

УДК: 576.08; 577.21

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2025.3.445

МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК ИЗ АНТРАЛЬНЫХ ОВАРИАЛЬНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ *SUS SCROFA DOMESTICUS*

Кузьмина Т.И. – д-р биол. наук, проф., глав. науч. сотрудник, зав. лабораторией биологии развития (ORCID 0000-0002-4218-6080); Притужалова А.О. – науч. сотр. лаборатории биологии развития (ORCID 0000-0002-2865-9582); Баранова Е.И.* – лаборант-исследователь лаборатории биологии развития (ORCID 0009-0004-1980-9333)

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

*elenabaranova666@gmail.com

Ключевые слова: фолликулярная жидкость, внеклеточная ДНК, клетки гранулезы, *Sus scrofa domesticus*, пикноз.

Keywords: follicular fluid, extracellular DNA, granulosa cells, *Sus scrofa domesticus*, pyknosis.

Финансирование: Материалы подготовлены в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования (№ FGGN-2024-0014)

Поступила: 06.05.2025

Принята к публикации: 26.08.2025

Опубликована онлайн: 15.09.2025



РЕФЕРАТ

Оценка качества донорских ооцитов животных и их компетентности к оплодотворению является важной задачей в репродуктивной биотехнологии. Одним из перспективных неинвазивных биомаркеров, который может использоваться для вышеобозначенных целей, является внеклеточная ДНК (внДНК). Этот показатель активно исследуется в медицине, ориентированной на человека, однако его значение в оценке женских гамет продуктивных животных остается недостаточно изученным. В настоящем исследовании проведен анализ содержания внДНК в фолликулярной жидкости свиней, аспирированной из антральных овариальных фолликулов (диаметр >3мм, 3-5мм, <5мм), проанализировано влияние различных режимов центрифугирования на её выделение, а также оценена жизнеспособность клеток гранулезы (доля клеток с пикнотическими ядрами). Уровень клеток в состоянии пикноза определяли методом Тарковского, включающим гипотоническую обработку цитратом натрия, фиксацию уксусно-метанольной смесью и микроскопический анализ после окрашивания по Романовскому–Гимзе. Установлено, что концентрация внДНК в жидкости фолликулов изменяется в зависимости от их диаметра и режима центрифугирования. При увеличении ускорения центрифугирования наблюдалось снижение количества внДНК и рост доли клеток с пикнотическими ядрами.

ми, что свидетельствует об их повреждении. Идентифицирован режим центрифугирования (603,72 g в течение 5 минут), обеспечивающий максимальный уровень содержания внДНК при минимальном количестве пикнотических клеток. Кроме того, полученные данные согласуются с гипотезой о том, что внДНК может служить индикатором клеточного стресса, что особенно важно при оценке качества биоматериала в условиях *in vitro*. Представленные результаты подчеркивают важность выбора параметров центрифугирования для эффективного выделения внДНК с целью ее дальнейшего изучения как потенциального биомаркера качества ооцитов и перспективного прогностического индикатора фертильности продуктивных животных.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Вспомогательные репродуктивные технологии занимают важное место в сохранении генетического разнообразия и воспроизводстве сельскохозяйственных животных. Оценка качества донорского ооцита и его компетентности к оплодотворению - важный этап клеточных репродуктивных технологий. В настоящее время при оценке женских гамет используют морфологические показатели клеток кумулюса и гранулезы, анализ гормонального статуса фолликулярной жидкости [1, 2, 3]. Вышеуказанные показатели не дают полного представления о степени компетентности женской гаметы к созреванию и оплодотворению. В связи с чем поиск биомаркеров, позволяющий оценивать их качество, продолжается. На сегодняшний день имеется информация о таком неинвазивном критерии качества женской гаметы, как циркулирующие свободные нуклеиновые кислоты (внДНК). Этот параметр в гуманной медицине рассматривается в качестве перспективного биомаркера женской фертильности при различных гинекологических и акушерских патологиях [4]. Он может иметь диагностическую ценность для выявления нарушений овариального резерва и оценки состояния фолликулярного микроокружения [5].

Внеклеточная ДНК (внДНК) представляет собой фрагменты генетического материала, находящиеся в крови, слюне, моче, спинномозговой, амниотической и семенной жидкостях. Ее количество и характеристика позволяют получать важные сведения о генетических изменениях и клеточном состоянии неинвазивным методом [6, 7]. Гипотеза клеточной гибели

предполагает, что в процессе апоптоза и некроза происходит высвобождение ДНК [8]. Это объясняет наличие внеклеточной ДНК в виде мелких фрагментов, а также соответствует наблюдениям, что при состояниях, сопровождающихся гибелью клеток, уровень внДНК в крови возрастает. Однако, внДНК находится даже там, где не произошла массовая гибель клеток [9], что может быть следствием других процессов, в которые вовлечена внДНК: активное участие в процессе окислительного стресса клеток, перенос генетического материала в другие клетки, роль в качестве межклеточного мессенджера [10, 11]. Молекулы внДНК различаются по источникам и механизмам образования, длине фрагментов, видам циркуляции и модификациям [12, 13, 14, 15]. Концентрация внДНК в биологических жидкостях пациентов с онкологическими заболеваниями оценивается в три раза выше, чем у здоровых людей [16, 17, 18]. Внеклеточная ДНК выявлена при гипертонии [19], болезнях Паркинсона и Альцгеймера [20] и ряде аутоиммунных заболеваниях [21]. В связи с уже имеющимися данными о содержании внДНК в различных биологических жидкостях, исследование внДНК в фолликулярной жидкости рассматривается как перспективный неинвазивный метод оценки качества женских гамет продуктивных животных. Фолликулярная жидкость – сложная биологическая среда, содержащая в себе множество компонентов, способных выступать прогностическим признаком качества ооцита, циркулирующая в ней внДНК может служить потенциальным биомаркером фертильности [22, 23]. Присутствие внеклеточной ДНК в фолликулярной жидкости

связано с апоптозом и некрозом клеток, окружающих развивающийся ооцит по мере роста фолликула [24]. В этом аспекте уровень внеклеточной ДНК может выступать дополнительным индикатором характера влияния гонадотропной стимуляции на процессы фолликулогенеза и оогенеза [5]. Информация о внДНК в фолликулярной жидкости и ее связь с качеством ооцитов крайне ограничена, и в основном такие исследования относятся к области вспомогательных репродуктивных технологий у женщин [3, 23]. Наличие единичных данных о концентрации внДНК в фолликулярной жидкости крупного рогатого скота и свиней не предоставляют достаточно информации для понимания степени её влияния на ооциты, методические подходы к выделению внеклеточной ДНК из фолликулярной жидкости свиней не разработаны, а сведения о различиях её содержания в фолликулах различного диаметра отсутствуют [25]. В

связи с вышеизложенным, актуальным представляется вопрос о роли внеклеточной ДНК и её значении в динамике фолликулогенеза.

Цель настоящего исследования – адаптация этапов методологии выделения внДНК в фолликулярной жидкости овариальных фолликулов *Sus scrofa domestica* путем выявления оптимальных режимов и продолжительности центрифугирования с учетом показателя уровня клеток гранулезы с дегенерированным хроматином и концентрации внДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

В экспериментах использовали постмортальные яичники свинок породы ландрас (возраст 5-8 месяцев), полученные на мясокомбинате "Тосненский" с последующей их транспортировкой в физиологическом растворе (t 37°C). Для исследований отбирали яичники на стадии фолликулярного роста, без видимых патоло-

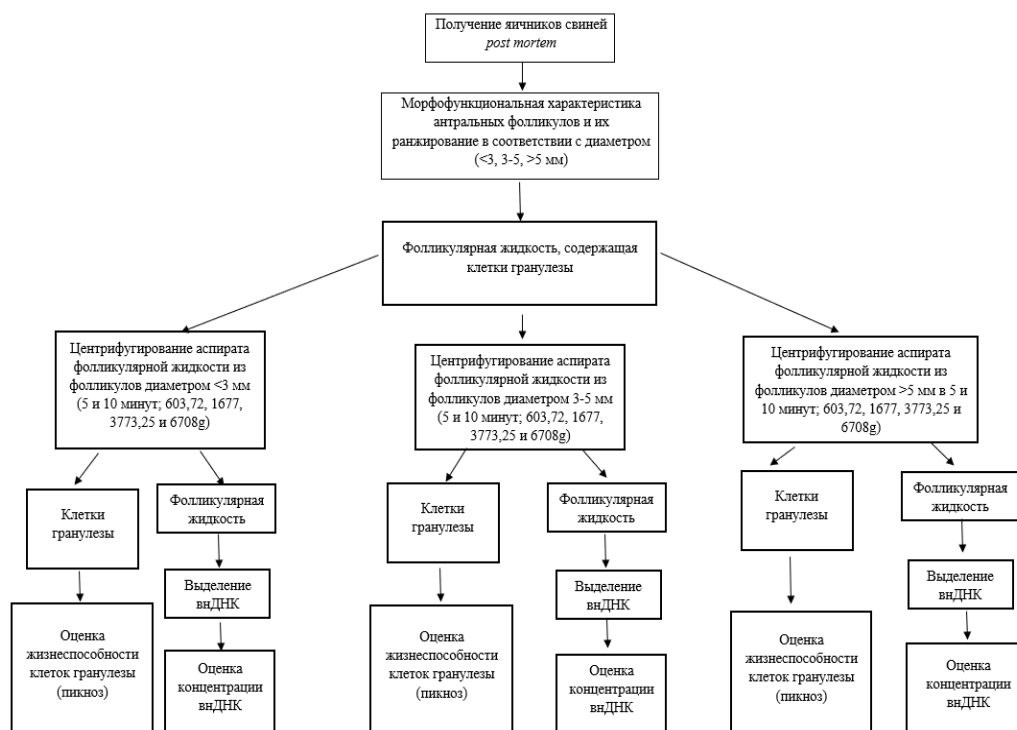


Рисунок 1 – Структурно-логическая схема эксперимента.

гических изменений. Фолликулярную жидкость и клетки гранулезы аспирировали из 10–15 фолликулов каждого яичника, ранжируя их в группы по диаметру ($\varnothing < 3$, 3–5, 5–8 мм) после чего центрифугировали при следующих режимах: 5 и 10 минут при 603,72, 1677, 3773,25 и 6708 g. Полученный осадок, содержащий клетки гранулезы, суспендировали в PBS для дальнейшего цитологического исследования (пикноз). Супернатант отбирали для последующей оценки концентрации внДНК с помощью набора QuDye dsDNA HS для определения количества двухцепочечной ДНК (Lumiprobe). Полученные образцы внДНК анализировали на флуориметре Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific).

Определение доли пикнотических клеток проводили по методу Тарковского [26]. Клетки гранулезы выдерживали в гипотоническом растворе цитрата натрия в течение 4 минут, после чего фиксировали раствором ледяной уксусной кислоты и метилового спирта (в соотношении 1:3). Высохшие суховоздушные препараты образцов клеток гранулезы окрашивали 4% раствором Романовского–Гимзе (азур-эозин) в течение 3–4 мин., после чего промывали стекла проточной водой, сушили на воздухе, а затем исследовали с помощью масляных импрессий под увеличением $\times 900$ на микроскопе Axio Imager A1, Carl Zeiss (Германия).

Схема эксперимента представлена на Рис.1.

Результаты обрабатывали с помощью статистической программы Excel. Достоверность исследуемых средних значений оценивали с помощью критерия χ^2 и критерия Стьюдента при трех уровнях значимости: $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Результаты экспериментов по обработке режимов центрифугирования жидкости из фолликулов разного диаметра представлены на рисунке 2, при центрифугировании 603,72 g в течение 5 минут содержание внДНК в фолликулах $\varnothing < 3$ мм оказалось значительно выше, чем в фолликулах $\varnothing 3–5$ мм (на 4,99 нг/мкл, p

$< 0,001$) и $\varnothing > 5$ мм (на 8,25 нг/мкл, $p < 0,05$). Указанная тенденция сохранялась по мере увеличения числа оборотов (8,37 нг/мкл при 1677g, 9,05 нг/мкл при 3773,25g и 10,01 нг/мкл при 6708 g, в течение 5 минут). При этом, внутри каждой группы, ранжированной по диаметру фолликулов, наблюдались достоверные отличия в уровне внДНК по мере изменения режима центрифугирования. В группах $\varnothing < 3$ мм центрифугирование при 603,72 g показало более высокую концентрацию внДНК в ФЖ в сравнении с группами, центрифугированными при 1677, 3773,25 и 6708 g (на 3,23, 2,55 и 1,5 нг/мкл соответственно, $p < 0,001$). Следует отметить, что в жидкости из фолликулов < 3 мм, центрифугированной при 6708 g, уровень внДНК был ниже, чем при использовании режимов ускорения 1677 и 3773,25 g (на 1,64 и 0,96 нг/мкл, $p < 0,001$; $p < 0,05$). В группе, содержащей жидкость, аспирированную из фолликулов $\varnothing 3–5$ мм, также наблюдали снижение уровня внДНК в фолликулярной жидкости, отцентрифугированной при 6708 g в сравнении с режимами центрифугирования 1677 и 3773,5 g (на 1,38 и 2,61 нг/мкл, $p < 0,01$). В образцах, содержащих жидкость из фолликулов $\varnothing > 5$ мм, была выявлена достоверная разница между группами жидкости фолликулов, отцентрифугированных при 1677 и 3773,25 g с увеличением в отношении второй на 1,09 нг/мкл, ($p < 0,001$, Рис. 2). В вышеобозначенной группе фолликулов в результате центрифугирования при 6708 g также наблюдали минимальную концентрацию внДНК в сравнении с другими режимами центрифугирования (на 1,67 нг/мкл в сравнении с центрифугированием при 603,72 g, на 1,32 нг/мкл при 1677 g, и на 2,41 нг/мкл в сравнении с 3773,25 g, $p < 0,001$, Рис.2).

Увеличение времени центрифугирования до 10 минут при тех же скоростных режимах демонстрирует схожую тенденцию с предыдущим показателем длительности центрифугирования, но с некоторыми изменениями.

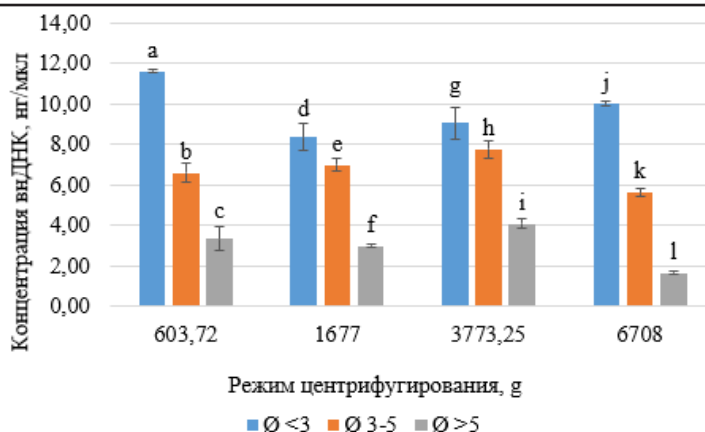


Рисунок 2 – Влияние режимов центрифугирования аспирата жидкости овариальных фолликулов разного диаметра на содержание вДНК (в течение 5 минут).
a,c, a;d; a,g; a;j; e,f, d;j; h,i; i,g, j;k, k,l, g;j; f;i; j;l; h;k; i;l; j;l – p < 0,001; b;c, d:e, e:k – p < 0,01; a;b; d;j; e:l – p < 0,05. (Student's t-test).

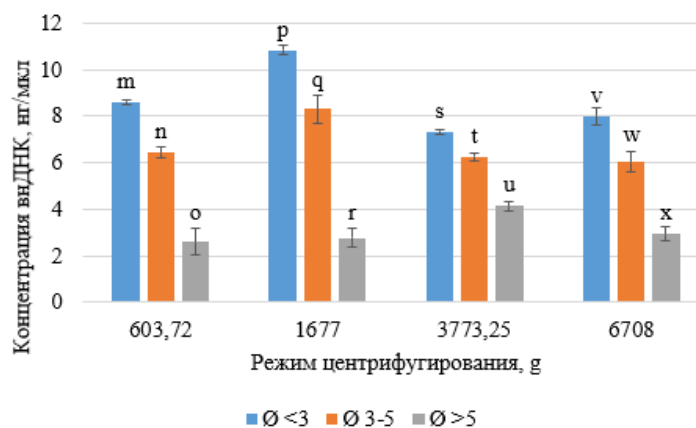


Рисунок 3 – Влияние режимов центрифугирования аспирата жидкости овариальных фолликулов разного диаметра на содержание вДНК (в течение 10 минут).
m;o, m;p, m;s, q;r, r;p, p;s, p:v, s;t, t;u, u;s, w;x, x:v – p < 0,001; p;q, v:w, q:w – p < 0,01; n;q, q;t, o;u, r;u, u;x – p < 0,05. (Student's t-test).

Достоверные отличия между временем центрифугирования по рис. 2 и рис. 3:
a;m, j:v – p < 0,001; d;p, h:t – p < 0,01; l;x – p < 0,05.

Согласно данным, представленным на рисунке 3, содержание вДНК в фолликулах $\varnothing < 3$ мм при увеличении времени центрифугирования до 10 минут составило 8,6 нг/мкл при 603,72 g, 10,84 нг/мкл при 1677 g, 7,35 нг/мкл при 3773,25 g и 7,99 нг/мкл при 6708 g, что значительно выше как уровня вДНК в жидкости фолликулов $\varnothing 3-5$ мм (на 2,17, 2,53, 1,1 и 1,96 нг/

мкл, $p < 0.001$), так и в жидкости фолликулов $\varnothing > 5$ мм (на 6, 8,08, 3,21 и 5,05 нг/мкл, $p < 0.001$) при одинаковых скоростях центрифугирования. Однако, при увеличении времени центрифугирования до 10 минут наблюдали изменения в соотношении уровня вДНК в жидкости из фолликулов одинакового диаметра в зависимости от числа оборотов. Так, в ФЖ из фол-

ликулов $\varnothing < 3$ мм наблюдался рост уровня вДНК при увеличении оборотов от 603,72 до 1677 g (на 2,24 нг/мкл, $p < 0,001$) и от 603,72 до 3773,25 g (на 1,25 нг/мкл, $p < 0,001$). Схожую тенденцию наблюдали при увеличении числа оборотов при центрифугировании с 1677 до 3773,25 g (на 3,49 нг/мкл, $p < 0,001$) и с 1677 до 6708 g (на 2,85 нг/мкл, $p < 0,001$). В результате оценки уровня содержания вДНК в жидкости, аспирированной из фолликулов $\varnothing 3-5$ мм, обнаружено, что при центрифугировании образцов с использованием режима ускорения - 1677 g, содержание вДНК увеличивается в сравнении с центрифугированием при 603,72 g (на 1,88 нг/мкл, $p < 0,05$), при 3773,25 g - на 2,06 нг/мкл ($p < 0,05$) и при 6708 g - на 2,28 нг/мкл ($p < 0,05$). В ФЖ из фолликулов $\varnothing > 5$ мм максимальная концентрация вДНК (4,14 нг/мкл), выявлена после центрифугирования при 3773,25 g, в течение 10 минут, что значительно выше на 1,54 нг/мкл, чем после центрифугирования при 603,72 g ($p < 0,05$), на 1,38 нг/мкл чем при 1677 g ($p < 0,05$) и на 1,2 нг/мкл при 6708 g ($p < 0,05$). Результаты, представленные на графике, показали значительное снижение концентрации вДНК по мере роста фолликулов при увеличении ускорения от 1677 g до

3773,25 g: на 3,49 нг/мкл в ФЖ из фолликулов $\varnothing < 3$ мм, на 2,06 нг/мкл в фолликулах $\varnothing 3-5$ мм. Однако, в фолликулах $\varnothing > 5$ мм уровень вДНК, наоборот, оказался выше на 1,38 нг/мкл ($p < 0,05$). Увеличение времени центрифугирования до 10 минут при тех же оборотах показало снижение концентрации вДНК в ФЖ, полученной из фолликулов $\varnothing < 3$ мм при ускорении 603,72 g (на 3 нг/мкл, $p < 0,001$) при 6708 g (на 2,02 нг/мкл, $p < 0,001$), из фолликулов $\varnothing 3-5$ мм при 3773,25 g (на 1,52 нг/мкл, $p < 0,01$). После 10 минут центрифугирования в сравнении с 5 мин наблюдался рост вДНК в ФЖ, полученной из фолликулов $\varnothing < 3$ мм после центрифугирования при 1677 g на 2,47 нг/мкл ($p < 0,01$) и в ФЖ из фолликулов $\varnothing > 5$ мм при 6708 g - на 1,26 нг/мкл ($p < 0,05$).

Разница в режимах ускорения и времени центрифугирования оказывает существенное влияние на показатели жизнеспособности гранулезных клеток, вызывая повреждения, инициирующее клеточную гибель. Для выявления характера влияния вышеуказанных факторов в нашем исследовании был оценен статус хроматина (уровень пикноза) в гранулезных клетках при различных режимах центрифугирования.

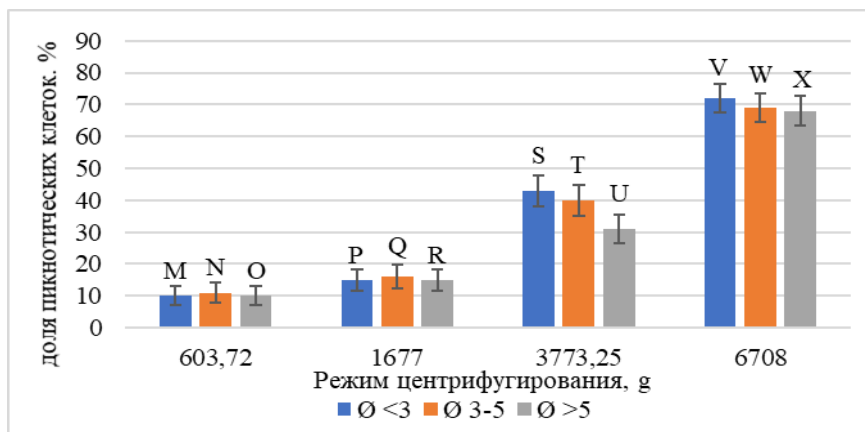


Рисунок 4 – Влияние режимов центрифугирования аспирированной жидкости овариальных фолликулов на статус хроматина гранулезных клеток *Sus scrofa domestica* (время центрифугирования 5 минут).

M:S, M:V, N:T, N:W, O:U, O:X, P:S, P:V, Q:T, Q:W, R:U, R:X, S:V, T:W, U:X - $p < 0,001$.

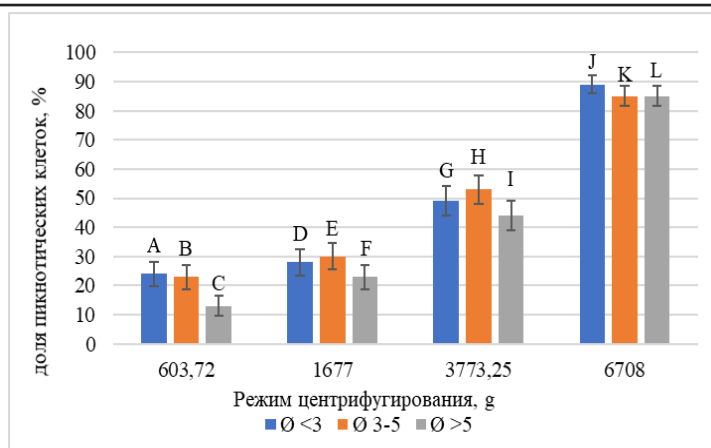


Рисунок 5 – Влияние режимов центрифугирования аспирата жидкости овариальных фолликулов на статус хроматина гранулезных клеток *Sus scrofa domestica* (время центрифугирования 10 минут).

A:J, B:H, B:K, C:I, C:K, C:L, D:J, F:L, G:J, H:K, I:L - $p < 0,001$ A:G, D:G, E:K, F:I - $p < 0,01$ A:C, E:H - $p < 0,05$

Достоверные отличия между временем центрифугирования по рис. 4 и рис. 5: A:M, J:V, K:W, L:X - $p < 0,01$ B:N, D:P, E:Q - $p < 0,05$.

Результаты анализов по влиянию режимов центрифугирования на деструктивные изменения хроматина в клетках гранулезы свиней представлены на рис.4. После 5 минут центрифугирования доля клеток гранулезы с пикнотическими ядрами, независимо от диаметра содержащих их фолликулов, оставалась на низком уровне при ускорении 603,72 и 1677 g. Значительный рост доли пикнотических клеток наблюдали внутри каждой группы фолликулов исследованных размеров по мере увеличения ускорения. Так, при скорости центрифугирования 3773,25 g в группе фолликулов $\varnothing < 3$ мм наблюдали увеличение доли пикнотических клеток на 33% в сравнении с ускорением 603,72 g ($p < 0,001$) и на 28% в сравнении с 1677 g ($p < 0,001$); в группе фолликулов - $\varnothing 3-5$ мм на 29% в сравнении с 603,72 g ($p < 0,001$) и на 24% в сравнении с 1677 g ($p < 0,001$); в популяции клеток из фолликулов $\varnothing > 5$ мм – на 21% в сравнении с 603,72 g ($p < 0,001$) и на 16% в сравнении с 1677 g ($p < 0,01$). Тенденция к повышению доли пикнотических клеток приобретала более выраженный характер при увеличе-

нии оборотов до 6708 g: в гранулезных клетках из фолликулов диаметром $\varnothing < 3, 3-5$ и > 5 мм этот показатель достигал 72%, 69% и 68% соответственно.

Согласно результатам, представленным на рисунке 5, в наших экспериментах при увеличении времени центрифугирования до 10 минут и разных режимах ускорения достоверных различий в соотношении групп клеток в состоянии пикноза из ФЖ фолликулов разного диаметра не обнаружено. Однако тенденция роста деструктивных изменений структуры хроматина в клетках гранулезы из фолликулов исследованных диаметров сохранялась. При центрифугировании КГ из фолликулов $\varnothing < 3$ мм при 603,72 g уровень пикнотических клеток был ниже в сравнении с клетками гранулезы после центрифугирования при 3773,25 g (на 25%, $p < 0,001$) и на 65%, ($p < 0,001$) после центрифугирования при 6708 g. КГ, полученные из фолликулов $\varnothing 3-5$ мм имели самый низкий процент пикнотических клеток также после центрифугирования при ускорения 603,72 g, что оказалось ниже, чем при 3773,25 g (на 30%, $p < 0,001$) и

6708 g (на 62%, $p < 0,001$). В образцах КГ, выделенных из фолликулов $\varnothing > 5$ мм обнаружен самый низкий уровень пикнозов после центрифугирования при ускорении 603,72 g и значительно ниже группы клеток, центрифугированной при 3773,25 g (на 31%, $p < 0,001$) и 6708 g (на 72%, $p < 0,001$). Увеличение времени центрифугирования инициировало рост клеток с пикнотическими ядрами во всех исследуемых группах при тех же режимах центрифугирования. Так, в КГ из фолликулов $\varnothing < 3$ мм при увеличении времени центрифугирования до 10 минут значительно возростала доля клеток в состоянии пикноза: после центрифугирования при 603,72 g на 14% ($p < 0,01$), при 1677 g на 13% ($p < 0,05$) и при 6708 g на 17%, ($p < 0,01$). В клетках, полученных из ФЖ фолликулов $\varnothing 3-5$ мм, после центрифугирования в течение 10 минут обнаружено повышение доли пикнотических клеток по сравнению с 5 минутами: при ускорении 603,72 g – на 12% ($p < 0,05$), при 1677 g – на 30% ($p < 0,05$) и при 6708 g на 16%, ($p < 0,01$). В образцах клеток из фолликулов $\varnothing > 5$ мм, при увеличении времени центрифугирования наблюдали достоверные различия в уровне пикнотических клеток только при ускорении 6708 g (на 17%) в сравнении с 5 минутным центрифугированием ($p < 0,01$). С увеличением времени центрифугирования до 10 минут в сравнении с 5 минутами, достоверных различий в доле клеток с пикнотическими ядрами из фолликулов всех исследуемых размеров при 3773,25 g не обнаружено.

Повышенное содержание внДНК в жидкости фолликулов $\varnothing < 3$ мм наблюдалось независимо от времени и скорости центрифугирования, что может быть связано с деструктивными процессами на ранних этапах фолликулогенеза, когда в клетках гранулезы активируются апоптотические механизмы, инициирующие атретические процессы в фолликулах [27, 28, 29, 30, 31]. В процессе роста фолликулов клетки гранулезы активно коммуницируют, по мере их развития наблюдается сокращение количества соматических

клеток, что связано со снижением пролиферативной активности, и, вероятно, влечет снижение содержания внДНК в фолликулах диаметром > 5 мм. При центрифугировании аспирата с ускорением 603,72 g в течение 5 минут выявлен минимальный процент клеток гранулезы с деструктивными изменениями хроматина. Дальнейшее повышение ускорения оборотов центрифугирования сопровождается риском механического повреждения клеточных структур, что, в свою очередь, может способствовать увеличению доли клеток, находящихся в состоянии пикноза. Как показывают полученные данные, при повышении оборотов (до 3773,25 g и 6708 g) происходит углубление процессов повреждения структуры клеток, что, хотя и увеличивает долю клеток в состоянии пикноза, однако не приводит к такой высокой концентрации внДНК, как при 603,72 (5 мин) и 1677 g (10 мин). Последнее свидетельствует о возможном осаждении фрагментов ДНК, вышедших из клеток, поврежденных при повышении режимов центрифугирования. Сокращение времени частично снижает негативное влияние высоких режимов центрифугирования, однако тенденция к уменьшению жизнеспособности клеток при повышении g сохраняется, что указывает на то, что продолжительность центрифугирования также является важным фактором, влияющим на сохранность соматических клеток. Центрифугирование при 3773,25 g и 6708 g оказывает выраженное повреждающее воздействие, вне зависимости от времени. Последнее подтверждается высоким процентом пикнотических клеток в образцах при использовании обоих временных режимов.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Отработаны этапы методологии получения внДНК и клеток гранулезы *Sus scrofa domestica* из антральных овариальных фолликулов ($\varnothing < 3$, 3-5 и > 5 мм). Содержание внДНК в фолликулах разного диаметра составило, соответственно: в фолликулах диаметром < 3 мм – 11,6 нг/мкл, диаметром 3-5 мм – 6,61 нг/мкл, диаметром > 5 мм – 3,35 нг/мкл. Высокий

уровень вДНК и низкие уровни пикнотических клеток, выявленных при центрифугировании с ускорением 603,72 g в течение 5 минут, позволяют рекомендовать данный режим, как оптимальный для центрифугирования аспирата жидкости фолликулов диаметром <3, диаметром 3-5 и диаметром >5 мм, т. к. дальнейшее увеличение числа оборотов и времени центрифугирования повышает концентрацию вДНК, обусловленное, по-видимому, углублением деструктивных процессов в клетках гранулезы (увеличение доли клеток с ядрами в состоянии пикноза), что может свидетельствовать о повреждении клеток, и, как следствие, выходе ДНК во внеклеточное пространство.

TO THE TECHNIQUE OF EXTRACELLULAR DNA ISOLATION OBTAINED FROM FOLLICLES OF DIFFERENT DIAMETERS OF SUS SCROFA DOMESTICUS

Kuzmina T.I. – Doctor of Biological Sciences, Professor, Chief Researcher, Head of the Laboratory of Developmental Biology, (ORCID 0000-0002-4218-6080); **Prituzhalova A.O.** – Researcher, Laboratory of Developmental Biology (ORCID 0000-0002-2865-9582); **Baranova E.I.** – Research Assistant at the Developmental Biology Laboratory (ORCID 0009-0004-1980-9333).

The All-Russian Scientific Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals is a branch of the Federal State Budgetary Scientific Institution Federal Research Center of Animal Husbandry named after Academician L. K. Ernst

*elenabaranova666@gmail.com

Financing: *The materials were prepared within the framework of the State Assignment of the Ministry of Science and Higher Education (No. FGGN-2024-0014)*

ABSTRACT

Assessment of the quality of animal donor oocytes and their competence for fertilization is an important task in reproductive biotechnology. Extracellular DNA is one of the promising noninvasive biomarkers that

can be used for the above purposes. This indicator is actively being investigated in human-oriented medicine, but its significance in assessing the female gametes of productive animals remains poorly understood. The present study analyzes the content of cDNA in pig follicular fluid aspirated from antral ovarian follicles (diameter 3mm, 3-5mm, <5mm), analyzes the effect of various centrifugation modes on its isolation, and evaluates the viability of granulosa cells (proportion of cells with pyknotic nuclei). The level of cells in a state of pyknosis was determined by the Tarkovsky method, which included hypotonic treatment with sodium citrate, fixation with an acetic-methanol mixture, and microscopic analysis after Romanovsky–Giemse staining. It was found that the concentration of cDNA in the follicle fluid varies depending on their diameter and mode of centrifugation. With an increase in the acceleration of centrifugation, a decrease in the amount of cDNA and an increase in the proportion of cells with pyknotic nuclei were observed, which indicates their damage. The centrifugation mode (603.72 g for 5 minutes) was identified, providing the maximum level of cDNA content with a minimum number of pyknotic cells. In addition, the data obtained is consistent with the hypothesis that cDNA can serve as an indicator of cellular stress, which is especially important when assessing the quality of biomaterials in vitro. The presented results emphasize the importance of choosing the parameters of centrifugation for the effective isolation of cDNA to further study it as a potential biomarker of oocyte quality and a promising predictive indicator of fertility in productive animals.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Сафронова Н.А., Калинина Е.А., Донников А.Е., Бурменская О.В., Макарова Н.П., Кулакова Е.В., Алиева К.У. Перспективы исследования маркеров клеток кумулюса для оценки качества ооцитов и эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий // *Акушерство и гинекология*. – 2015. – № 12.
2. Станиславович Т. И., Кузьмина Т. И.,

- Молчанов А. В. Оценка деструктивных процессов хроматина гранулезных клеток овариальных фолликулов коров и функциональный статус ооцита // Аграрный вестник Урала. 2019. № 12 (191) С. 60–64. DOI: 10.32417/1997-4868-2019-191-12-60-64.
3. Гапоненко А.А., Митюрин Е.В., Франкевич В.Е. Метаболический профиль фолликулярной жидкости как маркер качества ооцитов // Акушерство и гинекология. – 2021. – № 11. – С. 26–31. DOI:10.18565/aig.2021.11.26-31.
4. Scalici E, Mulet T, Ferrier Hoa A, et al. Circulating nuclear acids and infertility. *Gynecol Obstet Fertil*. 2015; DOI: 10.1016/j.gyobfe.2015.07.016.
5. Андреева Е. А., Хонина Н. А., Демченко Е. Н., Гаврилова Е. Д., Пасман Н. М., Козлов В. А., Черных Е. Р. Свободная ДНК в фолликулярной жидкости у женщин с различными показателями овариальной функции. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 16–23. DOI: 10.20538/1682-0363-2019-2-16-23
6. De Borre M, Che H, Yu Q, et al. Cell-free DNA methylome analysis for early preeclampsia prediction. *Nat Med*. 2023;29 (9):2206–15. DOI:10.1038/s41591-023-02510-5.
7. Adil, M., Kolarova, T.R., Doebley, AL. et al. Preeclampsia risk prediction from prenatal cell-free DNA screening. *Nat Med* (2025). DOI:10.1038/s41591-025-03509-w
8. Stroun M, Lyautey J, Olson-Sand A, Anker P. 2001. About the possible origin and mechanism of circulating DNA. *Apoptosis and active DNA release*. *Clin Chim Acta*. 313(1–2):139–142. DOI:10.1016/s0009-8981(01)00665-9.15
9. Aucamp J, Bronkhorst AJ, Badenhorst CPS, Pretorius PJ. 2018. The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 93(3):1649, 168. DOI: 10.1111/BRV.12413.
10. Fernández-Domínguez, I. J., Manzo-Merino, J., Taja-Chayeb, L., Dueñas-González, A., Pérez-Cárdenas, E., amp; Trejo-Becerril, C. The role of extracellular DNA (exDNA) in cellular processes. *Cancer Biology & Therapy*, 22(4), 267–278.
- Fernández-Domínguez, I. J., Manzo-Merino, J., Taja-Chayeb, L., Dueñas-González, A., Pérez-Cárdenas, E., amp; Trejo-Becerril, C. (2021). The role of extracellular DNA (exDNA) in cellular processes. *Cancer Biology & Therapy*, 22(4), 267–278. DOI:10.1080/15384047.2021.1890319
11. Keeling PJ, Palmer JD. 2008. Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nat Rev Genet*. 9(8):605–618. DOI: 10.1038/nrg2386.
12. Kustanovich A, Schwartz R, Peretz T, Grinshpun A. Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biol Ther*. 2019;20 (8):1057–1067. DOI:10.1080/15384047.2019.1598759.
13. Костюк С.В. Роль внеклеточной ДНК в функциональной активности генома человека // Вестник РАН. – 2010. – Т. 80, № 9. – С. 746–752.
14. McCarthy C. G., Wenceslau C. F., Gouloupoulou S., Oghi S., Baban B., Sullivan J. C., et al. (2015). Circulating mitochondrial DNA and Toll-like receptor 9 are associated with vascular dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc. Res*. 107 119–130. DOI: 10.1093/cvr/cvv137
15. Rykova E, Morozkin E, Ponomaryova A, Loseva E, Zaporozhchenko I, Cherdyntseva N, Vlassov V, Laktionov P. 2012. Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid complexes: mechanisms of generation, concentration and content. *Expert Opin Biol Ther*. 12(Suppl sup1):S141–S153. DOI:10.1517/14712598.2012.673577.
16. Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. 2016. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev*. 35(3):347–376. DOI:10.1007/s10555-016-9629-x.
17. Wang W, Kong P, Ma G, Li L, Zhu J, Xia T, Xie H, Zhou W, Wang S. 2017. Characterization of the release and biological significance of cell-free DNA from breast cancer cell lines. *Oncotarget*. 8(26):43180–43191. DOI: 10.18632/oncotarget.17858.
18. Sato Y, Matoba R, Kato K. 2019. Recent advances in liquid biopsy in precision oncology research. *Biol Pharm Bull*. 42(3):337–342. DOI: 10.1248/bpb.b18-00804.13

19. McCarthy C. G., Wenceslau C. F., Gouloupoulou S., Oghi S., Baban B., Sullivan J. C., et al. (2015). Circulating mitochondrial DNA and Toll-like receptor 9 are associated with vascular dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc. Res.* 107 119–130. DOI:10.1093/cvr/cvv137
20. Lowes H., Pyle A., Santibanez-Koref M., Hudson G. (2020). Circulating cell-free mitochondrial DNA levels in Parkinson's disease are influenced by treatment. *Mol. Neurodegener.* 15:10. DOI: 10.1186/s13024-020-00362-y
21. Vakkrou A. G., Boiu S., Ziakas P. D., Xingi E., Boleti H., Manoussakis M. N. (2018). Systemic activation of NLRP3 inflammasome in patients with severe primary Sjögren's syndrome fueled by inflammagenic DNA accumulations. *J. Autoimmun.* 91 23–33. DOI: 10.1016/j.jaut.2018.02.010
22. Scalici E., Mulet T., Ferrier Hoa A., Gala A., Lu V., Anahori T. et al. Circulating nuclear acids and infertility. *Gynecol Obstetric Fertil.* 2015; 43:593-8. DOI: 10.1016/j.gyobfe.2015.07.016.
23. Traver S, Scalici E, Mullet T, Molinari N, Vincens C, Anahory T, Hamamah S. Cell-free DNA in Human Follicular Microenvironment: New Prognostic Biomarker to Predict in vitro Fertilization Outcomes PLoS ONE. 2015;10(8):e0136172. DOI: 10.1371/journal.pone.0136172.
24. Guan Y., Zhang W., Wang X., Cai P., Jia Q., Zhao W. Cell-free DNA induced apoptosis of granulosa cells by oxidative stress. *Clin. Chim. Acta.* 2017; 473: 213–217. DOI: 10.1016/j.cca.2016.11.023.
25. Ichikawa K., Shibahara H., Shirasuna K., Kuwayama T., Iwata H. Cell-free DNA content in follicular fluid: a marker for the developmental ability of porcine oocytes. *Reproductive Medicine and Biology.* 2019. Vol. 19. P. 95-103. DOI: 10.1002/rmb2.12309.
26. Tarkowski AK. An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs. *Cytogenetics.* 1966;5(3):394-400. DOI:10.1159/000129914
27. Woodruff TK, Shea LD. The role of the extracellular matrix in ovarian follicle development. *Reprod Sci.* 2007 Dec;14(8 Suppl):6-10. DOI: 10.1177/1933719107309818.
28. Liu Z, Li F, Xue J, Wang M, Lai S, Bao H, He S. Esculentoside A rescues granulosa cell apoptosis and folliculogenesis in mice with premature ovarian failure. *Aging (Albany NY).* 2020 Aug 5;12(17):16951-16962. DOI: 10.18632/aging.103609. Epub 2020 Aug 5.
29. Xie J, Xu X, Liu S. Intercellular communication in the cumulus-oocyte complex during folliculogenesis: A review. *Front Cell Dev Biol.* 2023 Jan 19; 11:1087612. DOI: 10.3389/fcell.2023.1087612.
30. Avalos PN, Wong LL, Forsthoefel DJ. Extracellular vesicles promote proliferation in an animal model of regeneration. *bioRxiv [Preprint].* 2024 Mar 27:2024.03.22.586206. DOI: 10.1101/2024.03.22.586206.
31. Chaves MA, Ferst JG, Fiorenza MF, Vit FF, da Silveira JC. The Influence of Ovarian-Derived Extracellular Vesicles in Reproduction. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2025 Jan 1. DOI: 10.1007/102_2024_9.

REFERENCES

1. Safronova N.A., Kalinina E.A., Donnikov A.E., Burmenskaya O.V., Makarova N.P., Kulakova E.V., Alieva K.U. Prospects for studying cumulus cell markers to assess the quality of oocytes and embryos in assisted reproductive technology programs // *Obstetrics and Gynecology.* – 2015. – № 12. (In Russ.)
2. Stanislavovich T. I., Kuzmina T. I., Molchanov A. V. Assessment of the Destructive Processes of Chromatin in Granular Cells of Ovarian Follicles in Cows and the Functional Status of the Oocyte // *Agrarian Bulletin of the Urals.* 2019. No. 12 (191). Pp. 60–64. DOI: 10.32417/1997-4868-2019-191-12-60-64. (In Russ.)
3. Gaponenko A.A., Mityurina E.V., Frankevich V.E. The metabolic profile of follicular fluid as a marker of oocyte quality // *Obstetrics and Gynecology.* – 2021. – No. 11. – pp. 26-31. DOI:10.18565/aig.2021.11.26-31. (In Russ.)
4. Scalici E., Mulet T., Ferrier Hoa A., Gala A., Lu V., Anahori T. et al. Circulating nuclear acids and infertility. *Gynecol Obstetric Fertil.* 2015; DOI:10.18565/

- aig.2021.11.26-31. (in French)
5. Andreeva E.A., Honina N.A., Demchenko E.N., Gavrilova E.D., Pasman N.M., Kozlov V.A., Chernykh E.R. Free DNA in follicular fluid in women with different indicators of ovarian function. *Bulletin of Siberian medicine*. 2019; 18 (2): 16–23. DOI: 10.20538/1682-0363-2019-2-16-23 (In Russ.)
 6. De Borre M, Che H, Yu Q, et al. Cell-free DNA methylome analysis for early preeclampsia prediction. *Nat Med*. 2023;29 (9):2206-15. DOI:10.1038/s41591-023-02510-5 (in English)
 7. Adil, M., Kolarova, T.R., Doebley, AL. et al. Preeclampsia risk prediction from prenatal cell-free DNA screening. *Nat Med* (2025). DOI:10.1038/s41591-025-03509-w (in English)
 8. Stroun M, Lyautey J, Olson-Sand A, Anker P. 2001. About the possible origin and mechanism of circulating DNA. Apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta*. 313(1–2):139–142. DOI:10.1016/s0009-8981(01)00665-9.15 (in English)
 9. Aucamp J, Bronkhorst AJ, Badenhorst CPS, Pretorius PJ. 2018. The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 93(3):1649, 168. DOI: 10.1111/BRV.12413. (in English)
 10. Fernández-Domínguez, I. J., Manzo-Merino, J., Taja-Chayeb, L., Dueñas-González, A., Pérez-Cárdenas, E., amp; Trejo-Becerril, C. The role of extracellular DNA (exDNA) in cellular processes. *Cancer Biology; Therapy*, 22(4), 267–278. Fernández-Domínguez, I. J., Manzo-Merino, J., Taja-Chayeb, L., Dueñas-González, A., Pérez-Cárdenas, E., amp; Trejo-Becerril, C. (2021). The role of extracellular DNA (exDNA) in cellular processes. *Cancer Biology amp; Therapy*, 22(4), 267–278. DOI:10.1080/15384047.2021.1890319 (in English)
 11. Keeling PJ, Palmer JD. 2008. Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nat Rev Genet*. 9(8):605–618. DOI: 10.1038/nrg2386. (in English)
 12. Kustanovich A, Schwartz R, Peretz T, Grinshpun A. Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biol Ther*. 2019;20 (8):1057–1067. DOI:10.1080/15384047.2019. 1598759. (in English)
 13. Kostyuk S. V. The role of extracellular DNA in the functional activity of the human genome // *Bulletin of the Russian Academy of Sciences*. - 2010. — Vol.80, No. 9. — pp. 746-752. (In Russ.)
 14. McCarthy C. G., Wenceslau C. F., Gouloupoulou S., Ogbi S., Baban B., Sullivan J. C., et al. (2015). Circulating mitochondrial DNA and Toll-like receptor 9 are associated with vascular dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc. Res*. 107 119–130. DOI: 10.1093/cvr/cvv137 (in English)
 15. Rykova E, Morozkin E, Ponomaryova A, Loseva E, Zaporozhchenko I, Cherdyntseva N, Vlassov V, Laktionov P. 2012. Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid complexes: mechanisms of generation, concentration and content. *Expert Opin Biol Ther*. 12(Suppl sup1):S141–S153. DOI:10.1517/14712598.2012.673577. (in English)
 16. Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. 2016. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev*. 35(3):347–376. DOI:10.1007/s10555-016-9629-x. (in English)
 17. Wang W, Kong P, Ma G, Li L, Zhu J, Xia T, Xie H, Zhou W, Wang S. 2017. Characterization of the release and biological significance of cell-free DNA from breast cancer cell lines. *Oncotarget*. 8(26):43180–43191. DOI: 10.18632/oncotarget.17858. (in English)
 18. Sato Y, Matoba R, Kato K. 2019. Recent advances in liquid biopsy in precision oncology research. *Biol Pharm Bull*. 42(3):337–342. DOI: 10.1248/bpb.b18-00804.13 (in English)
 19. McCarthy C. G., Wenceslau C. F., Gouloupoulou S., Ogbi S., Baban B., Sullivan J. C., et al. (2015). Circulating mitochondrial DNA and Toll-like receptor 9 are associated with vascular dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc. Res*. 107 119–130. DOI: 10.1093/cvr/cvv137 (in English)
 20. Lowes H., Pyle A., Santibanez-Koref

- M., Hudson G. (2020). Circulating cell-free mitochondrial DNA levels in Parkinson's disease are influenced by treatment. *Mol. Neurodegener.* 15:10. DOI: 10.1186/s13024-020-00362-y (in English)
21. Vakrakou A. G., Boiu S., Ziakas P. D., Xingi E., Boleti H., Manoussakis M. N. (2018). Systemic activation of NLRP3 inflammasome in patients with severe primary Sjögren's syndrome fueled by inflammagenic DNA accumulations. *J. Autoimmun.* 91 23–33. DOI:10.1016/j.jaut.2018.02.010 (in English)
22. Scalici E., Mulet T., Ferrier Hoa A., Gala A., Lu V., Anahori T. et al. Circulating nuclear acids and infertility. *Gynecol Obstetric Fertil.* 2015; 43:593-8. DOI: 10.1016/j.gyobfe.2015.07.016. (in English)
23. Traver S, Scalici E, Mullet T, Molinari N, Vincens C, Anahory T, Hamamah S. Cell-free DNA in Human Follicular Microenvironment: New Prognostic Biomarker to Predict in vitro Fertilization Outcomes PLoS ONE. 2015;10(8):e0136172. DOI: 10.1371/journal.pone.0136172. (in English)
24. Guan Y., Zhang W., Wang X., Cai P., Jia Q., Zhao W. Cell-free DNA induced apoptosis of granulosa cells by oxidative stress. *Clin. Chim. Acta.* 2017; 473: 213–217. DOI: 10.1016/j.cca.2016.11.023. (in English)
25. Ichikawa K., Shibahara H., Shirasuna K., Kuwayama T., Iwata H. Cell-free DNA content in follicular fluid: a marker for the developmental ability of porcine oocytes. *Reproductive Medicine and Biology.* 2019. Vol. 19. P. 95-103. DOI: 10.1002/rmb2.12309. (in English)
26. Tarkowski A. K. An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs. (1966) *Cytogenetics*, nr. 5, 3, P. 394-400. DOI:10.1159/000129914 (in English)
27. Woodruff TK, Shea LD. The role of the extracellular matrix in ovarian follicle development. *Reprod Sci.* 2007 Dec;14(8 Suppl):6-10. DOI: 10.1177/1933719107309818. (in English)
28. Liu Z, Li F, Xue J, Wang M, Lai S, Bao H, He S. Esculentoside A rescues granulosa cell apoptosis and folliculogenesis in mice with premature ovarian failure. *Aging (Albany NY).* 2020 Aug 5;12(17):16951-16962. DOI: 10.18632/aging.103609. Epub 2020 Aug 5. (in English)
29. Xie J, Xu X, Liu S. Intercellular communication in the cumulus-oocyte complex during folliculogenesis: A review. *Front Cell Dev Biol.* 2023 Jan 19; 11:1087612. DOI: 10.3389/fcell.2023.1087612. (in English)
30. Avalos PN, Wong LL, Forsthoefel DJ. Extracellular vesicles promote proliferation in an animal model of regeneration. *bioRxiv [Preprint].* 2024 Mar 27:2024.03.22.586206. DOI: 10.1101/2024.03.22.586206. (in English)
31. Chaves MA, Ferst JG, Fiorenza MF, Vit FF, da Silveira JC. The Influence of Ovarian-Derived Extracellular Vesicles in Reproduction. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2025 Jan 1. DOI: 10.1007/102_2024_9. (in English)