. The production of pig preimplantation embryos in vitro: current progress and future prospects. *Reproductive biology*, 2018, vol. 18 (3), pp. 203–211. DOI: 10.1016/j.repbio.2018.07.001.
3. Shah J.S., Sabouni R., Vaught K.C.C., Owen C.M., Albertini D.F., Segars J.H. Biomechanics and mechanical signaling in the ovary: a systematic review. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 2018, vol. 35 (7), p. 1135. DOI: 10.1007/s10815-018-1180-y.
4. Eppig J.J. Reproduction: Oocytes Call, Granulosa Cells Connect. *Current Biology*, 2018, vol. 28 (8), p. 354. DOI: 10.1016/j.cub.2018.03.005.
5. Wu G., Li C., Tao J., Liu Z., Li X., Zang Z., Fu C., Wei J., Yang Y., Zhu Q., Zhang J.Q., Shen M., Liu H. FSH mediates estradiol synthesis in hypoxic granulosa cells by activating glycolytic metabolism through the HIF-1 $\alpha$ -AMPK-GLUT1 signaling pathway. *The Journal of biological chemistry*, 2022, vol. 298 (5), art. 101830. DOI: 10.1016/j.jbc.2022.101830.
6. Sreerangaraja Urs D.B., Wu W.H., Komrskova K., Postlerova P., Lin Y.F., Tzeng C.R., Kao S.H. Mitochondrial Function in Modulating Human Granulosa Cell Steroidogenesis and Female Fertility. *International journal of molecular sciences*, 2020, vol. 21 (10), art. 3592. DOI: 10.3390/ijms21103592.
7. Renne M.F., Hariri H. Lipid Droplet-Organellar Contact Sites as Hubs for Fatty Acid Metabolism, Trafficking, and Metabolic Channeling. *Frontiers in cell and developmental biology*, 2021, vol. 9, art. 726261. DOI: 10.3389/fcell.2021.726261.
8. 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. *Biology of Reproduction*, 2020, vol. 103 (1), pp. 36–48. DOI: 10.1093/biolre/ioaa045.
9. Hoque S.A.M., Kawai T., Zhu Z., Shimada M. Mitochondrial protein turnover is critical for granulosa cell proliferation and differentiation in antral follicles. *Journal of the Endocrine Society*, 2019, vol. 3, pp. 324–339. DOI: 10.1210/js.2018-00329.
  10. Aitken R.J., Bromfield E.G., Gibb Z. Oxidative stress and reproductive function: The impact of oxidative stress on reproduction: a focus on gametogenesis and fertilization. *Reproduction*, 2022, vol. 164 (6), pp. 79–94. DOI: 10.1530/REP-22-0126.
  11. Jamil M., Debbbarh H., Aboulmaouahib S., Aniq Filali O., Mounaji K., Zarqaoui M., Saadani B., Louanjli N., Cadi R. Reactive oxygen species in reproduction: Harmful, essential or both. *Zygote*, 2020, vol. 28 (4), pp. 255–269. DOI: 10.1017/S0967199420000179.
  12. Likso P., Skarzynski D.J., Moza Jalali B. Changes in Porcine Corpus Luteum Proteome Associated with Development, Maintenance, Regression, and Rescue during Estrous Cycle and Early Pregnancy. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, vol. 22 (21), art. 11740. DOI: 10.3390/ijms222111740.
  13. Yan F., Zhao Q., Li Y., Zheng Z., Kong X., Shu C., Liu Y., Shi Y. The role of oxidative stress in ovarian aging: a review. *Journal of ovarian research*, 2022, vol. 15 (1), art. 100. DOI: 10.1186/s13048-022-01032-x.
  14. Villalpando-Rodriguez G.E., Gibson S.B. Reactive oxygen species (ROS) regulates different types of cell death by acting as a rheostat. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021, vol. 2021, pp. 1–17. DOI: 10.1155/2021/9912436.
  15. Bertevello P.S., Teixeira-Gomes A.P., Seyer A., Vitorino Carvalho A., Labas V., Blache M.C., Banliat C., Cordeiro L.A.V., Duranthon V., Pappillier P., Maillard V., Elis S., Uzbekova S. Lipid Identification and Transcriptional Analysis of Controlling Enzymes in Bovine Ovarian Follicle. *International Journal of molecular sciences*, 2018, vol. 19 (10), art. 3261. DOI: 10.3390/ijms19103261.
  16. Raviv S., Hantisteanu S., Sharon S.M., Atzmon Y., Michaeli M., Shalom-Paz E. Lipid droplets in granulosa cells are correlated with reduced pregnancy rates. *Journal of Ovarian Research*, 2020, vol. 13, art. 4. DOI: 10.1186/s13048-019-0606-1.
  17. Nolfi-Donagan D., Braganza A., Shiva S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox biology*, 2020, vol. 37, art. 101674. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101674.
  18. Abreu J.M., Santos G.B., Carvalho M.G.S., Mencarelli J.M., Cândido B.R.M., Prado B.B.P., Caixeta E.S., Pereira Neto S.O., Corsetti P.P., Oliveira N.M.S., Garcia E.K.I., Silvério A.C.P., Anjos J.A., Alves L.R.C., Garcia J.A.D. Dyslipidemia's influence on the secretion ovarian's steroids in female mice. *Research, Society and Development*, 2021, vol. 10, art. 13. DOI: 10.33448/rsd-v10i13.21369.
  19. Sreerangaraja Urs D.B., Wu W.H., Komrskova K., Postlerova P., Lin Y.F., Tzeng C.R., Kao S.H. Mitochondrial Function in modulating human granulosa cell steroidogenesis and female fertility. *International journal of molecular sciences*, 2020, vol. 21, p. 3592. DOI: 10.3390/ijms21103592.
  20. Rudnicka E., Kunicki M., Calik-Ksepka A., Suchta K., Duszewska A., Smolarczyk K., Smolarczyk R. Anti-Müllerian Hormone in Pathogenesis, Diagnostic and Treatment of PCOS. *International journal of molecular sciences*, 2021, vol. 22 (22), art. 12507. DOI: 10.3390/ijms222212507.
  21. Silva M.S.B., Giacobini P. New insights into anti-Müllerian hormone role in the hypothalamic–pituitary–gonadal axis and neuroendocrine development. *Cellular and molecular life sciences*, 2021, vol. 78, pp. 1–16. DOI: 10.1007/s00018-020-03576-x.
  22. Ball B.A., El-Sheikh Ali H., Scoggin K.E., Riddle W.T., Schnobrich M., Bradekamp E., Agnew M., Squires E.L., Troedsson M.H.T. Relationship between anti-Müllerian hormone and fertility in the mare. *Theriogenology*, 2019, vol. 125, pp. 335–341.
  23. Almeida F.R.C.L., Costermans N.G.J., Soede N.M., Bunschoten A., Keijer J., Kemp B., Teerds K.J. Presence of anti-Müllerian hormone (AMH) during follicular development in the porcine ovary. *Plos One*, 2018, art. 13.
  24. Cheon K.Y., Chung Y.J., Cho H.H., Kim M.R., Cha J.H., Kang C.S., Lee J.Y., Kim J.H. Expression of Müllerian Inhibiting Substance/

- Anti-Mullerian Hormone Type II Receptor in the Human Theca Cells. *Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 2018, vol. 103, pp. 3376–3385.
25. Hong K.J., Lin J.-J., Lin L.H., Lai T.H. The intrafollicular concentration of leptin as a potential biomarker to predict oocyte maturity in in vitro fertilization. *Scientific Reports*, 2022, vol. 12, art. 19573. DOI: 10.1038/s41598-022-23737-1.
26. Lee J.B., Lee M.G., Lin T., Shin H.Y., Lee J.E., Kang J.W., Jin D.I. Effect of oocyte chromatin status in porcine follicles on the embryo development in vitro. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2019, vol. 32 (7), pp. 956–965. DOI: 10.5713/ajas.18.0739.

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

**Кузьмина Т.И.**, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией

(✉) **Притужалова А.О.**, младший научный сотрудник; **адрес для переписки:** Россия, 196625, г. Санкт-Петербург, п. Тярлево, Московское шоссе, 55-а; e-mail: aklevakina14@mail.ru

**Ширяев Г.В.**, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник

**Старикова Д.А.**, кандидат биологических наук, научный сотрудник

**Курочкин А.А.**, младший научный сотрудник

**Баранова Е.И.**, лаборант-исследователь

**Соколова Н.О.**, научный сотрудник

## AUTHOR INFORMATION

**Tatyana I. Kuzmina**, Doctor of Science in Biology, Professor, Head Researcher, Laboratory Head

(✉) **Anna O. Prituzhalova**, Junior Researcher; **address:** 55-a, Moskovskoe shosse, St. Petersburg, Tyarlevo, 196625, Russia; e-mail: aklevakina14@mail.ru

**Gennady V. Shiryaev**, Candidate of Science in Agriculture, Senior Researcher

**Darya A. Starikova**, Candidate of Science in Biology, Researcher

**Anton A. Kurochkin**, Junior Researcher

**Elena I. Baranova**, Research Assistant

**Natalia O. Sokolova**, Researcher

Дата поступления статьи / Received by the editors 06.09.2023  
Дата принятия к публикации / Accepted for publication 08.11.2023  
Дата публикации / Published 25.12.2023