

Флуоресцентный микроскопический анализ жизнеспособности ооцитов млекопитающих после витрификации*

© Е.В. Абакушина, Ю.В. Гельм, А.С. Миценьк

ООО „Арт БиоВет“,
249035 Обнинск, Калужская обл., Россия
e-mail: abakushina@mail.ru

Поступила в редакцию 18.12.2018 г.

В окончательной редакции 04.01.2019 г.

Принята к публикации 31.01.2019 г.

Жизнеспособность ооцитов крупного рогатого скота и свиней после витрификации изучена при помощи флуоресцентной микроскопии. Замораживание яйцеклеток осуществлялось в средах для витрификации с разной концентрацией криопротекторов в несколько этапов с последующей витрификацией. После хранения в криобанке в течение 14 дней опытные образцы были разморожены и проведен анализ жизнеспособности ооцитов с помощью морфологической оценки ооцитов и флуоресцентной микроскопии. Для окрашивания ооцитов были использованы два специальных набора: на некроз/апоптоз клеток (Propidium iodide/Alexa Fluor 488 Annexin) и на живые/мертвые клетки (Calcein-AM/ethidium homodimer-1). Флуоресцентная микроскопия ооцитов свиней и коров показала, что для оценки жизнеспособности ооцитов следует использовать флуоресцентный краситель Calcein-AM, поскольку флуоресцентные красители Propidium iodide и ethidium homodimer-1 не отображают процесс клеточной смерти яйцеклеток. В связи с этим Propidium iodide и ethidium homodimer-1 не могут выступать индикаторами истинной гибели ооцитов.

DOI: 10.21883/OS.2019.05.47660.9-19

Введение

В настоящее время для сохранения и длительного хранения ооцитов и эмбрионов млекопитающих (коров, свиней и др.), как и для человека, используется несколько способов криоконсервации наследственного материала: медленное или быстрое замораживание, т.е. витрификация или мгновенное погружение биоматериала в жидкий азот [1]. Для заморозки ооцитов и эмбрионов наиболее эффективным признан метод витрификации. Вопреки тому, что технология витрификации в конце двадцатого века стала прорывом в криобиологии, в частности криоконсервации, до сих пор отсутствуют стандартные протоколы витрификации биологического материала млекопитающих из-за наличия ряда физических закономерностей (охлаждение и замерзание жидкости, образование вне- и внутриклеточного льда) и информативный анализ выживаемости ооцитов и их качества из-за особенностей строения яйцеклеток [2,3]. Поэтому изучение жизнеспособности ооцитов млекопитающих после витрификации при помощи окраски флуоресцентными красителями и флуоресцентной микроскопии является важным этапом для разработки нового метода анализа выживаемости ооцит-кумулюсных комплексов (КОК), способного стать альтернативой анализу жизнеспособности ооцитов по их функциональной активности, т.е. по их способности оплодотворяться после разморозки.

* The 22nd Annual Conference Saratov Fall Meeting 2018 (SFM'18): VI International Symposium „Optics and Biophotonics“ and XXII International School for Junior Scientists and Students on Optics, Laser Physics & Biophotonics, September 24–29, 2018, Saratov, Russia.
<https://www.sgu.ru/structure/fiz/saratov-fall-meeting/previous-conferences/sara>

Материалы и методы

Для проведения данного исследования были собраны яйчники 15 свиней в возрасте от 5 месяцев до 3 лет и яйчники 15 коров в возрасте от 2 до 9 лет. Биоматериал доставлялся в лабораторию в течение нескольких часов после забоя скота в растворе хлорида натрия с антибиотиком в термосумке. КОК извлекались из яйчников млекопитающих при помощи аспирации фолликулярной жидкости из антральных и преовуляторных фолликулов более 2 mm в диаметре.

Среды для проведения процедуры витрификации были приготовлены на основе PBS (phosphate buffer solution) с добавлением 40 µg/ml гентамицина, 1 mM пирувата натрия, 2 mM L-глутамин и 20% FCS (fetal calf serum) (все Sigma-Aldrich, USA): растворы 1 и 2 для замораживания яйцеклеток коров содержали дополнительно в разных концентрациях комбинацию EG (ethylene glycol) и DMSO (dimethyl sulfoxide); растворы 3 и 4 для замораживания яйцеклеток свиней не содержали DMSO. Ооциты млекопитающих два раза отмывали в физиологическом растворе. Время инкубации КОК млекопитающих в растворе 1 и 3 было 8–10 min, в растворе 2 и 4 — 1–3 min.

Замораживание яйцеклеток осуществлялось методом витрификации: переносом ооцитов в криобирки и их погружением в жидкий азот. Процедура ревитализации осуществлялась в средах с 1 М раствором сахарозы в PBS (раствор 5) и 0.5 М раствором сахарозы в PBS (раствор 6) и растворе PBS или среде для культивирования ооцитов. Время инкубации в КОК млекопитающих в растворе 5 и 6 было не менее 5 min.

Для анализа жизнеспособности ооцитов была проведена их морфологическая оценка вместе с флуоресцентной микроскопией. Для окрашивания яйцеклеток были использованы два специальных набора: на некроз/апоптоз клеток (PI (Propidium iodide)/Alexa Fluor 488 Annexin — Molecular Probes, USA) и на живые/мертвые клетки (CAM (Calcein-AM) /EtHd-1 (ethidium homodimer -1) — Molecular Probes, США). Ооциты инкубировались в течение 15 min с флуоресцентными красителями в PBS (в соответствии с инструкцией производителя), потом был проведен анализ жизнеспособности клеток млекопитающих с помощью флуоресцентного микроскопа (Eclipse Ni, Nikon, Япония).

Результаты и обсуждение

В результате аспирации антральных и преовуляторных фолликулов яичников 15 коров разной возрастной категории было получено 193 яйцеклетки разной степени зрелости от GV до МП, имеющих различную морфологию, а в результате аспирации антральных и преовуляторных фолликулов яичников 15 свиной разной возрастной категории было получено 302 яйцеклетки.

Из всех полученных КОК коров дегенеративных оказалось 30.6%, а у свиной — 31.8%. Для процедуры витрификации были отобраны ооциты только с хорошей морфологией (класса А), окруженные со всех сторон клетками кумулюса (рис. 1). После отбора яйцеклетки были заморожены вместе с клетками кумулюса методом витрификации [4].

После хранения биоматериала в течение 14 дней нами было разморожено 32 ооцита коров и 64 ооцита свиной после процедуры витрификации. Морфологическая оценка КОК коров после мгновенного замораживания и последующего оттаивания показала, что 81.3% (26/32) ооцитов имели нормальную морфологию (рис. 2, *a*), остальные же (6/32) имели структурные изменения, свойственные дегенеративным ооцитам (рис. 2, *b*), а морфологическая оценка КОК свиной после витрификации и последующей ревитализации показала, что 76.3%

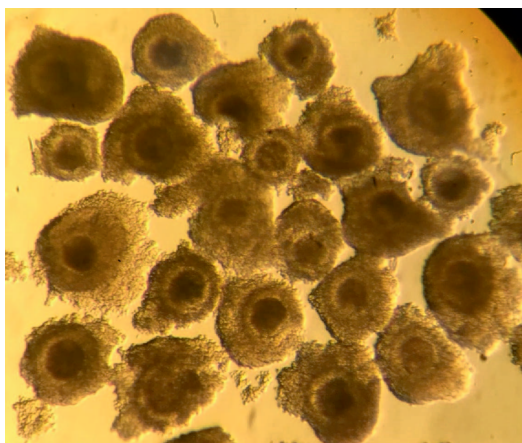


Рис. 1. Ооциты млекопитающих с хорошей морфологией до проведения процедуры витрификации.

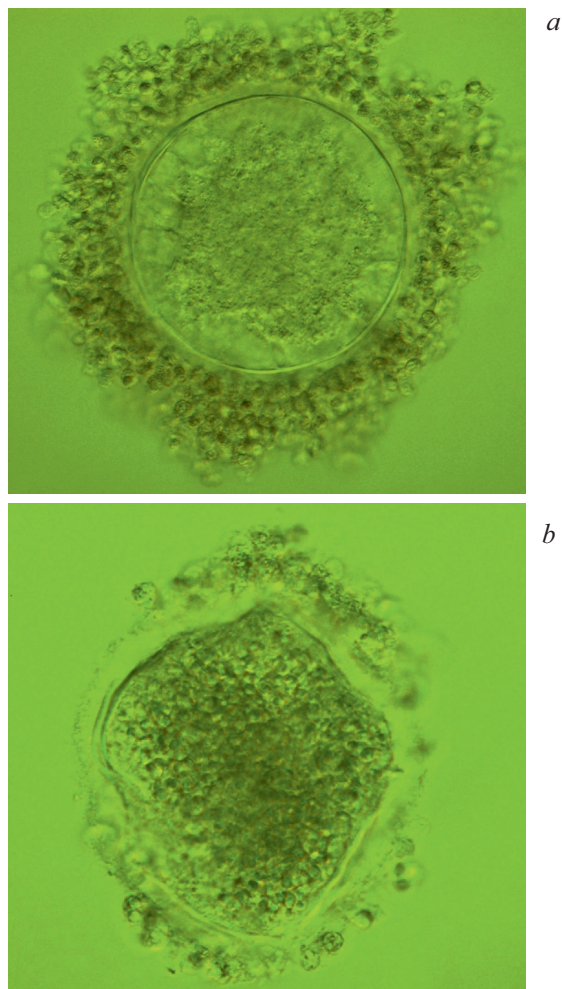


Рис. 2. Ооциты млекопитающих после оттаивания (*a* — ооцит с нормальной морфологией, *b* — дегенеративный ооцит).

(49/64) ооцитов имели нормальную морфологию в отличие от остальных 23.7% (15/64) ооцитов.

Жизнеспособность ооцитов свиной после оттаивания оказалась ниже, чем у коров, поскольку яйцеклетки свиной более чувствительны к холоду из-за особенностей морфологического строения. Выбор разных криопротекторов и их комбинаций для проведения процедуры витрификации для КОК коров и свиной был обусловлен тем, что для женских половых гамет коров среда с добавлением EG и DMSO — оптимальное сочетание криопротекторов в отличие от ооцитов свиной, которые более чувствительны к данной комбинации криопротекторов [5,6], поэтому замораживание половых женских гамет свиной проводилось в средах с различной концентрацией EG.

Для проведения данного исследования 32 КОК коров после оттаивания были поделены на две группы по 16 яйцеклеток в каждой, а 64 КОК свиной — на две группы по 32 яйцеклетки в каждой. Одна группа ооцитов коров и свиной окрашивалась специальным набором реагентов на некроз/апоптоз клеток (PI/Alexa Fluor 488 Annexin), а другая — на живые/мертвые клетки (CAM/EtHd-1).

Флуоресцентная микроскопия ооцитов коров и свиней из первой группы после витрификации и оттаивания показала, что при окраске яйцеклеток PI доля клеток составила 31.3% (5/16), а для ооцитов свиней — 28.1% (9/32). Доля морфологически измененных (дегенеративных) КОК из первой группы соответствует доле ооцитов, окрашенных PI на некроз, что несколько выше, чем при окраске на апоптоз — 25% (4/16) КОК коров и 25% (8/32) КОК свиней. Данные изменения и проникновение красного красителя внутрь клеток через перфорированную мембрану возможно связаны с изменением ее свойств после криоконсервации и ревитализации, а не с истинным некрозом, который возникает в результате гибели клетки.

Окраска яйцеклеток из второй группы EtHd-1 показала схожие с первой группой показатели по окрашиванию PI: в красный цвет окрасились 5 из 16 яйцеклеток коров и 10 из 32 яйцеклеток свиней. Полученный результаты несколько выше, чем предполагаемое количество живых клеток (2 из 16 у коров и 6 из 32 у свиней), не окрашенных САМ. Доля яйцеклеток, окруженных клетками кумулюса и окрашенных САМ, составила 87.5% (14/16) у КОК коров, а у КОК свиней — 81.3% (26/32).

Для того чтобы изучить процесс клеточной гибели и визуально оценить наличие апоптоза или некроза в клетках кумулюса, окружающих ооциты млекопитающих, был проведен эксперимент по инкубации не замороженных яйцеклеток с красителями на стекле при комнатной температуре в течение 25 min. Каждые 5 min после окрашивания ооцитов смесью PI и Alexa Fluor 488 Annexin оценивалась интенсивность окраски под флуоресцентным микроскопом.

Через 25 min инкубации клетки кумулюса начали окрашиваться с краев в зеленый цвет, т. е. начинался процесс апоптоза. Количество красных клеток, окрашенных PI, увеличивалось со временем инкубации. Был сделан вывод о том, что при оценке процесса клеточной гибели надо минимизировать факторы, которые оказывают губительное действие на клетки млекопитающих. В данном случае флуоресцентную микроскопию необходимо проводить непосредственно после аспирации ооцитов или разморозки образцов, не удлинняя время инкубации более чем на 25 min.

Полученные результаты после флуоресцентной микроскопии соответствуют доле ооцитов коров и свиней с нормальной морфологией. Сравнение результатов, полученных в ходе данного исследования по анализу жизнеспособности ооцитов разных млекопитающих при помощи окраски витальными флуоресцентными красителями и флуоресцентной микроскопии, показали, что полученные данные по выживаемости КОК хорошо соотносятся между собой, и они не противоречат друг другу.

Полученные нами данные по витрификации КОК свиней соответствуют результатам других авторов по выживаемости яйцеклеток данных видов млекопитающих после процедуры витрификации и последующего размораживания [6]. Результаты по выживаемости

ооцитов коров довольно сложно сравнивать с другими подобными исследованиями, поскольку многие авторы в своих работах выживаемость яйцеклеток коров оценивали по их функциональной активности, т. е. по проценту оплодотворенных яйцеклеток после витрификации с последующей ревитализацией [7,8].

Заключение

Таким образом, в результате окрашивания витальными флуоресцентными красителями и флуоресцентной микроскопии выяснилось, что для оценки жизнеспособности ооцит-кумулясных комплексов млекопитающих следует использовать краситель САМ, поскольку красители PI и EtHd-1 не отображают процесс клеточной гибели ооцита, в связи с чем они не могут выступать в роли показателей истинной гибели яйцеклеток. Также выяснилось, что флуоресцентную микроскопию необходимо проводить непосредственно после аспирации ооцитов или разморозки образцов, не удлинняя время инкубации более чем на 25 min. Окрашивание флуоресцентным красителем САМ может успешно применяться для оценки жизнеспособности половых клеток млекопитающих после витрификации.

Финансирование работы

Работа была поддержана Фондом содействия малым инновационным предприятиям (FASIE) (грант № 2367ГС1/39031).

Соблюдение этических стандартов

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] Chian R., Wang Y., Li Y. // J. Assist. Genet. 2014. V. 31. N 4. P. 411–420. doi 10.1007/s10815-014-0180-9
- [2] Monteiro C.A.S. // Livestock Science. 2017. V. 197. P. 1–7.
- [3] Blondin P., Vigneault C., Nivet A.L., et al. // Anim. Reprod. 2012. V. 9. N 3. P. 281–289.
- [4] Миценых А.С., Гельм Ю.В., Анохин Ю.Н., Абакушина Е.В. // Сборник тезисов 18-й Всероссийской молодежной научной конференции „Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии“. 19–20 апреля 2018 г. М.: ФГБНУ ВНИИСБ, 2018. С. 208–209.
- [5] Zhou G.B., Li N. // Mol. Hum. Reprod. 2009. V. 15. P. 279–285. doi 10.1093/molehr/gap016
- [6] Somfai T., Thi Men N., Noguchi J., et al. // J. Repr. Dev. 2015. V. 61. N 6. P. 571–579. doi 10.1262/jrd.2015-089
- [7] Ezoe K., Yabuuchi A., Tani T., et al. // PLoS One. 2015. V. 10. N 5. e0126801. doi 10.1371/journal.pone.0126801
- [8] Punyawai K., Anakkul N., Srirattana K., et al. // J. Reprod. Dev. 2015. V. 61. N 5. P. 431–437. doi 10.1262/jrd.2014-163