

КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ПРОЛИФЕРАЦИЯ

УДК 576

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЯДРЫШКОВОГО ОРГАНИЗАТОРА В РАСТУЩИХ ООЦИТАХ НЕПОЛОВОЗРЕЛЫХ САМОК ПТИЦ

© 2017 г. А. Г. Давидьян*, Е. И. Кошель, О. Б. Лаврова, А. Г. Демин,
С. А. Галкина, А. Ф. Сайфитдинова, Е. Р. Гагинская

Санкт-Петербургский государственный университет
199034, Санкт-Петербург, Университетская набережная, д. 7–9

*E-mail: asya.davidian@gmail.com

Поступила в редакцию 29.09.2016 г.

В ооцитах половозрелых птиц, несмотря на функционирование хромосом типа ламповых щеток, гены рибосомных РНК в ядрышковом организаторе (ЯОР) инактивированы и ядрышко не формируется на протяжении всех стадий роста ооцита. В то же время, в яичниках неполовозрелых птиц описаны две морфологические формы ооцитов, которые различаются по присутствию ядрышка в зародышевом пузырьке. До настоящего момента проблема активации и функционирования рибосомных генов в оогенезе птиц остается практически не изученной. В данной работе активация ЯОР в ооцитах цыплят *Gallus gallus domesticus* подтверждена с помощью флуоресцентной иммуногистохимии (ИГХ) (антитела против нуклеофозмина, фибрилларина, UBF1) и гибридизации нуклеиновых кислот *in situ* (FISH с зондом к *ITS1* на пре-рРНК). Выяснено, что в яичнике цыпленка фрагментация ядрышка в ооцитах поздней стадии ламповых щеток происходит после полной инактивации рибосомных генов: фрагменты ядрышка содержат фибрилларин, но не содержат молекул пре-рРНК. Показана перспективность 3D-реконструкции яичника на основе серийных гистологических срезов для количественной оценки гетерогенности популяции половых клеток в яичнике неполовозрелых самок птиц. Результаты настоящей работы дополняют и корректируют существующие в литературе сведения о функциональном статусе ЯОР в ооцитах неполовозрелых самок птиц, а также вносят вклад в представления о разнообразии сценариев гаметогенеза.

Ключевые слова: *Gallus gallus domesticus*, ооциты, ядрышко, ядрышковый организатор, хромосомы типа ламповых щеток

DOI: 10.7868/S047514501703003X

ВВЕДЕНИЕ

Ядрышко — важная полифункциональная внутриядерная органелла, формирующаяся в результате активности рибосомных генов и ответственная, в первую очередь, за формирование белок-синтезирующего аппарата клетки. Повторяющиеся гены рибосомных РНК (18S, 5.8S и 28S), вместе с разделяющими их межгенными транскрибируемыми спейсерами (*ITS1*, *ITS2*) (рис. 1) считываются РНК-полимеразой I в виде единого предшественника рРНК (пре-рРНК). Гены рРНК на хромосоме локализируются в районе ядрышкового организатора (ЯОР), экспрессия которого приводит к формированию ядрышка. Размеры, число и положение ядрышек в ядре различаются в зависимости от числа ядрышкообразующих хромосом в кариотипе, от типа и метаболической активности клетки (Pederson, 2011; Grummt, 2013).

Особенности функционирования ЯОР в ядрах растущих ооцитов — одна из важных характеристик типа оогенеза у животных (Raven, 1969; Гагин-

ская, 1975; Davidson, 1986). При гипертранскрипционном типе (Дондуа, 2005) запас рРНК в ооците обеспечивается работой ЯОР, при котором в ядре присутствует от одного до нескольких тысяч ядрышек. Полигеномный (нутриментарный) тип, напротив, характеризуется полностью инактивированным ЯОР, а накопление рРНК в ооците обеспечивается транспортом молекул через цитоплазматические мосты из вспомогательных клеток (трофоцитов) (Macgregor and Stebbings, 1970; Davidson, 1986; Дондуа, 2005; Greenbaum et al., 2011; Lei and Spradling, 2016).

Особенным представляется оогенез у птиц, который сочетает в себе характеристики гипертранскрипционного и полигеномного типов (Гагинская, Грузова, 1969; Гагинская, Чинь, 1980; Gaginskaya et al., 2009; Koshel et al., 2016). Признаком первого у птиц является присутствие гигантских транскрипционно активных хромосом типа ламповых щеток, которые функционируют на протяжении всего периода цитоплазматического роста и раннего вителлогенеза (Loyez, 1906; Га-

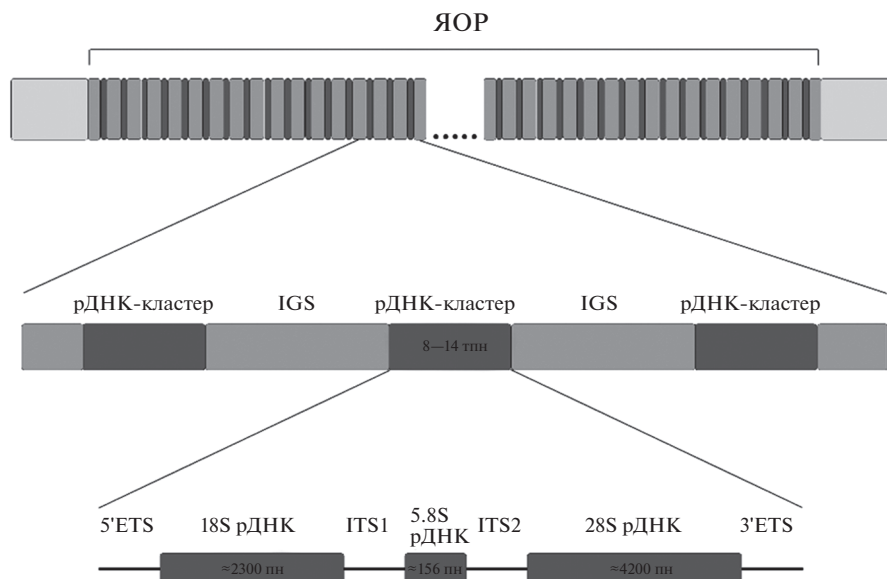


Рис. 1. Схема организации ЯОР эукариот (из Koshel et al., 2016 с изменениями).

гинская, 1972a; Gaginskaya et al., 2009). Вместе с тем, в ооцитах половозрелых птиц ЯОР инактивирован, и ядрышко не формируется на протяжении всех стадий роста ооцита, представленных в яичнике взрослой самки (рис. 2) (Гагинская, Грузова, 1975; Gaginskaya et al., 2009). Инактивация рибосомных генов в ядре ооцита у половозрелых птиц компенсируется, судя по всему, транспортом рРНК из клеток фолликулярного эпителия

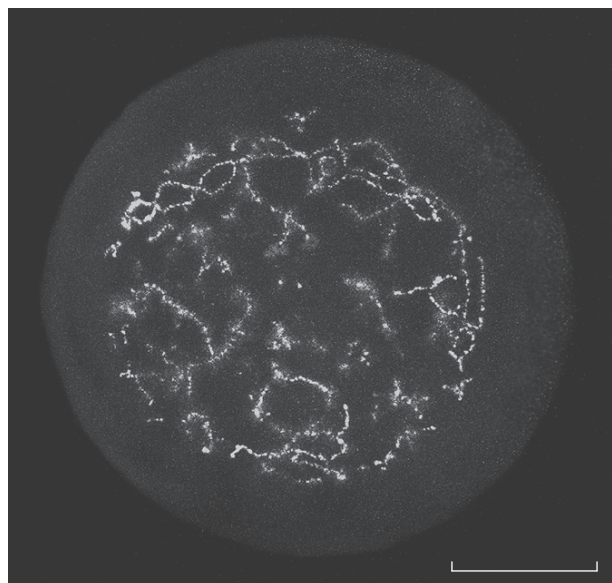


Рис. 2. Ядро, изолированное из растущего ооцита взрослой курицы: хромосомы типа ламповых щеток. Конфокальная микроскопия — максимальная проекция. Окраска SYTOX Green. Масштабная линия — 50 мкм.

(Press, 1964; Гагинская, Грузова, 1969; Schjeide et al., 1970; Гагинская, Чинь, 1980). Доставка рРНК обеспечивается функционированием особых органелл — трансосом, формирующихся в результате инвагинации мембран фолликулярных клеток и ооцита внутрь ооплазмы (Press, 1964; Callebaut, 1968; Schjeide et al., 1970).

В тоже время, имеются данные о существовании в яичниках неполовозрелых птиц двух морфологических форм ооцитов, которые различаются присутствием ядрышка в ядре (Greenfield, 1966; Чинь и др., 1979; Гагинская, Чинь, 1980). На основании морфологических данных предыдущих исследований было сделано заключение, что в ооците цыпленка с активным ЯОР, ядрышко образуется на стадии ранней диплотены перед вступлением ооцита в интрафолликулярный период развития; оно достигает максимальных размеров на стадии ламповых щеток, но в конце этой стадии, предположительно, распадается на несколько фрагментов и исчезает (Greenfield, 1966; Чинь, 1977; Гагинская, Чинь, 1980). Тем не менее, особенности функционирования ЯОР в ооцитах неполовозрелых птиц до настоящего времени остаются практически не изученными. Не определены судьба самого ядрышка и степень его участия в обеспечении ооцита рРНК. Соотношение ооцитов с активным и инактивированным ЯОР в яичнике неполовозрелых птиц, также как и сам феномен существования двух популяций ооцитов слабо изучены. Имеющиеся литературные данные о функционировании ядрышка в ооцитах неполовозрелых самок птиц основаны преимущественно на морфологических исследованиях с использованием классических гистологических методик и

нуждаются в подтверждении на современном методическом уровне.

В настоящей работе с использованием методов флуоресцентной ИГХ и FISH мы подтвердили присутствие ядрышка в ооцитах неполовозрелых самок домашней курицы *Gallus gallus domesticus* и проследили его судьбу после инактивации ЯОР. Предложен новый подход к количественному анализу популяции ооцитов на основе 3D-реконструкции фрагментов яичника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальным материалом для исследования служили яичники цыплят породы русская белая (*Gallus gallus domesticus*). Всего исследовано 95 особей цыплят в возрасте от шести дней до пяти месяцев после вылупления. Животные были получены из ФГУП “Генофонд” Россельхозакадемии (г. Пушкин, Ленинградская обл.). Содержание и умерщвление животных было проведено в соответствии с этическими требованиями государственного и международного уровня, что подтверждено заключением Этической комиссии СПбГУ № 131-03-2.

Для анализа функциональной активности ЯОР в ооцитах яичников цыплят на последовательных этапах развития использовали методы флуоресцентной ИГХ и FISH. Для проведения ИГХ и FISH яичники фиксировали 4% PFA и замораживали в среде Tissue freezing medium (Leica, Германия). Криосрезы толщиной 20 мкм получали с использованием криотома CM1850UV (Leica Microsystems, Германия). Препараты анализировали с использованием автоматизированных эпифлуоресцентных микроскопов DMRXA и DM4000B (Leica Microsystems, Германия), а также конфокального лазерного сканирующего микроскопа TCS SP5 (Leica Microsystems, Германия) с соответствующим программным обеспечением. Для обработки, деконволюции и анализа изображений, полученных с помощью конфокального микроскопа, использовали программу SVI Huygens.

Флуоресцентная ИГХ

Флуоресцентную ИГХ проводили с использованием антител к белкам ядрышка: фактор пролиферации нуклеофосмина (B23), фибрилларин и транскрипционный фактор UBF1. Для пермеабиллизации мембран клеток криосрезы обрабатывали 0.1% раствором Тритона X100 в течение 20 мин при комнатной температуре. После отмывки детергента в PBS препараты обрабатывали раствором протеиназы К (4 мкг/мл) в течение 20 мин при температуре 4°C. После промывки в PBS срезы постфиксировали в 2% PFA в течение 5 мин при комнатной температуре. Для снижения неспецифического связывания антител препараты инкубировали в 1% BSA в течение часа при 37°C. Первые антитела к фибрилларину (Ab-

cam, Великобритания), к B23 (Abcam, Великобритания), к UBF1 (Abcam, Великобритания) использовали в разведении 1 : 500, 1 : 100 и 1 : 100 соответственно. Препараты инкубировали в течение ночи при температуре 4°C. Вторые антитела Goat anti-Mouse IgG (H + L) (Thermo Fisher Scientific, США), Goat anti-Rabbit IgG (H + L) (Thermo Fisher Scientific, США) использовали в разведении 1 : 1000. Со вторыми антителами образцы инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Готовые препараты заключали в смесь глицерина, PBS и DAPI (1 мкг/мл) для выявления ядер клеток.

FISH

На базе ранее расшифрованной последовательности кластера рибосомных генов (Demin et al., 2015) нами разработан зонд (рис. 3), комплементарный последовательности внутреннего транскрибируемого спейсера (*ITS1*) в пре-рРНК. Благодаря тому, что транскрипты *ITS1* сплайсируются из молекулы пре-рРНК при ее созревании до 18S, 5.8S и 28S рРНК и не попадают в рибосомы, а присутствуют только в ядрышке, разработанный зонд служит надежным маркером ядрышка при использовании метода FISH.

Аmplификацию зонда осуществляли методом ПЦР с использованием амплификатора MJ Mini (BioRad, США). Состав реакционной смеси: 1× Taq Buffer + MgCl₂, 25 mM (Sileks, Россия); 0.7 mM digoxigenin-11-dUTP (Jena Bioscience, Германия); 2 mM dATP, dCTP, dGTP, 1.3 mM dTTP (Sileks, Россия); 10 пМ/мкл F-праймер и R-праймер; 0.125 ед/мкл Taq-pol (Sileks, Россия); 10 нг ДНК. Последовательности праймеров: F-праймер – 5'CAGCCTTCCCTTCCCTTCC3', R-праймер – 5'CCCTCGTCTCCCTTCTCT3'. ПЦР протокол: 94°C – 5 мин; (94°C – 20 сек, 58°C – 15 сек, 72°C – 15 сек) 35 циклов; 72°C – 5 мин; 4°C – ∞. В качестве матрицы была использована ДНК домашней курицы породы Русская белая.

Предобработка криосрезов для FISH идентична выше упомянутой для ИГХ. После дегидратации препаратов в растворах этанола (50–70–96%) наносили гибридизационную смесь по 10 мкл на срез. Состав гибридизационной смеси: зонд – 50 нг/мкл, формамид – 50%, DSS – 10%, тРНК – 0.5 мкг/мкл, 2× SSC. Гибридизацию проводили в термоциклере Genius (Techne, Великобритания) по следующему протоколу: денатурация – 5 мин при 81.5°C, медленное снижение температуры до 37°C. После выравнивания температуры препараты с зондом инкубировали в течение ночи при 37°C. Протокол отмывки не связавшегося зонда: 2 раза в 0.2× SSC при 60°C по 5 мин, 2 раза в 2× SSC при 60°C по 5 мин, в 4× SSC с 0.1% Tween-20 5 мин при комнатной температуре. Для снижения неспецифического связывания антител препараты инкубировали в 1% растворе BSA в 4× SSC с 0.1% Tween-20 в течение 1 ч при температуре 37°C. Против DIG в составе ДНК-зонда использовали

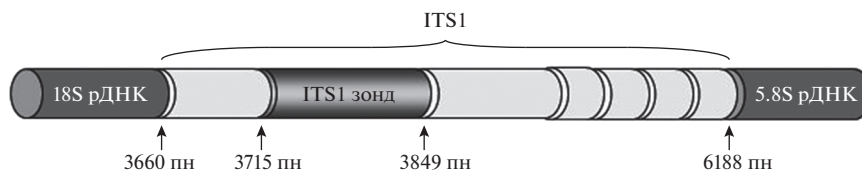


Рис. 3. Схема посадки ДНК-зонда к *ITS1* на пре-рРНК в ядрышке во время гибридизации *in situ*.

мышинные антитела, конъюгированные с цианидом $\text{Cu}3$ (Jackson ImmunoResearch, США) в разведении 1 : 400 в течение 1 ч при 37°C . Не связавшиеся антитела удаляли трехкратной отмывкой препаратов в 0.1% растворе Tween-20 в $4\times\text{SSC}$ по 5 мин при 43°C . Для повышения чувствительности детекции зонда препараты инкубировали со вторыми антителами, конъюгированными с $\text{Cu}3$ (Abcam, Великобритания) в разведении 1 : 400 в течение 1 ч при 37°C с последующими отмывками в 0.1% растворе Tween-20 в $4\times\text{SSC}$ и в $2\times\text{SSC}$ без детергента. Готовые препараты заключали в смесь глицерина, SSC и DAPI (1 мкг/мл) для выявления ядер клеток.

3D-анализ

Для количественной оценки соотношения в яичнике ооцитов с ядрышком и без ядрышка был применен метод 3D-анализа биологических объектов при использовании программного обеспечения Amira 5.2.0. 3D-реконструкцию осуществляли на основе серии парафиновых срезов яичника цыпленка 1.5-месячного возраста. Для этого яичник был фиксирован в смеси из метилового спирта и уксусной кислоты (3 : 1), проведен через раствор целлоидина с касторовым маслом (1 : 1) и залит в парафин. Серийные срезы толщиной 5 или 10 мкм получали на санном Leica SM-2010R (Leica, Германия) или ротационном микротоме Leica RM-2235 с CoolClamp (Leica, Германия). Для выявления ядрышка срезы яичника окрашивали гематоксилин-эозином. Микрофотографии получали с использованием эпифлуоресцентного микроскопа Carl Zeiss Axio Imager M1, оборудованного моторизованной станиной и цифровой камерой AxioCam MRc5. Панорамные изображения срезов при увеличении объектива $\times 20$ получали с использованием программного модуля MozaiX, а изображения по глубине среза — при помощи модуля Z-stack. Панорамные фотографии собирали в стек в программе Amira, где осуществляли обрисовку контура индивидуальных ооцитов на серийных срезах (рис. 5а). С целью более детального анализа структур ядра проводили Z-сканирование каждого ооцита при увеличении объектива $\times 63$ (рис. 5).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе нами был разработан оптимальный алгоритм анализа структурно-функционального состояния ЯОР, который позволил более детально исследовать некоторые особенности оогенеза неполовозрелых птиц на современном уровне. Алгоритм включает два этапа: 1) ИГХ и FISH с целью выявления ядрышка в ядре ооцита; 2) 3D-анализ срезов яичника с целью определения количественного соотношения ооцитов, содержащих и не содержащих ядрышко.

По данным Чиня (Чинь, 1977; Чинь и др., 1979), в яичнике шестисуточного цыпленка ооциты находятся либо на пахитенной, либо на ранней диплотенной стадиях, не окружены фолликулярным эпителием, средний размер ооцита составляет 10 мкм. Ооциты, окруженные фолликулярным эпителием, появляются в яичниках двухнедельных цыплят. У трехнедельного цыпленка асинхронно развивающиеся ооциты в яичнике окружены однослойным фолликулярным эпителием (рис. 4), находятся в периоде роста, хромосомы преобразованы в типичные ламповые щетки (Чинь, 1977; Гагинская, Чинь, 1980). В яичнике молодой самки, вплоть до наступления периода откладки яиц можно наблюдать растущие ооциты на всех стадиях развития, предшествующих созреванию, а именно на ранней диплотене, ранней, средней и поздней стадии ламповых щеток, на стадии конденсации хромосом.

Применив методы ИГХ и FISH, мы подтвердили более ранние наблюдения о присутствии одного или двух ядрышек в ядре ооцита у неполовозрелых кур (Greenfield, 1966; Callebaut, 1968; Гагинская, Чинь, 1980) (рис. 4). Кроме того, сравнение данных ИГХ и FISH позволило подробнее охарактеризовать динамику функционирования ЯОР в растущих ооцитах цыплят.

В растущих ооцитах на ранней и средней стадии ламповых щеток ядрышки имеют диаметр от 2 до 8 мкм, и чем меньше диаметр ооцита, тем чаще в ядре наблюдается два близко расположенных ядрышка. В кариотипе домашней курицы единственный ЯОР локализован на микрохромосоме 16 (Auer et al., 1987; Miller et al., 1996), которая детально охарактеризована в статье Солиньяка с коллегами (Solinhac et al., 2010). Показано, что в мейозе гомологичные хромосомы образуют одну хиазму в районе локализации повтора PO41 на расстоянии не

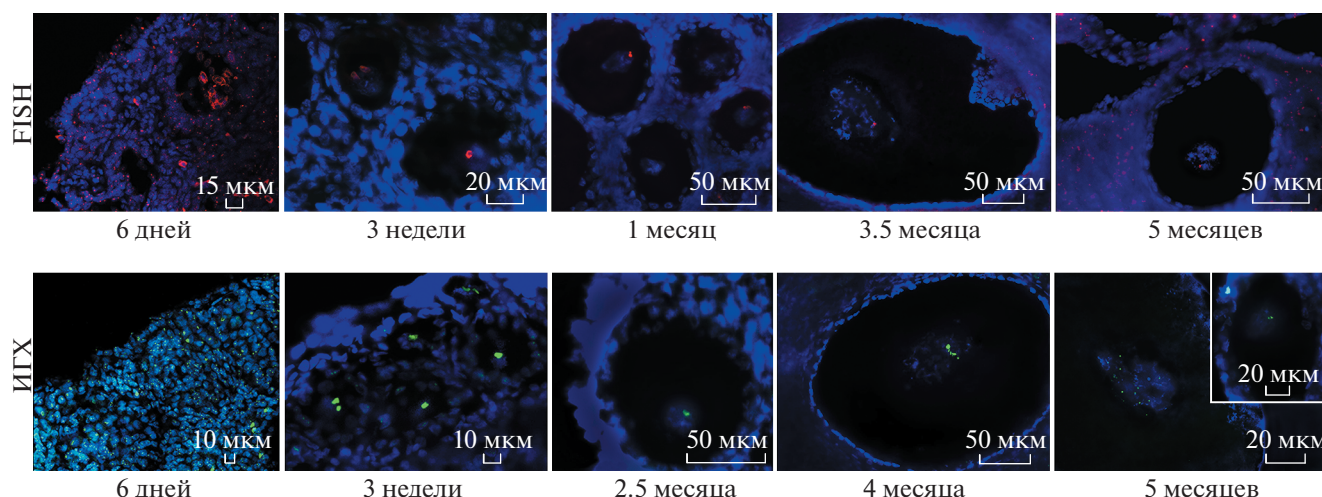


Рис. 4. Выявление ядрышка методами FISH (верхний ряд) и ИГХ (нижний ряд) на криосрезах яичников цыплят в возрасте от 6 дней до 5 мес. Красная флуоресценция — детекция пре-рРНК; зеленая флуоресценция — детекция фибрилларина.

менее 1.5 Мб от ЯОР (Solinhas et al., 2010). Взаимное расположение хиазмы и гомологичных ЯОР в биваленте объясняет присутствие в ядре ооцита одного или двух ядрышек. Различие, очевидно, определяется пространственной ориентацией гомологичных хромосом бивалента внутри ядра и возможным слиянием гомологичных ядрышек.

В яичнике полуторамесячного цыпленка в наиболее крупных ооцитах, достигающих в диаметре 100 мкм и находящихся на средней стадии ламповых щеток, обнаруживаются признаки фрагментации ядрышка: несколько фрагментов преимущественно крупных размеров расположены близко друг к другу, очевидно, в месте локализации исходного ядрышка. Ооциты с фрагментированным ядрышком можно наблюдать в яичниках цыплят в период от 1.5 до 5 мес. после вылупления. Начиная с 3.5-мес. возраста цыпленка, в более крупных ооцитах ядрышко распадается полностью и, судя по морфологической картине, исчезает. В самых крупных ооцитах стадии ламповых щеток у пятимесячного цыпленка на гистологических препаратах ядрышки также отсутствуют (Чинь, 1977; Гагинская, Чинь, 1980).

С помощью ИГХ анализа криосрезов яичника, белки ядрышка мы выявляли на всех этапах его функционирования и фрагментации (рис. 4). Более того, в ядрах крупных ооцитов у цыплят в возрасте 3.5–5 мес., когда ядрышко отсутствует полностью, с помощью антител к фибрилларину выявляется множество мелких фибрилларин-содержащих гранул, рассеянных по всему объему ядра (рис. 4). Очевидно, что эти гранулы содержат продукты распада ядрышка, которые сохраняются в ядре до поздних стадий развития ооцита. Однако какие-либо фрагменты распадающегося ядрышка, в том числе фибрилларин-содержащие гранулы, образующиеся после его полного распада, не выявляются методом FISH с

зондом к *ITS1*, тогда как интактные ядрышки в ооцитах ранних стадий развития (ранняя дипло-тена, ранняя и средняя стадии ламповых щеток) эффективно выявляются этим способом. Данные результаты свидетельствуют о том, что фрагменты деградирующего ядрышка не содержат пре-рРНК. Ядрышко распадается после того, как гены рРНК в ЯОР инактивируются и вся синтезированная пре-рРНК завершает процессинг.

Таким образом, к моменту наступления половой зрелости курицы наиболее крупные ооциты, вступающие в позднюю стадию ламповых щеток, оказываются лишенными ядрышка. В то же время, у цыпленка в ооцитах ранних стадий развития ядрышко еще функционирует. У половозрелых самок ЯОР инактивирован на всех стадиях роста ооцита (рис. 2) (Гагинская, Грузова, 1975; Gaginskaya et al., 2009; Koshel et al., 2016). Подобная динамика, по-видимому, в целом характерна для представителей класса Птицы (Гагинская, 1972a).

Дифференциальная активность генов рРНК в ооцитах, проявляющаяся в онтогенезе птиц, представляется загадочной и требующей детального изучения. В частности, важно выяснить, во всех ли ооцитах у неполовозрелых самок ЯОР активен и формирует ядрышко. По данным Чиня (1977), ЯОР функционирует не во всех зародышевых пузырьках и даже на ранней стадии ламповых щеток ядрышко сформировано примерно в половине ооцитов. Мы решили проверить эти данные и исследовать соотношение ооцитов с активным и инактивированным ЯОР в яичнике неполовозрелых птиц, используя новый подход. Для решения этой задачи нами был разработан алгоритм количественного анализа ядрышкосодержащих ооцитов на основе 3D-реконструкции сегментов яичника по серийным парафиновым срезам, окрашенным гематоксилин-эозином. В программе Amira фотографии срезов выравнивали между собой и собирали в

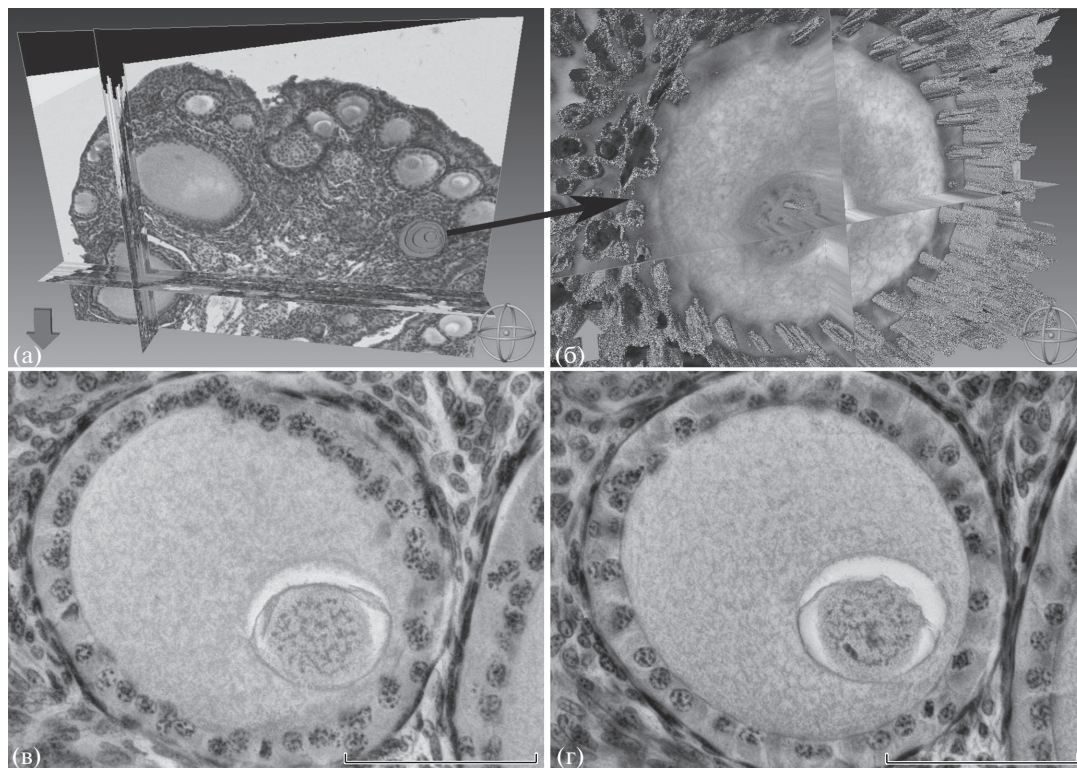


Рис. 5. 3D-реконструкция фрагмента яичника цыпленка в возрасте 1.5 мес. в программе Amira 5.2.0 на основе серии парафиновых срезов. (а) Стек из 20 панорамных фотографий срезов, полученных при увеличении объектива $\times 20$. (б) Z-сканирование выделенного ооцита с шагом в 1 мкм при увеличении объектива $\times 63$ с применением опции “изо-поверхности”, показывающей в объеме ооцит с ядрышком. (в, г) Демонстрация анализа целого ооцита на серии парафиновых срезов яичника. Увеличение объектива $\times 63$. (в) Срез через ядро ооцита, где ядрышки не обнаруживаются. (г) Тот же ооцит на другом срезе с двумя ядрышками в ядре. Масштабная линия — 50 мкм.

стек, воссоздающий каждый ооцит в объеме, что наглядно продемонстрировано на рис. 5а. Используя описанный метод, мы провели предварительный анализ фрагмента яичника полторамесячного цыпленка, который показал присутствие ядрышка во всех ооцитах диаметром от 40 до 200 мкм. Все проанализированные ооциты находились на средней стадии ламповых щеток. В этом наши результаты расходятся с данными Чиня (Чинь, 1977; Чинь и др., 1979; Гагинская, Чинь, 1980) и требуют дальнейшего исследования. Тем не менее, в данной работе нами показана эффективность метода 3D-реконструкции сегментов яичника для количественного анализа содержащих ядрышко ооцитов. Для более глубокого изучения особенностей дифференциальной активности генов рРНК в ооцитах птиц необходимо исследование всего яичника и всех стадий роста ооцита, включающее статистический анализ данных. Результаты настоящей работы дополняют и корректируют существующие в литературе сведения о функциональном статусе ЯОР в ооцитах неполовозрелых самок птиц (Чинь и др., 1979; Гагинская, Чинь, 1980). Полученные данные не только подчеркивают уникальность функционирования генов рРНК в оогенезе у птиц, но и в целом расширяют наше представление о

разнообразии сценариев оогенеза у различных организмов.

Исследование поддержано грантами СПбГУ № 1.50.1043.2014 и РФФИ № 15-04-05684. Использовано оборудование ресурсных центров СПбГУ “Хромас” и “Развития клеточных и молекулярных технологий”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гагинская Е.Р. О классификации типов оогенеза // Онтогенез. 1975. Т. 6. № 6. С. 539–545.
- Гагинская Е.Р. Ядерные структуры в ооцитах половозрелых птиц. I. Поведение хромосом в период цитоплазматического роста ооцита // Цитология. 1972а. Т. 14. № 4. С. 426–432.
- Гагинская Е.Р., Грузова М.Н. Выявление амплифицированной рДНК в клетках яичников некоторых насекомых и птиц методом гибридизации нуклеиновых кислот на препаратах // Цитология. 1975. Т. 17. № 10. С. 1132–1137.
- Гагинская Е.Р., Грузова М.Н. Особенности оогенеза зяблика // Цитология. 1969. Т. 9. № 10. С. 1241–1251.
- Гагинская Е.Р., Чинь С.Х. Особенности оогенеза цыпленка. II. Фолликулярный период в развитии ооцитов // Онтогенез. 1980. Т. 11. С. 213–221.
- Дондуа А.К. Биология развития. Т. 1. Элементы сравнительной эмбриологии. СПбГУ печать, 2005. 295 с.

- Чинь С.Х. Некоторые особенности развития ооцитов в яичнике цыпленка. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Ленинград. ЛГУ, 1977. 23 с.
- Чинь С.Х., Гагинская Е.Р., Калинина Е.И. Особенности оогенеза цыпленка. I. Экстрафолликулярный период в развитии ооцитов // Онтогенез. 1979. Т. 10. № 4. С. 340–349.
- Auer H., Mayr B., Lambrou M., Schleger W. An extended chicken karyotype, including the NOR chromosome // Cytogenetics and Cell Genetics. 1987. V. 45(3–4). P. 218–221.
- Callebaut M. [H3] Uridine incorporation during previtellogenesis and early vitellogenesis in the oocytes of the chick (*Gallus gallus*) // J. Embryology and Experimental Morphology. 1968. V. 20. P. 169–174.
- Davidson E.H. Gene Activity in Early Development. 3rd ed. New York, Acad Press. 1986. 670 p.
- Demin A.G., Koshel E.I., Kiselev A.M., Saifitdinova A.F., Galkina S.A., Fukagawa T., Kostareva A.A., Gaginskaya E.R. Chicken rRNA gene cluster structure // PLoS One. 2016. doi 10.1371/journal.pone.0157464
- Gaginskaya E., Kulikova T., Krasikova A. Avian lampbrush chromosomes: a powerful tool for exploration of genome expression // Cytogenetic and Genome Research. 2009. V. 124. P. 251–267.
- Greenbaum M.P., Iwamori T., Buchold G.M., Matzuk M.M. Germ cell intercellular bridges // Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2011. 3:a005850. doi 10.1101/cshperspect.a005850
- Greenfield M.L. The oocyte of the domestic chicken shortly after hatching, studied by electron microscopy // Journal of Embryology and Experimental Morphology. 1966. V. 15 № 3. P. 297–316.
- Grummt I. The nucleolus—guardian of cellular homeostasis and genome integrity // Chromosoma. 2013. V. 122. № 6. P. 487–497.
- Koshel E., Galkina S., Saifitdinova A., Demin A., Deryusheva S., Gaginskaya E. Ribosomal RNA gene functioning in avian oogenesis // Cell Tissue Res. 2016. doi 10.1007/s00441-016-2444-4
- Lei L., Spradling A.C. Mouse oocytes differentiate through organelle enrichment from sister cyst germ cells // Science. 2016. V. 352. P. 95–99.
- Loyez M. Recherches sur le developpement ovarien des oeufs meroblastiques a vitellus nutritif abundant // Archs Anat. Microsc. 1906. V. 8. P. 239–397.
- Macgregor H.C., Stebbings H. A massive system of microtubules associated with cytoplasmic movement in telotrophic ovarioles // Journal of Cell Science. 1970. V. 6. P. 431–449.
- Miller M.M., Goto R.M., Taylor R.L., Jr., Zoorob R., Auffray C., Briles R.W., Briles W.E., Bloom S.E. Assignment of Rfp-Y to the chicken major histocompatibility complex/NOR microchromosome and evidence for high-frequency recombination associated with the nucleolar organizer region // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 1996. V. 93. № 9. P. 3958–2962.
- Pederson T. The nucleolus // Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2011. V. 3. № 3. a000638.
- Press N. An unusual organelle in avian ovaries // J. Ultrastructure Research. 1964. V. 10. P. 528–546.
- Raven C.P. Oogenesis: The Storage of Developmental Information. Oxford, Pergamon. 1961. 274 p.
- Schjeide O.A., Galley F., Grellert E.A., I-San Lin R., Vellis J. de, Mead J.F. Macromolecules in oocyte maturation // Biology of Reproduction. 1970. V. 2. P. 14–43.
- Solinhas R., Leroux S., Galkina S., Chazara O., Feve K., Vignoles F., Morisson M., Derjusheva S., Bed'hom B., Vignal A., Fillon V., Pitel F. Integrative mapping analysis of chicken microchromosome 16 organization // BMC Genomics. 2010. V. 11. № 616. doi 10.1186/1471-2164-11-616

Specific Functional Features of the Nucleolar Organizer in Developing Oocytes of Sexually Immature Female Birds

A. G. David'yan*, E. I. Koshel', O. B. Lavrova, A. G. Demin, S. A. Galkina, A. F. Saifitdinova, and E. R. Gaginskaya

St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

*e-mail: asya.davidian@gmail.com

Received September 29, 2016

The genes of ribosomal RNA in the nucleolar organizer region (NOR) are inactivated in the oocytes of sexually mature birds despite the functioning of lampbrush chromosomes, and the nucleolus is not formed during all stages of the oocyte development. On the other hand, two morphological species of oocytes differing by the presence of nucleolus in the germinal vesicle are described in the ovaries of sexually immature birds. The activation and function of the ribosomal genes in avian oogenesis is still vague. In this work, the NOR activation in chicken (*Gallus gallus domesticus*) oocytes is confirmed with the help of fluorescence immunohistochemistry (antibodies to nucleophosmin, fibrillarin, and UBF1) and in situ nucleic acid hybridization (FISH with the probe to *ITS1* in pre-rRNA). It is demonstrated that the nucleolus in the oocytes at the late lampbrush stage in the chicken ovaries is fragmented after complete inactivation of the ribosome genes: the nucleolar fragments contain fibrillarin but do not contain pre-rRNA molecule. The utility of the ovary 3D reconstruction using serial histological sections for quantification of sex cell population heterogeneity in the ovaries of sexually immature birds is demonstrated. The obtained results supplement and improve the current insight into the functional NOR state in the oocytes of sexually immature female birds and contribute to the concept of diversity in the scenarios of gametogenesis.

Keywords: *Gallus gallus domesticus*, oocytes, nucleolus, nucleolar organizer, lampbrush chromosomes