

ЛИПИДНЫЙ АНАЛИЗ ООЦИТОВ *SUS SCROFA DOMESTICUS* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ

Д.А.Новичкова¹, Т.И.Кузьмина¹, Е.С.Усенбеков²,
И.Я.Шахтамиров³, Х.М.Мутиева³

¹ФГБНУ ВНИИ генетики и разведения сельскохозяйственных животных, Санкт-Петербург-Пушкин, Россия

²Казахский национальный аграрный университет, Алматы

³Чеченский государственный университет, Грозный, Россия

Аннотация

С использованием флуоресцентного зонда Nile red проведен комплексный анализ липидного содержимого ооцитов *Sus Scrofa Domesticus*. Результаты экспериментов позволяют расценивать трансформирование липидных гранул в кластеры при культивировании, как предиктор последующих деструктивных изменений в ооците. Подтверждена эффективность превентивной оценки исходной популяции ооцитов *Sus Scrofa Domesticus* маркером завершенности фазы роста бриллиантовым кристаллическим голубым (BCB-тест).

Ключевые слова: ооцит, *Sus Scrofa Domesticus*, липиды, Nile red, brilliant cresyl blue.

Введение.

Внедрение клеточных репродуктивных технологий в практику разведения сельскохозяйственных животных позволяет эффективно решать селекционные задачи, увеличивать число потомков от индивидуальных животных, сокращать генетические интервалы, минимизировать распространение заболеваний, обеспечивать сохранение генофонда, генетического разнообразия, оптимизировать продуктивные качества, конструировать новые генотипы. Актуальной проблемой, требующей быстрого разрешения, является разработка, совершенствование и внедрение клеточных репродуктивных

технологий, таких как получение эмбрионов *in vitro*, клонирование, трансгенез, создание линий эмбриональных стволовых клеток, в практику свиноводства [1].

Несмотря на то, что основные этапы технологии экстракорпорального созревания ооцитов *Sus Scrofa Domesticus* разработаны и о рождении потомства из ооцитов, созревших *in vitro*, сообщается в научных публикациях, выход ооцитов на стадии метафазы – II продолжает оставаться низким, по сравнению с результатами, полученными *in vivo* [2].

При оплодотворении ооцитов свиней, созревших *in vitro*,

наблюдается высокий процент полиспермии, нарушения процесса формирования мужского пронуклеуса [3]. Недостаточное количество эмбрионов на стадии бластоцисты значительно лимитирует эксперименты по созданию линий эмбриональных стволовых клеток. Все вышесказанное свидетельствует об актуальности проблемы разработки эффективных методов оценки качества ооцитов свиней и моделей их дозревания, позволяющих повышать выход зрелых яйцеклеток.

Внутриклеточные липиды - динамичные органеллы, необходимые для обеспечения энергией процессов роста и созревания ооцитов. Липидных капель в ооците множество. Они меняют свою форму, объем и локализацию в ооплазме, а также взаимодействуют с другими органеллами в процессе созревания [4]. Ооциты свиней содержат 156 нг липидов и отличаются по высокому уровню содержания липидных капель по сравнению с другими

Цель настоящего исследования – анализ липидного содержимого ооцитов *Sus Scrofa Domestica* с использованием флуоресцентного зонда NileRed в зависимости от функционального статуса женских гамет при их культивировании в средах, дополненных высокодисперсным кремнеземом.

Материалы и методы исследования.

Объектом исследований служили ооцит-кумулюсные комплексы, полученные из постмортальных яичников свинок

видами животных. Большое количество липидных капель в ооцитах свиней относительно других млекопитающими затрудняет разработку методов их криоконсервации [5]. Ооциты - информативная модель для понимания роли липидов и жирных кислот при созревании и оплодотворении женских гамет. Отбор компетентных к созреванию и оплодотворению ооцитов свиней для получения нативных и реконструированных эмбрионов (клонированных и трансгенных) – актуальные проблема интенсификации свиноводства на основе внедрения клеточных репродуктивных технологий в практику.

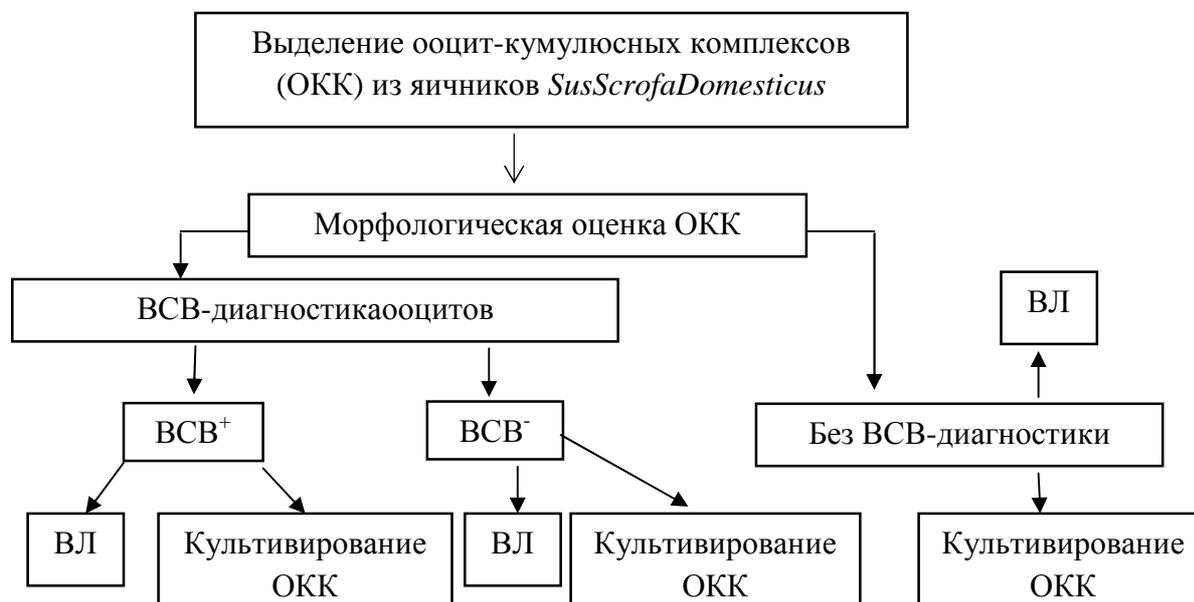
Форма липидов в незрелых ооцитах свиней изменяется во время различных фаз фолликулогенеза [5]. Липидные капли играют важную роль в энергетическом метаболизме во время созревания яйцеклетки, оплодотворения и раннего эмбрионального развития [6].

(6-8 месяцев). Для исследований отбирали только ооциты, окруженные не менее чем 5-6 слоями кумулюса, с равномерной по ширине зоной пеллюцида, гомогенной ооплазмой. Затем клетки подвергали ВСВ – тесту для определения стадии роста ооцита. Для этого ооцит-кумулюсные комплексы отмывали в растворе Дюльбекко с добавлением 0,4 % бычьего сывороточного альбумина (А-7888), затем помещали на 90 минут в 13 мМ раствор ВСВ (В-5388), приготовленного на основе Дюльбекко. Выбор концентрации

основывался на данных, полученных Egerszegi I. et al. [7]. Ооцит-кумуляционные комплексы отмывали в растворе Дюльбекко и делили на: ВСВ(+) -ооциты с окрашенной цитоплазмой (завершившие фазу роста *in vivo*) и ВСВ(-) – неокрашенные ооциты (растущие). Далее, ооцит-кумуляционные комплексы контрольной группы культивировали в SageMediaCleavage(SMC, «Coopersurgical» США) с 5% SerumProteinSubstitut (SPS, «Coopersurgical» США) и 10 М.Е. хорионическим гонадотропином человека (Россия, Московский эндокринный завод). Опытную группу клеток культивировали в среде, основанной на контрольной среде с дополнением 0,001% высокодисперсного кремнезема (Украина, г. Калуш Ивано-Франковской области). Режим культивирования ооцитов свиней соответствовал описанному в методических рекомендациях, разработанных в лаборатории биологии развития ФГБНУ ВНИИГРЖ [8].

рисунке 1.

С помощью окрашивания флуоресцентным зондом Nilered проводили визуализацию липидных гранул. Для окраски готовили рабочий раствор Nilered в концентрации 1 mM. Помещали ооциты в рабочий раствор Nilered и выдерживали 5 минут при комнатной температуре в темноте. Далее клетки отмывали в рабочей среде, оценивали морфологию липидных капель с помощью микроскопа CarlZeissAxioImager.A2m (длины волн - $E_x/E_m = 552/636$ nm). Для проведения статистического анализа полученных данных в опытных и контрольных группах, использовали критерий Фишера. Данные обрабатывали с помощью статистической программы SigmaStat. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали при трех уровнях значимости: $P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$, для 3-5 независимых экспериментов. Структурно-логическая схема экспериментов представлена на



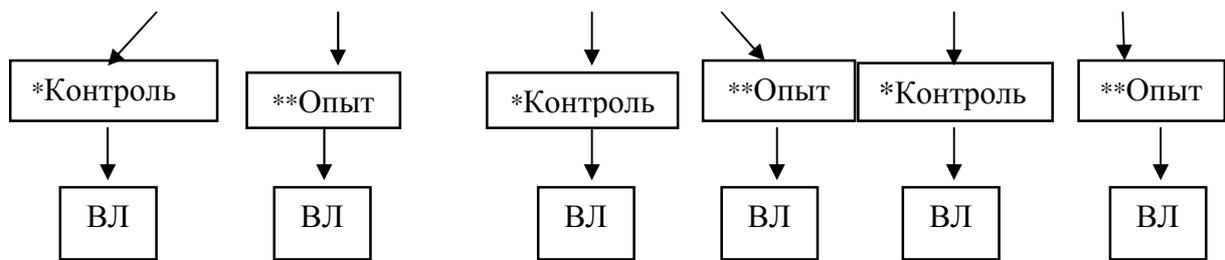


Рисунок - 1. Структурно-логическая схема экспериментов.

*Контроль – Sage Media Cleavage с 5% Serum Protein Substitut и 10 М.Е. хорионическим гонадотропином человека **Опыт – Sage Media Cleavage с 5% Serum Protein Substitut и 10 М.Е. хорионическим гонадотропином человека + 0,001% высокодисперсного кремнезема, ВЛ – визуализация липидов

Результаты исследования и их обсуждение.

Внутриклеточные липидные капли имеют шарообразную форму, различного диаметра. По морфологии липидные капли представлены двумя группами. Первая группа - гранулы, это мелкие, отдельные липидные капли с четкой различимой формой, в диаметре составляющие максимально 10% от диаметра ооцита. Вторая группа – кластеры, крупные липидные шарики с довольно четким очертанием, в диаметре составляющие более 10% от диаметра ооцита (рис.2). Ооцитов с липидными каплями только в виде кластеров в ходе эксперимента не

Гранулы

наблюдалось, а отмечали смешанный тип – гранулы+кластеры.

На рисунках 3 и 4 отражены результаты исследований по оценке формы липидов цитоплазмы ооцитов свиней до и после культивирования в разных системах дозревания в течение 44 часов. Предварительно ооциты подвергали ВСВ-диагностике. Ооциты контрольной группы культивировали в SageMediaCleavage (SMC) с SerumProteinSubstitut (SPS) и хорионическим гонадотропином человека, в опытной группе контрольную среду дополняли 0,001% высокодисперсный кремнеземом. Выбор данной концентрации основывался на выявленном ранее положительном эффекте высокодисперсного кремнезема на формирование эмбрионов кроликов [9] и свиней [10], а также при изучении жизнеспособности сперматозоидов при криоконсервации спермы быков [11].

Смешанный тип

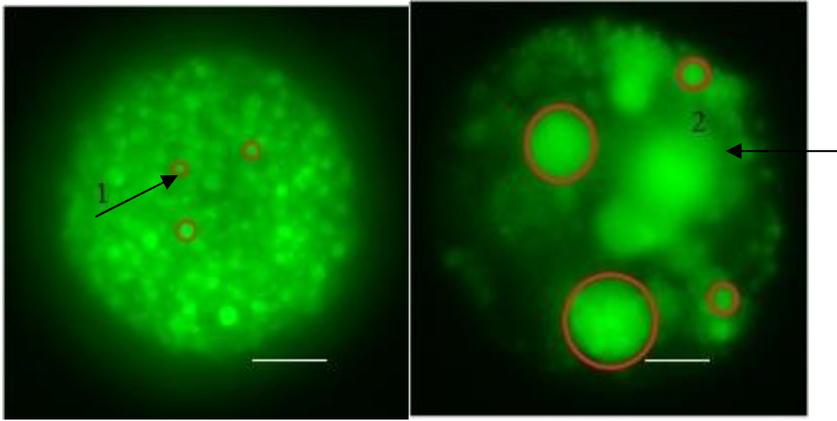


Рисунок - 2. Морфология липидных капель в ооцитах свиней (визуализация флуоресцентным зондом NileRed). Стрелка 1 – гранула, стрелка 2 – кластер. Шкала - 50μм.

До культивирования морфология липидных гранул в ооцитах всех исследованных групп представлена в основном в форме гранул 98%(80/82), 92% (73/79), 99%(74/75).

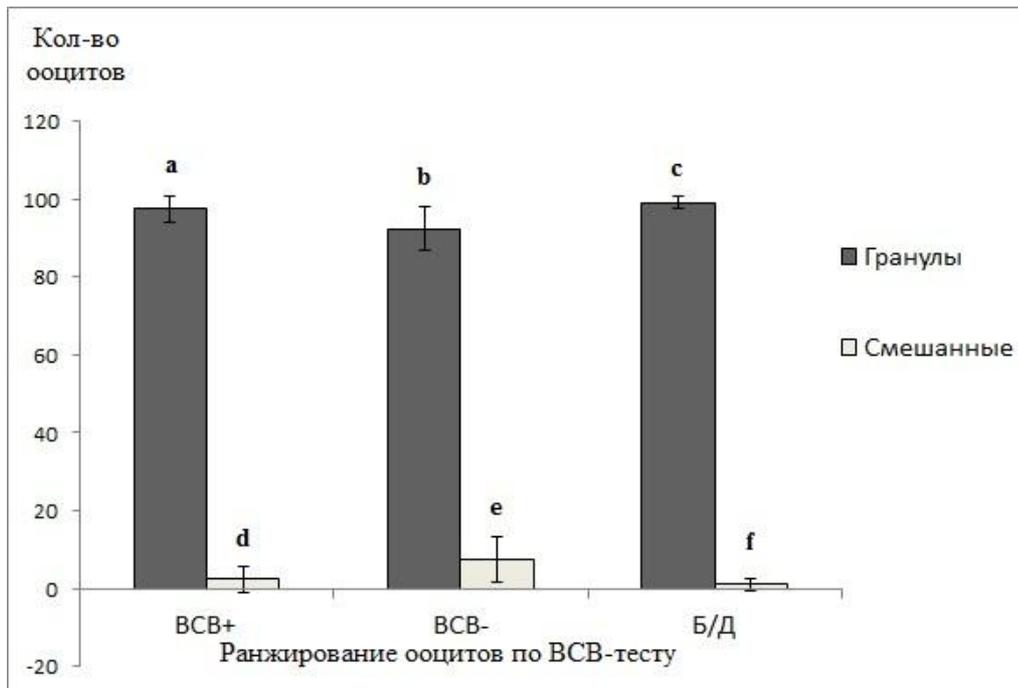


Рисунок - 3. Морфология липидных капель в растущих или завершивших фазу роста ооцитах свиней без культивирования. ВСВ+ - ооциты, завершившие фазу роста, ВСВ- - растущие ооциты, Б/Д – без ВСВ-диагностики. Достоверные различия по Фишеру: $P > 0,05^{b; c; e; f}$.

Анализ популяции ооцитов после культивирования показал достоверное снижение доли ооцитов с гранулярной формой липидов в контрольной группе, одновременно число ооцитов со смешанным

распределением липидных капель увеличилось. Так, количество ВСВ(+) ооцитов с гранулярным типом распределения липидов после культивирования снизилось до 76% (60/79), а уровень ВСВ(-) ооцитов в

этих же условиях культивирования снизился до 64% (34/53), а без ВСВ-теста составил 80% (56/70). Характер распределения липидов по форме в ооцитах опытной группы так же претерпел изменения. Во всех группах отмечается снижение количества клеток с гранулярной формой липидных капель. Напротив, содержание смешанных форм липидных капель в ооцитах после культивирования соответственно увеличилось. Анализ морфологии липидов после культивирования ооцитов, оцененных до культивирования, как завершившие фазу роста, выявил значительные различия в количестве ооцитов, имеющих гранулярный тип распределения липидов в зависимости от состава среды созревания. При культивировании ВСВ(+) ооцитов с высокодисперсным кремнеземом ооците.

значительно возросло число ооцитов с липидами в форме гранул. Полученные нами ранее результаты, свидетельствующие о положительном влиянии высокодисперсного кремнезема на экспансию кумулюсных клеток и показатели ядерного созревания ооцитов свиней [10], позволяют интерпретировать полученные данные о форме липидов в виде гранул в завершивших фазу роста ооцитах, прокультивированных с высокодисперсным кремнеземом, как форму, детерминирующую высокие потенции ооцитов к дальнейшему развитию. Результаты экспериментов также предполагают расценивать трансформирование гранул в кластеры при культивировании, как предиктор последующих деструктивных изменений в

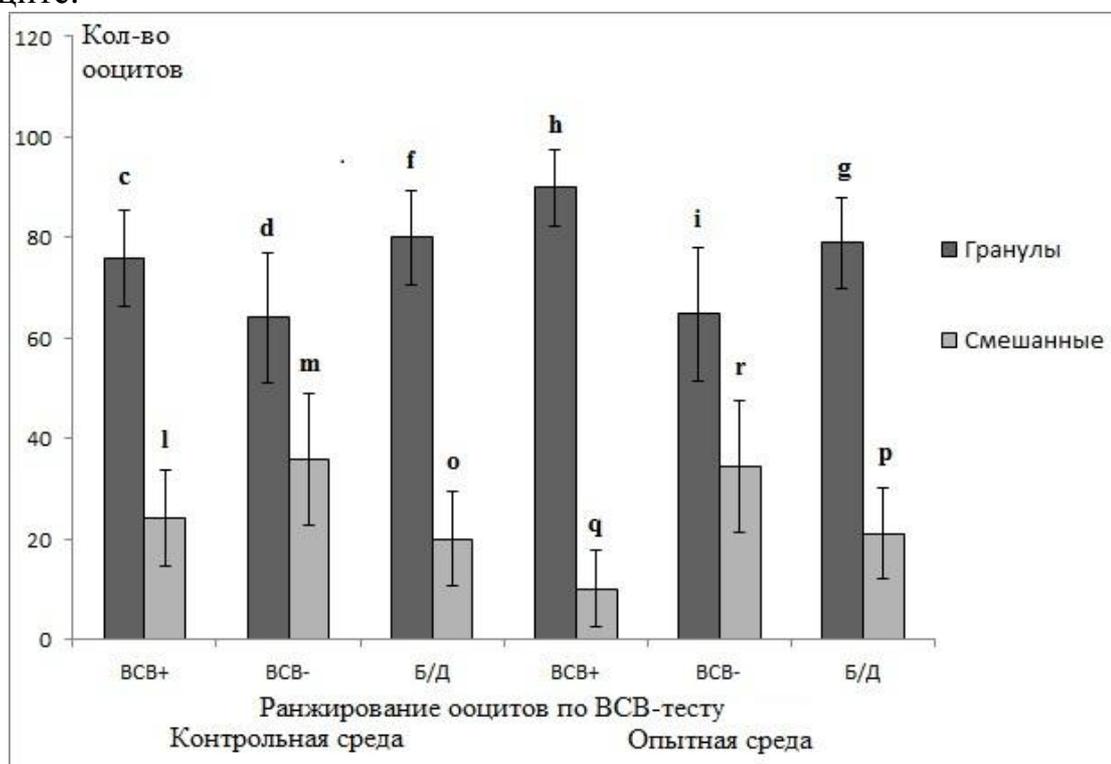


Рисунок - 4. Морфология липидных капель в растущих или завершивших фазу роста ооцитах свиней после 44 часов культивирования. Контроль – среда

SageMediaCleavage (SMC) +
 SerumProteinSubstitut (SPS) +
 хорионический гонадотропин
 человека; Опыт –среда
 SMC+SPS+хорионический
 гонадотропин человека +
 высокодисперсный кремнезем. Б/Д –
 без ВСВ-диагностики. Достоверные
 различия по Фишеру: $P > 0,01$ ^{d:h, h:i, j:l,}
^{j:l, j:o, j:r, l:n, m:n, m:q, q:r;} $P > 0,05$ ^{d:f, c:h, d:g, f:i, g:h,}
^{g:i, j:q, m:o, l:q, m:p, o:r, p:r.}

Выводы. На основе ВСВ-
 диагностики популяции донорских

ооцитов свиней и визуализации
 интрацитоплазматических липидов
 проанализирована морфологии
 липидных капель в ооцитах и
 предложена среда для их дозревания
invitro (SMC с 5% SPS, 10 М.Е. ХГЧ
 и 0,001% ВДК). Рекомендовано
 использовать для культивирования
 ооциты, тестированные, как ВСВ(+),
 т.е. к моменту извлечения их из
 овариальных фолликулов,
 завершивших фазу роста.

Список литературы

1. Кузьмина Т.И., Новичкова Д.А, Волкова Н.А. Моделирование систем созревания ооцитов свиней *invitro* //Сельскохозяйственная биология –2013 -№2 -С.52-57.
2. Coy P. Birth of piglets after transferring of *in vitro*-produced embryos pre-matured with R-roscovitine /P. Coy, R. Romar, S. Ruiz, S. Cánovas, J. Gadea, F Vázquez, C. Matás//Reproduction, 2005, v. 129 N. 6. –P. 747-755.
3. Hunter M. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. /M. Hunter// Rev Reprod. 2000. V. 5. P.122-130.
4. Prates E. G. A Role of Lipid Metabolism during Cumulus-Oocyte Complex Maturation: Impact of Lipid Modulators to Improve Embryo Production/ E. G. Prates, J. T. Nunes, R.M. Pereira// Mediators of Inflammation. V. 2014.P. 11.
5. Milaković I. Identification of the lipid droplets of immature porcine oocytes during the different stage of folliculogenesis / I. Milaković, Š. Hanuláková, M. Jeřeta, D. Knitlová, K. Hanzalová, R. Horský, L. Máchal // Proceedings of International Ph.D. Students Conference. 2008. P. 973-980.
6. Romek M. New technique to quantify the lipid composition of lipid droplets in porcine oocytes and pre-implantation embryos using Nile Red fluorescent probe./ M.Romek, B. Gajda, E. Krzysztofowicz, M. Kepczynski, Z.Smorag //Theriogenology. 2011. V.75 (1). P. 42-54.
7. Egerszegi I. Meiotic progression, mitochondrial features and fertilization characteristics of porcine oocytes with different G6PDH activities. /I. Egerszegi, H. Alm, J. Rátky, B. Heleil, K.P. Brüssow, H.Torner// ReprodFertil Dev. 2010. V.22.P. 830–838.
8. Кузьмина Т.И. Методы получения эмбрионов свиней *invitro*. / Т.И. Кузьмина, Х. Альм, Х. Торнер // СПб—Пушкин, 2008.
9. Зюзюна А.Б.
 Підвищення ефективності формування ембріонів кролів *invitro* з використанням наноматеріалів/ А. Б. Зюзюна. //Розведення і генетика тварин. 2012г. Вып. 46. Стр 184-186.

10. Новичкова Д.А. Использование наноматериалов в биотехнологии экстракорпорального созревания донорских ооцитов свиней. / Д.А.Новичкова, Т.И. Кузьмина, С.И.Ковтун, Н.П.Галаган // III Международная выставка-конференция «БИОИНДУСТРИЮ 2013», 16-18 октября 2013 г. Санкт-Петербург, с.31-32.
11. Ковтун С.И. Использование нанобиоматериалов в технологии криоконсервации генетических ресурсов животных. / С.И.Ковтун, Н.П.Галаган, Н.Ю. Клименко // Тез. Научн. конференции, - Максимовка, 2011. - С. 386-390.

Түйін

Флуоресценттік Nile red зондын пайдалана отырып *Sus Scrofa Domesticus* ооциттеріндегі липидтік құрамы кешенді түрде зерттелді. Зерттеу нәтижелері өсіру кезінде липид гранулаларының кластерлерге трансформациялануын көрсетеді, ол өз кезегінде ооциттердегі деструктивтік өзгерістердің предикторы болып табылады. Зерттеуде бастапқы *Sus Scrofa Domesticus* ооциттер популяциясын алдын ала бағалауға бриллианттық күлгін кристалдармен бояуды (BCB-тест) маркер ретінде қолданудың тиімділігі көрсетілген.

Кілттік сөздер: ооцит, *SusScrofaDomesticus*, липидтер, Nile red, brilliant cresyl blue.

Summary

With the use of Nile red fluorescent probe conducted a comprehensive analysis of the lipid content of oocytes *SusScrofaDomesticus*. Experimental results allow to regard transformation of lipid granules in clusters under cultivation, as a predictor of subsequent destructive changes in the oocyte. Confirmed the effectiveness of the preventive assessment of the initial population of oocytes *SusScrofaDomesticus* growth phase of completion of the crystal blue diamond marker (ENE-test). Key words: oocyte, *SusScrofaDomesticus*, lipids, Nile red, brilliant cresyl blue.