

АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЛИПИДОМА ООЦИТОВ СВИНЕЙ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *IN VITRO*

Старикова Дарья Андреевна, научный сотрудник лаборатории биологии развития

Кузьмина Татьяна Ивановна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории биологии развития

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения животных – филиал государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста»

142132, Московская обл., Городской округ Подольск, пос. Дубровицы, д. 60, (812) 451-76-63, e-mail: live8avis@mail.ru

Ключевые слова: ооцит, *Sus scrofa domesticus*, свинья, липидные капли, липидом, Nile red.

Выявление эффективных биомаркеров созревания ооцитов, основанных на морфофункциональной характеристике интрацитоплазматических липидных капель, позволит расширить информативность критериев оценки качества донорских гамет для повышения эффективности использования клеточных репродуктивных технологий в животноводстве, биомедицине, ветеринарии. Цель исследования – проанализировать показатели морфофункционального состояния липидома (морфологию липидных капель и интенсивность флуоресценции комплекса Nile red/липидные капли – ИФ Nile red) в ооцитах *Sus scrofa domesticus* до и после культивирования *in vitro*. Для созревания ооцитов использовали среду Sage Media Cleavage (CooperSurgical, США) с 5% сыворотки Serum Protein Substitute (CooperSurgical, США), 10 МЕ хорионического гонадотропина человека (Sigma, США). При ранжировании популяции донорских ооцитов по морфологии липидных капель (гранулы и кластеры) и ИФ Nile red (низкая, средняя, высокая) обнаружено, что до и после культивирования доли ооцитов со средней ИФ Nile red и липидными каплями (ЛК) в виде гранул составили 63% и 45%, соответственно, что оказалось значительно выше уровня гамет со средней ИФ Nile red и ЛК смешанной формы 41% и 23%, соответственно ($P < 0,05$). Впервые проведен сравнительный морфологический анализ взаимосвязи показателей морфофункциональной активности (морфология и ИФ Nile red) липидома в ооцитах *Sus scrofa domesticus*. Обсуждено использование комплексного анализа показателей функциональной активности липидома для оценки качества ооцита.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ, Госзадание №121052600350-9.

Введение

В настоящее время одной из важнейших задач внедрения клеточных репродуктивных технологий в практику животноводства является поиск эффективных маркеров качества донорских ооцитов. Мониторинг патологий развития у особей, полученных в результате инновационных клеточных репродуктивных технологий, указывает на наличие у животных заболеваний, связанных с нарушением липидного обмена [1]. Среди заболеваний, причины которых спровоцированы экстракорпоральным созреванием ооцитов, синдром рождения крупного потомства (LOS, Large offspring syndrome) превалирует в анамнезах у крупного рогатого скота [2]. Как показано на мышах, вышеуказанные патологии сопровождаются изменениями в морфологии липидных капель в гаметах и эмбрионах [3]. Необходимость в наличии большого количества донорских ооцитов свиней с высокими качественными характеристиками значительно возросла в последние годы в связи с активизацией исследований в областях клеточной и генетиче-

ской инженерии. Формирование яйцеклетки *in vitro* зависит от адекватности процессов ядерно-цитоплазматического созревания условиям *in vivo*. В процесс созревания ооцитов вовлечены клеточные компартменты, в том числе липидные капли, активно взаимодействующие с различными цитоплазматическими органеллами и выполняющие в клетке функцию энергетического депо [4]. Липидные капли участвуют в метаболизме клетки, являются местом хранения сигнальных молекул и гидрофобных витаминов, контролируют процессы окислительного стресса и преобразования белков [5, 6]. Гипераккумуляция липидов в ооцитах может быть следствием нарушения энергетического обмена в ооците при экстракорпоральном созревании. Известно, что повышенное содержание липидных капель препятствует успешному созреванию, оплодотворению и, в дальнейшем, развитию эмбрионов [4]. Ооциты свиней отличаются высоким уровнем липидов (156 нг), что вызывает дополнительные трудности в разработке и совершенствовании методов получения яйцеклетки,

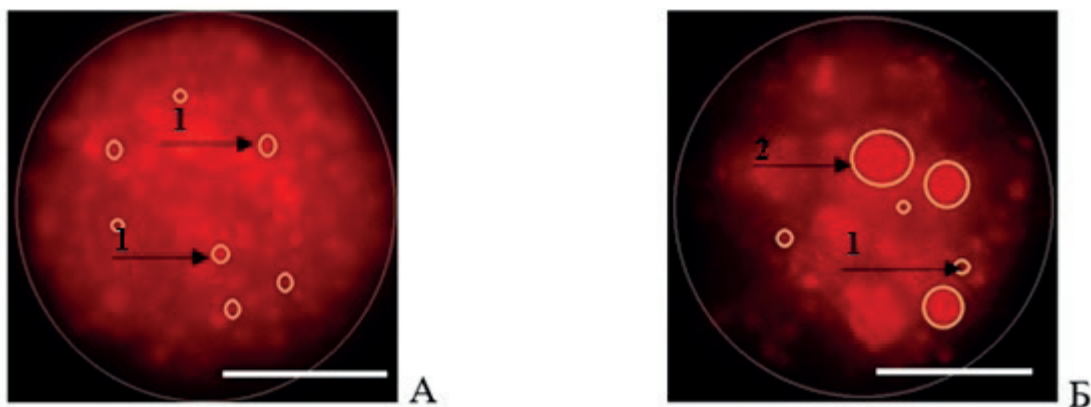


Рис. 1 - Морфология липидных капель в ооцитах свиней после окраски Nile red. А - ооцит с гранулированными липидными каплями, Б - ооцит с липидными каплями в виде гранул и кластеров. Стрелками указаны: 1 – гранула, 2 – кластер. Масштаб 100 мкм. Увеличение – 10x20.

компетентной к оплодотворению и развитию из нее качественных эмбрионов *in vitro* [7]. В связи с вышеизложенным, мониторинг показателей функциональной активности липидома в ооцитах свиней *in vitro* – актуальная задача, направленная на выявление механизмов формирования яйцеклетки животных и совершенствования клеточных репродуктивных технологий.

Цель настоящего исследования – проанализировать показатели морфофункционального состояния липидома (морфологию и интенсивность флуоресценции комплекса Nile red/липидные капли) в ооцитах *Sus scrofa domesticus* до и после культивирования *in vitro*.

Материалы и методы исследований

В экспериментах использовали ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК) *Sus scrofa domesticus* (свинья домашняя) породы ландрас, отобранные из яичников 6-8 месячных свиней на стадии фолликулярного роста. Яичники свиней *post mortem* доставляли в лабораторию в растворе NaCl (концентрация 0,9%) с гентамицином в концентрации 50 мкг/мл при температуре 30–35°C. ОКК выделяли из антральных фолликулов диаметром от 3 до 6 мм, с высоким тургором и обширной васкуляризацией шприцом с внешним диаметром иглы 0,8 мм. Опираясь на общепринятые критерии для отбора ОКК, для исследования отбирали ооциты, окруженные не менее 5-6 слоями плотного компактного кумулюса, с однородной, тонкозернистой цитоплазмой и равномерной по ширине зоной пеллюцида.

Для созревания извлеченных ооцитов использовали среду Sage Media Cleavage (SMC, CooperSurgical, США) с добавлением 5% белка Serum Protein Substitute (SPS, CooperSurgical,

США), 10 МЕ хорионического гонадотропина человека на 100 мл среды (Sigma, США) и 50 мкг/мл гентамицина (Sigma, США). Ооцит-кумулюсные комплексы культивировали в атмосфере 5% CO₂, 95% влажности и температуре 38°C в течение 44 часов.

Для оценки интрацеллюлярных липидных капель (ЛК) нативные или прокультивированные ооциты денудировали и обрабатывали витальным флуоресцентным красителем Nile red. Для этого денудированные ооциты помещали в раствор Nile red (концентрация 1 mM) и выдерживали в нём 5 минут при комнатной температуре в темноте. Образцы анализировали с помощью микроскопа CarlZeiss Axio Imager.A2m (длины волн - Ex/ Em = 552/636 nm). Оценку морфологии ЛК проводили с помощью фиксации изображения ооцитов микрофотосъемкой. Используя программу JMicroVision 1.2.7. определяли форму интрацитоплазматических ЛК. Липидные капли, имеющие диаметр менее 10% от диаметра ооцита, определяли как гранулы, а липидные капли, имеющие диаметр более 10% от диаметра ооцита, как кластеры [8] (рис. 1).

С помощью фиксации изображения ооцитов микрофотосъемкой и далее программы JMicroVision 1.2.7. (цветовая модель RGB) проводили оценку интенсивности флуоресценции (ИФ) липидных капель. Изображения клеток были зафиксированы в виде фотографий в пиксельном разрешении JPG с помощью программы FISH 2.0. и обработаны с помощью программы JMicroVision 1.2.7. Количество пикселей, попадающих в определенную группу по интенсивности свечения и превышающее половину площади клетки, являлось основанием для выделения

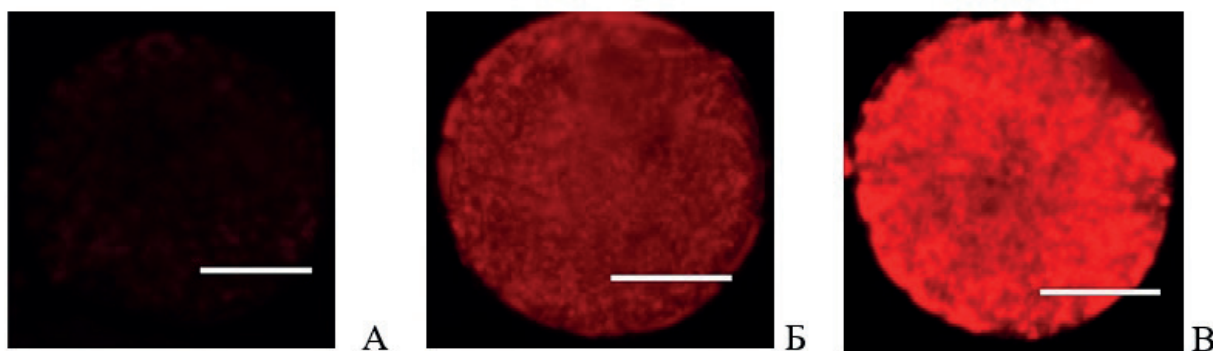


Рис. 2 - Интенсивность свечения липидов ооцитов свиней после окраски Nile red. По одному варианту каждой группы: А – низкая ИФ; Б – средняя ИФ; В – высокая ИФ. Масштаб 150 мкм. Увеличение – 10X20.

клетки в определенную группу: первая с низкой ИФ «+»; вторая – со средней ИФ «++»; третья – с высокой ИФ «+++» (рис. 2) [9].

Оценку статуса хроматина ооцитов проводили с использованием красителя Hoechst 33258. Денудированные ооциты помещали на предметные стёкла в минимальное количество фосфатно-солевого буфера, вокруг ставили три капли рабочего раствора красителя Hoechst 33258 в концентрации 2,5 мкг/мл. Затем ооциты осторожно накрывали покровными стеклами и заклеивали лаком. Оценку стадии мейоза проводили с использованием микроскопа CarlZeissAxio Imager.A2m (длины волн – Ex/ Em = 410/570nm).

Все реагенты, использованные при выполнении экспериментов, за исключением обозначенных в тексте, - производства компании Sigma-Aldrich (США). Задействованная пластиковая лабораторная посуда фирмы BD Falcon™ (США).

Для сравнения результатов экспериментов использовали критерий χ -квадрат, с помощью программы Statistica 6.0. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали при трех уровнях значимости: $P < 0,01$; $P < 0,05$; $P < 0,001$, для 3-5 независимых экспериментов.

Результаты исследований

В исследовании проведена оценка показателей морфофункциональной активности липида в ооцитах *Sus scrofa domesticus*. В первой серии экспериментов проведена индивидуальная оценка ооцитов по каждому из контролируемых параметров: морфология и интенсивность флуоресценции липидных капель с последующим комплексным анализом популяции гамет по совокупности вышеобозначенных контролируемых параметров.

Известно, что липидные капли в процессе созревания ооцита могут изменяться морфологически от гранул к кластерам [10] (рис.1). При ранжировании гамет по вышеуказанным параметрам выявлены две группы ооцитов: ооциты с гранулами и ооциты со смешанной морфологией (гранулы и кластеры). Гамет только с кластерами в ходе проведения исследований не обнаружено. В результате проведенных исследований по оценке морфологии липидных капель в ооцитах свиней при культивировании в течение 44 часов были получены данные, представленные в таблице 1.

**Таблица 1
Морфология липидных капель в ооцитах свиней при созревании *in vitro* (205 ооцитов, 3 повторности)**

Время культивирования ооцитов(час.)	n ооцитов	n (%) ооцитов с различной формой липидных капель:	
		Гранулярная	Смешанная
0	102	97(95%) ^a	5(5%) ^c
44	103	80(78%) ^b	23(22%) ^d

Достоверность сравниваемых значений (χ^2 -test):-^{a:b, c:d} $P < 0,001$.

Доля гамет (95%) с гранулами до культивирования с достоверной значимостью ($P < 0,001$) превышала уровень ооцитов той же группы, полученных после культивирования (78%). Напротив, достоверное увеличение уровня ооцитов со смешанными формами липидных капель отмечено после культивирования (22%), в сравнении с группой нативных ооцитов (5%, $P < 0,001$)

В процессе созревания ооцитов триглицериды (ТГ) под действием липаз подвергаются гидролизу [11], соответственно, уровень ИФ комплекса Nile red/ЛК снижается. При изуче-

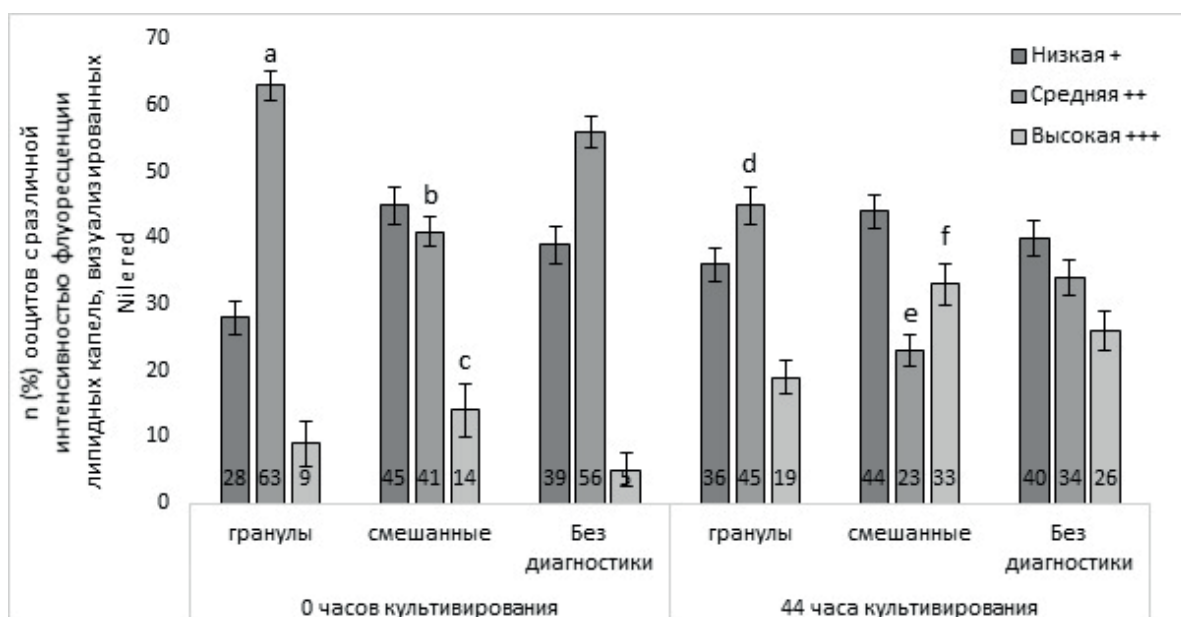


Рис. 3 - Сравнительный анализ показателей морфофункциональной активности липидома в ооцитах *Sus scrofa domestica* (247 ооцитов, 3 повторности). Достоверность сравниваемых значений по критерию Фишера: $a:b, c:d, e:f P < 0,05$.

нии интенсивности флуоресценции липидных капель, визуализированных красителем Nile red (табл.2), было показано, что доля нативных ооцитов (56%) со средней степенью ИФ достоверно выше, чем уровень прокультивированных гамет (34%) с аналогичной ИФ ($P < 0,005$). Напротив, анализ популяции ооцитов с высокой ИФ ЛК до и после культивирования гамет показал, что доля нативных ооцитов (5%) по данному показателю, значительно ниже уровня прокультивированных ооцитов (26%, $P < 0,001$). Между группами ооцитов с низкой ИФ комплекса Nile red/липидных капель достоверных различий не наблюдалось.

Таблица 2

Интенсивность флуоресценции липидных капель, визуализированных Nile red, в ооцитах свиней при созревании *in vitro* (185 ооцитов, 3 повторности)

Время культивирования ооцитов (час.)	n ооцитов	n (%) ооцитов с различным уровнем интенсивности флуоресценции липидных капель, визуализированных Nile red		
		Низкая+	Средняя++	Высокая+++
0	95	37(39%)	53(56%) ^a	5(5%) ^c
44	90	36(40%)	31(34%) ^b	23(26%) ^d

Достоверность сравниваемых значений (χ^2 -test): - $a:b P < 0,005$, $c:d P < 0,001$.

Оценка показателей морфофункциональной активности липидома в ооцитах

Susscrofadomesticus продемонстрировала значительные различия по уровню ИФ ЛК в представленных группах (рис. 3). С учетом вышеуказанного показателя оценена популяция ооцитов до и после культивирования без предварительного ранжирования по морфологии липидных капель. Данная группа служила контролем в сравнении с группой ооцитов с гранулами и кластерами.

Минимальный процент нативных клеток с высокой ИФ (5%) был получен в группе ооцитов, у которых не проводилась оценка по морфологии ЛК. Максимальные показатели уровня нативных ооцитов с высокой ИФ липидома выявлены в группе ооцитов со смешанной морфологией ЛК (14%). Достоверных различий между долями нативных гамет с различной морфологией ЛК, показывающих низкую ИФ, не обнаружено.

При анализе показателей морфофункциональной активности липидома в ооцитах *Susscrofadomesticus* некультивированных гамет было выявлено, что доля ооцитов с гранулированной формой и средней интенсивностью свечения липидных капель (63%) достоверно превысила уровень ооцитов со смешанными формами ЛК (41%, $P < 0,05$). Схожие результаты были получены и после культивирования ооцитов. Так, мы обнаружили достоверное превышение доли гамет со средней ИФ липидома с ЛК в виде гранул (45%) с уровнем ооцитов со средней ИФ липидома и ЛК в виде гранул и кластеров (23%, $P < 0,05$). После культивирования доля ооцитов

с высокой ИФ Nile red и смешанной морфологией ЛК (33%) достоверно превысила уровень некультивированных ооцитов с аналогичной характеристикой ЛК (14%, $P < 0,05$).

Обсуждение

Высокий уровень доли ооцитов до культивирования (стадия диплотены или диакинеза) с гранулированной формой ЛК, вероятно, свидетельствует о внутриклеточных процессах, нуждающихся в активной транспортировке липидных капель, связанных с мобильным взаимодействием липидов с другими органеллами, например, митохондриями [12]. После культивирования отмечается снижение доли гамет с гранулированной морфологией ЛК. Трансформация гранул в кластеры может происходить по одному из двух направлений: слияние гранул или накопление ТГ внутри одной гранулы [10]. В обоих случаях вероятнее всего на этот процесс действует снижение интенсивности окисления жирных кислот, что приводит к деградации клетки [13]. Таким образом, образование кластеров также может свидетельствовать о снижении интенсивности внутриклеточных процессов и расцениваться как предиктор деструктивных изменений в ооците.

Интенсивность флуоресценции является показателем содержания ТГ в липидной капле [9]. Поскольку триглицериды в процессе созревания ооцитов подвергаются гидролизу с образованием глицерина и высших жирных кислот, которые имеют энергетическую ценность при созревании клетки, мы предположили, что количественное уменьшение триглицеридов будет выражаться в снижении интенсивности свечения окрашенных липидных капель. При созревании ооцитов флуоресценция слабеет, показатели флуоресценции составляют от 0 до 80 пикселей и определяются как низкие («+»). Увеличение доли гамет со «смешанным» типом ЛК с высокой ИФ комплекса Nile red/липидная капля может свидетельствовать о внутриклеточных процессах, приводящих к слиянию капель или накоплению ТГ в липидной капле. Эти процессы могут быть результатом взаимодействия липидных капель с белками (например, типа Rab), локализованными в фосфолипидном монослое мембраны капли [11], что вероятно может свидетельствовать о начале деструктивных интрацитоплазматических процессов. В исследовании показано, что доля ооцитов со средней ИФ комплекса Nile red/липидная капля типа «гранулы» значительно выше доли ооцитов со «смешанным» типом липидных капель ($P < 0,01$).

Заключение

В исследовании впервые проведен комплексный сравнительный мониторинг показателей морфофункциональной активности липидома (ЛК) и статуса хроматина ооцитов до и после культивирования, выявлены различия в анализируемых показателях донорских ооцитов, извлеченных из антральных овариальных фолликулов и гамет, созревших *in vitro*. Полученные данные свидетельствуют о том, что трансформация (кластеризация) липидных капель сопровождается преобразованием хроматина ядра при созревании ооцитов, что предполагает возможность использования этих показателей при оценке ядерно-цитоплазматического созревания ооцитов для прогнозирования качества женских гамет с целью повышения эффективности технологии экстракорпорального получения эмбрионов *Sus scrofa domestica*.

Библиографический список

1. García-Domínguez, X. Early Embryo Exposure to Assisted Reproductive Manipulation Induced Subtle Changes in Liver Epigenetics with No Apparent Negative Health Consequences in Rabbit / X. García-Domínguez, G. Diretto, D.S. Peñaranda, S. Frusciante, V. García-Carpintero, J. Cañizares, J.S. Vicente, F. Marco-Jiménez // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – V.22. – No18. – P.9716.
2. Rocio, M.R. 209 Large Offspring Syndrome: Effects of *in vitro* Production on Embryo Epigenetics and Development / M.R. Rocio // Journal of Animal Science. – 2021. – V. 99. – I. 1. – P. 114–115.
3. Mok, H.J. Age-Associated Lipidome Changes in Metaphase II Mouse Oocytes / H.J. Mok, H. Shin, J.W. Lee, G.K., Lee, C.S. Suh, K.P. Kim, H.J..Lim // PLoS One. – 2016. – V.16. – I.11. – No.2. – e0148577.
4. Dunning, K.R. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation / K.R Dunning, D.L Russell, R.L Robker // Reproduction. – 2014. – V. 148. – P. R15–R27.
5. Prates, E.G. A Role of Lipid Metabolism during Cumulus-Oocyte Complex Maturation: Impact of Lipid Modulators to Improve Embryo Production/ E.G. Prates, J.T. Nunes, R.M. Pereira // Mediators of Inflammation. – 2014. – V. 2014. – P. 11.
6. Welte, M.A. Lipid droplet functions beyond energy storage / M.A. Welte, A.P. Gould // Biochimica et Biophysica Acta. – 2017. – V.1862 (10 Pt B). – P.1260–1272.
7. Gao Q. The lipid droplet—a well-connected organelle / Q. Gao, J. M. Goodman // Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2015. – V.3. – P.49.
8. Новичкова, Д.А. Липидный анализ оо-

цитов *Sus scrofa domestica* в зависимости от их функционального состояния / Д.А. Новичкова, Т.И. Кузьмина, Е.С. Усенбеков, И.Я. Шахтамиров, Х.М. Мутиева // Вестник Науки Казахского агротехнического университета имени С. Сейфуллина. – Астана –2017. – №2(93)– С. 69-75.

9. Новичкова, Д.А. Характеристика популяции донорских ооцитов свиней на основе визуализации липидов флуоресцентным красителем Nile red / Д.А. Новичкова, Т.И. Кузьмина, С.И. Ковтун, Н.П. Галаган // Материалы XVIII Международной научно-практической конференции: «Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства», посвященной 85-летию образования зооинженерного факультета. – Горки. – 2015. – С. 333-337.

10. Olzmann, J.A. Dynamics and functions of

lipid droplets // J.A. Olzmann, P. Carvalho // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2019. – V. 20. – No 3. – P. 137–155.

11. Ibayashi, M. Homeostatic regulation of lipid droplet content in mammalian oocytes and embryos / M. Ibayashi, R. Aizawa, J. Mitsui, S. Tsukamoto // Reproduction. – 2021. – V.162. – No.6. – P.R99-R109.

12. Barbosa A.D. Function of lipid droplet-organelle interactions in lipid homeostasis / A.D. Barbosa, S. Siniosoglou // Biochimica et Biophysica Acta. – 2017. – V. 1864. – No. 9. – P.1459-1468.

13. Dunning K.R. Regulation of fatty acid oxidation in mouse cumulus-oocyte complexes during maturation and modulation by PPAR agonists / Dunning KR, Anastasi MR, Zhang VJ, Russell DL, Robker RL. // PLoS One. – 2014. – V.9. – No.2. – e87327.

ANALYSIS OF PARAMETERS OF MORPHOFUNCTIONAL STATE OF PIG OOCYTE LIPIDOME IN CASE OF IN VITRO CULTIVATION

Starikova D.A., Kuzmina T.I.

All-Russian Research Institute of Animal Genetics and Animal Breeding - a branch of the State Budgetary Scientific Institution "Federal Research Center of Animal Husbandry - VIZH named after Academician L.K. Ernst" 142132, Moscow region, Podolsk city district, Dubrovitsy v., 60, (812) 451-76-63, e-mail: live8avis@mail.ru

Key words: oocyte, *Susscrofadomesticus*, pig, lipid droplets, lipidome, Nile red.

Identification of effective markers of oocyte maturation based on morphological and functional characteristics of intracytoplasmic lipid droplets will allow to increase informative value of the criteria for assessing the quality of donor gametes for improvement of the efficiency of using cellular reproductive technologies in animal husbandry, biomedicine, and veterinary medicine. The aim of the study is to analyze the parameters of morphofunctional state of the lipidome (the morphology of lipid droplets and the intensity of fluorescence of the Nile red/lipid droplets complex - Nile red IF) in *Susscrofadomesticus* oocytes before and after in vitro cultivation. Oocytes were matured using Sage Media Cleavage (CooperSurgical, USA) with 5% Serum Protein Substitute serum (CooperSurgical, USA), 10 IU human chorionic gonadotropin (Sigma, USA). As a result of ranking the population of donor oocytes according to morphology of lipid droplets (granules and clusters) and Nile red IF (low, medium, high), it was found that, the proportion of oocytes with an average Nile red IF and lipid droplets (LD) in the form of granules was 63% before cultivation, which was significantly higher than the proportion of gametes with an average IF of Nile red and LD of a mixed form of 41% ($P < 0.05$). After cultivation, the level of oocytes with medium Nile red IF and LD in the form of granules was 45%, which exceeded the level of gametes with the same Nile red IF and mixed LD of 23% ($P < 0.05$). The proportion of in vitro matured oocytes with high Nile red IF and mixed LD morphology (granules and clusters) was 33%, 14% were characterized by the above parameters before cultivation ($P < 0.05$). Comparative morphological analysis of the relation between the parameters of morphofunctional activity (morphology and IF Nile red) of lipidome in *Susscrofadomesticus* oocytes was carried out for the first time. Features of functional activity of lipidome before and after cultivation were revealed. The usage of a comprehensive analysis of parameters of functional activity of lipidome for assessment of the quality of the oocyte is substantiated. Pig oocytes which morphology of lipid droplets is represented by a granular form are promising for cultivation, while Nile red IF is assessed as low. With regard to the analysis of the obtained results, it is recommended to use the proposed comprehensive assessment of lipidome based on morphology and Nile red IF to assess the initial population of donor oocytes in cellular reproductive technologies.

Bibliography:

1. García-Domínguez X. Early Embryo Exposure to Assisted Reproductive Manipulation Induced Subtle Changes in Liver Epigenetics with No Apparent Negative Health Consequences in Rabbit / X. García-Domínguez, G. Diretto, D.S. Peñaranda, S. Frusciante, V. García-Carpintero, J. Cañizares, J.S. Vicente, F. Marco-Jiménez // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – V.22. – No.18. – P.9716.
2. Rocio M.R. 209 Large Offspring Syndrome: Effects of in vitro Production on Embryo Epigenetics and Development / M.R. Rocio // Journal of Animal Science. – 2021. – V.99. – I. 1. – P. 114–115.
3. Mok H.J. Age-Associated Lipidome Changes in Metaphase II Mouse Oocytes / H.J. Mok, H. Shin, J.W. Lee, G.K., Lee, C.S. Suh, K.P. Kim, H.J. Lim // PLoS One. – 2016. – V.16. – I.11. – No.2. – e0148577.
4. Dunning K.R. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation / K.R. Dunning, D.L. Russell, R.L. Robker // Reproduction. – 2014. – V. 148. – P. R15–R27.
5. Prates E.G. A Role of Lipid Metabolism during Cumulus-Oocyte Complex Maturation: Impact of Lipid Modulators to Improve Embryo Production / E.G. Prates, J.T. Nunes, R.M. Pereira // Mediators of Inflammation. – 2014. – V. 2014. – P. 11.
6. Welte M.A. Lipid droplet functions beyond energy storage / M.A. Welte, A.P. Gould // Biochimica et Biophysica Acta. – 2017. – V.1862 (10 Pt B). – P.1260-1272.
7. Gao Q. The lipid droplet—a well-connected organelle / Q. Gao, J. M. Goodman // Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2015. – V.3. – P.49.
8. Novichkova, D.A. Lipid analysis of *Susscrofadomesticus* oocytes depending on their functional state / D.A. Novichkova, T.I. Kuzmina, E.S. Usenbekov, I.Ya. Shakhdamirov, Kh.M. Mutieva // Vestnik of Science of the Kazakh Agrotechnical University named after S. Seifullin. – Aстана -2017. – № 2 (93) - P. 69-75.
9. Novichkova, D.A. Characteristics of the population of donor oocytes of pigs based on visualization of lipids with the fluorescent dye Nile red / D.A. Novichkova, T.I. Kuzmina, S.I. Kovtun, N.P. Galagan // Materials of the XVIII International Scientific and Practical Conference: "Current problems of intensive development of animal husbandry", dedicated to the 85th anniversary of the zoengineering faculty. - Gorki. - 2015. - P. 333-337.
10. Olzmann, J.A. Dynamics and functions of lipid droplets // J.A. Olzmann, P. Carvalho // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2019. – V. 20. – No 3. – P. 137–155.
11. Ibayashi, M. Homeostatic regulation of lipid droplet content in mammalian oocytes and embryos / M. Ibayashi, R. Aizawa, J. Mitsui, S. Tsukamoto // Reproduction. – 2021. – V.162. – No.6. – P.R99-R109.
12. Barbosa, A.D. Function of lipid droplet-organelle interactions in lipid homeostasis / A.D. Barbosa, S. Siniosoglou // Biochimica et Biophysica Acta. – 2017. – V. 1864. – No 9. – P.1459-1468.
13. Dunning K.R. Regulation of fatty acid oxidation in mouse cumulus-oocyte complexes during maturation and modulation by PPAR agonists / Dunning KR, Anastasi MR, Zhang VJ, Russell DL, Robker RL. // PLoS One. – 2014. – V.9. – No.2. – e87327.