ОЦЕНКА ДЕСТРУКТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ ХРОМАТИНА ГРАНУЛЕЗЫ ОВАРИАЛЬНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ СВИНЕЙ, СОДЕРЖАЩИХ РАСТУЩИЕ ИЛИ ЗАВЕРШИВШИЕ ФАЗУ РОСТА ООЦИТЫ

КУЗЬМИНА Татьяна Ивановна, Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных - филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста»

СТАНИСЛАВОВИЧ Татьяна Ивановна, Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных - филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста»

МОЛЧАНОВ Алексей Вячеславович, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И.Вавилова

ТАТАРСКАЯ Диана Николаевна, Центр репродуктивных технологий Embry Life

В результате сравнительного мониторинга показателей жизнеспособности и дегенерации хроматина (апоптоз, пикноз) в клетках гранулезы из фолликулов свиней, содержащих растущие или завершившие фазу роста ооциты, с использованием цитологического анализа, методов цитофлуориметрии (Annexin-тест) и TUNEL-теста установлены достоверные различия в характере атретических процессов гранулезы при формировании яйцеклетки. Для оценки функционального состояния ооцитов использовали ВСВ-тест. Завершение фазы роста ооцитов сопровождалось значительным ростом доли гранулезных клеток из фолликулов с завершившими фазу роста ооцитами в состоянии апоптоза (11% против 7%, $P < 0,05$), пикноза (9% против 5%, $P < 0,05$), некроза (5% против 3%, $P < 0,05$) и снижением уровня жизнеспособных клеток (85% против 88%, $P < 0,05$) по сравнению с вышеуказанными показателями в гранулезных клетках из фолликулов с растущими ооцитами. Выявленные особенности деструктивных процессов в клетках гранулезы из фолликулов, содержащих растущие или завершившие фазу роста ооциты, дополняют имеющиеся в литературе сведения об особенностях взаимодействия половой и соматических клеток овариального фолликула при формировании яйцеклетки, компетентной к оплодотворению и дальнейшему развитию из нее зародыша.

Введение. Всевозрастающий интерес к исследованиям в области молекулярной генетики и биологии развития организмов обусловливается разработкой технологий CRISPR/Cas9 и соматического клонирования [9]. Редактирование генома является мощным методом, который обещает значительно интенсифицировать селекционные процессы в животноводстве, повысить эффективность биомедицинских разработок (ксенотрансплантация) [5, 8]. Технология получения эмбрионов свиней, несмотря на рождение живого потомства, по сравнению с другими видами сельскохозяйственных животных, такими как крупный рогатый скот, требует совершенствования [6]. Популяция донорских ооцитов свиней, используемых в технологии экстракорпорального созревания гетерогенна, морфологические критерии отбора качественных ооцитов недостаточно эффективны в силу субъективной оценки эмбриотехнолога и низкой информативности морфологических

показателей. Привлечение в качестве показателя завершенности фазы роста извлекаемых из постмортальных яичников ооцитов свиней ВСВ-теста, основанного на различиях в ответной реакции растущих и завершивших фазу роста ооцитов на воздействие флуоресцентного зонда бриллиантового кристаллического голубого (ВСВ), позволило в значительной мере повысить эффективность метода созревания ооцитов свиней вне организма [1, 3].

Рост и созревание ооцита происходит в фолликуле, взаимосвязь функционирования структурных компонентов детерминирует завершение формирования яйцеклетки. Функциональное состояние клеток гранулезы, продуцирующих эстрадиол, во многом предопределяет судьбу ооцита – гибель или созревание с последующей овуляцией. Поиски неинвазивных способов оценки качества донорских ооцитов – актуальная проблема совершенствования технологии экстракорпорального созревания женских гамет. В этой связи пред-

ставляет интерес выявление особенностей функционального состояния соматических клеток овариального фолликула и развивающегося в нем ооцита.

Цель настоящего исследования – провести сравнительный мониторинг показателей жизнеспособности и деструкции хроматина в растущих и завершивших фазу роста ооцитах свиней с использованием цитологического анализа, методов цитофлуориметрии и TUNEL-теста.

Методика исследований. Клетки гранулезы и ооцит-кумулюсные комплексы получали аспирацией фолликулярной жидкости из антральных фолликулов ($d = 3-6$ мм) постмортальных яичников свиней породы ландрас (возраст 6–8 месяцев). Яичники, полученные на мясокомбинате, доставляли в лабораторию в термосе в стерильном физиологическом растворе при температуре $32-35^{\circ}\text{C}$. В планшет помещали и нумеровали образцы каждого ооцита и жидкости фолликулов, в которой они развивались. Образцы клеток гранулезы выделяли из каждого фолликула индивидуально и помещали в 96-луночные платы до проведения ВСК-теста ооцитов. После извлечения ооцит-кумулюсных комплексов их подвергали ВСК-тесту, для чего помещали в $13\ \mu\text{M}$ ВСК (бриллиантовый кристаллический голубой), растворенный в фосфатно-солевом буфере с 0,4%-м бычьим сывороточным альбумином (А-7888, Sigma) на 60 мин при температуре $38,5^{\circ}\text{C}$ в атмосфере 5 % CO_2 , 90 % влажности [1, 3].

Ранжирование ооцитов после инкубации с ВСК проводили в соответствии с окраской ооплазмы: ооплазма завершивших фазу роста ооцитов оставалась окрашенной, а растущих – теряла окраску. После ВСК-теста образцы фолликулярной жидкости с клетками гранулезы фолликулов, содержащих растущие или завершившие фазу роста ооциты, центрифугировали в течение 10 мин при $2500\ \text{мин}^{-1}$, отделяли осадок с гранулезными клетками и промывали дважды в фосфатно-солевом буфере. Затем клетки подвергали цитологическому анализу и тестировали на апоптоз. Уровень апоптоза в клетках гранулезы оценивали методами TUNEL и проточной цитофлуориметрии.

Протокол оценки статуса хроматина в клетках гранулезы методом TUNEL подробно представлен в работах, опубликованных ранее [2, 4]. Образцы анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Carl Zeiss Axio Imager A 2m. В тех же образцах оценивали уровень апоптозов методом проточной цитофлуориметрии и цитологическим методом [11]. Для определения уровня живых клеток, апо-

птозов и некрозов добавляли зонд Annexin-V и йодистый пропидий (набор AnnexinV-FITC Apoptosis detection kit, Sigma-Aldrich, США). Оценку проводили на проточном спектрофлуориметре Cytomics FC-500 (Beckman Coulter, США).

Для подготовки цитологических препаратов аспирированные из фолликулов гранулезные клетки ресуспендировали в физиологическом растворе, каплю суспензии помещали на сухое обезжиренное стекло. После осаждения клеток в течение 5–10 мин их фиксировали смесью метанола и уксусной кислоты (3:1). Высохшие препараты окрашивали по Романовскому – Гимза (азур-эозином) в течение 5–10 мин. Образцы анализировали с помощью светового микроскопа при увеличении $\times 900$. Все использованные в исследовании реагенты, за исключением обозначенных, производства фирмы Sigma-Aldrich. Эксперименты проводили в 3–5 повторностях. Для сравнения результатов использовали критерии χ^2 (статистическая программа Sigma Stat). Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали при трех уровнях значимости: $P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$.

Результаты исследований. Ооциты млекопитающих развиваются в овариальном фолликуле – морфологической и структурной единице, в которой биологические клеточные механизмы, взаимодействуя с высшими нервными центрами, обуславливают фолликулярный рост, неизменно заканчивающийся атрезией или овуляцией. Фолликулярный рост и созревание яйцеклеток в яичниках млекопитающих – процесс дифференцировки, сопровождающийся комплексом морфологических, биохимических и молекулярных трансформаций различных компонентов фолликула: ооцита, гранулезы и текальных клеток.

Взаимосвязь функционирования структурных компонентов овариального фолликула детерминирует формирование яйцеклетки,

Рис. 1. Структурно-логическая схема эксперимента

компетентной к оплодотворению и развитию эмбрионов. В настоящем исследовании охарактеризованы показатели жизнеспособности и деструктивные процессы в гранулезных клетках фолликулов, содержащих ооциты в различном функциональном состоянии. Применение трех методов оценки статуса хроматина гранулезы позволило значительно повысить информативность полученных результатов. Исследования проводили в соответствии со схемой, представленной на рис. 1.

При оценке хроматина цитологическим методом использовали морфологические критерии дегенерации ядерного материала в соответствии с критериями, разработанными ранее [7]: 1) слипание части хроматина в темно окрашенную массу, расположенную вдоль ядерной мембраны; 2) наличие компактного ядра с плотным, гомогенно окрашенным, слипшимся хроматином; 3) фрагментация слипшегося хроматина. В каждом образце выделенных гранулезных клеток оценивали по 200 клеток (эксперименты проведены в 5 повторностях, всего 1000 клеток). В фолликулах, содержащих растущие ооциты, уровень пикнотических клеток гранулезы составил 5 % против 9 % в фолликулах, содержащих завершившие фазу роста ооциты ($P < 0,05$). Для обнаружения фрагментации апоптотической ДНК применялся метод TUNEL, позволяющий идентифицировать одиночные разрывы ДНК, широко используемый для количественного определения апоптотических клеток [2, 4].

В каждом образце оценивали 100 клеток, число повторностей эксперимента – 5. Доля апоптотических гранулезных клеток из фолликулов с завершившими фазу роста ооцитами составила 11 %, что значительно превысило таковую

в фолликулах, содержащих растущие ооциты (7 %, $P < 0,05$). На рис. 2а и 2б представлены примеры результатов цитофлуориметрического анализа (Annexin-тест) образцов клеток гранулезы, выделенных из фолликулов с растущими или завершившими фазу роста ооцитами, с учетом показателей жизнеспособности и деструкции хроматина.

Метод оценки соотношения количества живых клеток и клеток на стадии апоптоза, некроза с использованием набора Annexin V-FITC (Apoptosis detection kit) основан на особенностях входящих в него красителей. Аннексин V-FITC специфично связывается с фосфатидилсерином, экстернализация которого служит индикатором апоптоза. Йодистый пропидий проникает только в клетки с поврежденной мембраной и идентифицирует некротические клетки (так как для апоптоза характерно сохранение целостности мембраны вплоть до последних этапов программированной клеточной гибели). Живые клетки не окрашиваются ни одним красителем (Annexin V⁻/PI⁻), апоптотические клетки имеют свечение исключительно по каналу, предназначенному для детекции Аннексина (Annexin V⁺/PI⁻), а некротические клетки и клетки на поздних стадиях апоптоза будут окрашиваться йодистым пропидием или обоими красителями сразу (Annexin V⁺/PI⁺). Концентрация гранулезных клеток в каждом образце составляла $1,3 \times 10^6$ кл./мл, число повторностей эксперимента – 3–5.

Доля жизнеспособных клеток гранулезы в фолликулах с растущими ооцитами составила 88 %, что достоверно превысило таковую в фолликулах с завершившими фазу роста ооцитами – 85 %, $P < 0,05$ (рис. 3а). Установлены достоверные различия в уровне апоптотических

Рис. 2а

Рис. 2б

Рис. 2. Результаты репрезентативного эксперимента цитофлуориметрического анализа (Annexin-тест) образцов клеток гранулезы, выделенных из фолликулов с растущими (BCV-, рис. 2а) или завершившими фазу роста ооцитами (BCV+, рис. 2б), с учетом показателей жизнеспособности и деструкции хроматина

Рис. 3. Мониторинг деструктивных процессов хроматина гранулезы в фолликулах свиней, содержащих растущие или завершившие фазу роста ооциты

гранулезных клеток в фолликулах в зависимости от функционального статуса развивающихся в них ооцитах (рис. 3б). Доля апоптотических клеток гранулезы в фолликулах с завершившими фазу роста ооцитами составила 9 % против 6 % клеток гранулезы из фолликулов, содержащих растущие ооциты ($P < 0,05$). Доля некротических гранулезных клеток в фолликулах с завершившими фазу роста ооцитами превысила таковую в гранулезных клетках фолликулов с растущими ооцитами (5 % против 3 %, $P < 0,05$, рис. 3с). Доля клеток гранулезы в состоянии «глубокого апоптоза» и некроза из фолликулов, содержащих растущие ооциты, составила 0,7 % против 1,4 % ($P < 0,01$) клеток из фолликулов с завершившими фазу роста ооцитами (рис. 3д).

Выявленные различия в характере деструктивных процессов гранулезных клеток в овариальных фолликулах, содержащих ооциты в различном функциональном состоянии, свидетельствуют о вовлечении клеток гранулезы в завершение ооцитами фазы роста. Клетки гранулезы – активные продуценты ряда биологически активных веществ, в первую очередь стероидов (эстрадиола), которые детерминируют успешное созревание женской гаметы [10]. Высокий уровень показателей деструкции хроматина в клетках гранулезы, содержащих завершившие фазу роста ооциты, вероятно, свидетельствует о снижении их функциональной активности, связанной с отсутствием необходимости синтетических процессов, обес-

печивающих активный рост женской гаметы. В фолликулах, содержащих растущие ооциты, необходимость в высокой синтетической активности клеток гранулезы не исчезает, что и может явиться объяснением низкого уровня апоптозов и жизнеспособности.

Заключение. Сравнительный мониторинг показателей жизнеспособности и дегенерации хроматина (апоптоз, пикноз) в клетках гранулезы из фолликулов свиней, содержащих растущие или завершившие фазу роста ооциты, с использованием цитологического анализа, методов цитофлуориметрии и TUNEL-теста выявил достоверные различия в характере атретических процессов гранулезы при формировании яйцеклетки. Достоверность исследований подтверждается использованием комплекса методов оценки показателей жизнеспособности и статуса хроматина гранулезных клеток (цитологический, цитофлуориметрический, TUNEL-тест).

При использовании всех вышеуказанных методов обнаружено, что завершение фазы роста ооцита сопровождается снижением жизнеспособности и возрастанием апоптотических и некротических процессов в клетках гранулезы. В клетках гранулезы из фолликулов, содержащих ооциты, не завершившие фазу роста, деструктивные процессы имеют значительно менее выраженный характер. Это может свидетельствовать о востребованности функционирования гранулезных клеток для завершения фазы роста развивающегося

в фолликуле ооцита. Полученные результаты дополняют имеющиеся в литературе сведения об особенностях взаимодействия половой и соматических клеток овариального фолликула при формировании яйцеклетки, компетентной к оплодотворению и дальнейшему развитию из нее зародыша.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 18-016-00147А).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ВCB-диагностика донорских ооцитов Bos Taurus и Sus Scrofa Domesticus – перспективы использования в клеточных репродуктивных технологиях / Т.И. Кузьмина [и др.] // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2015. – № 2. – С. 212–214.
2. Кузьмина Т.И., Станиславович Т.И., Молчанов А.В. Апоптоз соматических клеток фолликулов и функциональный статус ооцитов BOSTAURUS // Аграрный научный журнал. – 2018. – № 5. – С. 30–35.
3. Egerszegi I., Alm H., J. Ratky B. Meiotic progression, mitochondrial features and fertilization characteristics of porcine oocytes with different G6PDH activities // ReprodFertil Dev., 2010, V. 22, P. 830–838.
4. Feng W., Pan Z. The effect of granulosa cells apoptosis on the cumulus expansion and the developmental competence of bovine oocytes // Advanced Materials Research, 2014, V. 997, P. 251–254.
5. Flisikowska T., Kind A. & Schnieke A. The new pig on the block: modeling cancer in pigs // Transgenic Res., 2013, V. 22, P. 673–680.
6. Grupen C.G. The evolution of porcine embryo in vitro production // Theriogenology, 2014, V. 81, P. 24–37.
7. Jolly P.D., Smith P.R., Heath D.A. et al. Morphological evidence of apoptosis and the prevalence of apoptotic versus mitotic cells in the membrane granulosa of ovarian follicles during spontaneous and induced atresia in ewes // Biol. Reprod., 1997, V. 56, P. 837–846.

8. Meyer M., Hrabe De Angelis M., Wurst W. & Kuhn R. Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases // Proc. Natl. Acad. Sci., 2010, V. 107, P. 15022–15026.

9. Niemann H., Petersen B. The production of multi-transgenic pigs: update and perspectives for xenotransplantation // Transgenic Res., – 2016, V. 25(3), P. 361–374.

10. Sato E. Intraovarian control of selective follicular growth and induction of oocyte maturation in mammals // Proc. Jpn. Acad., 2015, V. 91, P. 76–91.

11. Tarkowski A. An air-drying method for chromosomal preparation from mouse eggs // Cytogenetic, 1966, V. 1, P. 394–400.

Кузьмина Татьяна Ивановна, д-р биол. наук, проф., главный научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста». Россия.

Станиславович Татьяна Ивановна, канд. с.-х. наук, ведущий научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста». Россия.

196625, г. Санкт-Петербург – Пушкин, Московское шоссе, 55а.

Тел.: 892184026719; e-mail: illfor@mail.ru.

Молчанов Алексей Вячеславович, д-р с.-х. наук, проф., зав. кафедрой «Технология производства и переработки продукции животноводства», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова. Россия.

410005, г. Саратов, ул. Соколовая, 335.

Тел.: (8452) 69-25-38; e-mail: molchanov_av@mail.ru.

Татарская Диана Николаевна, врач-репродуктолог, Центр репродуктивных технологий Embry Life. Россия.

190031, г. Санкт-Петербург, ул. Садовая, 35.

Тел.: (963) 322-77-75.

Ключевые слова: гранулеза свиней; ооцит; ВCB-тест; апоптоз.

ASSESSMENT OF DESTRUCTIVE PROCESSES OF CHROMATIN IN GRANULOSE OF PORCINE FOLLICLES CONTAINING GROWING OR FULLY GROWN OOCYTES

Kuzmina Tatiana Ivanovna, Doctor of Biological Sciences, Professor, Senior Re-searcher, All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals – branch of Federal State Budget Scientific Institution “Federal Scientific Center for Animal Husbandry – VIZH named after Academician L.K. Ernst”. Russia.

Stanislavovich Tatyana Ivanovna, Candidate of Agricultural Sciences, Leading Re-searcher, All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals – branch of Federal State Budget Scientific Institution “Federal Scientific Center for Animal Husbandry – VIZH named after Academician L.K. Ernst”. Russia.

Molchanov Aleksey Vyacheslavovich, Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Head of the chair “Technology of Production and Processing of Livestock Product”, , Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov. Russia.

Tatarskaya Diana Nikolaevna, Reproductologist, Center of Reproductive Technologies EmbryLife. Russia.

Keywords: porcine granulosa; oocyte; BCB-test; apoptosis.

Significant differences in character of atretic processes in porcine granulosa were established as a result of comparative monitoring of the viability and degeneration of chromatin (apoptosis, pycnosis) in granulosa cells from follicles containing growing or fully grown oocytes using cytology analysis, cytofluorometry (An-nexin-test) and TUNEL-test. BCB-test was used for the evaluation of the functional state of the oocytes. Completion of the oocyte growth phase was accompanied by a significant increase in the proportion of granulosa cells from the follicles with the fully grown oocyte in the status of apoptosis (11% vs 7%, $P < 0.05$), pycnosis (9% vs 5%, $P < 0.05$), necrosis (5% vs 3%, $P < 0.05$) and a decreasing in the level of viable cells (85% vs 88, $P < 0.05$) compared to the above markers in granulosa cells from follicles with growing oocytes. The revealed features of destructive processes in granulosa cells from follicles containing growing or fully grown oocytes supplement the available information on the features of the interaction of the germ and somatic cells of the ovarian follicle in the formation of an egg that is capable of fertilization and further development of the embryo.