Секция «Биология развития»

Исследование функционального состояния митохондрий в ооцитах коров в ходе их пролонгированного культивирования in vitro

Научный руководитель – Сингина Галина Николаевна

Лопухов Александр Викторович

Студент (специалист)

Российский государственный аграрный университет МСХА имени К.А. Тимирязева, Зоотехнии и биологии, Разведения и племенного дела, Москва, Россия

E-mail: vubi_myaso@mail.ru

Качество ооцитов - лимитирующий фактор их использования во вспомогательных репродуктивных технологиях. Одной из причин такого ограничения выступает нарушение функции отдельных органелл, таких как митохондрии. Большинство научных трудов описывает деятельность митохондрий в ходе *in vitro* созревания, однако практически без внимания остается вопрос их функциональной изменчивости после достижения метафазы II второго деления мейоза. Поэтому данная работа была направлена на исследование изменения активности митохондрий в зрелых ооцитах коров. Объектами исследования служили ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК), выделенные из яичников коров не позднее 3 часов после их убоя на мясокомбинате. Отобранные по качеству ОКК (10-25 в группе) созревали *in vitro* в течение 20 часов в среде ТС-199 с добавлением 0,2 mM пирувата натрия, 50 мкг/мл гентамицина, 10 мкг/мл ФСГ, 5 мкг/мл ЛГ и 5% фетальной бычьей сыворотки. В последующем часть зрелых ОКК переносили в среду ТС-199 без гормонов и дополнительно инкубировали в течение 12, 24 и 36 часов. Другую часть ОКК перед пролонгированным культивированием освобождали от окружающих клеток кумулюса. Для определения активности митохондрий в конце каждого временного периода ОКК (предварительно освобожденные от клеток кумулюса) и изолированные ооциты окрашивали *MitoTracker Orange*, фиксировали в 4% параформальдегиде, подвергали процедуре пермеабилизации в 0,5% растворе Тритон Х-100 и окрашивали DAPI (в концентрации 1 мкг/мл), после чего переносили на сухое обезжиренное стекло и заключали в среду Vectashield. Полученные цитологические препараты исследовали с использованием флуоресцентной световой микроскопии Carl Zeiss и программного обеспечения Zen Pro. Эксперименты проводили в 3 независимых повторностях. Данные обрабатывали при помощи программного пакета SigmaStat. Было показано изменение активности митохондрий в ооцитах в процессе их старения *in vitro*. Наблюдалась тенденция к возрастанию данной функциональной характеристики. Наименьший уровень активности митохондрий был обнаружен в ооцитах непосредственно после завершения ими созревания, к 24 ч пролонгированного культивирования активность митохондрий возрастала ($P<0,01$). Кроме того, сравнительный анализ митохондриальной активности изолированных и окруженных кумулюсом ооцитов в процессе пролонгированного культивирования показал, что удаление соматических клеток влияет на активность митохондрий в сторону ее понижения ($P<0,05$). Сделано предположение, что повышение активности митохондрий является признаком ухудшения качества яйцеклеток в процессе их старения *in vitro*. Также было установлено, что клетки кумулюса ускоряют ассоциированные со старением изменения функциональной активности митохондрий в зрелых яйцеклетках коров.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 16-38-00921).