

## Апоптоз кумулюсных клеток при экстракорпоральном созревании девитрифицированных ооцитов коров

Т.И. КУЗЬМИНА, Н.О. НОВИКОВА, Д.А.НОВИЧКОВА

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН, Санкт-Петербург – Пушкин

## Apoptosis in Cumulus Cells at In Vitro Maturation of Devitrified Bovine Oocytes

T.I. KUZMINA, N.O. NOVIKOVA, D.A. NOVICHKOVA

All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals of Russian Academy of Agricultural Sciences, St.-Petersburg – Pushkin, Russia

Криорезистентность женских гамет – актуальная проблема интенсификации внедрения достижений клеточных репродуктивных технологий в медицину, животноводство, сохранения генофонда млекопитающих. Множество факторов детерминирует криотолерантность донорских ооцитов, в том числе характер ооцит-кумулясных взаимодействий при культивировании девитрифицированных ооцитов. Цель настоящего исследования – сравнительный анализ морфологии и статуса хроматина клеток кумулюса нативных и девитрифицированных ооцитов коров.

Выделение ооцит-кумулясных комплексов, их морфологическую оценку, культивирование проводили в соответствии с методами, описанными нами ранее [Kuzmina *et al.*, 2007]. Апоптоз в кумулюсе ооцитов определяли методом TUNEL [Alm *et al.*, 2000]. Статус хроматина ооцитов оценивали по методу Тарковского [Tarkowski A.K., 1966]. Для витрификации ооциты обрабатывали поэтапно тремя растворами (1 – 0,7 М ДМСО и 0,9 М этиленгликоля (ЭГ); 2 – 1,4 М ДМСО и 1,8 М ЭГ; 3 – 2,8 М ДМСО, 3,6 М ЭГ и 0,65 М трегалозы), приготовленными на среде 199 («Sigma», США), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки («Sigma»), помещали в соломинку и затем в жидкий азот.

О зрелости ооцита свидетельствуют визуальные признаки изменения морфологии кумулюса, в том числе степень экспансии кумулюсных клеток. После 24 часов культивирования доля девитрифицированных ооцитов с низкой степенью экспансии клеток кумулюса составила 40%, что оказалось значительно выше, чем в группе нативных ооцитов (11%,  $P < 0,001$ ). Показано, что уровень апоптозов в кумулюсе нативных и девитрифицированных ооцитов возрастал после культивирования (26 и 43%; 38 и 51%, соответственно), 41% девитрифицированных ооцитов достигли стадии метафазы-II. Выявлены критические периоды прохождения мейоза в девитрифицированных ооцитах при культивировании *in vitro* (метафаза-I – анафаза). Кумулюсные клетки 52% девитрифицированных ооцитов сохраняли способность к экспансии при последующем экстракорпоральном культивировании.

Таким образом, анализ статуса хроматина кумулюса девитрифицированных ооцитов (степень экспансии кумулюса, уровень клеток с признаками апоптоза) – перспективный маркер при разработке моделей витрификации и систем дозревания донорских ооцитов животных *in vitro*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект офи-а 10-04-00389).

Cryoresistance of female gametes is an actual problem of intensification of introducing the achievements of cell reproductive technologies in medicine, animal breeding, preservation of mammalian gene pool. A variety of the factors determines a cryotolerance of donor oocytes, including the character of the oocyte-cumulus interactions when culturing devitrified oocytes.

The research aim was to comparatively analyze morphology and chromatin status of cumulus cells of native and devitrified oocytes.

Isolation of oocyte-cumulus complexes, their morphological assessment, culturing were carried-out according to the methods described previously [Kuzmina *et al.*, 2007]. Apoptosis in oocytes' cumulus was determined by TUNEL [Alm *et al.*, 2000]. Chromatin status of oocytes was evaluated by the method of Tarkowski [Tarkowski A.K., 1966]. For vitrification the oocytes were treated stepwise with three solutions (1 – 0.7 M DMSO and 0.9 M ethylene glycol (EG); 2 – 1.4 M DMSO and 1.8 M EG; 3 – 2.8 M DMSO, 3.6 M EG and 0.65 M trehalose), prepared on the base of medium 199 (Sigma, USA) containing 10% fetal bovine serum (Sigma), then placed into straws and plunged into liquid nitrogen.

The maturity of oocytes is confirmed by visual signs of cumulus morphology changes, including the expansion rate of cumulus cells. After 24-hr-long culturing of devitrified oocytes with low expansion rate of cumulus cells was 40%, which was significantly higher than in native oocytes (11%,  $P < 0.001$ ). It has been shown that the apoptoses level in cumulus of native and devitrified oocytes increased after culturing (26 and 43%; 38 and 51%, respectively), 41% of devitrified ones reached metaphase-II. There were identified critical periods of passing meiosis in devitrified oocytes when culturing *in vitro* (metaphase-I – anaphase). Cumulus cells of 52% devitrified oocytes retained the ability to expand during following culturing *in vitro*.

Thus, the analysis of cumulus chromatin status of devitrified oocytes (cumulus expansion rate, the level of cells with apoptosis signs) is a promising marker for the development of vitrification models and systems of donor oocytes maturation of animals *in vitro*.

The research was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project 10-04-00389 ofi-a).