

## ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ЯДРЫШКОВОГО ОРГАНИЗАТОРА В РАСТУЩИХ ООЦИТАХ КУР: РЕВИЗИЯ СУЩЕСТВУЮЩИХ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ

© 2023 г. А. Г. Давидьян<sup>а</sup>, \*, Е. И. Кошель<sup>б</sup>, С. А. Галкина<sup>а</sup>,  
А. Ф. Сайфитдинова<sup>с</sup>, Е. Р. Гагинская<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

<sup>б</sup>Университет ИТМО, Санкт-Петербург, 197101 Россия

<sup>с</sup>Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, 191186 Россия

\*e-mail: a.davidian@spbu.ru

Поступила в редакцию 16.08.2022 г.

После доработки 26.09.2022 г.

Принята к публикации 28.11.2022 г.

В современной литературе утвердилось представление о том, что в яичнике взрослых самок птиц ядрышковый организатор (ЯОР) инактивирован на всех стадиях роста ооцита. Однако на примере яичника цыплят *Gallus g. domesticus*, в половине ооцитов стадии ранней диплотены обнаруживали одно или два ядрышка, которые функционировали вплоть до стадии развитых ламповых щеток. Предполагалось, что диплотенные ооциты с инактивированным ЯОР у цыпленка сохраняются как резерв для развития в яичнике взрослой самки. Такое несоответствие в функциональной активности ЯОР в ооцитах цыпленка и взрослой самки требовало специальных исследований. Здесь мы приводим новые результаты сравнительного анализа ядрышка в ооцитах у цыплят и у половозрелых кур. Мы впервые показываем, что в ооцитах взрослых кур, как и у цыплят, ядрышко появляется на стадии ранней диплотены и синтез пре-рРНК в нем продолжается до стадии ламповых щеток. На стадии ламповых щеток ЯОР инактивируется: ядрышко распадается на крупные фрагменты, содержащие как пре-рРНК, так и фибрилларин, а затем на мелкие гранулы, которые не содержат пре-рРНК, но содержат фибрилларин. Результаты устраняют указанное выше противоречие и демонстрируют сходный алгоритм функционирования ЯОР в ооцитах у половозрелых и неполовозрелых самок птиц.

**Ключевые слова:** курица, ооциты, диплотена, гены рРНК, ядрышковый организатор (ЯОР), ядрышко

DOI: 10.31857/S0475145023010032, EDN: FQIQKI

### ВВЕДЕНИЕ

Оогенез — это особый тип дифференцировки клетки, направленный на формирование зрелой яйцеклетки, которая во время длительного созревания накапливает материнский запас органелл, макромолекул и энергоемких соединений, необходимых для осуществления ранних этапов эмбриогенеза (Дондуа, 2018). В материнские запасы зрелого яйца входит огромное количество рибосом — компонентов белок-синтезирующего аппарата клетки. Важный структурный и функциональный элемент рибосом — это четыре молекулы рибосомных РНК (рРНК), три из которых (18S, 5.8S и 28S рРНК) закодированы в геноме в повторяющихся последовательностях рДНК, формирующих ядрышкообразующий район хромосомы, или ядрышковый организатор (ЯОР). Активация ЯОР приводит к формированию ядрышка.

В кариотипе домашней курицы *Gallus gallus domesticus* единственный ЯОР расположен на микрочромосоме GGA16 (Auer et al., 1987; Miller et al., 1996). В отличие от ближайших родственников — крокодилов и черепах (Davidian et al., 2021), в оогенезе птиц рибосомные гены не амплифицируются, хотя, как и у большинства позвоночных, все хромосомы кариотипа проходят типичную стадию ламповых щеток (ЛЩ) в диплотене профазы мейоза I в период роста ооцита. После того, как метод выделения ЛЩ из ооцитов амфибий (Gall, 1954, 1956; Callan, 1986) был адаптирован для выделения ЛЩ из ооцитов птиц (Ahmad, 1970; Кропотова, Гагинская, 1984; Hutchison, 1987; Solovei et al., 1992, 1993; 1994; Saifitdinova et al., 2017), подавляющее большинство исследований функциональной активности хромосом в растущих ооцитах курицы проводят на ЛЩ, выделен-

ных вручную из ооцитов диаметром от 200 мкм (стадия развитых ЛЩ) до 1.5–2.0 мм. Solinhac et al. (2010) показали, что на стадии ЛЩ в ооцитах курицы ЯОР инактивирован. Это наблюдение согласуется с более ранними результатами гистохимических исследований ооцитов птиц (Гагинская, Грузова, 1969; Гагинская, 1972а, 1972б) и данными, полученными с использованием метода гибридизации *in situ* на парафиновых срезах (Гагинская, Грузова, 1975). Одновременно существовали данные о том, что рРНК поступают в ооцит из фолликулярных клеток в специализированных органеллах – трансосомах (Press, 1964; Bellairs, 1965; Schjeide et al., 1970; Callebaut, 1973). В результате сложилась концепция, которая сводится к тому, что в яичниках взрослых птиц ЯОР в ооцитах инактивирован на всех стадиях оогенеза. Считается, что отсутствие синтеза рРНК в самих ооцитах компенсируют фолликулярные клетки соматического происхождения, которые выполняют функцию трофоцитов, по крайней мере, в снабжении ооцита рРНК (обзоры: Гагинская, 1975; Gaginskaya et al., 2009; Koshel et al., 2016; Красикова, Куликова, 2019). В последние полвека эта концепция поддерживается исследованиями изолированных из ооцитов зародышевых пузырьков (ядро растущего ооцита – ЗП) и ЛЩ (Кропотова, Гагинская, 1984; Hutchison, 1987; Solovei et al., 1992, 1994; Saifitdinova et al., 2003, 2017; Gaginskaya et al., 2009; Krasikova et al., 2012; Красикова, Куликова, 2019).

В известном противоречии с приведенной концепцией находились данные, полученные при исследовании ядер ооцитов в яичниках неполовозрелых самок *G. g. domesticus* (Brambell, 1926; Greenfield, 1966; Callebaut, 1968; Wylie, 1972; Гагинская, Чинь, 1980; Krasikova et al., 2012). Перечисленные авторы определенно описывали ядрышки в ооцитах как ранней диплотенной стадии (до преобразования хромосом в ЛЩ), так и на первых этапах стадии ЛЩ. На стадии ЛЩ ядрышко фрагментируется и полностью исчезает. Но существующие данные о ядрышках в ооцитах цыплят сами по себе были тоже противоречивы. Так, Калэбо (Callebaut, 1968) ссылался на свои отрицательные результаты включения НЗ-тимидина, тогда как Вайли (Wylie, 1972) выявил синтез ДНК в ядрышке и пришел к заключению об амплификации рДНК невысокого уровня в оогенезе курицы. По данным количественного анализа ооцитов на парафиновых срезах ювенильных яичников, только половина ооцитов ранней диплотены обнаруживала одно или два истинных ядрышка, на основании чего была сформулирована гипотеза о существовании в ювенильном яичнике двух морфо-функциональных форм ооцитов ранней диплотенной стадии, которые различаются между собой наличием или отсутствием ядрышка в ядре (Чинь и др., 1979; Гагинская, Чинь, 1980). Согласно этой гипотезе ооциты без ядрышка сохраняются в состо-

янии покоя до наступления половой зрелости самки и составляют тот резерв, за счет которого во взрослом яичнике периодически развиваются зрелые яйцеклетки, ЯОР в них никогда не активируется (обзоры: Гагинская, 1975; Koshel et al., 2016). Судьба содержащих ядрышко ооцитов в яичнике цыпленка вызвала вопросы. Очевидное противоречие между данными о функционировании ЯОР в ооцитах у половозрелых и неполовозрелых самок требовало исследования проблемы с использованием новых подходов (Koshel et al., 2016).

Здесь мы публикуем новые данные о функциональном состоянии ЯОР в ооцитах у половозрелых самок и цыплят *G. g. domesticus*, полученные с использованием флуоресцентной иммуногистохимии для выявления специфичных белков ядрышка и флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) для выявления пре-рРНК транскриптов, а также 3D-реконструкции целого яичника цыпленка в программе Amira-6. Мы обнаружили полное сходство цитологической картины функционирования ЯОР на одних и тех же стадиях оогенеза у цыпленка и взрослой курицы, что снимает трудно объяснимые противоречия в существующих до сих пор представлениях (обзор: Koshel et al., 2016).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

### Объекты исследования

В качестве объекта исследования мы выбрали домашнюю курицу (*Gallus gallus domesticus*) породы русская белая. Всего было взято в анализ пять особей цыплят в возрасте десяти дней после вылупления и пять половозрелых особей кур. Животных получали в Центре коллективного пользования “Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур” Всероссийского научно-исследовательского института генетики и разведения с/х животных (г. Пушкин, Ленинградская обл.). Умерщвление животных проводили в соответствии с этическими требованиями государственного и международного уровня (National Research Council, 2011), что подтверждено заключением Этической комиссии СПбГУ № 131-03-3 от 01.06.2017.

### Парафиновые срезы яичников

Яичники ювенильных цыплят фиксировали смесью метилового спирта и уксусной кислоты (3 : 1), проводили через раствор целлоидина с касторовым маслом (1 : 1) и заливали в парафин. Серийные срезы толщиной 10 мкм получали на санном Leica SM-2010R (Leica, Германия) или ротационном микротоме Leica RM-2235 с Cool-Clamp (Leica, Германия). Срезы яичника окрашивали гематоксилин–эозином или метиловым зеленым–пиронином (Ромейс, 1954). Мы не обнаружили принципиальной разницы между этими способами окраски для выявления ядрышка.

### Замороженные срезы яичников

Фрагменты яичников *G. g. domesticus* фиксировали в растворе 4% параформальдегида в PBS в течение ночи. После фиксации ткань промывали PBS и пропитывали 30% сахарозой в течение ночи при 4°C. Фрагменты яичников помещали в формочки из фольги со специальной средой Surgipath® FSC 22® Frozen Section Embedding Medium (Leica Biosystems, США), замораживали в парах жидкого азота и хранили при -80°C. Криосрезы толщиной 10 или 20 мкм, сделанные с помощью криотома Leica CM1850UV (Leica Biosystems, США), помещали на предметные стекла Superfrost Plus (Thermo Fisher Scientific, Германия). Перед использованием криосрезы сушили минимум 2 ч при комнатной температуре.

### Иммунофлуоресцентное окрашивание

Иммунофлуоресцентное окрашивание применяли к криосрезам яичников. Предобработку препаратов и процедуру непрямого иммуноокрашивания проводили, как описано в работе Давидьян и др. (Davidian et al., 2017). В работе использованы следующие первичные антитела: против фибрилларина (ab4566, Abcam, Великобритания, разведение 1 : 500), против нуклеолина (ab22758, Abcam, Великобритания, разведение 1 : 1000), и поликлональная сыворотка R288 против р80 коилина (Andrade et al., 1991, разведение 1 : 2000). Криосрезы яичников инкубировали с первичными антителами в течение ночи при 4°C и с соответствующими вторичными антителами в течение 1 часа при 37°C. Все антитела разводили в PBS с 5% лошадиной сывороткой Gibco® (Thermo Fisher Scientific, США). Препараты контрастировали 1 мкг/мл DAPI в растворе PBS с глицерином и фотопротектором DABCO.

### FISH на криосрезях

Для выявления активных ядрышек в ооцитах кур был применен метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) в соответствии с протоколом РНК-FISH. Целью была детекция транскриптов спейсерных районов кластеров рибосомных генов в рДНК ЯОР, что позволяет маркировать синтезированные последовательности пре-рРНК в составе ядрышек. Гибридизационный зонд, комплементарный фрагменту 134 п.н. внутреннего спейсера ITS1 рибосомных генов курицы, был разработан на базе ранее расшифрованной последовательности кластера генов рРНК этого вида (Duomin et al., 2016). Синтез зонда осуществляли методом ПЦР с предварительно подобранными праймерами F-5'CAGCCTTCCCTTCCCTTCC, R-5'CCCTCGTCTCCCTTCTCTCT (ООО "Билль", Россия) в амплификаторе MJ Mini (BioRad, США), в качестве матрицы использовали геном-

ную ДНК домашней курицы породы русская белая. ПЦР-продукт метили дигоксигенином.

РНК-FISH проводили на свежих криосрезях яичников. Предобработка срезов включала в себя: пермеабиллизацию мембран клеток 0.1% раствором Тритона X100 в течение 20 мин при комнатной температуре, отмывку детергента в PBS, обработку раствором протеиназы К (4 мкг/мл) в течение 15 мин при 4°C. Для ингибирования фермента препараты фиксировали 2% PFA в течение 5 мин при комнатной температуре и затем промывали в PBS. После дегидратации препаратов в растворах этанола (50%–70%–96%) наносили предварительно денатурированную гибридизационную смесь (состав гибридизационной смеси в 2× SSC: 50 нг/мкл зонда, 50% формамида, 10% DSS, 0.5 мкг/мкл тРНК) и инкубировали в течение ночи при 37°C. Несвязавшийся зонд отмывали в 0.2× SSC при 60°C, затем в 2× SSC при 60°C и в 4× SSC с 0.1% Tween-20 при комнатной температуре. Для уменьшения неспецифического связывания антител препараты инкубировали в 5% растворе лошадиной сыворотки Gibco® (Thermo Fisher Scientific, США) в 4× SSC буфере с 0.1% Tween-20 в течение 1 ч при 37°C. Для детекции зонда, меченного дигоксигенином, использовали антитела, конъюгированные с Cy3 (Jackson ImmunoResearch, США), в разведении 1 : 400 в течение 1 часа при 37°C с последующими отмывками в 4× SSC буфере с 0.1% Tween-20 и 2× SSC. Препараты контрастировали DAPI, растворенном в 2× SSC, с добавленным глицерином и DABCO.

### 3D-анализ яичника цыпленка

Для оценки соотношения в яичнике ооцитов, содержащих и не содержащих ядрышки, был применен метод 3D-анализа биологических объектов с помощью программного обеспечения Amiga-6 (FEI Company, США). 3D-реконструкцию осуществляли на основе фотографий серии парафиновых срезов (в количестве 130 штук) яичника цыпленка десятидневного возраста. Микрофотографии получали с использованием эпифлуоресцентного микроскопа Carl Zeiss Axio Imager M1 (ZEISS, Германия), оборудованного моторизованной станиной и цифровой камерой AxioCam MRc5. Панорамные изображения срезов при увеличении объектива ×10 получали с использованием программного модуля MozaiX, а изображения по глубине среза – при помощи модуля "Z-stack". Панорамные фотографии собирали в стек в программе Amiga-6, где осуществляли прорисовку контура яичника. С целью более детального анализа структур ядра проводили Z-сканирование каждого ооцита с использованием объектива ×63, учитывая ядра, только полностью попадающие на 10 мкм срез. Проанализировано 284 ооцита ранней диплотенной стадии из кортекса передней и задней

части яичника, отдельно просчитаны ооциты, содержащие и не содержащие ядрышко. Достоверность результата оценивали по схеме эксперимента Бернулли с использованием функции языка R (*binom.test* и *prop.test*).

#### *Микроскопия и работа с изображениями*

Препараты исследовали с помощью эпифлуоресцентных микроскопов Carl Zeiss Axio Imager M1 (ZEISS, Германия), DMRXA и DM4000B (Leica Microsystems, Германия) с соответствующими программными обеспечениями. Окончательное оформление всех рисунков проводили с использованием программного обеспечения Adobe Photoshop.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проверка гипотезы о дифференциальной экспрессии генов рРНК в ооцитах внутри одного яичника у неполовозрелых особей при полной их инактивации в ооцитах половозрелых кур была выполнена с применением методов иммуноокрашивания, FISH, компьютерного 3D-анализа парафиновых срезов целых яичников и эпифлуоресцентной микроскопии. Мы исследовали содержимое ядер в ооцитах десятидневных цыплят и взрослых кур на последовательных стадиях роста ооцитов, включающих стадию ранней диплотены (диаметр ооцита 16–60 мкм), переходную стадию к ЛЩ (диаметр ооцита 60–120 мкм), а также стадию ЛЩ (диаметр ооцита 120–1500 мкм).

#### *Функционирование ЯОР в ооцитах цыпленка*

Мы описываем яичник недавно вылупившегося цыпленка на основе 3D-реконструкции в программе Amiga-6 и молекулярно-цитологического анализа присутствия рРНК в ранних диплотенных ооцитах (рис. 1). Проведен анализ мейоцитов в разных зонах яичника десятидневного цыпленка (рис. 1а, 1б). Результаты согласуются с ранее опубликованными данными (Hughes, 1963; Чинь и др., 1979; Guraya, 1989; Bernardo et al., 2015; Davidian et al., 2017) о том, что в ядрах ооцитов на зиготенной и пахитенной стадиях ядрышко отсутствует (рис. 1в), одно или два ядрышка можно наблюдать в ооцитах ранней диплотенной стадии профазы мейоза I (рис. 1г). В последних мы выявляли ядрышко на парафиновых срезах, окрашенных неспецифическими красителями (рис. 1г'), на криосрезах с помощью РНК-FISH с зондом ITS1 для выявления пре-рРНК (рис. 1г''), а также с помощью иммуногистохимии с антителами против фибрилларина и нуклеолина (рис. 1г'''). 3D-реконструкция яичника по серийным срезам (рис. 1д) демонстрирует передне-задний и спин-

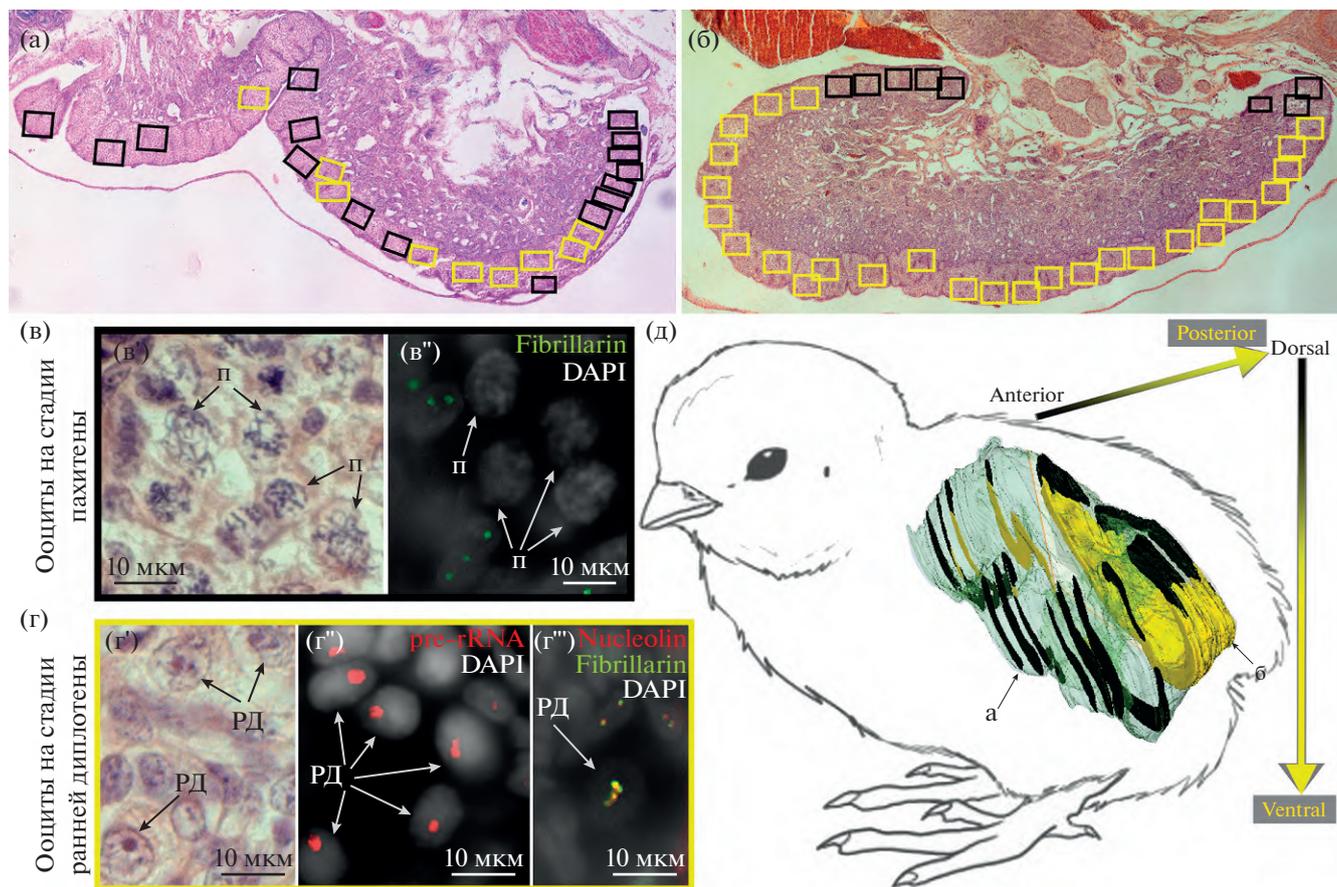
но-брюшной градиенты созревания ооцитов в яичнике цыпленка.

Для оценки доли ооцитов, содержащих ядрышко, мы исследовали полноразмерные ядра в 284-х ооцитах стадии ранней диплотены из разных участков яичника на парафиновых срезах, окрашенных гематоксилин-эозином или метиловым зеленым-пиронином. По нашим данным,  $85.5 \pm 4.2\%$  диплотенных ооцитов содержали в ядре одно, реже два, ядрышка. Мы предполагаем, что остальные ооциты без ядрышка ( $14.5 \pm 4.2\%$ ) находятся в самом начале диплотены, рибосомные гены в них активируются, но полноценное ядрышко еще не успело сформироваться. Мы не исключаем, что начальные этапы формирования ядрышка были незаметны на морфологических препаратах и могли остаться неучтенными.

Наши результаты существенно отличаются от ранее опубликованных Чинем и соавторами (Чинь и др., 1979; Гагинская, Чинь, 1980), согласно которым у цыпленка ядрышко обнаруживали только в 50% ооцитов ранней диплотенной стадии. Расхождения результатов ( $86\%$  vs  $50\%$ ) мы объясняем разницей в методике анализа. Указанные авторы анализировали гистологические срезы толщиной 2–4 мкм. В то же время в ранних диплотенных ооцитах ядра имеют диаметр порядка 10 мкм при ядрышке около 2 мкм, что могло сказаться на ошибке подсчетов. Мы изготавливали гистологические срезы толщиной 10 мкм и использовали автоматизированный микроскоп с программным модулем “Z-stack”, позволяющим выбирать для анализа только целые ядра по глубине среза (рис. 1в, 1г). Таким образом проведенный нами анализ ставит под сомнение сложившееся ранее представление об активации ЯОР только в 50% ооцитов яичника цыпленка (обзор: Koshel et al., 2016).

#### *Функционирование ЯОР в ооцитах половозрелой курицы*

В яичнике взрослой птицы все ооциты находятся на диплотенной стадии профазы мейоза I (Brambell, 1926; Gilbert, 1966; Guraya, 1989). В процессе роста они последовательно переходят от ранней диплотены через стадию транскрипционно активных ламповых щеток, соответствующую периоду цитоплазматического роста ооцита, к стадии конденсации и инактивации хромосом в период вителлогенеза (Кольцов, 1938; Гагинская, 1972а, 1972б; Guraya, 1989; Callebaut et al., 1997). Достоверные описания ядрышек в ооцитах половозрелых птиц нам неизвестны. Например, описанные Луайе (Loyez, 1906) ядрышки в ооцитах зяблика на поверку оказались центромерными белковыми телами (Гагинская, Грузова, 1969, 1975; Гагинская, 1972б, 1975; Saifitdinova et al., 2003; Krasikova et al., 2004), а определенные Т. Горбик (Горбик,

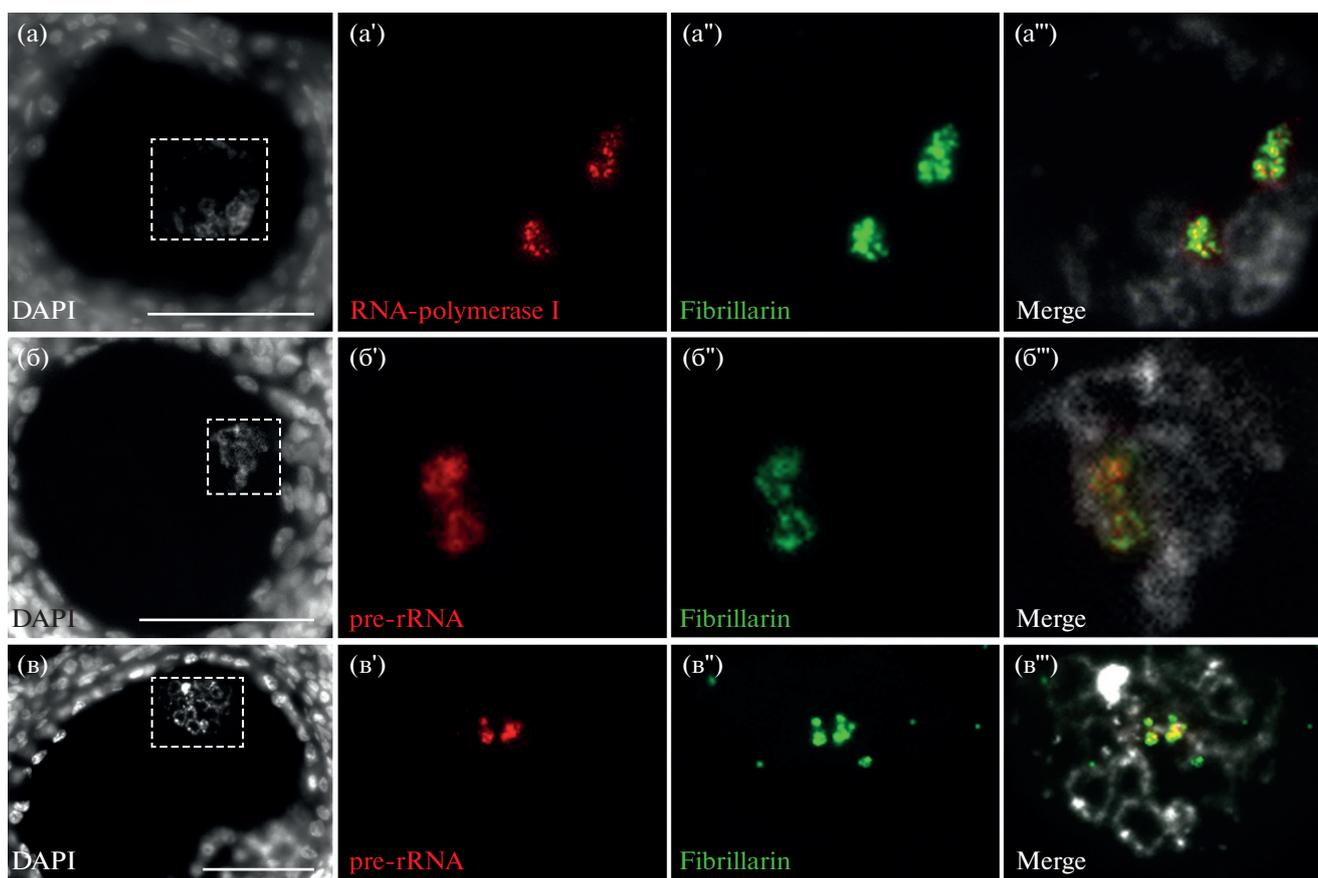


**Рис. 1.** Распределение ооцитов зиготенной/пахитенной и ранней диплотенной стадий мейоза в яичнике десятидневного цыпленка по данным анализа серийных срезов и 3D-реконструкции в программе Amira-6. (а, б) Фрагменты поперечных срезов передней (а) и задней (б) частей яичника: прямоугольники очерчивают зоны подсчета мейоцитов в кортексе, черные – преобладание ооцитов на зиготенной/пахитенной стадии, желтые – преобладание ооцитов на ранней диплотенной стадии, увеличение объектива  $\times 10$ . (в) Участок кортекса из передней части яичника, преобладание ооцитов на пахитенной (П) стадии мейоза I, увеличение объектива  $\times 63$ : (в') парафиновый срез, окраска гематоксилин-эозин, (в'') криосрез, иммунофлуоресценция антител против фибрилларина (зеленый), DAPI (серый). (г) Участок кортекса из задней части яичника, преобладание ооцитов на ранней диплотенной (РД) стадии мейоза I, увеличение объектива  $\times 63$ : (г') парафиновый срез, окраска гематоксилин-эозин, (г'') криосрез, РНК-FISH с зондом ITS1 (красный), DAPI (серый), (г''') криосрез, иммунофлуоресценция антител против фибрилларина (зеленый), нуклеолина (красный), DAPI (серый). (д) 3D-реконструкция целого яичника, передне-задний и спинно-брюшной градиенты созревания мейоцитов в кортексе: светло-зеленый цвет – весь яичник в полупрозрачном режиме, черный цвет – зоны кортекса с преобладанием ооцитов на стадиях зиготены/пахитены, желтый цвет – зоны кортекса с преобладанием ооцитов на стадии ранней диплотены; черные стрелки – срезы, представленные на (а) и (б).

1977) клетки с ядрышками в яичнике скворца как ранние диплотенные ооциты, судя по всему, были клетками нервного ганглия. В целом, в литературе утвердилось представление о том, что у взрослых птиц ЯОР полностью инактивирован в ооцитах всех размеров и стадий (Гагинская, Грузова, 1969, 1975; Гагинская, 1972а, 1972б; Кропотова, Гагинская, 1984; Hutchison, 1987; Guraya, 1989; Saifitdinova et al., 2003; Solinhac et al., 2010; Khodyuchenko et al., 2012; Krasikova et al., 2012; обзоры: Гагинская, 1975; Gaginskaya et al., 2009; Koshel et al., 2016; Боголюбов, 2019; Красикова, Куликова, 2019). В настоящей работе мы впервые показываем, что, как и в яичнике цыпленка, в яичнике взрослой курицы ооциты в ранней ди-

плотене ( $\sim 50$  мкм) и в переходной стадии к ЛЩ ( $\sim 60$ – $120$  мкм) содержат в ядре одно или два функционирующих ядрышка (рис. 2, 3). С использованием соответствующих антител в этих ядрышках мы выявили РНК-полимеразу I (рис. 2а') и фибрилларин (рис. 2а'', 2б''), в опытах по РНК-FISH с зондом ITS1 в них обнаружены также непротранскрибированные рРНК (рис. 2б'), что свидетельствует о транскрипционной активности генов рРНК в этот период развития ооцита.

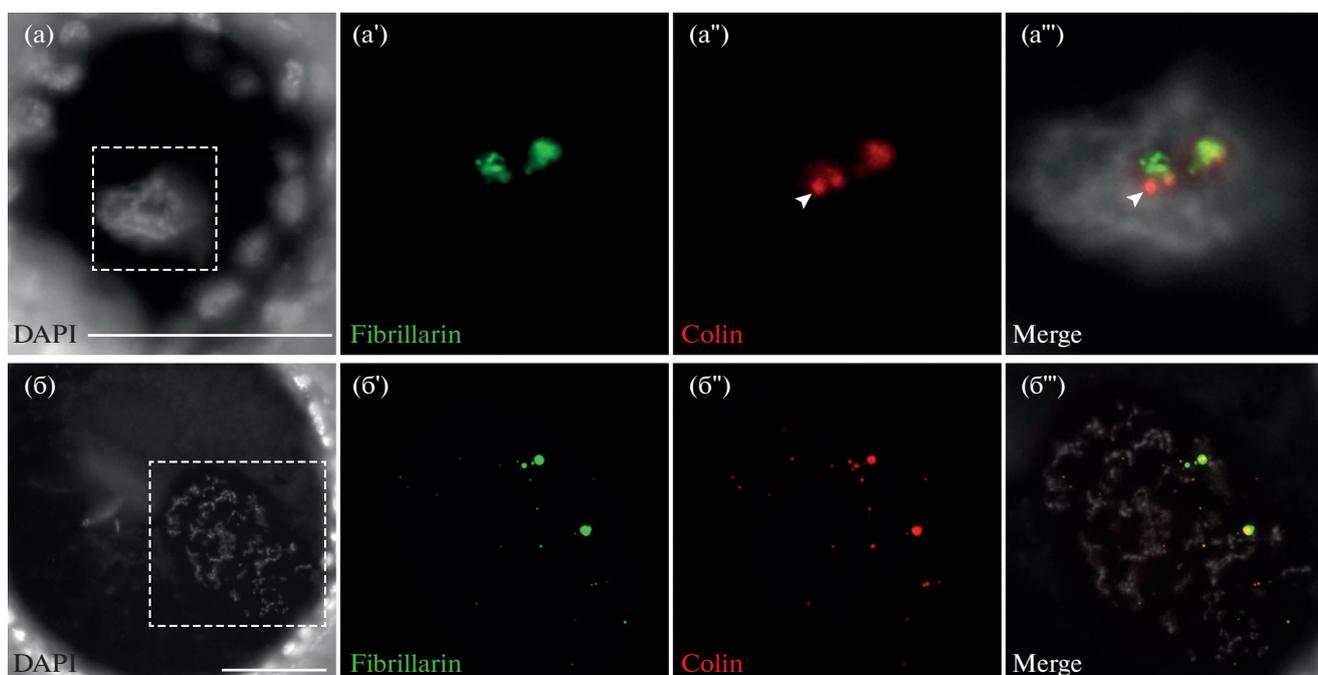
По нашим наблюдениям, ЯОР у взрослых кур инактивируется в ооцитах уже на ранней-средней стадии ЛЩ, когда вместо ядрышка в ЗП можно видеть немногочисленные его фрагменты, содержащие фибрилларин и молекулы пре-



**Рис. 2.** Ядрышко в ооцитах на стадии, переходной к ЛЩ, (а–б) и начало распада ядрышка на стадии ЛЩ (в) в яичнике половозрелой курицы. (а–а'') Двойное иммуноокрашивание с помощью антител к РНК-полимеразе I (а') и фибрилларину (а''). (б–б'') и (в–в'') РНК-FISH с зондом ITS1 (б', в') с последующим окрашиванием антителами к фибрилларину (б'', в''). На картинах совмещения (Merge) добавлен канал DAPI (серый). Криосрезы, эпифлуоресцентная микроскопия. Масштабные линии – 50 микрометров.

рРНК, а также множество мелких гранул, в которых мы выявляли только фибрилларин (рис. 2в''). Наблюдаемая картина идентична описываемой нами в ооцитах соответствующих стадий у неполовозрелых самок (см. также Davidian et al., 2017). В более крупных ооцитах с хорошо развитыми ЛЩ, а также на последующих стадиях инактивации хромосом в период вителлогенеза ядрышки или фрагменты ядрышек в ЗП не выявляются с использованием методов морфологического анализа, иммуногистохимии или РНК-FISH. Деграляция ядрышка, обусловленная инактивацией генов рРНК, происходит в ооците во время периода его цитоплазматического роста и функционирования ЛЩ, предшествующего периоду накопления экзогенного желтка. Точно сопоставить время инактивации рибосомных генов с размерами ооцита затруднительно, поскольку соответствие конкретной стадии роста ооцита его размерам может варьировать от клетки к клетке и от организма к организму (Гагинская, Чинь, 1980; Davidian et al., 2017).

В работе Красиковой с соавторами (Krasikova et al., 2012) выявляли ядрышко и отдельные коилин-содержащие тельца в ооцитах ювенильных самок домашней курицы и перепела, но ни тех, ни других телец не наблюдали в ооцитах половозрелых самок тех же видов. В ЗП ооцитов из яичников взрослых кур мы впервые наблюдали коилин, ассоциированный с ядрышками. На переходной к ЛЩ стадии коилин выявляли как внутри ядрышка, так и в виде скоплений снаружи ядрышка в непосредственном с ним контакте (на рис. 3а''–3а''' наконечник стрелки). В ядрах ооцитов, содержащих развитые ЛЩ и деградирующее ядрышко, коилин был ко-локализован с фибрилларинном во всех фрагментах распадающегося ядрышка (рис. 3б–3б'''). Известно, что локализация коилина около ядрышка в основном бывает вызвана клеточным ответом на стресс, приводящим к выключению транскрипции генов рРНК в соматических клетках (Gilder et al., 2011; Broom, Hebert, 2013; Hebert, 2013; Trinkle-Mulcahy, Sleeman, 2017). Мы допускаем, что коилин может играть



**Рис. 3.** Локализация фибрилларина (зеленая флуоресценция) и коилина р80 (красная флуоресценция) в ооцитах половозрелой курицы. (а–а''') Ооцит на стадии, переходной к стадии ЛЩ; хромосомы слабо деспирализованы, ярко окрашены DAPI (серый). (а'–а''') Два близко лежащих ядрышка, коилин внутри ядрышка и в виде скоплений снаружи ядрышка (наконечник стрелки). (б–б''') Ооцит на стадии ЛЩ; хромосомы сильно деспирализованы, слабо окрашены DAPI, фрагменты ядрышка содержат коилин. На картинах совмещения (Merge) добавлен канал DAPI. Криосрезы, эпифлуоресцентная микроскопия. Масштабные линии – 50 микрометров.

роль в инактивации ЯОР во время роста ооцита, то есть не в ответ на стресс, а в естественных условиях развития яйцеклетки. Сходство естественных процессов в ядре растущего ооцита с результатами опытов на культуре клеток, подвергшихся стрессу, заслуживает дополнительного изучения.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В свете полученных в настоящей работе данных мы считаем необходимым пересмотреть существующие представления о функционировании ЯОР в ооцитах домашней курицы *G. g. domesticus* и, по-видимому, вообще представителей класса Aves. Ядрышко присутствует во всех ооцитах на стадии ранней диплотены и сохраняется функционально активным вплоть до стадии ЛЩ, после чего оно деградирует и полностью исчезает задолго до начала вителлогенеза в ооците. По всей видимости, функциональная роль ядрышка в оогенезе птиц определяется потребностями ооцита в период цитоплазматического роста. В период вителлогенеза ядрышко в растущем ооците никогда не выявлялось. Существуют свидетельства того, что инактивация генов рРНК в ядре ооцита у птиц компенсируется активностью клеток фолликулярного эпителия (Press, 1964; Schjeide et al., 1970; Callebaut, 1973). Важно подчеркнуть, что согласно совре-

менным работам по анализу функциональной морфологии ядерных структур в оогенезе птиц, феномен амплификации рибосомных генов для оогенеза птиц не характерен (Gaginskaya et al., 2009; Koshel et al., 2016; Красикова, Куликова, 2019). Таким образом, между диплотенными ооцитами в яичниках неполовозрелых и взрослых самок нет различий по функциональному состоянию ЯОР на одинаковых стадиях оогенеза.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящее исследование посвящается 100-летию создания профессором П.П. Ивановым кабинета эмбриологии – предшественника кафедры эмбриологии Санкт-Петербургского государственного университета. Авторы благодарны Александру Демину и ООО “Бигль” за разработку и синтез праймеров. В работе использовано оборудование Научного парка СПбГУ (ЦКП “Хромас”).

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 22-24-00538.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Манипуляции с животными проводили в соответствии с этическими требованиями государственного и международного уровня, изложенными в Руководстве по уходу и использованию лабораторных животных (National Research Council, 2011), что подтверждено заключением Этической комиссии СПбГУ № 131-03-3 от 01.06.2017.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Определение задачи – ЕРГ; выполнение экспериментов – АГД, ЕИК, САГ, АФС; написание текста статьи – АГД, ЕРГ; редактирование текста статьи – ЕРГ, АГД, САГ; подготовка иллюстраций – АГД. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Боголюбов Д.С. Безмембранные органеллы эукариотической клетки: основные понятия и принципы формирования // Цитология. 2019. Т. 61. № 9. С. 683–703.

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. Ядерные структуры в ооцитах половозрелых птиц. II. Белковые тела и кариосфера // Цитология. 1972б. Т. 14. № 5. С. 568–577.

Гагинская Е.Р. О классификации типов оогенеза // Онтогенез. 1975. Т. 6. № 6. С. 539–545.

Гагинская Е.Р., Грузова М.Н. Особенности оогенеза зяблика // Цитология. 1969. Т. 9. № 10. С. 1241–1251.

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., Чинь С.Х. Особенности оогенеза цыпленка. II. Фолликулярный период в развитии ооцитов // Онтогенез. 1980. Т. 11. С. 213–221.

Горбик Т.А. О морфодинамике яйцевых фолликулов в оогенезе некоторых диких птиц // Вестник Ленинградского университета. 1977. № 3. С. 7–13.

Дондуа А. К. Биология развития. СПб: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2018. 812 с.

Кольцов Н.К. Структура хромосом и обмен веществ в них // Биологический журнал. 1938. Т. 7. № 1. С. 3–46.

Красикова А.В., Куликова Т.В. Хромосомы типа ламповых щеток: современные представления и перспективы исследований // СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2019. 104 с.

Кропотова Е.В., Гагинская Е.Р. Хромосомы типа ламповых щеток из ооцитов японского перепела. Данные световой и электронной микроскопии // Цитология. 1984. Т. 26. С. 1006–1015.

Ромейс Б. Микроскопическая техника. Москва: Изд-во иностранной литературы, 1954. 718 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.

Ahmad M.S. Development, structure and composition of lampbrush chromosomes in domestic fowl // Can. J. Genet. Cytol. 1970. V. 12. № 4. P. 728–737.

Andrade L.E., Chan E.K., Raska I. et al. Human autoantibody to a novel protein of the nuclear coiled body: Immunological characterization and cDNA cloning of p80-coilin // J. Exp. Med. 1991. V. 173. P. 1407–1419.

Auer H., Mayr B., Lambrou M. et al. An extended chicken karyotype, including the NOR chromosome // Cytogenetics and Cell Genetics. 1987. V. 45. P. 218–221.

Bellaïrs R. The relationship between oocyte and follicle in the hen's ovary as shown by electron microscope // J. Embryol. Exp. Morphol. 1965. V. 13. P. 215–233.

Brambell F.W.R. The oogenesis of the fowl (*Gallus bankiva*) // Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. 1926. V. 214. P. 113–151.

Broome H.J., Hebert M.D. Coilin displays differential affinity for specific RNAs *in vivo* and is linked to telomerase RNA biogenesis // J. Mol. Biol. 2013. V. 425. № 4. P. 713–724.

Callan H.G. Lampbrush Chromosomes. Heidelberg: Springer, 1986. 254 p.

Callebaut M. [H3] Uridine incorporation during previtellogenesis and early vitellogenesis in the oocytes of the chick (*Gallus gallus*) // J. Embryol. Exp. Morphol. 1968. V. 20. P. 169–174.

Callebaut M. Correlation between germinal vesicle and oocyte development in the adult Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). A cytochemical and autoradiographic study // Development. 1973. V. 29. P. 145–157.

Callebaut M., Van Nassauw L., Harrison F. Comparison between oogenesis and related ovarian structures in a reptile, *Pseudemys scripta elegans* (turtle) and in a bird *Coturnix coturnix japonica* (quail) // Reprod. Nutr. Dev. 1997. V. 37. № 3. P. 233–252.

Davidian A.G., Koshel E.I., Lavrova O.B. et al. Functional features of the nucleolar organizer in developing oocytes of juvenile birds // Russ. J. Dev. Biol. 2017. V. 48. № 3. P. 224–230.

Davidian A., Koshel E., Dyomin A. et al. On some structural and evolutionary aspects of rDNA amplification in oogenesis of *Trachemys scripta* turtles // Cell Tissue Res. 2021. V. 383. № 2. P. 853–864.

Dyomin A.G., Koshel E.I., Kiselev A.M. et al. Chicken rRNA gene cluster structure // PLoS One. 2016. V. 11. e0157464.

Gaginskaya E., Kulikova T., Krasikova A. Avian lampbrush chromosomes: a powerful tool for exploration of genome expression // Cytogenet. Genome Res. 2009. V. 124. № 3–4. P. 251–267.

Gall J.G. Lampbrush chromosomes from oocyte nuclei of the newt // J. Morphol. 1954. V. 94. P. 283–352.

Gall J.G. On the submicroscopic structure of chromosomes // Brookhctven Syrup. Biol. 1956. № 8. P. 17–36.

Gilbert S.F. Formation of the egg in the domestic chicken // Adv. Reprod. Physiol. 1966. V. 2. P. 111–180.

Gilder A.S., Do P.M., Carrero Z.I. et al. Coilin participates in the suppression of RNA polymerase I in response to cisplatin-induced DNA damage // Mol. Biol. Cell. 2011. V. 22. № 7. P. 1070–1079.

- Greenfield M.L.* The oocyte of the domestic chicken shortly after hatching, studied by electron microscopy // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1966. V. 15. P. 297–316.
- Guraya S.S.* Ovarian Follicles in Reptiles and Birds. Berlin: Springer-Verlag, 1989. 285 p.
- Hebert M.D.* Signals controlling Cajal body assembly and function // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2013. V. 45. № 7. P. 1314–1317.
- Hughes G.C.* The population of germ cells in the developing female chick // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1963. V. 11. P. 513–536.
- Hutchison N.* Lampbrush chromosomes of the chicken, *Gallus domesticus* // *J. Cell Biol.* 1987. V. 105. № 4. P. 1493–1500.
- Khodyuchenko T., Gaginskaya E., Krasikova A.* Non-canonical Cajal bodies form in the nucleus of late stage avian oocytes lacking functional nucleolus // *Histoschem. Cell Biol.* 2012. V. 138. P. 57–73.
- Koshel E., Galkina S., Saifitdinova A. et al.* Ribosomal RNA gene functioning in avian oogenesis // *Cell Tissue Res.* 2016. V. 366. P. 533–542.
- Krasikova A., Kulikova T., Saifitdinova A. et al.* Centromeric protein bodies on avian lampbrush chromosomes contain a protein detectable with antibody against DNA topoisomerase II // *Chromosoma.* 2004. V. 113. P. 316–323.
- Krasikova A., Kulikova T., Saifitdinova A. et al.* Three-dimensional organisation of RNA-processing machinery in avian growing oocyte nucleus // *Chromosome Res.* 2012. V. 20. № 8. P. 979–994.
- Loyez M.* Recherches sur le developpement ovarien des oeufs meroblastiques a vitellus nutritive abondant // *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exper.* 1906. V. 8. P. 69–397.
- Miller M.M., Goto R.M., Taylor R.L.J. et al.* Assignment of Rfp-Y to the chicken major histocompatibility complex/NOR microchromosome and evidence for high-frequency recombination associated with the nucleolar organizer region // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 3958–3962.
- National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th ed. Washington, (DC): The National Academies Press, 2011. 220 p.
- Ochs R.L., Stein T.W., Tan E.M.* Coiled bodies in the nucleolus of breast cancer cells // *J. Cell Sci.* 1994. V. 107. P. 385–399.
- Press N.* An unusual organelle in avian ovaries // *J. Ultrastruct. Res.* 1964. V. 10. P. 528–546.
- Saifitdinova A., Derjushcheva S., Krasikova A. et al.* Lampbrush chromosomes of the chaffinch (*Fringilla coelebs* L.) // *Chromosome Res.* 2003. V. 11. P. 99–113.
- Saifitdinova A., Galkina S., Volodkina V. et al.* Preparation of lampbrush chromosomes dissected from avian and reptilian growing oocytes // *Bio. Comm.* 2017. V. 62. № 3. P. 165–168.
- Schjeide O.A., Galey F., Grellert E.A. et al.* Macromolecules in oocyte maturation // *Biol. Reprod.* 1970. V. 2. P. 14–43.
- Solinhaç R., Leroux S., Galkina S. et al.* Integrative mapping analysis of chicken microchromosome 16 organization // *BMC Genomics.* 2010. V. 11. P. 616.
- Solovei I., Gaginskaya E., Allen T. et al.* A novel structure associated with a lampbrush chromosome in the chicken *Gallus domesticus* // *J. Cell Sci.* 1992. V. 101. P. 759–772.
- Solovei I., Gaginskaya E., Hutchison N. et al.* Avian sex chromosomes in the lampbrush form: the ZW lampbrush bivalent from six species of bird // *Chromosome Res.* 1993. V. 1. P. 153–166.
- Solovei I., Gaginskaya E.R., Macgregor H.C.* The arrangement and transcription of telomere DNA sequences at the ends of lampbrush chromosomes of birds // *Chromosome Res.* 1994. V. 2. № 6. P. 460–470.
- Trinkle-Mulcahy L., Sleeman J.E.* The Cajal body and the nucleolus: “In a relationship” or “It’s complicated”? // *RNA Biol.* 2017. V. 14. № 6. P. 739–751.
- Wylie C.C.* Nuclear morphology and nucleolar DNA synthesis during meiotic prophase in oocytes of the chick (*Gallus domesticus*) // *Cell Differ.* 1972. V. 1. № 5. P. 325–334.

## Nucleolus Organizer Region Functioning in Chicken Growing Oocytes: A Revision of the Existing Views

A. G. Davidian<sup>1,\*</sup>, E. I. Koshel<sup>2</sup>, S. A. Galkina<sup>1</sup>, A. F. Saifitdinova<sup>3</sup>, and E. R. Gaginskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*St Petersburg University, St. Petersburg, 199034 Russia*

<sup>2</sup>*ITMO University, St. Petersburg, 197101 Russia*

<sup>3</sup>*Herzen State Pedagogical University of Russia, St. Petersburg, 191186 Russia*

\*e-mail: a.davidian@spbu.ru

It is believed that the nucleolus organizer region (NOR) in the ovary of adult birds is inactivated at all stages of oocyte growth. However, in the ovary of juvenile chicken (*Gallus g. domesticus*) one or two nucleoli were observed in 50% of early diplotene oocytes. These nucleoli were functioning up to the lampbrush stage. It was assumed that diplotene oocytes with inactivated NOR are stored as a pool for development in the ovary of adult hens. Such a contradiction in the NOR functional activity in the oocytes of juvenile and adult hens required special studies. Here we represent new results of a comparative study of the nucleoli in oocytes of juvenile and adult hens. We show for the first time that in the oocytes of laying hens the nucleolus appears at the early diplotene stage and the pre-rRNA synthesis continues up to the lampbrush stage. At the lampbrush stage, the NOR is getting inactivated. The nucleolus disintegrates into large fragments containing both pre-rRNA and fibrillarin. Then these larger fragments break down into small granules that do not contain pre-rRNA but contain fibrillarin. The results resolve the above contradiction and demonstrate a similar pattern of NOR functioning in oocytes of adult and juvenile birds.

**Keywords:** chicken, oocytes, diplotene, rRNA genes, nucleolus organizer region (NOR), nucleolus