Молчанова Надежда Петровна, *канд. с.-х. наук, доцент кафедры «Земледелие, мелиорация и агрохимия», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова. Россия.*

410012, г. Саратов, Театральная пл., 1.

Тел.: (8452) 26-16-28.

Ключевые слова: *бинарные посевы; плодородие; чернозем; биологическая активность почвы; подсолнечник; люцерна; донник.*

BINARY CROPS OF SUNFLOWER WITH SWEET CLOVER AND ALFALFA AND THEIR INFLUENCE ON SOIL BIOGENEITY

Korzhov Sergei Ivanovich, *Doctor of Agricultural Sciences, Professor of the chair "Agriculture and Agroecology", Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great. Russia.*

Trofimova Tatyana Nikolaevna, *Doctor of Agricultural Sciences, Professor of the chair "Agriculture and Agroecology", Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great. Russia.*

Solodovnikov Anatoly Petrovich, *Doctor of Agricultural Sciences, Professor of the chair "Agriculture, Amelioration and Agrochemistry", Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov. Russia.*

Molchanova Nadezhda Petrovna, *Candidate of Agricultural Sciences, Associate Professor of the chair "Agriculture, Amelioration and Agrochemistry", Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov. Russia.*

Keywords: *binary sowings; fertility; chernozem soil,; soil biological activity.*

Binary sunflower sowings with sweet clover and alfalfa improve main indicators of soil fertility thanks to an increased biological activity of typical chernozem, as well as to an increasedrate of decomposition of linen (by 2.1-3.2 times on the variants of combined sowing of sunflower with legume crops as compared to pure sowing of sunflower. The aftereffect of binary sowing was registered in winter wheat plantings. Wheat planting in sweet clover and alfalfa fallow increased the rate of decomposition of linen by 2.8 and 3.2 times, respectively, as compared with plantings in complete fallow. In crop rotation with complete fallow during the germination of barley the coefficient of retrogradation was the highest and exceeded the values of other variants by 3-4 times. This indicates that in barley plantings there remain a great number of hard degradable plant residues. The succession of two crops with a wide C:Nratio leads to the accumulation in the soil of inhibitors of the decomposition of straw residues. Binary sowings of sunflower with sweet clover and alfalfa increased the relative index of biogenesity during the blossom and harvest time by 138% and 127%, respectively. Winter wheat yield was the highest in the variant of complete fallow, barley and sunflower in the rotation with binary sowings of crops.

УДК 636.2.57.089.38

АПОПТОЗ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ФОЛЛИКУЛОВ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СТАТУС ООЦИТОВ *BOS TAURUS*

КУЗЬМИНА Татьяна Ивановна, *Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста»*

СТАНИСЛАВОВИЧ Татьяна Ивановна, *Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста»*

МОЛЧАНОВ Алексей Вячеславович, *Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова*

Проведен анализ апоптозных изменений соматических клеток фолликула (гранулеза и кумулюса) в зависимости от диаметра фолликула (<3 мм, 3–5 мм, 6–8 мм) и функционального статуса ооцита (растущие и завершившие фазу роста). Функциональный статус ооцитов оценивали ВСВ-тестом. Апоптоз в клетках гранулезы и кумулюса, выделенных из фолликулов, содержащих растущие или завершившие фазу роста ооциты, определяли методом TUNEL (Feng W., Pan Zhifang Z. 2014). Показано, что клетки гранулезы из фолликулов коров характеризуются различными показателями уровней апоптоза в зависимости от статуса ооцитов (завершившие рост и растущие), выделенных из этих фолликулов. Доля апоптотических клеток гранулезы в фолликулах, содержащих завершившие фазу роста ооциты, независимо от диаметра фолликула значительно превышала таковую в фолликулах, содержащих растущие ооциты. В клетках кумулюса, напротив, такой тенденции не выявлено. Уровень клеток кумулюса, окружающих ооциты в различном функциональном состоянии, затронутых апоптозом, не имел достоверных различий во всех исследуемых группах эксперимента. Последнее позволяет расценивать уровень апоптозов в клетках гранулезы овариального фолликула коровы как индикатор функционального статуса развивающегося в нем ооцита (растущий или завершивший фазу роста) и предложить использовать данный показатель при прогнозировании качества донорских ооцитов коров.

Введение. Несомненные успехи в совершенствовании селекционных схем разведения крупного рогатого скота основываются и на внедрении клеточных репродуктивных технологий в практику животноводства [3]. Использование донорских ооцитов в качестве источника получения нативных или реконструированных эмбрионов вызывает необходимость разработки эффективных маркеров проспективных потенций женских гамет к со-

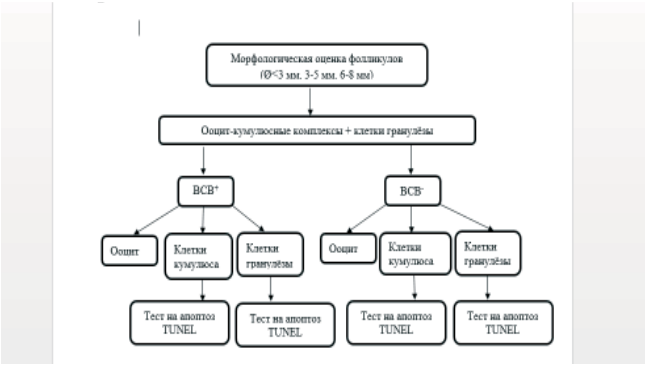
зреванию и оплодотворению in vitro. Несмотря на разработанные морфологические критерии оценки пригодности донорских ооцитов для дальнейшего культивирования (размер фолликула, его тургор, степень васкуляризации, число слоев кумулюсных клеток, окружающих гамету, структура ооплазмы), выход эмбрионов на стадии бластоцисты на протяжении многих лет составляет от 20 до 40 % [7, 9]. Вышесказанное вызывает необходимость совершенствования этапов технологии экстракорпорального созревания ооцитов, прежде всего, отбора качественных донорских ооцитов. Эффективным представляется использование BCB-теста, основанного на различии в активности глюкозо-6фосфат дегидрогеназы в растущих [BCB(-)] и завершивших фазу роста [BCB(+)] ооцитах [4]. Ооциты, завершившие фазу роста in vivo, обладают высокими потенциями к созреванию и оплодотворению-по сравнению с растущими (на момент их выделения из фолликулов) ооцитами [5]. В связи с вышеизложенным представляет интерес поиск интрафолликулярных маркеров функционального статуса созревающего ооцита. Созревание ооцита in vivo – результат сложных межклеточных взаимодействий гаметы и соматических клеток овариального фолликула, в первую очередь ооцитов, клеток кумулюса и гранулезы [8]. Росту и приобретению ооцитами компетентности к созреванию сопутствуют функциональные изменения окружающих его соматических клеток. Апоптоз является неотъемлемой частью жизни многоклеточных организмов. Во время эмбрионального развития апоптоз участвует в органогенезе, а на протяжении всей жизни в регуляция гомеостаза в различных тканях. Апоптоз в физиологическом контексте жестко регулируется и сбалансирован. Особую роль апоптоз играет при формировании яйцеклетки, затрагивая соматические клетки фолликула и участвуя в селекционном процессе отбора гамет, компетентных к завершению мейотического созревания [6, 10]. В этой связи представляет интерес оценка апоптотических процессов в соматических клетках овариальных фолликулов, содержащих различные по своему функциональному статусу гаметы с перспективой выявления интрафолликулярных маркеров оценки качества ооцитов.

Цель настоящего исследования – анализ уровня апоптозов в соматических клетках (гранулеза, кумулюс) овариальных фолликулов коров в зависимости от их диаметра и функционального статуса содержащихся в них гамет (растущие или завершившие фазу роста ооциты).

Методика исследований. В экспериментах использовали постмортальные яичники коров в стадии фолликулярного роста. Яичники, полученные на мясокомбинате, доставляли в лабораторию в термосе в стерильном физиологическом растворе при температуре 32–35 °С. Ооцит-кумулюсные комплексы выделяли путем аспирации содержимого фолликулов диаметром менее 3 мм, 3–5 мм и 6–8 мм, с высоким тургором, обширной сетью капилляров. Образцы клеток гранулезы выделяли из каждого фолликула индивидуально и помещали в 96-луночные плата до проведения BCB-теста ооцитов. После извлечения ооцит-кумулюсных комплексов их подвергали BCB-тесту, для чего помещали в 26 μM BCB (бриллиантовый кристаллический голубой), растворенном в фосфатно-солевом буфере с 0,4%-м бычьим сывороточным альбумином (A-7888, Sigma) на 90 мин при температуре 38,5 °С в атмосфере 5 % CO_2, 90 % влажности [1]. Ранжирование ооцитов после инкубации с BCB проводили в соответствии с окраской ооплазмы – ооплазма завершивших фазу роста ооцитов оставалась окрашенной, а растущих – теряла окраску. После BCB-теста образцы фолликулярной жидкости с клетками гранулезы в соответствии с контролируемыми параметрами эксперимента (диаметр фолликула и функциональный статус ооцита – растущие или завершившие фазу роста) центрифугировали в течение 10 мин при 300g, отделяли осадок с гранулезными клетками и промывали дважды в фосфатно-солевом буфере, затем клетки подвергали анализу на апоптоз. Клетки кумулюса отделяли пипетированием от ооцитов, ранжированных по BCB-тесту и диаметру фолликулов и определяли в них уровень апоптоза. Уровень апоптоза в клетках кумулюса и гранулезы оценивали методом TUNEL [2]. Для этого клетки кумулюса или гранулезы помещали на покрытые poly-L-lysine предметные стекла и подсушивали на воздухе. После этого фиксировали в растворе формалина в течение 30 мин. Промывали в фосфатно-солевом буфере. Помещали на 2 мин в 10%-й раствор Тритона X -100 на 0,1%-м цитрате натрия. Отмывали в фосфатно-солевом буфере. Затем добавляли к клеткам реактив TUNEL (Kit from Boehringer Mannheim Cat.No.1684795) и инкубировали в темноте в течение 60 мин при 37 °С. После инкубации клетки отмывали в фосфатно-солевом буфере и инкубировали в 1 мг/мл пропидиум иодида на дистиллированной воде, вновь промывали в фосфатно-солевом буфере, оставляли в темноте при комнатной температуре на 1 ч, затем помещали

в холодильник и хранили в горизонтальном положении. Образцы анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Carl Zeiss Axio ImagerA 2m (длины волн: возбуждения – 490 нм, эмиссия – 520 нм). Все использованные в исследовании реагенты, за исключением обозначенных, – производства фирмы Sigma-Aldrich. Эксперименты проводили от 3 до 5 повторностей каждый в соответствии со структурно-логической схемой (см. рисунок).

Для сравнения результатов использовали критерии χ^2 (статистическая программа Sigma Stat). Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали при трех уровнях значимости: $P<0,05$; $P<0,01$; $P<0,001$.



Структурно-логическая схема экспериментов

Результаты исследований. Анализ апоптотических процессов в клетках гранулезы коров выявил достоверные различия между уровнем апоптозов в гранулезных клетках фолликулов всех размеров, содержащих растущие или завершившие фазу роста ооциты. Доля апоптотических клеток гранулезы в фолликулах, содержащих завершившие фазу роста ооциты, независимо от диаметра фолликула значительно превышала таковую в фолликулах, содержащих растущие ооциты (< 3 мм – 15 % против 9 %, 3–5 мм – 18 % против 11 %, 6–8 мм –17 % против 12 %, $P<0,05$), табл. 1. Наименьший уровень апоптозов в гранулезе фолликулов с ВСВ(+) ооцитами наблюдали в фолликулах диаметром менее 3 мм (15 %). Тенденция не изменилась при анализе апоптотических процессов в фолликулах, содержащих растущие ооциты. В этом случае наименее затронутыми апоптозом оказались клетки гранулезы из фолликулов диаметром <3 мм (9 %).

Таблица 1

Уровень апоптозов в клетках гранулезы коров из фолликулов разного диаметра, содержащих растущие или завершившие фазу роста ооциты

Диаметр фолликула	<3 *n* = 58		3–5 *n* = 63		6–8 *n* = 48	
*ВСВ-тест ооцитов	ВСВ+ *n* = 32	ВСВ- *n* =26	ВСВ+ *n* =49	ВСВ- *n* =14	ВСВ+ *n* =38	ВСВ- *n*=10
Всего клеток	3200	2600	4900	1400	3800	1000
Число нормальных клеток, *n*, %	2720 (85)	2366 (91)	4018 (82)	1246 (89)	3154 (83)	880 (88)
Число клеток с хроматином в состоянии апоптоза, *n*, %	480 (15)[a]	234 (9)[b]	882 (18)[c]	154 (11)[d]	646 (17)[e]	120 (12)[h]

Примечание: *n* ооцитов – 169; 3–5 повторностей, [a:c] $P<0,05$; [a:e] $P<0,05$; [c:d, b:h] $P<0,01$; [b:d] $P<0,01$, критерий χ^2; *ВСВ(+) – ооциты, завершившие фазу роста, ВСВ(–) – растущие ооциты.

Таблица 2

Уровень апоптозов в клетках кумулюса коров из фолликулов разного диаметра, содержащих растущие или завершившие фазу роста ооциты

Диаметр фолликула	<3 *n* = 58		3–5 *n* = 63		6–8 *n* = 48	
*ВСВ-тест ооцитов	ВСВ(+) *n* = 32	ВСВ(-) *n* = 26	ВСВ(+) *n* = 49	ВСВ(-) *n* = 14	ВСВ(+) *n* = 38	ВСВ(-) *n* = 10
Всего клеток	3200	2600	4900	1400	3800	1000
Число нормальных клеток, *n*, %	3008 (94)	2444 (94)	4606 (94)	1330 (95)	3458 (91)	920 (92)
Число клеток с хроматином в состоянии апоптоза, *n*, %	192 (6)[a]	156 (6)[b]	294 (6)[c]	70 (5)[d]	342 (9)[e]	80 (8)[h]

Примечание: *n* ооцитов – 169; 3–5 повторностей, [a:e]$P<0{,}001$; [c:e]$P<0{,}05$, критерий χ^2; *ВСВ(+) – ооциты, завершившие фазу роста, ВСВ(–) – растущие ооциты.

Результаты анализа апоптоза в клетках кумулюса представлены в табл. 2. Не обнаружено достоверных различий в доле клеток кумулюса с ядрами в состоянии апоптоза в фолликулах разного диаметра, содержащих завершившие фазу роста или растущие ооциты. Показан рост доли клеток кумулюса с признаками апоптоза в фолликулах диаметром от 6 до 8 мм, содержащих как растущие, так и завершившие фазу роста ооциты (8 и 9 % против 6 % соответственно).

Заключение. Проведен анализ апоптозных изменений соматических клеток фолликула (гранулеза и кумулюса) в зависимости от диаметра фолликула и функционального статуса ооцита. Клетки гранулезы из фолликулов коров разного диаметра характеризуются различными показателями уровней апоптоза в зависимости от статуса ооцитов (завершившие рост и растущие), выделенных из этих фолликулов.

В клетках кумулюса, напротив, такой тенденции не выявлено. Уровень клеток кумулюса, окружающих ооциты в различном функциональном состоянии, затронутых апоптозом, не имел достоверных различий во всех исследуемых группах эксперимента. Последнее позволяет расценить уровень апоптозов в клетках гранулезы овариального фолликула коровы как индикатор функционального статуса развивающегося в нем ооцита (растущий или завершивший фазу роста) и предложить использовать данный показатель при прогнозировании качества донорских ооцитов коров.

Работа выполнена в соответствии с темой Государственного задания ФАНО России, номер госрегистрации – АААА-А18-118021590132-9.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Модернизация этапов технологии экстракорпорального созревания донорских ооцитов *Bos taurus*/ Т.И. Кузьмина [и др.] // Аграрный научный журнал. – 2017. – № 3. – С. 9–14.

2. *Feng W., Pan Z.* The effect of granulosa cells apoptosis on the cumulus expansion and the developmental competence of bovine oocytes // Advanced Materials Research, 2014, Vol. 997, P. 251–254.

3. *Galli C.* Achievements and unmet promises of assisted reproduction technologies in large animals: a

personal perspective // Anim. Reprod., 2017, Vol. 14, No.3, P. 614–621.

4. *Heleil B., Kuzmina T., Novikova N., Torner H. and Alm H.* Effect of prolactin on Developmental Competence of Bovine Oocytes Selected by Brilliant Cresyl Blue Staining//Journal of Reproduction and Infertility, 2010, No. 1, P. 01–07.

5. *Kuzmina T., Molchanov A., Stanislavovich T., Tatarskaya D.* Developmental competence of bovine oocytes that have not finished growth phase in vivo // Anim. Reprod., 2016, Vol. 13, No. 3, P. 651.

6. *Liu S., Jiang L., Zhong T., Kong S., Zheng R., Kong F.* et al. Effect of acrylamide on oocyte nuclear maturation and cumulus cells apoptosis in mouse in vitr. –PLoS ONE 10(8): e0135818. http://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135818.

7. *Lopes A.S., Madsen S.E., Ramsing N.B., Lovendahl P., Greve T., Callesen H.* Investigation of respiration of individual bovine embryos produced in vivo and in vitro and correlation with viability following transfer // Hum Reprod., 2007, Vol. 22, P. 558–566.

8. *Macaulay D. Angus, Gilbert I., ScantlandS., Fournier E., AshkarF., BastienA., ShojaeiSaadiH. A., GagneD., SirardM.-A., Khandjian E´ douard W., Richard F. J., HyttelP. and Robert C.* Cumulus cell transcripts transit to the bovine oocyte in preparation for maturation1 // Biology of reproduction, 2016, 94(1):16, P. 1–11.

9. *Menezo Y.J., Servy E., Veiga A., Hazout A., Elder K.* Culture systems: embryo co-culture // Methods Mol. Biol., 2012, Vol. 912, P. 231–247.

10. *Sinderewicz E., Grycmacher K., Boruszewska D., Kowalczyk-ZiebaI., Staszkiewicz J., Slesak T. and Woclawek-Potocka I.* Expression of factors involved in apoptosis and cell survival is correlated with enzymes synthesizing lysophosphatidic acid and its receptors in granulosa cells originating from different types of bovine ovarian follicles // Reprod.Biol.Endocrinol, 2017, Vol. 15, P. 72.

Кузьмина Татьяна Ивановна, *д-р биол. наук, проф., главный научный сотрудник, зав. лабораторией биологии развития, Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста». Россия.*

Станиславович Татьяна Ивановна, *канд. с.-х. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биологии развития, Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста». Россия.*

196625, г. Санкт-Петербург – Пушкин, Московское шоссе, 55а.

Тел.: (921)402-67-19; e-mail: lllfor@mail.ru.

Молчанов Алексей Вячеславович, *д-р с.-х. наук, проф., зав. кафедрой «Технология производства и переработки продукции животноводства», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова. Россия.*

410012, г. Саратов, Театральная пл., 1.

Тел.: (8452) 69-25-32; e-mail: molchanov_av@mail.ru.

Ключевые слова: *ооцит; гранулеза; кумулюс; апоптоз; Bos taurus; бриллиантовый кристаллический голубой.*

APOPTOSIS OF SOMATIC CELLS IN FOLLICULES AND THE FUNCTIONAL STATUS OF BOS TAURUS OOCYTES

Kuzmina Tatiana Ivanovna, *Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Laboratory of Developmental Biology,Chief researcher, All-Russian Research Institute of Ggenetics and Breeding of Farm Animals - branch of Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Center for Animal Husbandry - VIZH named after academician L.K. Ernst", Russia.*

Stanislavovich Tatyana Ivanovna, *Candidate of Agricultural Sciences, Leading Researcher of the Laboratory of Developmental Biology,Chief researcher, All-Russian Research Institute of Ggenetics and Breeding of Farm Animals - branch of Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Center for Animal Husbandry - VIZH named after academician L.K. Ernst", Russia.*

Molchanov Aleksey Vyacheslavovich, *Doctor of Agricultural Sciences, Professor of the chair "Technology of Production and Processing of Livestock Products, Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov, Russia.*

Keywords**:** *oocyte, granulosa, cumulus,apoptosis, Bos Taurus, brilliant cresyl blue, the embryo.*

In the present study, the analysis of apoptotic changes in the somatic cells of the follicle (granulosa and cumulus), depending on the diameter of the follicle (<3 mm, 3-5 mm, 6-8 mm) and the functional status of the oocyte (growing oocytes or oocytes that have finished growth phase) is presented. The functional status of the oocytes was assessed by BCB test based on the difference in the color of the ooplasm after exposure by the vital dye of brilliant cresyl blue (BCB)..Apoptosis in granulosa and cumulus cells isolated from follicles containing growing oocytes or oocytes that have finished growth phase was determined by the TUNEL (Feng W., Pan Zhifang Z. 2014).It is shown that granulosa from Bos Taurus follicles are characterized by different levels of apoptosis depending on the status of oocytes (growing oocytes or oocytes that have finished growth phase), isolated from these follicles.The proportion of apoptotic granulosa cells in follicles containing the oocytes that have finished growth phase, regardless of diameter of the follicle, was significantly higher than in follicles containing growing oocytes. In cumulus cells, on the contrary, there is no such trend. The level of apoptotic in the cumulus cells of oocytes in a different functional state did not have significant differences in all experimental groups. This data allow us to assess the level of apoptosis in granulosa of ovarian follicles as an indicator of the functional status of the developing oocyte and suggest to use this indicator as prediction of the quality of donor's Bos Taurus oocytes.