

УДК 576.315.45

ПОЛОЖЕНИЕ ЯДРА В ПРЕДОВУЛЯТОРНЫХ ООЦИТАХ МЫШИ С РАЗНОЙ КОНФИГУРАЦИЕЙ ХРОМАТИНА

© 2016 г. К. В. Шишова^{#, *}, Е. А. Лаврентьева[#], А. И. Хамидуллина, О. В. Зацепина^{**}

*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

[#] Авторы внесли равный вклад в выполнение работы

**E-mail: kseniya.shishova@inbox.ru*

***E-mail: zatsepina_olga@mail.ru*

Поступила в редакцию 21.04.2016 г.

Окончательный вариант получен 04.07.2016 г.

На основании общей конфигурации хроматина, предовуляторные (GV) ооциты млекопитающих разделяют на два основных (NSN и SN) и, как минимум, один промежуточный (pSN) типы. У мыши, наиболее компетентными к созреванию принято считать SN-ооциты, фенотипические признаки которых активно изучаются в связи с необходимостью усовершенствования репродуктивных технологий у человека. Одним из таких признаков является положение зародышевого пузырька (ядра) по отношению к центру ооцита. Однако данные по этому вопросу являются противоречивыми, а для ооцитов pSN отсутствуют полностью. В настоящей работе мы изучили положение ядра в 187 GV ооцитах мыши NSN-, pSN- и SN-типов, используя разные подходы, известные из литературы. Наши результаты показали, что: (1) во всех изученных типах ооцитов наиболее часто встречались центральные (43–66%), а наиболее редко – периферические (12–39%) ядра; (2) по характеру расположения ядер, ооциты pSN-типа больше соответствуют ооцитам SN-типа, чем ооцитам NSN-типа; (3) в GV ооцитах мыши положение ядра не является однозначным маркером общей конфигурации хроматина, и, следовательно, компетентности ооцита к созреванию; (4) разнообразие в положении ядер, проявляемое в GV ооцитах NSN-, pSN- и SN-типов, наиболее вероятно отражает способность ядер ооцитов к перемещению; (5) оценка положения ядра по трем вариантам (центральное, промежуточное и периферическое) является более информативным, чем по двум вариантам (центральное и периферическое).

Ключевые слова: предовуляторные (germinal vesicle, GV) ооциты мыши, ядро (germinal vesicle), конфигурация хроматина NSN-, pSN- и SN-типа

DOI: 10.7868/S0475145016060070

ВВЕДЕНИЕ

Многочисленными работами последних лет доказано, что у млекопитающих всех видов предовуляторные (germinal vesicle, GV) ооциты различаются по общей конфигурации хроматина, позволяющей разделять их на несколько типов (Zuccotti et al., 1998; De La Fuente, 2006; Tan et al., 2009; Luciano et al., 2012). Конфигурацию хроматина обычно определяют методами флуоресцентной микроскопии путем окрашивания живых или фиксированных ооцитов ДНК-связывающими

красителями, такими как Hoechst 33342, Hoechst 33258 и DAPI (Wickramasinghe et al., 1991; Debey et al., 1993). При этом в качестве фиксатора принято использовать параформальдегид (формальдегид), поскольку он сохраняет клетки и органеллы в состоянии, максимально приближенном к нативному (Kuzmin et al., 2014; Shishova et al., 2015). Для окрашивания хроматина в живых ооцитах применяют только Hoechst 33342, который способен проникать через мембраны живых клеток (Belli et al., 2014), хотя его влияние на созревания ооцитов до сих пор остается малоизученным.

На сегодняшний день общая конфигурация хроматина и ее связь со способностью GV ооцитов к созреванию наиболее активно изучается у двух видов млекопитающих – человека, что вызвано необходимостью усовершенствования репродуктивных технологий, и мыши, ооциты ко-

Сокращения: GV – germinal vesicle (ядро), GV ооцит – предовуляторный ооцит, NLB – nucleolus-like body, ЯПТ – ядрышко-подобное тельце, NSN – non-surrounded nucleolus (“неокруженное” ядрышко), SN – surrounded nucleolus (“окруженное” ядрышко), pSN – partly surrounded nucleolus (частично “окруженное” ядрышко, DIC – differential interference contrast (дифференциальный интерференционный контраст по Номарскому).

торых используют в качестве лабораторной модели оогенеза человека. У обоих видов различают два основных (NSN и SN) и один-два промежуточных (pNSN и/или pSN) типа ооцитов. К NSN (non-surrounded nucleolus, “неокруженное” ядрышко) типу относят GV ооциты, в которых хроматин наиболее деконденсирован, а ядрышко-подобное тельце (ЯПТ; nucleolus-like body, NLB) не окружено кольцом конденсированного хроматина (Wickramasinghe et al., 1991; Debey et al., 1993). Дополнительным признаком NSN-ооцитов мыши является также наличие блоков центрального гетерохроматина (хромоцентров) на поверхности ЯПТ и в нуклеоплазме. Типичные SN (surrounded nucleolus, “окруженное” ядрышко) ооциты (Wickramasinghe et al., 1991; Debey et al., 1993) отличаются от NSN-ооцитов наличием непрерывного слоя хроматина на поверхности ЯПТ, который в ооцитах человека часто называют “кариосферой” (Parfenov et al., 1989; Combelles et al., 2002). У мыши в составе этого слоя обнаружены последовательности, соответствующие центральному и ядрышко-образующим районам хромосом (Longo et al., 2003; Bonnet-Garnier et al., 2012; Fulka and Langerova, 2014). В значительной части ооцитов конфигурация хроматина проявляет признаки, промежуточные между типичными NSN- и SN-типами: в них присутствуют только одиночные хромоцентры, а хроматин, окружающий ЯПТ, не образует “замкнутого” кольца. Такие ооциты принято называть частично “неокруженными” (partly NSN, pNSN) или частично “окруженными” (partly SN, pSN) (Pesty et al., 2007). В настоящей работе мы будем придерживаться термина “pSN-ооциты”. Необходимо специально отметить, что конфигурация хроматина, напоминающая таковую в ооцитах NSN- и SN-типов мыши характерна для GV ооцитов всех млекопитающих, но терминология, используемая для их описания, варьирует в зависимости от вида млекопитающего (Tan et al., 2009). Например, одни авторы разделяют GV ооциты человека на четыре типа (A, B, C, D), где тип A соответствует NSN-ооцитам мыши, а типы B–D могут быть отнесены к SN-ооцитам (Combelles et al., 2002), тогда как другие авторы выделяют три типа GV ооцитов: с дисперсным, промежуточным и конденсированным хроматином (Sánchez et al., 2015), но их соответствие типам A–D не уточняется. В свете существующей терминологии не понятно также, к какому типу следует относить ооциты человека с хромосомами, формирующими агрегаты вокруг ЯПТ (Otsuki and Nagai, 2007; Otsuki et al., 2014), которые отсутствуют в ооцитах мыши (Otsuki and Nagai, 2007).

Согласно современным данным, ооциты с относительно деконденсированным хроматином (условный NSN-тип) и ооциты с отчетливой конденсацией хроматина (SN-тип), различаются по транскрипционной активности (Bouniol-Baly et al.,

1999; Parfenov et al., 1989), набору экспрессирующихся генов (Ma et al., 2013; Monti et al., 2013) и компетентности к созреванию (Fulka et al., 2015). У мыши наиболее компетентными считают SN-ооциты, поскольку только они позволяют получать зародыши, способные *in vitro* развиваться до бластоцисты (Zuccotti et al., 2002; Inoue et al., 2008). Компетентность ооцитов pSN типа у мыши на сегодняшний день не изучалась. Данные о способности к созреванию GV ооцитов у человека являются менее однозначными. Так, одни авторы относят к наиболее компетентным ооциты с отчетливым кольцом конденсированного хроматина вокруг ЯПТ (SN-подобные ооциты) (Sánchez et al., 2015), тогда как другие считают такие ооциты (тип B) наименее способными к созреванию (Combelles et al., 2002). Известны также публикации, согласно которым наиболее компетентными являются ооциты человека, в которых хромосомы собираются (aggregate) вокруг ЯПТ (Otsuki and Nagai, 2007; Salimov et al., 2014; Otsuki et al., 2014) подобно тому, что имеет место, например, в ооцитах коровы (Lodde et al., 2007). Однако данный тип ооцитов на сегодня не описан у мыши (Otsuki and Nagai, 2007). Отсутствие единой классификации GV ооцитов у разных видов млекопитающих (Tan et al., 2009) в совокупности с разными способами получения ооцитов (Combelles et al., 2002; Sánchez et al., 2015) затрудняют сравнение результатов, полученных разными авторами. Поэтому лишь в общем виде можно утверждать, что у всех млекопитающих наименее компетентными являются ооциты с наиболее дисперсной конфигурацией хроматина, тогда как конденсация хроматина (хромосом) коррелирует со способностью ооцитов к созреванию.

Неоднократно принимались попытки связать конфигурацию хроматина с расположением зародышевого пузырька (ядра), поскольку положение ядра является признаком, который легко идентифицируется методами микроскопии в живых ооцитах (Alexandre et al., 1989; Brunet and Maro, 2007; Bellone et al., 2009; Levi et al., 2013). Однако накопленные по этому вопросу данные не являются однозначными. Так, некоторые авторы показали, что у мыши около 90% ядер в ооцитах NSN-типа и 65% ядер в ооцитах SN-типа располагаются в центре (центроиде) ооцитов (Brunet and Maro, 2007; Bellone et al., 2009), тогда как другие авторы не обнаружили связи между положением ядра и SN-конфигурацией хроматина не только в ооцитах мыши, но и человека (Levi et al., 2013). В современной литературе причины этих разногласий не анализировались, а сведения о положении ядер в ооцитах промежуточного pSN-типа отсутствуют совсем.

Принимая во внимание вышеизложенное, в настоящей работе мы изучили положение ядер в GV ооцитах мыши NSN-, pSN- и SN-типов, ис-

пользуя разные подходы, известные из литературы (Bellone et al., 2009; Levi et al., 2013). Наши результаты показали, что вне зависимости от способа оценки, ядра в ооцитах разных типов располагаются как в центре (NSN – 43–58% случаев, pSN – 58–61%, SN – 52–66%), так и на периферии (NSN – 12–42% случаев, pSN – 22–39%, SN – 18–34%). Таким образом, наши данные говорят о том, что положение ядер в GV ооцитах мыши не является однозначным признаком конфигурации хроматина и, следовательно, компетентности ооцита к созреванию. Мы полагаем, что гетерогенность в расположении ядер, проявляемая в ооцитах всех изученных типов, отражает способность зародышевых пузырьков к перемещению, которое, скорее всего, происходит в направлении от периферии к центру ооцита.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Лабораторные животные

Эксперименты выполняли на самках мышей линии C57Bl/6 4–8 недельного возраста, которых приобретали в питомнике лабораторных животных “Пушино” (Московская область). Все животные в момент получения из питомника были свободны от патогенной флоры, содержались в условиях, свободных от патогенных возбудителей, и получали стандартизированный корм и воду *ad libitum*.

Для индукции роста ооцитов, мышам инъекцировали по 7.5 МЕ фолликулостимулирующего гормона ГСЖК (гонадотропин сыворотки жеребой кобылы, “Sigma-Aldrich”, США) в 100 мкл стерильного 0.14 М раствора NaCl. Через 46–48 ч животных умерщвляли путем цервикальной дислокации. Яичники извлекали и помещали в среду M2 (4.15 mM Na₂CO₃, 20.85 mM Hepes, 4 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, “Sigma-Aldrich”) с добавлением 100 мкг/мл дибутирил-циклического аденозинмонофосфата (dbcAMP) (“Sigma-Aldrich”), предотвращающего спонтанную активацию созревания ооцитов. GV ооциты выделяли из яичников с помощью препаровальных игл под контролем стереомикроскопа Stemi2000 (“Carl Zeiss”, Германия). Все манипуляции с выделенными ооцитами производили в среде M2 + dbcAMP, используя механические микропипетки Stripper (“Origio”, США) с внутренним диаметром капилляра 135 мкм.

Определение общей конфигурации хроматина

Определение общей конфигурации хроматина, т.е. типа GV ооцита, производили после окраски витальным ДНК-связывающим красителем Hoechst 33342 (“Thermo Fisher Scientific”, США). Выделенные ооциты помещали в раствор

1 мкг/мл Hoechst 33342 в среде M2 с добавлением 100 мкг/мл dbcAMP на 10–15 мин при комнатной температуре. Затем ооциты переносили в среду M2 с добавлением dbcAMP и фотографировали в режиме флуоресценции и дифференциального интерференционного контраста по Номарскому (DIC), используя конфокальный лазерный сканирующий микроскоп LSM510 DuoScanMETA (“Carl Zeiss”, Германия) и коррекционный объектив LD Plan-Neofluar ×63 (числовая апертура 0.75)/DIC.

Определение положения ядра в ооцитах

Определение положения ядра относительно центра (центроида) ооцита производили двумя способами, известными из литературы (Brunet and Maro, 2007; Bellone et al., 2009; Levi et al., 2013). Оба способа основаны на вычислениях коэффициента ρ (ρ), который отражает расстояние между центрами (центроидами, centroid) ооцита (oo) и герминативного пузырька (ядра, я) и рассчитывается по формуле $\rho = \frac{d(Cя - Coo)}{d(Roo - Rя)}$, где $d(Cя - Coo)$ –

расстояние между центрами (C) ядра и ооцита (в мкм), а $d(Roo - Rя)$ – разница между средними радиусами (R, в мкм) ооцита и ядра. Таким образом, ρ является параметром, указывающим на позицию ядра (герминативного пузырька) внутри ооцита и может колебаться от 0 (когда центр ядра совпадает с центром ооцита) до 1 (когда центр ядра расположен на контуре (кортексе) ооцита). Однако одни авторы оценивают положение ядра по двум значениям ρ : $0 < \rho \leq 0.5$ (центральное положение) и $0.5 < \rho \leq 1$ (периферическое положение) (Levi et al., 2013), тогда как другие – по трем значениям ρ : $0 < \rho \leq 0.33$ (центральное положение), $0.33 < \rho \leq 0.66$ (промежуточное положение ядра) и $0.66 < \rho \leq 1$ (периферическое положение ядра) (Brunet and Maro, 2007; Bellone et al., 2009). Принимая во внимание, что выводы, сделанные авторами на основании разных подходов, не являются однозначными, в настоящей работе мы использовали оба способа анализа положения ядер в ооцитах NSN-, pSN- и SN-типов. Определение средних радиусов, а также центров ядер и ооцитов производили с использованием программных обеспечений ImageJ1.47 (NIH, США; <http://imagej.nih.gov/ij/download.html>) и LSM Image Browser (“Carl Zeiss”, Германия; http://www.zeiss.com/microscopy/en_us/website/downloads/lsm-image-browser.html), доступных для свободного использования. Статистическую обработку результатов производили с помощью Microsoft Office Excel 2007. Средние значения сравнивали по критерию Стьюдента (*t*-test); достоверными считали значения, при которых $P < 0.05$.

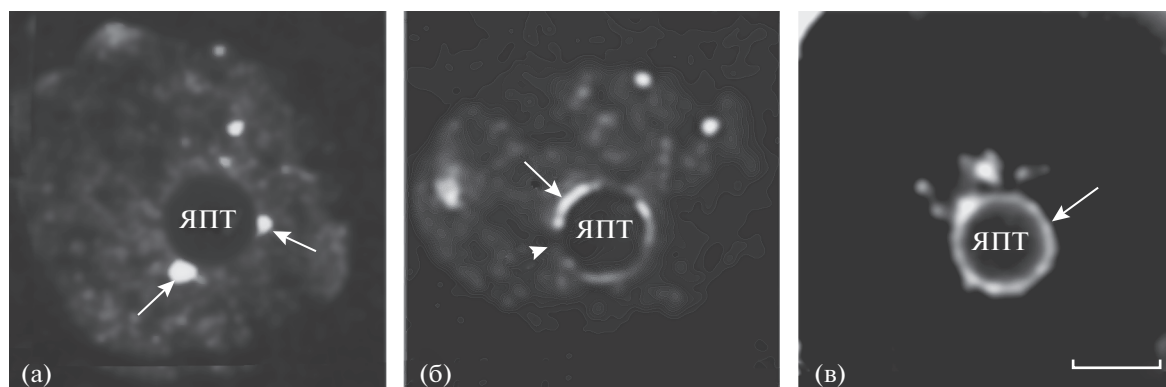


Рис. 1. Основные типы GV ооцитов мыши, определяемые по общей конфигурации хроматина после выделения из яичников и окрашивания витальным ДНК-связывающим красителем Hoechst 33342: NSN-тип (а), рSN-тип (б) и SN-тип (в). Стрелки указывают на хромоцентры, связанные с ЯПТ (а), прерывистый слой конденсированного хроматина на поверхности ЯПТ (б) и непрерывный слой хроматина на поверхности ЯПТ (в). Головка стрелки (б) указывает на “разрыв” в слое хроматина вокруг ЯПТ. ЯПТ – ядрышко-подобное тельце. Масштабная линия, 10 мкм.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В общей сложности, мы изучили положение ядер в 187 GV ооцитах мыши. На основании общей конфигурации хроматина (рис. 1) ооциты были разделены на следующие типы: NSN-тип (66 ооцитов, или 35.3% от общего числа), рSN-тип (44 ооцита, или 23.5%) и SN-тип (77 ооцитов, или 41.2%). К NSN-ооцитам относили ооциты, в которых присутствовали хромоцентры, контак-

тирующие с ЯПТ (рис. 1а). К SN-ооцитам – ооциты, на поверхности ЯПТ которых присутствовал непрерывный слой конденсированного хроматина (рис. 1в). Основным признаком рSN-ооцитов считали наличие прерывистого слоя хроматина вокруг ЯПТ (рис. 1б). Размеры всех ооцитов соответствовали стандартным значениям (Griffin et al., 2006): диаметр ооцитов составлял 70–80 мкм, диаметр ядра (зародышевого пузырька) – около 30 мкм, диаметр ЯПТ – не менее 10 мкм (рис. 2).

Расчет значений ρ производили для каждого ооцита, как иллюстрировано на рис. 2. Для этого определяли положение центра герминативного пузырька (ядра, Ся), центра ооцита (Со), а также маркировали контуры ядра и ооцита, что необходимо для расчетов среднего радиуса и коэффициента ρ . Примеры центрального ($0 < \rho \leq 0.33$), промежуточного ($0.33 < \rho \leq 0.66$) и периферического ($0.66 < \rho \leq 1$) положения ядер показаны на рис. 3а–3в.

В табл. 1 и 2 суммированы результаты оценки положения ядер при разных значениях ρ , но без привязки к определенному типу хроматина. Видно, что доминирующим вариантом является центральное расположение ядра, которое характерно для 50–62% ооцитов. Периферические ядра встречались заметно реже – у 17–38% ооцитов. Примерно у трети ооцитов ядра занимали промежуточное положение.

Результаты вычислений среднего значения ρ для ооцитов NSN-, рSN- и SN-типов суммированы в табл. 3. Согласно этим результатам, средние значения ρ в ооцитах разных типов не различаются статистически значимо ($P > 0.05$), что указывает на отсутствие явных различий в положении ядер между ооцитами с разной конфигурацией хроматина.

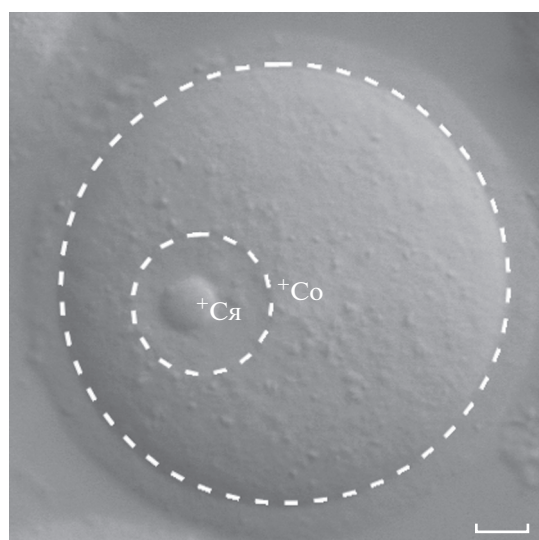


Рис. 2. Общий вид выделенного GV ооцита мыши в режиме дифференциального интерференционного контраста по Номарскому (DIC). Крестики обозначают центр (центроид) герминативного пузырька, или ядра (Ся) и центр (центроид) ооцита (Со). Пунктирными линиями обозначены контуры ядра и ооцита. Обозначения иллюстрируют параметры, необходимые для расчета коэффициента ρ и оценки положения ядра относительно центра ооцита. Масштабная линия, 10 мкм.

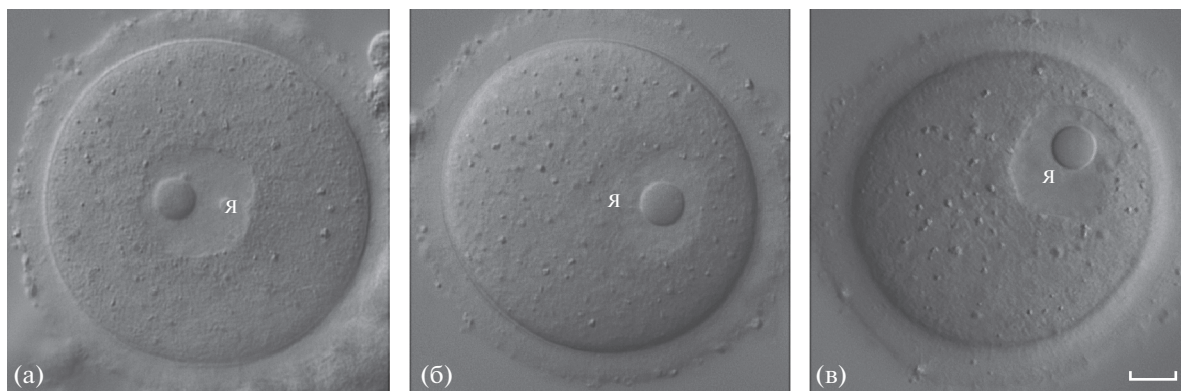


Рис. 3. Варианты положения герминативных пузырьков (ядер, я) в выделенных GV ооцитах мыши: центральное ($0 < \rho \leq 0.33$), промежуточное ($0.33 < \rho \leq 0.66$) и периферическое ($0.66 < \rho \leq 1$). Масштабная линия, 10 мкм.

В табл. 4 суммированы результаты определения положения ядер в ооцитах NSN-, pSN- и SN-типов при пороговом значении ρ , равном 0.5. Из таблицы видно, что в большинстве ооцитов всех типов ядра занимают центральное положение ($0 < \rho \leq 0.5$), составляя 58% для NSN-ооцитов, 61% для pSN-ооцитов и 66% для SN-ооцитов. Наиболее часто периферические ядра встречались в ооцитах NSN-типа (42%), наиболее редко – в SN-ооцитах (34%).

Уменьшение порогового значения ρ до 0.33, в первую очередь, сократило долю ооцитов с периферически-расположенными ядрами ($0.66 < \rho \leq 1$) до 12% в NSN-ооцитах, 18% в SN- и 22% в pSN-ооцитах (табл. 5). Центально-расположенные ядра ($0 < \rho \leq 0.33$) наиболее часто встречались в ооцитах pSN- и SN-типов, где их доля составила 58 и 52% соответственно. Из табл. 5 видно также, что в значительном числе ооцитов всех типов ядра занимали промежуточное положение ($0.33 < \rho \leq 0.66$), причем максимальная доля таких ядер (45%) характерна для ооцитов NSN-типа.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты настоящей работы показывают, что изменение пороговых значений коэффициента ρ , указывающего на положение зародышевого пузырька (ядра) относительно центра GV ооцита, безусловно, оказывает влияние на распределение ооцитов NSN-, pSN- и SN-типов по этому признаку. Так, снижение порогового значения ρ с 0.5 до 0.33 уменьшает долю ооцитов с периферическим расположением ядра (табл. 1, 2), что особенно заметно в ооцитах NSN-типа, где доля периферических ядер составляет 42% при $\rho = 0.5$ и 12% при $\rho = 0.33$ (табл. 4, 5). Кроме того в NSN-ооцитах снижение ρ значительнее (с 58 до 43%), чем в pSN- и SN-ооцитах, уменьшает долю центрально-расположенных ядер (табл. 4, 5). Однако при обоих пороговых значениях ρ ядра про-

являли тенденцию располагаться в центре ооцита (табл. 1, 2), что было наиболее заметно в ооцитах pSN- и SN-типов (соответственно, 58–61% и 52–66% случаев) (табл. 4, 5). Таким образом, наши данные не подтверждают выводы о явном преобладании центральных ядер в NSN-ооцитах (Bellone et al., 2009) и отсутствии каких-либо закономерностей в расположении ядер в ооцитах с SN-подобной конфигурацией хроматина (Levi et al., 2013). Некоторое преобладание центральных ядер в ооцитах SN-типа, проявляемое вне зависимости от порогового значения ρ (табл. 4, 5), соответствует представлениям о том, что у мыши SN-ооциты являются более зрелыми, чем NSN-ооциты (Zuccotti et al., 2002), поскольку распад зародышевого пузырька (стадия GVBD) и формирование метафазной пластинки в первом делении мейоза (стадия MI) у мыши происходят в центральной части ооцита (Maro and Verlhak, 2002; Yi et al., 2013; Almonacid et al., 2015). Наши данные показывают также, что по характеру расположения зародышевого пузырька ооциты pSN-типа ближе к SN-, чем к NSN-ооцитам. Действительно, в обоих типах ооцитов с близкой частотой встречались как центральные (58% в pSN- и 52% в SN-ооцитах), так и периферические (соответственно, 22% и 18%) ядра (табл. 5), хотя значимость этого сходства остается пока не установленной. Однако оно

Таблица 1. Доля ооцитов (в %) с центральным и периферическим положением герминативного пузырька (ядра) при пороговом значении ρ , равном 0.5

	Доля, % (число ооцитов)
Центральное положение ($0 < \rho \leq 0.5$)	62% (116)
Периферическое положение ($0.5 < \rho \leq 1$)	38% (71)
Всего	100% (187)

Таблица 2. Доля ооцитов (в %) с центральным, промежуточным и периферическим положением герминативного пузырька (ядра) при пороговом значении ρ , равном 0.33

	Доля, % (число ооцитов)
Центральное положение ($0 < \rho \leq 0.33$)	50% (94)
Промежуточное положение ($0.33 < \rho \leq 0.66$)	33% (61)
Периферическое положение ($0.66 < \rho \leq 1$)	17% (32)
Всего	100% (187)

Таблица 3. Средние значения коэффициента ρ в GV ооцитах мыши NSN-, pSN- и SN-типов. SE – ошибка определения среднего

	NSN	pSN	SN
Число ооцитов	66	44	77
$\rho \pm SE$	0.41 ± 0.03	0.40 ± 0.04	0.38 ± 0.03

Таблица 4. Частота встречаемости ооцитов NSN-, pSN- и SN-типов с центральным и периферическим положением ядра при пороговом значении ρ , равном 0.5

	NSN	pSN	SN
Центральное положение ($0 < \rho \leq 0.5$)	58%	61%	66%
Периферическое положение ($0.5 < \rho \leq 1$)	42%	39%	34%
Всего	100%	100%	100%

Таблица 5. Частота встречаемости ооцитов NSN-, pSN- и SN-типов с центральным, промежуточным и периферическим положением ядра при пороговом значении ρ , равном 0.33

	NSN	pSN	SN
Центральное положение ($0 < \rho \leq 0.33$)	43%	58%	52%
Промежуточное положение ($0.33 < \rho \leq 0.66$)	45%	20%	30%
Периферическое положение ($0.66 < \rho \leq 1$)	12%	22%	18%
Всего	100%	100%	100%

позволяет в случае необходимости объединять pSN- и SN-ооциты в один тип.

Таким образом, наши данные говорят об отсутствии жесткой корреляции между положением ядра и конфигураций хроматина в GV ооцитах мыши

всех проанализированных типов, т.е. NSN-, pSN- и SN-ооцитах. Вне зависимости от величины коэффициента ρ в ооцитах каждого типа ни один из вариантов расположения ядра (т.е., центральное, промежуточное или периферическое) не является явно доминирующим, что проявляется, например, в близких значениях ρ , характерных для ооцитов разного типа (табл. 3). Тем не менее, наши данные указывают на более высокую частоту встречаемости центральных ядер в SN-ооцитах, которая составляет от 52 до 66% (табл. 4, 5). Эти наблюдения не соответствуют выводу Леви с соавторами (Levi et al., 2013), согласно которому наличие периядрышкового хроматина не коррелирует с положением ядра ни в ооцитах мыши, ни человека. Причины этих несоответствий остаются нам не понятными. Поскольку на сегодняшний день работа Леви с соавторами является единственным исследованием, посвященным анализу положения ядра в ооцитах человека, вопрос о возможности экстраполяции наших данных на ооциты млекопитающих других видов, остается открытым. Однако, принимая во внимание, что у человека формирование митотического веретена на стадии МI обычно происходит в центре ооцита (Otsuki et al., 2014), мы допускаем, что некоторые закономерности, характерные для ооцитов мыши, могут проявляться и в ооцитах человека. К ним, в частности, может относиться более высокая частота встречаемости центральных ядер в ооцитах SN-типа, несмотря на то, что это явление не было описано Леви с соавторами.

Мы также полагаем, что гетерогенность NSN-, pSN- и SN-ооцитов мыши по расположению ядер скорее указывает не на компетентность ооцитов к созреванию, а на способность зародышевых пузырьков к перемещению. Согласно последним данным литературы, движение ядер в GV ооцитах мыши происходит в направлении от периферии к центру ооцита (Almonacid et al., 2015; Metchat et al., 2015). Возможно, что перемещение зародышевого пузырька сопряжено с изменениями конфигурации хроматина, однако, переход одного типа GV ооцита в другой пока не удалось подтвердить прямыми наблюдениями *in vitro* (Bellì et al., 2014). Остаются до конца не выясненными также механизмы движения ядер в ооцитах, поскольку одни авторы полагают, что за него отвечает тубулиновый цитоскелет (Alexandre et al., 1989), тогда как другие указывают на решающую роль актиновых филаментов и ассоциированных с ними белков (Almonacid et al., 2015).

Суммируя наши наблюдения, можно заключить, что выбор порогового значения ρ (0.5 или 0.33) не оказывает решающего значения на выявление центральных ядер, но влияет на долю ооцитов с периферическим положением ядра. В изолированных GV ооцитах мыши положение ядра не является жестким признаком общей конфигу-

рации хроматина и, следовательно, компетентности ооцита к созреванию, несмотря на то, что в более зрелых SN-ооцитах ядра чаще располагаются в центре, чем на периферии. Гетерогенность NSN-, рSN- и SN-ооцитов по расположению ядер вероятнее всего отражает способность зародышевых пузырьков к миграции, которая происходит вплоть до начала их распада.

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-14-00856).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Almonacid M., Ahmed W.W., Bussonnier M. et al.* Active diffusion positions the nucleus in mouse oocytes // *Nat. Cell Biol.* 2015. V. 17. P. 470–479.
- Alexandre H., Van Cauwenberge A., Mulnard J.* Involvement of microtubules and microfilaments in the control of the nuclear movement during maturation of mouse oocyte // *Dev. Biol.* 1989. V. 136. P. 311–320.
- Belli M., Vigone G., Merico V. et al.* Time-lapse dynamics of the mouse oocyte chromatin organisation during meiotic resumption // *BioMed. Res. Int.* 2014. doi 10.1155/2014/207357
- Bellone M., Zuccotti M., Redi C.A. et al.* The position of the germinal vesicle and the chromatin organization together provide a marker of the developmental competence of mouse antral oocytes // *Reproduction.* 2009. V. 138. P. 639–643.
- Bonnet-Garnier A., Feuerstein P., Chebrou M. et al.* Genome organization and epigenetic marks in mouse germinal vesicle oocytes // *Int. J. Dev. Biol.* 2012. V. 56. P. 877–887.
- Bouniol-Baly C., Hamraoui L., Guibert J. et al.* Differential transcriptional activity associated with chromatin configuration in fully grown mouse germinal vesicle oocytes // *Biol. Reprod.* 1999. V. 60. P. 580–587.
- Yi K., Rubinstein B., Unruh J.R. et al.* Sequential actin-based pushing forces drive meiosis I chromosome migration and symmetry breaking in oocytes // *J. Cell Biol.* 2013. V. 200(5). P. 567–576.
- Brunet S., Maro B.* Germinal vesicle position and meiotic maturation in mouse oocyte // *Reproduction.* 2007. V. 133. P. 1069–1072.
- Combelles C.M., Cekleniak N.A., Racowsky C., Albertini D.F.* Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes // *Hum. Reprod.* 2002. V. 17. P. 1006–1016.
- De La Fuente R.* Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes // *Dev. Biol.* 2006. V. 292. P. 1–12.
- Debey P., Szöllösi M.S., Szöllösi D. et al.* Competent mouse oocytes isolated from antral follicles exhibit different chromatin organization and follow different maturation dynamics // *Mol. Reprod. Dev.* 1993. V. 36. P. 59–74.
- Fulka H., Langerova A.* The maternal nucleolus plays a key role in centromere satellite maintenance during the oocyte to embryo transition // *Development.* 2014 V. 141. P. 1694–1704.
- Fulka H., Kyogoku H., Zatssepina O. et al.* Can nucleoli be markers of developmental potential in human zygotes? // *Trends Mol. Med.* 2015. V. 21. P. 663–672.
- Griffin J., Emery B.R., Huang I. et al.* Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig, and human) // *J. Exp. Clin. Assist. Reprod.* 2006. V. 3. P. 2.
- Inoue A., Nakajima R., Nagata M., Aoki F.* Contribution of the oocyte nucleus and cytoplasm to the determination of meiotic and developmental competence in mice // *Hum. Reprod.* 2008. V. 23. P. 1377–1384.
- Kuzmin A.N., Pliss A., Prasad P.N.* Changes in biomolecular profile in a single nucleolus during cell fixation // *Anal. Chem.* 2014. V. 86. P. 10909–10916.
- Levi M., Ghetler Y., Shulman A., Shalgi R.* Morphological and molecular markers are correlated with maturation-competence of human oocytes // *Hum. Reprod.* 2013. 28. P. 2482–2489.
- Lodde V., Modina S., Galbusera C. et al.* Large-scale chromatin remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: interplay with gap junction functionality and developmental competence // *Mol. Reprod. Dev.* 2007. V. 74. P. 740–749.
- Longo F., Garagna S., Merico V. et al.* Nuclear localization of NORs and lentromeres in mouse oocytes during folliculogenesis // *Mol. Reprod. Dev.* 2003. V. 66. P. 279–290.
- Luciano A.M., Lodde V., Franciosi F. et al.* Large-scale chromatin morpho-functional changes during mammalian oocyte growth and differentiation // *Eur. J. Histochem.* 2012. V. 56. P. e37.
- Ma J., Li M., Luo Y. et al.* Maternal factors required for oocyte developmental competence in mice: transcriptome analysis of non-surrounded nucleolus (NSN) and surrounded nucleolus (SN) oocytes // *Cell Cycle.* 2013. V. 12. P. 1928–1938.
- Maro B., Verlhac M.-H.* Polar body formation: new rules for asymmetric divisions // *Nature cell biology.* 2002. V. 4. P. 281–283.
- Metchat A., Eguren M., Hossain J.M. et al.* An actin-dependent spindle position checkpoint ensures the asymmetric division in mouse oocytes // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 7784.
- Otsuki J., Nagai Y.* A phase of chromosome aggregation during meiosis in human oocytes // *Reprod. Biomed. Online.* 2007. V. 15. P. 191–197.
- Otsuki J., Nagai Y., Sankai T.* Aggregated chromosomes transfer in human oocytes // *Reprod. Biomed. Online.* 2014. V. 28. P. 401–404.
- Monti M., Zanoni M., Calligaro A. et al.* Developmental arrest and mouse antral not-surrounded nucleolus oocytes. // *Biol. Reprod.* 2013. V. 88. P. 1–7.
- Parfenov V., Potchukalina G., Dudina L. et al.* Human antral follicles: oocyte nucleus and the karyosphere formation (electron microscopic and autoradiographic data) // *Gamete Res.* 1989. V. 22. P. 219–231.
- Pesty A., Miyara F., Debey P. et al.* Multiparameter assessment of mouse oogenesis during follicular growth in vitro // *Mol. Hum. Reprod.* 2007. V. 13. P. 3–9.
- Salimov D., Lopata A., Nagai Y., Lisovskaya T. et al.* In human oocytes the aggregation of chromosomes around the nucleolus is associated with the initiation and com-

- pletion of meiotic maturation // *Fertil. Steril.* 2014. V. 102. № 3. P. e118.
- Sánchez F., Romero S., De Vos M. et al.* Human cumulus-enclosed germinal vesicle oocytes from early antral follicles reveal heterogeneous cellular and molecular features associated with in vitro maturation capacity // *Hum. Reprod.* 2015. V. 30. P. 1396–1409.
- Shishova K.V., Lavrentyeva E.A., Dobrucki J.W., Zatsepina O.V.* Nucleolus-like bodies of fully-grown mouse oocytes contain key nucleolar proteins but are impoverished for rRNA // *Dev. Biol.* 2015. V. 397. P. 267–281.
- Tan J.H., Wang H.L., Sun X.S. et al.* Chromatin configurations in the germinal vesicle of mammalian oocytes // *Mol Hum Reprod.* 2009. V. 15. P. 1–9.
- Wickramasinghe D., Ebert K.M., Albertini D.F.* Meiotic competence acquisition is associated with the appearance of M-phase characteristics in growing mouse oocytes // *Dev. Biol.* 1991. V. 143. P. 162–172.
- Zuccotti M., Ponce R.H., Boiani M. et al.* The analysis of chromatin organisation allows selection of mouse antral oocytes competent for development to blastocyst // *Zygote.* 2002. V. 10. P. 73–78.

Position of the Nucleus in Mouse Germinal Vesicle—Stage Oocytes with Different Chromatin Configurations

K. V. Shishova*^{#,}, E. A. Lavrent'eva[#], A. I. Khamidullina, and O. V. Zatsepina**

Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: kseniya.shishova@inbox.ru

**e-mail: zatsepina_olga@mail.ru

[#] These authors equally contributed to this work

Received April 21, 2016; in final form, July 4, 2016

The mammalian germinal vesicle—stage (GV) oocytes are divided into two major types, NSN (nonsurrounded nucleolus) and SN (surrounded nucleolus), and at least one intermediate type, pSN (partly surrounded nucleolus), based on the general chromatin configuration. In mice, the SN oocytes are regarded as the most maturation competent, which explains active study of their phenotypic characteristics necessary for improvement of human reproductive technologies. One of such characteristics is the position of the GV (nucleus) relative to the center of the oocyte. However, the current data on this issue are contradictory and even completely absent for SN oocytes. In this work, we have studied the GV position in 187 mouse GV oocytes belonging to NSN, SN, and pSN types using different approaches known from the literature. Our results suggest that (1) the most abundant in all examined types of oocytes are central GVs (43–66%) and the least abundant are peripheral GVs (12–39%); the pSN oocytes are closer to SN oocytes rather than to NSN oocytes according to the GV position; (2) the position of the nucleus in mouse GV oocytes is an ambiguous marker of the general chromatin configuration and, correspondingly, maturation competence of the oocyte; (3) the diversity in the GV position of NSN, SN, and pSN oocytes most likely reflects the ability of GVs to migrate; and (4) assessment of the GV position according to three variants (central, peripheral, and intermediate) is more informative as compared with two variants (central and peripheral).

Keywords: mouse germinal vesicle—stage (GV) oocytes, germinal vesicle, chromatin configuration of NSN, SN, and pSN types