

МЕЙОТИЧЕСКОЕ СОЗРЕВАНИЕ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ЛИПИДОМА В ООЦИТАХ СВИНЕЙ, ЗАВЕРШИВШИХ ФАЗУ РОСТА *in vivo* ИЛИ *in vitro*, ПРИ ПРОЛОНГИРОВАННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Т.И. Кузьмина, доктор биологических наук, И.В. Чистякова, аспирант, Д.А. Старикова

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального научного центра животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, 196601, Санкт-Петербург, Пушкин, Московское шоссе, 55а
E-mail: prof.kouzmina@mail.ru

С целью повышения эффективности технологии экстракорпорального созревания донорских ооцитов свиней проанализированы кинетика мейотических преобразований хроматина и функционирование липидома ооцитов, завершивших фазу роста *in vivo* (BCB⁺) или *in vitro* (BCB⁻) при пролонгированном культивировании. Выявлено, что пролонгированное культивирование (до 50 ч) в среде Sage Media Cleavage («Coopersurgical», США) с добавлением 5% Serum Protein Substitute («Coopersurgical», США), 10 МЕ хорионического гонадотропина человека провоцирует разрушение хроматина как у BCB⁺, так и BCB⁻ ооцитов (76% против 50%, P<0.01). Процессы старения ооцитов свиней в результате пролонгирования культивирования сопровождаются изменениями морфологии липидных капель: гранулы трансформируются в кластеры. Высокий процент BCB⁻ ооцитов с нормальным хроматином на стадии метафазы II свидетельствует о возможности ооцитов, не завершивших фазу роста *in vivo*, закончить ее *in vitro* с последующим мейотическим дозреванием. Полученные данные могут быть использованы при моделировании систем дозревания яичных гамет свиней, не завершивших фазу роста *in vivo*.

MEIOTIC MATURATION AND LIPIDOME FUNCTIONING IN PORCINE OOCYTES THAT HAVE FINISHED ITS GROWTH PHASE *in vivo* OR *in vitro* AT PROLONGED CULTIVATION

Kuzmina T.I., Chistyakova I.V., Starikova D.A.

All-Russian research institute of genetics and breeding of farm animals – the branch of Federal Research Center Livestock – AUIAB Academician L.K. Ernst, 196601, Sankt-Peterburg, Pushkin, Moskovskoe shosse, 55a,
E-mail: prof.kouzmina@mail.ru

In order to increase the efficiency of the extracorporeal maturation technology of porcine donor oocytes, the kinetics of meiotic chromatin reorganization and functioning of lipidome in oocyte, which completed their growth phase *in vivo* (BCB⁺) or *in vitro* (BCB⁻) at prolongation of cultivation, were analyzed. It was revealed that prolonged cultivation (up to 50 hours) in Sage Media Cleavage medium (Coopersurgical, USA) with the addition of 5% Serum Protein Substitute (Coopersurgical, USA), 10 IU human chorionic gonadotropin provides chromatin destruction in both BCB⁺ and BCB⁻ oocytes (76% versus 50%, P<0.01). The aging processes of porcine oocytes as a result of prolonged cultivation are accompanied by morphological changes of lipid droplets: granules are transformed into clusters. A high percentage of BCB⁻ oocytes with normal chromatin at the metaphase II stage demonstrate the ability of oocytes that did not complete their growth phase *in vivo* to finish it *in vitro* followed by meiotic maturation. The obtained data can be used to model the maturation systems of porcine female gametes, which did not finish their growth phase *in vivo*.

Ключевые слова: ооциты свиней, мейоз, липидом, функциональный статус, созревание *in vitro*

Key words: porcine oocytes, meiosis, lipidome, functional status, *in vitro* maturation

Использование инновационных репродуктивных биотехнологий в животноводстве (получение эмбрионов *in vitro*, клонирование, трансгенез, в том числе редактирование генома с помощью метода CRISPR-CAS9) обеспечивает интенсификацию селекционного процесса путем тиражирования выдающихся по хозяйственно-полезным признакам особей [1]. Домашняя свинья *Sus scrofa domestica* в силу физиологического и иммунологического сходств с *Homo sapiens* – прекрасная экспериментальная модель для исследования различных заболеваний, ксенотрансплантации органов, получения линий эмбриональных стволовых клеток [2,3]. Эффективность внедрения клеточных репродуктивных и ДНК-технологий в животноводство и биомедицину определяется, прежде всего, качеством донорских ооцитов и адекватностью состава используемых для экстракорпорального созревания гамет сред. Несмотря на несомненные успехи в технологии получения эмбрионов свиней *in vitro*, отдельные ее этапы требуют дальнейшего совершенствования [4]. Популяция донорских ооцитов гетерогенна как по морфологическим показателям, так и по функциональному статусу. Разработка метаболического BCB-теста, позволяющего определять завершенность фазы роста ооцитов, раскрывает возможности углубленного исследования физиологии женской гаметы и индивидуального подхода к условиям экстракорпорального дозревания ооцита [5-

7]. Мониторинг процессов роста, созревания, старения и гибели женской гаметы позволит выявить критические периоды в формировании яйцеклетки и факторы, детерминирующие приобретение ею компетентности к дальнейшему развитию или определяющие ее гибель в культуре. Созревание ооцита – комплексный процесс преобразования хроматина ядра и функционирования клеточных компартментов, в т.ч. и липидома, который играет особую роль у *Sus scrofa domestica* [8,9].

Цель настоящего исследования – проанализировать кинетику мейотического созревания и функционирования липидома ооцитов свиней, завершивших фазу роста *in vivo* (BCB⁺) или *in vitro* (BCB⁻) при пролонгированном экстракорпоральном культивировании.

Методика. Ооцит-кумулясные комплексы (ОКК) выделяли из антральных фолликулов (диаметром от 3 до 6 мм, с высоким тургором и обширной сетью капилляров) яичников свиней в возрасте 6-8 месяцев породы ландрас. В исследовании использовали ооциты округлой формы с гомогенной, тонкозернистой цитоплазмой, равномерной по ширине зоной пеллюциды, окруженные 5 и более слоями клеток кумулюса. После извлечения ооцит-кумулясных комплексов из фолликулов их подвергали BCB-тесту. Для этого ОКК помещали в 13 мМ раствор бриллиантового кристаллического голубого (BCB, В-5388), приготовленный на фосфатно-солевом буфере с 0,4%-ным бычьим сы-

вороточным альбумином (А-7888) на 90 мин при температуре 38,5 °С в атмосфере 5% CO₂, 90% влажности [10,11]. Затем, в соответствии с окраской ооплазмы, ОКК делили на ВСВ⁺ – завершившие фазу роста (ооплазма ооцитов оставалась окрашенной) и ВСВ⁻ – растущие (ооплазма теряла окраску). ОКК культивировали в среде Sage Media Cleavage (SMC, «Coopersurgical», США) с добавлением 5% Serum Protein Substitute (SPS, «Coopersurgical», США), 10 МЕ хорионического гонадотропина человека. Режим культивирования соответствовал описанному в методических рекомендациях, разработанных в лаборатории биологии развития ФГБНУ ВНИИГРЖ [10]. Цитологический анализ стадий мейоза проводили в соответствии с методом, представленным в работе Fu В. с соавторами (2015), путем окрашивания хромосом 10 мг/мл Hoechst 33342 [7]. К деструктивным изменениям метафазных хромосом относили морфологические аномалии: слипание хромосом, фрагментацию, деспирализацию или потерю четких очертаний хроматина. Проведен мониторинг показателей ядерного созревания и деструктивных изменений хроматина ооцитов через 24, 44 и 50 ч культивирования. Всего прокультивировано 354 ооцит-кмулюсных комплекса.

Для анализа липидного содержимого ооцита гаметы денудировали и окрашивали флуоресцентным красителем Nile red. Краситель растворяли в среде для культивирования, затем ооциты погружали в 1 мМ раствор и выдерживали при комнатной температуре в темноте 5 мин. Оценку морфологии хромосом и липидных капель проводили с помощью микроскопа Carl Zeiss Axio Imager A2m.

Для сравнения результатов экспериментов использовали критерий χ^2 . Данные обрабатывали с помощью пакета статистической программы Sigma Stat. Достоверность разности сравниваемых средних значений оценивали при трех уровнях значимости: $P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$.

Результаты и обсуждение. Основная масса выделенных из антральных фолликулов ооцитов находится на стадии диплотены. Для завершения ядерного созревания (достижение стадии метафазы II) хроматину ооцита необходимо поэтапно преодолеть стадии мейоза, включая диплотену, диакинез, метафазу I, анафазу, телофазу. К моменту извлечения гамет из фолликулов они завершают фазу роста и приобретают компетентность к созреванию. Время, необходимое «выросшим» ооцитам свиней для завершения ядерного созревания, составляет 44 ч. Через 24 ч 32% ВСВ⁺ ооцитов находились на стадии метафазы I, 47% – на стадиях анафазы и телофазы. К этому же времени 52% ВСВ⁻ ооцитов достигли стадии метафазы I, 12% – стадии анафазы и телофазы, что достоверно ниже ($P < 0,01$), чем у ВСВ⁺ ооцитов (рис. 1).

Через 44 ч большинство ВСВ⁺ ооцитов (60%) завершило мейотическое созревание, и лишь 31% ВСВ⁻ ооцитов достиг стадии метафазы II (рис. 2).

Пролонгация культивирования до 50 ч позволила выявить следующие особенности мейотического преобразования хроматина ВСВ⁺ и ВСВ⁻ ооцитов (рис. 3). Основная масса ВСВ⁺ ооцитов (76%) была представлена клетками с аномальным хроматином (фрагментация, деспирализация, слипание) и лишь 24% ооцитов с нормальным хроматином находились на стадии метафазы II. На этот же период 50% ВСВ⁻ ооцитов с нормальным хроматином находились на стадии метафазы II, а у 50% ВСВ⁻ ооцитов хроматин оценивался как дегенерированный.

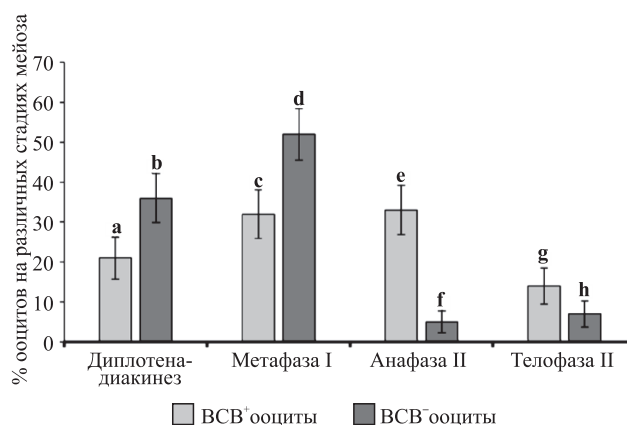


Рис. 1. Статус хроматина ооцитов свиней после культивирования в течение 24 ч. Достоверность различий χ^2 -test: bf; bh; df; dh; ef $P < 0,001$; cd; ce: ef $P < 0,05$.

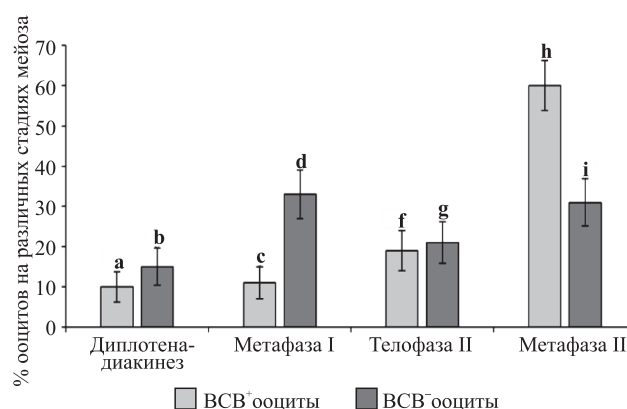


Рис. 2. Статус хроматина ооцитов свиней после культивирования в течение 44 ч. Достоверность различий χ^2 -test: ag; cg; eg $P < 0,001$; bd; bh $P < 0,05$; cd; gh $P < 0,01$.

Рост деструктивных процессов в ВСВ⁺ ооцитах при пролонгации культивирования спровоцирован, по-видимому, процессами «старения» яйцеклетки. Ооциты, тестированные в момент извлечения из фолликулов как растущие, завершали рост *in vitro* и затем приступали к мейотическому созреванию, т.е. в более поздние сроки, чем ВСВ⁻ ооциты.

Формирование яйцеклетки – тандем процессов преобразования хроматина и функциональной активности органелл гаметы [12]. Одним из важных отличий, характеризующих ооциты свиньи, является повышенное содержание в них липидов по сравнению с другими видами животных [13,14]. Характеристика показателей функциональной активности липидома гаметы в периоды роста, созревания и старения позволяет идентифицировать факторы, вовлеченные в процесс формирования ооцита с высокими качественными показателями [8].

В экспериментах, в соответствии с разработанными ранее классификациями функциональной активности липидома, а именно – липидных капель, оценивали следующие показатели: интенсивность флуоресценции, интрацитоплазматическая локализация и морфология липидных капель [9,15,16]. Данные проведенных нами исследований представлены на рис. 4.

Не обнаружено достоверных различий в интенсивности флуоресценции липидных капель в тестируе-

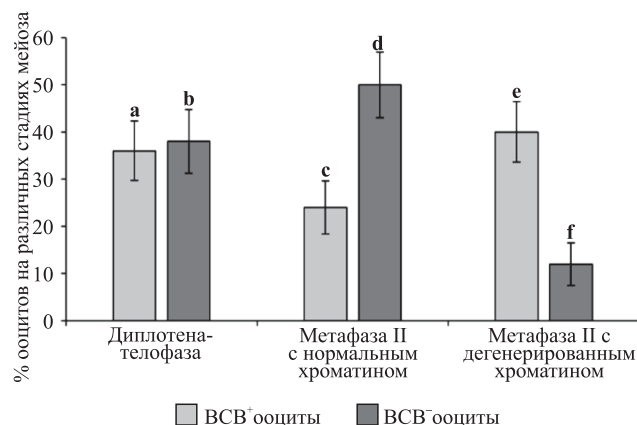


Рис. 3. Статус хроматина ооцитов свиней после культивирования в течение 50 ч. Достоверность различий χ^2 -test: e,f; d,f $P < 0,001$; c,d; b,f $P < 0,01$.

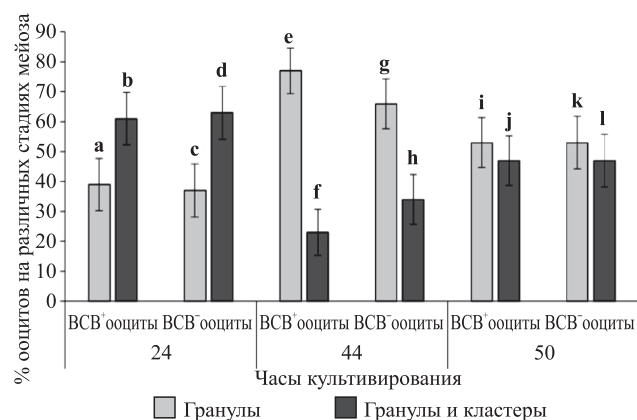


Рис. 4. Оценка морфологии липидных капель ооцитов свиней при пролонгированном культивировании. Достоверность различий χ^2 -test: e,f $P < 0,001$; a,e; c,e; b,f $P < 0,01$; a,g; c,g; e,h; b,h; d,h; f,j; f,l $P < 0,05$.

мые временные промежутки культивирования BCB⁺ и BCB⁻ ооцитов. При исследовании морфологии липидных капель учитывали полученные нами данные, свидетельствующие о том, что в ооцитах, оцененных как дегенерированные по ряду показателей, в т.ч. дегенерация хромосом, липидные капли формировали кластеры. Липидом нормальных ооцитов был представлен мелкими гранулами. В настоящем исследовании обнаружено, что при пролонгированном культивировании доля ооцитов, содержащих липидные капли в виде мелких гранул совместно с кластерами, возрастала как в BCB⁺, так и BCB⁻ ооцитах. Не обнаружено достоверных различий в уровне ооцитов с липидными каплями в виде гранул спустя 24 ч культивирования. Через 44 ч доля ооцитов с гранулярными липидными каплями возрастала. Дальнейшее культивирование сопровождалось снижением уровня BCB⁺ и BCB⁻ ооцитов с липидными каплями в виде гранул.

Таким образом, старение ооцита свиней в результате пролонгирования культивирования сопровождается

кластеризацией липидных капель. Пролонгированное культивирование провоцировало деструкцию хроматина как у BCB⁺, так и BCB⁻ ооцитов. Высокий процент BCB⁻ ооцитов с нормальным хроматином на стадии метафазы II в результате пролонгации культивирования позволяет сделать предположение о возможности ооцитов, не завершивших фазу роста *in vivo*, закончить ее *in vitro* с последующим мейотическим дозреванием. Полученные данные могут быть использованы при моделировании систем дозревания женских гамет свиней, не завершивших фазу роста *in vivo*, что позволит повысить эффективность клеточных репродуктивных технологий, основой которых является метод экстракорпорального созревания ооцитов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект №18-016-00147А).

Литература

1. Prathes S., Hawley R.J., Carter D.B., Lai L., Greenstein J.L. Transgenic swine for biomedicine and agriculture // *Theriogenology*. – 2003. – V. 59. – № 1. – P. 115-123.
2. Aigner B., Renner S., Kessler B., Klymiuk N., Kurome M., Wunsch A., Wolf E. Transgenic pigs as models for translational biomedical research // *Journal of molecular medicine*. – 2010. – № 88. – P. 653-664.
3. Niemann H., Petersen B. The production of multi-transgenic pigs: update and perspectives for xenotransplantation // *Transgenic Research*. – 2016. V.25. – № 3. – P. 361-374.
4. Dyck M.K., Zhou C., Tsoi S., Grant J., Dixon W.T., Foxcroft G.R. Reproductive technologies and the porcine embryonic transcriptome // *Animal Reproduction Science*. – 2014. – V.149. – № 1-2. – P. 11-18.
5. Кузьмина Т.И., Новичкова Д.А., Волкова Н.А. Моделирование систем созревания ооцитов свиней *in vitro* // *Сельскохозяйственная биология*. – 2013. – № 2. – С. 52-57.
6. Ishizaki C. Developmental competence of porcine oocytes selected by brilliant cresyl blue and matured individually in a chemically defined culture medium // *Theriogenology*. – 2009. – V.72. – № 1. – P. 72-80.
7. Fu B., Ran L., Liu D., Ma J.-Z., An T.-Z., Bay J. Sub cellular characterization of porcine acolytes with different glucose-6-phosphate dehydrogenase activities Asian Austral as // *Journal of Animal Science*. – 2015. – V. 28. – № 12. – P.1703-1712.
8. Prates E.G., Nunes J.T., Pereira R.M. A role of lipid metabolism during cumulus-oocyte complex maturation: Impact of lipid modulators to improve embryo production // *Mediators of inflammation*. – 2014. – № 2014. – P. 692096-692107.
9. Welte M.A. Expanding roles for lipid droplets // *Current Biology*. – 2015. – № 25. – P. R470-R481.
10. Кузьмина Т.И., Торнер X., Альм X. Методы получения эмбрионов свиней *in vitro*: методические рекомендации // СПб-Пушкин, 2008. – 36 с.
11. Egerszegi I. Meiotic progression, mitochondrial features and fertilization characteristics of porcine oocytes with different G6PDH activities // *Reproduction, Fertility and Development*. – 2010. – № 22. – P. 830-838.
12. Reader K.L., Stanton J.-A. L., Juengel L.J. The role of oocyte organelles in determining developmental competence // *Biology*. – 2017. – № 6. – P.35.
13. Niu Y., Wang Ch., Xiong Q., Yang X., Chi D., Li P., Liu H., Li J., Huang R. Distribution and content of lipid droplets and mitochondria in pig parthenogenetically activated embryos after delipation // *Theriogenology*. – 2015. – № 83. – P.131-138.
14. Budna J., Celichowski P., Bryja A., Jeseta M., Jankowski M., Bukowska D., Antosik P., Nowicki A., Brüßow K. P., Bruska M., Nowicki M. Expression changes in fatty acid metabolic process related genes in porcine oocytes during *in vitro* maturation // *Medical journal of Cell Biology*. – 2018. – V.6. – № 2. – P. 48-54.
15. Ago Q. The lipid droplet — a well-connected organelle // *Frontiers in cell and developmental biology*. – 2015. – V.3. – P.49.
16. Dunning K.R., Russell D.L., Robker R.L. Lipids and oocyte developmental competence: The role of fatty acids and β -oxidation // *Reproduction*. – 2014. – V. 148. – №1. – P. R15-27.

Поступила в редакцию 14.08.19

После доработки 09.09.19

Принята к публикации 10.10.19