

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-238

**ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА КОИЛИН-СОДЕРЖАЩИХ ЯДЕРНЫХ ТЕЛЕЦ
В КУМУЛЮСНЫХ КЛЕТКАХ ПРЕОВУЛЯТОРНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ МЫШИ****DYNAMICS OF COILIN-CONTAINING NUCLEAR BODIES IN CUMULUS CELLS
OF OVARIAN PRE-OVULATORY FOLLICLES IN AGING MICE**А. С. Анисимов¹, И. О. Боголюбова²¹Санкт-Петербургский государственный университет²Институт цитологии РАН, Санкт-ПетербургA. S. Anisimov¹, I. O. Bogolyubova²¹Saint Petersburg State University²Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg

✉ alexey.nisimov@gmail.com

Аннотация

3D-анализ коилин-содержащих ядерных телец в кумулюсных клетках мышей разных возрастных групп, проведенный в ImageJ, выявил значимые ($p < 0,01$) возрастные изменения: снижение медианного числа телец на ядро (с 6 до 4,5) и повышение интенсивности флуоресценции. Результаты свидетельствуют о выраженной перестройке ядер кумулюсных клеток при старении яичников.

Abstract

Using a custom ImageJ macro for 3D quantification of coillin-containing bodies in mouse cumulus cells across three age groups, we identified significant ($p < 0.01$) age-related changes: a decrease in the median number of bodies per nucleus (from 6 to 4.5) and an increase in fluorescence intensity, suggesting altered nuclear organization in cumulus cells during ovarian aging.

Кумулюсные клетки (специализированная популяция гранулезных клеток, окружающих ооцит) играют ключевую роль в оогенезе и фолликулогенезе, обеспечивая питание и регуляцию развития ооцита [1].

Целью настоящего исследования являлось изучение возрастной динамики коилин-содержащих телец в кумулюсных клетках мыши. Эти тельца представляют собой гетерогенную популяцию безмембранных ядерных органелл, вовлеченных в такие важные функции, как процессинг малых ядерных РНК и поддержание длины теломер [2, 3].

Для исследования использовали кумулюсные клетки, полученные от трех мышей каждой возрастной группы: молодых (2–3 мес.), взрослых (6–7 мес.) и старых (12 мес.). Все животные перед забором материала подвергались гормональной стимуляции препаратом «Фоллигон» для синхронизации эстрального цикла и увеличения числа преовуляторных фолликулов. Иммунофлуоресцентное окрашивание проводили с использованием первичных поликлональных антител против коилина и вторичных козьих антител против иммуноглобулинов кролика, коньюгированных с Alexa 488. Препараты заключали в среду Vectashield с добавлением DAPI и анализировали с помощью конфокального микроскопа Leica SP5.

Анализ полученных изображений выполняли с помощью специально разработанного автоматизированного алгоритма в программе ImageJ, который включал три основных модуля: идентификацию отдельных ядер в стеке изображений, сегментацию ядерных структур и экспорт количественных параметров для статистического анализа. Для обеспечения высокой точности измерений алгоритм включал 3D-гауссовское размытие для подавления шума и специальные параметры детекции локальных максимумов.

Всего было проанализировано 129 ядер, соответствующих строгим критериям качества. Выявляемые с помощью иммунофлуоресцентного мечения коилин-положительные тельца представлены в ядрах клеток кумулюса как более крупными структурами (рис. 1, стрелки), так и мелкими точечными зонами с меньшей интенсивностью флуоресцентного мечения (см. рис. 1, головки стрелок).

Результаты исследования выявили четкую возрастную динамику параметров коилин-положительных телец. В группе молодых животных медианное количество телец на ядро составляло 6, тогда как в группе старых животных этот показатель снижался до 4,5 ($p = 0,0007$ по критерию Джонкира). При этом максимальное количество телец в отдельных ядрах молодых животных достигало 33, что значительно превышало аналогичные показатели у взрослых (13 телец) и старых (7 телец) особей (рис. 2, а).

Примечательно, что, наряду с динамикой количества коилин-положительных телец, интенсивность свечения демонстрирует положительную возрастную динамику (см. рис. 2, б). При этом, как и для количества телец, не выявлено статистически значимых различий в интенсивности свечения между молодыми и взрослыми животными — значимое увеличение интенсивности наблюдается только у старых животных (12 месяцев) по сравнению с молодыми и взрослыми животными.

Таким образом, разработанный метод автоматизированного анализа трехмерных изображений показал высокую эффективность для количественной оценки тонких изменений в организации ядерных структур. Получен-

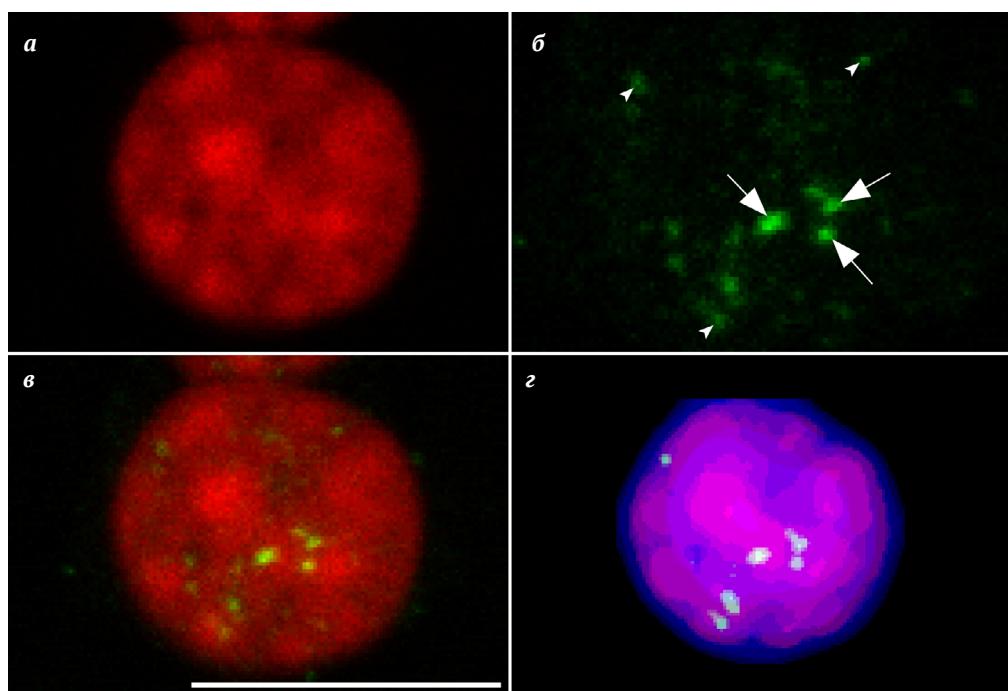


Рис. 1. Типичная картина распределения хроматина и коилин-позитивных телец в ядре кумулюсной клетки: а — DAPI, б — коилин, в — совмещение, г — сегментированные алгоритмом объекты ядра для морфометрического анализа. Масштабный отрезок — 10 мкм

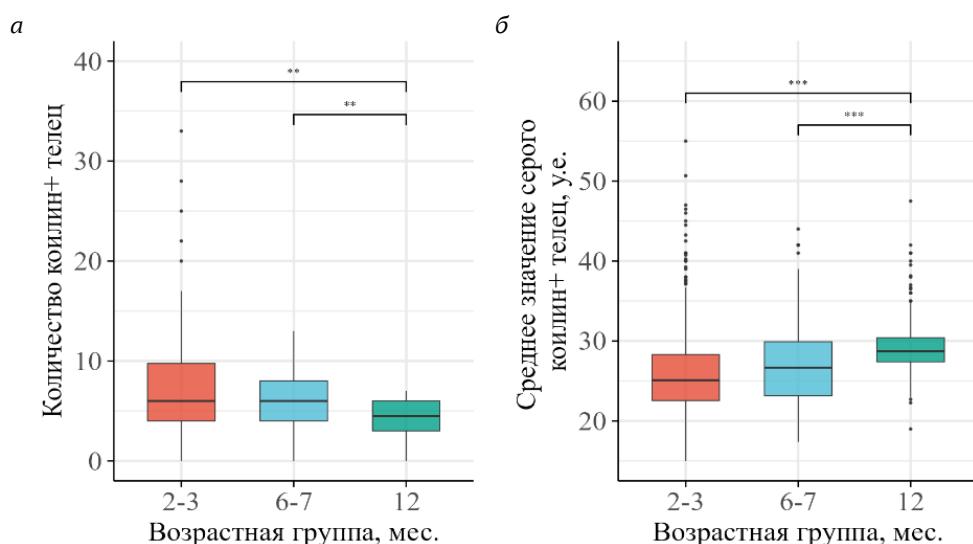


Рис. 2. Количество (а) и интенсивность флуоресценции (б) коилин-позитивных телец ($n = 812$) в ядрах кумулюсных клеток ($n = 129$), полученных от самок разного возраста.

** — различия между группами достоверны для $p < 0,01$;

*** — различия между группами достоверны для $p < 0,001$

ные данные свидетельствуют о значительных возрастных изменениях в организации ядерных структур кумулюсных клеток. Уменьшение количества коилин-положительных телец при одновременном увеличении их размеров и интенсивности флуоресценции может отражать изменения функциональной активности ядер кумулюсных клеток, связанные со старением яичников.

Литература

1. Russel D. L., Robker R. L. Cumulus Cells // Encyclopedia Reprod. (Second Ed.). Academic Press, 2018. P. 43–46.
2. Morris G. E. The Cajal Body // Biochimica Biophysica Acta. 2008. Vol. 1783, No. 11. P. 2108–2115.
3. Stanek D., Neugebauer K. M. The Cajal Body: A Meeting Place for Spliceosomal snRNPs in the Nuclear Maze // Chromosoma. 2006. Vol. 115, No. 5. P. 343–354.