

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА БИОЛОГИЯ

ВЕНЕРА ПАНТАЛЕЕВА НИКОЛОВА

Организация на интермедиерните филаменти
(цитокератини, виментин и ламини)

и промените им по време на овоцитното зреене при
мишка

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертацията за присъждане на образователна и научна степен
„доктор”

Област на висше образование 4. „Природни науки, математика и
информатика”

Професионално направление 4.3. „Биологически науки”

Докторска програма „Ембриология”

Научни ръководители:

Доц. СТЕФКА МЕТОДИЕВА ДЕЛИМИТРЕВА, д.б.

Доц. МАЙЯ ДЯНКОВА МАРКОВА, д.б.

София, 2015

Дисертационният труд съдържа 145 страници и е илюстриран с 39 фигури, от които 2 схеми и 37 микрофотографии. Цитирани са 177 литературни източника, от които 6 са на кирилица.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от разширен катедрен съвет в катедра Биология при Медицинския факултет на Медицинския университет – София.

Докторантът работи като асистент към същата катедра.

Всички експерименти, свързани с дисертационния труд, са проведени в Лабораторията по *in vitro* оплождане и предимплантационна ембриология в Катедрата по биология на Медицинския университет – София. Документирането на резултатите също е извършено в Катедрата с изключение на конфокалното сканиране, което е осъществено в Института по биология и имунология на размножаването към Българската академия на науките.

Материалите по защитата са на разположение в Катедрата по биология на Медицинския факултет при МУ – София и са публикувани в Интернет-страницата на МУ – София.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 06.04.2015г. от 14.00 часа във II аудитория на ПУЦ, МУ – София, съгласно чл. 76 и 77 от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и академични длъжности в Медицински университет – София, и въз основа на Заповед №РК36-142/03.02.2015 на Ректора на МУ – София, пред научно жури в състав:

Председател:

Проф. д-р Анастасия Божилова Пастирова, дмн – вътрешен член

Членове:

Проф. д-р Цветанка Цанкова Маринова, дмн – външен член

Доц. д-р Стефка Методиева Делимитрева, дб – вътрешен член и научен ръководител

Доц. д-р Маргарита Топашка-Анчева, дб – външен член

Доц. д-р Милена Сергеева Мурджева-Андонова, дб – външен член

Резервни членове:

Доц. д-р Майя Дянкова Маркова, дб – вътрешен член и научен ръководител

Доц. д-р Павел Истилиянов Рашев, дб – външен член

Съдържание

Въведение	4
Цел и задачи	6
Материали и методи	7
Резултати	12
Обсъждане	30
Изводи	42
Приноси	44
Публикации и участия в научни форуми	45
Благодарности	46

Списък на използваните съкращения

- ДНаза – дезоксирибонуклеаза
- РНаза – рибонуклеаза
- кат. No. – каталожен номер
- BSA – говежди серумен албумин
- FITC – флуоресцеин-изотиоцианат
- FSH – фоликул-стимулиращ хормон
- GV – зародишно мехурче
- GVBD – разпад на зародишното мехурче
- HEPES – N-2-хидроксиетилпиперазин-N'-2-етансулфонова киселина
- IF – интермедиерни филаменти
- IU – международни единици
- MEM – Есенциална среда на Eagle
- Mr – относителна молекулна маса
- NM-IF – ядрен матрикс и интермедиерни филаменти
- NPC – комплекс на ядрената пора
- PAGE – полиакриламидна гелна електрофореза
- PBS – физиологичен разтвор, буфериран с фосфат
- PMSF – фенилметилсулфонилфлуорид
- SDS – натриев додецилсулфат
- Tris – трис(хидроксиметил)-аминометан
- TRITC –тетраметил-родамин изотиоцианат
- v/v – обемни
- w/v – тегловни в обем

ВЪВЕДЕНИЕ

Интермедиерните филаменти (IF) са нишки с диаметър около 10 nm, влизащи в състава на цитоскелета и изграждащи ядрената ламина. Цитоплазмените IF придават механична здравина на животинските тъкани. Измежду съставните им белтъци най-разпространени са цитокератините и виментинът. Ядрената ламина е изградена от два типа ламини – В и А/С. Тя осигурява опора на ядрената обвивка и допринася за ядрено-цитоплазмения транспорт, защото с нея се свързват комплексите на ядрените пори (NPC), изградени от нуклеопорини. Цитоплазмените и ядрени IF заедно с ядрения матрикс са най-устойчивите компоненти на животинската клетка и са единствените, които се запазват след прилагане на тристепенна химична дисекция, наречена екстракция за ядрен матрикс и интермедиерни филаменти (NM-IF). Интермедиерните филаменти са динамични и търпят преобразувания по време на митозата, както и в хода на клетъчното диференциране. Значимостта им се доказва от факта, че мутации в техните гени водят до влошаване на механичните свойства на клетките и развитие на тежки заболявания.

Докато IF в соматичните тъкани са предмет на множество системни изследвания, данните за IF в овоцити и техни предшественици са оскъдни и противоречиви. Диференцирането на женските гамети е продължителен и сложен процес, протичащ във фоликулите на яйчника в тясно взаимодействие с фоликулните клетки, с които овоцитът образува овоцит-кумулусен комплекс и чиито израстъци преминават през *zona pellucida* и осъществяват контакт с оолемата. След началото на овогенезата мейозата спира в края на профаза I и остава блокирана почти до самата овулация. Този стадий се нарича зародишно мехурче или герминален везикул (GV), защото със същото име по традиция се означава профазното ядро на първичния овоцит. Първата промяна, настъпваща при възобновяване на мейозата, е образуването на кариосфера – сферичен слой от хетерохроматин в периферията на транскрипционно неактивното ядрце. Следва етапът на разпадане на ядрото, означаван като GVBD (*germinal vesicle breakdown*). Овоцитът образува мейотично вретено, навлиза в метафаза I, изгражда актинова шапка под оолемата, отделя първото полярно телце и след това достига до метафаза II – стадий, в който остава блокиран до оплождането.

В кумулусните клетки са открити както цитокератини, така и виментин, но структурната им организация все още не е добре изучена. В овоцитите според някои изследвания IF изобщо липсват, но в последните години повечето изследователи установяват имуноцитохимично техни белтъци, най-вече цитокератини. Различни автори описват положителна реакция за тях в клетъчната периферия или/и в околядрената област. Според най-подробните налични изследвания, проведени върху хамстер, мрежата от кератинови филаменти в хода на овоцитното зреене се усложнява с оглед на поддържане на целостта на клетката след овулацията. Цитокератини са локализирани и в овоцити от земноводни, при които обаче е описан разпад на техните структури към края на зреенето. За виментина има по-малко данни, но изследване върху зиготи показва наличие и роля на този белтък за сближаването на пронуклеусите. Не е системно изследвано прилагането на NM-IF екстракцията към цитоскелетните структури на овоцита.

Преобразуванията на ядрените IF – ламините, по време на овоцитното зреене също са слабо изучени. Според наличните данни в ядрото на стадий GV се съдържат ламини B и A/C, които изграждат добре развита ядрена ламина. Тя обаче се разпада с възобновяването на мейозата и NPC се отделят. На етап GVBD ламин A/C може да образува безформен агрегат близо до хромозомите. На по-късните етапи, т.е. в метафазните овоцити, се съобщава за изчезване на реакцията за ламини B и A/C. При оплождането в пронуклеарната зигота се установява ламина с типичен състав и структура, включваща ламини както от B, така и от A/C тип. Между стадий GVBD и образуването на пронуклеуси в зиготата обаче състоянието на ламините засега е неизвестно. Липсват изследвания и върху нуклеопорините, които са тясно свързани с ламината и изпълняват регулаторни функции по време на клетъчното делене.

В заключение следва да се посочи, че цитоплазмените и ядрени IF са недостатъчно изучени в овоцитите и овоцит-кумулусните комплекси, особено при бозайници. Наличните данни са с предварителен характер и подчертават необходимостта от подробни изследвания върху IF на различните етапи от овоцитното зреене.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ:

Да се изследват чрез имуноцитохимични методи и лазерна сканираща конфокална микроскопия промените в организацията на ядрената ламина и цитоплазмените IF в миши овоцити и овоцит-кумулусни комплекси на различни етапи от зреенето. Чрез успоредни изследвания тези промени да се съпоставят с промените в организацията на микротубулите, микрофиламентите, хроматина и ядрените порови комплекси, за да се разкрият взаимодействията между тези структури в хода на овогенезата.

ЗАДАЧИ:

1. Да се изследва набор от цитокератини и виментин в миши овоцити и овоцит-кумулусни комплекси с различна степен на зрялост чрез имуноцитохимични методи.
2. Да се подложат миши овоцити и овоцит-кумулусни комплекси на екстракция за NM-IF и да се опишат промените в структурата им след химичната дисекция.
3. Да се изследват стадите и степента на колокализация на белтъците на цитоплазмените IF и актина в различни стадии от зреенето на овоцитите.
4. Да се проследят промените на ядрената ламина в хода на зреенето на миши овоцити и връзката им с едромащабните хроматинови промени чрез имуноцитохимични методи.
5. Да се проследи динамиката на промените в количеството и разпределението на компоненти на комплексите на ядрените пори в различните стадии на овоцитното зреене и да се свържат с промените в ламината чрез имуноцитохимични методи.
6. С цел детайлно изследване на имуноцитохимичните резултати да се визуализира флуоресцентната реакция в оптични срези с дебелина 0,5 μm , които да се използват за прецизно описание на триизмерните цитоскелетни структури чрез възможностите на лазерната сканираща конфокална микроскопия.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Опитни животни

Като източник на овоцити бяха използвани предпубертетни девствени женски лабораторни мишки от линия BALB/c, осигурявани от вивариума на МУ – София. Всички експерименти с тях бяха предварително одобрявани от Комисията по етика на научните изследвания към МУ – София.

Реактиви за специфично визуализиране

За откриване на изследваните белтъци бяха използвани следните миши моноклонални антитела:

- анти-пан-цитокератин, IgG1, клон No. PCK-26, моноклонално мише (Sigma-Aldrich), кат. No. C1801; разпознава кератини 1, 5, 6, 8 и хомоложни цитокератини от II тип от различни сухоземни гръбначни;
- анти-виментин, IgM, клон No. VIM-13.2, моноклонално мише (Sigma-Aldrich), кат. No. V5255; разпознава виментин от различни сухоземни гръбначни;
- анти-ламин В2, поликлонално заешко (Sigma-Aldrich), разпознава ламин от различни бозайници;
- анти-ламин А/С, IgG2а, клон No. 4C11, моноклонално мише (Sigma-Aldrich), кат. No. SAB4200236; разпознава ламин А/С от различни бозайници;
- анти-нуклеопорин 160, поликлонално заешко (Sigma-Aldrich), кат. No. SAB4500969; разпознава нуклеопорин 160 от човек и гризачи;
- анти- α -тубулин, IgG1, клон DM1A, моноклонално мише (Sigma-Aldrich), кат. No. T6199; разпознава α -тубулин от широк набор еукариоти;
- анти- α -тубулин, поликлонално заешко (Sigma-Aldrich), кат. No. T3526, разпознава α -тубулин от човек и кокошка;

След прилагане на горните първи антитела реакцията беше визуализирана с помощта на следните втори антитела, конюгирани с флуорохроми:

- поливалентно козе антитяло срещу миши IgG, IgA и IgM, конюгирано с FITC (Sigma-Aldrich), кат. No. F1010;
- F(ab)₂ фрагмент от афинитетно-изолирано козе антитяло срещу миши IgG (Fab-специфично), конюгирано с FITC (Sigma-Aldrich), кат. No. F8521;
- афинитетно-изолирано козе антитяло срещу миши IgG, конюгирано с FITC (Sigma-Aldrich), кат. No. 0257;

– афинитетно-изолирано козе антитяло срещу заешки IgG, конюгирано с FITC (Sigma-Aldrich), кат. No. F0382;

– козе антитяло срещу миши IgG (IgG антисерумна фракция), конюгирано с TRITC (Sigma-Aldrich), кат. № T5393;

– афинитетно-изолирано козе антитяло срещу заешки IgG, конюгирано с TRITC (Sigma-Aldrich), кат. № T 6778;

Фибриларният актин беше специфично визуализиран чрез фалоидин, конюгиран с TRITC (Sigma-Aldrich, кат. No. P1951).

За визуализация на хроматина се използваше флуорохромът Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich), който специфично се свързва с ДНК.

Методи

Получаване на зрели овоцити чрез стимулирана овулация

За да се получат голям брой овоцити, мишките се подлагаха на овариална стимулация с 5-8 IU хормон с фоликуло-стимулиращо действие (Menogon, Ferring) и 48 часа по-късно с 5-8 IU хормон с лутеинизиращо действие (Pregnyl, Organon). Животните бяха евтаназирани 16-18 часа след втората стимулация.

Яйцепроводите бяха отпрепарирани и поставяни в петри с хранителна среда на Leibovitz (Sigma – Aldrich) със следните добавки: 3mg/ml BSA; 2,5mg/ml трансферин; 2,5mg/ml инсулин. Чрез спукване на ампулите на яйцепроводите бяха получавани зрели овоцити и овоцит-кумулусни комплекси.

Дисекция на яйчникови фоликули за получаване на незрели овоцити

За получаване на незрели овоцити и овоцит-кумулусни комплекси бяха използвани яйчниците на мишки, стимулирани или както е описано по-горе, или само с фоликул-стимулиращ хормон – FSH (Serono). Яйчникът се отпрепарираше, отделяше от яйцепровода и се прехвърляше в ембриологично петри със среда на Leibovitz. Фоликулите се пунктираха с инсулинови игли.

Обработка на овоцитите и овоцит-кумулусните комплекси

Всички следващи процедури се извършваха стерилно в ламинарния бокс под стереомикроскоп върху топла масичка при 37°C. Зрелите и незрели овоцити се поемаха с източени на пламък стъклени пастъорки и с тяхна помощ се прехвърляха от един разтвор в друг.

Използваните за микроскопия овоцити бяха за кратко (5-10 min) обработвани в ембриологично петри с 0.5 mg/ml хиалуронидаза при 37°C за

отстраняване на външните слоеве кумулус. Пробите, предназначени за електрофореза, не бяха обработвани с хиалуронидаза.

In vitro зреене на миши овоцити (In vitro maturation)

За *in vitro* зреене мишките се стимулираха само с FSH-препарат и се евтаназираха след 40 часа за вадене на овоцитите.

Хранителната среда за *in vitro* зреене се приготвяше въз основа на среда α MEM (Sigma – Aldrich). Добавяха се следните компоненти: 2,2mg/ml Na бикарбонат, 50 μ g/ml аскорбинова киселина, 10 μ g/ml трансферин, 5 μ g/ml инсулин, 5% фетален телешки серум, 10IU/ml пеницилин/0,01mg/ml стрептомицин. Средата с добавките се филтруваше стерилно през бактериален филтър и към нея се добавяше 0,075 IU/ml FSH. От получената среда с FSH се приготвяха 100 μ l капки и се покриваха с минерално масло в ембриологични петрита.

Добитите овоцити и овоцит-кумулусни комплекси се преместваха в ембриологични петрита в среда α MEM без FSH. В тази среда овоцитите престояваха половин час в CO₂ инкубатор на 37°C. След това бяха премествани в капки α MEM с FSH под парафин за зреене и се оставяха за 24 часа в инкубатора.

На следващия ден яйцеклетките се сортираха на такива с и без кумулусни клетки. Кумулусът се отстраняваше с 0,5mg/ml хиалуронидаза, разтворена в α MEM без FSH. След 3-5 минути кумулусът се отстраняваше механично с пипетиране под микроскопско наблюдение и овоцитите бяха премествани в 96-ямкови стерилни плаки със заоблено дъно (Corning) за клетъчно култивиране.

Рутинна светлинна микроскопия

За рутинно светлинно-микроскопско наблюдение клетките се пренасяха върху чисти предметни стъкла и се фиксираха със студен метанол за 5 min. След това се оцветяваха с 5% Giemsa в PBS (pH 7.0) за 40 min при стайна температура. Изплакваха се с дестилирана вода и се изсушаваха на въздух. Наблюдаваха се и се документираха с микроскоп Axioskop 20 (Zeiss).

Имунофлуоресценция

Овоцитите бяха фиксирани с предварително затоплен до 37°C 2% параформалдехид в PBS (pH 7.2) с 0.02% Triton X-100 за 1 час. Промиваха се двукратно в PBS (pH 7.2) с 0.3% BSA за по 10 min и след това в PBS (pH 7.2) с 0.3% BSA и 0.02% натриев азид. В същия разтвор като при последното промиване се оставяха за нощта при 4°C.

Инкубацията с първото антитяло се провеждаше за 45 min при 37°C. След това се промиваше двукратно с PBS (pH 7.2) с 0.3% BSA и 1 µl/ml Tween-20 за по 10 min при 37°C.

Следваше инкубация с разтвора на второто антитяло, Hoescht 33258 и евентуално (при колокализация с актин) фалоидин-TRITC за 45 min при при 37°C на тъмно. Промиваше се трикратно с PBS с 0.3% BSA and 1 µl/ml Tween-20 за по 10 min при 37°C и още веднъж в същия разтвор за 20-30 min при 37°C. След това се импрегнираше за по 10 min в нарастващи концентрации поливинилов алкохол – съответно 5, 10, 30 и 50% в PBS (pH 7.2) с 0.3% BSA и 0.02% натриев азид при 37°C. Всички описани стъпки се провеждаха върху 96-ямковата плака.

След това овоцитите се пренасяха в капки 100% поливинилов алкохол върху чисто предметно стъкло и се покриваха с покривно стъкло. Съхраняваха се на тъмно при 4°C до наблюдението. Използваше се епифлуоресцентен микроскоп Axioskop 20 (Zeiss).

Лазерна сканираща конфокална микроскопия

Част от пробите след гореописаната методика и епифлуоресцентно наблюдение бяха подложени и на лазерна сканираща конфокална микроскопия. Използваше се микроскоп Axioskop2 mot Plus (Zeiss) с модул за LCM5 Pascal.

Екстракция за NM-IF

Екстракцията се провеждаше в капки на предметни стъкла. Промитите с PBS клетки се екстрахираха за 10 min при 4°C с цитоскелетен буфер: 10 mM HEPES pH 6.8, 100 mM NaCl, 300 mM захароза, 3 mM MgCl₂, 0.5% Triton X-100, 1.2 mM PMSF. След това се поставяха за 10 min при 4°C в екстракционен буфер: 10 mM HEPES pH 6.8, 250 mM (NH₄)₂SO₄, 300 mM захароза, 3 mM MgCl₂, 0.5% Triton X-100, 1.2 mM PMSF. Следваше 20 min престой при стайна температура в смилателен буфер: 10 mM HEPES pH 6.8, 50 mM NaCl, 300 mM захароза, 3 mM MgCl₂, 0.5% Triton X-100, 1.2 mM PMSF, 200 µg/ml ДНаза I (Sigma-Aldrich) и 100 µg/ml РНаза А (Sigma-Aldrich). В него се добавяше (NH₄)₂SO₄ до крайна концентрация 250 mM и се оставяше за още 5 min при стайна температура.

PAGE-електрофореза

Беше използвана SDS-електрофореза в редуциращи условия. Изследваните проби се довеждаха до крайна концентрация от 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 5% 2-меркаптоетанол, 10% глицерол, 0.001% бромфенолово синьо. Разделящият

(separating) гел беше 12%. Апаратът за електрофореза (BioRad) се пълнеше с буфер със състав 25 mM Tris, 192 mM глицин, pH 8.3. Електрофорезата се провеждаше при напрежение 200 V и ток около 40 mA. Като маркери за молекулна маса се използваха SDS7 и SDS-7B (Sigma-Aldrich).

След електрофорезата геловеите бяха оцветявани със сребро. Гелът се фиксираше за не по-малко от 2 h с 50% (v/v) метанол, 10% (v/v) оцетна киселина. Преди самото оцветяване се фиксираше допълнително за 10 min с 50% (v/v) метанол и 0,5 ml/l 37% формалдехид, добавен непосредствено преди работа. След фиксацията гелът се промиваше двукратно за по 5 min с вода. Сенсibiliзираше се за 1 min с 0,02% (w/v) натриев тиосульфат. Изплакваше се двукратно за по 20 sec с вода. След това се оцветяваше за 10 min в 0,1% сребърен нитрат, прясно разреден от 20% изходен разтвор. Изплакваше се с вода и след това с малко количество проявителен разтвор – 3% (w/v) Na₂CO₃, 0,0004% (w/v) натриев тиосульфат и 0,5 ml/l 37% формалдехид, добавен непосредствено преди работа. След това гелът се поставяше в проявителен разтвор за няколко минути до поява на ивиците. Реакцията се спираше с 2,3 M лимонена киселина – 5 ml за 100 ml проявителен разтвор. Работеше се на стайна температура с разклащане.

Начин на финансиране

Използваните реактиви и животни бяха закупени по следните договори:

- „Оценка на яйчниковия ресурс – анализ на плоидността и състоянието на хроматина при овоцити, изолирани от оперативно отстранена яйчникова тъкан”, *договор 40/2007 към МУ – София.*
- „Изследване на хромозомните и цитоскелетни дефекти при овоцити и предимплантационни ембриони като главни причини за ранната ембрионална загуба при бозайниците”, *договор ВУ-Л-311607 към НФНИ – МОН, с участието на Германски приматен център, Гьотинген.*
- „Ядрен матрикс и интермедиерни филаменти (NM-IF) в миши овоцити и кумулусни клетки”, *договор 15/2009 към МУ – София.*
- “Промени в организацията на ядрената ламина и разпределението на ядрените порови комплекси в различни стадии на *in vitro* зрееенето на миши овоцити”, *договор 36/2012 към МУ – София.*
- “Изследване на цитокератиновите и виментиновите интермедиерни филаменти при поликистоза на яйчника (POS)”, *договор 37/2012 към МУ – София.*

РЕЗУЛТАТИ

Изследване на наличието и вътреклетъчното разпределение на набор от цитокератини и виментин в миши овоцити и овоцит-кумулусни комплекси с различна степен на зрялост

Чрез имунофлуоресценция бяха локализирани цитокератини 1, 5, 6 и 8 и виментин. При това беше установено наличие и пълна колокализация на двата типа белтъци на IF, поради което реакцията за тях ще бъде описвана общо.

В овоцитите на стадий GV се наблюдаваше положителна реакция за цитокератини и виментин в два клетъчни компартмента – непосредствено под оолемата и областта на ядрото. На етап ранен GV асоциираната с ядрото реакция беше ограничена в неговата периферия (Фиг. 1). На малко по-късен етап – GV с оформена кариосфера, кондензираният хетерохроматин в нейната периферия също реагираше за белтъците на цитоплазмените IF (Фиг. 2).

GV-овоцитите, които не бяха специално обработени за пълно отстраняване на кумулуса, по правило бяха заобиколени от кумулусни клетки, в които също се откриваха изследваните белтъци на цитоплазмените IF (вж. Фиг. 2).

На стадий метафаза I и метафаза II виментинът и цитокератините отново показаха асоциация с клетъчната периферия, от една страна, и с ядрения материал (хромозомите), от друга. Относителната интензивност на реакцията обаче бе променена, като в кортикалната област беше отслабнала, а в близост до метафазната пластинка беше засилена. Единственият периферен участък с все още интензивна реакция беше шапката. Под нея се наблюдаваше натрупване на IF, свързано със самите хромозоми и около мейотичното вретено, без обаче да се белязват самите нишки (Фиг. 3). Повечето метафазни овоцити при подготовката за микроскопиране бяха останали без кумулус и се наблюдаваха изолирани.

Изследване на миши овоцити и овоцит-кумулусни комплекси след екстракция за ядрен матрикс и интермедиерни филаменти (NM-IF)

За да се оцени цялостната морфология на овоцитите, подложени на екстракция за NM-IF, беше използвана светлинна микроскопия след оцветяване с Гимза. Тя показва твърде различен ефект върху незрелите и зрелите овоцити.

Екстрахираните овоцит-кумулусни комплекси на етап GV бяха загубили голяма част от съдържимото си, запазвайки предимно скелетни структури. Въпреки това общият вид на комплекса, положението на овоцитното ядро, зона

pellucida, кумулусните клетки и техните израстъци през зоната бяха запазени и не се отличаваха съществено от неекстрахираните контроли (Фиг. 4).

При овоцитите в метафаза I и метафаза II екстракцията за NM-IF се отразяваше драстично на видимата структура на клетката. В неекстрахираните контроли цитоплазмата изглеждаше хомогенна, а хромозомите бяха разположени в периферията на клетката (Фиг. 5A). В екстрахираните овоцити структурната организация беше унищожена. Не се забелязваха хромозоми, а останките от цитоплазмата бяха колабирали до безструктурна маса (Фиг. 5B).

Екстрахираните овоцити бяха изследвани и чрез имунофлуоресценция за белтъци на цитоплазмените IF. Бе възприет вариант на екстракцията, при който нуклеазната обработка се пропускаше, което позволи съпоставяне на състоянието на IF с това на хроматина или хромозомите.

В съгласие с морфологичните данни екстрахираните овоцити на стадий GV реагираха идентично с неекстрахираните контроли (Фиг. 6), а в екстрахираните метафазни овоцити се наблюдаваше колапс на кортикалния слой от IF и дисоциирането му от zona pellucida. В някои овоцити този слой все още запазваше контакта си със зоната в отделни точки (Фиг. 7). В други клетки останките от цитоплазмата, реагиращи за виментин и цитокератини, бяха напълно отделени от зоната и колабирали до кълбовидно образуване без видима структура (Фиг. 8).

За характеризиране на промените в белтъчния състав, настъпващи след екстракция за NM-IF, беше използвана SDS-PAGE електрофореза. Бяха изследвани проби от яйчник след пълна екстракция, след второто и след първото стъпало, както и неекстрахираните контроли. Резултатът показва, че след екстракция за NM-IF се съхраняват само малка част от изходните белтъци (Фиг. 9). Най-добре видимите ивици отговаряха на молекулни маси (Mr) 86 000, 84 000, 64 000, 57 000, 38 000 и 27 000, като само тази с Mr 57 000 се виждаше и при контролите.

Изследване на колокализацията на белтъците на цитоплазмените IF и актина в овоцити с различна степен на зрялост

Предвид на положителната реакция за цитоплазмени IF в кортикалната цитоплазма на овоцита и особено в шапката над мейотичното вретено – участъци, известни с добре развития си актинов цитоскелет, бе проведена успоредна локализация на IF, от една страна, и фибриларен актин, от друга. Беше установена значителна, но не пълна колокализация. В кортикалния слой реакцията за двете

групи цитоскелетни компоненти беше идентична, но в областта на ядрото и хромозомите се откриваха разлики. При незрелите овоцити на стадий GV белтъците на цитоплазмените IF показваха много по-силна склонност от актина да се асоциират с герминалния везикул (Фиг. 10). При метафазните овоцити около мейотичното вретено се наблюдаваше светене както за IF, така и за актин, но само IF се асоциираха с хромозомите от метафазната пластинка (Фиг. 11).

Кумулусните клетки също освен за IF бяха положителни и за актин. Разпределението им се припокриваше с тази разлика, че реакцията за IF беше по-силна във вътрешността на клетката, а за актин – в периферията (вж. Фиг. 10).

Изследване на локализацията на ламини В и А/С и връзката им с промените на хроматина в овоцити с различна степен на зрялост

Епифлуоресцентната локализация на ламини В и А/С разкри наличие и на двата типа в овоцитите на етап GV. Точната им локализация обаче показва разлики, свързани с липсата или наличието на кариосфера.

На етап ранен GV реакцията за ламин В беше положителна в ядрената обвивка (Фиг. 12). След оформянето на кариосферата малки количества ламин В също навлизаха в ядрото, без обаче да се наблюдава колокализация с кондензирания хроматин (Фиг. 13). На стадий GVBD ламин В се съсредоточаваше в кариосферата. При това изглеждаше, че светенето обхваща не само хетерохроматина по периферията ѝ, а и нейната вътрешност (Фиг. 14).

По време на метафаза I и метафаза II ламин В колокализираше с тубулиновите нишки на мейотичното вретено (Фиг. 15).

Ламин А/С в овоцитите на етап ранен GV се откриваше в ядрената обвивка идентично с ламин В (Фиг. 16). След оформяне на кариосферата и през GVBD обаче ламин А/С се преместваше от ядрената периферия към кариосферата и се свързваше с хроматина ѝ (Фиг. 17). В метафазните овоцити поведението на ламин А/С отново беше различно от това на ламин В. Той се регистрираше около вретеното в дифузен ярък слой, без да се асоциира с нишките му. В по-малка степен реакция се наблюдаваше и в целия обем на цитоплазмата (Фиг. 18).

Изследване на локализацията на нуклеопорин Nup160 и връзката му с ламините в овоцити с различна степен на зрялост

Във връзка с измененията на ламината при зреенето беше проследено поведението на нуклеопорина Nup160. Установено беше, че при оформянето на

кариосферата тойсе придвижва заедно с ламин А/С към вътрешността на ядрото. При оформена кариосфера той също се разполагаше освен в ядрената периферия и в кариосферния хетерохроматин (Фиг. 19). След прехода към метафаза I обаче колокализацията на Nup160 с ламин А/С се нарушаваше. При метафаза I и метафаза II Nup160 се концентрираше във вретеновите полюси (Фиг. 20, 21), очертавайки кръгове около тях на някои от епифлуоресцентните образи (Фиг. 20).

Прецизиране на имуноцитохимичните изследвания чрез лазерна сканираща конфокална микроскопия

За да се прецизират данните за вътреклетъчното разпределение на изследваните компоненти, част от овоцитите, показали добра епифлуоресцентна реакция, бяха документирани и чрез лазерно конфокално сканиране.

Прецизиране на локализацията на белтъци на цитоплазмените IF (цитокератини и виментин) и фибриларния актин

За овоцит-кумулусните комплекси на етапи GV и GVBD беше потвърдена реакцията за виментин и цитокератини в кортикалната цитоплазма и областта на ядрото при овоцити, както и в свързаните с тях кумулусни клетки (Фиг. 22). Реакцията за IF и актин в тези комплекси очертаваше израстъците на кумулусните клетки, пронизващи zona pellucida. Те често се наблюдаваха дори когато самите кумулусни клетки се бяха откъснали при подготовката за микроскопското наблюдение. В крайната част на израстъците, граничеща с мембраната на овоцита, цитоскелетните компоненти се разширяваха и в напречен срез даваха пръстеновидно светене (Фиг. 23). Нерядко по повърхността на zona pellucida можеха да се наблюдават части от израстъците, останали след откъсването на кумулусната клетка и реагиращи за цитокератини, виментин и актин (Фиг. 24).

При овоцити в метафаза I и метафаза II лазерното конфокално сканиране потвърди колокализацията на цитоплазмените IF и актина в кортикалната цитоплазма и около вретеното, както и асоциацията само на белтъците на IF с мейотичните хромозоми (Фиг. 25, 26). Кортикалната реакция беше отслабена спрямо наблюдаваното в GV и GVBD, с изключение на шапката.

Прецизиране на локализацията на белтъци на ядрените интермедиерни филаменти (ламини), нуклеопорин Nup160 и тубулин

При лазерното конфокално сканиране за ламини B и A/C и нуклеопорин Nup160 в изследването беше включена паралелна визуализация на α -тубулин,

имунофлуоресцентната реакция за тези ядрени белтъци също беше регистрирана и чрез лазерно конфокално сканиране. Доколкото за ламин В и Nup160 епифлуоресценцията бе показала асоциация с мейотичното вретено, в конфокалното изследване н.

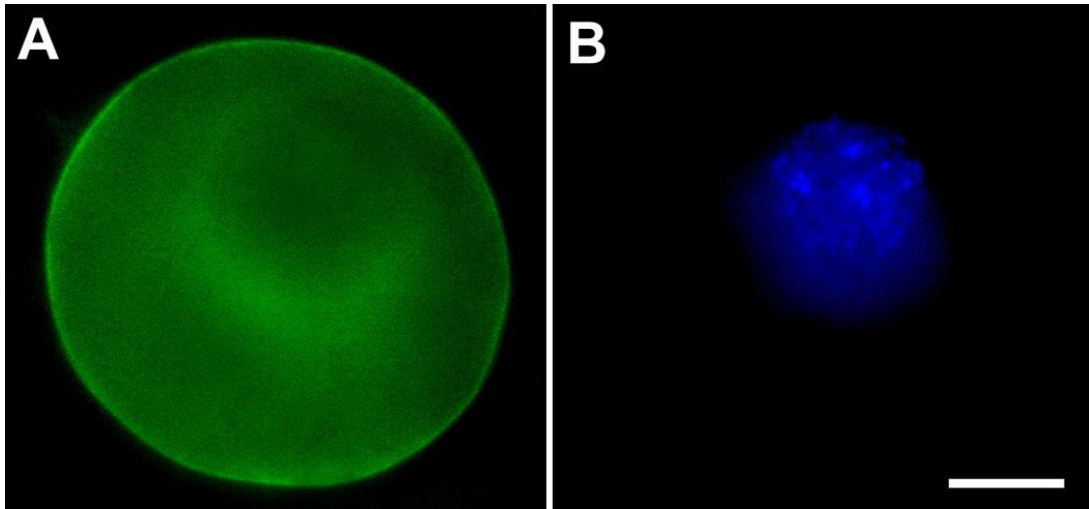
При незрели овоцити на етап ранен GV и трите ядрени белтъка се локализираха в ядрената обвивка. За ламин А/С и Nup160 това е показано на Фиг. 27. Не се наблюдаваше реакция за ламини или нуклеопорин във вътрешността на ядрото, а тубулинът се откриваше само в цитоплазмата.

На етап GV с оформена кариосфера се наблюдаваше пълна колокализация на ламин А/С и Nup160 в ядрената периферия и в областта на кариосферата (Фиг. 28). Така в ядрото на овоцита се очертаваха две концентрични сфери. Цитоплазменият белтък тубулин също се откриваше в ядрото, най-вече свързан с кариосферния хетерохроматин. Ламин В обаче все още се локализираше предимно в ядрената периферия. Малко количество от него навлизаше във вътрешността на ядрото, но не се асоциираше с кариосферата (Фиг. 29).

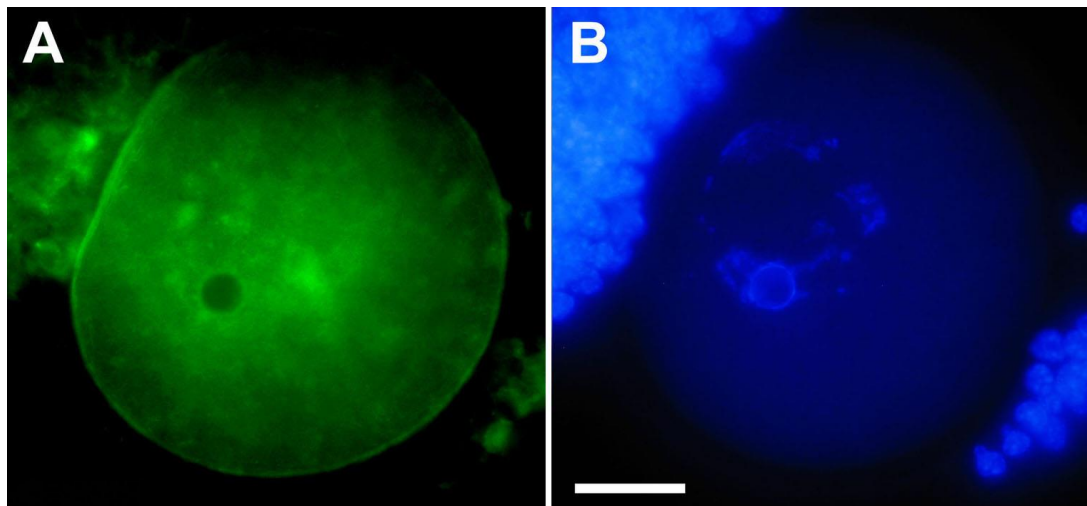
На етап GVBD разликите в локализацията на изследваните белтъци се задълбочаваха. Нуклеопоринът пръв се отделяше изцяло от ядрената обвивка и се наблюдаваше в целия обем на ядрото освен вътрешността на кариосферата (Фиг. 30). С напредването на кондензацията на хроматина ламини В и А/С се преместваха към кариосферата. Между тях обаче се наблюдаваше разлика: ламин А/С оставаше свързан с хетерохроматина на кариосферата и не проникваше във вътрешността ѝ (Фиг. 30), а ламин В се натрупваше в целия ѝ обем (Фиг. 31).

Наблюдението и документирането на метафазни овоцити чрез лазерно конфокално сканиране потвърди и прецизира епифлуоресцентните данни. Ламин В отново се откриваше в мейотичното вретено, ламин А/С – в „ореол“ около вретеното и в по-малка степен в цялата овоплазма, а нуклеопоринът – във вретеновите полюси. За ламин А/С и Nup160 този резултат се вижда на Фиг. 32.

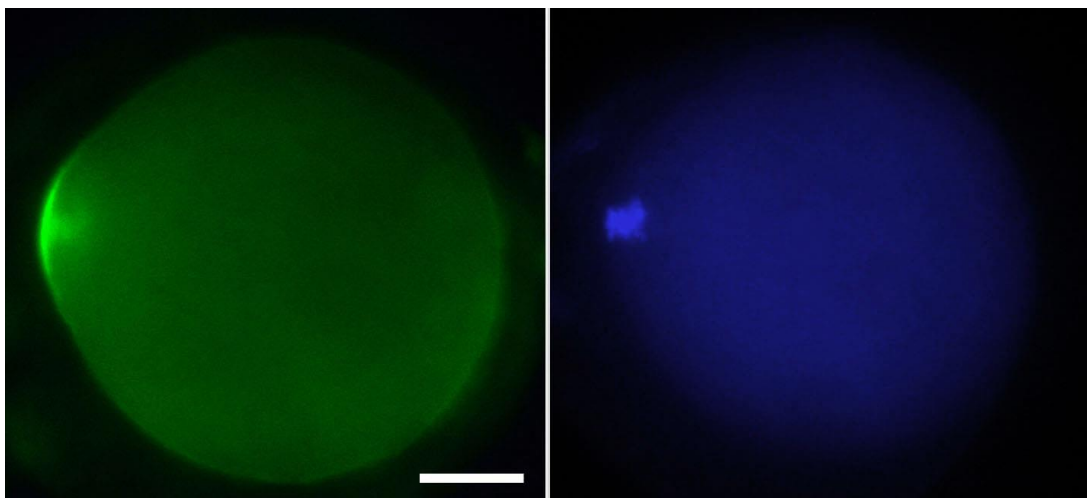
При едновременната визуализация с α -тубулин за ламин В беше установена пълна колокализация с нишките на вретеното. Докато обаче реакцията за тубулин очертаваше непрекъснати нишки, тази за ламин В разкри фини гранули, явно съответстващи на мехурчетата от ядрената обвивка (Фиг. 33). Nup160 беше концентриран само в полюсите на вретеното и при подходящ ъгъл на наблюдение даваше пръстеновидна реакция (Фиг. 34).



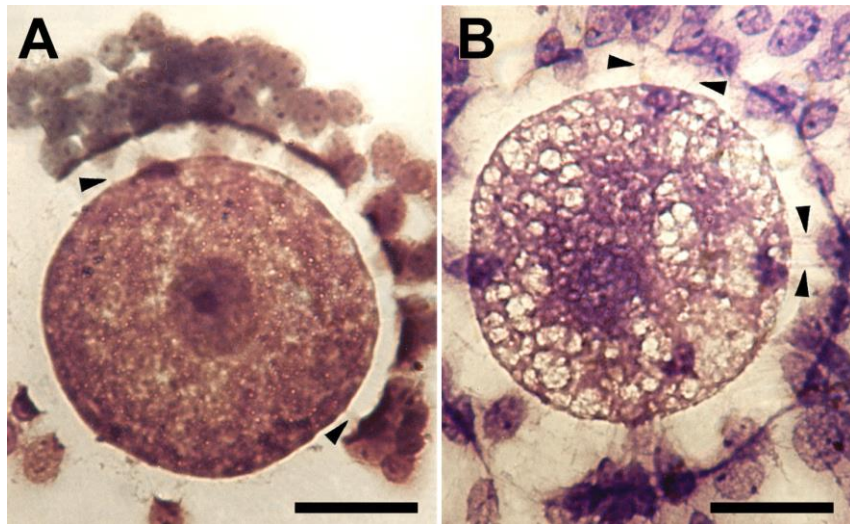
Фиг. 1. Овоцит на стадий ранен GV, епифлуоресценция. Кумулусът е отстранен. **А.** Реакция за цитоплазмени IF. **В.** Реакция за хроматин. Отсечката е 20 μm .



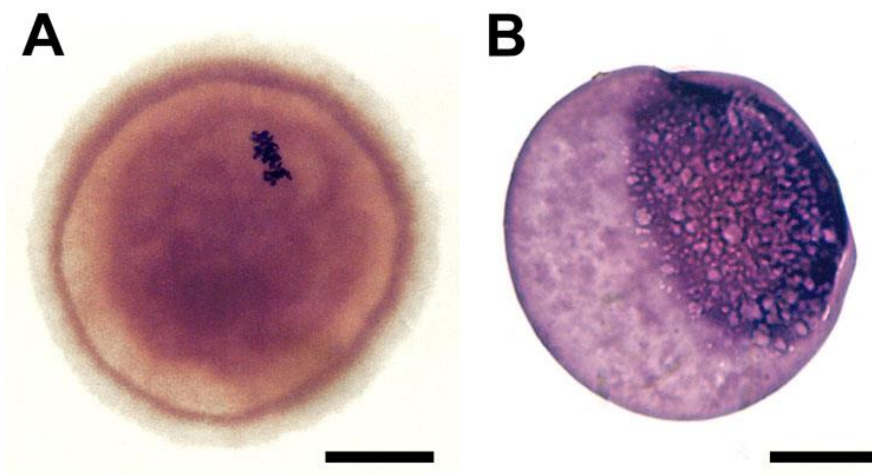
Фиг. 2. Овоцит на стадий GV с оформена кариосфера, епифлуоресценция. **А.** Реакция за цитоплазмени IF. **В.** Реакция за хроматин. Отсечката е 20 μm .



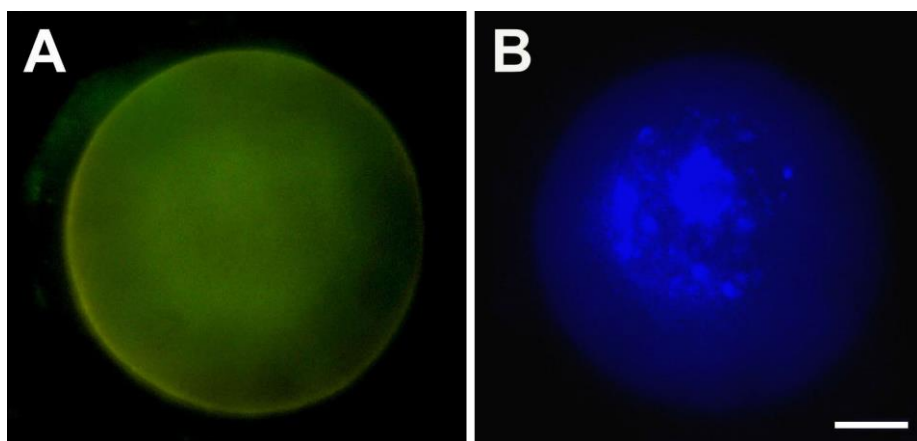
Фиг. 3. Овоцит на стадий метафаза I, епифлуоресценция. **А.** Реакция за цитоплазмени IF. В лявата част на клетката се вижда метафазната пластинка, покрита от силно белязана „шапка”. **В.** Реакция за хроматин. Отсечката е 20 μm .



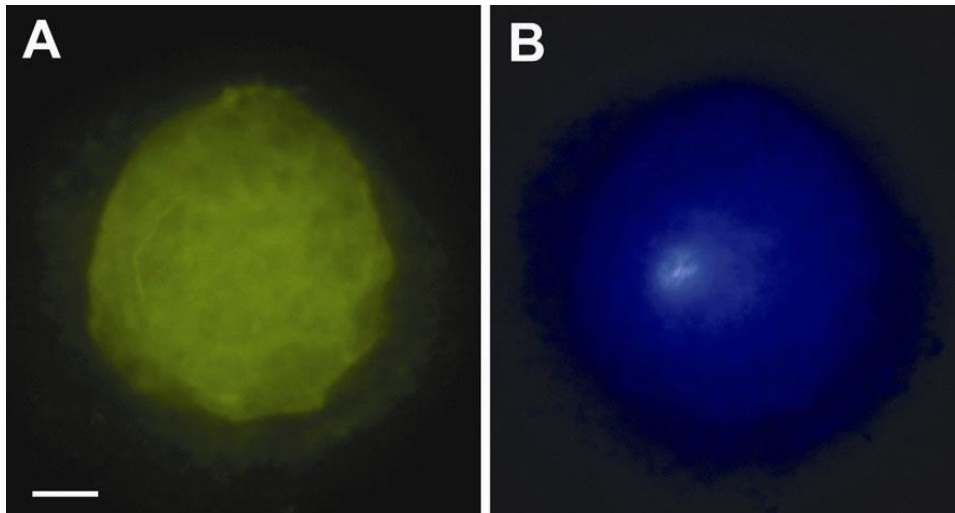
Фиг. 4. Овоцит-кумулусни комплекси на стадий GV, оцветени с Гимза; отсечките са по 20 μm . **А.** Неекстрахиран контролен комплекс. **В.** Екстрахиран комплекс. С главички на стрелки са означени израстъци на кумулусни клетки.



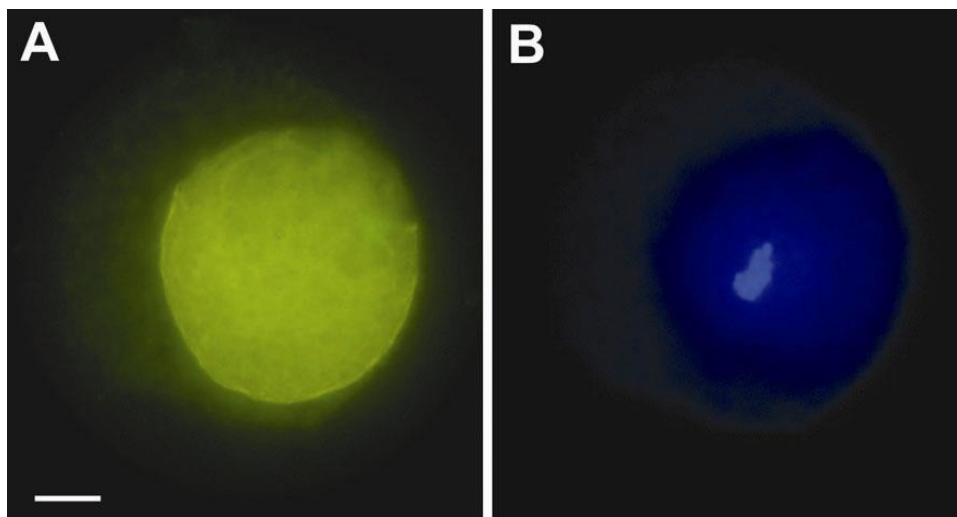
Фиг. 5. Зрели овоцити, оцветени с Гимза; отсечките са по 20 μm . **А.** Неекстрахиран контролен овоцит. Добре се вижда пластинката на метафаза II. **В.** Екстрахиран овоцит. В цитоплазмата се вижда сфера без видима структура.



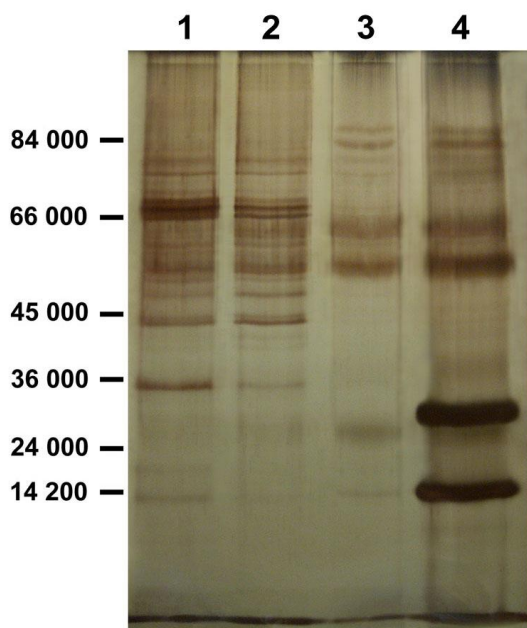
Фиг. 6. Екстрахиран овоцит на стадий GV с оформена кариосфера, епифлуоресценция. **А.** Реакция за цитоплазмени IF. Наблюдава се светене в кортикалната област и асоциирано с областта на ядрото, особено кариосферата. **В.** Реакция за хроматин. Отсечката е 20 μm .



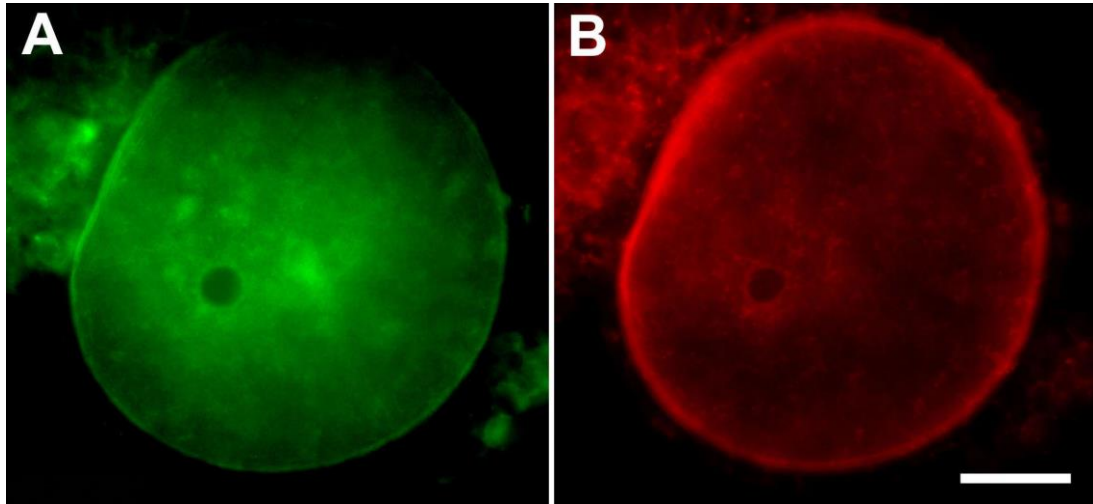
Фиг. 7. Екстрахиран овоцит в метафаза I, епифлуоресценция. **А.** Реакция за IF – наблюдава се частичен колапс. **В.** Реакция за хроматин. Отсечката е 20 μm .



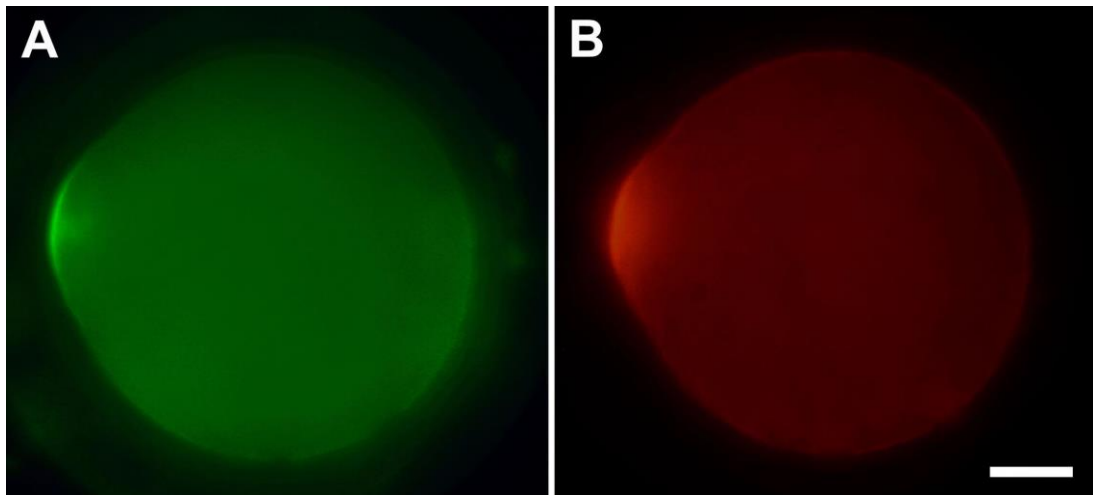
Фиг. 8. Екстрахиран овоцит в метафаза II, епифлуоресценция. **А.** Реакция за IF – наблюдава се пълен колапс. **В.** Реакция за хроматин. Отсечката е 20 μm .



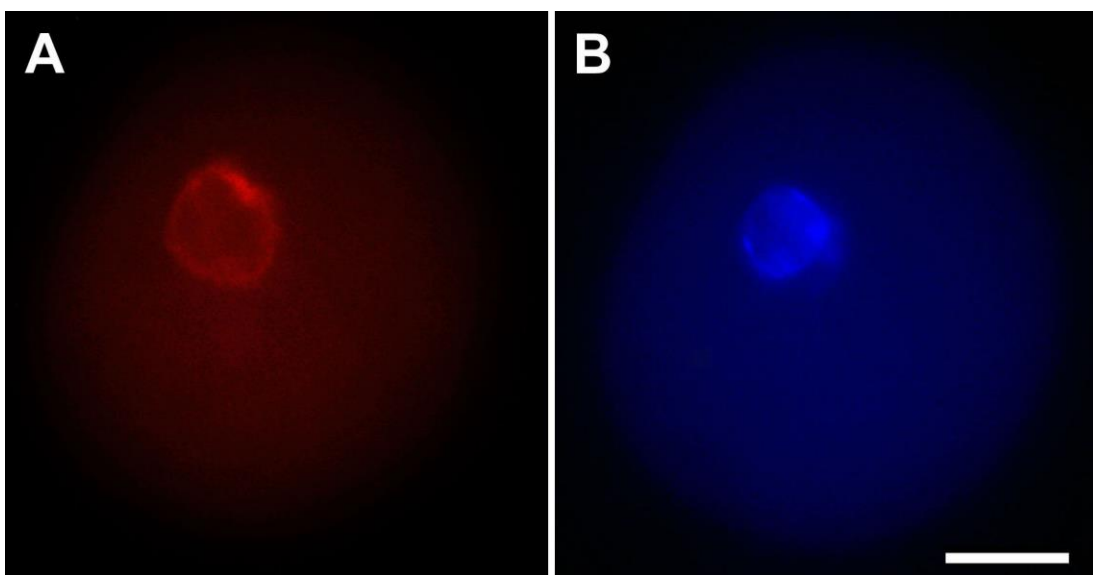
Фиг. 9. Белтъци от овоцит-кумулусни комплекси: неекстрахирани контроли (1), след обработка с цитоскелетен буфер (2), с висока йонна сила (3) и с нуклеази (4), след SDS-PAGE електрофореза и оцветяване на гела със сребро; вляво – маркери за молекулна маса. Двете най-ярки ивици на старт 4 са ДНаза I и РНаза A, използвани за разграждане на хроматина при последния етап на екстракцията.



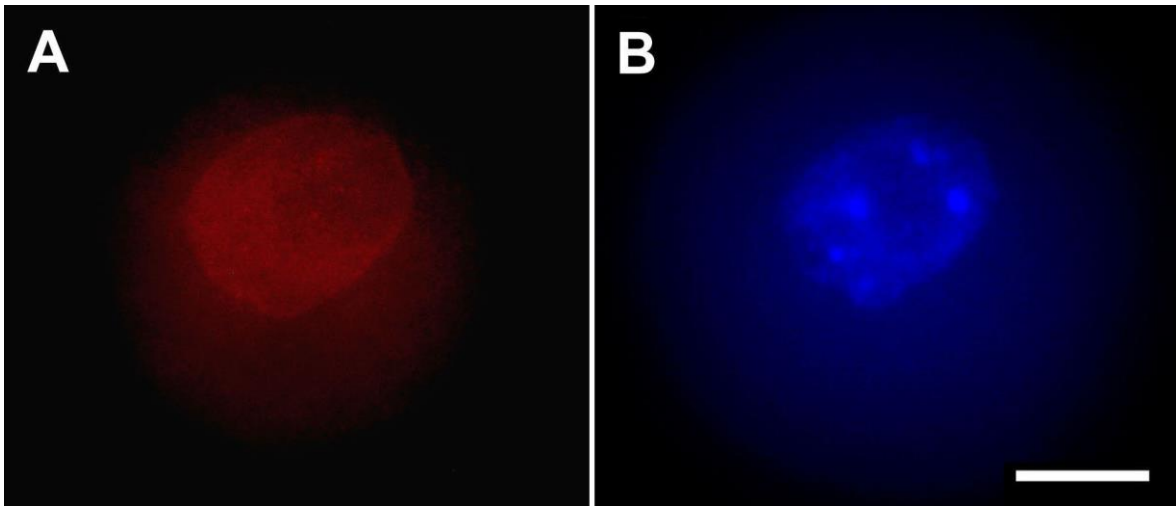
Фиг. 10. Овоцит на стадий GV (клетката от Фиг. 2), епифлуоресценция. **А.** Реакция за цитоплазмени IF. **В.** Реакция за F-актин. Отсечката е 20 μm .



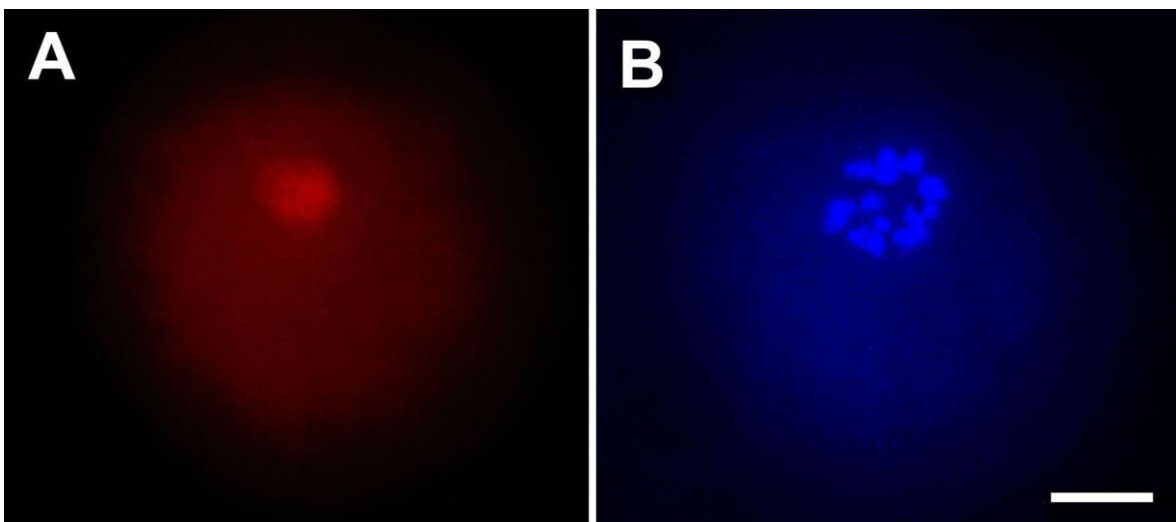
Фиг. 11. Овоцит на стадий метафаза I (клетката от Фиг. 3), епифлуоресценция. **А.** Реакция за цитоплазмени IF. **В.** Реакция за F-актин. Отсечката е 20 μm .



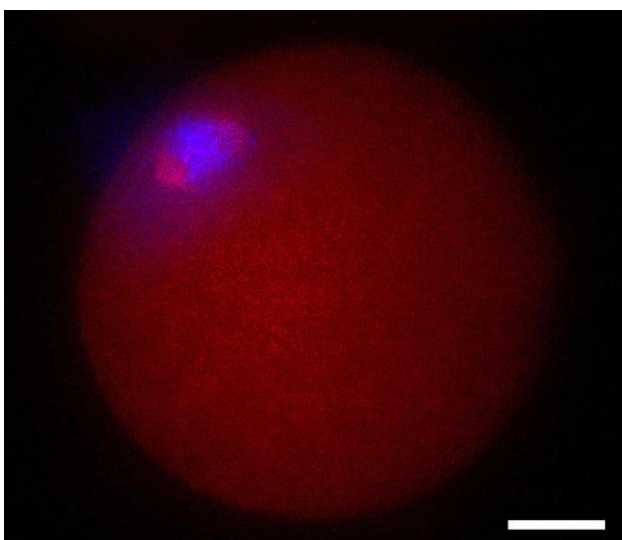
Фиг. 12. Овоцит в ранен GV, епифлуоресценция. **А.** Реакция за ламин B. Светене се наблюдава в областта на ядрената обвивка. **В.** Реакция за хроматин. Кариосферата още не е изградена. Отсечката е 20 μm .



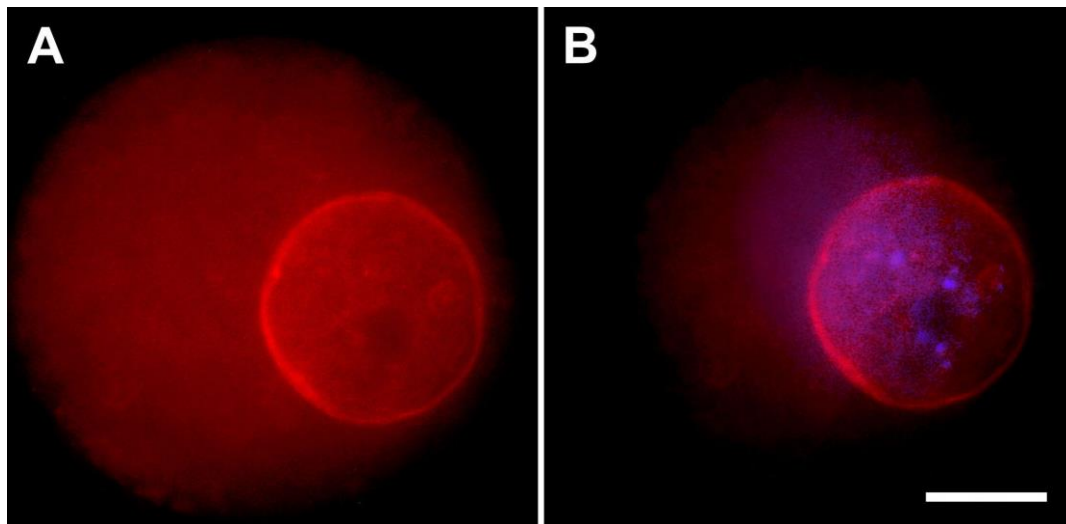
Фиг. 13. Овоцит в GV с оформена кариосфера, епифлуоресценция. **А.** Реакция за ламин В. **В.** Реакция за хроматин. Вижда се, че положителна за ламин В е ядрената периферия и в по-малка степен вътрешността на ядрото, но не се наблюдава по-силно светене в кариосферата. Отсечката е 20 μm .



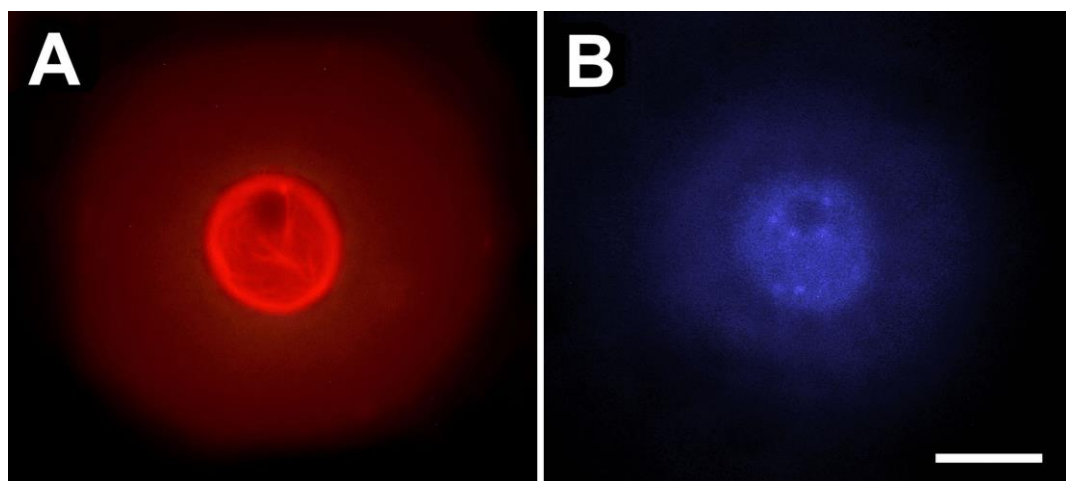
Фиг. 14. Овоцит в GVBD, епифлуоресценция. **А.** Реакция за ламин В. Беязан е целият обем на кариосферата. **В.** Реакция за хроматин. Отсечката е 20 μm .



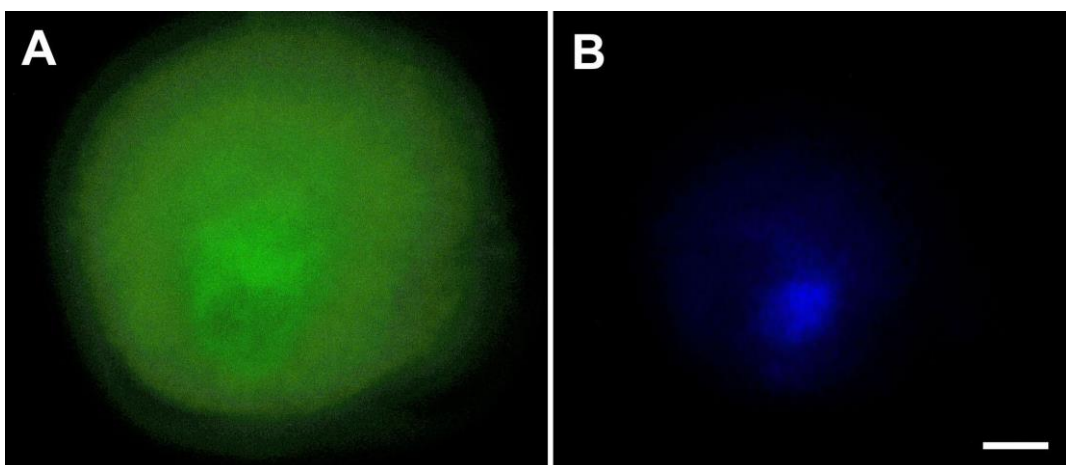
Фиг. 15. Овоцит в метафаза I, епифлуоресценция – реакция за ламин В (червено) и хроматин (синьо), комбиниран образ. Мейотичното вретено е положително за ламин В. Отсечката е 20 μm .



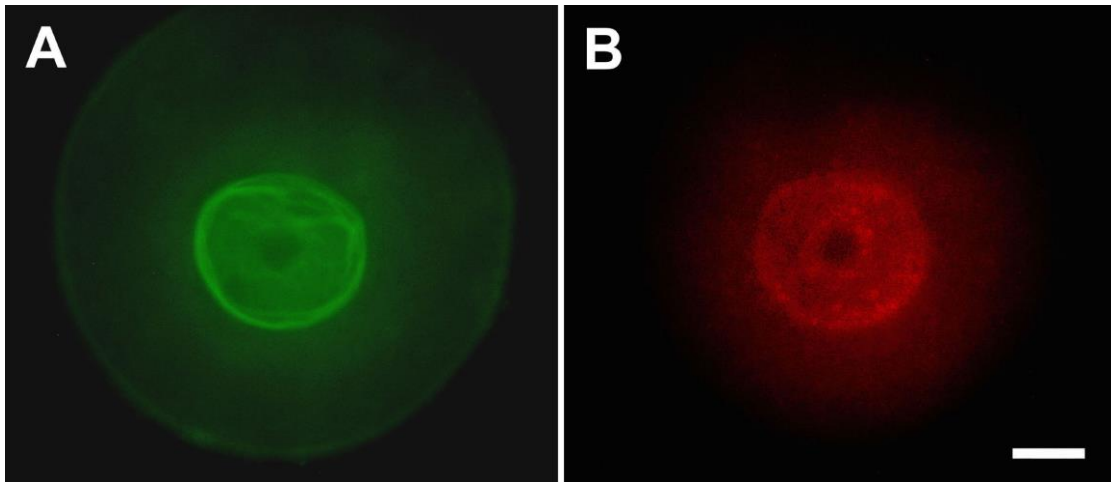
Фиг. 16. Овоцит в ранен GV, епифлуоресценция. **А.** Реакция за ламин А/С. **В.** Реакция за ламин А/С (червено), съпоставена с реакцията за хроматин (синьо). Положителна реакция се наблюдава в ядрената обвивка. В периферията на ядръцето още не се вижда оформена кариосфера. Отсечката е 20 μm .



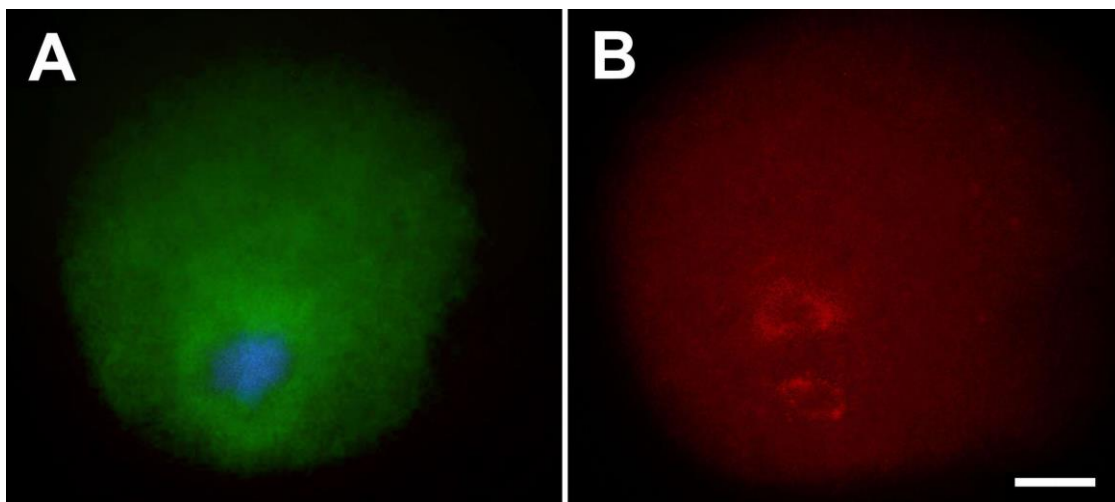
Фиг. 17. Овоцит в GV, епифлуоресценция. **А.** Реакция за ламин А/С. **В.** Реакция за хроматин. Ламин А/С се открива най-вече в периферията на ядрото, но също и свързан с оформящата се кариосфера. Отсечката е 20 μm .



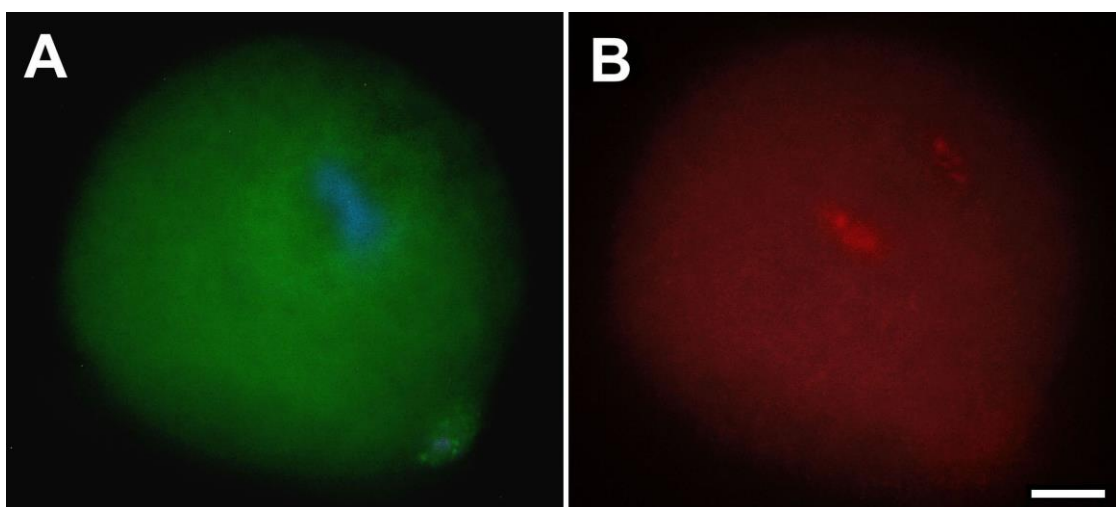
Фиг. 18. Овоцит в метафаза I, епифлуоресценция. **А.** Реакция за ламин А/С. **В.** Реакция за хроматин. Отсечката е 20 μm .



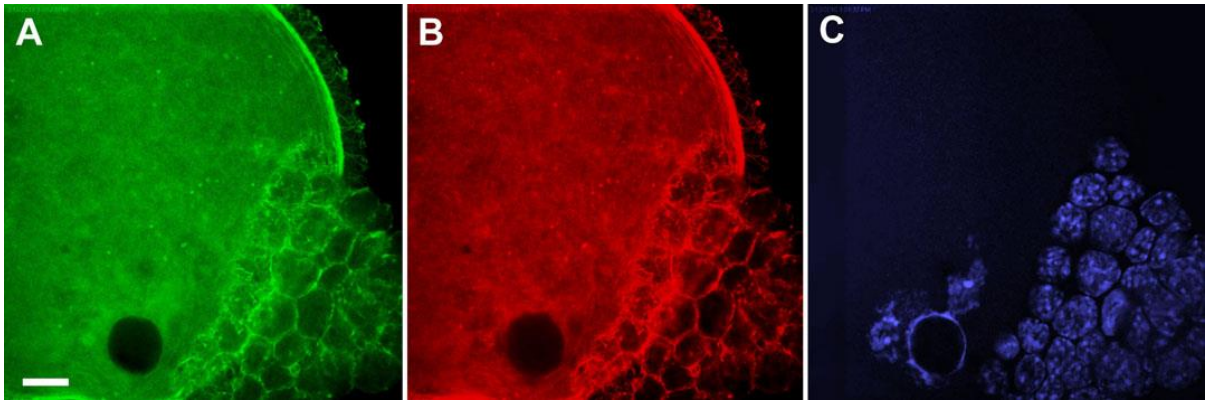
Фиг. 19. Овоцит в GV, епифлуоресценция. **А.** Реакция за ламин А/С. **В.** Реакция за нуклеопорин Nup160. Отсечката е 20 μm .



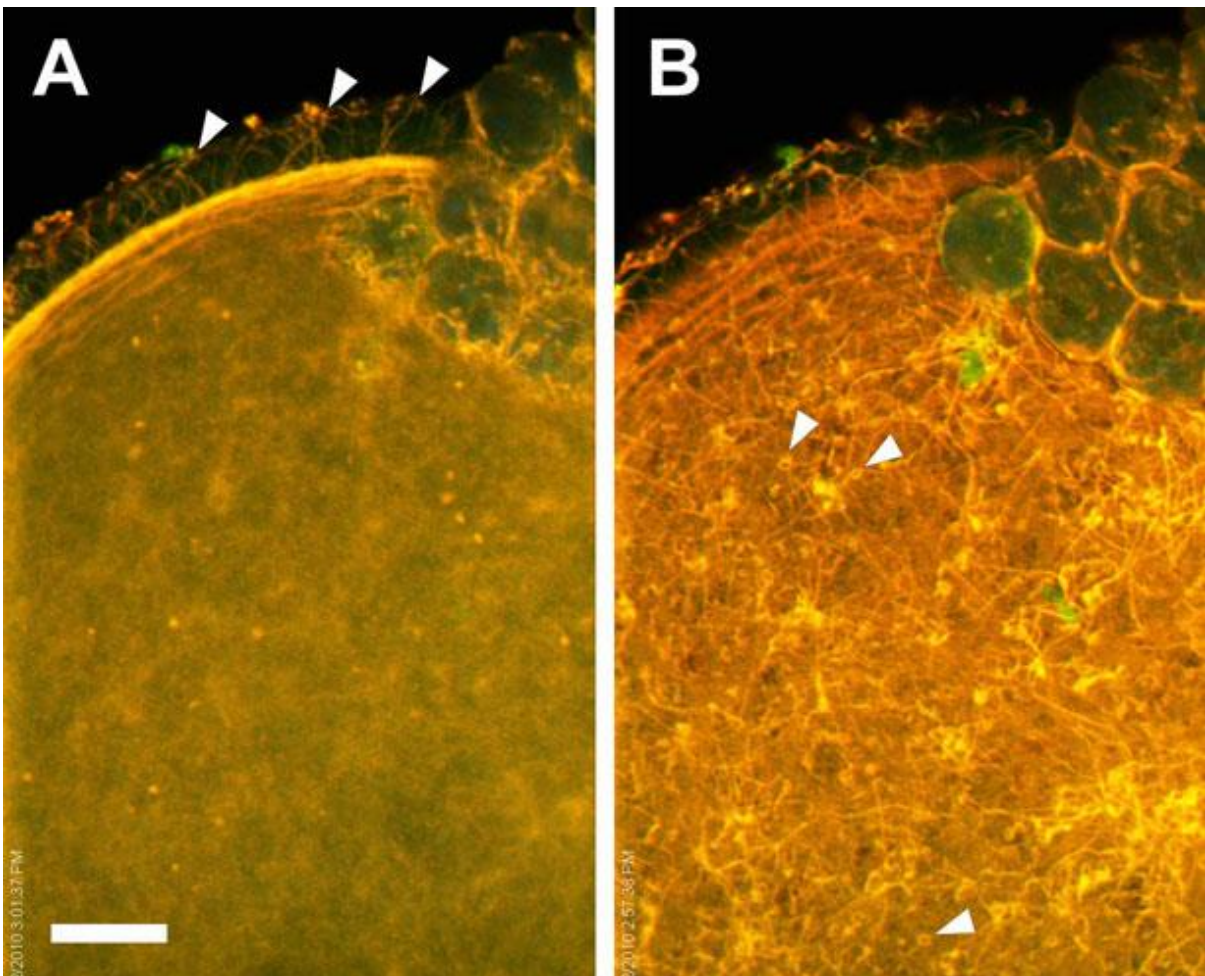
Фиг. 20. Овоцит в метафаза I, епифлуоресценция. **А.** Реакция за ламин А/С (зелено) и хроматин (синьо), комбиниран образ. **В.** Реакция за Nup160 – очертават се кръгове, съответстващи на вретеновите полюси. Отсечката е 20 μm .



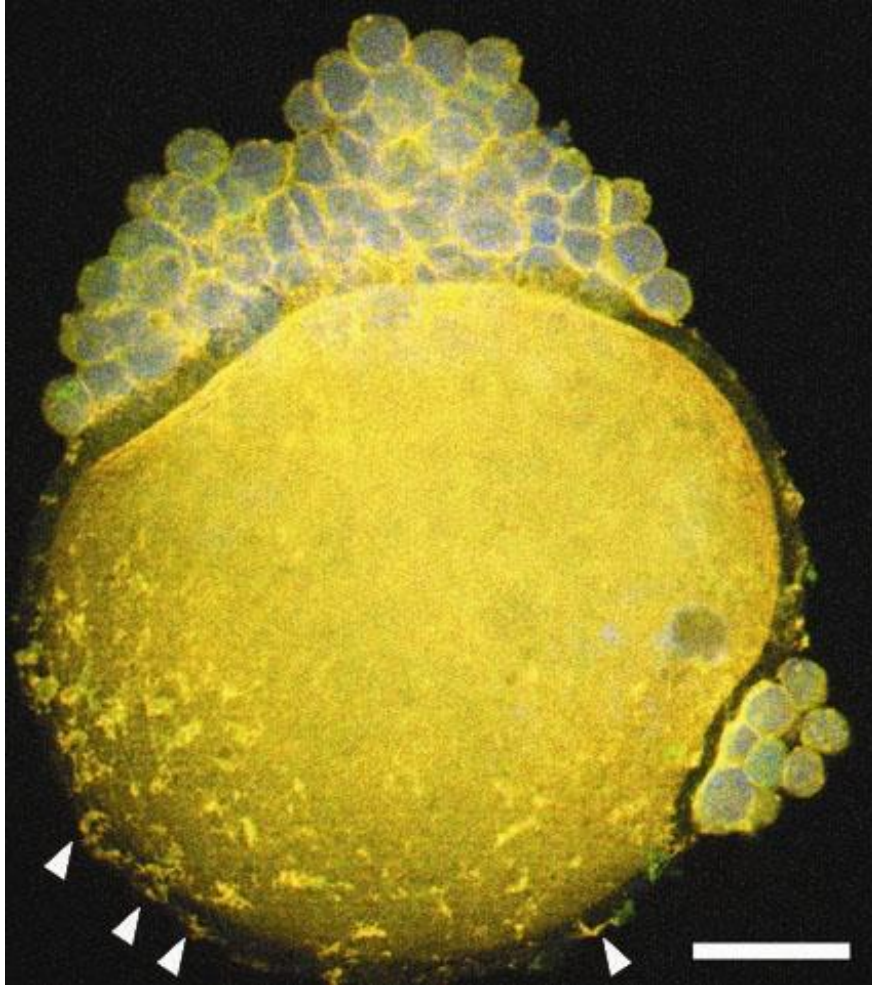
Фиг. 21. Овоцит в метафаза II, епифлуоресценция. **А.** Реакция за ламин А/С (зелено) и хроматин (синьо), комбиниран образ. **В.** Реакция за Nup160 – белязани са вретеновите полюси. В полярното телце (долу вдясно) има слаба реакция за ламин А/С и липсва реакция за Nup160. Отсечката е 20 μm .



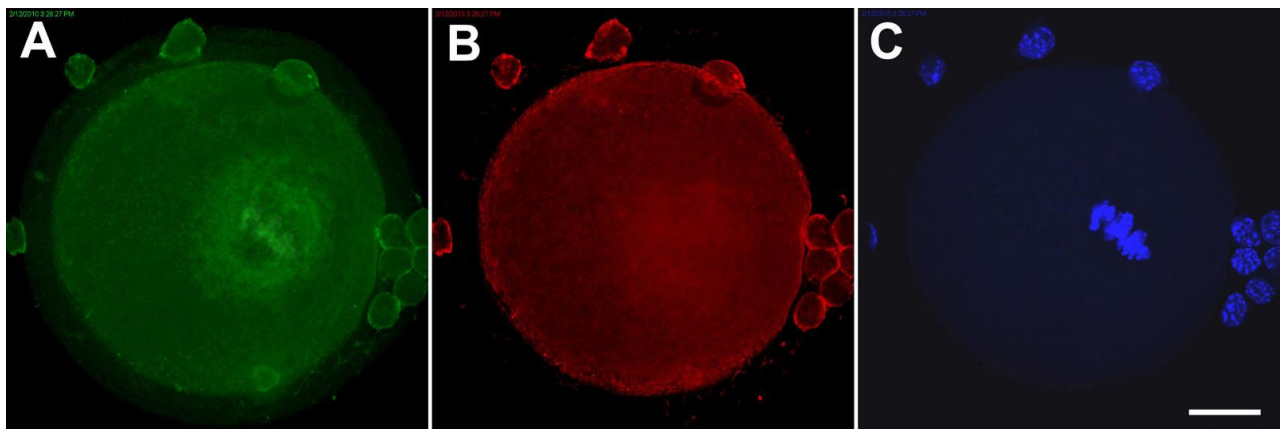
Фиг. 22. Овоцит на стадий GVBD, лазерна сканираща конфокална микроскопия. **А.** Реакция за цитоплазмени IF. **В.** Реакция за F-актин. **С.** Реакция за хроматин. Отсечката е 5 μm .



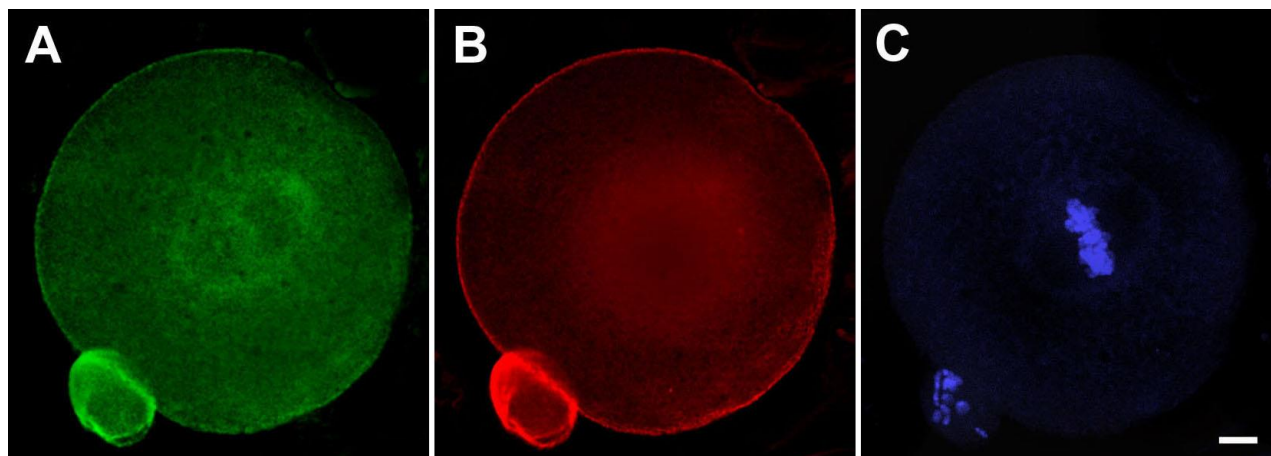
Фиг. 23. Увеличен участък от клетката на Фиг. 22, лазерно конфокално сканиране, комбинирано оцветяване за IF и актин. **А.** Голям брой кумулусни клетки са се откъснали, но израстъците им през зоната се виждат (главички на стрелки). **В.** Друг фокус на същия участък. Крайните разширения на израстъците в напречен срез дават пръстеновидна реакция (главички на стрелки). Отсечката е 2 μm .



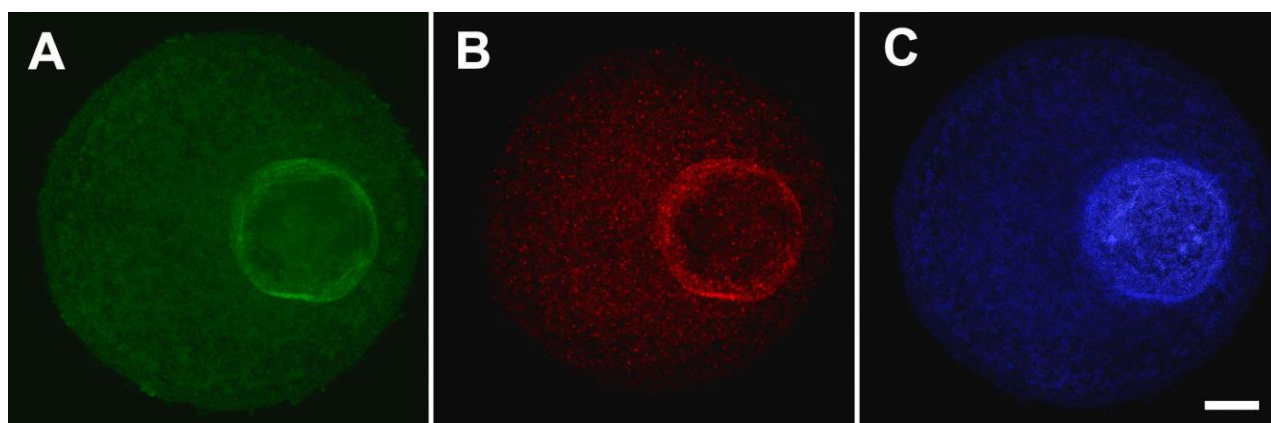
Фиг. 24. Овоцит на стадий GV, лазерна сканираща конфокална микроскопия, комбинирано оцветяване за IF (зелено), актин (червено) и хроматин (синьо). С главички на стрелки са означени фрагменти от откъснали се кумулусни клетки, останали свързани с израстъците. Отсечката е 20 μm .



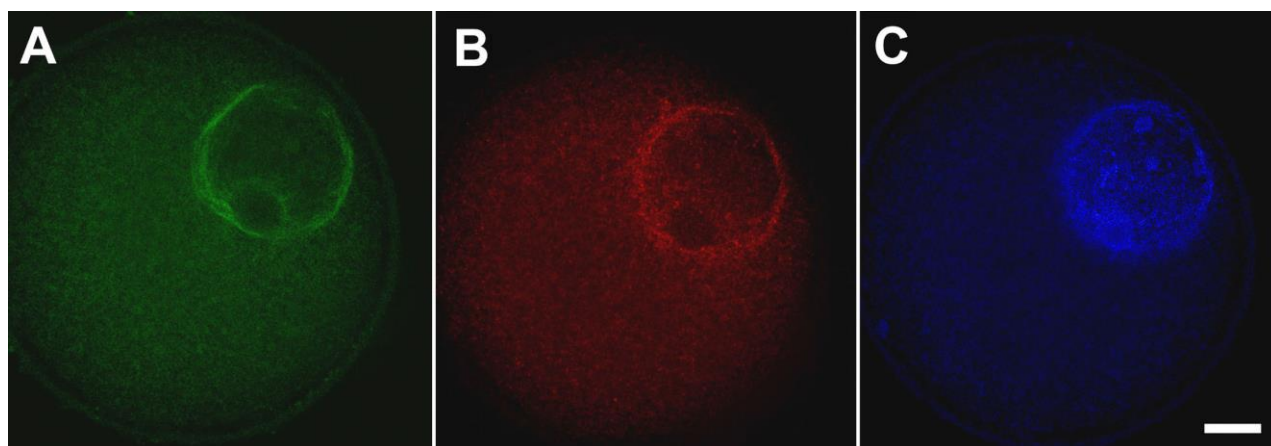
Фиг. 25. Овоцит в метафаза I, лазерно конфокално сканиране. **А.** Реакция за цитоплазмени IF. **В.** Реакция за F-актин. **С.** Реакция за хроматин. Отделни кумулусни клетки са останали свързани с овоцита. Отсечката е 20 μm .



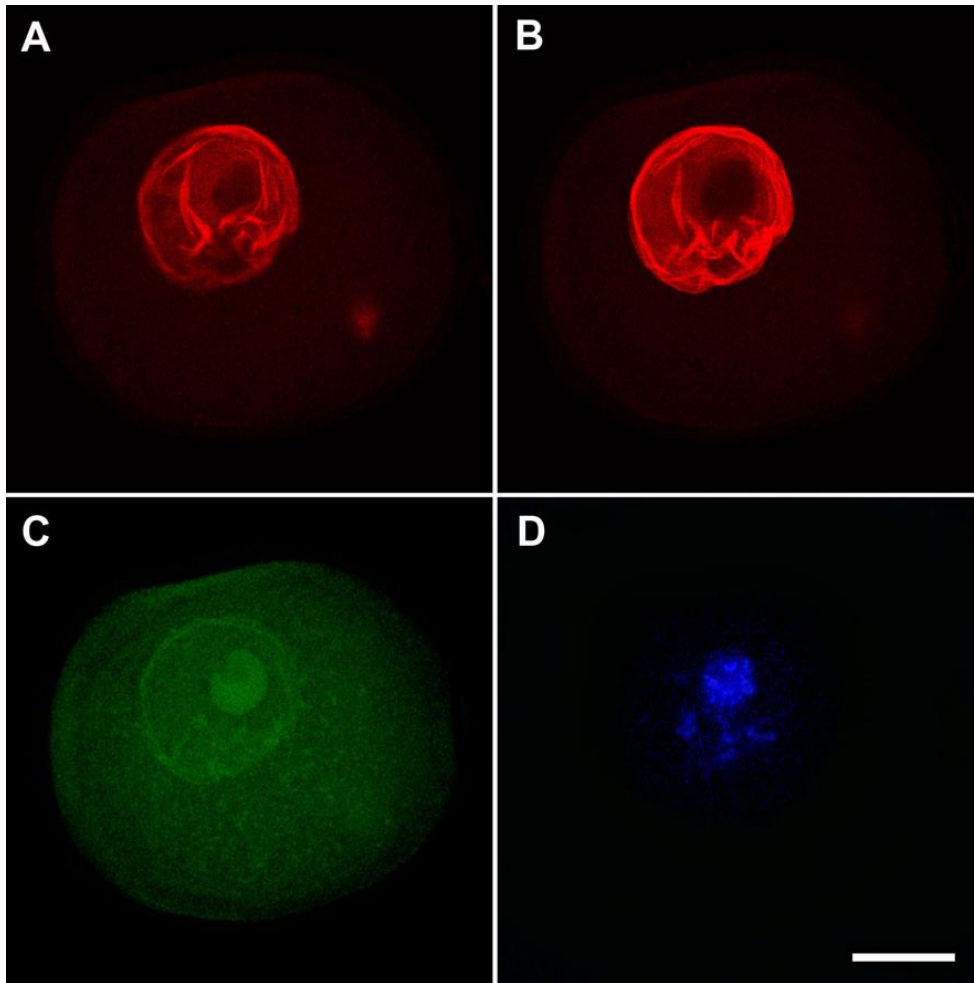
Фиг. 26. Овоцит в метафаза II, лазерно конфокално сканиране. **А.** Реакция за цитоплазмени IF. **В.** Реакция за F-актин. **С.** Реакция за хроматин. Полярното телце (долу вляво) показва ярка флуоресцентна реакция за IF и актин в периферията си. Отсечката е 10 μm .



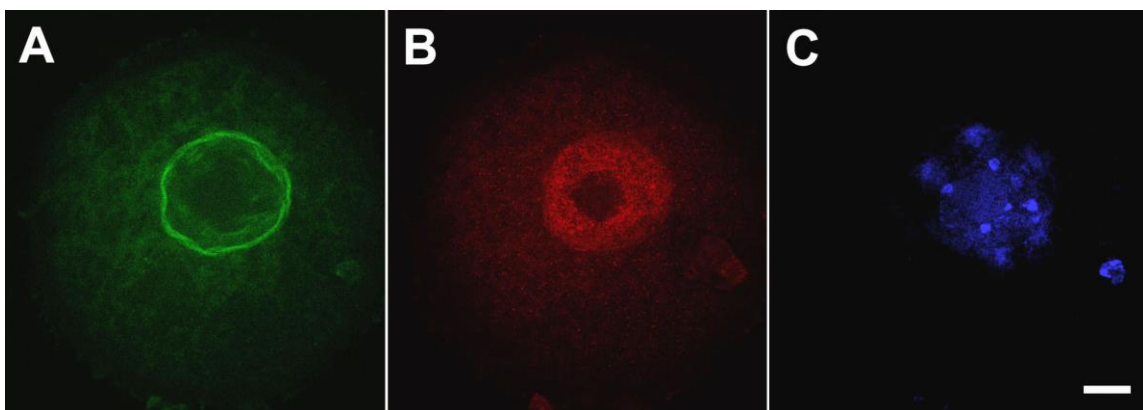
Фиг. 27. Овоцит на стадий ранен GV, конфокална микроскопия **А.** Реакция за ламин A/C. **В.** Реакция за Nup160. **С.** Реакция за хроматин. Двата белтъка се откриват свързани с ядрената обвивка. Отсечката е 10 μm .



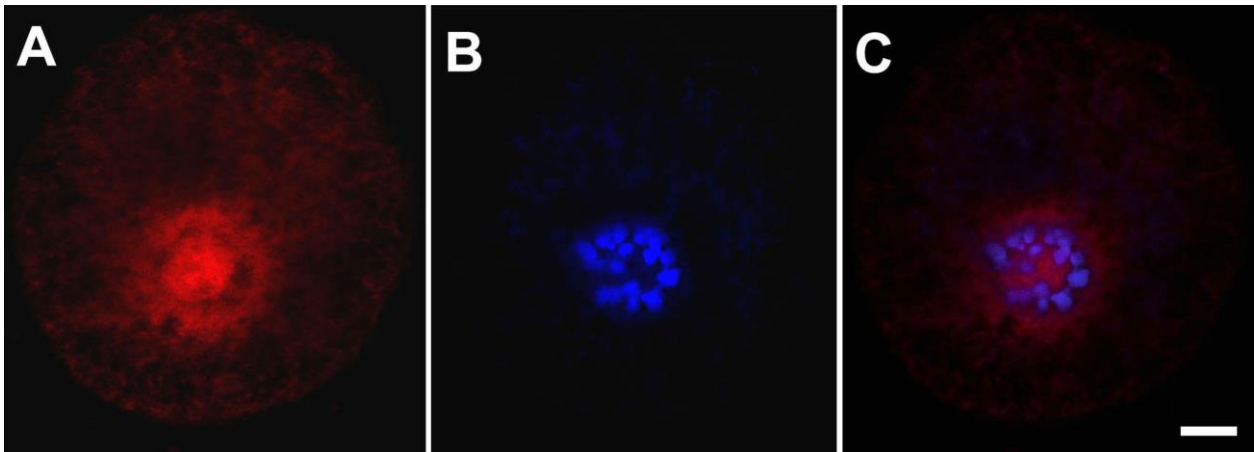
Фиг. 28. Овоцит на стадий GV с оформена кариосфера, конфокална микроскопия. **А.** Реакция за ламин A/C. Ламинът се свързва с кариосферата, но не навлиза във вътрешността ѝ. **В.** Реакция за Nup160 във вид на две концентрични сфери – периферията на ядрото и кариосферата. **С.** Реакция за хроматин. Отсечката е 10 μm .



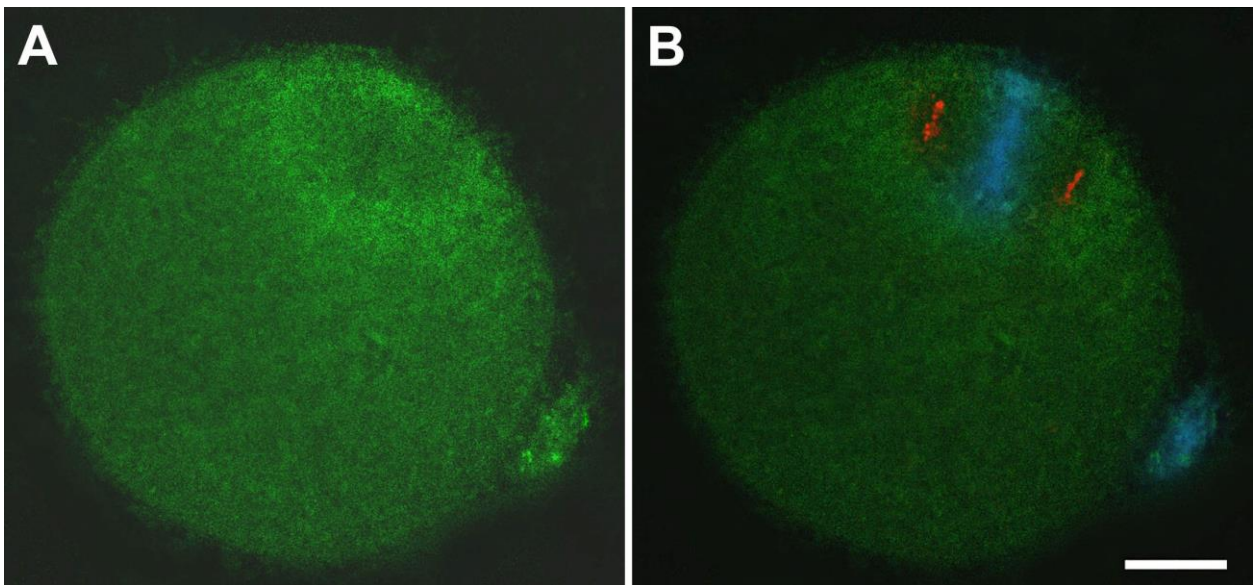
Фиг. 29. Овоцит на стадий GV с оформена кариосфера, конфокална микроскопия. **А, В.** Реакция за ламин В, два различни оптични среза. Реакцията е главно в разпадащата се ядрена обвивка. Малко количество се открива и във вътрешността на ядрото, но не се свързва с кариосферата. Вдясно се вижда ядро на кумулулна клетка. **С.** Реакция за тубулин във вид на две сфери – периферията на ядрото и кариосферата. **Д.** Реакция за хроматин. Отсечката е 20 μm .



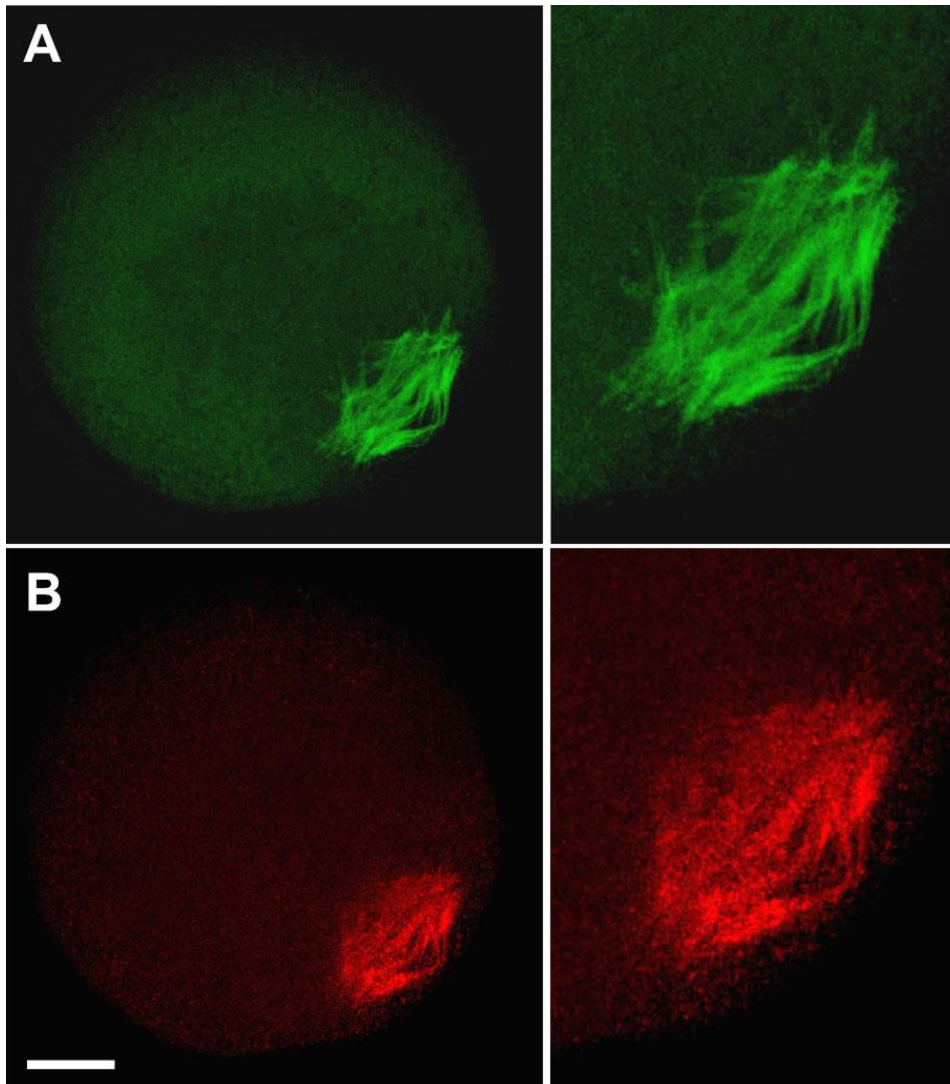
Фиг. 30. Овоцит на стадий GVBD, конфокална микроскопия. Оптичният срез е обхванал и ядрото на една кумулулна клетка (в долната част на снимките). **А.** Реакция за ламин А/С. Ядрената периферия още свети ярко, но има видими деформации, показващи разпад на ламината. Наблюдава се и реакция в областта на кариосферния хетерохроматин. **В.** Реакция за Nup160. Вижда се, че той е напуснал ядрената обвивка и се открива изцяло във вътрешността на ядрото. **С.** Реакция за хроматин. Отсечката е 10 μm .



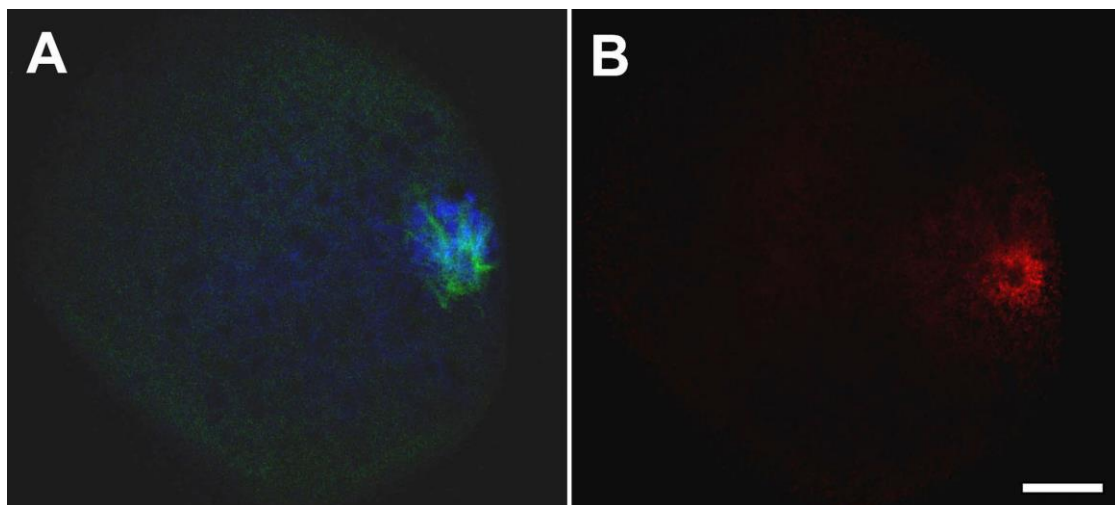
Фиг. 31. Овоцит на стадий GVBD, конфокална микроскопия. (Същата клетка при епифлуоресцентно наблюдение е показана на Фиг. 14.) **А.** Реакция за ламин В. **В.** Реакция за хроматин. **С.** Комбиниран образ. Ламин В е навлязъл между подредените в кръг хромозоми във вътрешността на кариосферата и достига до самия ѝ център. Отсечката е 10 μm .



Фиг. 32. Овоцит на стадий метафаза II, конфокална микроскопия. **А.** Реакция за ламин А/С. Ламинът се локализира в дифузна зона около мейотичното вретено и в по-малка степен в обема на цитоплазмата. **В.** Реакция за ламин А/С (зелено), нуклеопорин (червено) и хроматин (синьо), съчетан образ. Нуклеопоринът е съсредоточен в полюсите на вретеното. Отсечката е 20 μm .



Фиг. 33. Овоцит на стадий метафаза I, конфокална микроскопия. **А.** Реакция за тубулин. **В.** Реакция за ламин В. Наблюдава се пълна. Отсечката е 20 μm . Вдясно участъкът, съдържащ вретеното, е даден увеличен.



Фиг. 34. Овоцит на стадий метафаза I, конфокална микроскопия. **А.** Реакция за тубулин (зелено) и хроматин (синьо), съчетан образ. **В.** Реакция за Nup160. Оптичният срез обхваща едната половина от вретеното с метафазната пластинка и единия полюс. Нуклеопоринът е съсредоточен в областта на полюса, очертавайки пръстен. Отсечката е 20 μm .

ОБСЪЖДАНЕ

Цитоплазмените IF в миши овоцити и овоцит-кумулусни комплекси

Настоящият труд предоставя резултати в подкрепа на наличието на конвенционални белтъци на цитоплазмените IF в овоцитите от бозайници и тяхната динамика в хода на овогенезата. При имуноцитохимичното изследване на миши овоцити и овоцит-кумулусни комплекси за виментин и набор от цитокератини беше установена пълна колокализация на двата типа белтъци на IF. Поначало те рядко се синтезират в една клетка, доколкото кератините са характерни за епителните тъкани, а виментинът – за мезенхимните. При култивиране на епителни клетки обаче често освен цитокератини започва да се експресира и виментин във връзка с повишените механични изисквания, свързани с растежа в култура. Най-вероятно в подобно положение са и мишите овоцити от стадий GV до края на овогенезата, както и кумулусните клетки.

На всички стадии от овогенезата се установяваше положителна реакция за белтъци на IF в кортикалния слой на овоцитната цитоплазма. Такова съсредоточаване на кератинови филаменти под клетъчната мембрана е описано както в епителни клетки така и в овоцити от земноводни. Функцията му е да осигури механична устойчивост на клетъчната периферия. В епителните слоеве това се постига чрез свързване със съседни клетки посредством десмосоми. Свързване със съседни клетки, по-точно с най-близките кумулусни клетки, се наблюдава и при мишите овоцити на етап GV. То е важно с оглед на осигуряването на механична устойчивост на периферията им и предаването на химични вещества и сигнали от кумулусните клетки към овоцита.

С напредване на овоцитното зреене кортикалната реакция за цитокератини и виментин отслабваше, освен в свързаната с мейотичното вретено шапка. Това понижение на реакцията се съгласува със схващането за ролята на IF, влизаци в състава на кортикалния слой, за механичното свързване с кумулусните клетки, доколкото връзките с кумулуса постепенно се прекъсват след разпадането на GV.

Друг компартмент на овоцита, в който се наблюдаваше изразена положителна реакция за цитоплазмени IF, беше обкръжението на ядрения материал – ядрената периферия на етап ранен GV, ядрената периферия и кариосферата на етап GV с оформена кариосфера и мейотичното вретено, включително самата метафазна пластинка, на етапи метафаза I и II. Известно е, че

в соматичните клетки цитоплазмените IF също са склонни да образуват перинуклеарна мрежа и да се асоциират както с делителното, така и със самите митотични хромозоми. В изследваните от нас миши овоцити с напредването на мейозата успоредно с отслабването на реакцията за IF в кортекса се засилваше реакцията, свързана с мейотичното вретено и хромозомите. Това е израз на асоциирането им с мейотичното вретено и хромозомите и предполага възможна роля на цитоплазмените IF при реорганизацията на мейотичния хроматин след разпадането на GV.

Следва да се отбележи, че на етап GV след оформяне на кариосферата се появяваше реакция за цитокератини и виментин, свързана с кариосферния хетерохроматин, т.е. във вътрешността на ядрото. Това показва, че с напредването на стадия GV и подготовката на прехода към GVBD, макар видимата структура на ядрото да е все още запазена, се наблюдава навлизане на цитоплазмени белтъци в неговата вътрешност.

За разлика от някои публикувани изследвания получените от нас резултати не показаха усложняване и разрастване на мрежата от IF в овоплазмата по време на овоцитното зреене. Засилване на реакцията се наблюдаваше само в областта на мейотичното вретено и хромозомите, докато в клетъчната периферия се наблюдаваше редукция на кортикалния слой. Можем да предположим, че тази редукция е необходима за придаване на по-голяма динамичност на овоцитния цитоскелет. С други думи, IF също като микротубулите и микрофиламентите в късните етапи на овогенезата търпят преобразувания, които най-вероятно са предпоставка за отделянето на полярните телца и дробенето на зиготата.

Получените резултати биха могли да се сравнят със съобщенията за локализация на цитокератини при други гръбначни с оглед на разбирането на еволюцията и характеристиките на кератиновия цитоскелет на овоцитите. Понастоящем такива изследвания са проведени върху представители на три класа сухоземни гръбначни – земноводни, влечуги и бозайници. При всички тях е установена локализация в цитоплазмената кора на незрелите овоцити в профаза I, а при *Xenopus* и бозайници се наблюдава реакция и в ядрената периферия. В това отношение включените в настоящия труд резултати и публикуваните трудове на други автори сочат еволюционно консервативно разпределение на кератина в ранните овоцити (на етап GV) от различни сухоземни гръбначни. За по-късните

стадии на овогенезата обаче няма такава единодушие на наличните данни. За *Xenopus* няколко екипа описват разпад на кератиновия цитоскелет с напредването на овоцитното зреене. За бозайниците обаче най-подробното публикувано изследване установява фрагментация на кортикалната реакция за цитокератини след GVBD, което авторите интерпретират като увеличаване на сложността на кератиновата мрежа с възможна роля за запазване на целостта на клетката под механично напрежение след овулацията. Това поставя въпроса дали съществува основна разлика във вътреклетъчното разпределение на цитокератини между овоцитите на земноводни и тези на бозайници. Настоящите резултати обаче са в съгласие с описаното от различни автори разпадане на кортикалния кератинов слой в овоцити на *Xenopus*. По този начин включените в настоящия труд данни за пръв път показват, че животните, заемащи най-раздалечени позиции във филогенезата на сухоземните гръбначни (т.е. земноводните и бозайниците), имат общ модел на разпределение на цитокератините в зреещите овоцити от етап GV до метафаза II.

NM-IF структури в мишия овоцит, разкрити чрез екстракция за ядрен матрикс и интермедиерни филаменти

В хода на работата по настоящия труд за пръв път системно бяха изследвани чрез микроскопски методи и електрофореза овоцити, подложени на екстракция за ядрен матрикс и IF (NM-IF). За характеризиране на морфологията на екстрахираните клетки бе използвана рутинна светлинна микроскопия, за локализиране на белтъците на IF – имунофлуоресценция, а за оценка на белтъчния профил – SDS-PAGE електрофореза.

Естрахираните овоцит-кумулусни комплекси на стадий GV съхраняваха общата си морфология и вътреклетъчно разпределение на IF и не се различаваха видимо от неекстрахираните контроли. На този етап те явно притежават добре развити и взаимосвързани скелетни компоненти, позволяващи запазване на основните структурни особености дори и след такава радикална химична дисекция. Важността на междуклетъчните взаимодействия в големите триизмерни клетъчни комплекси, описани от различни изследователи в различни органи, в яйчника се илюстрира най-добре от израстъците, свързващи кумулусните клетки с овоцита на етап GV. След изолиране и екстракция на овоцит-кумулусния комплекс те можеха да се наблюдават през *zona pellucida* и техният брой и общ

вид, както и видът на самата зона, не бяха видимо променени. Положителната реакция за цитокератини и виментин в израстъците и в самите кумулусни клетки, както и в кортикалния слой на овоцита, показва, че на стадий GV тримерна мрежа от IF чрез междуклетъчните контакти пронизва както овоцита, така и фоликулните клетки и поддържа цялата структура на фоликула стабилна.

На стадии метафаза I и метафаза II обаче екстракцията за NM-IF причиняваше колапс – концентрация на IF около хромозомите с частично или пълно отделяне на цитоплазмата от zona pellucida. Тази понижена екстракционна устойчивост показва загуба на стабилността на опорните структури в късните етапи на овогенезата, най-вероятно в резултат на реорганизация на овоцитния цитоскелет и загуба на външната му опора поради прекъсване на контакта на кортикалния му слой с околните фоликулни клетки. С други думи, след разпадането на GV тримерната мрежа от IF се преобразува и редуцира, правейки клетката по-динамична, но и по-уязвима на външни въздействия. Тази релаксация може би е предпоставка за мащабните цитоскелетни промени, съпровождащи отделянето на полярното телце и дробенето на зиготата. Нужни са още изследвания, за да се изясни до каква степен резултатите, получени за подложени на химична дисекция овоцити, отразяват физиологичното състояние на интактните овоцити, но съдейки по известните свойства на NM-IF структурите в епителните слоеве, би могло да се очаква мрежата да възстанови напълно своята устойчивост в 8-клетъчния зародиш след компакцията.

Сравнението на белтъчните профили след SDS-електрофорезата показва, че в овоцит-кумулусните комплекси, както и в другите изследвани тъкани, устойчивите на NM-IF екстракция белтъци са малко на брой и съставят само няколко процента от общото белтъчно съдържание. Ивиците, получени от напълно екстрахирани клетки, не можеха да се проследят при неекстрахираните контроли, явно поради твърде ниското си относително съдържание в неекстрахираните овоцит-кумулусни комплекси. Изключение беше ивица с Mr 57 000, най-изразена в екстрахираните проби и ясно видима и при неекстрахираните контроли. Тя вероятно отговаряше на белтъците на IF, които имат посочената молекулна маса и се съдържат както в овоцитите, така и в кумулусните клетки. Тези резултати показват, че структурната организация на

NM-IF в соматичните тъкани и в овоцит-кумулусните комплекси се подчинява на сходни принципи и се опира на IF.

Колокализация на цитоплазмените IF с фибриларен актин

Установеното при настоящото изследване вътреклетъчно разпределение на IF, съответстващо на области с концентрация на микрофиламенти, наложи провеждане на изследвания за колокализация на двата вида цитоскелетни компоненти. Макар че по литературни данни цитоплазмените IF могат да се свързват с микрофиламентите, в повечето тъкани припокриването между IF и фибриларния актин е ограничено поради склонността на IF да се съсредоточават в централната част на клетката, а микрофиламентите – в периферната.

Двойното белязване на двете цитоскелетни системи в кумулусните клетки даде резултат, подобен на описания за други клетъчни типове, със съсредоточаване на IF във вътрешността на клетката и на актина – в периферията ѝ. В самите овоцити обаче се наблюдаваше почти пълна колокализация на микрофиламентите и цитоплазмените IF. Това навежда на предположението, че в овогенезата на бозайниците се наблюдава тясно взаимодействие между двете цитоскелетни системи, макар че без допълнителни данни може само да се предполага дали мрежата от микрофиламенти осигурява образец, по който се изгражда мрежата от IF, или напротив, цитоплазмените IF стабилизират фибриларния актин. Следва да се отбележи, че резултатите ни за наличието и вътреклетъчното разпределение на фибриларния актин на различните етапи от овоцитното зреене са в съгласие с литературните данни.

Единственият участък със съществена разлика между разпределението на цитоплазмените IF и това на микрофиламентите беше ядрената периферия на стадий GV и съответно метафазната пластинка на стадии метафаза I и II. На стадий GV цитокератините и виментинът показваха много по-силна склонност от актина да се съсредоточават в областта на ядрената периферия и по-късно на кариосферата, а в по-късните стадии се асоциираха с мейотичните хромозоми, което за актина не се наблюдаваше. Можем да предположим, че белтъците не само на ядрените IF (ламините), а и на цитоплазмените IF (цитокератини, виментин) са способни да се асоциират с хроматина и да играят роля в неговата реорганизация, докато микрофиламентите не притежават такава функция.

*Локализация на ламини В и А/С и връзката им с промените на хроматина в
овоцити с различна степен на зрялост*

За проследяване на промените във вътреклетъчното разпределение на ламини В и А/С в зреещи миши овоцити беше предприето имунофлуоресцентно изследване. На етап ранен GV реакцията за двата типа ламини очертаваше ядрената обвивка както при соматичните клетки и в съгласие с данните на други автори. След това обаче се появяваха важни разлики със соматичните клетки. В GV-овоцитите с оформена кариосфера част от ламините се откриваха около най-кондензирания ѝ хроматин. Така те очертаваха във вътрешността на ядрото втора сфера, даваща положителна реакция – явление, което не е описано за ядърцето на соматичните клетки. Тази разлика показва, че кариосферата, макар че често се нарича „оградено ядърце” или „ядърце с очертана граница”, има различна структура и поведение от ядърцето на соматичните клетки.

По време на GVBD се наблюдаваше все по-изразено отделяне на ламините от ядрената периферия и преместването им към кариосферата. При това ламин В се наблюдаваше в нейната вътрешност, докато ламин А/С оставаше свързан с хетерохроматина по повърхността ѝ. Този резултат е интересен, доколкото локализацията на ламините през краткия преходен етап GVBD не е описана от други автори, с изключение на едно съобщение за агрегат с неопределена форма в близост до хромозомите.

Интерес представляваше също резултатът от имуноцитохимичното изследване с овоцити на стадии метафаза I и II. Ламините от тип В, които в соматичните клетки образуват „вретенов матрикс”, в овоцитите също се наблюдаваха свързани с нишките на делителното вретено. Ламините от тип А/С, които в соматичните клетки след прехода към метафаза се отделят от ядрената обвивка и се разпръсват в целия обем на цитоплазмата, при проведените експерименти даваха реакция в цитоплазмата на овоцита като цяло, но освен това забележимо се концентрираха около делителното вретено, без да се свързват със самите му нишки. Тези резултати показват, че ламините по време на мейозата в зреещия миши овоцит показват известно, но не пълно сходство с вътреклетъчното разпределение, описано при митозата.

Следва да се отбележи, че по литературни данни реакцията за двата типа ламини в овоцита изчезва на етап GVBD и се появява отново едва в хода на

оплождането на етап пронуклеарна зигота. Относно ламин А/С можем да предположим, че разпръсването на реакцията в големия обем на овоплазмата, макар и сходно с наблюдаваното при митозата на соматичните клетки, е било регистрирано като отрицателна реакция. Във всеки случай би било учудващо, ако двата типа ламини наистина бъдат подложени на разграждане след GVBD, като се има предвид, че при евентуално оплождане те не след дълго отново биха станали необходими за изграждането на ядрената обвивка на двата пронуклеуса.

Локализация на нуклеопорин Nup160 и връзката му с ламините в овоцити с различна степен на зрялост

Комплексът NPC, съставен от нуклеопорини, е механична основа за ядрено-цитоплазмения транспорт, също както съставената от ламини ядрена ламина е механична опора на самата ядрена обвивка. Ето защо системното изследване на ядрените опорни структури през овогенезата изисква изследване не само на ламините, а и на компоненти на NPC. За настоящото изследване бе избран нуклеопорин Nup160. Неговото наличие и вътреклетъчно разпределение в хода на овоцитната мейоза, за което не са ни известни литературни данни, беше проследено в зреещи миши овоцити на стадии от GV до метафаза II.

Резултатите показаха на етап GV наличие на Nup160 в ядрената периферия, което бе очаквано и сходно с известното за соматичните клетки. След формирането на кариосферата обаче се наблюдаваше преместване на част от Nup160 към нея, което бе сходно с наблюдаваното за ламините и нямаше аналог с литературните данни за дялящите се соматични клетки. Можем да допуснем, че локализацията в областта на кариосферата вероятно е механизъм за задържане на важни ядрени белтъци в близост до хромозомите, докато ядрената обвивка постепенно се дестабилизира в процеса на подготовка за GVBD.

Интересно е да се съпостави наблюдаваната динамика на Nup160 през по-късните етапи на овоцитната мейоза с описаното от други автори за митозата. През прометафазата в соматичните клетки Nup107-160 първо се концентрира в областта на вретеновите полюси, а после обхваща проксималните нишки на митотичното вретено, като в отделни случаи се разпростира и по цялата дължина на нишките. В изследваните от нас миши метафазни овоцити обаче Nup160 се регистрираше в областта на полюсите на мейотичното вретено както през метафаза I, така и през метафаза II. С други думи, овоцитите, задържани в

метафаза I или II на мейозата, по отношение на локализацията на Nup160 наподобяваха соматичните клетки в прометафазата на митозата. Предвид на известната роля на Nup160 за организацията на митотичното вретено установената от нас разлика вероятно отразява значими особености при сглобяването на вретеното и неговата контролна точка в мейотичните овоцити.

Прецизиране на вътреклетъчната локализация на изследваните белтъци чрез лазерна сканираща конфокална микроскопия

За да се прецизират резултатите от епифлуоресцентните имуноцитохимични изследвания, част от клетките бяха наблюдавани и документирани и чрез лазерна сканираща конфокална микроскопия. Получените с този метод резултати се съгласуваха с установеното чрез епифлуоресценция и позволиха да се получи по-точна представа за триизмерното положение на изследваните структури. По този начин бе потвърдено, че наличието на цитокератини, виментин и актин в областта на кариосферата след нейното оформяне е действителна имунофлуоресцентна находка, а не артефакт от наслагването на светене от различни оптични пластове на овоцита при епифлуоресцентно наблюдение. Конфокалното сканиране потвърди също така колокализацията на белтъците на цитоплазмените IF с хромозомите на етапи метафаза I и II. Това е довод в полза на хипотезата за роля на тези белтъци в регулацията на състоянието на хроматина. С оглед на това е интересна установената разлика в поведението на фибриларния актин: макар да се откриваше свързан с кариосферния хетерохроматин в късните етапи на GV и GVBD, той се отделяше от хроматина на следващите стадии от мейозата и не се локализираше свързан с хромозомите през метафаза I и II. Това предполага, че роля за мейотичните преобразувания на хроматина след етап GVBD имат белтъците на IF, но не и актинът.

Още по-интересни данни предостави лазерното конфокално сканиране за разкриване на детайли от овоцит-кумулусните взаимодействия. За овоцит-кумулусните комплекси на стадий GV по-големите възможности на този метод позволиха не само прецизиране на резултатите от епифлуоресценцията, а и получаване на качествено нови резултати, свързани с взаимодействието между овоцита и кумулусните клетки. Това взаимодействие се основава на израстъците

на най-близките кумулусни клетки, които пронизват *zona pellucida* и се свързват с овоцита. Цитоскелетните компоненти на двата вида клетки осигуряват механична опора на връзката между мембраните им. Високата разделителна способност на лазерната сканираща конфокална микроскопия ни позволи да осъществим детайлно наблюдение и документиране на израстъците на кумулусните клетки и по-конкретно на техния цитоскелет. На нивото на *zona pellucida* реакцията за IF и фибриларен актин в израстъците очертаваше единична линия. Диаметърът обаче се увеличаваше в областта на крайното разширение на израстъка, така че в напречен срез на това ниво реакцията за IF и актин беше пръстеновидна. Това показва, че в крайното разширение на израстъците на кумулусните клетки опорните цитоскелетни компоненти са съсредоточени периферно, в субплазмалемална позиция, така че да осигуряват необходимата механична здравина, без да пречат на транспорта на вещества от кумулусната клетка към овоцита. Доколкото ни е известно, описаните подробности от строежа на израстъците досега не са публикувани в научната литература.

При подготовката на овоцит-кумулусните комплекси за микроскопия в много случаи се откъсваха не само клетките от външните слоеве на кумулуса, а и непосредствено свързаните с овоцита. Техните израстъци обаче се запазваха, често заедно с цитоплазмен фрагмент. Следователно връзките между кумулусните израстъци и овоцитния кортекс са по-устойчиви от връзките между цитоскелетните компоненти в самата цитоплазма на кумулусната клетка. Това показва важното значение на овоцит-кумулусните взаимодействия за диференцирането на овоцита и правилното протичане на овогенезата.

Прецизното изследване на вътреклетъчното разпределение на белтъците на ядрените IF (ламините) и нуклеопорина също като изследването на цитоплазмените IF изискваше използване на лазерно конфокално сканиране, защото важни детайли останаха неизяснени или непотвърдени след епифлуоресценцията. Например при овоцитите в GV изглеждаше, че ламин B е във вътрешността на кариосферата, а ламин A/C – само в периферията ѝ, свързана с най-кондензирания хроматин, но тази разлика не можеше да се установи със сигурност. Състоянието на ядрената ламина по време на прехода GV – GVBD също изискваше прецизиране чрез конфокална микроскопия както за ламин B, така и за ламин A/C. Потвърждение изискваше и епифлуоресцентната находка, че

в метафазните овоцити ламин В колокализира с тубулиновите вретенови нишки, а ламин А/С се регистрира в дифузен слой около вретеното. Освен това резултатът от изследването за нуклеопорин Nup160 не можеше да се приеме като категоричен. Данните, че на етап GV този белтък се свързва с ядрената периферия и кариосферата като две концентрични сфери, а през метафаза I и II се съсредоточава в областта на вретеновите полюси и очертава пръстени, също трябваше да се уточнят чрез конфокална микроскопия.

При незрели овоцити на етап ранен GV наблюдението чрез конфокална микроскопия потвърди локализацията на трите ядрени белтъка в областта на ядрената обвивка, без значими количества във вътрешността на ядрото. Потвърдено беше и преразпределението им към кариосферата на етап GV с оформена кариосфера, което видимо напредваше с приближаване на GVBD. На етап GVBD конфокалното сканиране позволи да се наблюдава и документира убедително разликата в разпределението на ламини В и А/С, а именно че ламин А/С се открива само свързан с хетерохроматина в периферията на кариосферата, докато ламин В прониква и навътре в целия ѝ обем. За отбелязване е, че сходна с ламин А/С локализация показва и Nup160, както и проникналите на този етап в ядрото цитокератини и виментин. Общо за всички тези белтъци, откривани по повърхността на кариосферата, но не и в нейната вътрешност, е, че са хидрофилни. За разлика от тях ламин В, регистриран и във вътрешността на кариосферата, е мембранно-свързан белтък на всички етапи от клетъчния цикъл. Получените данни хвърлят нова светлина върху промените на кариосферата по време на прехода от ранен GV през GV с кариосфера към GVBD и участието на цитоскелетните елементи в нейните преобразувания.

Конфокалната микроскопия предостави важна информация и за локализацията на изследваните ядрени белтъци през метафаза I и II, когато в овоцита липсва обособено ядро. Беше потвърдена локализацията на ламин А/С в дифузен ярък слой около мейотичното вретено и в по-малка степен в целия обем на овоплазмата. Това противоречи на съобщенията на други автори, че с прехода към метафаза I ламин А/С изчезва, за да се появи отново едва в пронуклеарната зигота. Като се вземе предвид обаче значителната големина на пронуклеусите и относително бързото им образуване при евентуално оплождане, изглежда малко вероятно ламин А/С наистина да се разгражда при мейотичното зреене и да

трябва да се синтезира отново при активирането на овоцита. Получените от нас данни, според които той се разпръсва в обема на цитоплазмата след GVBD, добре обясняват неговата динамика в хода на овогенезата и отговарят на преобразуванията му при митозата на соматичните клетки. Би могло да се допусне, че дифузната реакция за ламин A/C в цитоплазмата на метафазните овоцити лесно се приема от някои наблюдатели за неспецифичен фон, който не отговаря на действителна локализация на белтъка. Неспецифичното фоново оцветяване обаче се елиминира при наблюдение на тънки оптични срези от клетката чрез конфокална микроскопия, което е едно от важните предимства на метода. При изследването на метафазни овоцити за ламин A/C обаче „фоново” оцветяване на цялата цитоплазма се наблюдаваше и при конфокална микроскопия, което показва, че отразява действително разпределение на белтъка.

Освен в целия обем на цитоплазмата ламин A/C беше концентриран около мейотичното вретено като по-ярък „ореол”. Би могло да се допусне специфичен механизъм за тази концентрация, но тя може да се обясни и с пасивно натрупване на ламин A/C в участъка около вретеното, свободен от други органели.

За разлика от ламин A/C обаче, ламин B показваше специфична колокализация с нишките на делителното вретено. Този резултат беше потвърден от конфокалното сканиране, като по протежение на белязаните за тубулин нишки се наблюдаваха дребни гранули с положителна реакция за ламин B, явно съответстващи на мехурчетата от ядрената обвивка. С оглед на данните от последните години за „вретенов матрикс” от ламин B върху тубулиновото вретено в митотичните клетки, следва да заключим, че през мейотичната метафаза I и II той има сходна динамика и роля за организацията на вретеното. Възниква въпросът защо в малкото изследвания за локализацията на ламин B през овогенезата се съобщава за отрицателна реакция в метафазните овоцити. Вероятната причина е, че прецизната локализация на мембранно-свързан белтък като ламин B поставя методични трудности, много по-значителни от тези при локализацията на изцяло хидрофилните белтъци. В настоящото изследване обаче методичните затруднения бяха преодоляни чрез подходящ протокол за фиксация и прилагане на мануални умения при обработката на клетките. Така динамиката на ламин B бе проследена на всички етапи от GV до метафаза II, включително чрез конфокално сканиране. Едновременното белязване на ламин B и тубулин

потвърди колокализацията на тези белтъци и включването на ламин В във „вретенов матрикс“ по време на мейотичната метафаза I и II аналогично на митотичната метафаза при соматичните клетки. По този начин настоящото изследване допринася за разкриване на все още неясната локализация на овоцитните ламини между GVBD и оплождането.

Установената за ламините сходна динамика при мейоза и митоза обаче не се наблюдаваше при нуклеопорин Nup160, освен че на етап ранен GV този белтък се локализира в ядрената обвивка, а на етап GVBD, се отделя от нея. Другите аспекти на вътреклетъчното разпределение на Nup160 в овоцитите обаче бяха различни от литературните данни за дялящи се соматични клетки. Конфокалната микроскопия потвърди епифлуоресцентните данни за колокализация на нуклеопорина с кариосферата след нейното оформяне. На по-късните етапи от зреенето – метафаза I и II, оптичните срези от мейотичното вретено показаха съсредоточаване на Nup160 в неговите полюси и образуване на пръстени. Тази картина при митотичните клетки е характерна не за метафазата, а за прометафазата, докато с прехода към метафаза реакцията първо се разпростира по дължината на вретеновите нишки, а после изцяло се дисоциира от вретено. При настоящото изследване върху миши овоцити обаче не бе наблюдавана промяна или изчезване на реакцията за Nup160 в областта на вретеновите полюси дори при зрелите овоцити в метафаза II. Колокализацията с полюсите на мейотичното вретено беше потвърдена чрез едновременна визуализация на Nup160 и тубулин.

Предвид на общата прилика между митозата и мейозата и същевременно наличието на ключови разлики между двата процеса би могло да се очаква повечето молекули-участници в клетъчното делене да имат сходна динамика в хода на митозата и мейозата, но определени белтъци с важна регулаторна роля да показват разлики. Измежду изследваните от нас ядрени белтъци два (ламини В и А/С) показаха поведение, сходно това при митозата, докато третият (Nup160) имаше различна локализация. Можем да предположим, че Nup160 още от края на профаза I изпълнява регулаторна роля, свързана с изграждането, стабилизацията и динамиката на мейотичното вретено. По този начин съпоставянето на данните за различните изследвани белтъци показва, че разкриването на молекулните механизми на мейотичното зрееене изисква комплексен подход с проследяване на редица компоненти на ядрото и цитоплазмата.

ИЗВОДИ

1. Имуноцитохимичното изследване показва, че конвенционални цитокератини и виментин се съдържат в мишите овоцити в клетъчния кортекс и около ядрото и хромозомите и търпят реорганизация в хода на овогенезата. Те отслабват връзката си с клетъчната периферия и се концентрират около метафазната пластинка. Това предполага възможна роля на цитоплазмените IF при реорганизацията на мейотичния хроматин след разпадането на герминалния везикул.
2. Екстракцията за NM-IF показва първоначална устойчивост на тези цитоскелетни компоненти в GV-овоцитите, която впоследствие се губи, водейки до колапс на IF в екстрахираните метафазни овоцити. Тази структурна релаксация може би е предпоставка за мащабните цитоскелетни промени, съпровождащи отделянето на полярното телце и дробенето на зиготата.
3. Цитоплазмените IF показват значителна колокализация с фибриларния актин, което сочи тясно взаимодействие между двете цитоскелетни системи. Асоциация с хроматина (хромозомите) обаче се наблюдава само за IF, което предполага, че те, а не микрофиламентите, са от значение за мейотичните преобразувания на хроматина.
4. Ядрените IF (ламините) в овоцитите търпят динамика, като цяло сходна с тази при митозата на соматичните клетки, но със специфики, свързани с наличието на уникална структура – кариосферата. Както ламин В, така и ламин А/С се преместват от ядрената обвивка към кариосферата на етап GVBD, като ламин В навлиза и в самата кариосфера. Обобщените данни от изследването на няколко цитоскелетни и ядрени белтъка водят до предположението, че кариосферата е важен структурно-организационен център за предстоящите мейотични събития в края на етап GV и в GVBD. През МI и МII ламин В колокализира с вретеното, а ламин А/С се разполага в дифузен слой около него и в обема на овоплазмата.

5. Нуклеопорин NUP 160 на етап GVBD се придвижва към кариосферата заедно с ламин A/C, а през MI и MII колокализира с вретеното както в дялящите се соматични клетки, но за разлика от тях се съсредоточава в полюсите на вретеното във вид на пръстени и запазва това си разположение до края на метафаза II, което вероятно е свързано със специфични особености на регулацията на делителното вретено при мейозата.

6. Чрез лазерна сканираща конфокална микроскопия върху израстъците на кумулусните клетки на стадий GV беше установено, че те са богати на цитоскелетни компоненти и остават свързани с овоцита дори след откъсване на кумулусните клетки. Следователно връзките между израстъците и овоцита са механично по-устойчиви от връзките между цитоскелетните компоненти в самата цитоплазма на кумулусната клетка, което показва важното значение на овоцит-кумулусните взаимодействия за диференцирането на овоцита. В крайното разширение на израстъка цитоскелетните белтъци се разполагат в периферията, което позволява осигуряване на механична устойчивост без възпрепятстване на преноса на вещества от кумулусните клетки към овоцита.

ПРИНОСИ

Настоящият дисертационен труд има следните приноси:

1. За първи път е изследвано системно поведението на цитокератини и виментин в миши овоцити както и във връзките им с кумулусните клетки. В литературата съществуват някои стари данни по този въпрос за други бозайници, но те са изключително противоречиви и неясни, което вероятно е следствие на използваните стари методи за анализ.
2. За първи път са изследвани промените в ядрената и кортикалната зона на овоцитите след екстракция за NM-IF.
3. За първи път ламините от типове В и А/С са локализирани в овоцити между стадии GV и метафаза II.
4. За първи път е проследена динамиката на нуклеопорин Nup160 в различните стадии на овоцитното зреене.

Приносите са научно-теоретични, като принос № 2 има и методичен аспект.

Публикации, свързани с темата на дисертацията

1. Маркова М., С. Делимитрева, Р. Живкова, В. Николова, Д. Димитрова (2010). Цитоплазмени интермедиерни филаменти в гамети от бозайници (обзор). Андрология, т. 19, бр. 3: 17-20.
2. Чакърова И., В. Николова, Р. Живкова, С. Делимитрева. Вариации на хроматиновите и цитоскелетните структури в *in vitro* зрели овоцити от две миши линии. Ембриология (2011) 6, 1, 13-18.
3. Nikolova V., S. Delimitreva, R. Zhivkova, I. Chakarova, D. Dimitrova, M. Markova (2011). Cytoskeletal changes during mouse oocyte maturation revealed by a variation of nuclear matrix and intermediate filaments (NM-IF) extraction. CR Acad. Bulg. Sci. 64, No. 11: 1571-1576. IF за 2011 = 0,21.
4. Nikolova V., R. Zhivkova, M. Markova, T. Topouzova-Hristova, A. Mitkova, S. Delimitreva (2012). Characterization of mouse oocytes and oocyte-cumulus complexes extracted for nuclear matrix and intermediate filaments (NM-IF). Acta Morph. Anthropol. 19: 149-152.
5. Nikolova V., I. Chakarova, R. Zhivkova, M. Markova, S. Delimitreva (2012). Comparison of *in vitro* matured oocytes from two inbred mouse strains and their F1 hybrids. Embriology (2012) 7, 1, 10-15.
6. Markova M., V. Nikolova, I. Chakarova, R. Zhivkova, R. Dimitrov, S. Delimitreva. Intermediate filament distribution patterns in maturing mouse oocytes and cumulus cells, приета за печат в сп. BIOCELL. IF за 2013 = 0,575.

Участия в научни форуми, свързани с темата на дисертацията

1. Zhivkova R., S. Delimitreva, I. Chakarova, V. Nikolova, D. Dimitrova, M. Markova. Localization of cytokeratin and vimentin in maturing mouse oocytes. The Cytoskeleton in Development and Pathology – FEBS/EMBO Lecture Course in conjunction with European Cytoskeletal Forum and Swedish Association for Cytoskeletal Research, 19. – 24. 06. 2010, Stockholm, Sweden.
2. Николова В., И. Чакърова, Р. Живкова, М. Маркова, С. Делимитрева. Сравнение между *in vitro* зрели овоцити от две миши инбредни линии и техните F1 хибриди. IX национална конференция по медицинска биология, 21. – 23. 10. 2011 г., Плевен.
3. Чакърова И., В. Николова, Р. Живкова, М. Маркова, С. Делимитрева. Вариации на хроматиновите и цитоскелетните структури в *in vitro* зрели овоцити от две миши линии. IX национална конференция по медицинска биология, 21. – 23. 10. 2011 г., Плевен.
4. Nikolova V., R. Zhivkova, M. Markova, T. Topouzova-Hristova, A. Mitkova, S. Delimitreva. Characterization of mouse oocytes and oocyte-cumulus complexes extracted for nuclear matrix and intermediate filaments. V Морфологични дни и IX Национална конференция по антропология, 01. – 03. 06. 2012, София.
5. Nikolova V., I. Chakarova, R. Zhivkova, S. Delimitreva. Variations of chromatin and cytoskeletal structures in *in vitro* matured oocytes from two mouse lines. 13th

- International Symposium for Immunology of Reproduction, 22. – 24. 06. 2012, Varna, Bulgaria. Am J Reprod Immunol 67, Suppl s1, P1-2. Impact factor 3,05.
6. Nikolova V., S. Delimitreva, M. Markova, R. Zhivkova, R. Dimitrov, E. Grigorova, D. Dimitrova. Dynamic changes in intermediate filaments correlated with chromatin reorganization in maturing mouse oocytes. 13th International Symposium for Immunology of Reproduction, 22. – 24. 06. 2012, Varna, Bulgaria. Am J Reprod Immunol 67, Suppl s1, P1-2. Impact factor 3,05.
 7. Nikolova V., S. Delimitreva, R. Zhivkova, I. Chakarova, D. Dimitrova, M. Markova. Cytoskeletal changes during mouse oocyte maturation revealed by a variation of nuclear matrix and intermediate filaments (NM-IF) extraction. XXI National Congress of the Bulgarian Anatomical Society with international participation. Sofia, May 31 – June 2, 2013.
 8. Markova M., V. Nikolova, I. Chakarova, R. Zhivkova, R. Dimitrov, S. Delimitreva. Involvement of cytokeratins and vimentin in mouse oocyte meiotic rearrangements. XXI National Congress of the Bulgarian Anatomical Society with international participation. Sofia, May 31 – June 2, 2013; награда за най-добър постер.
 9. Николова В., М. Маркова, Р. Живкова, И. Чакърова, С. Делимитрева. Преобразувания на ядрената ламина и съставните ѝ белтъци в хода на овоцитната мейоза при мишки. X национална конференция по медицинска биология, Плевен, 25 – 27 октомври 2013 г.
 10. Маркова М., В. Николова, Р. Живкова, И. Чакърова, С. Делимитрева. Промени във вътреклетъчната организация на нуклеопорин NUP160 в зреещи миши овоцити. X национална конференция по медицинска биология, Плевен, 25 – 27 октомври 2013 г.
 11. Nikolova V., M. Markova, R. Zhivkova, I. Chakarova, S. Delimitreva. Localization of lamins in maturing mouse oocytes. VI Морфологични дни, 06. – 08. 06. 2014, София.
 12. Markova M., V. Nikolova, R. Zhivkova, I. Chakarova, S. Delimitreva. Immunocytochemical study of nucleoporin 160 during meiosis in mouse oocytes. VI Морфологични дни, 06. – 08. 06. 2014, София.

Благодарности

Изказвам сърдечна благодарност на научните си ръководители доц. Делимитрева и доц. Маркова за ценните напътствия и всеотдайната помощ. Благодаря и на колегите от катедра Биология за подкрепата при разработването на този труд.