

А. В. Лопухов, Е. Н. Шедова, Е. В. Цындрина, Г. Н. Сингина

Анализ изменения активности митохондрий в ооцитах коров в процессе их старения *in vitro*

Аннотация. Старение созревших ооцитов млекопитающих *in vitro* влияет на их дальнейшее практическое и научное использование. Тем не менее, существует мало данных об изменениях в ооцитах, происходящих в процессе их старения. В представленной работе изучен характер изменения активности митохондрий в зрелых ооцитах коров в процессе их пролонгированного культивирования *in vitro*. С этой целью ооцит-кумулясные комплексы (ОКК) культивировали в течение 20 ч. в среде ТСМ-199, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, 10 мкг/мл фолликулостимулирующего (ФСГ) и 10 мкг/мл лютеинизирующего гормонов. После созревания ОКК и освобожденные от клеток кумулюса ооциты (ДО) переносили в аналогичную, но без гонадотропных гормонов среду и культивировали дополнительно в течение 12 часов. С целью оценки активности митохондрий ооциты, достигшие стадии метафазы II в конце созревания и пролонгированного культивирования, окрашивали MitoTracker Orange. Наблюдался невысокий уровень активности митохондрий в ооцитах непосредственно после завершения ими созревания, в то время как к 12 ч. пролонгированного культивирования активность митохондрий возрастала ($P < 0,05$). В тоже время обнаружено, что удаление клеток кумулюса влияет на активность митохондрий в сторону ее понижения ($P < 0,05$). Полученные результаты свидетельствуют о повышении уровня митохондриальной активности в процессе старения ооцитов *in vitro*. Также они показывают, что удаление клеток кумулюса способно нивелировать данные возрастные изменения.

Ключевые слова: ооцит, созревание *in vitro*, старение, активность митохондрий.

Авторы:

Лопухов Александр Викторович — научный сотрудник; e-mail: vubi_myaso@mail.ru;

Шедова Екатерина Николаевна — научный сотрудник; e-mail: shedvek@yandex.ru;

Цындрина Евгения Валериевна — лаборант-исследователь; e-mail: vip.krilochkina@mail.ru;

Сингина Галина Николаевна — кандидат биологических наук ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории; e-mail: g_singina@mail.ru.

ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ имени Л. К. Эрнста»; 142132, Россия, Московская обл., гор. окр. Подольск, пос. Дубровицы, д. 60.

Введение. Методы, основанные на использовании созревших *in vitro* ооцитов сельскохозяйственных животных, широко используются в биотехнологии для целей клеточной инженерии, а также получения эмбрионов, пригодных для трансплантации. К настоящему времени достигнут существенный прогресс в разработке данных методов, однако потенциал к эмбриональному развитию полученных *in vitro* яйцеклеток по-прежнему остается значительно более низким, чем у яйцеклеток, созревших *in vivo* [1]. Одной из причин является то, что при дальнейшем использовании в рамках большинства репродуктивных технологий в зрелых ооцитах вслед за завершением первого деления мейоза инициируются процессы старения, которые ухудшают качество созревших яйцеклеток [2].

К настоящему времени выявлен ряд функциональных изменений, ассоциированных с процессом старения ооцитов, в том числе снижение их оплодотворяемости, повышение предрасположенности к партеногенезу и апоптозу, возрастание частоты хромосомных нарушений, а также аномалий в эмбриональном развитии [3–8]. В работах ряда авторов было показано, что старение приводит также к ухудшению функции митохондрий [9–11].

Как известно, митохондрии важны для клетки, так как в них синтезируется большая часть необходимого клетке аденозинтрифосфата. Кроме того митохондрии содержат антиапоптотические и апоптотические компоненты, поэтому их дисфункция может играть важную роль в предрасположенности

активированных зрелых ооцитов к фрагментации после искусственной либо естественной активации [12–13]. Однако данные о характере изменения функционального состояния этих органелл в цитоплазме зрелых ооцитов домашних животных лимитированы.

Для изучения *in vitro* процесса старения яйцеклеток, находящихся на стадии метафазы-II, используют метод пролонгированного культивирования ооцитов, позволяющий индуцировать в них молекулярные и клеточные изменения, сходные с таковыми, происходящими *in vivo* [2]. В представленной работе данный подход был использован для изучения *in vitro*, связанного с возрастом изменения в активности митохондрий у зрелых ооцитах коров, а также исследована роль клеток кумулюса в этом процессе.

Материалы и методы исследований. Объектом исследования служили ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК), выделенные из фолликулов коров. Для их получения яйцешники, отобранные после убоя, доставляли в лабораторию в течение 4–5 часов при 30–35°C. Изолирование ОКК проводили методом рассечения антральных фолликулов в среде ТС-199, содержащей 5% ФБС (фетальная бычья сыворотка), 10 мкг/мл гепарина, 0,2 мМ пирувата натрия и 50 мкг/мл гентамицина. Для экспериментов отбирали ОКК, состоящие из ооцитов округлой формы, с гомогенной цитоплазмой, равномерной по ширине зоной пеллюцида, окруженные компактным кумулюсом.

ОКК первоначально культивировали по 15–20 ооцитов в 500 мкл среды созревания [14], содержащей фолликулостимулирующий и лютеинизирующий гормоны в течение 20 часов, затем переносили в ту же среду, но без гормонов и культивировали дополнительно 12 часов. При этом часть ооцитов перед пролонгированным культивированием освобождалась от окружающих их кумулюсных клеток. Контролем служили ОКК, созревающие в течение первых 20 часов (0 ч. старения).

Созревание и пролонгированное культивирование ОКК происходило в условиях инкубатора при 38,5 °C и 5% CO₂ в воздухе.

Для анализа активности митохондрий в конце

каждого временного периода ОКК (предварительно освобожденные от клеток кумулюса) и ооциты, лишенные клеток кумулюса (ДО), окрашивали потенциалзависимым флуоресцентным красителем MitoTracker Orange CMXRos, фиксировали в 4% параформальдегиде, подвергали процедуре пермеабиллизации в 0,5% растворе Тритон X-100 и окрашивали DAPI (в концентрации 1 мкг/мл), после чего переносили на сухое обезжиренное стекло и заключали в среду Vectashield. Микрофотографирование и оценку препаратов выполняли под микроскопом Axio Imager M2, оснащенным флуоресцентной приставкой, с использованием монохромной цифровой камеры AxioCam 503 и программы Zen pro (Carl Zeiss, Германия). Оценку активности митохондрий проводили только в ооцитах достигших стадии метафазы II.

Эксперименты были выполнены в 5–6 независимых повторностях. Данные обрабатывали при помощи компьютерной программы SigmaStat.

Результаты и обсуждение. Оценка данных флуоресцентного анализа с использованием высокоспецифичного зонда показала изменение активности митохондрий в ооцитах в процессе их старения *in vitro*. Наблюдалась тенденция к возрастанию данной функциональной характеристики (табл. 1). Наименьший уровень активности митохондрий был обнаружен в ооцитах непосредственно после завершения ими созревания, к 12 ч пролонгированного культивирования активность митохондрий возрастала ($P < 0,05$). Нами сделано предположение, что повышение активности митохондрий является признаком ухудшения качества яйцеклеток в процессе их старения. Ранее другими авторами также было показано, что у крупного рогатого скота старение зрелых ооцитов *in vitro* приводит к изменению поляризации митохондрий [11].

Клетки кумулюса, окружающие ооцит, являются специализированной субстанцией клеток гранулезы, основная функция которых заключается в обеспечении созревающего ооцита питательными веществами и сигнальными молекулами, необходимыми для приобретения им компетенции к дальнейшему развитию. Кумулюсные клетки, по видимому, также участвуют в регуляции процес-

Таблица 1. Изменение активности митохондрий на стадии метафазы II в процессе пролонгированного культивирования ОКК коров

Время старения, ч	Число экспериментов	Общее число ОКК	Общее число ооцитов на стадии метафазы II	Активность митохондрий
0	6	115	84	72,2 ± 8,1*
12	6	111	78	115 ± 11,0

Достоверные различия: * $P < 0,05$.

сов старения ооцитов [14]. В данной работе сравнительный анализ митохондриальной активности изолированных и окруженных кумулюсом ооцитов (табл. 2) в процессе пролонгированного культивирования показал, что удаление клеток кумулюса влияет на активность митохондрий в сторону ее понижения ($P < 0,05$) (табл. 2). Следовательно, клетки кумулюса усиливают ассоциированные со старением изменения функциональной ак-

тивности митохондрий в стареющих яйцеклетках коров.

Заключение. Полученные результаты демонстрируют повышение уровня митохондриальной активности в процессе старения ооцитов *in vitro*. Также они показывают, что удаление клеток кумулюса способно нивелировать данные возрастные изменения в модификации функции митохондрий.

Таблица 2. Активность митохондрий в процессе пролонгированного культивирования (12 ч) созревших *in vitro* изолированных (ДО) и окруженных кумулюсом (ОКК) ооцитов коров

Группа	Число экспериментов	Общее число ОКК	Общее число ооцитов на стадии метафазы II	Активность митохондрий
ДО	5	84	59	$76,6 \pm 10,9^*$
ОКК	5	83	65	$118 \pm 7,4$

Достоверные различия: $*P < 0.05$.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-38-00921) и ФАНО России (№ ГЗ № АААА-А18-118021590132-9).

Литература

- Lonergan, P. State of the art embryo technologies in cattle. Review / P. Lonergan // Soc. Reprod. Fertil. — 2007. — Vol. 64 (Suppl). — P. 315–325.
- Miao, Y. L. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility / Y. L. Miao, K. Kikuchi, Q. Y. Sun, H. Schatten // Hum. Reprod. Update. — 2009. — Vol. 15. — P. 573–585.
- Perez, G. I., Cumulus cells are required for the increased apoptotic potential in oocytes of aged / G. I. Perez, J. L. Tilly // Hum. Reprod. — 1997. — Vol. 12. — P. 2781–2783.
- Goud, P. Fertilization abnormalities and pronucleus size asynchrony after intracytoplasmic sperm injection are related to oocyte postmaturity / P. Goud, A. Goud, P. Van Oostveldt, J. Van der Elst, M. Dhont // Fertil. Steril. — 1999. — Vol. 72. — P. 245–252.
- Tarin, J. J. Postovulatory aging of oocytes decreases reproductive fitness and longevity of offspring / J. J. Tarin, S. Perez-Albala, S. Perez-Hoyos, A. Cano // Biol. Reprod. — 2002. — Vol. 66. — P. 495–499.
- Jeseta, M. In vitro ageing of pig oocytes: effects of the histone deacetylase inhibitor trichostatin A / M. Jeseta, J. Petr, T. Krejcova, E. Chmelikova, F. Jilek // Zygote. — 2008. — Vol. 16. — P. 145–152.
- Petr, J. Activation of protein kinase C suppresses fragmentation of pig oocytes aged in vitro / J. Petr, M. Krejcova, R. Rajmon, F. Jilek // Animal. — 2011. — Vol. 5. — P. 565–571.
- Lebedeva, I. Y. Dynamics of morphofunctional changes in aging bovine ova during prolonged culture in vitro / I. Y. Lebedeva, G. N. Singina, A. V. Lopukhov, N. A. Zinovieva // Cell Tissue Biol. — Vol. 8. — P. 258–266.
- Wilding, M. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos / M. Wilding, B. Dale, M. Marino, L. di Matteo, C. Alviggi, M.L. Pisaturo, L. Lombardi, G. De Placido // Hum. Reprod. — 2001. — Vol. 16. — P. 909–917.
- Zhang, N. Caffeine alleviates the deterioration of Ca (2+) release mechanisms and fragmentation of in vitro-aged mouse eggs / Zhang N., Wakai T., Fissore R.A. // Mol. Reprod. Dev. — 2011. — Vol. 78. — P. 684–701.
- Koyama, K. Aging-related changes in in vitro-matured bovine oocytes: oxidative stress, mitochondrial activity and ATP content after nuclear maturation / K. Koyama, S.S. Kang, W. Huang, Y. Yanagawa, Y. Takahashi, M. Nagano // J. Reprod. Dev. — 2014. — Vol. 60. — P. 136–142.
- Green, D. R. Mitochondria and apoptosis / D.R. Green, J.C. Reed // Science. — 1998. — Vol. 281. — P. 1309–1312.
- Wang, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis / X. Wang // Genes Dev. — 2001. — Vol. 15. — P. 2922–2933.
- Singina, G. Pole of pituitary hormones and cumulus cells in modulating the developmental capacity of aging bovine oocytes / G. Singina, I. Lebedeva, T. Taradajnic, N. Zinovieva // Reprod. Fertil. Dev. — 2015. — Vol. 27. — P. 204.

Lopukhov A. V., Shedova E. N., Tsyndrina E. V., Singina G. N.

Evaluation of mitochondrial activity in mature bovine oocytes during their aging in vitro

Abstract. *Aging in in vitro-matured oocytes negatively affects its fitness. However, there are few data on aging-related changes in oocytes. In this research for was to determine the mitochondrial pattern of distribution of the matured bovine oocytes during their prolonged culture in vitro. Bovine cumulus-oocyte complexes (COCs) were cultured for 20 h in maturation medium (TCM 199 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 10 µg/ml FSH, and 10 µg/ml LH). After IVM, COCs and oocytes denuded of their CCs (DO) were transferred to the aging medium consisting of TCM 199 supplemented with 10% fetal calf serum and prolonged cultured for 12 h. After maturation (20 h) or prolonged culture MII oocytes (12 h) were studied to determine mitochondrial activity using MitoTracker Orange fluorescence. For oocytes analyzed just after IVM mitochondrial activity was low, while after 12 h prolonged culture of mature bovine oocytes the activity increased ($P<0,05$). At the same time the removal of CCs before prolonged culture affected mitochondrial activity reducing ($P<0,05$). The result obtained point to increasing the level of mitochondrial activity during in vitro aging of bovine oocytes and to that the removal of CCs is able to decelerate these age-associated alterations.*

Keywords: oocytes, maturation in vitro, aging, mitochondrial activity.

Authors:

Lopukhov A. V. — researcher, e-mail: vubi_myaso@mail.ru;

Shedova E. N. — researcher, e-mail: shedvek@yandex.ru;

Tsyndrina E. V. — laboratory assistant, e-mail: vip.krilochkina@mail.ru;

Singina G. N. — PhD (Biol. Sci.), head of laboratory, e-mail: g_singina@mail.ru

Federal Science Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst, 142132, Moscow region, Podolsk city district, Dubrovitsy settlement, 60

References

1. Lonergan, P. State of the art embryo technologies in cattle. Review / P. Lonergan // Soc. Reprod. Fertil. — 2007. — Vol. 64 (Suppl). — P. 315-325.
2. Miao, Y. L. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility / Y. L. Miao, K. Kikuchi, Q. Y. Sun, H. Schatten // Hum. Reprod. Update. — 2009. — Vol. 15. — P. 573-585.
3. Perez, G. I., Cumulus cells are required for the increased apoptotic potential in oocytes of aged / G. I. Perez, J. L. Tilly // Hum. Reprod. — 1997. — Vol. 12. — P. 2781-2783.
4. Goud, P. Fertilization abnormalities and pronucleus size asynchrony after intracytoplasmic sperm injection are related to oocyte postmaturity / P. Goud, A. Goud, P. Van Oostveldt, J. Van der Elst, M. Dhont // Fertil. Steril. — 1999. — Vol. 72. — P. 245-252.
5. Tarin, J. J. Postovulatory aging of oocytes decreases reproductive fitness and longevity of offspring / J. J. Tarin, S. Perez-Albala, S. Perez-Hoyos, A. Cano // Biol. Reprod. — 2002. — Vol. 66. — P. 495-499.
6. Jeseta, M. In vitro ageing of pig oocytes: effects of the histone deacetylase inhibitor trichostatin A / M. Jeseta, J. Petr, T. Krejcova, E. Chmelikova, F. Jilek // Zygote. — 2008. — Vol. 16. — P. 145-152.
7. Petr, J. Activation of protein kinase C suppresses fragmentation of pig oocytes aged in vitro / J. Petr, M. Krejcova, R. Rajmon, F. Jilek // Animal. — 2011. — Vol. 5. — P. 565-571.
8. Lebedeva, I. Y. Dynamics of morphofunctional changes in aging bovine ova during prolonged culture in vitro / I. Y. Lebedeva, G. N. Singina, A. V. Lopukhov, N. A. Zinovieva // Cell Tissue Biol. — Vol. 8. — P. 258-266.
9. Wilding, M. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos / M. Wilding, B. Dale, M. Marino, L. di Matteo, C. Alviggi, M.L. Pisaturo, L. Lombardi, G. De Placido // Hum. Reprod. — 2001. — Vol. 16. — P. 909-917.
10. Zhang, N. Caffeine alleviates the deterioration of Ca (2+) release mechanisms and fragmentation of in vitro-aged mouse eggs / Zhang N., Wakai T., Fissore R.A. // Mol. Reprod. Dev. — 2011. — Vol. 78. — P. 684-701.
11. Koyama, K. Aging-related changes in invitro-matured bovine oocytes: oxidative stress, mitochondrial activity and ATP content after nuclear maturation / K. Koyama, S.S. Kang, W. Huang, Y. Yanagawa, Y. Takahashi, M. Nagano // J. Reprod. Dev. — 2014. — Vol. 60. — P. 136-142.
12. Green, D. R. Mitochondria and apoptosis / D.R. Green, J.C. Reed // Science. — 1998. — Vol. 281. — P. 1309-1312.
13. Wang, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis / X. Wang // Genes Dev. — 2001. — Vol. 15. — P. 2922-2933.
14. Singina, G. Pole of pituitary hormones and cumulus cells in modulating the developmental capacity of aging bovine oocytes / G. Singina, I. Lebedeva, T. Taradajnic, N. Zinovieva // Reprod. Fertil. Dev. — 2015. — Vol. 27. — P. 204.