

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА БИОЛОГИЯ

ВАЛЕНТИНА ПРОДАНОВА ХАДЖИНЕШЕВА

**Асиметрия и полярност на овоцити от
бозайници в условия на клетъчно
диференциране и патология**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна
степен „доктор”
по професионално направление „4.3. БИОЛОГИЧЕСКИ НАУКИ“
В ОБЛАСТ НА ВИСШЕ ОБРАЗОВАНИЕ „4. ПРИРОДНИ НАУКИ,
МАТЕМАТИКА И ИНФОРМАТИКА“
Научна специалност: Ембриология

Научни ръководители:
Доц. РАЛИЦА СТЕФАНОВА ЖИВКОВА, д.б.
Доц. МАЙЯ ДЯНКОВА МАРКОВА, д.б.

София, 2018

Дисертационният труд съдържа 126 страници и е илюстриран с 27 фигури, включващи 67 микрофотографии. Цитирани са 196 литературни източника на латиница и 8 на кирилица.

Дисертационният труд е обсъден от разширен катедрен съвет в Катедрата по биология на Медицински факултет, Медицински университет – София.

Експерименти, свързани с дисертационния труд, са проведени в Лабораторията по *in vitro* оплождане и предимплантационна ембриология в Катедрата по биология на Медицинския университет – София. Изолирането на яйчниците, фиксирането им, рязането и монтирането на човешките срези бе извършено в Лабораторията по клинична патология на СБАЛАГ „Майчин дом”, а на мишите срези, както и документирането на резултатите - в Секция Имунобиология на размножаването, Институт по биология и имунология на размножаването (ИБИР) към БАН.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 16.05.2018г. от 16:00 часа в сградата на Предклиничния университетски център, ул. „Здраве“ 2, МФ, МУ – София, съгласно Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в МУ- София, пред **Научно жури в състав:**

Научно жури:

Доц. Ралица Стефанова Живкова, дб - научен ръководител на докторанта, вътрешен член

Проф. д-р Виолета Григорова Бурнева, дмн, пенсионер, външен член

Проф. д-р Анастасия Божилова Пастирова, дмн, пенсионер, външен член

Доц. Маргарита Василева Моллова, дб, пенсионер, външен член

Доц. Маргарита Нешова Топашка – Анчева, дб, пенсионер, външен член

Резервни членове:

Доц. Майя Дянкова Маркова, дб - научен ръководител на докторанта, вътрешен член

Доц. д-р Иван Димитров Буланов, дм, пенсионер, външен член

Съдържание

| | |
|--------------------------------------|----|
| Въведение | 4 |
| Цели и задачи | 6 |
| Материали и методи | 7 |
| Резултати | 16 |
| Обсъждане | 36 |
| Изводи | 49 |
| Приноси | 50 |
| Публикации и участия в научни форуми | 51 |
| Благодарности | 52 |

Списък на използваните съкращения

РНК - рибонуклеинова киселина
мРНК – матрична рибонуклеинова киселина
ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина
F-актин – фибриларен актин
G- актин – глобуларен актин

DDX4 – DEAD box protein 4
GV – Germinal vesicle
PCOS - Polycystic Ovary Syndrome
PCM - pericentriolar material
IF - intermediate filaments
GRASP – Golgi ReAssembly Stacking Protein
VDAC - Voltage-dependent anion channel
FITC – Fluorescein isothiocyanate
TRITC –Tetramethylrhodamine isothiocyanate
PBS – Phosphate-buffered saline
BSA – Bovine serum albumin
PFA – Paraformaldehyde

ВЪВЕДЕНИЕ

Асиметрия наричаме неравномерното разпределение на определени клетъчни компоненти. Когато асиметрията засяга всички клетки от дадения тип и промяната ѝ е свързана с нарушения, се говори за клетъчна полярност. При многоклетъчните животни с изключение на плацентните бозайници овоцитите са поляризиращи – имат анимален и вегетативен полюс. Причината е, че в получения зародиш клетъчното диференциране отчасти се определя от морфогени с майчин произход, т.е. запасени в цитоплазмата на яйцето макромолекули. За да определят различни пътища на диференциране, морфогените образуват струввания и градиенти. Следователно за повечето многоклетъчни животни създаването на асиметрия и полярност в овоцита е необходимо условие за нормално зародишно развитие. Интересна структура в това отношение е т. нар. телце на Балбиани – преходен комплекс от органели и макромолекули, разположен в цитоплазмата на ранния профазен овоцит в съседство с ядрото. При насекоми, риби, земноводни и птици то обединява митохондрии, цистерни от комплекса на Голджи и ендоплазмения ретикулум, цитоскелетни елементи и белтъци и мРНК с регулаторна и морфогенна функция. Телцето на Балбиани се образува в ранните овоцити при навлизането им в мейоза и се разпада, когато те започнат да зреят. При животните, чиято овогенеза включва пренос на цитоплазмено съдържимо от съседни клетки към овоцита, пренесените органели се включват в телцето на Балбиани. Впоследствие то участва в транспорта на морфогени към вегетативния полюс. По този начин, макар да престава да съществува дълго преди оплождането, телцето на Балбиани залага в овоцита полярност, която впоследствие определя дорзо-вентралната ос на зародиша и обособяването на първичните полови клетки.

Еволюцията на плацентните бозайници се характеризира със загуба на изходното амниотично яйце и неговите цитоплазмени градиенти. Диференцирането на клетките в зародиша се определя чрез клетъчни взаимодействия (ембрионална индукция). Независимо от това ранните овоцити в профазата I по данни на редица автори показват асиметрично разпределение на

определени клетъчни органели и дори наличие на телце на Балбиани в профазните овоцити на развиващия се яйчник и в овоцитите от примордиалните фоликули на възрастния яйчник. Еволюционното съхранение на дадена структура по правило предполага и наличие на функция. Към настоящия момент обаче асиметрията на овоцитите от плацентни бозайници е слабо изучена, а малкото налични данни са противоречиви. Не е изяснена ролята на цитоскелета в изграждането и поддържането на телцето на Балбиани. Няма системни изследвания, които да съпоставят динамиката на телцето на Балбиани и на центрозомата – единствената цитоскелетна структура на овоцита, безспорно асоциирана с телцето, която обаче се разпада на ранен етап от овогенезата. За интермедиерните филаменти резултатите са спорни, а роля на микрофиламентите не е установена, което оставя неяснота относно важни структурни аспекти на телцето на Балбиани.

Още по-малко се знае за функцията на телцето при плацентни бозайници. При изучаването ѝ засега се използват непреки подходи, доколкото прякото ѝ установяване се натъква на твърде големи методични трудности. Има противоречие по въпроса дали белтъкът DDX4, участващ в метаболизма на мРНК и важен за тотипотентността на първичните полови клетки, се асоциира с телцето на Балбиани при плацентни бозайници. Евентуалната му локализация в телцето би означавала възможна функция на овоцитни мРНК в ембриогенезата дори при плацентни бозайници. Други косвени данни за функцията на телцето на Балбиани биха могли да се осигурят от наблюдения в условия на патология – дали телцето се запазва при нарушено диференциране на овоцита и дали структурата му е видимо променена. Засега обаче в литературата липсват данни за телцето на Балбиани в абнормални овоцити. Настоящият дисертационен труд, посветен на асиметрията и полярността на овоцитите от бозайници, е опит да се допринесе за решаването на тези интересни и засега неизяснени въпроси.

Цели и задачи

Цели:

1. Визуализация на клетъчни компоненти с потенциална роля за създаване на асиметрия в цитоплазмата на овоцити от фетален и възрастен яйчник: мембранни органели (митохондрии, апарат на Голджи) и цитоскелетни структури (центриолни сателити, интермедиерни филаменти, микрофиламенти).
2. Установяване на корелации във вътреклетъчната локализация на различните клетъчни компоненти с отношение към полярността и тяхната динамика в хода на овогенезата.

В съответствие с поставените цели си поставихме следните задачи:

Задачи:

1. Изследване на овоцити от примордиални фоликули в яйчникови срези от пациентки с овариална поликистоза за евентуално наличие на полярност чрез имунофлуоресцентна локализация на набор от цитоскелетни белтъци.
2. Идентифициране на овоцити в срези от неонатален миши яйчник чрез имунофлуоресцентна локализация на маркер за герминативни клетки.
3. Изследване на разпределението и евентуалната колокализация на цитоскелетни белтъци и маркери на митохондриите и апарата на Голджи в перинуклеарната цитоплазма при герминативни клетки от формиращи се примордиални фоликули в овариални срези от новородени мишки.
4. Изследване на разпределението и евентуалната колокализация на цитоскелетни белтъци и маркери на митохондриите и апарата на Голджи в междуклетъчни мостове между герминативните клетки при формиране на примордиални фоликули в овариални срези от новородени мишки.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Използван биологичен материал

За целите на нашите изследвания са използвани серийни срези от човешки поликистозни яйчници, както и серийни срези на яйчници от новородени мишки BALB/c (еднодневни и двудневни), включени в парафин. Човешките овариални срези са получени като съпътстващо изследване към стандартния хистопатологичен анализ на материал, биопсиран по време на лапароскопска фенестрация на яйчника при жени с PCOS. Използвани са серийни срези от 8 пациентки с PCOS според установено хистопатологично заключение от Лабораторията по обща и клинична патология на „Майчин дом“ - София. Получаването на допълнителни срези за целта на този анализ е одобрено от КЕНИМУС (Комисията по етика на научните изследвания в Медицински университет – София) и е предварително декларирано от пациентките чрез подписване на информирано съгласие за това. Фиксирането, включването на биопсирания материал, рязането на срезите и тяхното депарафиниране следват обичайната методика на Лабораторията по клинична патология на СБАЛАГ „Майчин дом”. Работата е финансирана по Договор 37 – 2012 към Медицински университет – София.

Работата с лабораторни мишки е част от следващ научен грант към Медицински университет – София: Договор 16 – 2015. Изолирането на яйчниците, фиксирането им, рязането и монтирането на срезите са извършени в Секция Имунобиология на размножаването, Институт по биология и имунология на размножаването (ИБИР) към Българската академия на науките (БАН). Яйчниците от новородени мишки, линия BALB/c, са изолирани, фиксирани в 10% неутрален формалин и включени в парафин през първия и втория ден след раждането. Парафиновите блокчета са нарязани на срези с дебелина 5µm и монтирани върху адхезивни микроскопски стъкла. Пригответени са общо 195 овариални среза от новородени мишки, 86 от които от еднодневни и 109 от двудневни мишки. Препаратите са подложени на последваща обработка и анализ, както е описано в следващите части на раздела.

В изследванията на зреещи миши овоцити също са използвани мишки от линията BALB/c, към които има специфични изсквания: женски предпубертетни, девствени мишки на възраст 22-25 дни. Те са подложени на хормонална стимулация по схема, за да бъдат изолирани миши яйцеклетки в различна степен на мейотична зрялост. Животните са осигурени от вивариума на Експериментална и развъдна база за опитни животни – гр. *Сливница*.

Работата с миши яйчници и изолирани миши овоцити, като проектно финансирана от Медицински университет – София, е одобрена от КЕНИМУС.

Работата по обработка на срезите и изолираните овоцити, тяхното флуоресцентно оцветяване, епифлуоресцентно наблюдение и анализът на получените резултати е проведена изцяло в Катедра Биология на Медицински факултет при Медицински университет – София. Лазерната сканираща конфокална микроскопия на избрани обекти е провеждана в Лабораторията за конфокална и светлинна микроскопия на ИБИР, БАН.

2. Реактиви за специфично белязване на клетъчни компоненти

2.1. Първи антитела

- Monoclonal Anti-Pan Cytokeratin (миши IgG1 изотип), клон No. PCK-26, срещу цитокератини 1, 5, 6 и 8, (Sigma-Aldrich), в работно разреждане 1:300;
- Polyclonal Anti-Vimentin (заешко антитяло), в работно разреждане 1:1000 пъти;
- Monoclonal Anti-Vimentin (миши IgM изотип), клон Vim 13.2, (Sigma – Aldrich, Германия), в работно разреждане 1:200;
- Polyclonal anti-PCM-1 (заешко антиляло), разпознава N-крайния домен на белтъка, (Santa Cruz Biotechnology, USA), в работно разреждане 1:300;
- Anti-Voltage dependent anion channel 1 / VDAC1 (мише IgG2a антитяло), срещу белтъка VDAC1, образуващ канали във външната митохондриална мембрана, (Quartett, Германия), в работно разреждане 1:100;

- Anti-Golgi peripheral membrane protein p65/GRASP65 (заешко IgG антитяло), разпознава Голджи цистерни в широк набор еукариоти (Quartett, Германия), в работно разреждане 1:40;
- Anti-DEAD box protein 4 / DDX4– заешко IgG антитяло, срещу РНК хеликаза, характерна за герминативни клетки в широк набор еукариоти, (Quartett, Германия), в работно разреждане 1:40;
- моноклонално анти- α -тубулиново антитяло (мише, от клас IgG1), клон DM1A, (Sigma – Aldrich, Германия), срещу α -тубулин в широк набор еукариоти, в работна концентрация $0,5 \div 1 \mu\text{g/ml}$.

2.2. Втори антитела

- козе антитяло срещу заешки IgG, белязано с FITC, (Sigma – Aldrich, Германия), в работно разреждане 1:80;
- козе антитяло срещу миши IgG, белязано с FITC (Sigma – Aldrich, Германия), в работно разреждане 1:200;
- козе антитяло срещу миши IgG, белязано с TRITC (Sigma – Aldrich, Германия), в работно разреждане 1:60;
- козе антитяло срещу заешки IgG, белязано с TRITC (Sigma – Aldrich, Германия), в работно разреждане 1:500.

2.3. Други реактиви за визуализация на клетъчни компоненти

- фалоидин – TRITC (Sigma – Aldrich, Германия) с работна концентрация $1 \mu\text{g/ml}$;
- НОЕСНСТ (33258) (Sigma – Aldrich, Германия) с работна концентрация $1 \mu\text{g/ml}$;
- хематоксилин и еозин за стандартно хистологично оцветяване (Имунобиология на размножаването, ИБИР, БАН).

3. Допълнителни реактиви, разтвори и буфери

- суперблок – Super Block – блокира неспецифично фоново светене, (ScyTek, USA);

- FITC-Protein Blocking – блокира неспецифично свързване на FITC-конюгирани антитела в тъканни проби, (Quartett, Germany);
- нормален кози серум – блокира неспецифично свързване на антителата (Sigma – Aldrich, Германия);
- ксилол;
- низходяща алкохолна редица – 100%, 96%, 90%, 80% и 70% етанол, разтворен в dH₂O;
- възходяща алкохолна редица – 70%, 80% и 96% етанол, разтворен в dH₂O;
- цитратен буфер – Bio SB 20x immuno/DNA retriever with citrate (Bio SB, USA) и dH₂O в съотношение съответно 1:10;
- dH₂O за промиване;
- миеш буфер – PBS (pH 7,2) (Sigma – Aldrich, Германия);
- инкубиращ буфер (за антителата, използвани за овариалните срези) - PBS (pH 7,2) + 0,3% BSA + 0,02% Na азид (Sigma – Aldrich, Германия);
- влажна камера – в петри с капак се поставя навлажнена филтърна хартия;
- 100% Polyvinyl alcohol (Fluka, Германия);
- серия от разреждания на поливинил алкохол – 5%, 10%, 30% и 50%;
- Merional (IBSA, Италия) – човешки менопаузен гонадотропин, пречистен от урината на жени в менопауза. Има 1:1 фоликулостимулираща и лутеинизираща активност.
- Pregnyl (Organon, Холандия) – човешки хорионен гонадотропин, пречистен от урината на бременни жени. Има лутеинизиращо действие. Предназначението му беше да предизвика завършване на овоцитното зреене и овулация.
- хранителна среда Leibovitz (Sigma – Aldrich, Германия) за дисекция на яйчници. Към нея се добавят:
 - 3mg/ml BSA (Sigma – Aldrich, Германия);
 - 2,5µg/ml инсулин (Sigma – Aldrich, Германия);
 - 5µg/ml трансферин (Sigma – Aldrich, Германия).
- хиалуронидаза (Sigma – Aldrich, Германия) - За отстраняването на кумулуса, в работна концентрация 0,5 mg/ml;

- Миеш буфер I – PBS (pH 7,2) + 0,3 % BSA (Sigma – Aldrich, Германия);
- Миеш буфер II – PBS (pH 7,2) + 0,3 % BSA + 0,02% Na азид (Sigma – Aldrich, Германия);
- Миеш буфер III – PBS (pH 7,2) + 0,3 % BSA + 1 µl/ml Tween 20 (Sigma – Aldrich, Германия);
- Фиксатор – 4% PFA (Sigma – Aldrich, Германия) + 0,04% Тритон X-100, разтворени в PBS.

4. Използвани специфични апарати, консумативи и лабораторни съдове

- Водна баня (GDR, Германия);
- CO₂ инкубатор Hera cell 150 (Heraeus, Германия);
- ламинарен бокс (Flow laboratories, САЩ);
- топла масичка (Labotect, Германия);
- стереомикроскоп (Zeiss, Германия);
- ембриологични петрита (Corning, САЩ);
- 96 ямкови стерилни плаки със заоблено дъно (Corning, САЩ);
- 0,22µm бактериални филтри (Corning, САЩ);
- източени на пламък стъклени пастъорки, приготвени в момента в лабораторията;
- Микроскоп Zeiss Axioskop 20 с приставка за флуоресцентна микроскопия и фотокамера (Zeiss, Германия);
- Лазерен сканиращ конфокален микроскоп LeicaTSC SPE с модул за LCM5 Pascal.

5. Използвани лабораторни методи:

5.1. Депарафиниране и хидратиране на овариалните срези

- Стъклата се поставят в три последователни кювети с ксилол, като във всяка престояват по 10 мин (след тази стъпка срезите не бива да се оставят да изсъхнат);

- Следва третиране с етанол в низходяща алкохолна редица - по 5 мин във всеки разтвор;
- Срезите се оставят за 5 мин в dH₂O;
- Варене на срезите в цитратен буфер (за разкриване на антигените) за 20 мин на 90 °C;
- Следва охлаждане на срезите на стайна температура до избистряне на разтвора;
- Стъклата се промиват трикратно за по 5 мин в PBS буфер.

5.2. Блокиране на неспецифична флуоресценция

Приготвя се влажна камера, в която препаратите да бъдат поддържани влажни по време на обработката. Тя представлява петри с капак, в което е поставена навлажнена филтърна хартия.

- Човешките овариални срези се накапват с нормален кози серум за блокиране на неспецифичното флуоресцентно светене за 20-30 мин във влажната камера;
- Мишите срези се инкубират с FITC блок във влажната камера за 15 мин;
- Стъклата се промиват трикратно за по 5 мин в PBS буфер;
- Допълнително, отново във влажна камера, мишите срези се третират със суперблок за 15 мин и се промиват трикратно за по 5 мин в PBS буфер.

5.3. Флуоресцентно белязване за специфични клетъчни компоненти в яйчниковите срези

- Препаратите се третират с първи антитела за белязване на специфичните клетъчни компоненти. Работи се отново във влажна камера, инкубацията трае 60 мин;
- Четирикратно промиване на стъклата за по 5 мин в PBS буфер;
- Инкубиране на препаратите в разтвор, съдържащ конюгирани с флуорохром втори антитела (60 мин, влажна камера);
- Трикратно промиване за по 5 мин в PBS буфер;

- Контраоцветяване с Hoechst 33258 за 5 мин;
- Трикратно промиване за по 5 мин в PBS буфер;
- Покриване на срезите с 100% Polyvinyl alcohol. За стъкла с размери 22x32mm се накапват 15 µl и се поставя покривно стъкло;
- Препаратите се съхраняват на тъмно при 4°C до момента на наблюдението;
- Микроскопирането се извършва най-рано на следващия ден.

В различните опитни постановки са прилагани следните комбинации от реактиви за специфично откриване на клетъчни компоненти:

- Анти-цитокератиново и анти-виментиново антитяло + Hoechst 33258;
- Анти-PCM-1 и анти-VDAC-1 антитяло + Hoechst 33258;
- Анти-GRASP65 антитяло и фалоидин-TRITC + Hoechst 33258;
- Анти-PCM-1 и анти-цитокератиново антитяло + Hoechst 33258;
- Анти-PCM-1 и анти-виментиново антитяло + Hoechst 33258;
- Анти DDX4 антитяло и фалоидин-TRITC + Hoechst 33258.

В случаите с едновременно белязване на два компонента чрез антитела едното второ антитяло е FITC, а другото – TRITC конюгат. При визуализиране на микрофиламенти второто антитяло срещу другия изследван компонент е FITC конюгат и в разтвора му се прилага фалоидин TRITC.

5.4. Оцветяване с хематоксилин – еозин

- Препаратите се депарафинират и хидратират, както е посочено в т. 4.5.1., но срезите не се варят в цитратен буфер;
- Следва оцветяване с хематоксилин за 1-2 мин във влажна камера;
- Диференциране на течаща вода за около 60 мин.;
- Оцветяване с еозин за 4 мин във влажна камера;
- Обезводняване във възходяща алкохолна редица: 70%, 80% и 96% разтвор за няколко секунди и в 100% разтвор за 2-5 мин.;
- Изчистване на алкохола в две последователни кювети с ксилол. Срезите престояват във всяка по 10 мин;
- Включване в смола и поставяне на покривни стъкла.

5.5. Получаване на зреещи овоцити

Ден първи: Яйчникова стимулация на мишките:

Мишките се инжектират интерперитонеално между 16 – 17 часа следобед с фоликулостимулиращ хормон. На всяка мишка се инжектират по 7,5 IU разтворени в 100µl физиологичен разтвор. Използваният хормонален препарат е Merional – човешки уринарен препарат, който има 1:1 фоликулостимулираща и лутеинизираща активност (IBSA, Италия).

Ден втори :

- Приготвяне на хранителната среда;
- Стерилно филтруване на средата през 22µm бактериален филтър;
- Оставяне на средата за една нощ в CO₂ инкубатор.

Ден трети: Получаване на овоцити след хормонална стимулация:

- 40 часа след инжектирането с Merional , мишките се убиват с цервикална транслокация след упояване с етер. Отваря се кожата откъм гърба, където яйчниците прозират през перитонеума. Яйчниците се отпрепарират и се поставят в петри с физиологичен разтвор. С помощта на пинсети се прехвърлят в ембрионално петри със среда Leibovitz. Фоликулите се пунктират с помощта на инсулинова спринцовка с игла. Избират се големи антрални фоликули, като се работи със стереомикроскоп и топла масичка. Получават се яйцеклетки, които могат да са голи или в комплекс с кумулусни клетки. Всички се преместват с източена на пламък пастърка в ново петри с Leibovitz.
- Отстраняване на кумулусните клетки с хиалуронидаза, разтворена в Leibovitz, яйцеклетките се оставят в тази среда в инкубатора за около 5 – 10 минути, след което кумулусът се отстранява механично чрез пипетиране под стереомикроскоп.
- Фиксиране на овоцитите. Овоцитите се преместват в 96 ямкова плака, като се измиват последователно в 3 ямки с по 100 µl миеш буфер I. Всяко плакнене е за 5-10 мин на 37°C. Следва преместването на яйцеклетките във фиксатора, като се инкубират за 45-60 минути на 37°C. След изтичане на времето овоцитите се измиват в две последователни ямки със 100 µl

миещ буфер I (отново миенето е за 5-10 мин на 37°C) и се преместват в нова ямка с 100 µl миещ буфер II. Така фиксираните клетки могат да се съхраняват за една седмица в хладилник на 4°C, като плаката се запечатва с парафилм.

Визуализация на центриолни сателити, тубулин и хроматин.

Центриолните сателити и тубулинът се отчитат след непряка имуноцитохимична реакция. Хроматинът се оцветява с флуоресцентно багрило Hoechst 33258, което се свързва специфично с ДНК. Работи се в 96 ямковата плака.

- след като клетките са фиксирани, следва инкубиране на яйцеклетките с първи антитела срещу РСМ-1 и тубулин, разтворени в буфер I (на 37°C за 45 минути);
- миене 2 пъти по 10 минути в миещ буфер III;
- прехвърляне в трета капка със същия буфер за 20-30 минути;
- инкубиране на овоцитите за 45 мин в разтвор на миещ буфер I, съдържащ вторите антитела, белязани с различни флуорохроми (анти-миши FITC-конюгат и анти-заешки TRITC конюгат) и Hoechst 33258;
- От този момент плаките се пазят на тъмно;
- Трикратно промиване за по 10 минути в миещ буфер III;
- прехвърляне в четвърта капка със същия буфер за 20-30 минути на 37°C;
- включване в поливинил алкохол с нарастваща концентрация – 5%, 10%, 30% и 50%, разтворен в миещ буфер II; яйцеклетките се поставят за по 10 минути в 5%, 10% и 30% поливинил алкохол. 50%-ният поливинил алкохол се слага в ембриологично петри, където клетките се оставят за 15 минути;
- прехвърляне на яйцеклетките на предметни стъкла: за покривни стъкла с размери 22x32mm се капят 15 µl 100% поливинил алкохол; в тази капка веднага се преместват овоцитите и се поставя покривно стъкло;
- Препаратите се съхраняват на тъмно при 4°C до момента на наблюдението. Микроскопирането се извършва най-рано на следващия ден.

5.6. Наблюдение и документиране на резултатите

Всички препарати първоначално се анализират чрез епифлуоресценция. Използван е епифлуоресцентен микроскоп Axioskop 20 с приставка за флуоресцентна микроскопия и фотокамера (Zeiss) при възбуждащ филтър 560 nm за TRITC, 490 nm за FITC и 365 nm за Hoechst.

Избрани препарати и подходящи участъци от тях са подложени на лазерна сканираща конфокална микроскопия, провеждана в Института по биология и имунология на размножаването на БАН. Получаните резултати позволяват прецизен анализ на проследяваните структури както при човешките овариални срези, така и при мишите срези и единични яйцеклетки. Стандартната дебелина на оптичните срези е 0,2 микрометра. Използван е микроскоп LeicaTSC SPE с модул за LCM5 Pascal.

РЕЗУЛТАТИ

1. Изследване на цитокератиновите и виментиновите интермедиерни филаменти при поликистоза на яйчника (PCOS) – присъствие и характерна структура на телце на Балбиани в примордиалните фоликули

Изследването обхваща серийни срези от 8 пациентки с PCOS според установено хистопатологично заключение от Лабораторията по обща и клинична патология на „Майчин дом“ - София. При две от пациентките са получени данни за локализация на интермедиерните филаменти само в овариалната тъкан поради липса или оскъден брой фоликули в срезите. Един от случаите показва неподходящо качество на срезите, което не позволи анализ на този материал. Анализът обхваща серийни овариални срези от останалите пет пациентки с PCOS, при които яйчниковата тъкан показва изобилие от примордиални фоликули.

Срезите са наблюдавани и документираны чрез епифлуоресценция, след което най-интересните находки са прецизно анализирани чрез лазерна сканираща конфокална микроскопия.

Получените резултати в цялостната яйчникова тъкан показват присъствие на цитокератини и виментин в периферния слой на яйчника, както и в соматичните клетки, обкръжаващи овоцита в примордиалните фоликули. Данни за присъствие на белтъци на интермедиерните филаменти във фоликулните клетки на човешки примордиални фоликули са получени чрез лазерна сканираща конфокална микроскопия. Представени са на Фигура 1.

Получени са оригинални данни за присъствието на белтъците на интермедиерните филаменти в примордиалните фоликули и в самите овоцити. При серийните срези е наблюдавана имунофлуоресцентна реакция за колокализация на цитокератини и виментин със специфичен вид в перинуклеарния район на овоцита. Установено е присъствие на грануларна структура в съседство с ядрото на овоцита. Тя е образувана от близки по размер гранули, подредени във форма на полукръг или кръг. Резултати от епифлуоресцентна детекция на перинуклеарни агрегати, в които се наблюдава колокализация на цитокератини и виментин, са показани на Фигури 2, а резултат от детекция чрез лазерна сканираща конфокална микроскопия – на Фигура 3. Структурата на перинуклеарния агрегат съответства на асиметрично струпване от органели, познато като телце на Балбиани.

2. Особенности на овогенезата и фоликулогенезата в неонатален миши яйчник – характерни морфологични разлики в срези от едnodневни и двудневни мишки

Яйчниците на новородените мишки предоставят възможност за изучаване на началните фази от образуването на примордиални фоликули поради характерни особености на развитието на герминативните клетки в мишия яйчник. Анализирани са общо 195 овариални среза от новородени мишки, 86 от които от едnodневни и 109 от двудневни мишки. Макар разликата във възрастта на мишлетата да не е значителна, в яйчниците се наблюдават значими разлики в организацията на герминативните и соматичните клетки при формирането на примордиални фоликули.

Стандартните хистологични срези са оцветени по класически метод с хематоксилин-еозин за добиване на представа за цялостната структура. Успоредно са наблюдавани срези, оцветени с флуорохрома Hoechst 33258, за оценка на състоянието на хроматина.

В срезите от едnodневни мишлета все още се наблюдават овоцити в началото на профаза I на мейозата, преди настъпването на периода на покой, наречен dictyate. Техният хроматин има нехомогенна структура, с ясно обособени струпвания кондензиран хроматин, видими в овоцитното ядро и очертаващи периферията му. Видът на хроматина кореспондира с периодите на мейотичната профаза I до пахитен включително. В някои овоцитни ядра се наблюдава единично хроматиново струпване, разположено близо до ядрената периферия. Процесът на образуване на примордиални фоликули е сравнително ранен: соматичните клетки са относително едри, с вретеновидна форма и ограждат овоцитите частично. В периферията на яйчника на едnodневните мишки се наблюдават обособени групи овоцити (зародишни гнезда). Фигура 4 представя срез от едnodневна мишка със зародишни гнезда. В тези зародишни гнезда овоцитите имат сходен вид на хроматина, съответстващ на профазни хромозоми, които са видимо в синхронна мейотична фаза – периодите преди dictyate на профаза I.

Синхронно развитие показват и овоцитите от медуларната зона на яйчника на едnodневни мишки, но там не се наблюдава повече обединение в зародишни гнезда. Характерният вид на овоцитните и соматичните ядра от медуларната зона е показан на Фигура 5. Нехомогенната структура на овоцитните ядра се дължи на хромозомна кондензация. Соматичните клетки все още не обгръщат изцяло овоцитите.

В яйчниците на двудневните мишлета процесът на образуване на примордиални фоликули е напреднал и овоцитите са почти напълно оградени с по-плоски и удължени клетки. Хроматинът на овоцитите придобива по-хомогенен вид, съответстващ на настъпването на dictyate. Видимите очертания на хромозоми и техни струпвания се губят. Обичаен вид на яйчниковата тъкан в срези от двудневни мишлета е показан на Фигура 6. В някои яйчници се

наблюдават и по-едри, добре оформени примордиални фоликули, както показва Фигура 7. Те се откриват най-вече в медуларната зона на яйчника.

3. Локализация и асиметрично разпределение на фибриларен актин и комплекс на Голджи в овоцити от новородени мишки

Изследвано е взаимното разположение на комплекса на Голджи и фибриларния актин в яйчникови срези от едnodневни и двудневни мишки. Сравнението на данните показва характерни разлики, свързани с динамиката на фоликулогенезата в периода около раждането при мишка.

Комплексът на Голджи и фибриларният актин показват характерна локализация в срезите от яйчници на едnodневни и двудневни мишлета. Данните за тези овоплазмени компоненти в яйчници от едnodневни мишки са представени на Фигура 8. Получена е флуоресцентна реакция за комплекс на Голджи, показана на Фигура 8А. В овоцитите Голджи материалът е разположен в перинуклеарния район. Структурата на перинуклеарното Голджи струпване показва специфичен пръстенен или полулунен вид. Флуоресцентна реакция за Голджи материал е регистрирана и във все още запазени цитоплазмени мостове, свързващи овоцитите в пространствата между клетките.

Флуоресцентната детекция на актин е показана на Фигура 8В. В овоплазмата микрофиламентите показват положителна реакция в периферията на овоцитите, както и спрегната с Голджи имунохистохимична реакция. Специфична кръгова или полупръстеновидна структура от актин се наблюдава в близост до овоцитното ядро и обгръща перинуклеарния Голджи. Актинът е асоцииран с Голджи маркера и образува пръстен или полукръг, вероятно стабилизиращ този асиметричен овоплазмен комплекс. Разпределението на комплекс на Голджи и на актин в овоцитната цитоплазма под формата на пръстеновидна структура е разпознато като телце на Балбиани. Фигура 8В показва взаимното разположение на Голджи и актин при формирането на телцето на Балбиани. Ясно се вижда, че микрофиламентите образуват допълнителна кръгова или полупръстеновидна структура, която обгръща перинуклеарния Голджи.

Локализацията на същите прицелни структури в срез на яйчник от двудневна мишка също показва асиметрично перинуклеарно разположение на комплекса на Голджи в овоцитите, но междуклетъчни мостове не се наблюдават повече, а микрофиламенти се разполагат в цитоплазмата и кортекса на овоцитите и в местата на контакт между соматичните клетки в примордиалните фоликули. Данни от лазерна сканираща конфокална микроскопия са представени на Фигура 9.

4. Локализация и динамика на РСМ-1 и митохондриален маркер в овариални срези от новородени мишки

Изследването на центриолния сателитен белтък РСМ-1 е проведено в срези от яйчници от едnodневни и двудневни мишки, като неговото характерно разпределение е съпоставено с детекция на митохондриалния маркер VDAC-1. Данните от двата вида овариални срези са сравнени за установяване на динамика в разпределението на двете структури в течение на ранната овогенеза – в процеса на оформяне на примордиалните фоликули.

В овариалните срези от едnodневни мишки е установена специфична локализация на РСМ-1 като асиметричен агрегат близо до ядрото. Забелязва се пространствена асоциация на перинуклеарния РСМ-1 със струпване на кондензиран хроматин, прилежащ към периферията на овоцитното ядро. Видът на РСМ-1 агрегата варира – среща се както под формата на двойна, така и като по-широка единична структура. В някои от срезите се наблюдават два флуоресцентни сигнала за РСМ-1, асоциирани с кондензиран хроматин, но на разстояние един от друг.

Локализацията и разпределението на митохондриалния маркер VDAC-1 показва тясна асоциация с центриолния сателитен белтък РСМ-1 в овоцитите от едnodневни мишки. Флуоресцентна реакция за VDAC-1 е установена и в областта на контакт на овоцита със съседна клетка (Фигури 10 и 11).

В срезите на яйчници от двудневни мишки разпределението на центриолния сателитен белтък РСМ-1 и митохондриалния маркер VDAC-1 показва разлики, свързани с по-напредналия етап от оформянето на примордиалните фоликули. Разликите са значителни, въпреки краткия 24-часов

интервал. В овоцитите, които прогресивно навлизат в периода на мейотичен арест (dictyate), хроматинът е хомогенен, реакцията за PCM-1 е по-слабо дискретна, а разпределението на митохондриалния маркер става по-дифузно и асоциацията му с PCM-2 отслабва.

В срезите от двудневни мишки флуоресцентната реакция за PCM-1 показва сърповидна структура, която покрива частично ядрото. Подобен вид на структурата предполага разстилане върху част от овоцитното ядро и вероятно е под формата на шапка. Сърповидният PCM-1 е равномерен и относително еднороден при някои овоцити, докато при други все още присъства малък единичен или двоен агрегат.

Митохондриалният маркер VDAC-1 при двудневни мишки не показва повече тясна асоциация с PCM-1 и се наблюдава на по-широка площ, като при някои овоцити все пак е съсредоточен от едната страна на ядрото, а при други има дифузно разпределение в овоплазмата. Характерният вид на PCM-1 и разпределението на VDAC-1 в овоцитите са представени на Фигура 12.

5. Сравнение на локализацията на PCM-1 и интермедиерни филаменти в срези от яйчници на едnodневни и двудневни мишки

Едновременната визуализация на PCM-1 и интермедиерни филаменти цели да установи взаимното разположение на двата вида структури по време на ранната фоликулогенеза. Взаимодействието на центриолния сателитен протеин PCM-1 с цитокератини и виментин носи важна информация за формирането и поддържането на асиметрията в овоцитите при формирането на примордиални фоликули.

Цитокератини

В срезите от яйчници на едnodневни мишки цитокератините показват пространствена връзка с PCM-1, като при това оформят овална структура с перинуклеарна позиция. Тази асиметрична спрямо ядрото позиция и овалната форма на структурата, която дава специфична флуоресцентна реакция за цитокератини, дава основание да я разпознаем като част от телцето на Балбиани.

Цитокератините показват флуоресцентна реакция и в кортикалната цитоплазма на овоцита, както и в соматичните клетки.

Визуализацията на реакция за цитокератини и РСМ-1 е представена на Фигура 13. На нея е представен единичен фоликул, в който реакцията за РСМ-1 е под формата на двоен агрегат, асоцииран с хроматина на овоцита (13Б). Реакцията за цитокератини показва както колокализация с РСМ-1, така и овална цитокератинова структура в непосредствена близост и свързана с него. Оптичният срез, показващ структурата на РСМ-1 и цитокератините, е комбиниран с различен оптичен образ, на който хроматинът е най-ясен. Така перинуклеарната позиция на комплекса РСМ-1 и цитокератини е съпоставена с хроматин в различна позиция. Резултатът доказва както участието на цитокератини в телцето на Балбиани, така и връзка между тях и РСМ-1.

В срезите от яйчници на двудневни мишки съпоставянето на цитокератините и РСМ-1 показва значителна разлика спрямо резултатите при едnodневните. Структурата на РСМ-1 е в съответствие с данните за неговата организация на този етап от ранната фоликулогенеза. Реакцията за цитокератини се разпростира като полукръг от едната страна на ядрото, но в по-малка степен от тази за центриолния сателитен белтък. При това структурата, която цитокератините формират, изглежда леко зърниста и образувана от отделни по-малки агрегати. Ясна реакция има и в овоцитния кортекс, както и в периферията на соматичните клетки и в местата на контакти между тях. Данните за разпределението на цитокератини и РСМ-1 са представени на Фигура 14.

Виментин

Наличието и вътреклетъчното разпределение на виментина е изследвано и сравнено с това на центриолния сателитен белтък РСМ-1 в срези от яйчници на едnodневни и двудневни мишки. Сравнението показва разлики в асоциацията на виментина с РСМ-1, както и разлики, свързани със специфичния момент от процеса на образуване на примордиалните фоликули в неонаталния яйчник.

Особеност в реакцията за виментин в срези от яйчници на едnodневни мишки е тясната му асоциация с РСМ-1 агрегатите и присъствието му в цитоплазмата на овоцитите, както показва Фигура 15.

В срезите от яйчници на двудневни мишки виментинът частично запазва своята асоциация с РСМ-1 в овоцитите, като засилена реакция за виментин се наблюдава в непосредствена близост с РСМ-1 и овоцитното ядро. Виментинът показва флуоресцентна реакция в овоплазмата, както и в цитоплазмата на соматичните клетки и в местата на контакт между тях. Разпределението на виментин, съпоставено с РСМ-1 в яйчниците на двудневни мишки е показано на Фигура 16.

6. Експресия на маркер за зародишна герминативна линия в срези от яйчници на едnodневни и двудневни мишки

Маркерен белтък за герминативна клетъчна линия DDX4 е изследван в двата вида овариални срези. В яйчниците на едnodневните мишки той се експресира в овоцитната цитоплазма, като образува струпване в периферията на ядрото, вероятно като част от телцето на Балбиани. В срезите от двудневни мишки маркерът проявява ясна овоплазмена локализация с хомогенен вид. Данните са представени на Фигура 17.

7. Локализация и динамика в разпределението на РСМ-1 по време на мейотичното зреене на миши овоцити

Белтъкът РСМ-1 на центриолните сателити беше изследван и в зреещи миши овоцити. Установена беше специфичната му локализация и динамиката в разпределението му в хода на мейотичното зреене в следпубертетния яйчник. Проследени са характерни стадии: възобновяване на мейозата след dictyate на профаза I, метафаза I, телофаза I и метафаза II на овоцитното зреене.

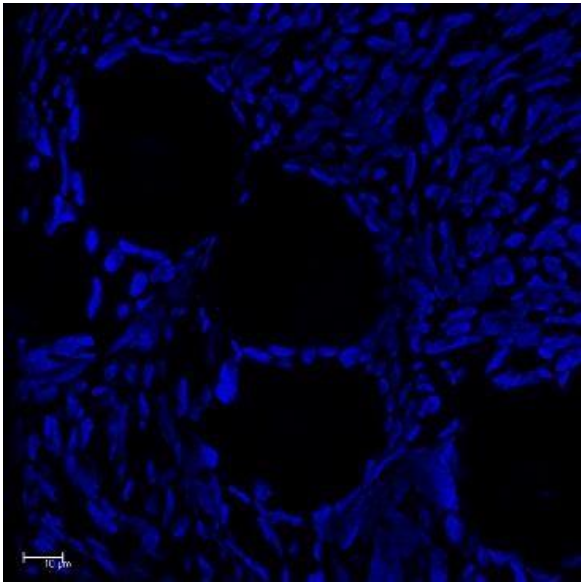
При възобновяването на мейотичното зреене в мишия следпубертетен яйчник перицентриоларният белтък РСМ-1 образува две струпвания периферно на кондензиращия се хроматин. Разпределението му е показано на Фигура 18.

Ясно се вижда напредваща кондензация на хроматина и визуализиране на овоцитните хромозоми, кореспондиращо с диакинетичния период на мейотичната профаза I: конюгиращите хромозоми са свързани чрез хиазми. Центриолният сателитен белтък РСМ-1 образува две сравнително дифузни струпвания в различни планове на оптичните срези – едно под хроматиновата група и едно над нея, като проявява склонност да се асоциира частично с хроматина.

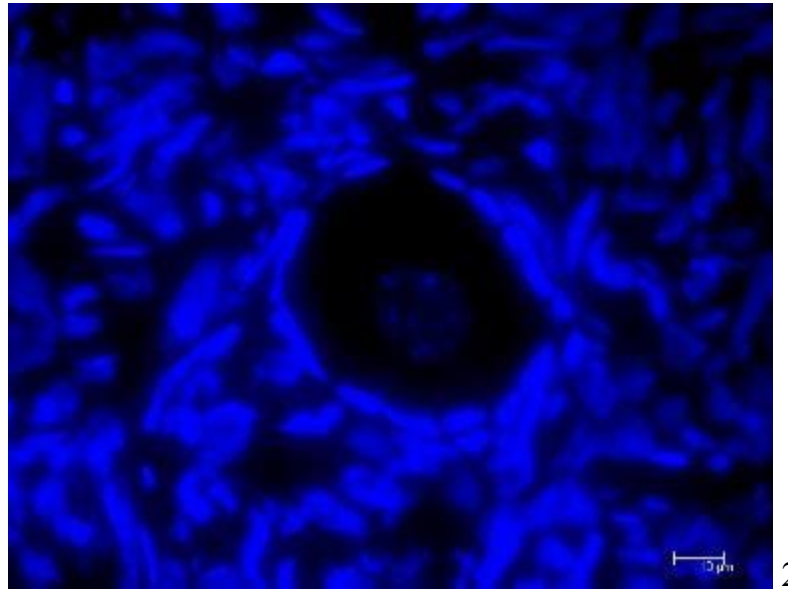
С напредването на мейотичното зреење белтъкът РСМ-1 се асоциира с микротубулите на мейотичното вретено по различен начин. В метафазното вретено той не остава само в полюсите, а се локализира и по дължината на микротубулите с предпочитание към кортикалната повърхност на вретеното. Фигура 19 показва асоциацията на РСМ-1 с тубулиновите нишки на мейотичното вретено.

С настъпването на телофаза I центриолният сателитен белтък РСМ-1 се изтегля към полюсите на вретеното, асоцииран повече с хроматина, отколкото с разпадащото се мейотично вретено. На Фигура 20 е показана мейотична телофаза I с имунофлуоресцентна реакция за РСМ-1 в областта на двете хроматинови групи – една за овоцита и друга с предстоящо отстраняване чрез отделяне на първото полярно телце. Отново се наблюдава леко изместване на реакцията към периферията на клетката.

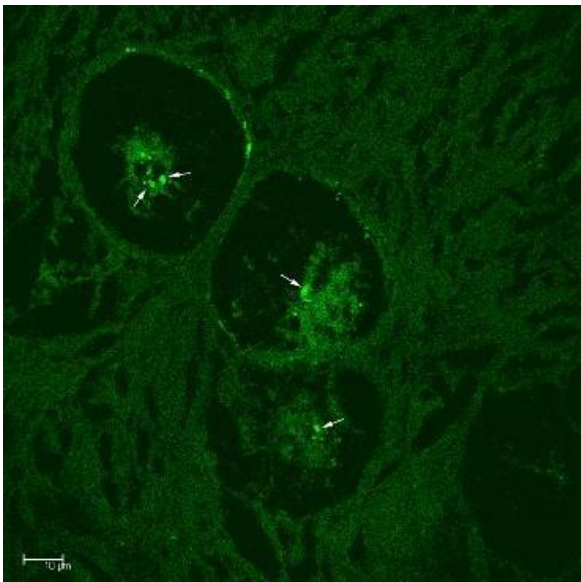
Въз основа на настоящите данни може да се допусне участие на РСМ-1 в установяването на ялната цитоплазмена асиметрия по време на прехода метафаза I – метафаза II, изразяваща се в периферно разположение на мейотичното вретено и осъществявана с участието на различни цитоскелетни белтъци. За категорично заключение по този въпрос обаче са необходими по-обстойни изследвания.



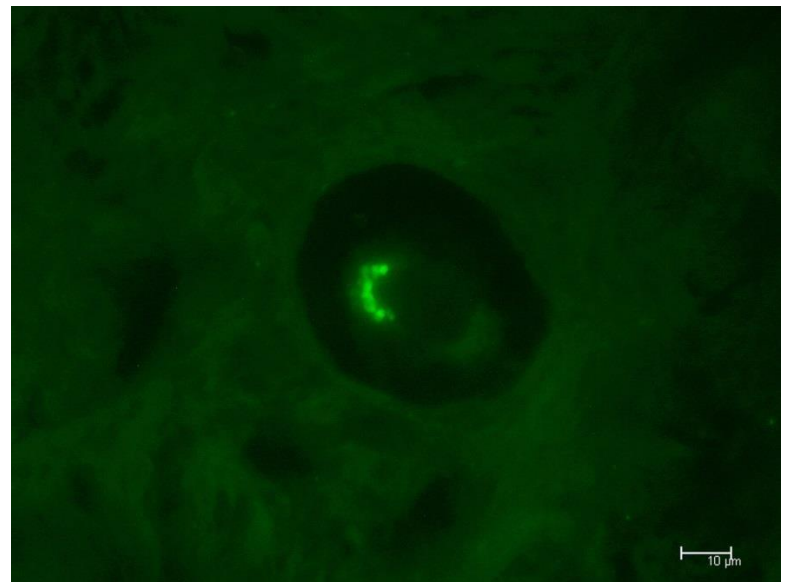
1A



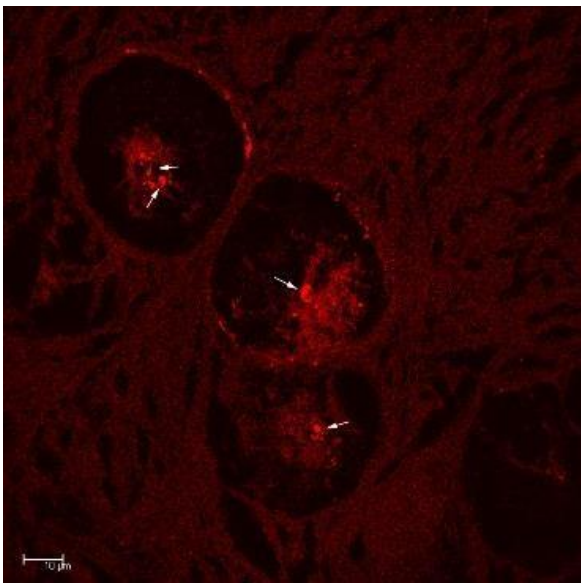
2A



1B



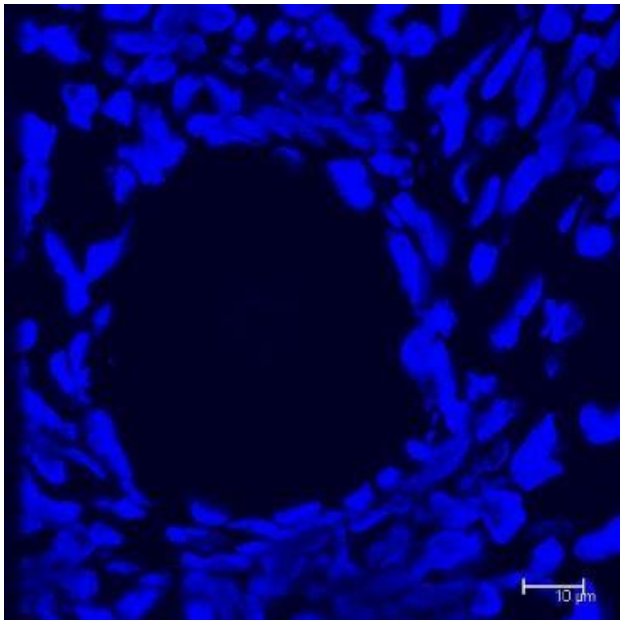
2B



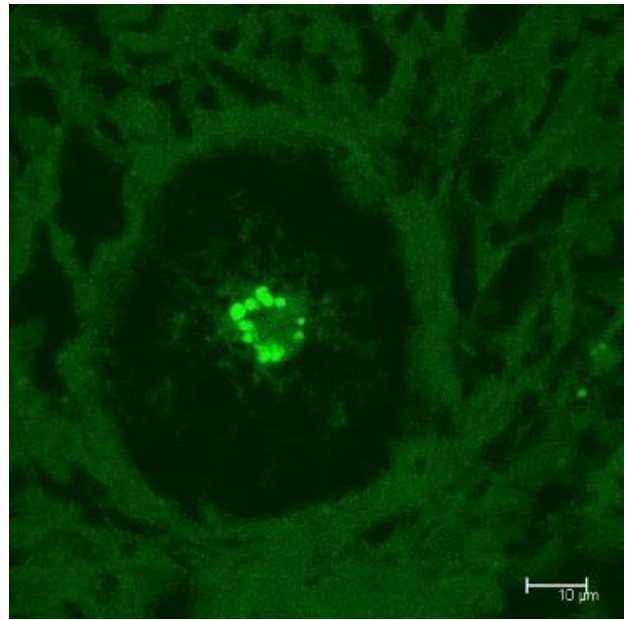
1B



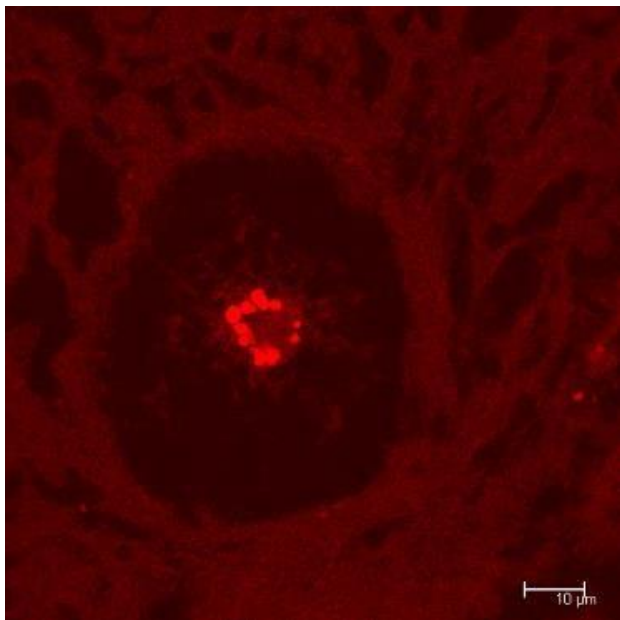
2B



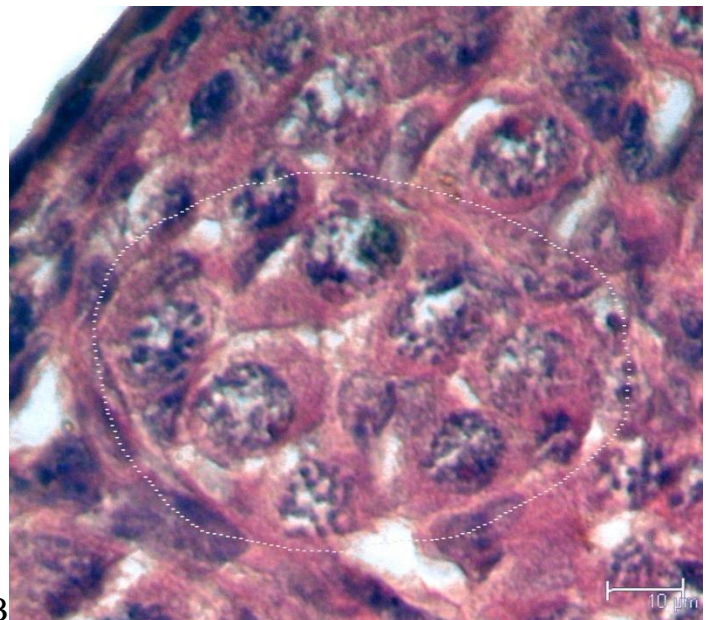
3A



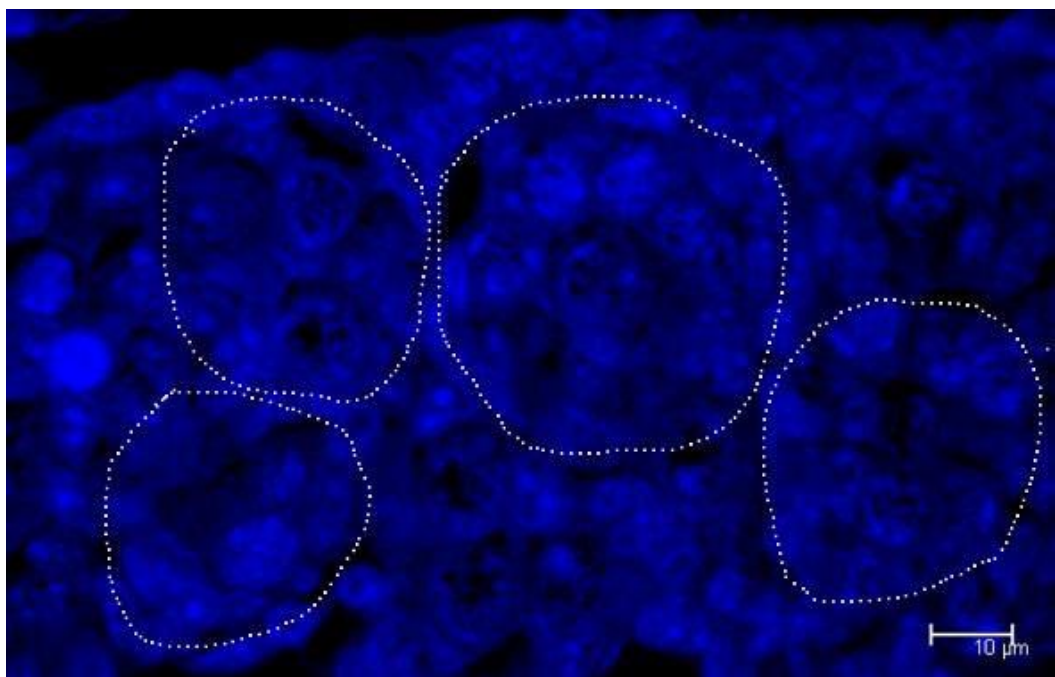
3B



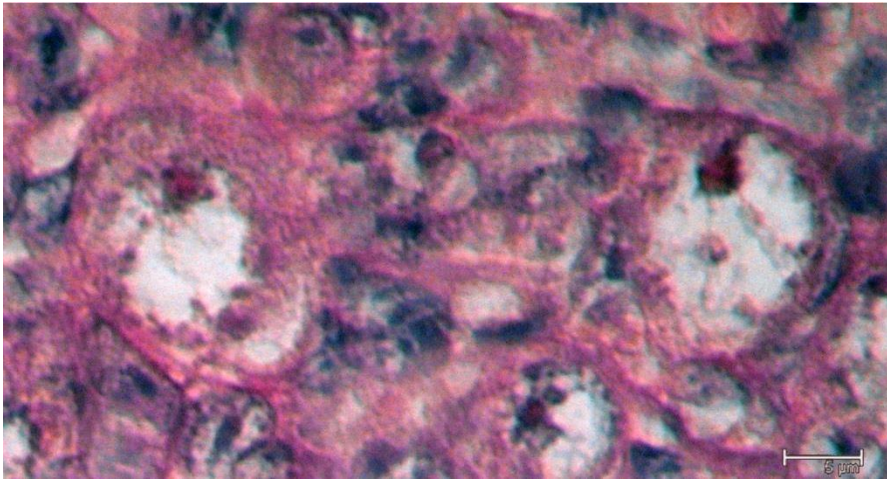
3B



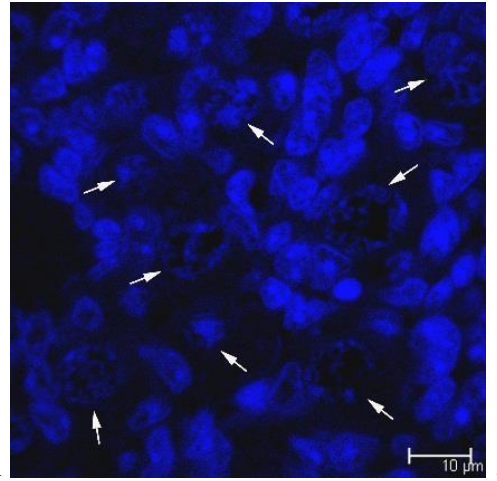
4A



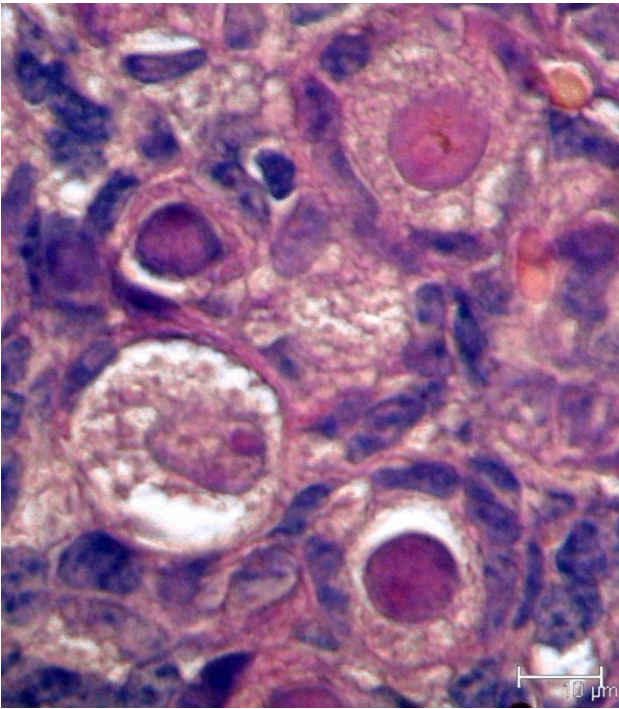
4B



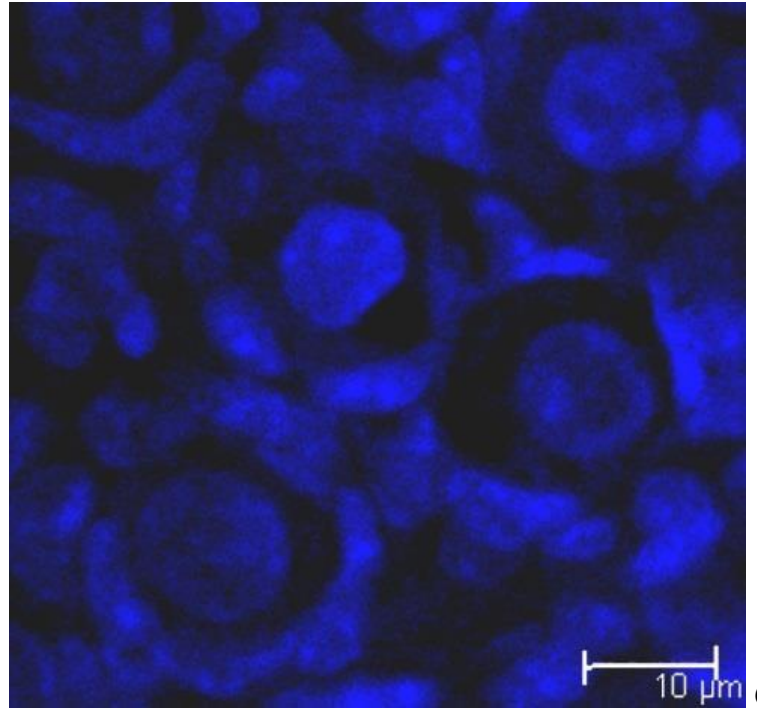
5A



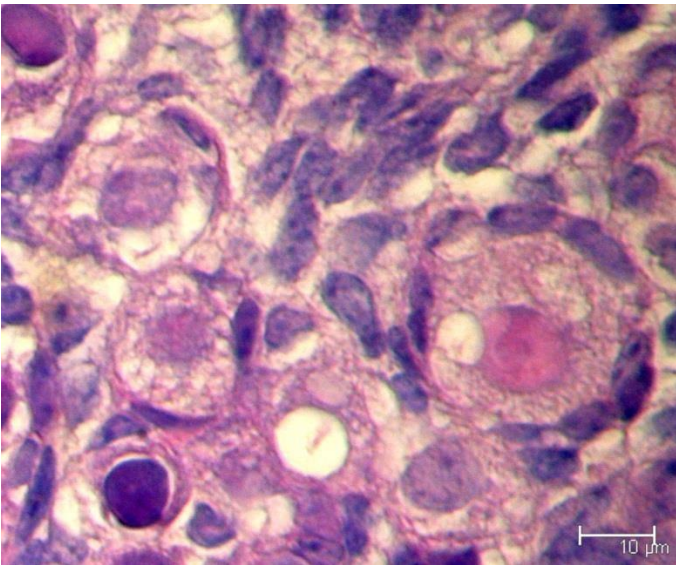
5B



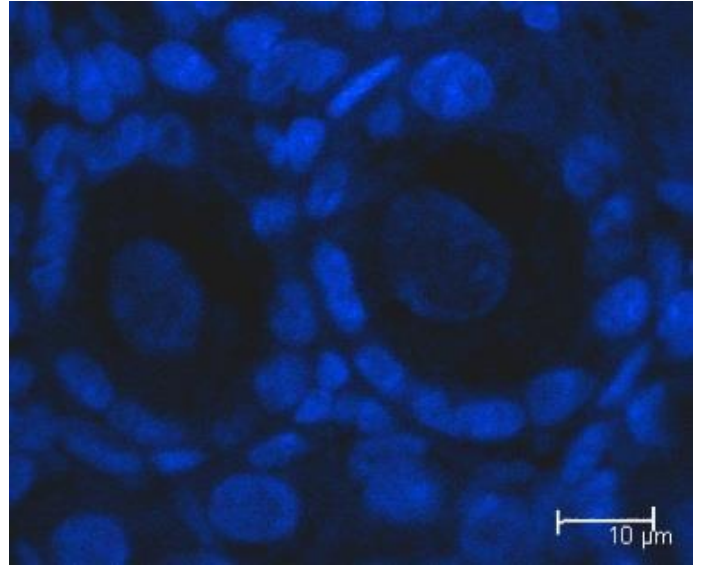
6A



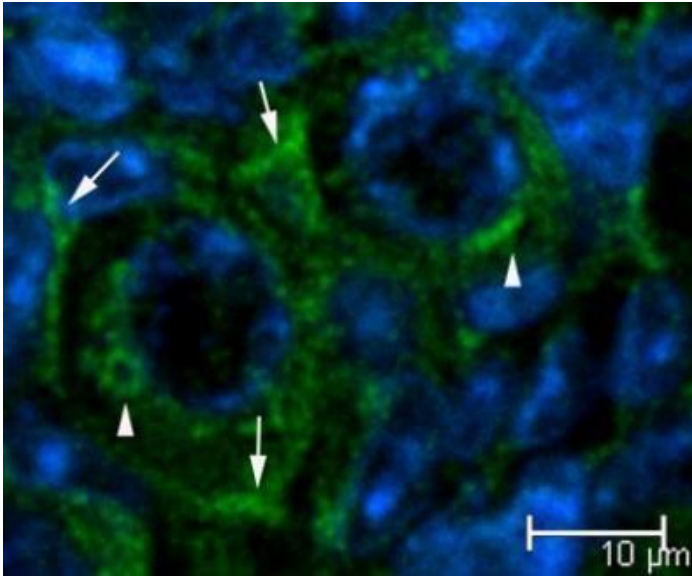
6B



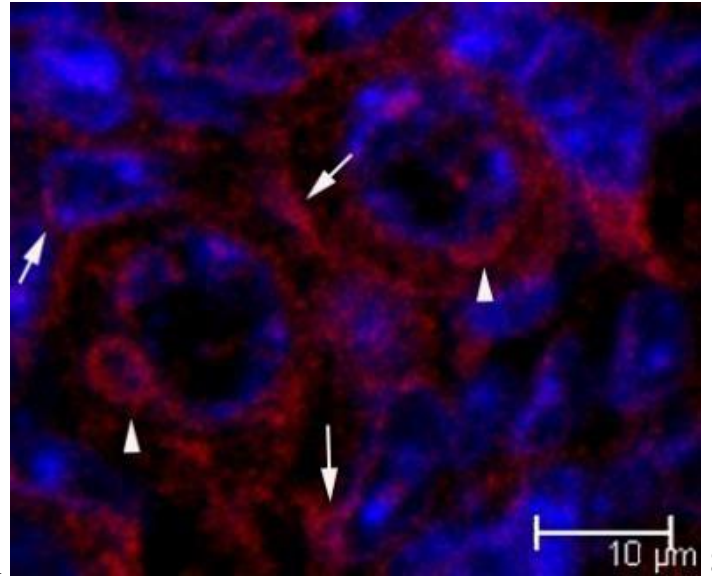
7A



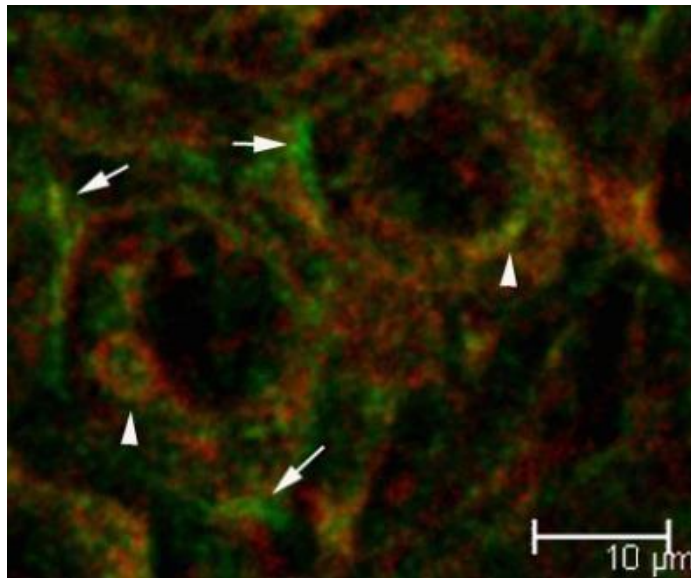
7B



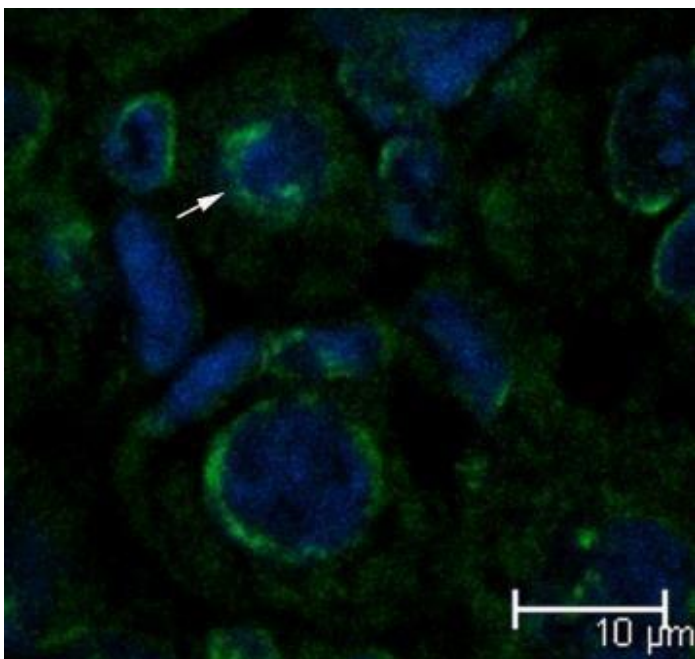
8A



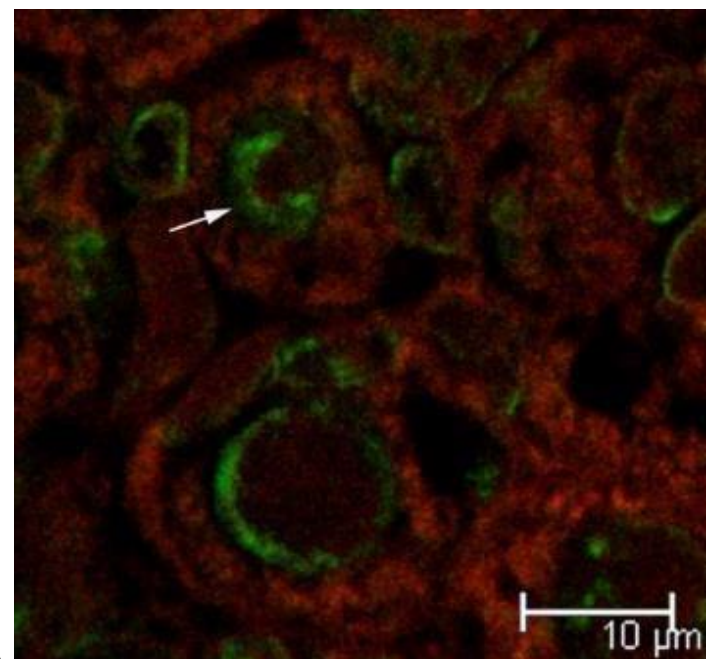
8B



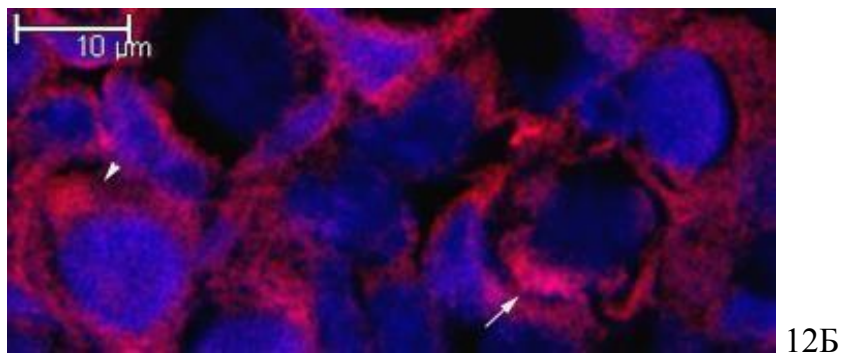
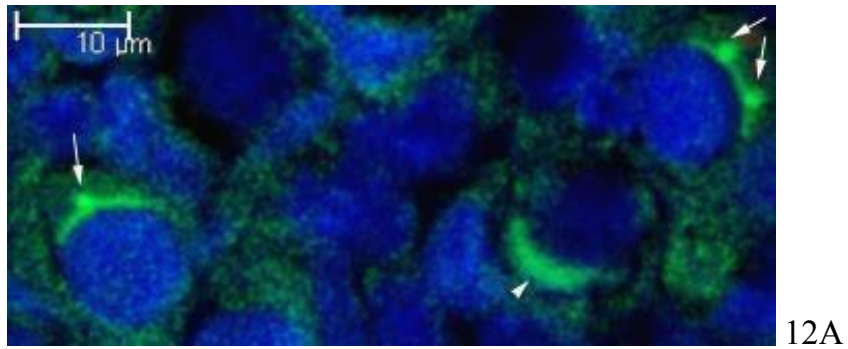
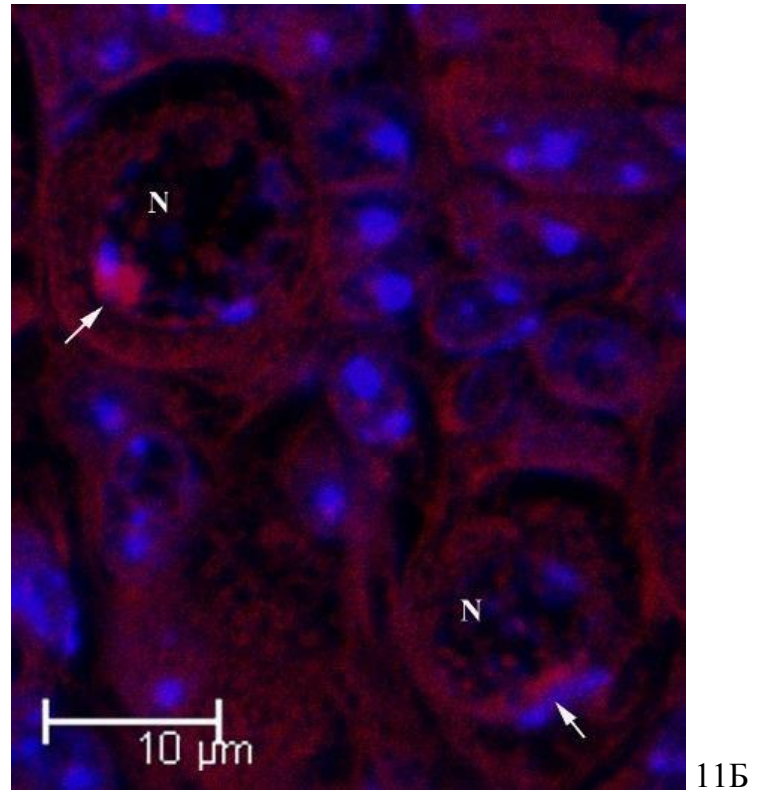
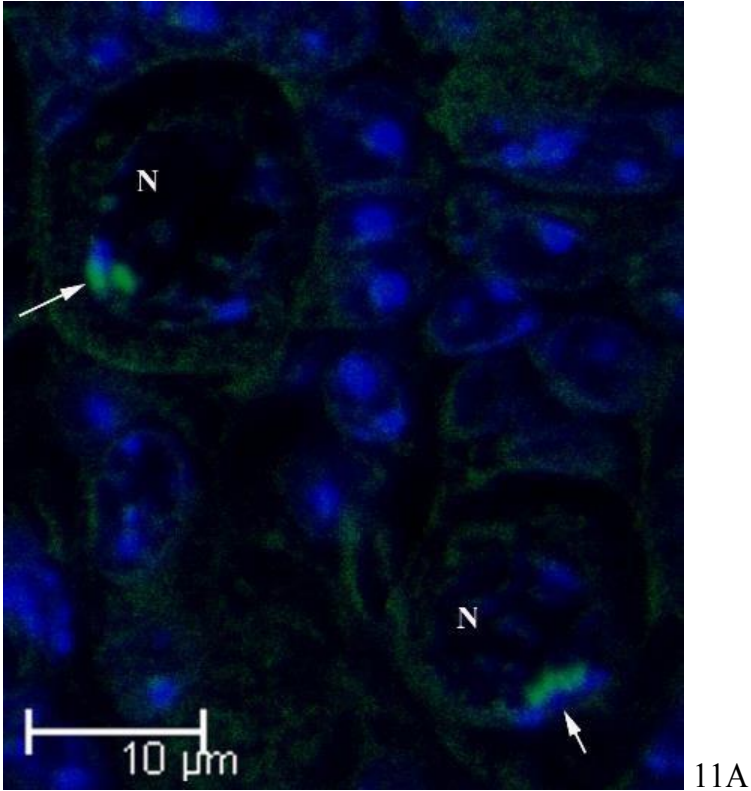
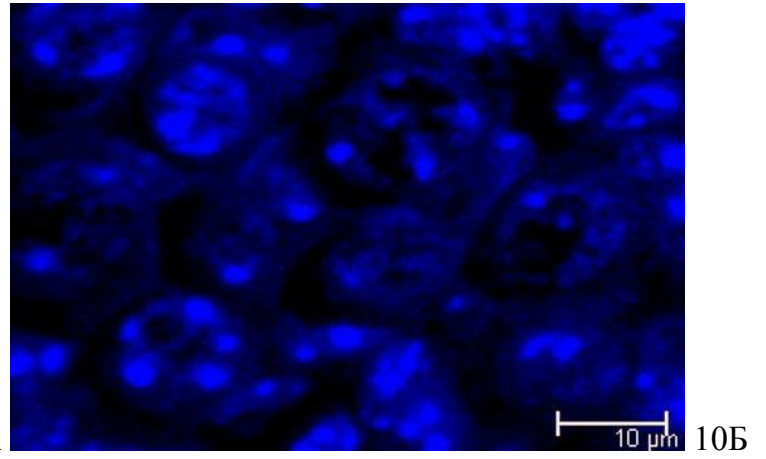
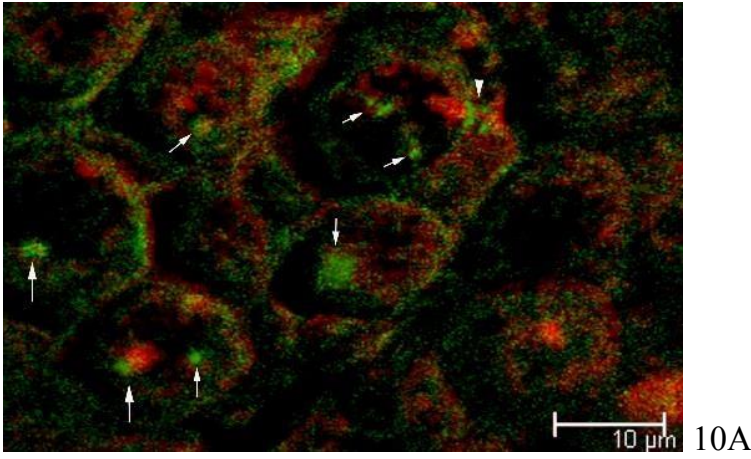
8B

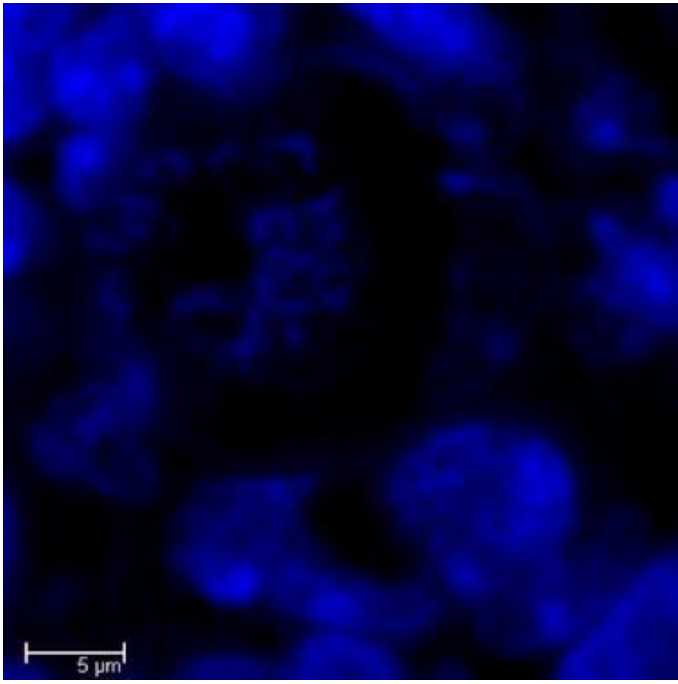


9A

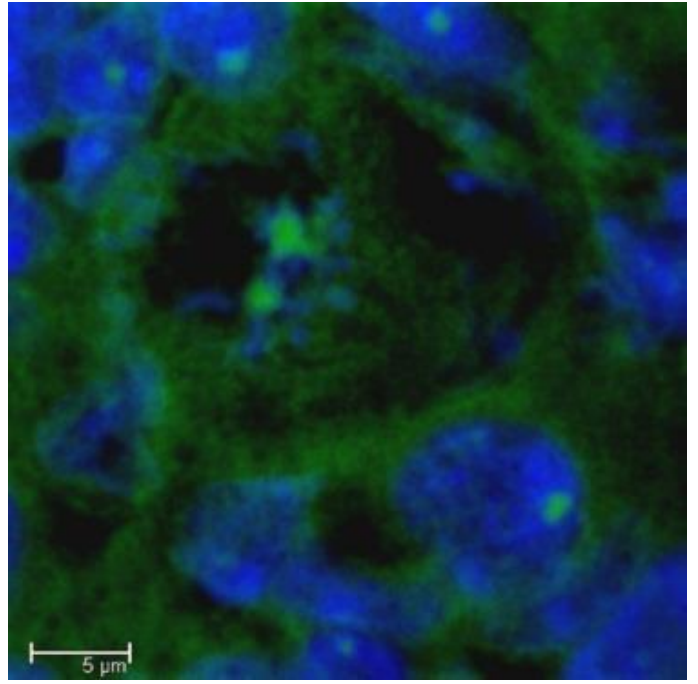


9B

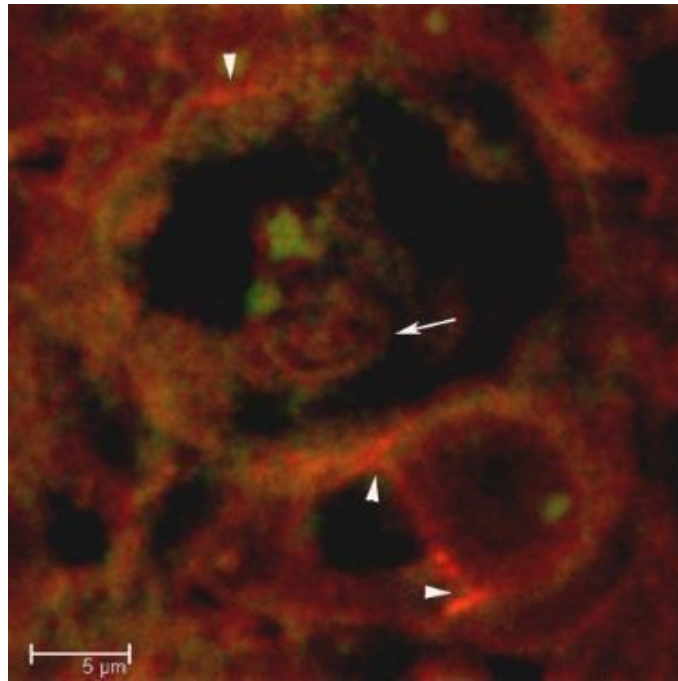




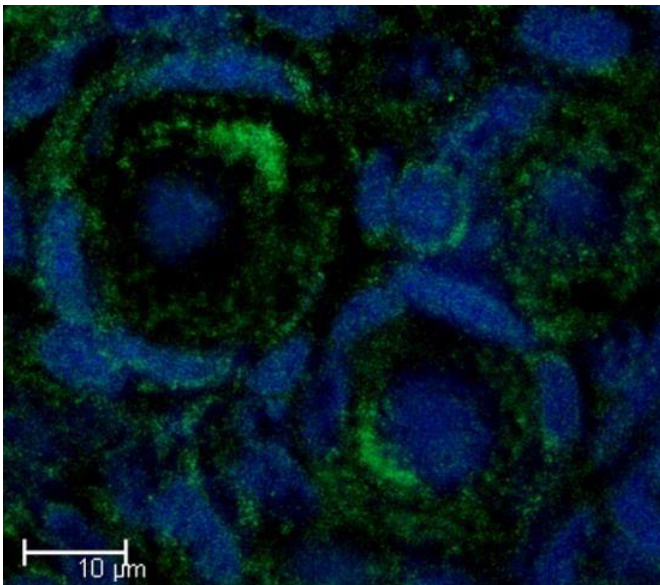
13A



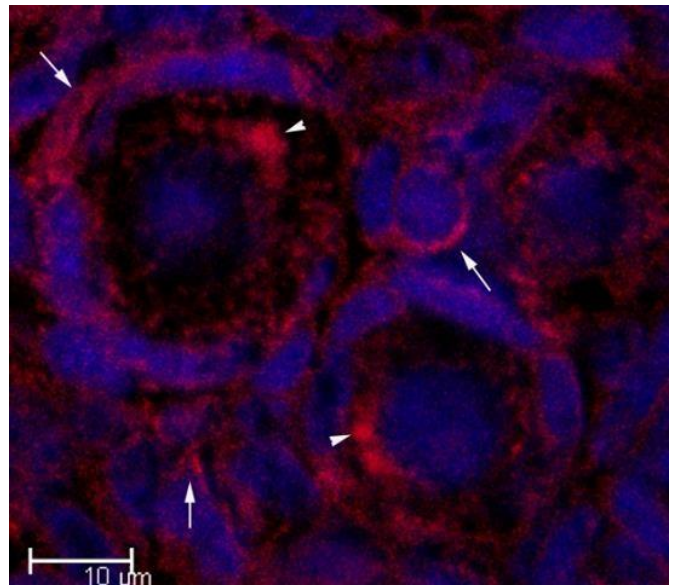
13B



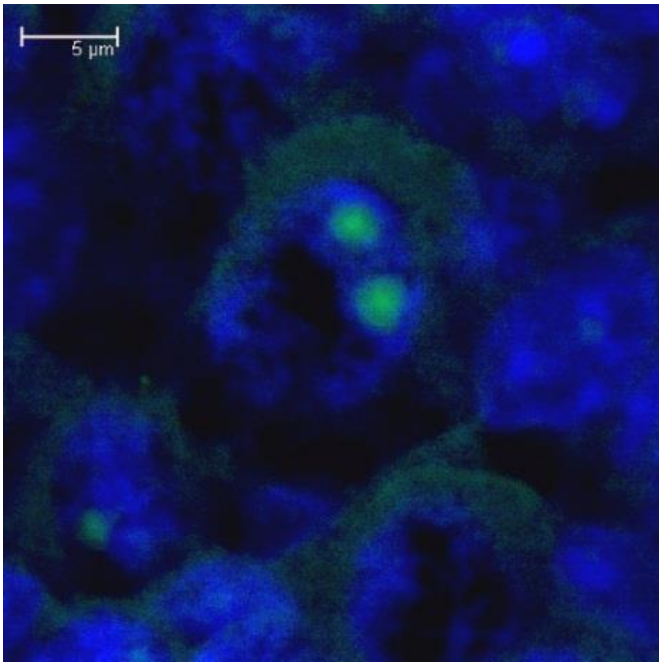
13B



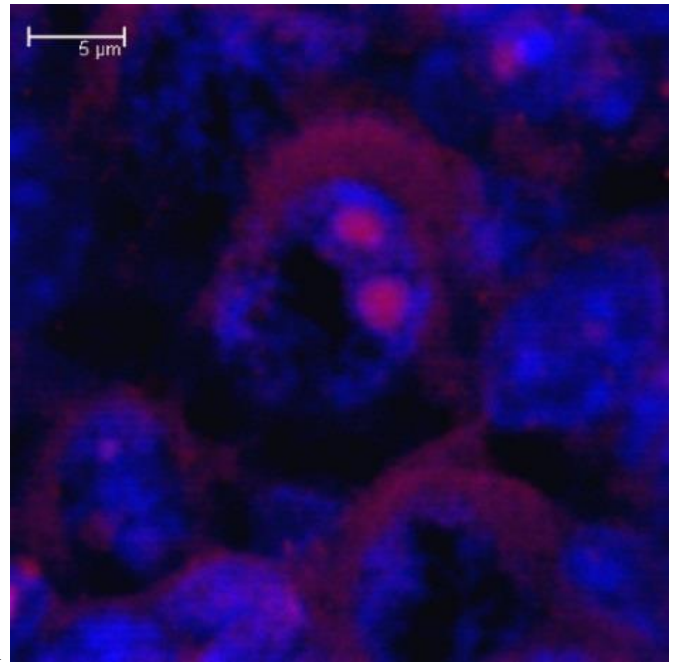
14A



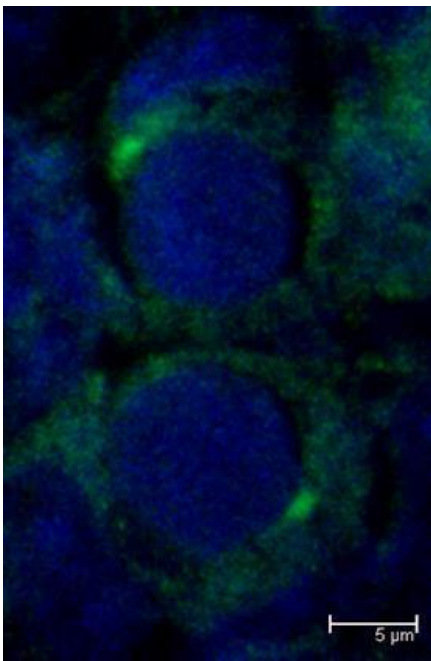
14B



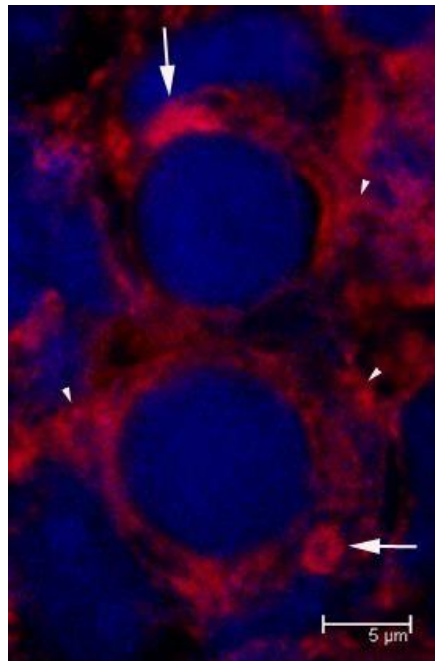
15A



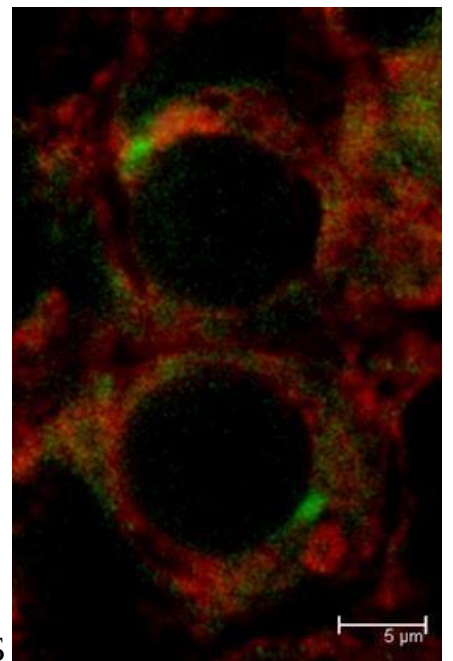
15B



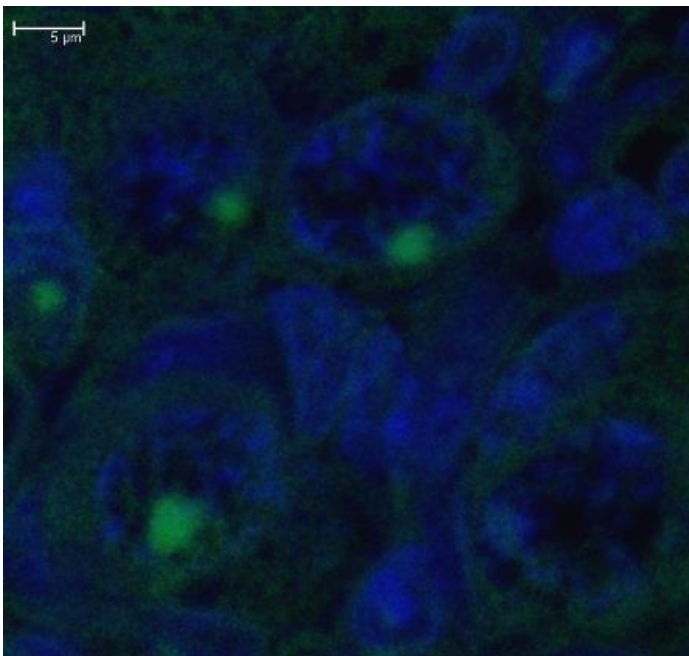
16A



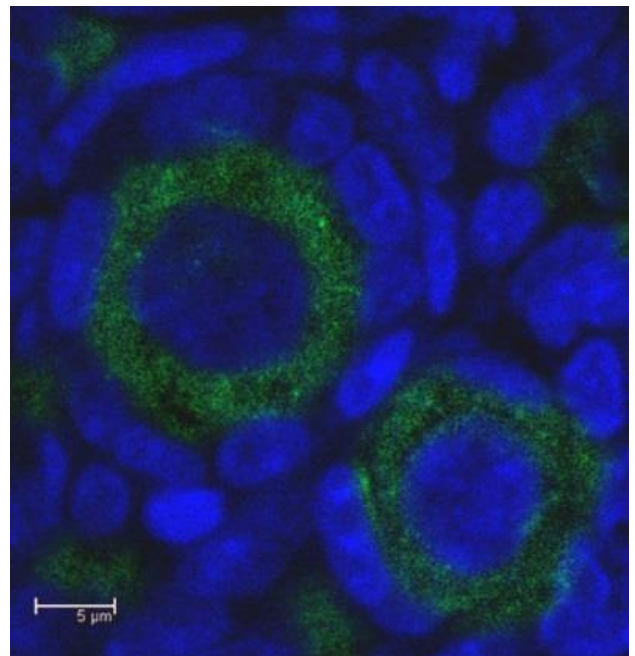
16B



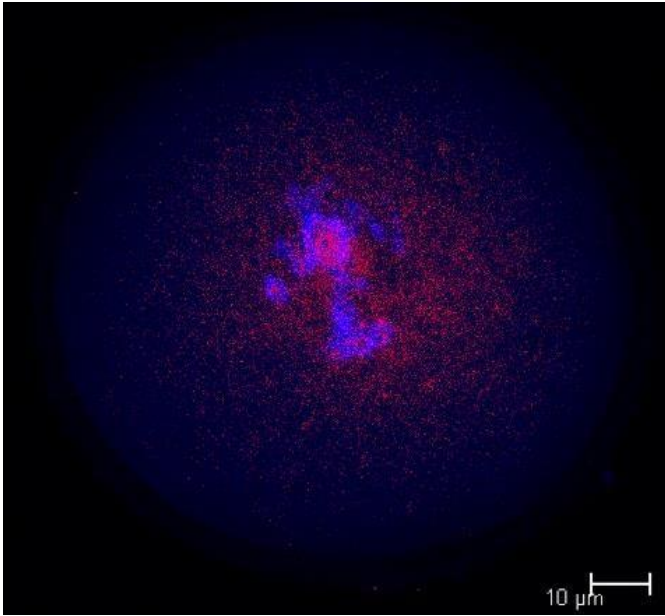
16B



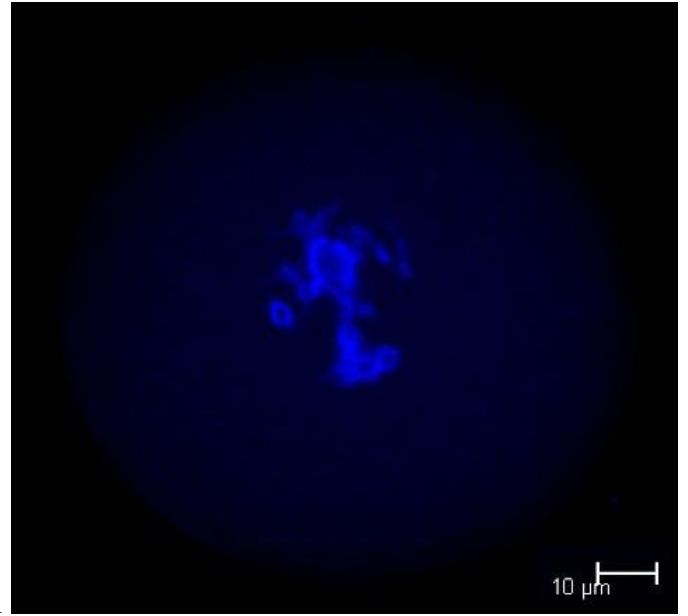
17A



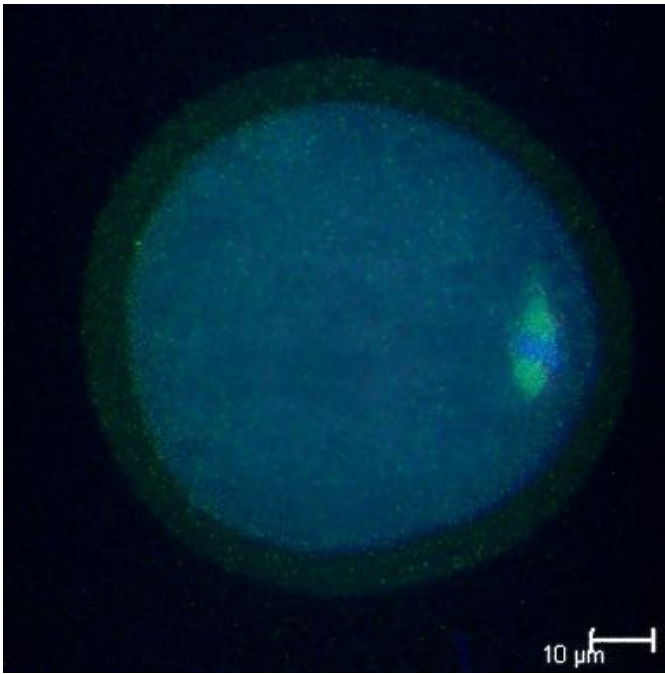
17B



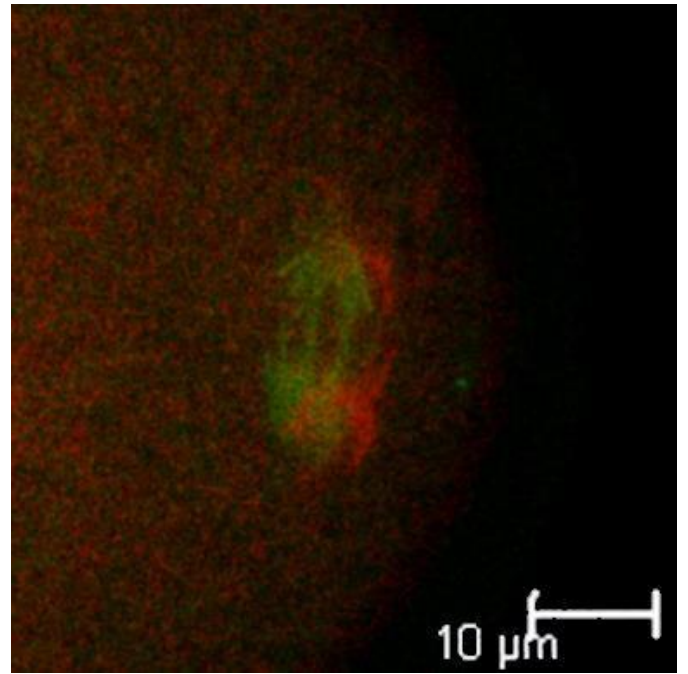
18A



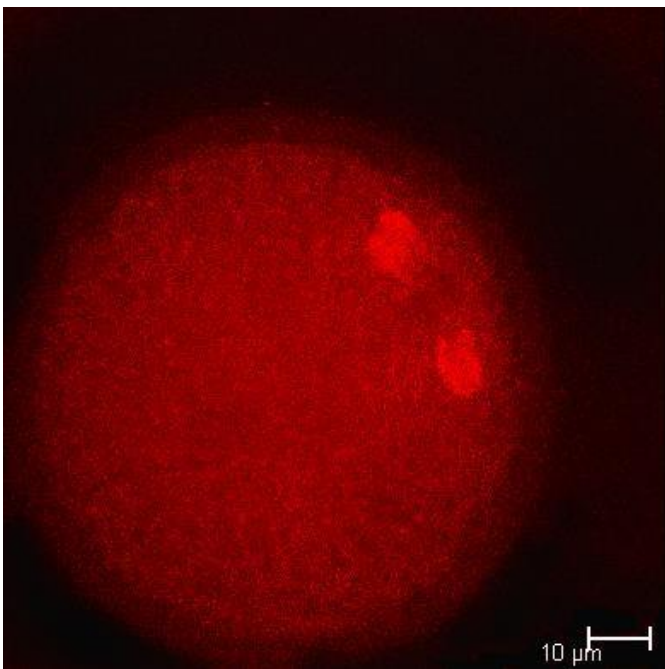
18Б



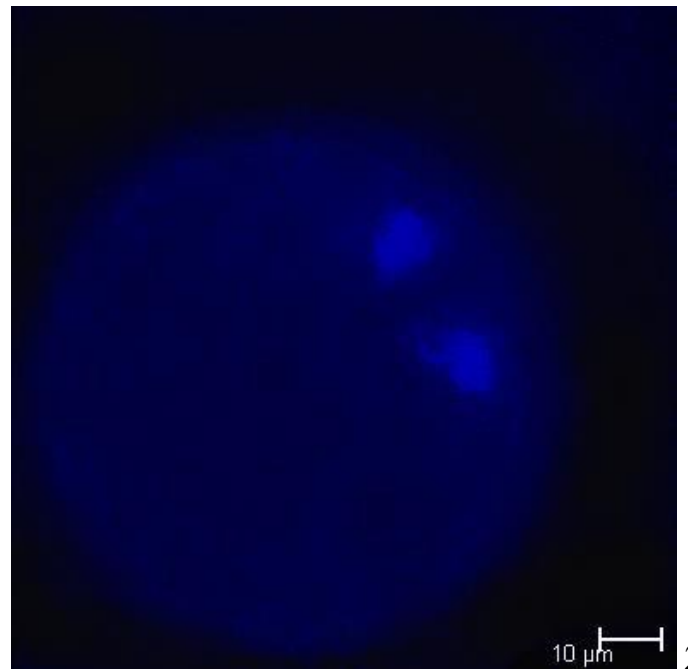
19A



19Б



20A



20Б

Фигура 1. Лазерна сканираща конфокална микроскопия на група човешки примордиални фоликули. Вижда се реакция за интермедиерни филаменти във фоликулните клетки. Във вътрешността на фоликулите, извън фокуса на овоцитното ядро, се наблюдават части от перинуклеарни агрегати, посочени със стрелки. А – флуоресцентно оцветяване за хроматин (Hoechst 33258). Б – цитокератини, визуализирани в зелено чрез FITC. В - имунофлуоресцентна реакция за виментин, визуализиран чрез TRITC в червено.

Фигура 2. Епифлуоресцентен образ на перинуклеарен агрегат с полулунна форма, образуван от гранули. А – Оцветяване за хроматин с Hoechst 33258. Б – Визуализация на полулунно струпване от цитокератини в перинуклеарния район на овоцита (чрез FITC). В – Агрегатът е позитивен и за виментин (TRITC).

Фигура 3. Лазерна сканираща конфокална микроскопия на човешки примордиален фоликул с кръгово подредени гранули на структура, съответстваща на телце на Балбиани. А – Хроматин (Hoechst 33258). Ядрото на овоцита е извън оптичния срез Б – Реакция за цитокератини в кръговата структура (FITC). В – Визуализация на виментин чрез TRITC в същия агрегат.

Фигура 4. Зародишни гнезда (маркирани с пунктир) в периферията на срез от едnodневна мишка. А – Оцветяване с хематоксилин-еозин. Оригинално увеличение 1000x. Б - Хроматинът на герминативните и соматичните клетки е визуализиран чрез Hoechst 33258. Лазерна сканираща конфокална микроскопия, оригинално увеличение 400x.

Фигура 5. Изглед на срез от едnodневен миши яйчник след оцветяване с хематоксилин-еозин за светлинна микроскопия (А) и визуализиран чрез Hoechst 33258 и лазерна сканираща конфокална микроскопия (Б). Стрелките обозначават овоцитните ядра в профаза I, оригинално увеличение 1000x.

Фигура 6. Изглед на срез от двудневен миши яйчник, оцветен с хематоксилин-еозин за светлинна микроскопия (А) и визуализиран чрез Hoechst 33258 и лазерна сканираща конфокална микроскопия (Б). Овоцитните ядра имат хомогенна структура, съответстваща на мейотичния арест в dictyate. Удължени соматични клетки обгръщат овоцитите в примордиални фоликули. Оригинално увеличение 1000x.

Фигура 7. Оформени примордиални фоликули от медуларната зона на яйчник от двудневна мишка. Оригинално увеличение 1000x. Овоцитните ядра са с хомогенна хроматинова структура, а соматичните клетки са с плосък, понякога почти кубичен вид и ограничават изцяло примордиалните фоликули. А - Оцветяване с хематоксилин-еозин. Б – Лазерна сканираща конфокална микроскопия, Hoechst 33258.

Фигура 8. Локализация на комплекс на Голджи и микрофиламенти в срез от яйчник на едnodневна мишка. Лазерна сканираща конфокална микроскопия, оригинално увеличение 1000x. Хроматинът е флуоресцентно белязан с Hoechst 33258. А – Комплекс на Голджи, визуализиран чрез FITC. Пръстеновидно и полупръстеновидно струпвания периферно на ядрото са посочени с глави на

стрелка. Стрелките обозначават положителна реакция за Голджи материал в областта на цитоплазмените мостове между овоцитите. Б – Реакция за фибриларен актин, белязан чрез TRITC, в същия срез. С глави на стрелки са посочени актиновите структури, които обгръщат перинуклеарното Голджи струпване. Стрелките показват присъствието на микрофиламенти в цитоплазмените мостове. В – Едновременна визуализация на Голджи комплекс и актин в същия срез.

Фигура 9. Овариален срез от двудневна мишка. А – Комбиниран образ на хроматин (в синьо) и комплекс на Голджи (в зелено). Б – Комбиниран образ на актин (в червено) с комплекс на Голджи (в зелено). Стрелката показва полупръстенна конфигурация на Голджи. Местата на контакт между соматичните клетки са изразено положителни. Оригинално увеличение 1000x.

Фигура 10. Паралелна визуализация на PCM-1 и VDAC-1 в срез от едnodневна мишка. А – Двойни и единични агрегати на центриолния сателитен белтък PCM-1 (в зелено) са означени със стрелки, а в червено (белязан с TRITC) е митохондриялният маркер VDAC-1. С глава на стрелка е показан контакт на овоцита със съседна клетка, в който има специфична флуоресцентна реакция за двете прицелни структури. Б – Лазерна сканираща конфокална микроскопия, Hoeschst 33258

Фигура 11. Едновременна локализация на хроматин (в синьо) с PCM-1 в зелено (А) и с VDAC-1 в червено (Б). Агрегатът на митохондриите (асоцииран с този на PCM-1) има различна интензивност в различните овоцити: в горния е по-едър от този на PCM-1, докато в долния е по-малък. Разликата се дължи на равнината на оптичния срез.

Фигура 12. Лазерна сканираща конфокална микроскопия – срез от яйчник на двудневна мишка. А – Стрелките указват PCM-1 структура със сърповиден вид (в зелено), в която се наблюдават единичен или двоен агрегат. С глава на стрелка е показана равномерна PCM-1 структура. Б – Реакция за VDAC-1 (в червено). Стрелка сочи перинуклеарно струпване на митохондрии, а глава на стрелка – по-дифузно разпределение. Оригинално увеличение 1000x.

Фигура 13. Лазерна сканираща конфокална микроскопия за визуализация на цитокератини и PCM-1 в срез от яйчник на едnodневна мишка. Оригинално увеличение 1000x. Бар = 5 микрометра. А – Визуализация на хроматина чрез Hoeschst 33258. В овоцита се вижда ясно нишковиден хроматин, а самата яйцеклетка е частично обградена от соматични клетки, някои от които едри и/или вретеновидни. Б – Реакция за PCM-1, белязан с FITC. Двойният агрегат показва асоциация с хроматина, а по-дифузната реакция оформя по-широка структура, свързана с цитакератиновия пръстен. В – Комбиниран образ на PCM-1 и цитокератини, белязани с TRITC. Наблюдава се колокализация на двете реакции в областта на двойния агрегат, както и пръстеновидна цитокератинова структура на телцето на Балбиани (показана със стрелка). Ясна реакция за цитокератини се вижда в овоцитния кортекс, както и в соматична клетка с цитоплазмени връзки със съседните (показани с глави на стрелки).

Фигура 14. Лазерна сканираща конфокална микроскопия за визуализация на цитокератини и РСМ-1 в срез от яйчник на двудневна мишка. Оригинално увеличение 1000x. А – Комбиниран образ на хроматин (в синьо) и РСМ-1 (в зелено). Снимката показва два равномерни, сърповидни агрегата, прилежащи към овоцитните ядра. Б - Комбиниран образ на хроматин (в синьо) и цитокератини (в червено). Реакцията за цитокератини в овоцитите под формата на зърнести агрегати, отчасти колокализиращи с РСМ-1 агрегатите, са посочени с глави на стрелки. Реакцията в соматичните клетки и контактите между тях са показани със стрелки.

Фигура 15. Паралелна визуализация на РСМ-1 (А, белязан със зелен флуорохром FITC) и виментин (Б, белязан в червено с TRITC).

Фигура 16. Лазерна сканираща конфокална микроскопия на срез от яйчник на двудневна мишка за визуализация на виментин и РСМ-1. Реакцията за РСМ-1 е в зелено (чрез FITC), а тази за виментин – в червено (чрез TRITC). А – Два примодиални фоликула в яйчник от двудневна мишка с единични агрегати РСМ-1. Б – същите фоликули с реакция за виментин в близост с РСМ-1 агрегатите (показани със стрелки), в овоплазмата. Контактите между клетките с реакция за виментин са показани с глави на стрелки. В – Комбиниран образ на РСМ-1 и виментин.

Фигура 17. Визуализация на маркерен белтък за герминативни клетки DDX4 чрез FITC. А – Разпределение в овоплазмата и в перинуклеарно струпване в срез от едnodневна мишка. Б – Овоплазмена реакция в срез от двудневна мишка.

Фигура 18. Лазерна сканираща конфокална микроскопия на миши овоцит в диакинеза от профаза I на мейозата. А. Монтирани оптични срези за едновременна визуализация на РСМ-1 (белязан с TRITC) и овоцитните хромозоми (оцветени с Hoechst 33258). Наблюдават се центрове на акумулиране на РСМ-1, съответстващи на хроматина. Б. Изглед на хромозомите, свързани чрез хиазми.

Фигура 19. А - Овоцит в метафаза I: алфа-тубулинът е белязан в зелено, а хроматинът – в синьо. Б – увеличен изглед на вретеното, представен чрез монтирани оптични срези. Съпоставени са тубулиновите нишки с компонента на центриолните сателити РСМ-1 (в червено).

Фигура 20. Овоцит в мейотична телофаза I. А – Визуализация на РСМ-1 чрез TRITC. Наблюдава се изтегляне на РСМ-1 към полюсите на вретеното, обвързано с разделящия се хроматин и разпадането на вретеното, и леко изместване на реакцията към клетъчната периферия. Б – визуализация на хроматина чрез Hoechst 33258.

ОБСЪЖДАНЕ

1. Изследване на цитокератиновите и виментиновите интермедиерни филаменти при поликистоза на яйчника (PCOS) – присъствие и характерна структура на телце на Балбиани в примордиалните фоликули

Овариалната поликистоза е относително широко разпространена – засяга най-малко 12% от жените в репродуктивна възраст и значително по-голям процент при тези с наднормено тегло (March et al., 2010; Boyle and Teede, 2012). Нормално при човека във фоликулната фаза на всеки менструален цикъл един фоликул става доминантен и стига до овулация. Хиперандрогенемията обаче разстройва регулацията на фоликулния растеж, в резултат на което поликистозният яйчник се характеризира със значително по-голям брой растящи фоликули, но голяма част от менструалните цикли протичат без овулация, което силно намалява вероятността за естествено зачеване (Rotterdam ESHRE / ASRM-sponsored PCOS workshop group, 2004). Тези данни подчертават важноста на изследванията върху поликистозния яйчник. В литературата могат да се открият твърдения за цялостно влошаване на овоцитната морфология и функция (Eini et al., 2017), за засягане на отделни овоцитни компоненти като митохондриите (Jia et al., 2016) или за нормални показатели на овоцитите (Sigala et al., 2015). Тези противоречия показват необходимостта от изследвания, насочени конкретно към клетъчните и молекулни аспекти на заболяването и в частност към свързаните с PCOS промени в структурата и функцията на овоцитите.

Изследователският колектив има траен интерес към биологичните аспекти на овариалната поликистоза при човека – провеждал е изследвания върху хроматина и хромозомния набор на овоцити от поликистозни яйчници (Живкова и сътр., 2009) и оценка на яйчниковия резерв (Пъневска и сътр., 2011). Настоящото изследване беше насочено към евентуалното наличие на асиметрия и полярност в овоцити, която по литературни данни се очакваше да се открие в овоцитите в покой, намиращи се в примордиални фоликули, и да се изразява в наличие на телце на Балбиани. За имунохистохимична локализация измежду клетъчните компоненти, локализиращи в телцето на Балбиани, бяха избрани белтъците на цитоплазмените интермедиерни филаменти. Литературни данни

сочат присъствие на цитокератини и виментин в телцето на Балбиани (Santini et al., 1993; Rodler and Sinowatz, 2013), а по-ранни имуноцитохимични изследвания на членове на екипа разкриват присъствие на кератинови и виментинови интермедиерни филаменти в зреещи миши овоцити (Markova et al., 2015; Nikolova et al., 2016).

С оглед на изследването на диференцирането на овоцитите и по-конкретно на евентуалното асиметрично разпределение на техни компоненти най-голям интерес представляваше перинуклеарно локализираният грануларен агрегат в овоцитната цитоплазма, даващ положителна реакция за двата типа белтъци на IF. Тази структура морфологично не отговаря на никой от универсалните клетъчни компоненти. Съдейки по вида и местоположението ѝ, тя явно е идентична с телцето на Балбиани. От литературата е известно, че това образувание представлява преходно перинуклеарно струпване на мембранни органели, цитоскелетни елементи, белтъци и мРНК през овоцитната профаза I. При повечето групи животни то участва в определянето на полярността в яйцата и впоследствие на пътищата на диференциране на ембрионалните клетки (Marlow, 2010). В овоцитите на бозайниците телцето на Балбиани е известен, но малко изследван и обсъждан обект, чиято роля в овогенезата засега не е установена. Намирането на функцията на слабо изучените структури често се подпомага от анализ на промените, наблюдавани при определени патологични състояния. Ако структурата, характерна за нормалната клетка, присъства и при наличие на съответната диагноза, следва да се сравнят особеностите им при норма и при патология.

Нашите изследвания върху човешки поликистозни яйчници визуализират образувание със сходни размери и местоположение, даващо положителна реакция за цитокератини и виментин, което идентифицираме като телце на Балбиани. Доколкото ни е известно, това е първо наблюдение на телце на Балбиани при PCOS. Същевременно резултатите показват, че при овариална поликистоза телцето на Балбиани има необичайна структура, образувана от подредени в правилна форма по-малки елементи. Вместо единично телце ние наблюдаваме полукръг или кръг от гранули с приблизително еднакви размери.

Гранулите реагират положително за белтъци на цитоплазмените интермедиерни филаменти (цитокератини и виментин), но от това не трябва да се прави извод, че те са изцяло цитоскелетни образувания. Много е вероятно те да включват и мембранни органели – митохондрии, цистерни на Голджи и на ендоплазмения ретикулум. Предвид на сходния вид на гранулите в много овоцити може да се предположи, че всяка от тях е „елементарна единица” на телцето на Балбиани, вероятно включваща мембранни органели от всеки от посочените типове, свързани помежду си с цитоскелетни елементи.

2. Особенности на овогенезата и фоликулогенезата в неонатален миши яйчник – характерни морфологични разлики в срези от еднодневни и двудневни мишки

За да получим допълнителни данни за състава, строежа и динамиката на телцето на Балбиани в овоцити от бозайници, ние се насочихме към характеризирането му в нормален яйчник на различни етапи от овогенезата. Такова мащабно изследване обаче е трудно да се проведе върху човешки яйчници поради ограничения от практическо, нормативно и етично естество. При всички положения е уместно обектът най-напред да бъде възможно най-пълно характеризиран в животински модел. Ето защо последващите изследвания бяха проведени върху опитни животни – лабораторни мишки от стандартната линия BALB/c.

В яйчниците от възрастни бозайници във всеки момент се съдържат фоликули на различен етап от развитието си. Освен примордиални фоликули с овоцити в покой, в които може да се наблюдава телце на Балбиани, присъстват и зреещи фоликули. Наличието им затруднява откриването и изследването на малките примордиални фоликули. Освен това във възрастния яйчник не може да се наблюдава образуването на телцето на Балбиани, защото няма овоцити на стадий, по-ранен от dictyate (Repling, 2006). По тези причини за повечето изследвания в настоящия дисертационен труд като обект бяха използвани овариални срези от новородени лабораторни мишки от линия BALB/c – на еднодневна възраст (т.е. в деня на раждането) и на двудневна възраст. По този

начин можеше да се проследи динамиката на промените в яйчника непосредствено след раждането, когато протичат важни процеси – разпадане на зародишните гнезда, възникване на примордиални фоликули и спиране на овоцитната мейоза в dictyate (Pepling and Spradling, 2001; Chen et al., 2007).

Микроскопските наблюдения показаха, че в яйчниците от едnodневни мишки овоцитите имат ядра с нехомогенен хроматин. Това отговаряше на очакваното за активна мейотична профаза I, преди първото за овогенезата спиране в стадий dictyate. Наличието на едри соматични клетки с удължена вретеновидна форма между овоцитите беше белег, че в момента се извършва разпадане на зародишните гнезда чрез навлизане на соматични (прегранулозни) клетки между тях, за да се образуват примордиални фоликули. Соматичните клетки обаче не обгръщаха изцяло овоцитите, което показваше, че фоликулите още не са оформени. Подобна картина е описана от други колективи (Pepling and Spradling, 2001; Chen et al., 2007) като характерна за развитието на мишия яйчник непосредствено след раждането, когато отделянето от майчиното кръвообращение променя хормоналната среда и рязко ускорява разпадането на зародишните гнезда.

При мишките на двудневна възраст в овоцитите се наблюдаваше хомогенен хроматин без кондензирани участъци. Това декондензиране на хромозомите показва навлизане в dictyate и спиране на мейозата. Овоцитите бяха заградени от прегранулозни клетки, което показваше, че са вече включени в примордиални фоликули. Това отговаря на данните на други автори за яйчници на тази възраст (Chen et al., 2007; Pepling et al., 2010).

Както в едnodневните, така и в двудневните яйчници медуларната зона се характеризираше с малко по-напреднал етап на овогенезата и фоликулогенезата, отколкото кортикалната зона. В едnodневните мишки в медуларната зона на яйчника зародишните гнезда вече се разпадаха, докато в кортекса те още можеха ясно да се наблюдават. В двудневните мишки по-добре оформени фоликули се откриваха в медуларната, отколкото в кортикалната зона на яйчника. Тази малка „преднина” на медуларната част на яйчника по отношение на процесите на

диференциране и клетъчните взаимодействия също отговаряше на литературните данни (Rajah et al., 1992; Pepling et al., 2010).

3. Локализация и асиметрично разпределение на фибриларен актин и комплекс на Голджи в овоцити от новородени мишки

Установената при настоящото изследване перинуклеарна пръстенна реакция за апарат на Голджи в овоцити от яйчници на новородени мишки отговаря по местоположение, размери и форма на телцето на Балбиани, описано от други автори на този етап от развитието на мишите овоцити (Pepling et al., 2007; Kloc et al., 2008). Регистрираната от нас асоциация на F-актина с телцето на Балбиани обаче по наши данни досега не е описвана в овоцити от бозайници, макар че е установена в овоцити от низши гръбначни – рибата данио (Escobar-Aguirre et al., 2017) и жабата *Xenopus* (Zelenka et al., 1992). Наблюдаваната в настоящото изследване колокализация на Голджи маркера GRASP65 и микрофиламенти навежда на предположение за участие на актина в натрупването на Голджи материал (а вероятно и на други компоненти) в телцето на Балбиани. Взаимното разположение на двете структури (актиновият пръстен обгражда кръгообразното Голджи струпване) се съгласува с модел, при който микрофиламентите поддържат структурата на телцето на Балбиани и / или го задържат в перинуклеарната област. Възможно е обаче и микрофиламентите да се натрупват около телцето, за да подготвят неговото предстоящо на по-късен етап разрушаване, каквато роля Escobar-Aguirre et al. (2017) установяват за микрофиламентите спрямо телцето на Балбиани в овоцити от риба.

Реакция за фибриларен актин бе установена също и в междуклетъчните мостове между овоцитите в еднодневния миши яйчник. Тази находка предполага роля на микрофиламентите в поддържане на мостчетата и подпомагане на транспортирането на органели между овоцитите. Доколкото ни е известно, такава функция на актиновите филаменти в зародишни гнезда от бозайници досега не е обсъждана. Изследвания на нашия екип са установили опорна роля на микрофиламентите в цитоплазмените израстъци, свързващи кумулусните клетки през *zona pellucida* със зреещия миши овоцит (Markova et al., 2015). В

това отношение интерес представлява фактът, че при овогенезата на *Drosophila* зародишните гнезда, включващи овоцит и изхранващи клетки, се характеризират с пръстеновидни канали между овоцита и изхранващите клетки от същото гнездо, като структурата на тези канали се поддържа както от микротубули, така и от микрофиламенти. Двата вида цитоскелетни нишки с помощта на моторни белтъци и разход на енергия транспортират от изхранващите клетки към овоцита различни компоненти, включително мембрани на апарата на Голджи (Nicolas et al., 2009). Получените при настоящото изследване резултати показват участие на актина в поддържане на междуклетъчните мостове между овоцитите при бозайник – мишка. Локализацията на микрофиламенти и Голджи материал в мостовете показва, че е твърде вероятно везикулният транспорт на органели между клетките от едно зародишно гнездо да следва еволюционно консервативен модел, свързващ относително далечнородствени, отдавна дивергирали групи животни с ранната овогенеза при бозайници. Този модел изглежда още по-вероятен след съобщението на Lei and Spradling (2016), че в развиващите се яйчници от бозайници част от клетките в зародишните гнезда играят ролята на изхранващи клетки и загиват, след като през междуклетъчните мостове прехвърлят част от органелите си към овоцитите, избрани да оцелеят. При настоящото изследване в двудневния миши яйчник междуклетъчни мостове вече почти не се наблюдаваха, което показва, че този процес вече е почти завършен, зародишните гнезда се разпадат и оцелелите овоцити се включват във фоликулогенеза. Наблюдаваната положителна реакция за фибриларен актин в местата на контакт между гранулозните клетки следва да се тълкува като показател, че тези клетки вече се обединяват в типичен епителен слой и установяват тясна механична връзка и комуникация помежду си.

Описаният модел на разпределение на Голджи материал и актин в овоцити от новородени мишки съответства на наблюдаваната пръстеновидна структура от цитокератини и виментин в човешки примордиални фоликули при поликистоза. Пръстеновидно разположение на комплекс на Голджи е описвано в научната литература като асоцииране на Голджи с телцето на Балбиани (Pepling et al., 2007).

4. Локализация и динамика на РСМ-1 и митохондриален маркер в овариални срези от новородени мишки

В досега публикуваните изследвания, свързани с овоцитната мейоза при мишка, основното внимание се насочва към гама-тубулина като най-важен компонент на МТОС. Следва обаче да се проследи и реорганизацията на останалите съставни белтъци на центрозома, доколкото те се преразпределят в клетката по различен начин и могат да поемат допълнителни функции (Manandhar et al., 2005). За настоящото изследване беше избран центриолният сателитен белтък РСМ-1 поради функцията му да осигурява радиално разположение на микротубулите и да насочва към центрозома други нейни компоненти като центрин и перицентрин (Dammermann and Merdes, 2002).

В срезите от едnodневни яйчници белегът за РСМ-1 беше концентриран в единичен или двоен агрегат близо до ядрото. Когато агрегатът беше единичен, той често беше широк или изглеждаше „двуделен” (Фигура 11А). Това предполага, че агрегатите са два във всички овоцити на този стадий, но в някои клетки поради пространствено сближаване изглеждат обединени. Предполагаме, че те съответстват на удвоената центрозома. Центрозомите на ранните профазни овоцити преди стадий dictyate играят роля в организацията на телцето на Балбиани и винаги са асоциирани с него (Kloc et al., 2008).

Интересен резултат беше видимото съответствие между единичния или двоен агрегат, реагиращ положително за РСМ-1, и основното струпване на кондензиран хроматин в ядрото на ранните профазни овоцити. Взаимодействието на микротубулния цитоскелет с хромозомите през интактна ядрена обвивка по принцип е напълно възможно (Alberts et al., 2008). За животински клетки такова взаимодействие не е обичайно, но по данни на Shibuya et al. (2014) се наблюдава при миши сперматоцити в профаза I, а Elkouby et al. (2016) го установяват при овоцити от *Danio*. Логично е да се допусне, че същото явление е свойствено и на незрелите овоцити в профаза I в неонаталния миши яйчник.

Успоредно с центриолния сателитен белтък РСМ-1 беше локализиран митохондриалният белтък VDAC-1, което позволи да се проследи връзката

между центриолните сателити и телцето на Балбиани, в което са струпани митохондрии. Реакцията за митохондриалния маркер беше положителна в съседство с агрегата, съдържащ РСМ-1. Това следва да се тълкува като потвърдителен резултат за ролята на центрозомата на ранните овоцити при организацията на телцето на Балбиани. Агрегатът, положителен за РСМ-1, беше разположен между ядрото и митохондриалния агрегат (телцето на Балбиани). Това наблюдение добре се съгласува с публикуваните съобщения на други автори (Петков, 1988; Elkouby et al., 2016). Следва да се отбележи, че митохондриалното струпуване, макар и видимо асоциирано с реакцията за РСМ-1, не съвпаднаше с нея напълно, имаше различна форма и рядко беше раздвоено.

В двудневните миши яйчници успоредно с хомогенния вид на хроматина, показващ преход към dictyate, реакцията за РСМ-1 се беше разпространила на по-голяма площ и се разстилаше сърповидно от едната страна на ядрото. При много от овоцитите реакцията за РСМ-1 вече беше загубила своята дискретност до такава степен, че беше невъзможно да се прецени дали преди това е била съсредоточена в един или два агрегата. От това наблюдение може да се заключи, че на този етап вече няма структури, които като центрозомите да привличат и задържат центриолните сателити.

Разпределението на митохондриалния маркер VDAC-1 в овоцитите от двудневни мишки също беше по-дифузно от това в пробите от едnodневни мишки. При това се наблюдаваха ясни разлики между отделните овоцити – в повечето клетки реакцията още се очертаваше перинуклеарно струпуване малко по-компактно от това на РСМ-1, докато в други оцветяването беше по-хомогенно и обхващаше цитоплазмата като цяло. Най-вероятното обяснение за тези разлики е, че в двудневния яйчник овоцитите със запазен перинуклеарен митохондриален агрегат (т.е. телце на Балбиани) съставят репродуктивния резерв на животното, докато овоцитите с дифузна реакция за митохондриалния маркер, показваща разпадане на телцето на Балбиани, са започнали да растат и ще се включат в първата вълна на овоцитно зреене. Както беше посочено по-горе, телцето на Балбиани се разпада при активирането на овоцита за растеж (Albamonte et al., 2013).

В срезите от двудневни яйчници вече не се наблюдаваше тясна асоциация на митохондриалния маркер с РСМ-1. Тези находки се съгласуват с описаното в литературата разпадане на центрозома след пахитена (Manandhar et al., 2005).

5. Сравнение на локализацията на РСМ-1 и интермедиерни филаменти в срези от яйчници на едnodневни и двудневни мишки

Интермедиерните филаменти са цитоскелетна система, отличаваща се с висока стабилност и механична устойчивост. Кератинови и виментинови IF се съдържат в овоцитната цитоплазма както по литературни данни, така и според собствени по-ранни изследвания. Колокализация на цитокератини с телцето на Балбиани е установена в ранни профазни овоцити от риба (Escobar-Aguirre et al., 2017) и птица (Rodler and Sinowatz, 2013). Авторите на последния труд отчитат положителна реакция и за виментин в незрелите птичи овоцити. При човек Santini et al. (1993) наблюдават в овоцити от фетален и възрастен човешки яйчник единичен перинуклеарен цитокератинов агрегат, вероятно отговарящ на телцето на Балбиани. Предишни изследвания на нашия колектив са установили наличие и колокализация на цитокератини и виментин в зреещи миши овоцити (Markova et al., 2015; Nikolova et al., 2016). При тези опити не е наблюдавано телце на Балбиани, защото на този етап от овогенезата то вече е претърпяло разпад и компонентите му са се разпръснали. В обсъдените по-горе примордиални фоликули от човешки поликистозни яйчници имуноцитохимичната локализация на цитокератини и виментин даде положителен резултат и очерта в цитоплазмата структура с перинуклеарно разположение, която оценихме като идентична с телцето на Балбиани.

За да характеризираме по-пълно евентуалното участие на тези белтъци на IF в телцето на Балбиани, предприехме имунохистохимично изследване за тях в срези от яйчници на новородени мишки. Успоредно проведохме реакция за белтъка РСМ-1, за да сравним организацията на IF с тази на центриолните сателити по времето, когато овоцитната центрозама е в процес на дегенерация. И двата типа белтъци на IF – цитокератини и виментин, бяха локализирани в единичен агрегат, разположен близо до ядрото и до РСМ-1 агрегатите.

Наблюдаваше се асоциация, но не и пълна колокализация между IF и PCM-1. Реакцията за цитокератини и виментин, сравнена с тази за PCM-1, показваше склонност към обединяване, като в повечето овоцити от едnodневни мишки и всички наблюдавани овоцити от двудневни мишки беше съсредоточена в единичен агрегат. Срезите от двудневни яйчници, сравнени с тези от едnodневните, показаха изразена разлика в находката: реакцията за цитокератини и виментин обхващаше по-широка площ покрай ядрото, а асоциацията ѝ с центриолния сателитен белтък PCM-1 беше отслабена. Грануларната консистенция на имуноцитохимичната реакция за IF и очертаната от нея форма на прилежаща към ядрото дъга или кръг в зависимост от ъгъла на наблюдение отговаря на находката в овоцити от примордиални фоликули в човешки поликистозни яйчници. Може да се предположи, че в овоцитите, намиращи се в покой в dictyate, цитокератините и виментинът запазват това разположение от феталния или неонатален период до евентуалното активиране на овоцита за зреене в конкретен естрален/менструален цикъл. Данните от настоящото изследване разкриват асоциация на цитокератините и виментина с телцето на Балбиани при незрели овоцити от два различни вида бозайници (човек и мишка). Това навежда на предположението, че е възможно интермедиерните филаменти да допринасят за стабилността на телцето на Балбиани след пахитена, когато центрозомата се разпада.

Установената положителна реакция за двата типа белтъци на IF в гранулозните клетки и особено в местата на контакт между тях се съгласува с литературни данни (Santini et al., 1993) и предишни собствени изследвания (Markova et al., 2015).

6. Експресия на маркер за зародишна герминативна линия в срези от яйчници на едnodневни и двудневни мишки

Белтъкът DDX4 е еволюционно консервативен маркер за герминативна клетъчна линия, т.е. експресира се изключително в клетките от половия път и липсва в соматичните клетки (Stoop et al., 2005; Song et al., 2016). Има РНК-хеликазна активност и според наличните данни потиска транскрипцията на

подвижните генетични елементи (транспозоните), с което предотвратява „размножаването“ на ретротранспозоните в герминативните клетки и поддържа стабилността на генома (Hadziselimovic et al., 2011). В овоцити от насекоми, риби и земноводни неговият хомолог Vasa се натрупва в телцето на Балбиани (Marlow, 2010). Според някои автори в ранните профазни овоцити от бозайници DDX4 също се съсредоточава в телцето на Балбиани (Albamonte et al., 2013), но други изследователи го откриват дифузно в цялата цитоплазма (Pepling et al., 2007).

Получените резултати показаха наличие на DDX4 в герминативните клетки (овоцитите), както се очакваше според данните за тъканно-специфичната експресия на този белтък. В ранните профазни овоцити от едnodневния яйчник се наблюдаваше ярко светещ единичен агрегат в перинуклеарна позиция, докато останалата част на цитоплазмата показва слабо положителна реакция. По вид и разположение този агрегат изглеждаше идентичен с телцето на Балбиани. В двудневния яйчник овоцитите, вече намиращи се в dictyate, се характеризираха с дифузна реакция за DDX4. С други думи, DDX4 се разпределяше в овоплазмата равномерно при прехода към dictyate, но това беше предхождано от съсредоточаване в телцето на Балбиани на по-ранните стадии от мейотичната профaza I. Следователно нашите резултати, получени за новородена мишка, се различават от тези на Pepling et al. (2007) за същия обект (дифузна реакция на всички стадии) и са сходни с получените от Albamonte et al. (2013) за човешки яйчници. Въз основа на това следва да се приеме, че при плацентните бозайници също като при останалите изучени животни РНК-хеликазата DDX4 преходно се концентрира в телцето на Балбиани. Резултатът е интересен, защото локализацията на РНК-хеликазата в телцето е свързана с наличието в него на мРНК, каквито засега не са доказани в овоцити на плацентни бозайници.

7. Локализация и динамика в разпределението на РСМ-1 по време на мейотичното зреене на миши овоцити

След като изследвахме вътреклетъчното разпределение на редица компоненти на овоцита в срези от миши неонатален яйчник, локализирахме един

от тях – РСМ-1, в зреещи овоцити от постпубертетен яйчник. Този белтък беше избран, тъй като участва в изграждането на центриолните сателити и така позволява да се проследят тези малко изучени съставки на центрозома.

Сравнително дифузната перинуклеарна реакция за РСМ-1 в овоцитите, непосредствено възобновили своята мейоза, е очаквана находка. След като овоцитните центрозоми се разпадат при прехода към dictyate, техните компоненти се разпръсват в цитоплазмата. Впоследствие при възобновяването на мейозата около ядрото, чиято обвивка все повече се дестабилизира, се формират множество малки МТОС (установени чрез положителната им реакция за гама-тубулин), които ще изградят делително вретено, без обаче да се обособяват в центрозома (Manandhar et al., 2005; Делимитрева, 2010). Ето защо наблюдаваната на стадий GV имуноцитохимична локализация на РСМ-1 е логична и показва, че е много вероятно на този ранен етап от овоцитното зреене центриолните сателити да се асоциират с гама-тубулина въпреки липсата на обособени центрозоми.

Асоциацията на РСМ-1 с кондензирания хроматин показва взаимодействие между тях още преди разпадането на ядрената обвивка. В зреещия овоцит такова взаимодействие може да се осъществи още по-лесно поради промените, настъпващи в ядрената обвивка. В края на GV-стадия тя е все още съхранена като видима микроскопска структура, но става силно пропусклива поради поява в нея на широки отвори (Choi et al., 1996). По данни на нашия екип на този етап в ядрото могат да се открият цитоплазмени белтъци, което означава, че ядрената обвивка е престанала да бъде препятствие за макромолекулите и ги пропуска свободно (Nikolova et al., 2017).

По време на късните стадии на GV и разпадане на GV установихме присъствието на белтъка РСМ-1 не в един, а в два участъка от двете страни на кондензирания хроматин. Съсредоточаването на този компонент на центриолните сателити в две струпвания, навежда на предположението, че по този начин се подготвя изграждането на двуполусно вретено. При овоцитната мейоза сглобяването на двуполусно вретено е по-проблематично поради липсата на центрозоми. Нуклеацията на микротубули се активира в близост до

хромозомния набор и особено до центромерната ДНК, а събирането им в два полюса се постига чрез набор от белтъци, асоциирани с микротубулите (Manandhar et al., 2005; Schuh and Ellenberg, 2007). Данните от настоящото изследване сочат, че процесът на обособяване на два полюса вероятно започва още преди разпадането на GV и в него освен гама-тубулин участва и РСМ-1.

В метафазните овоцити, наблюдавани през настоящото изследване, РСМ-1 се локализира по дължината на вретеновите нишки и по този начин се разпределя от полюсите на вретеното до екваториалната му част. Може да се предположи, че центриолните сателити взаимодействат с микротубулите по цялата им дължина, а не само с фиксирания в полюсите им край. Този резултат, според който РСМ-1 остава компактен и се асоциира с микротубулите и хромозомите по време на мейозата, следва да се съпостави с литературните данни за неговото разпръскване и видимо изчезване по време на митозата (Kubo and Tsukita, 2003; Lopes et al., 2011). Едно възможно обяснение е, че в делящите се соматични клетки по време на митозата, когато експресията на гена за РСМ-1 спира, запасите му в цитоплазмата се изчерпват, докато в овоцита поради големия му обем се запазва достатъчно количество от белтъка, за да бъде регистрирано. Освен това може да се предположи, че разпръскването на гранулите РСМ-1 около полюсите, съобщено от Vārenz et al. (2013), отразява тяхно движение по микротубулите до хромозомите.

Един аспект на резултатите за РСМ-1, който засега е трудно да се обясни, е неговата локализация успоредно на вретеновите нишки откъм кортикалната им страна в част от метафазните овоцити. Следва да се отбележи, че Zimmerman and Dohsey (2000), изследвайки поведението на РСМ-1 съдържащи частици, на фона на преобладаващото им движение към центрозоите наблюдават в някои случаи движение към клетъчната периферия, чийто механизъм остава неясен. По време на овоцитната мейоза това вероятно подпомага „закотвянето” на вретеното под клетъчната мембрана, а в други типове клетки би могло да допринася за периферната локализация на базалните телца на ресничките и камшичетата.

ИЗВОДИ

1. Наблюдаваната грануларна структура с правилна форма в овоцити от примордиални фоликули на овариални срези при поликистоза на яйчника съответства на телце на Балбиани.
2. Необичайната организация на телцето на Балбиани би могла да се окаже характерна за примордиалните фоликули при овариалната поликистоза.
3. Присъствието на фибриларен актин, асоцииран с телцето на Балбиани, предполага евентуална роля на микрофиламентите в организирането, стабилизирането на телцето и / или неговото задържане в перинуклеарната област на мишите овоцити.
4. Реакцията за фибриларен актин в междуклетъчните мостове предполага роля на микрофиламентите в тяхното поддържане и вероятно в органелния транспорт между мишите овоцити, което отговаря на еволюционно консервативен модел на ранната овогенеза.
5. Динамиката на центриолния сателитен белтък РСМ-1 през профаза I е свързана първо с обособяване на дискретен единичен или двоен перинуклеарен агрегат, асоцииран с кондензиран хроматин и митохондриалния облак на телцето на Балбиани, последвано от разстилането му в прилежаща към ядрото полулунна структура.
6. Цитокератинови и виментинови интермедиерни филаменти се асоциират с телцето на Балбиани и вероятно допринасят за механичната му устойчивост.
7. Маркерът за герминативни клетки DDX4 през ранната профаза I колокализира с телцето на Балбиани, преди да се локализира дифузно в цитоплазмата през dictyate, което предполага запазване при бозайници на функцията на телцето да натрупва и регулира мРНК.
8. При възобновяване на мейозата при овоцитното зреење РСМ-1 се асоциира с хромозомите и мейотичното вретено откъм периферната му повърхност, съответстващо на асиметричната локализация на вретеното след метафаза I.

ПРИНОСИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Установено е наличие и атипична структура на телце на Балбиани в примордиални фоликули от човешки яйчници с поликистоза, което е довод в подкрепа на възможното му функционално значение.
2. Установено е участие на микрофиламенти в структурата и динамиката на телце на Балбиани в ранни овоцити от бозайник.
3. Проследена е динамиката на центриолния сателитен белтък РСМ-1 в ранни и зреещи миши овоцити.
4. Установена е асоциация на цитокератинови и виментинови интермедиерни филаменти с телце на Балбиани в овоцити от мишка и човек.
5. Установено е наличие на герминативния маркер DDX4, показващ роля в метаболизма на РНК, в телце на Балбиани в ранни профазни овоцити от бозайник.

Приносите на дисертационния труд са с научно-теоретичен характер. Приноси 1, 2 и 3 са изцяло оригинални, а приноси 4 и 5 са отчасти с потвърдителен характер предвид противоречивите литературни данни.

Публикации, свързани с темата на дисертацията

1. Hadzhinesheva V., Delimitreva S., Markova M., Nikolova V., Chakarova I., Mourdjeva M., Rashev P., Zhivkova R. Asymmetric distribution of microfilaments, pericentriolar material, Golgi apparatus and mitochondria in oocytes from mouse neonatal ovaria. *Science & Technologies*, 2017, 7 (3), 13-16.
2. Hadzhinesheva V., S. Delimitreva, M. Markova, V. Nikolova, I. Chakarova, M. Mourdjeva, P. Rashev, R. Zhivkova. Localization and asymmetric distribution of Golgi complex and fibrillar actin in oocytes from newborn mouse ovaria. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*, (2017), 70(7) 981 - 986. IF 0,233 (2015)
3. Hadzhinesheva V., V. Nikolova, I. Chakarova, S. Delimitreva, M. Markova, R. Zhivkova. Mammalian Balbiani Body As a Sign of Ancestral Oocyte Asymmetry: Review. *Acta morphologica et Anthropologica*, (2015), 22, 159-162.
4. Живкова Р, М Пъневска, С Делимитрева, М. Маркова, В Николова, И Чакърова, Т Тенев, В Хаджинешева, К Майнхард, И Ватев. Изследване на цитокератиновите и виментиновите интермедиерни филаменти при поликистоза на яйчника (PCOS) – присъствие и характерна структура на телце на Балбиани в примордиалните фоликули. *Акушерство и гинекология – София* (2013)52(7):7-12.

Участия в научни форуми, свързани с темата на дисертацията

1. Р. Живкова, В. Хаджинешева, В. Николова, И. Чакърова, С. Делимитрева, М. Мурджева, П. Рашев, М. Маркова. Локализация и асиметрично разпределение на перицентриоларен материал и митохондриален маркер в овоцити от новородени мишки. XII национална конференция по медицинска биология, Цигов чарк, 08-10.09.2017 г.
2. В. Хаджинешева, С. Делимитрева, М. Маркова, В. Николова, И. Чакърова, М. Мурджева, П. Рашев, Р. Живкова. Участие на микрофиламенти в стабилизацията на телцето на балбиани и на междуклетъчните мостове в миши неонатални яйчници. XII национална конференция по медицинска биология, Цигов чарк, 08-10.09.2017 г.
3. Hadzhinesheva V., Delimitreva S., Markova M., Nikolova V., Chakarova I., Mourdjeva M., Rashev P., Zhivkova R. Asymmetric distribution of microfilaments, pericentriolar material, Golgi apparatus and mitochondria in oocytes from mouse neonatal ovaria. XXVII международна научна

конференция, посветена на 65 години „Мини Марица“, 01-02.06. 2017, Стара Загора.

4. Hadzhinesheva V., V. Nikolova, I. Chakarova, M. Panevska, R. Zhivkova, T. Tenev, S. Delimitreva, M. Markova. A structure corresponding to Balbiani body in oocytes of patients with ovarian polycystosis. XI национална конференция по медицинска биология, Пловдив, 15-17.05.2015 г. награда за най-добър постер
5. R. Zhivkova, M. Markova, V. Nikolova, I. Chakarova, T. Tenev, V. Hadzhinesheva, M. Panevska, R. Dimitrov, S. Delimitreva. Balbiani body is present in oocytes of patient with polycystosis and reacts for intermediate filaments and F-actin. XXI National Congress of the Bulgarian Anatomical Society with international participation. Sofia, May 31 – June 2, 2013;

Благодарности

Изказвам сърдечни благодарности на научните си ръководители доц. Живкова и доц. Маркова за ценните напътствия и всестранната помощ, както и на доц. Рашев и доц. Мурджева. Благодаря и на колегите от катедра Биология за подкрепата при разработването на този труд.

Работата по настоящия дисертационен труд е финансирана от следните проекти:

Изследване на цитокератиновите и виментиновите интермедиерни филаменти при поликистоза на яйчника (POS)“, финансиран от Медицински университет – София, договор № 37/2012.

„Изследване на цитоплазмени компоненти на телце на Балбиани в овоцити от миши примордиални фоликули“, финансиран от Медицински университет – София, договор № 16/2015.