

Оценка деструктивных процессов хроматина гранулезных клеток овариальных фолликулов коров и функциональный статус ооцита

Т. И. Станиславович¹✉, Т. И. Кузьмина¹, А. В. Молчанов²

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального научного центра животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста (ВНИИГРЖ), Санкт-Петербург, Россия

² Саратовский государственный аграрный университет имени Н. И. Вавилова, Саратов, Россия

✉ E-mail: llfor@mail.ru

Аннотация. В настоящее время в связи с совершенствованием клеточных репродуктивных технологий в современном животноводстве появилась возможность для более подробных исследований по изучению ооцита и соматических клеток (клетки гранулезы) фолликула. Необходимость разработки успешных моделей дозревания женских гамет определяет потребность совершенствования существующих методик отбора донорских яйцеклеток). Созревание ооцита *in vivo* происходит при непосредственном участии структурных элементов фолликула, содержащихся в фолликулярной жидкости [3, 4, 6]. Клетки гранулезы широко используются в системах дозревания ооцитов коров, а также в технологиях клонирования и трансгенеза [8, 13]. Цель настоящего исследования – проанализировать деструктивные изменения клеток гранулезы в овариальных фолликулах коров (Ø 3–5 мм), содержащих растущие (BCV⁻) или завершившие фазу роста ооциты (BCV⁺). **Методы.** Тестирование ооцитов по функциональному признаку проводилось с помощью витального красителя BCB (brillant cresyl blue – бриллиантовый кристаллический голубой) [10]. Показатели жизнеспособности в клетках гранулезы, выделенных из фолликулов, содержащих растущие или завершившие фазу роста ооциты, определяли методом проточной цитометрии. **Результаты исследования.** Установлено, что гранулезные клетки из фолликулов коров характеризуются различными показателями уровней апоптоза в зависимости от статуса ооцитов (завершившие рост и растущие), выделенных из этих фолликулов. Доля апоптотических клеток гранулезы в фолликулах коров, содержащих завершившие фазу роста ооциты, значительно превышала таковую в фолликулах, содержащих растущие ооциты (29 % против 18 %, ^cДР < 0,05). **Научная новизна исследований:** данные, полученные при помощи проточной цитометрии, позволяют рассматривать уровень апоптозов в клетках гранулезы овариальных фолликулов коров как индикатор функционального статуса развивающегося в нем ооцита (растущий или завершивший фазу роста). Данный показатель возможно использовать при прогнозировании компетенций ооцитов коров к созреванию *in vitro*.

Ключевые слова: ооцит, гранулеза, апоптоз, корова, бриллиантовый кристаллический голубой, *in vitro*.

Для цитирования: Станиславович Т. И., Кузьмина Т. И., Молчанов А. В. Оценка деструктивных процессов хроматина гранулезных клеток овариальных фолликулов коров и функциональный статус ооцита // Аграрный вестник Урала. 2019. № 12 (191) С. 60–64. DOI: ...

Дата поступления статьи: 15.10.2019.

Постановка проблемы (Introduction)

Появление новых технологических возможностей в клеточных репродуктивных технологиях (клонирование и трансгенез) определяет важность первичного этапа – отбора качественных донорских яйцеклеток для культивирования. Методика ранжирования ооцит-кумулясных комплексов с учетом морфологических критериев (число слоев кумулюсных клеток, ширина зоны пеллюцида, зернистость ооплазмы) долгое время являлась единственной. Визуальная оценка донорских ооцитов, выделенных из фолликулов яичников живых животных (трансвагинальная аспирация) или из постмортальных яичников, во многом зависит от профессиональных компетенций эмбриотехнологов. В качестве способа оценки компетентности яйцеклетки к дальнейшему созреванию предложена

диагностика функционального статуса ооцитов, основанная на разнице в активности фермента глюкозо-6 фосфат дегидрогеназы (G6PDH). На момент аспирации ооциты в фолликулах могут находиться в разном функциональном состоянии: растущие ооциты (BCV⁻) и ооциты, завершившие фазу роста (BCV⁺). Разделить эту гетерогенную популяцию стало возможным с помощью инвазивного витального красителя BCB (brillant cresyl blue – бриллиантовый кристаллический голубой) [10]. BCB-тест основан на способности G6PDH конвертировать окраску BCB из голубой в бесцветную в растущих ооцитах (BCV⁻), а в цитоплазме завершивших стадию роста ооцитах (BCV⁺) BCB-краситель не теряет цвет. Созревание яйцеклетки *in vivo* происходит при участии структурных элементов фолликула, содержащихся в фолликулярной жидкости, состав

которой, безусловно, влияет на качество женской гаметы [3, 4, 6]. Фолликул выполняет две главные функции: продуцирование гормонов и обеспечение роста ооцитов, компетентных к оплодотворению [3, 11]. Клетки гранулезы необходимы для роста и дифференциации ооцитов, нормального протекания мейоза, цитоплазматического созревания, а также контроля транскрипционной активности в яйцеклетках [12, 13, 15]. Гетерогенность ооцитов регулируется на уровне клеточных популяций, и одним из таких механизмов может быть универсальный процесс программированной клеточной гибели – апоптоз, который характерен для единичных клеток или их кластеров яйцеклетках [1, 14]. Этот процесс отвечает за развитие доминантного фолликула и желтого тела, фолликулярную атрезию и овуляцию [2, 7]. Мониторинг деструктивных изменений гранулезных клеток овариальных фолликулов может явиться ключевым моментом в изучении механизмов формирования полноценной яйцеклетки [8, 13].

Методология и методы исследования (Methods)

В экспериментах использовали постмортальные яичники коров разного возраста. Яичники доставляли в лабораторию в термосе в стерильном физиологическом растворе при температуре 32–35 °С. Объектом исследования служили ооцит-кумулосные комплексы (ОКК) и клетки гранулезы (КГ), которые получали путем аспирации жидкости из 453 фолликулов диаметром 3–5 мм с заметно выраженной васкуляризацией и тургором. Аспират, полученный из каждого фолликула, переносили в одну из лунок 96-луночных плат до оценки функционального статуса ооцита. Для экспериментов отбирали ооциты округлой формы, с гомогенной цитоплазмой, равномерной по ширине зоной пеллюциды, окруженные многослойным компактным кумулюсом. Для проведения ВСВ-теста ооцит-кумулосные комплексы (ОКК) коров отмывали в растворе Дюльбекко с добавлением 0,4 % бычьего сывороточного альбумина, затем помещали на 90 минут в 26μМ раствор ВСВ, приготовленного на основе Дюльбекко. После этого аспиранты ФЖ разделяли в соответствии с функциональным статусом находившегося в нем ооцита (растущий или завершивший фазу роста) и центрифугировали при 250g в течение 10 минут. Далее удаляли супернатант, а клетки гранулезы дважды отмывали путем ресуспендирования в фосфатно-солевом буфере. Инкубировали КГ в течение 3 часов при температуре 37 °С в фосфатно-солевом буфере с добавлением 5 % сыворотки крупного рогатого скота. Для оценки экстернализации фосфатидилсерина к клеточной суспензии ($1,3 \times 10^6$ клеток/мл) добавляли зонд к аннексину-V (AnV) и йодистый пропидий (PI) (набор AnnexinV-FITC Apoptosisdetectionkit, Sigma-Aldrich, США) согласно инструкции. Анализ проводили на проточном цитометре Cytomics FC 500. Обработка полученных результатов осуществлялась при помощи программного обеспечения Kaluza™ (BeckmanCoulter, США). Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали при трех уровнях значимости: $P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$ для 3 независимых экспериментов с использованием χ^2 -тест

(статистическая программа SigmaStat). Все использованные в исследовании реагенты, за исключением указанных, производства Sigma-Aldrich. Цель настоящего исследования – проанализировать деструктивные изменения клеток гранулезы в овариальных фолликулах коров (\varnothing 3–5 мм), содержащих растущие (BCV⁻) или завершившие фазу роста ооциты (BCV⁺).

Результаты (Results)

Количество апоптотических клеток определялось как доля клеток, окрашенных аннексином V, но не окрашенных йодистым пропидием (фракция AnV⁺/PI⁻), и выражалось в процентах от общего количества анализируемых клеток. Идентификация некроза базируется на способности йодистого пропидия проникать только в клетки с поврежденной мембраной. Для апоптоза характерно сохранение целостности мембраны вплоть до последних этапов программированной клеточной гибели [5]. Таким образом, живые клетки не будут окрашиваться ни одним красителем (AnnexinV⁻/PI⁻), апоптотические клетки будут окрашиваться аннексином V (AnV⁺), некротические клетки и клетки на поздних стадиях апоптоза будут окрашиваться йодистым пропидием или обоими красителями сразу (AnnexinV⁺/PI⁺). Мониторинг деструктивных процессов в клетках гранулезы овариальных фолликулов коров выявил достоверные различия между уровнем апоптозов гранулезных клеток фолликулов, содержащих растущие или завершившие фазу роста ооциты (18 % против 29 %, $^{c,d}P < 0,05$, (критерий χ^2)). Доля живых клеток гранулезы в фолликулах, содержащих завершившие фазу роста ооциты, была значительно меньше таковой в фолликулах, содержащих растущие ооциты (62 % против 76 %, $^{a,b}P < 0,05$, (критерий χ^2)). Оценка некротических процессов исследуемых образцов показала, что уровень клеток с некрозом и клеток на поздних стадиях апоптоза в фолликулах, содержащих завершившие фазу роста ооциты, был выше по сравнению с этим показателем у клеток гранулезы из фолликулов, содержащих растущие ооциты (11 % против 6 %, $^{c,d}P < 0,05$ (критерий χ^2)).

Обсуждение и выводы (Discussion and Conclusion)

В результате исследования установлено снижение количества жизнеспособных, функционально активных клеток гранулезы в овариальных фолликулах с ооцитами, ранжированными как завершившие фазу роста (BCV⁺). Напротив, доля живых клеток гранулезы, участвующих в формировании компетенции ооцита к созреванию, выше в клетках гранулезы из фолликулов с растущими ооцитами (BCV⁻). Полученные с помощью проточной цитометрии данные о деструктивных изменениях в клетках гранулезы овариальных фолликулов коров с учетом функционального статуса содержащегося в них ооцита (растущие и завершившие фазу роста) позволяют использовать уровень апоптозов гранулезных клеток как показатель при прогнозировании качества донорских ооцитов коров.

Работа выполнена в соответствии с темой Министерства образования Российской Федерации, номер государственной регистрации – АААА-А18-118021590132-9.

Библиографический список

1. Дворяшина И. А. [и др.] Современный взгляд на механизмы и классификацию клеточной гибели // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2016. № 3. С. 59.

2. Косякова Г. П., Прошин С. Н., Шабанов П. Д., Глушаков Р. И. Изменения клеток гранулезы фолликулов в стадии атрезии, регистрируемые с помощью флюорохромов // Морфологические ведомости. 2014. № 2. С. 41–47.
3. Кузьмина Т. И., Мутиева Х. М., Новичкова Д. А. Морфология хроматина соматических клеток овариальных фолликулов коров – индикатор функционального статуса ооцита // Генетика и разведение животных. 2014. № 1. С. 8–11.
4. Сингина Г. Н., Лебедева И. Ю., Шедова Е. Н., Тарадайник Т. Е., Митяшова О. С., Цындрин Е. В., Данч С. С. Способность ооцитов коров к эмбриональному развитию при созревании в разных системах двухфазного культивирования // Сельскохозяйственная биология. 2017. Т. 52. № 4. С. 776–784. DOI: 10.15389/agrobiol.2017.4.776rus.
5. Bravo-San Pedro J. M., Vitale I., Aaronson S. A. [et al.] Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015 // Cell Death and Differentiation. 2015. V. 22. Pp. 58–73. DOI: 10.1038/cdd.2014.137.
6. Bunel A., Nivet A. L., Blondin P., Vigneault C., Richard F. J. & Sirard M. A. // Cumulus cell gene expression associated with preovulatory acquisition of developmental competence in bovine oocytes // Reproduction, Fertility, and Development. 2014. V. 26. Pp. 855–865. DOI: 10.1071/RD13061.
7. 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. Pp. 251–254. DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMR.997.251.
8. Galli C. Achievements and unmet promises of assisted reproduction technologies in large animals: a personal perspective // Animal Reproduction. 2017. V. 14. No. 3. Pp. 614–621. DOI: 10.21451/1984-3143-AR1005.
9. Kuzmina T., Molchanov A., Stanislavovich T., Tatarskaya D. Developmental competence of bovine oocytes that have not finished growth phase in vivo // Anim. Reprod. 2016. V. 13. No. 3. Pp. 651.
10. Kuzmina T., Molchanov A., Stanislavovich T., Tatarskaya D. Steroid levels in fluid of bovine follicles containing growing or fully grown oocytes // Reproduction in domestic animals. 2017. V. 52. S. 3. Pp. 103.
11. Macaulay D. Angus, Gilbert I., Scantland S., Fournier E., Ashkar F., Bastien A., Shojaei Saadi H. A., Gagne D., Sirard M.-A., Khandjian E' douard W., Richard F. J., Hyttel P., Robert C. Cumulus cell transcripts transit to the bovine oocyte in preparation for maturation // Biology of reproduction. 2016. V. 94. No. 1:16. Pp. 1–11. DOI: 10.1095/biolreprod.114.127571.
12. Mazzoni [et al.] Transcriptomic analysis of follicular cells for IVP oocyte competence // Animal Reproduction. 2017. V. 14. No. 3. Pp. 482–489.
13. Melo E. O., Cordeiro D. M., Pellegrino R., Wei Z., Daye Z. J., Nishimura R. C., Dode M. A. Identification of molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells // Stichting International Foundation for Animal Genetics. 2016. V. 48. Pp. 19–29. DOI: 10.1111/age.12496.
14. Sinderewicz E., Grycmacher K., Boruszewska D., Kowalczyk-Zieba I., Staszkiwicz J., Slesak T., Woclawek-Potocka I. Expression of factors involved in apoptosis and cell survival is correlated with enzymes synthesizing lysophosphatidic acid and its receptors in granulosa cells originating from different types of bovine ovarian follicles // Reproduction Biology Endocrinol. 2017. V. 15. Pp. 72. DOI: 10.1186/s12958-017-0287-9.
15. Sonigo C, Grynberg M. In vitro oocyte maturation for female fertility preservation // Gynecol Obstet Fertil. 2014. V. 42. Pp. 657–660. DOI: 10.1016/j.gyobfe.2014.07.009.

Об авторах:

Татьяна Ивановна Станиславович¹, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биологии развития, ORCID 0000-0003-2157-070X, AuthorID 838525; +7 921 402-67-19, lllfor@mail.ru

Татьяна Ивановна Кузьмина¹, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией биологии развития, ORCID 0000-0002-2246-5277, AuthorID 78163; +7 921 392-19-47, prof.kouzmina@mail.ru

Алексей Вячеславович Молчанов², доктор сельскохозяйственных наук, профессор, заведующий кафедрой «Технология производства и переработки продукции животноводства», ORCID 0000-0002-0819-1484, AuthorID 670074; +7 927 134-58-02, molchanov_av@mail.ru

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального научного центра животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста (ВНИИГРЖ), Санкт-Петербург, Россия

² Саратовский государственный аграрный университет имени Н. И. Вавилова, Саратов, Россия

Assessment of the destructive processes of chromatin of granulosa cells and functional status of oocyte in bovine ovarian follicles

T. I. Stanislavovich¹✉, T. I. Kuzmina¹, A. V. Molchanov²

¹ All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals – a branch of Federal Scientific Center of Animal Husbandry – All-Russian Institute of Livestock named after academician L. K. Ernst, Saint Petersburg, Russia

² Saratov State Agrarian University named after N. I. Vavilov, Saratov, Russia

✉E-mail: lllfor@mail.ru

Abstract. Currently, there is the possibility of more detailed studies to the study of oocytes and somatic cells (granulosa cells). The possibility to develop successful models of maturation of female gametes defines the possibility to improve existing methods for the selection of donor eggs and the search for new donor eggs. Oocyte maturation in vivo occurs with the participation of structural follicle elements and follicular fluid [3, 4, 6]. Granulosa cells are widely used in bovine oocyte maturation systems and used in cloning and transgenesis technologies [8, 13]. **Purpose of this study:** to perform destructive changes granulosa cells in ovarian follicles of bovines (\varnothing 3–5 mm), which contain growing (BCB⁻) or completed the growth phase of oocytes (BCB⁺). **Methods:** Functional testing of oocytes was carried out using the vital dye BCB (brilliant cresyl blue – diamond crystal blue) [10]. Viability indices in granulosa cells isolated from follicles that contain oocytes that grow or complete the growth phase were determined by flow cytometry. **The result.** It was found, that cells of granulosa from cow follicles are characterized by different indicators of apoptosis levels depending on the status of oocytes (completed growth and growing) isolated from these follicles. The proportion of apoptotic granulosa cells in bovine follicles of containing oocytes that completed the growth phase, exceeded that in follicles containing growing oocytes by 11 % (29 % vs. 18 %, ^{cid}P < 0.05). **The scientific novelty:** The data obtained using flow cytometry, allow us to evaluate the level of apoptosis in granulosa cells of bovine ovarian follicle as indicator of functional status of developing oocytes (growing or completed growth phases). This indicator can be used in prognosis of competencies for maturation of bovine oocytes.

Keywords: oocyte, granulosa, apoptosis, bovine, brilliant cresyl blue, in vitro.

For citation: Stanislavovich T. I., Kuzmina T. I., Molchanov A. V. Otsenka destruktivnykh protsessov khromatina granuleznykh kletok ovarial'nykh follikulov korov i funktsional'nyy status ootsita [Assessment of the destructive processes of chromatin of granulosa cells and functional status of oocyte in bovine ovarian follicles] // Agrarian Bulletin of the Urals. 2019. No. 12 (191). Pp. 60–64. DOI: ... (In Russian.)

Paper submitted: 15.10.2019.

References

1. Dvoryashina I. A. [et al.] Sovremennyy vzglyad na mekhanizmy i klassifikatsiyu kletochnoy gibeli [A modern view on the mechanisms and classification of cell death] // Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta. 2016. No. 3. Pp. 59. (In Russian.)
2. Kosyakova G. P., Proshin S. N., Shabanov P. D., Glushakov R. I. Izmeneniya kletok granulezy follikulov v stadii atrezii, registriremye s pomoshch'yu flyuorokhromov [Morphologi calchanging of granulose cells in bovine follicles (bostaurus) on the stage of atresia detected by fluorescent makers] // Morfologicheskie vedomosti. 2014. No. 2. Pp. 41–47. (In Russian.)
3. Kuz'mina T. I., Mutieva Kh. M., Novichkova D. A. Morfologiya khromatina somaticheskikh kletok ovarial'nykh follikulov korov-indikator funktsional'nogo statusa ootsita [Morphology of chromatin in somatic cells from ovarian follicle – the indicator of the functional status of the oocyte] // Genetika i razvedenie zhivotnykh. 2014. No. 1. Pp. 8–11. (In Russian.)
4. Singina G. N., Lebedeva I. Yu., Shedova E. N., Taradaynik T. E., Mityashova O. S., Tsyndrina E. V., Danch S. S. Sposobnost' oositov korov k embrional'nomu razvitiyu pri sozrevanii v raznykh sistemakh dvukhfaznogo kul'tivirovaniya [Bovine oocyte ability to embryonic development when maturing in different two-phase culture systems] // Sel'skokhozyaystvennaya biologiya. 2017. T. 52. No. 4. Pp. 776–784. DOI: 10.15389/agrobiol.2017.4.776rus. (In Russian.)
5. Bravo-San Pedro J. M., Vitale I., Aaronson S. A. [et al.] Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015 // Cell Death and Differentiation. 2015. V. 22. Pp. 58–73. DOI: 10.1038/cdd.2014.137.
6. Bunel A., Nivet A. L., Blondin P., Vigneault C., Richard F. J. & Sirard M. A. // Cumulus cell gene expression associated with preovulatory acquisition of developmental competence in bovine oocytes // Reproduction, Fertility, and Development. 2014. V. 26. Pp. 855–865. DOI: 10.1071/RD13061.
7. 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. Pp. 251–254. DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMR.997.251.
8. Galli C. Achievements and unmet promises of assisted reproduction technologies in large animals: a personal perspective // Animal Reproduction. 2017. V. 14. No. 3. Pp. 614–621. DOI: 10.21451/1984-3143-AR1005.
9. Kuzmina T., Molchanov A., Stanislavovich T., Tatarskaya D. Developmental competence of bovine oocytes that have not finished growth phase in vivo // Anim. Reprod. 2016. V. 13. No. 3. Pp. 651.
10. Kuzmina T., Molchanov A., Stanislavovich T., Tatarskaya D. Steroid levels in fluid of bovine follicles containing growing or fully grown oocytes // Reproduction in domestic animals. 2017. V. 52. S. 3. Pp. 103.
11. Macaulay D. Angus, Gilbert I., Scantland S., Fournier E., Ashkar F., Bastien A., Shojaei Saadi H. A., Gagne D., Sirard M. A., Khandjian E' douard W., Richard F. J., Hyttel P., Robert C. Cumulus cell transcripts transit to the bovine oocyte in preparation for maturation // Biology of reproduction. 2016. V. 94. No. 1:16. Pp. 1–11. DOI: 10.1095/biolreprod.114.127571.
12. Mazzoni [et al.] Transcriptomic analysis of follicular cells for IVP oocyte competence // Animal Reproduction. 2017. V. 14. No. 3. Pp. 482–489.
13. Melo E. O., Cordeiro D. M., Pellegrino R., Wei Z., Daye Z. J., Nishimura R. C., Dode M. A. Identification of molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells // Stichting International Foundation for Animal Genetics. 2016. V. 48. Pp. 19–29. DOI: 10.1111/age.12496.

14. Sinderewicz E., Grycmacher K., Boruszewska D., Kowalczyk-Zieba I., Staszkievicz J., Slesak T., Woclawek-Potocka I. Expression of factors involved in apoptosis and cell survival is correlated with enzymes synthesizing lysophosphatidic acid and its receptors in granulosa cells originating from different types of bovine ovarian follicles // *Reproduction Biology Endocrinol.* 2017. V. 15. Pp. 72. DOI: 10.1186/s12958-017-0287-9.

15. Sonigo C, Grynberg M. In vitro oocyte maturation for female fertility preservation // *Gynecol Obstet Fertil.* 2014. V. 42. Pp. 657–660. DOI: 10.1016/j.gyobfe.2014.07.009.

Authors' information:

Tatyana I. Stanislavovich¹, candidate of agricultural sciences, leading researcher laboratory of developmental biology, ORCID 0000-0003-2157-070X, AuthorID 838525; +7 921 402-67-19, lllfor@mail.ru

Tatyana I. Kuzmina¹, doctor of biological sciences, professor, chief researcher, head of the laboratory of developmental biology; ORCID 0000-0002-2246-5277, AuthorID 78163; +7 921 392-19-47, prof.kouzmina@mail.ru

Aleksey V. Molchanov², doctor of agricultural sciences, professor, head of department “Technology of the production and processing of livestock products”; ORCID 0000-0002-0819-1484, AuthorID 670074; +7 927 134-58-02, molchanov_av@mail.ru

¹ All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals – a branch of Federal Scientific Center of Animal Husbandry – All-Russian Institute of Livestock named after academician L. K. Ernst, Saint Petersburg, Russia

² Saratov State Agrarian University named after N. I. Vavilov, Saratov, Russia