

ДИНАМИКА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В СТАРЕЮЩИХ ЯЙЦЕКЛЕТКАХ КОРОВ ПРИ ПРОЛОНГИРОВАННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ IN VITRO

© И. Ю. Лебедева,* Г. Н. Сингина, А. В. Лопухов, Н. А. Зиновьева

Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства РАСХН, Подольск—Дубровицы;

* электронный адрес: irledv@mail.ru

В отсутствие активирующих стимулов в созревших ооцитах млекопитающих инициируются процессы старения, которые негативно влияют на качество яйцеклеток и их способность к дальнейшему развитию. В представленной работе на модели пролонгированного культивирования ооцитов коров была исследована динамика ряда морфофункциональных изменений, ассоциированных с постовуляторным старением. В ооцитах, окруженных клетками кумулюса, миграция первого полярного тельца относительно хромосом на стадии метафазы II начиналась между 18 и 22 ч созревания. Угол отклонения тельца от метафазной пластинки возрастал по мере увеличения времени культивирования до 30 ч. Через 32 ч культивирования наблюдали повышение доли яйцеклеток с аномальной морфологией хромосом, которое продолжалось вплоть до 56 ч. Кроме того, через 56 ч у 16 % созревших ооцитов были выявлены признаки спонтанной партеногенетической активации. При пролонгированном культивировании ооцитов, лишенных кумулюсных клеток через 20 ч созревания, возрастание частоты хромосомных нарушений было обнаружено только через 44 ч. Вместе с тем удаление кумулюса не влияло на поддержание блокады мейоза II в стареющих яйцеклетках. При этом деструктивным изменениям хромосом в ооцитах сопутствовало постепенное повышение уровня апоптотической дегенерации и снижение пролиферативной активности окружающих клеток кумулюса. Полученные результаты свидетельствуют о различной временной динамике отдельных морфофункциональных изменений и об участии кумулюсных клеток в модуляции скорости деструктивных модификаций метафазных хромосом в стареющих яйцеклетках коров.

Ключевые слова: ооциты, клетки кумулюса, старение яйцеклеток, первое полярное тельце, состояние метафазных хромосом, спонтанная партеногенетическая активация.

Принятые сокращения: ДО — денудированные ооциты, ОКК — ооцит-кумуляные комплексы, ПН — пронуклеус, ППТ — первое полярное тельце, ФПС — фактор промоции созревания.

В отсутствие активирующих стимулов в созревших ооцитах млекопитающих инициируются процессы старения, которые негативно влияют на качество яйцеклеток (Miao et al., 2009). Наиболее детально на клеточном уровне эти процессы исследованы у человека, лабораторных грызунов и свиней. Установлено, что постовуляторное старение женских гамет характеризуется рядом функциональных изменений, которые сходны с таковыми, наблюдаемыми при репродуктивном старении. Они включают в себя хромосомные аномалии, дефекты веретена деления, нарушение сегрегации сестринских хроматид, повышение предрасположенности к апоптозу и партеногенезу, снижение оплодотворяемости и способности к эмбриональному развитию (Mailhes et al., 1998; Goud et al., 1999; Tatone et al., 2006; Somfai et al., 2011).

Согласно современным представлениям, в основе вышперечисленных негативных последствий старения ооцитов лежат изменения, происходящие в их цитоплазме. Они связаны с молекулярными трансформациями, главным образом с изменением синтеза эффекторных белков и характера их посттрансляционных модификаций, а также с ухудшением митохондриальной функции и

ослаблением антиоксидантной защиты (Eichenlaub-Ritter et al., 2004; Tatone et al., 2006, 2008; Miao et al., 2009). Эти процессы контролируются различными внутриклеточными механизмами, функционирование которых может происходить относительно автономно. У разных видов млекопитающих, включая коров, центральным молекулярным событием, ассоциированным со старением зрелых ооцитов и снятием блокады мейоза II, является снижение активности фактора промоции созревания (ФПС), который представляет собой комплекс циклинзависимой киназы CDK1 и белка циклина В (Kikuchi et al., 2000; Tian et al., 2002; Tatone et al., 2006). Далее следует падение активности MAP-киназы, которая, как и ФПС, вовлечена в поддержание блокады мейоза на метафазе II (Tian et al., 2002; Ma et al., 2005; Tatone et al., 2006). Идентифицированы и другие внутриклеточные посредники, участвующие в регуляции различных функциональных изменений в стареющих ооцитах, например ионы кальция, протеинкиназа С и оксид азота (Goud et al., 2005; Takahashi et al., 2009; Petr et al., 2011).

Клетки кумулюса, окружающие ооцит, являются специализированной субпопуляцией клеток гранулезы,

основная функция которых заключается в обеспечении созревающего ооцита питательными веществами и сигнальными молекулами, необходимыми для приобретения им компетенции к дальнейшему развитию (Tanghe et al., 2002). Кумулюсные клетки, по-видимому, также участвуют в регуляции процессов старения ооцита, однако данные по этому вопросу достаточно противоречивы. Показано, что после овуляции клетки кумулюса мышей и крыс подвергаются апоптотической дегенерации, оставаясь в составе ооцит-кумуляного комплекса или находясь в яйцевоме в непосредственной близости от ооцита (Longo, 1980; Szoltys et al., 2000). При этом у мышей выявлено как стимулирующее, так и тормозящее влияние *in vitro* клеток кумулюса на связанные со старением функциональные изменения в яйцеклетках (Miao et al., 2005; Takahashi et al., 2009).

К настоящему времени установлено близкое сходство цитологических и молекулярных модификаций, которые происходят в созревших ооцитах во время их последующего пролонгированного культивирования *in vitro*, и соответствующих модификаций, сопровождающих постовуляторное старение *in vivo*, хотя последние инициируются быстрее (Miao et al., 2005, 2009). Таким образом, пролонгированное культивирование ооцитов млекопитающих является удобной моделью для изучения как самого процесса старения, так и факторов, участвующих в его регуляции. Кроме того, знание хронологии событий, ведущих к снижению качества яйцеклетки *in vitro*, является необходимой предпосылкой для определения предельно допустимого времени между завершением ее созревания и процедурой последующей активации.

В этой связи в представленной работе изучена динамика ряда морфофункциональных изменений, ассоциированных с постовуляторным старением, при пролонгированном культивировании яйцеклеток коров, а также исследована роль клеток кумулюса в модуляции скорости этих изменений.

Материал и методика

Объектом исследования служили ооцит-кумуляные комплексы (ОКК) из антральных фолликулов яичников коров и половозрелых телок. Полученные на мяскокомбинате яичники без видимых признаков патологии доставляли в лабораторию при 30—35 °С в течение 2 ч после овариэктомии животных и многократно отмывали в стерильном физиологическом растворе с антибиотиками (100 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина). Изоляцию и оценку ОКК выполняли, как описано ранее (Лебедева и др., 2009), все манипуляции с ооцитами осуществляли под стереомикроскопом Nikon (Япония).

Для выделения, культивирования и окраски клеток использовали среду TC-199 (содержащую L-глутамин и НЕРЕС), гентамицин, пируват натрия, свиной фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), овечий лютеинизирующий гормон (ЛГ), минеральное масло, гиалуронидазу, краситель Гимза, флуоресцентный краситель Hoechst 33342 (все от Sigma, США) и фетальную бычью сыворотку (Hyclone, США).

С целью анализа миграции первого полярного тельца (ППТ) ОКК культивировали в течение 18, 22, 26 или 30 ч в среде TC-199, содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки, 1 мМ пирувата натрия, 50 мкг/мл гентамицина, 10 мкг/мл ФСГ и 5 мкг/мл ЛГ (среда созревания). Затем

ооциты освобождали от клеток кумулюса путем инкубации ОКК в 0.1%-ном растворе гиалуронидазы (в среде созревания, не содержащей ФСГ и ЛГ) в течение 1 мин при 37 °С и последующего пипетирования комплексов с помощью микропипетки с диаметром отверстия 130 мкм. Денудированные (освобожденные от кумулюса) ооциты (ДО) окрашивали в течение 5 мин флуоресцентным красителем Hoechst 33342 (10 мкг/мл в среде созревания без ФСГ и ЛГ). Локализацию ППТ определяли под флуоресцентным микроскопом (Carl Zeiss, Германия) путем измерения угла между двумя линиями, соединяющими центр ооцита соответственно с ППТ и с метафазной пластинкой. Ооциты делили на 4 группы по величине угла отклонения ППТ от метафазной пластинки: 1-я 0—10, 2-я 11—20, 3-я 21—30 и 4-я более 30 град.

Для оценки динамики деструктивных изменений метафазных хромосом и частоты партеногенетической активации ооцитов ОКК первоначально культивировали в течение 20 ч в среде созревания, затем переносили в ту же среду, но без ФСГ и ЛГ и культивировали в течение следующих 12, 24, 36 или 48 ч. Контролем служили ОКК, созревшие в течение первых 20 ч. Общее время культивирования составляло соответственно 20, 32, 44, 56 или 68 ч. Кроме того, часть созревших ооцитов освобождали от кумулюса по вышеописанному методу и полученные ДО культивировали в течение 12—48 ч в тех же условиях, что и ОКК.

Подготовку препаратов ядерного материала половых клеток и эмбрионов проводили, как описано ранее (Лебедева и др., 2005). Состояние хромосом в ооцитах коров оценивали в соответствии с известными морфологическими критериями (Эрнст и др., 1979, 1980). К деструктивным изменениям метафазных хромосом относили следующие морфологические аномалии: деспирализацию и потерю четких очертаний, частичное слипание, слипание с образованием единой комковатой массы, фрагментацию. Общее число ооцитов, подвергшихся спонтанной партеногенетической активации в соответствующих группах, определяли путем суммирования числа раздробившихся эмбрионов и числа ооцитов, достигших стадий анафазы II—телофазы II или содержащих пронуклеус.

После культивирования клетки кумулюса выделяли из ОКК вышеописанным методом, фиксировали смесью этанола и уксусной кислоты (3 : 1) и окрашивали красителем Гимза. Наличие деструктивных изменений ядерного материала в клетках оценивали, как описано нами ранее (Лебедева и др., 2008, 2011), на основании критериев, разработанных для клеток кумулюса (гранулезы), подвергающихся апоптозу (Ikeda et al., 2003). Признаками дегенерации ядерного материала служили: 1) компактное ядро с гомогенно окрашенным, слипшимся хроматином (пикноз); 2) образование нескольких фрагментов слипшегося хроматина; 3) слипание части хроматина в темноокрашенную массу, локализованную вдоль ядерной мембраны. Кроме того, были идентифицированы кумулюсные клетки с морфологическими признаками, характерными для митоза (от стадии профазы до телофазы). На каждом препарате было оценено не менее 1000 клеток. Долю клеток с признаками дегенерации ядерного материала или митотических клеток выражали в % от общего числа клеток кумулюса. Исследование состояния ядерного материала в ооцитах и клетках кумулюса проводили с помощью микроскопа Opton (Германия), используя объектив с увеличением 100×.

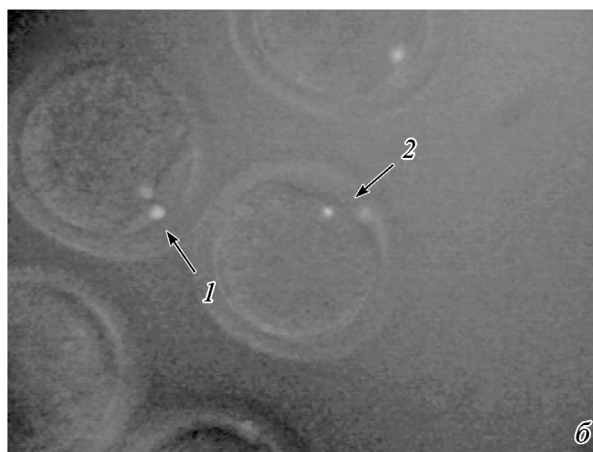
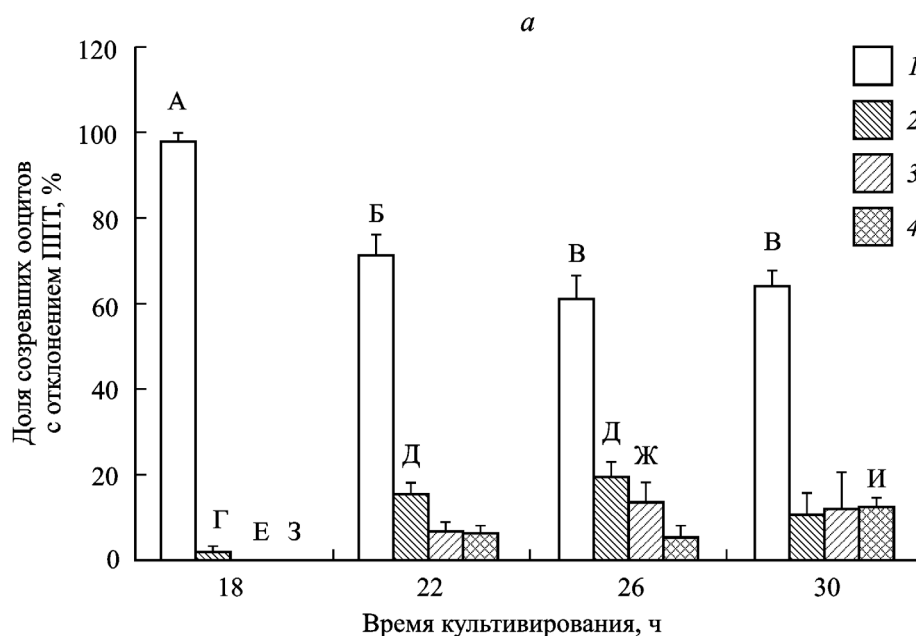


Рис. 1. Миграция первого полярного тельца (ППТ) относительно хромосом на стадии метафазы II в процессе пролонгированного культивирования окруженных кумулюсом ооцитов коров.

a — динамика миграции ППТ относительно метафазной пластинки. Вертикальные отрезки — стандартные ошибки средних значений. Отклонение ППТ от метафазной пластинки (град): столбцы 1 — 0—10, 2 — 11—20, 3 — 21—30, 4 — более 30. Достоверность различия между сравниваемыми средними значениями: А, ВР < 0.01, А, ВР < 0.001, Г, ДР < 0.05, Е, ЖР < 0.05, З, ИР < 0.05. *б* — репрезентативная микрофотография локализации ППТ относительно метафазной пластинки. Об. 40×. 1 и 2 — отклонения 0—10 и 11—20 град соответственно.

Эксперименты по культивированию ОКК были выполнены в 3—4 независимых повторностях. Данные, выраженные в %, обрабатывали методом однофакторного и двухфакторного дисперсионного анализа при помощи программы SigmaStat. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали с использованием критерия Тьюки (Лакин, 1990), при этом был принят уровень значимости $P < 0.05$. При вычислении корреляционных отношений использовали коэффициент Пирсона.

Результаты

Образование ППТ является общепризнанным морфологическим критерием достижения ооцитом стадии метафазы II. Дисперсионный анализ данных показал, что увеличение времени культивирования ОКК коров с 18 до 30 ч не влияло существенно на долю ооцитов, содержащих

ППТ, которая составляла 69.9 ± 2.4 (18 ч), 75.0 ± 3.0 (22 ч), 73.8 ± 4.1 (26 ч) или 78.2 ± 2.3 % (30 ч). Напротив, локализация ППТ относительно метафазной пластинки в целом зависела от времени культивирования ($P < 0.001$). Через 18 ч у 98 % созревших ооцитов ППТ было расположено рядом с метафазными хромосомами (отклонение 0—10 град), тогда как через 22 ч доля таких ооцитов снижалась ($P < 0.01$), достигая минимума через 26—30 ч (рис. 1). При этом возрастало ($P < 0.05$) относительное число яйцеклеток, у которых отклонение ППТ составляло 11—20 град (22 и 26 ч культивирования), 21—30 град (26 ч культивирования), а также более 30 град (30 ч культивирования). Таким образом, миграция ППТ, которая является одним из наиболее ранних событий, связанных со старением яйцеклеток млекопитающих (Miao et al., 2009), начиналась у коров между 18 и 22 ч созревания ооцитов *in vitro*. В этой связи в дальнейших экспериментах время культивирования 20 ч было

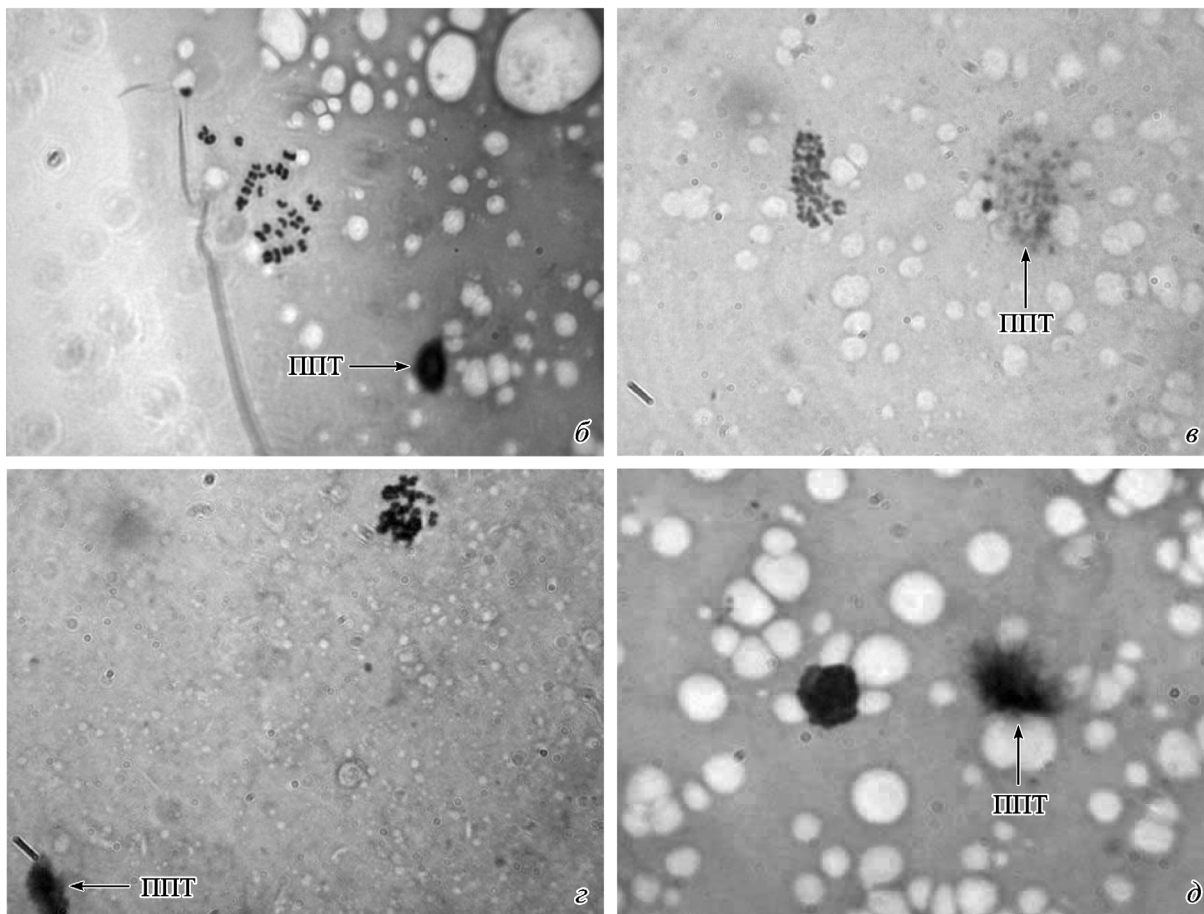
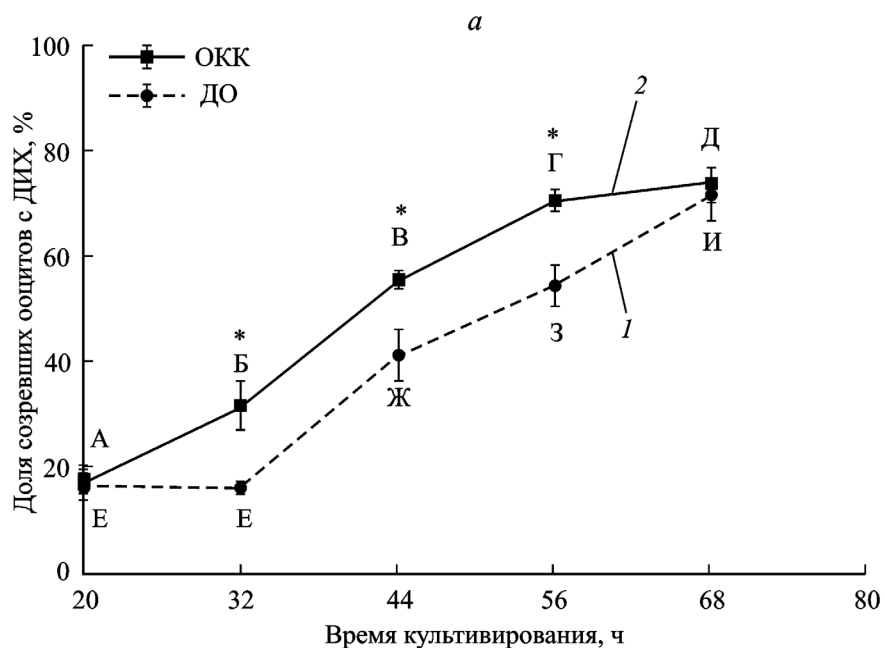


Рис. 2. Деструктивные изменения состояния метафазных хромосом (ДИХ) в процессе пролонгированного культивирования созревших *in vitro* изолированных (ДО) и окруженных кумулюсом (ОКК) ооцитов коров.

a — динамика ДИХ: кривая 1 — ДО, кривая 2 — ОКК. Достоверные различия между сравниваемыми средними значениями: А, ВР < 0.05, А, ВР < 0.001, А, ГР < 0.001, А, ДР < 0.001, Б, ВР < 0.001, Б, ГР < 0.001, Б, ДР < 0.001, В, ГР < 0.05, В, ДР < 0.01 (ОКК); Е, ЖР < 0.001, Е, ЗР < 0.001, Е, ИР < 0.001, Ж, ИР < 0.001, З, ИР < 0.05 (ДО); звездочка показывает достоверные различия между ОКК и ДО в соответствующий временной интервал ($P < 0.01$). б—д — репрезентативные микрофотографии; морфология хромосом на стадии метафазы II (цитогенетические препараты): без признаков деструктивных изменений (б), деспирализация и потеря четких морфологических очертаний (в), частичное слипание (з), образование единой комковатой массы (д). Об. 100×. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

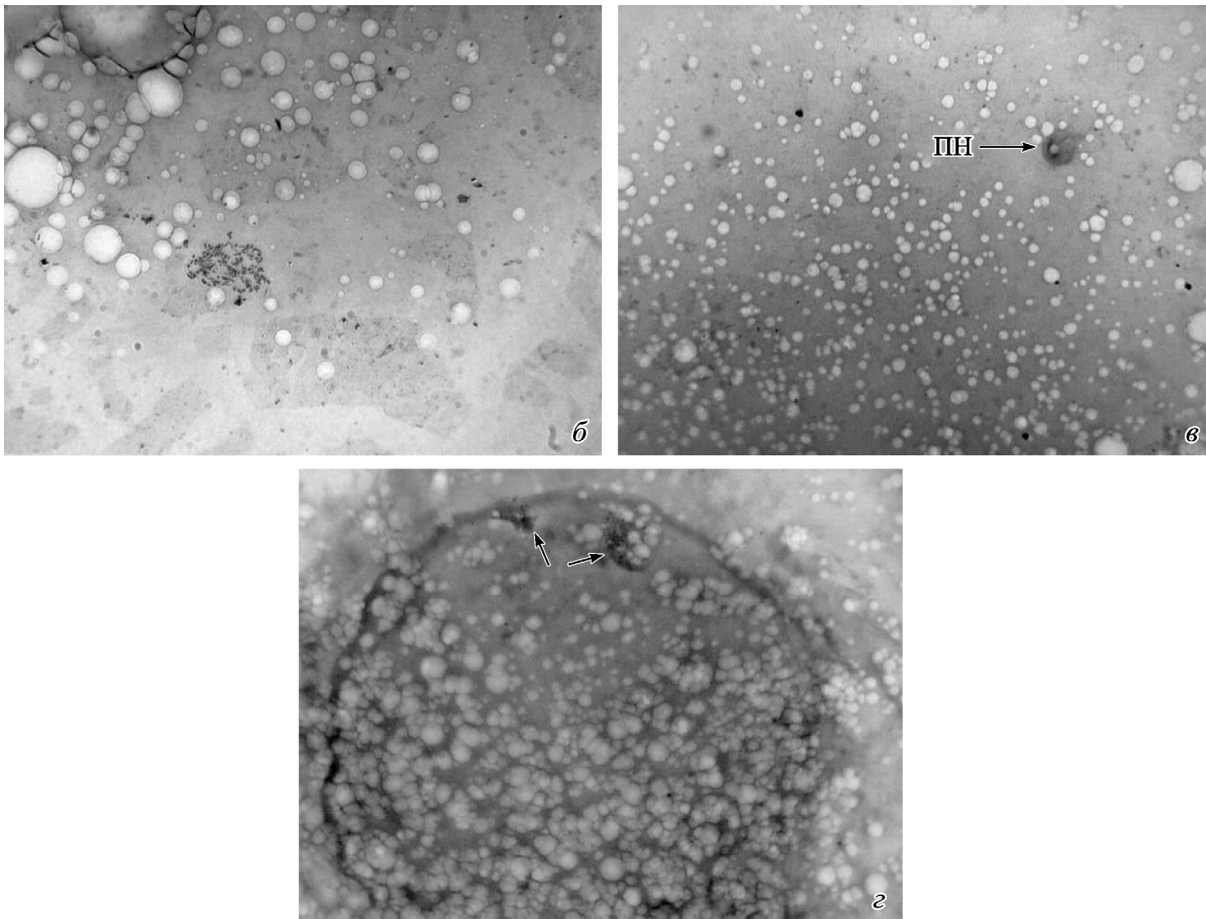
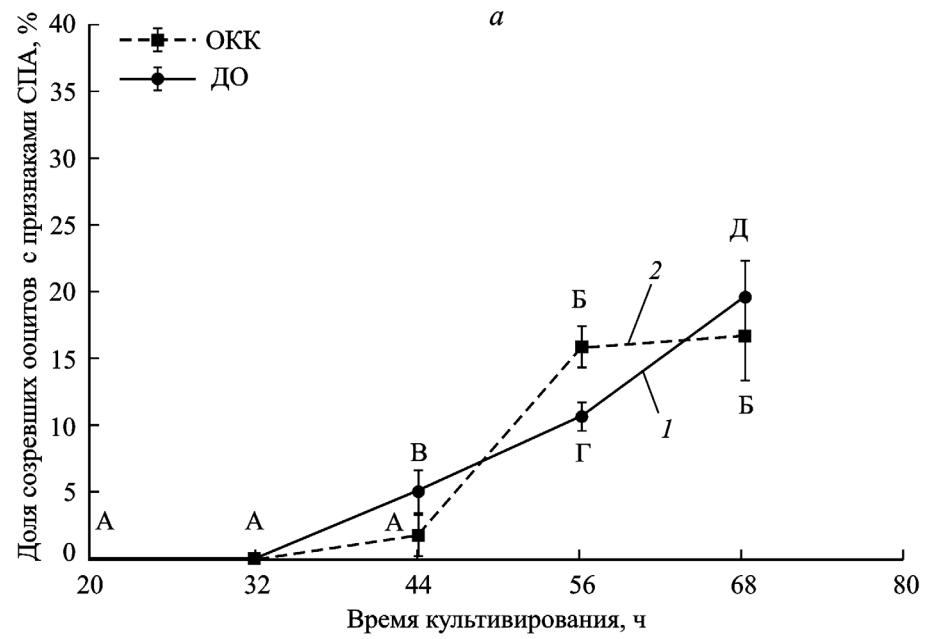


Рис. 3. Спонтанная партеногенетическая активация (СПА) в процессе пролонгированного культивирования созревших *in vitro* изолированных (ДО) и окруженных кумулюсом (ОКК) ооцитов коров.

a — динамика СПА: кривая 1 — ДО, кривая 2 — ОКК. Достоверные различия между сравниваемыми средними значениями: А, БР < 0.001 (ОКК); А, ГР < 0.01, А, ДР < 0.001, В, ДР < 0.001, Г, ДР < 0.05 (ДО). Остальные обозначения те же, что и на рис. 1. б–з — репрезентативные микрофотографии различных стадий партеногенетической активации ооцитов (цитогенетические препараты): анафаза II (б), стадия пронуклеуса (ПН) (в), двухклеточный эмбрион; стрелками показаны ядра (з). Об. 40×.

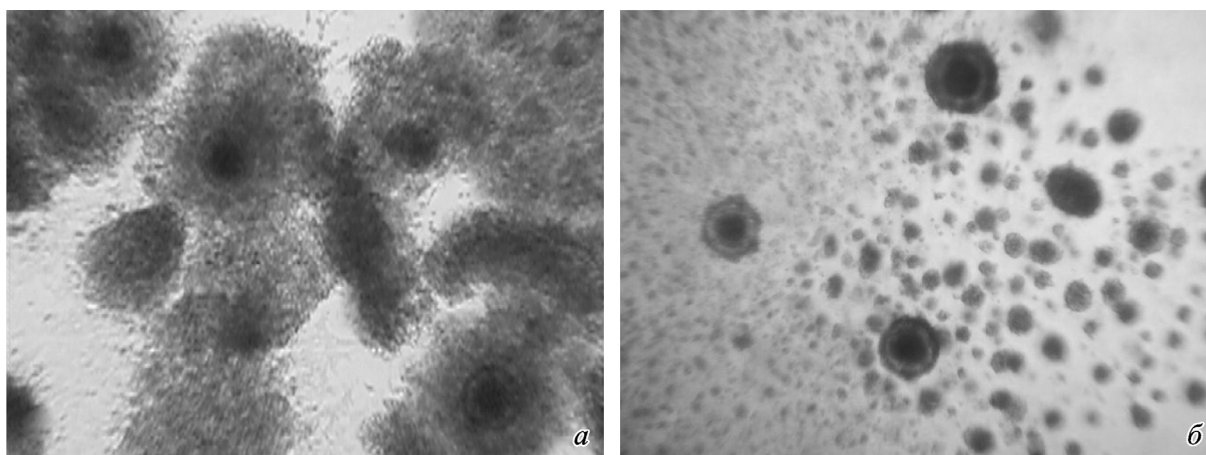


Рис. 4. Морфология кумулюса в ОКК коров через 20 (а) и 68 (б) ч культивирования. Об. 10×.

нами выбрано в качестве контрольной точки для мониторинга нарастания морфофункциональных изменений, ассоциированных с постовуляторным старением ооцитов.

Через 20 ч созревания ОКК доля ооцитов с деструктивными изменениями метафазных хромосом составляла $17.5 \pm 2.6\%$ от общего числа клеток, достигших стадии метафазы II (рис. 2). В этих экспериментах выход созревших яйцеклеток был в среднем $81.7 \pm 4.2\%$. К 32 ч культивирования наблюдали возрастание частоты хромосомных нарушений в ооцитах ($P < 0.05$), которое продолжалось в течение последующих 24 ч, а затем становилось менее выраженным. Удаление кумулюса через 20 ч созревания ооцитов обуславливало торможение деструктивных процессов в ДО по сравнению с ОКК вплоть до 56 ч культивирования ($P < 0.01$). В отсутствие окружающих соматических клеток повышение доли яйцеклеток с аномальной морфологией хромосом было обнаружено только через 44 ч. Тем не менее выявленное торможение было кратковременным: через 68 ч культивирования ОКК и ДО относительное число ооцитов с деструктивными изменениями метафазных хромосом было одинаковым в соответствующих группах.

Первые признаки ослабления блокады второго деления мейоза появлялись через 44 ч культивирования ОКК и ДО (рис. 3). Вместе с тем относительное число созревших ооцитов, подвергшихся спонтанной партеногенетической активации, существенно возрастало лишь к 56 ч (по крайней мере $P < 0.01$). При этом частота партеногенетической активации изолированных и окруженных кумулюсом ооцитов была сходной.

Морфология кумулюса заметно изменялась в процессе пролонгированного культивирования ОКК коров *in vitro*

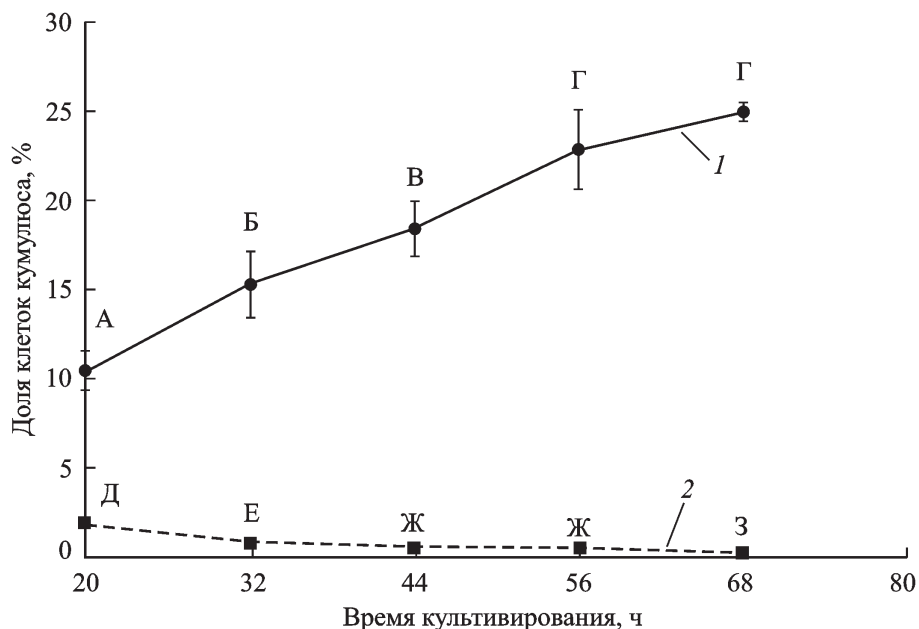


Рис. 5. Изменения функционального состояния клеток кумулюса в процессе пролонгированного культивирования созревших *in vitro* ооцитов коров.

Кривые: 1 — доля клеток с признаками дегенерации ядерного материала, 2 — доля клеток в стадии митоза. Достоверные различия между сравниваемыми средними значениями: А, $VP < 0.05$, А, $ГP < 0.01$, Б, $ГP < 0.05$ (1); Д, $EP < 0.001$, Д, $ЖP < 0.001$, Д, $ЗP < 0.001$, Е, $ЗP < 0.05$ (2). Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

го (рис. 4). Через 68 ч ооциты еще оставались окруженными несколькими слоями кумулюсных клеток, хотя значительная часть последних диссоциировала из комплексов. Морфологическая оценка состояния ядерного материала в клетках кумулюса, сопряженных с яйцеклетками, показала постепенное повышение ($P < 0.001$) уровня их апоптотической дегенерации и снижение ($P < 0.001$) пролиферативной активности (рис. 5). Кроме того, повышение частоты хромосомных нарушений в ооцитах во время пролонгированного культивирования ОКК позитивно коррелировало с увеличением доли клеток кумулюса с дегенеративными изменениями хроматина ($r = 0.86$, $P < 0.001$) и с уменьшением доли клеток в стадии митоза ($r = 0.85$, $P < 0.001$). Тем не менее значительное возрастание ($P < 0.05$) относительного числа кумулюсных клеток с признаками деструкции ядерного материала наблюдали только через 44 ч культивирования, тогда как частота хромосомных нарушений в ооцитах повышалась уже к 32 ч.

Обсуждение

Данные настоящей работы о локализации ППТ в зрелых ооцитах коров в целом согласуются с результатами, полученными по миграции ППТ в стареющих ооцитах лабораторных грызунов (Miao et al., 2004; Wang et al., 2009). Так, в ооцитах мышей смещение ППТ относительно метафазного веретена *in vivo* и *in vitro* инициируется почти сразу после его образования во время завершения первого деления мейоза (Miao et al., 2004). Кроме того, в процессе старения яйцеклеток мышей после овуляции или экстракорпорального созревания обнаружено постепенное увеличение расстояния между метафазной пластинкой и ППТ. В нашем исследовании изменение локализации ППТ относительно хромосом на метафазе II началось между 18 и 22 ч культивирования ооцитов, что совпадало по времени с завершением их ядерного созревания. При этом максимальный угол отклонения ППТ от метафазной пластинки возрастал по мере увеличения времени культивирования с 18 до 30 ч. Вместе с тем это возрастание происходило значительно медленнее, чем в ооцитах мышей, что указывает на более медленное расширение перивителлинового пространства (Miao et al., 2004). Таким образом, динамика миграции ППТ в зрелых ооцитах, по-видимому, характеризуется некоторыми видовыми особенностями.

У человека и лабораторных грызунов ранее были описаны различные хромосомные нарушения, наблюдаемые при постовуляторном старении ооцитов. Хотя основное внимание исследователей было направлено на изучение преждевременного разделения сестринских хроматид, ассоциированного с анеуплоидией, также были отмечены деконденсация, фрагментация и слипание хромосом (Eichenlaub-Ritter et al., 1988; Van Wissen et al., 1991; Mailhes et al., 1998). При пролонгированном культивировании яйцеклеток коров основными выявленными нами аномалиями в морфологии метафазных хромосом являлись их деспирализация и слипание (частичное или с образованием единой комковатой массы). Сходные изменения в состоянии хроматина ооцитов наблюдали и в процессе репродуктивного старения самок (Miao et al., 2009). При использовании конфокальной микроскопии для количественного трехмерного анализа ядерного материала в ооцитах стареющих мышей недавно было пре-

монстрировано усиление адгезии между хромосомами в метафазе I, которое может быть следствием дефектов их морфологии, связанных с деконденсацией (увеличение объема и площади поверхности, округление формы), а также сокращения межхромосомной дистанции (Tian et al., 2013). В целом эти данные свидетельствуют о снижении степени спирализации метафазных хромосом как общем признаке старения ооцитов млекопитающих.

В работах ряда авторов было показано, что старение вызывает различные эпигенетические изменения в ооцитах, такие как снижение уровня метилирования ДНК и гистонов и повышение уровня гистоновой ацетиляции (Huang et al., 2007; Liang et al., 2008; Manosalva, Gonzalez, 2010). Как известно, модификации гистонов играют важную роль в регуляции хромосомных трансформаций во время мейоза, в том числе упаковки хроматиновых нитей в конденсированные хромосомы (Endo et al., 2005; Ivanovska, Orr-Weaver, 2006). К настоящему времени получены экспериментальные данные о том, что снижение уровня метилирования гистонов в ооцитах стареющих самок может обуславливать структурные аномалии хромосом, включая их деконденсацию, и влиять на дальнейшую хромосомную сегрегацию (Manosalva, Gonzalez, 2010). Однако до сих пор не идентифицированы эпигенетические изменения, вызывающие хромосомные трансформации при постовуляторном старении яйцеклеток.

В нашем исследовании частота деструктивных изменений в морфологии метафазных хромосом ооцитов, окруженных кумулюсом, возрастала в течение 32 ч культивирования. В этой связи следует отметить, что снижение активности ФПС, очевидно, не является компонентом механизма индукции выявленных нами хромосомных аномалий, поскольку оно происходит только к 40–44 ч культивирования ооцитов коров (Wu et al., 1997). В свою очередь аномальные хромосомные модификации могут иметь негативные последствия для способности яйцеклеток к дальнейшему развитию. Действительно, через 30 ч культивирования происходит снижение потенциала к эмбриональному развитию у ооцитов различных видов жвачных, включая коров (Emuta, Hogiuchi, 2001; Maalouf et al., 2009; Zhang et al., 2013). Необходимы дальнейшие исследования, направленные на идентификацию взаимосвязей между модификацией молекулярных сигналов, эпигенетическими изменениями, структурными аномалиями хромосом и компетенцией к развитию в стареющих яйцеклетках млекопитающих.

Нами было обнаружено, что временная динамика спонтанной партеногенетической активации яйцеклеток коров отличается от той, которая наблюдается для деструктивных изменений метафазных хромосом. При этом частота активации сходна с частотой, зафиксированной другими исследователями при пролонгированном культивировании ооцитов крупного рогатого скота (Lechniak et al., 1998). В настоящее время в качестве основной причины снятия блокады второго деления мейоза рассматривают понижение активностей ФПС и MAP-киназы при старении женских гамет (Miao et al., 2009). В нашем исследовании первые признаки спонтанной партеногенетической активации были обнаружены через 44 ч культивирования, т. е. к моменту уменьшения активности ФПС в ооцитах коров (Wu et al., 1997). Тем не менее уровень партеногенетической активации яйцеклеток значительно возрастал только к 56 ч, что соответствует более позднему снижению активности MAP-киназы (Tian et al., 2002). Таким образом, полученные нами данные согласуются с

современным представлением о том, что для снятия блокады мейоза II в ооцитах необходима инактивация обеих киназ.

Как известно, клетки кумулюса участвуют в поддержании нормальных процессов созревания, овуляции и оплодотворения ооцитов млекопитающих (Tanghe et al., 2002). Однако их роль в регуляции старения яйцеклеток не совсем ясна. Показано, что клетки кумулюса могут как ускорять, так и замедлять *in vitro* различные функциональные изменения, ассоциированные со старением. При постовуляторном старении и пролонгированном культивировании ОКК мышей кумулюсные клетки повышали чувствительность ооцитов к искусственной партеногенетической активации и снижали их последующую способность поддерживать активность ФПС, хотя и не влияли на спонтанный партеногенез (Miao et al., 2005). Кроме того, клетки кумулюса усиливали фрагментацию стареющих яйцеклеток свиней, а также понижали их способность к эмбриональному развитию после электроактивации (Wu et al., 2011). С другой стороны, у мышей эти клетки поддерживали компетенцию стареющих *in vitro* ооцитов к оплодотворению и последующему развитию до стадии бластоцисты и предотвращали окислительный стресс (Takahashi et al., 2009). В настоящей работе удаление кумулюсных клеток из ОКК коров приводило к кратковременному торможению деструктивных изменений метафазных хромосом, но не оказывало влияния на спонтанную партеногенетическую активацию созревших *in vitro* ооцитов. Следовательно, у коров клетки кумулюса также могут ускорять некоторые процессы, связанные со старением яйцеклеток.

При пролонгированном культивировании ОКК коров повышению частоты хромосомных нарушений в ооцитах сопутствовали постепенное возрастание уровня деструктивных изменений хроматина в кумулюсных клетках и снижение митотической активности последних. При этом у млекопитающих установлена обратная связь между пролиферативной активностью клеток гранулы (кумулюса) и их подверженностью апоптозу (Quirk et al., 2004). Нарастание апоптотических изменений, в том числе в генной транскрипции, ранее было выявлено в клетках кумулюса, сопряженных с ооцитами коз и свиней, стареющими *in vitro* (Wu et al., 2011; Zhang et al., 2013). Апоптоз также наблюдали в кумулюсных клетках, окружающих ооциты крыс, в процессе старения *in vivo* (Szoltys et al., 2000). Как известно, ооциты секретируют паракринные факторы роста, которые направляют дифференцировку клеток кумулюса и защищают их от апоптоза (Gilchrist et al., 2008). Было выдвинуто предположение о том, что стареющие ооциты постепенно теряют такую способность, вследствие чего кумулюсные клетки подвергаются апоптотической дегенерации и в свою очередь начинают продуцировать вещества, негативно влияющие на функциональную активность и жизнеспособность ооцитов (Wu et al., 2011). Показано, что клетки кумулюса вносят вклад в процесс старения яйцеклеток путем секреции растворимых паракринных факторов, которые повышают чувствительность ооцитов к искусственной партеногенетической активации у мышей, а также понижают способность к эмбриональному развитию и усиливают фрагментацию ооцитов у свиней (Qiao et al., 2008; Wu et al., 2011). Выявленная нами позитивная корреляция между долей яйцеклеток с деструктивными изменениями хромосом и уровнем апоптотической дегенерации клеток кумулюса показывает, что у коров интенсивность старения ооцитов

также зависит, по крайней мере частично, от функционального состояния окружающих соматических клеток.

Таким образом, полученные результаты демонстрируют различную временную динамику отдельных морфофункциональных изменений при пролонгированном культивировании ооцитов коров, что свидетельствует о различии предшествующих молекулярных изменений. При этом клетки кумулюса, подвергающиеся апоптотической дегенерации, могут ускорять деструктивные модификации метафазных хромосом в стареющих *in vitro* яйцеклетках.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-01888).

Список литературы

- Лакин Г. Ф. 1990. Биометрия. М.: Высшая школа. 352 с. (Lakin G. F. 1990. Biometrics. Moscow: High School. 352 p.)
- Лебедева И. Ю., Кибардина Т. В., Кузьмина Т. И. 2005. Участие клеток гранулы в опосредовании действия пролактина и соматотропина на ооцит-кумулюсные комплексы коров *in vitro*. Цитология. 47 (10) : 882—888. (Lebedeva I. Yu., Kibardina T. V., Kuz'mina T. I. 2005. Participation of granulosa cells in mediation of prolactin and somatotropin action on bovine oocyte-cumulus complexes *in vitro*. Tsitologiya. 47 : 882—888.)
- Лебедева И. Ю., Сингина Г. Н., Волкова Н. А., Мормышев А. Н., Голубев А. К., Зиновьева Н. А. 2008. Взаимодействие сигнальных каскадов, индуцированных цАМФ и пролактином в ооцит-кумулюсных комплексах коров. Цитология. 50 (8) : 734—742. (Lebedeva I. Yu., Singina G. N., Volkova N. A., Mormishev A. N., Golubev A. K., Zinovieva N. A. 2008. Interaction of signal cascades induced by cAMP and prolactin in bovine oocyte-cumulus complexes. Cell Tissue Biol. 2 : 472—480.)
- Лебедева И. Ю., Сингина Г. Н., Тарадайник Т. Е., Зиновьева Н. А. 2011. Роль протеинкиназ в проведении сигнала пролактина в ооцит-кумулюсных комплексах коров. Цитология. 53 (8) : 679—686. (Lebedeva I. Yu., Singina G. N., Taradajnic T. E., Zinovieva N. A. 2011. Protein kinase implication in prolactin signaling in bovine oocyte-cumulus complexes. Cell Tissue Biol. 5 : 560—567.)
- Лебедева И. Ю., Сингина Г. Н., Эрнст Л. К., Голубев А. К. 2009. Пути реализации модулирующего влияния пролактина на цАМФ-зависимый механизм регуляции мейоза в ооцитах коров. Цитология. 51 (7) : 559—564. (Lebedeva I. Yu., Singina G. N., Ernst L. K., Golubev A. K. 2009. Realization pathways of prolactin modulating effect on the cAMP-dependent mechanism of meiosis regulation in bovine oocytes. Cell Tissue Biol. 3 : 438—444.)
- Эрнст Л. К., Свиридов Б. Е., Галиева Л. Д., Голубев А. К., Янушка А. Л., Пименова М. Н. 1980. Нарушение мейоза при культивировании ооцитов коров. Цитология. 22 (4) : 475—477. (Ernst L. K., Sviridov B. E., Galiyeva L. D., Golubev A. K., Yanushka A. L., Pimenova M. N. 1980. Meiosis abnormality during culture of cow oocytes. Tsitologiya. 22 : 475—477.)
- Эрнст Л. К., Янушка А. Л., Свиридов Б. Е., Галиева Л. Д., Пименова М. Н., Никитин А. И., Голубев А. К., Мамлеев Р. С. 1979. Культивирование фолликулярных ооцитов коров. Докл. ВАСХНИЛ. 4 : 27—28. (Ernst L. K., Yanushka A. L., Sviridov B. E., Galiyeva L. D., Pimenova M. N., Nikitin A. I., Golubev A. K., Mamleyev R. S. 1979. Culture of cow follicular oocytes. Dokl. VASKhNIL. 4 : 27—28.)
- Eichenlaub-Ritter U., Stahl A., Luciani J. M. 1988. The microtubular cytoskeleton and chromosomes of unfertilized human oocytes aged *in vitro*. Hum. Genet. 80 : 259—264.
- Eichenlaub-Ritter U., Vogt E., Yin H., Gosden R. 2004. Spindles, mitochondria and redox potential in ageing oocytes. Reprod. Biomed. Online. 8 : 45—58.
- Emuta C., Horiuchi T. 2001. Effects of timing of activation and aging of bovine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm

- injection ICSI on cleavage and subsequent embryonic development *in vitro*. *J. Reprod. Develop.* 47 : 399—405.
- Endo T., Naito K., Aoki F., Kume S., Tojo H. 2005. Changes in histone modifications during *in vitro* maturation of porcine oocytes. *Mol. Reprod. Develop.* 71 : 123—128.
- Gilchrist R.B., Lane M., Thompson J.G. 2008. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum. Reprod. Update.* 14 : 159—177.
- Goud A.P., Goud P.T., Diamond M.P., Abu-Soud H.M. 2005. Nitric oxide delays oocyte aging. *Biochemistry.* 44 : 11 361—11 368.
- Goud P., Goud A., Van Oostveldt P., Van der Elst J., Dhont M. 1999. Fertilization abnormalities and pronucleus size asynchrony after intracytoplasmic sperm injection are related to oocyte postmaturation. *Fertil. Steril.* 72 : 245—252.
- Huang J. C., Yan L. Y., Lei Z. L., Miao Y. L., Shi L. H., Yang J. W., Wang Q., Ouyang Y. C., Sun Q. Y., Chen D. Y. 2007. Changes in histone acetylation during postovulatory aging of mouse oocyte. *Biol. Reprod.* 77 : 666—670.
- Ikeda S., Imai H., Yamada M. 2003. Apoptosis in cumulus cells during *in vitro* maturation of bovine cumulus-enclosed oocytes. *Reproduction.* 125 : 369—376.
- Ivanovska I., Orr-Weaver T. L. 2006. Histone modifications and the chromatin scaffold for meiotic chromosome architecture. *Cell Cycle.* 5 : 2064—2071.
- Kikuchi K., Naito K., Noguchi J., Shimada A., Kaneko H., Yamashita M., Aoki F., Tojo H., Toyoda Y. 2000. Maturation/M-phase promoting factor: a regulator of aging in porcine oocytes. *Biol. Reprod.* 63 : 715—722.
- Lechniak D., Cieslak D., Sosnowski J. 1998. Cytogenetic analysis of bovine parthenotes after spontaneous activation *in vitro*. *Theriogenology.* 49 : 779—785.
- Liang X. W., Zhu J. Q., Miao Y. L., Liu J. H., Wei L., Lu S. S., Hou Y., Schatten H., Lu K. H., Sun Q. Y. 2008. Loss of methylation imprint of Snrpn in postovulatory aging mouse oocyte. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71 : 16—21.
- Longo F. J. 1980. Aging of mouse eggs *in vivo* and *in vitro*. *Gamete Res.* 3 : 379—393.
- Ma W., Zhang D., Hou Y., Li Y.H., Sun Q.Y., Sun X.F., Wang W. H. 2005. Reduced expression of MAD2, BCL2, and MAP kinase activity in pig oocytes after *in vitro* aging are associated with defects in sister chromatid segregation during meiosis II and embryo fragmentation after activation. *Biol. Reprod.* 72 : 373—383.
- Maalouf W. E., Lee J. H., Campbell K. H. 2009. Effects of caffeine, cumulus cell removal and aging on polyspermy and embryo development on *in vitro* matured and fertilized ovine oocytes. *Theriogenology.* 71 : 1083—1092.
- Mailhes J. B., Young D., London S. N. 1998. Postovulatory ageing of mouse oocytes *in vivo* and premature centromere separation and aneuploidy. *Biol. Reprod.* 58 : 1206—1210.
- Manosalva I., González A. 2010. Aging changes the chromatin configuration and histone methylation of mouse oocytes at germinal vesicle stage. *Theriogenology.* 74 : 1539—1547.
- Miao Y. L., Kikuchi K., Sun Q. Y., Schatten H. 2009. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Hum. Reprod. Update.* 15 : 573—585.
- Miao Y. L., Liu X. Y., Qiao T. W., Miao D. Q., Luo M. J., Tan J. H. 2005. Cumulus cells accelerate aging of mouse oocytes. *Biol. Reprod.* 73 : 1025—1031.
- Miao Y., Ma S., Liu X., Miao D., Chang Z., Luo M., Tan J. 2004. Fate of the first polar bodies in mouse oocytes. *Mol. Reprod. Develop.* 69 : 66—76.
- Petr J., Krejčová M., Rajmon R., Jilek F. 2011. Activation of protein kinase C suppresses fragmentation of pig oocytes aged *in vitro*. *Animal.* 5 : 565—571.
- Qiao T. W., Liu N., Miao D. Q., Zhang X., Han D., Ge L., Tan J. H. 2008. Cumulus cells accelerate aging of mouse oocytes by secreting a soluble factor(s). *Mol. Reprod. Develop.* 75 : 521—528.
- Quirk S. M., Cowan R. G., Harman R. M., Hu C. L., Porter D. A. 2004. Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. *J. Anim. Sci.* 82 (E-Suppl.) : E40—E52.
- Somjai T., Kikuchi K., Kaneda M., Akagi S., Watanabe S., Mizutani E., Haraguchi S., Dang-Nguyen T. Q., Inaba Y., Geshi M., Nagai T. 2011. Cytoskeletal abnormalities in relation with meiotic competence and ageing in porcine and bovine oocytes during *in vitro* maturation. *Anat. Histol. Embryol.* 40 : 335—344.
- Szołtys M., Tabarowski Z., Pawlik A. 2000. Apoptosis of postovulatory cumulus granulosa cells of the rat. *Anat. Embryol. (Berlin).* 202 : 523—529.
- Takahashi T., Igarashi H., Kawagoe J., Amita M., Hara S., Kurachi H. 2009. Poor embryo development in mouse oocytes aged *in vitro* is associated with impaired calcium homeostasis. *Biol. Reprod.* 80 : 493—502.
- Tanghe S., Van Soom A., Nauwynck H., Coryn M., de Kruif A. 2002. Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol. Reprod. Develop.* 61 : 414—424.
- Tatone C., Amicarelli F., Carbone M.C., Monteleone P., Caserta D., Marci R., Artini P.G., Piomboni P., Focarelli R. 2008. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. *Hum. Reprod. Update.* 14 : 131—142.
- Tatone C., Carbone M. C., Gallo R., Delle Monache S., Di Cola M., Alesse E., Amicarelli F. 2006. Age-associated changes in mouse oocytes during postovulatory *in vitro* culture: possible role for meiotic kinases and survival factor BCL2. *Biol. Reprod.* 74 : 395—402.
- Tian N., Zhang L., Zheng J. H., Lv D. Y., Li Y., Ma W. Y. 2013. Three-dimensional quantitative analysis of chromosomes in the oocytes of aging mice during meiosis I *in vitro*. *Theriogenology.* 79 : 249—256.
- Tian X. C., Lonergan P., Jeong B. S., Evans A. C., Yang X. 2002. Association of MPF, MAPK, and nuclear progression dynamics during activation of young and aged bovine oocytes. *Mol. Reprod. Develop.* 62 : 132—138.
- Van Wissen B., Bomsel-Helmreich O., Debey P., Eisenberg C., Vautier D., Pennehouat G. 1991. Fertilization and ageing processes in non-divided human oocytes after GnRHa treatment: an analysis of individual oocytes. *Hum. Reprod.* 6 : 879—884.
- Wang L., Li D., Li Z. 2009. Changes in the reciprocal position of the first polar body and oocyte chromosome set in golden hamsters. *Biosci. Rep.* 29 : 315—320.
- Wu B., Ignatz G., Currie W.B., Yang X. 1997. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 56 : 253—259.
- Wu Y., Wang X. L., Liu J. H., Bao Z. J., Tang D. W., Wu Y., Zeng S. M. 2011. BIM EL-mediated apoptosis in cumulus cells contributes to degenerative changes in aged porcine oocytes via a paracrine action. *Theriogenology.* 76 : 1487—1495.
- Zhang G. M., Gu C. H., Zhang Y. L., Sun H. Y., Qian W. P., Zhou Z. R., Wan Y. J., Jia R. X., Wang L. Z., Wang F. 2013. Age-associated changes in gene expression of goat oocytes. *Theriogenology.* 80 : 328—336.

DYNAMICS OF MORPHOFUNCTIONAL CHANGES IN AGING
BOVINE OVA DURING THE PROLONGED CULTURE *IN VITRO*

I. Yu. Lebedeva, G. N. Singina, A. V. Lopukhov, N. A. Zinovieva*

All-Russian Research Institute of Animal Husbandry, Podolsk—Dubrovitsy;

* e-mail: irledv@mail.ru

In the absence of activating stimuli, aging processes are initiated in matured mammalian oocytes, which negatively affect the quality of ova and their capacity for further development. On the model of the prolonged culture of bovine oocytes, the dynamics of a number of morphofunctional changes associated with the postovulatory aging was investigated in the present work. In cumulus-enclosed oocytes, migration of the first polar body relative to metaphase II chromosomes started between 18 and 22 h of maturation. The angle of the body deviation from the metaphase plate rose as the culture time increased to 30 h. By 32 h of culture, a gain in the rate of ova with the abnormal chromosome morphology was observed that continued up to 56 h. Furthermore, after 56 h, signs of spontaneous parthenogenetic activation were revealed in 16 percent of matured oocytes. During the prolonged culture of oocytes deprived of cumulus cells after 20 h of maturation, an increase in the frequency of chromosomal abnormalities was found only by 44 h. At the same time the cumulus elimination did not affect the maintenance of the meiosis II blockade in aging ova. Meanwhile, destructive chromosomal changes in oocytes were attended by a gradual rise in the level of apoptotic degeneration and reduction in the proliferative activity of surrounding cumulus cells. The results obtained point to the various temporal dynamics of distinct morphofunctional changes and to the participation of cumulus cells in modulation of the speed of metaphase chromosome destructive modifications in aging bovine ova.

Key words: oocytes, cumulus cells, aging of ova, first polar body, state of metaphase chromosomes, spontaneous parthenogenetic activation.
