

ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОК ГРАНУЛЁЗЫ Фолликулов в Стадии атрезии, РЕГИСТРИРУЕМЫЕ С ПОМОЩЬЮ ФЛЮОРОХРОМОВ

КОСЯКОВА Г.П.¹, ПРОШИН С.Н.², ШАБАНОВ П.Д.³, ГЛУШАКОВ Р.И.³

MORPHOLOGICAL CHANGING OF GRANULOSE CELLS IN BOVINE FOLLICLES (BOSTAURUS L.) ON THE STAGE OF ATRESIA DETECTED BY FLUORESCENT MAKERS

KOSYAKOVA G.P., PROSHIN S.N., SHABANOV P.D., GLUSHAKOV R.I.

¹НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург; ²ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург; ³Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург.

В работе исследованы морфологические изменения при апоптозе клеток гранулёзы коров из интактных и атретических фолликулов. С использованием флуоресцентных маркеров выделено пять морфологических типов гранулёзных клеток, включая клетки на стадии некроза. Выявлено, что в атретических фолликулах частота клеток на поздних стадиях апоптоза преобладает. Частота клеток на стадии некроза не превышает 8% единичных атретических фолликулов. Сделан вывод о ценности предлагаемого метода для морфологической характеристики апоптоза гранулёзных клеток фолликулов и значении данного исследования в понимании судьбы яйцеклетки в атретических фолликулах.

Ключевые слова: коровы, клетки гранулёзы, апоптоз

The apoptotic morphological changes of bovine granulosa cells from intact and atretic follicles were elucidated. The five morphological types of granulosa cells including cells in necrosis were elaborated using unique fluorescent dyes. It has been established that the frequency of granulosa cells in the late stages of apoptosis in the bovine follicles on the stage of atresia is significantly prevailed. The frequency of granulosa cells on the stage of necrosis in rare atretic follicles does not exceed the percentage of 8. It was concluded that the fluorescent technique to detect apoptosis is a very valuable tool to get understanding about fate of oocytes in the follicles on the stage of atresia.

Keywords: cows, granulosa cells, apoptosis

Введение. Гистологически различают примордиальный фолликул, зреющий, граафов

пузырёк, кистозный и атретический фолликулы. Процесс развития яйцеклеток связан с ростом и развитием первичных фолликулов, которые состоят из незрелой яйцеклетки, окружённой слоем эпителиальных клеток и соединительной тканью. Значительная часть фолликулов у млекопитающих, включая коров, подвергается обратному развитию, то есть атрезии. Оставшиеся фолликулы начинают медленно и постепенно созревать, но и из этого числа фолликулов полной зрелости достигают не многие. Рост и созревание фолликулов совершается под контролем нейроэндокринных факторов: гормонов гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси. Нормальное функционирование гормональной системы коров гарантирует регулярное воспроизведение здорового потомства. Это особенно актуально сейчас, поскольку в современном животноводстве высокопродуктивные животные страдают снижением фертильности и патологий вынашивания эмбрионов. Для созревания ооцитов необходимо участие многих элементов фолликулов [1]. Рост, дифференцировка и апоптоз фолликулярных клеток яичника регулируется действием и взаимодействием эндокринных, паракринных и аутокринных факторов. Так, например, фактор некроза опухоли α (ФНО- α) является ингибитором гонадотропин индуцированной дифференцировки, тогда как трансформирующий фактор роста α (ТФР- α) доказанный промиотогенный и антиапоптотический фактор [2]. Считается, что в тот момент, когда фолликул «селектируется» организмом для овуляции и *in vivo*, развитие до стадии преовуляции предопределено и фолликулярной атрезии, а, следовательно, апоптоза не произойдёт [3]. Апоптоз – это один из фундаментальных процессов в жизни клеток организмов, находящихся на самом различном уровне эволюционного развития. Морфологические преобразования в процессе апоптоза выражаются в разной степени распада внутриклеточных компонентов. Конечными этапами апоптоза является уплотнение цитоплазмы, фрагментация ядер и самих клеток с образованием апоптотиче-

ских телец, в которых могут быть фрагменты ядер, элементы аппарата Гольджи, митохондрии и т.д. [4]. К настоящему времени разработано немало методов по определению программируемой клеточной гибели: рутинное свето-микроскопическое исследование с использованием обычных методов фиксации и окрашивания или способов, селективно выявляющих пикнотизированный хроматин. Флуоресцентный метод анализа апоптоза (запрограммированной смерти) по связыванию Аннексина V. Электронно-микроскопические методы: трансмиссионная и сканирующая электронная микроскопия – выявление олигонуклеосомной деградации ДНК *in situ*. Иммуногистохимическое выявление белков-маркеров, участвующих в запуске апоптоза и проточная цитофлуориметрия. Рутинная световая микроскопия широко используется, однако, низкая эффективность метода связана с незначительной длительностью специфичной для апоптоза стадии фрагментации клеток (всего 1-1,5 ч) и с трудностями, возникающими при изучении морфологии погибающих клеток и апоптотических телец даже при применении фазового контраста [5]. Проточная цитометрия является скрининговым методом даже при использовании Аннексина V, при этом, не учитывает морфологических изменений клеток. Иммуногистохимия является перспективным методом, однако, маркеры (моно- и/или поликлональные антитела), которые используются, в немалом числе случаев дают противоречивые результаты: например, там, где предполагается, что это апоптотические изменения, в действительности всего лишь клеточная репарация [6]. Важным методом для определения программируемой клеточной гибели является электронная микроскопия, которая позволяет учесть почти все морфологические нюансы, возникающие в ядре и органеллах клетки практически на всех стадиях апоптоза: ранний апоптоз, поздний апоптоз, образование апо-телец. Однако метод трудоёмок и не позволяет проводить анализ значительной популяции клеток. В связи с этим метод, основанный на витальном окрашивании клеток флуоресцентными красителями, представляется наиболее предпочтительным, поскольку позволяет учитывать все те же морфологические признаки апоптоза, которые выявляются рутинными методами окрашивания и улавливаются методом электронной микроскопии: маргинацию хроматина, неровность контуров ядра, пикноз (конденсацию) хроматина, изменение окрашивания и вакуализацию цитоплазмы, изменение контуров и фрагментацию клеток [7, 8]. Однако есть весьма важное преимущество, поскольку удаётся уловить оттенки ярко светящегося хроматина, а также морфологические изменения ядра по типу рексиса и пикноза [9, 10].

Процесс атрезии антральных фолликулов многие исследователи разделяют на три последовательные стадии. Одним из важных показателей атретического процесса в тканях фолликулов служит появление пикнотических ядер. Вопрос о количестве пикнотических ядер в атретических фолликулах различными авторами решается неоднозначно [11, 12, 13], что побудило нас с использованием более точного метода на основе флуоресцентных красителей охарактеризовать морфологические изменения клеток гранулёзы фолликулов.

Материал и методы исследования. Выделение и исследование фолликулов. Антральные фолликулы диаметром 2 – 5 мм выделяли из яичников коров на разных стадиях полового цикла. При этом фолликулы со слабым тургором, “белесые”, “серые”, с темными пятнами в опытах не использовали. Выделенные фолликулы оценивали по состоянию и степени развития микроциркуляторного русла (МЦР) [14, 15]. Степень развития МЦР оценивали по 5-балльной системе. По исследуемым признакам популяция фолликулов была разделена на 4 группы: 1-я группа – фолликулы с обширной васкуляризацией, представленной плотной сетью капилляров без признаков дегенерации. Контуров сосудов ровные, без расширений, прерывистости (интактные фолликулы); 2-я группа – фолликулы с развитым МЦР, представленным более крупными микрососудами без признаков дегенерации (1-я степень атрезии); 3-я группа – фолликулы со слабо развитым МЦР без признаков дегенерации, сеть капилляров отсутствовала (2-я степень атрезии); 4-я группа – фолликулы, МЦР которых имело признаки дегенерации (неровность контура, прерывистость сосудов) (3-я степень атрезии). В литературе известны единичные работы, в которых оценка фолликулов мышей, овец и коров проводилась по состоянию МЦР [16]. Вся популяция фолликулов была разделена на 4 группы. В качестве основного прижизненного морфологического признака полноценности фолликула использовано состояние МЦР: степень его развития, равномерность контуров сосудов, наличие или отсутствие прерывистости [17]. Для исследования на предмет программируемой клеточной гибели в работе использовали интактные фолликулы (n=28) и в 3-й степени атрезии (n=21). Гистологическое исследование. С каждого парафинового блока фолликулов коров на микротоме Leica SM 2000R (Sliding Microtome for Routine Applications) были получены срезы толщиной около 4 мкм. Парафиновые срезы были расправлены в водяной бане Гистобат LEICA HI 1210. После этого они были нанесены на стекла фирмы Menzel и

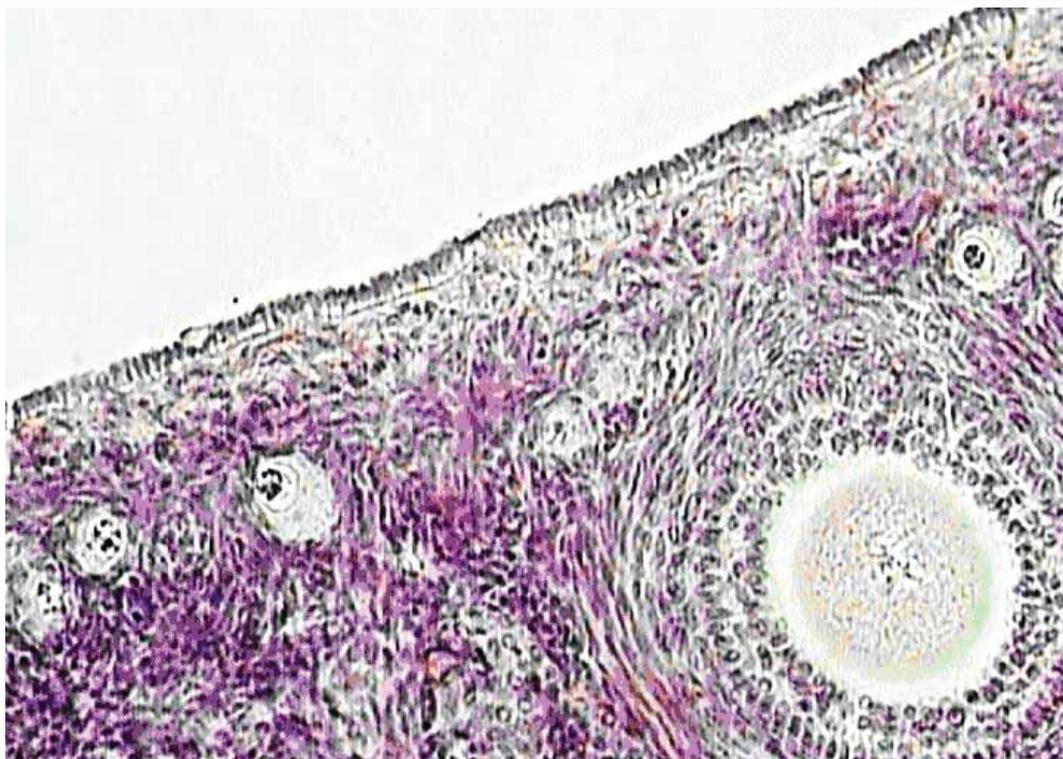


Рис. 1. Строение яичника у половозрелых коров. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400.

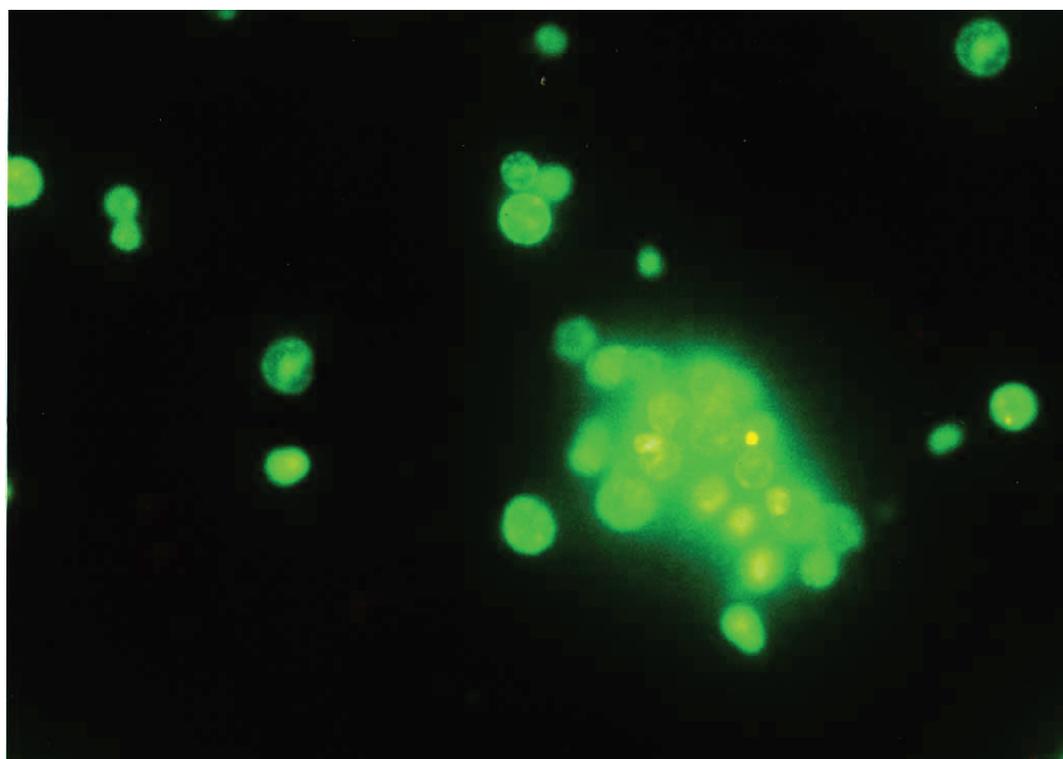


Рис. 2. Клетки гранулёзы интактного фолликула коровы. Окрашивание флюорохромами. Ув. 400.

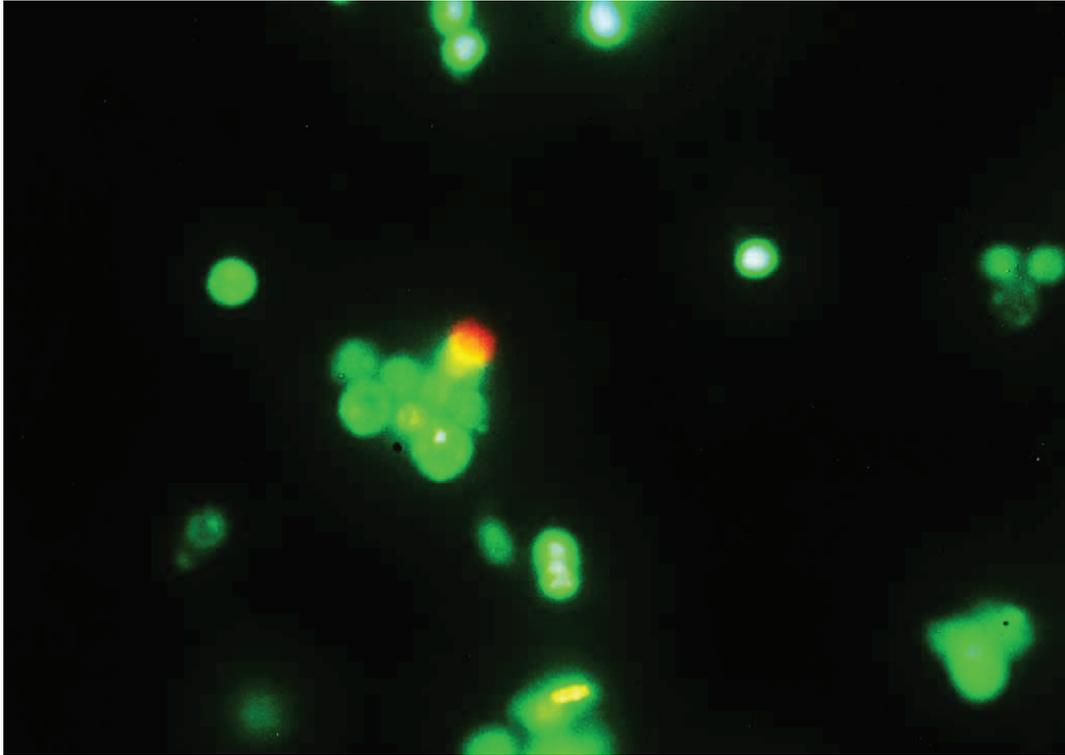


Рис. 3. Клетки гранулёзы интактного фолликула коровы. Окрашивание флюорохромами. Ранняя стадия апоптоза. Ув. 400.

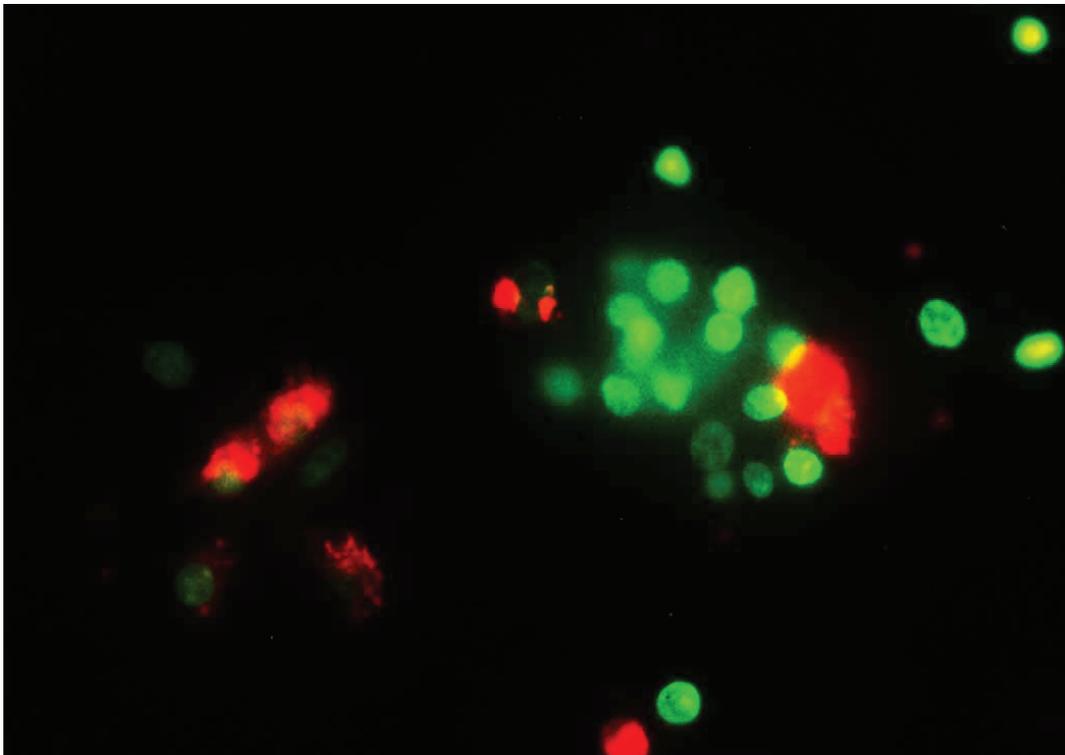


Рис. 4. Атретические фолликулы коровы. Окрашивание флюорохромами. Ранняя стадия апоптоза. Ув. 400.

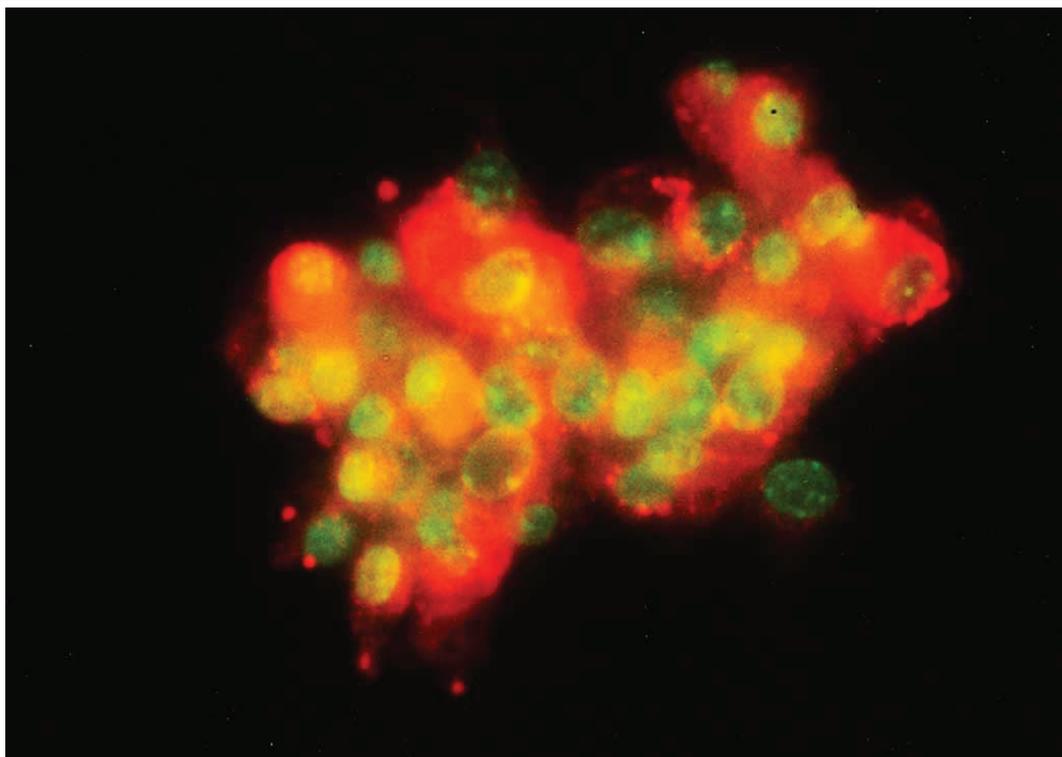


Рис. 5. Атретические фолликулы коровы. Окрашивание флюорохромами. Поздняя стадия апоптоза. Дегенерации ядерного аппарата. Ув. 400.

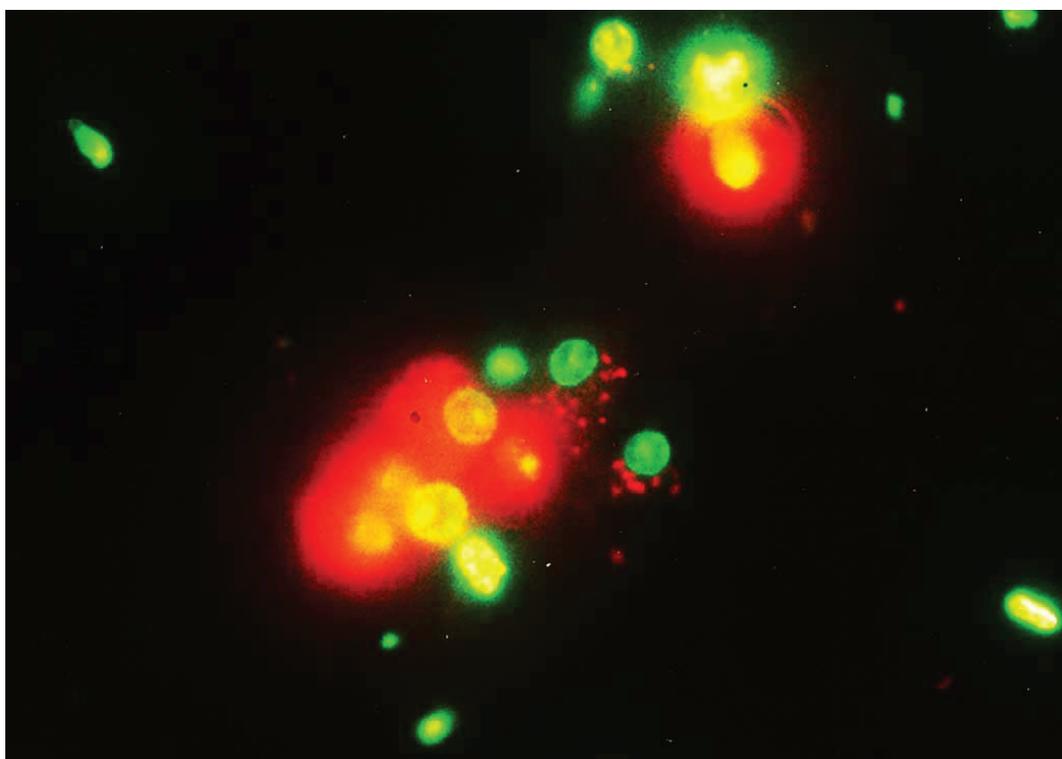


Рис. 6. Атретические фолликулы коровы. Окрашивание флюорохромами. Появление признаков некроза. Ув. 400.

высушены при температуре 35-35оС в течение одного часа. Затем срезы подвергались депарафинизации в двух сменах ксилола (2 x 5 мин) в каждом, отмыты и обезвожены в двух сменах 96%-го спирта (5 мин в каждом) и один раз в 70%-м спирте в течение 10 мин. Депарафинизированные среды окрашивали гематоксилином и эозином (рис. 1).

Морфологическое исследование с использованием флюорохромов. Акридиновый оранжевый и этидиум бромид (АО/ЭБ) использовались для исследования морфологических изменений клеток гранулёзы фолликулов коров. Клетки гранулёзы были ресуспендированы в охлаждённом ФСБ, после чего к ним была добавлена смесь свежеприготовленных красителей АО/ЭБ в соотношении 1:1, исходя из рабочей концентрации флюорохромов: АО – 100 мкг/мл и ЭБ – 100 мкг/мл, рН 7.4. Через минуту клетки наслаивали на предметное стекло и накрывали покровным стеклом. После чего производили морфологический анализ и подсчитывали частоту клеток с определёнными признаками апоптоза, распределяя их по следующим классам: 1 – живые клетки (ярко-зелёный хроматин с организованной структурой и прозрачно окрашенной в зелёный цвет цитоплазмой), 2 – ярко-зелёный хроматин с оранжевыми гранулами в цитоплазме (ранний апоптоз), 3 – фрагментированный хроматин, окрашенный в зелёный цвет с бледно-зелёной и/или оранжевой цитоплазмой (выраженный апоптоз), 4 – ярко-оранжевый фрагментированный хроматин с оранжевой цитоплазмой (конечная стадия апоптоза); 5 – оранжево-окрашенный хроматин без конденсации (некротические изменения). В каждом случае для каждого фолликула оценивали не менее 200 клеток при увеличении 400x на микроскопе OlympusVanoх-T (Japan).

Результаты исследования и их обсуждение. На рис. 2. представлены клетки гранулёзы интактного фолликула без каких-либо апоптотических изменений, то есть клетки без малейших признаков нарушения целостности ядер и клеток. У ядер чёткие контуры, хроматин ядер флюоресцирует ярко зелёным, а цитоплазма прозрачно зелёным. Частота таких клеток достигает в интактных фолликулах 96 %. В редких случаях (менее 5 %) в интактных фолликулах встречаются клетки с ядром без признаков фрагментации ярко флюоресцирующим зелёным светом, но с небольшими оранжевыми гранулами в цитоплазме (рис. 3). Данный тип клеток можно рассматривать как клетки, которые находятся на ранней стадии апоптоза. Это может указывать на то, что либо небольшая часть клеток даже в интактном фолликуле подвергается программируемой клеточной гибели, либо это единичные гистиоциты с кислыми цитоплазматическими гранулами, или же это артефакт, т.е.

во время приготовления клетки гранулёзы подвергаются неблагоприятным внешним воздействиям. Это может быть не обязательно механическое воздействие, а, скажем, кислород, свет и т.д. При исследовании атретических фолликулов также регистрировались клетки 1-го типа. Однако частота их не превышала 35 %, а в некоторых атретических фолликулах была не выше 8%. Частота клеток на ранней стадии апоптоза варьировала в менее широких пределах – от 19 до 32%. И, наконец, преобладали клетки гранулёзы 3-го типа (рис. 4) и на поздней стадии апоптоза (рис. 4), соответственно, частота таких клеток варьировала от 25 до 87% и от 53 до 81 %. Следует отметить, что частота клеток с признаками некроза не превышала 8% (рис. 5, 6).

Считается, что наиболее подверженной дегенерации в фолликулах является гранулеза. Причиной повышенной чувствительности клеток гранулезы служит, вероятно, отсутствие в ней сосудов, в результате чего происходит нарушение обменных и питательных функций этой ткани.

Морфологический анализ фолликулов показывает, что наибольшее число интактных фолликулов содержится в яичниках на стадиях фолликулярного роста и развитого желтого тела. В яичниках на ранней лютеиновой стадии фолликулы в основном атретические [18, 19]. Фолликулы коров обладают разной способностью к созреванию. Считается, что созревание ооцитов в интактных и 1-й степени атрезии фолликулах диаметром 2–5 мм происходит медленнее, чем созревание ооцитов в фолликулах 2-й степени атрезии. Повидимому, это связано с тем, что секреция клеток гранулезы в интактном фолликуле ингибирует созревание ооцита [20]. В атретических фолликулах значительная часть клеток, а иногда и вся гранулеза подвергается лизису. В результате этого ингибирующий эффект ослабевает и наступает реинициация мейоза. Культивирование фолликулов 2-й степени атрезии выявило значительное увеличение числа ооцитов с признаками дегенерации ядерного материала. Таким образом, разная степень атретических изменений, происходящих в клетках теки, гранулезы и кумюлюса, оказывает влияние на состояние ооцита, в частности на способность к созреванию вне организма [19]. Повидимому, можно предположить следующую цепь событий: атретические изменения начавшись в клетках гранулёзы, индуцируют морфологические и функциональные изменения в клетках кумюлюса, затем следуют изменения в клетках теки, откуда сигнал передаётся в яйцеклетку, что делает в дальнейшем невозможным участие таких яйцеклеток в процессе оплодотворения.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Campedel M.R., Campedel C.H., Mapletoft R.J., Ginter O.J. Morphology and location of attached follicular cumulus-oocyte complexes in horses, cattle and llamas // *Theriogenology*. – 1995. – Vol. 43. – P. 533-542.
2. Manchanda R., Kim J.-M., Tsang B.K. Transforming growth factor α inhibits apoptosis in hen granulosa cells. In: *Proceedings of the XIth Ovarian Workshop: Ovarian Cell Growth, Apoptosis and Cancer*; 1996; London, ON, Canada. P. 17.
3. Kaipia A., Hsueh A.J. Regulation of follicular atresia // *Annu. Rev. Physiol.* – 1997. Vol. 59. – P. 349-363.
4. Белушкин Н.Н., Хамад А.Х., Северин С.Е. Молекулярные основы патологии апоптоза // *Архив патологии*. – 2001. - №. 1. – С. 51-60.
5. Белушкин Н.Н. Особенности регуляции апоптоза опухолевых клеток // *Вестник Российской академии медицинских наук: Ежемесячный научно-теоретический журнал / Российская академия медицинских наук*. – 2008. - №. 10. – С. 15-20.
6. Прошин С.Н., Косякова Г.П. Кравцов В.Ю. Яковлев А.Ф. Ядерный антиген клеточной пролиферации в лимфоцитах коров с вирусиндуцированным лейкозом // *Цитология*. – 2007. – Т. 49. – №. 9. – С. 760.
7. Proshin S.N., Smirnova T.A., Kuzmina T.I., Yakovlev A.F. Vital study of Bovine granulosa cells during follicular development by differential staining with acridine orange for detection of apoptosis // *The 50th Annual Meeting of the European Association for Animal Production*. – 1999. – Zurich, Switzerland. – P. 328
8. Прошин С.Н., Косякова Г.П. Смирнова Т.А. Гаврилов Б.А. Яковлев А.Ф. Связь функциональной активности и апоптоза клеток периферической крови крупного рогатого скота // *Актуальные проблемы биологии в животноводстве. Тез. докл., Боровск, 2000*, С. 421.
9. Huang F., Yang Z., Yu D., Wang J., Li R., Ding G. *Sepia ink oligopeptide induces apoptosis in prostate cancer cell lines via caspase-3 activation and elevation of Bax/Bcl-2 ratio* // *Marine Drugs*. – 2012. – Vol. 10. – P. 2153-2165.
10. Прошин С.Н., Смирнова Т.И., Яковлев А.Ф. Прижизненное исследование программируемой клеточной смерти (апоптоза) в клетках гранулёзы фолликулов крупного рогатого скота с помощью дифференциального окрашивания акридиновым оранжевым // *Актуальные проблемы ветеринарной науки*. – С. 239–240: Тез. докл. МВА им. К.И. Скрябина, 1999, 251 с.
11. Romeis B. *Mikroskopische Technik*. Leibniz Verlag. Munchen 1948; 159
12. Kruip Th.A.M., Dieleman S.J. Steroid hormone concentrations in the fluid of bovine follicles relative to size, quality and stage of the oestrus // *Theriogenology*. – 1985. – Vol. 24. – N. 4. – P. 395-408.
13. Leibfried-Rutledge M.L., Critser E.S., First N.L. Fertilization potential of follicular oocytes classified by stage of cycle and size of follicle // *Theriogenology*. – 1985. – Vol. 23. – N. 5. – P. 753-760.
14. Смирнова Т.А., Галиева Л.Д., Завертяев Б.П. и др. Цитоморфологическая оценка фолликулов коров // *Проблемы репродукции*. – 1995. – Т. 2. – С. 23-25.
15. Смирнова Т.А., Галиева Л.Д., Свиридов Б.Е. Цитогенетический анализ ооцитов антральных фолликулов // *Проблемы репродукции*. – 1996. – Т. 4. – С. 8-12.
16. Webb R., Gauld I.K., Driancourt M.A. Morphological and functional characterization of large antral follicles in three breeds of sheep with different ovulation rates // *J. Reprod. Fert.* – 1989. – Vol. 87. – P. 243-255.
17. Hinrichs K. The relationship of follicle atresia to follicle size, oocyte recovery rate on aspiration, and oocyte morphology in the mare // *Theriogenology*. – 1991. – Vol. 36. – N. 2. – P. 157-168.
18. Katska L., Smorang Z. Number and quality of oocytes in relation to age cattle // *Anim. Reprod. Sci.* – 1984. Vol. – 7. – N. 5. – P. 451-460.
19. Hurk van den R., Dijkstra G., Hulshof S.C.J., Vos P.L.A.M. Micromorphology of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis, with particular reference to atypical granulosa cells // *J. Reprod. Fert.* – 1994. Vol. – 100. – P. 137-142.
20. Ireland H., Janet L., Ireland J.J. Changes in expression of inhibin/activin and subunit messenger ribonucleic acids following increases in size and during different stages of differentiation or atresia of non-ovulatory follicles in cows // *Biol. Reprod.* – 1994. – Vol. 50. – P. 492-501.

Авторская справка:

1. Косякова Галина Павловна – старший научный сотрудник Отдела фармакологии им. С.В. Аничкова НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН; E-mail: Galkos1@mail.ru
2. Прошин Сергей Николаевич – доцент кафедры фармакологии ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения РФ; E-mail: psnjns@rambler.ru
3. Шабанов Пётр Дмитриевич – заведующий кафедры фармакологии Военно-Медицинской академии им. С.М. Кирова; E-mail: pdshabanov@mail.ru
4. Глушаков Руслан Иванович – врач-гинеколог кафедры акушерства и гинекологии Военно-Медицинской академии им. С.М. Кирова, 194044, Санкт-Петербург, ул. Акад. Лебедева 10.