

«Анализ уровней экспрессии микроРНК (gga-miR-301a-5p, gga-miR-6701-3p) и их целевых генов (*TGFB2*, *DMRT1*) в сперматозоидах петухов *Gallus gallus domesticus* с различной посткриогенной подвижностью»

Автор: аспирант 1 курса направления 1.5.7 «Генетика» Ивершина А. А. (nastya_ivershina@mail.ru)

Научный руководитель: канд. биол. наук. Федорова Е. С. (osot2005@yandex.ru)

Исследование выполнено в рамках проекта РНФ 24-16-00259

Криоконсервация семени – технология, которая широко применяется в программах сохранения генетических ресурсов в птицеводстве, однако ее эффективность ограничивается рядом проблем, связанных с сохранением фертильности спермы самцов после размораживания.

АКТУАЛЬНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

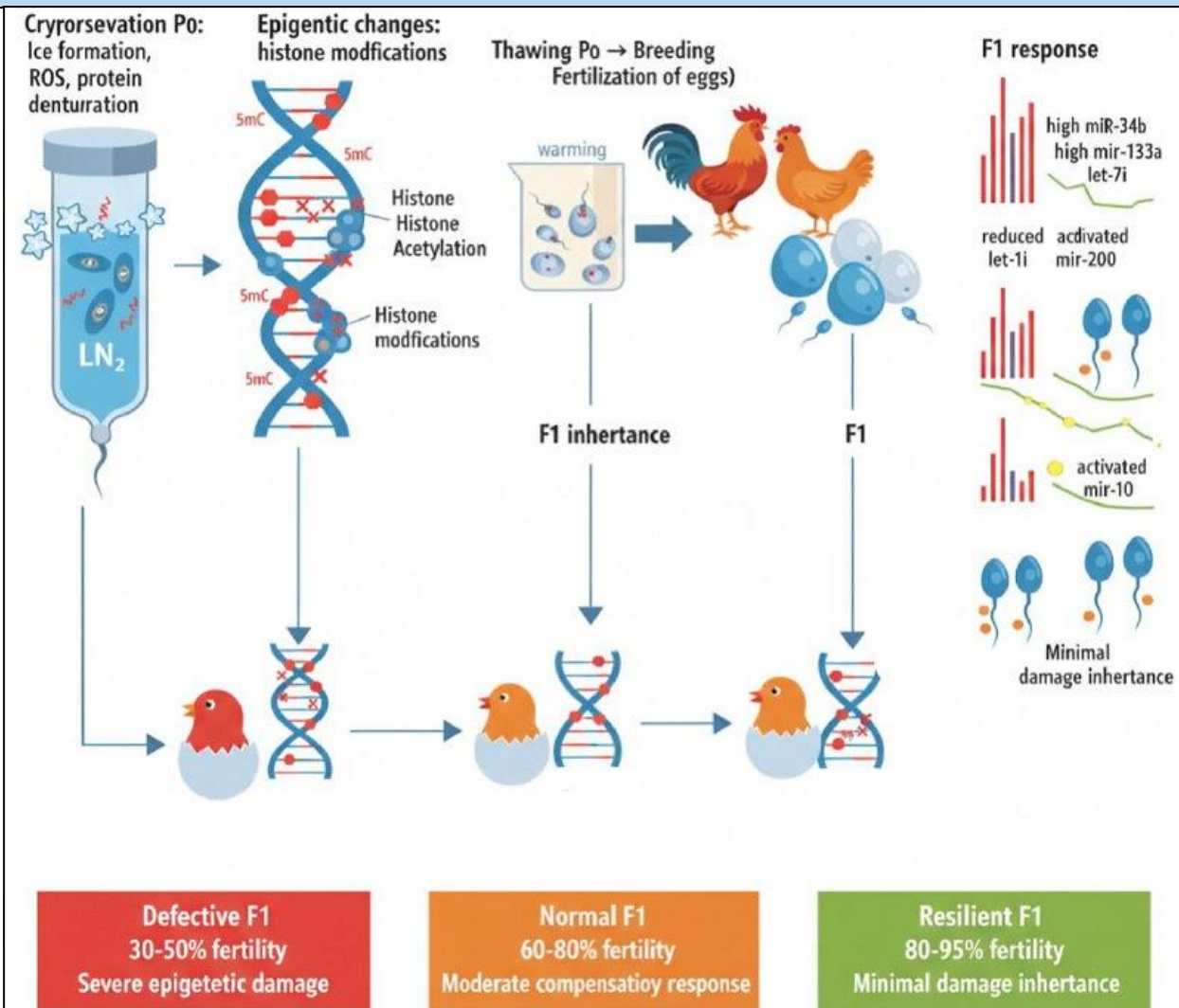
Проблема: снижение оплодотворяющей способности сперматозоидов птиц после оттаивания

Механизмы криповреждений:

- нарушение целостности мембран;
- окислительный стресс;
- активация апоптотических путей

Неизученный аспект: роль посттранскрипционной регуляции в формировании индивидуальной криорезистентности половых клеток у птиц

Гипотеза: микроРНК (gga-miR-301a-5p, gga-miR-6701-3p) как модуляторы экспрессии генов-мишеней (*TGFB2*, *DMRT1*) определяют устойчивость сперматозоидов к криострессу



ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ:

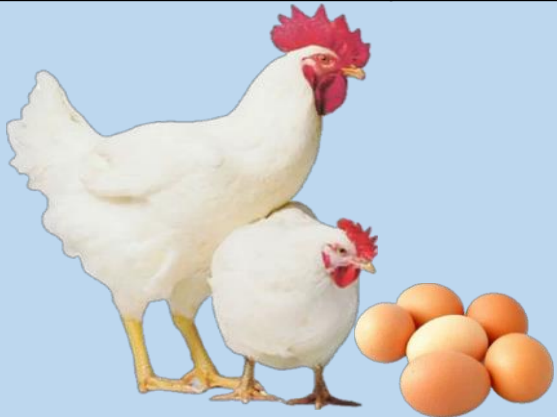
- анализ молекулярно-функциональных профилей микроРНК и их целевых генов, ассоциированных с высокой и низкой подвижностью сперматозоидов после криоконсервации у петухов *Gallus gallus domesticus*.

ЗАДАЧИ:

1. Провести оценку качества семени петухов до и после криоконсервации по показателям подвижности, жизнеспособности и митохондриальной активности;
2. Провести кластерный анализ образцов на основе показателей подвижности (ОП/ПП, %) сперматозоидов после криоконсервации;
3. Провести анализ уровней экспрессии микроРНК (gga-miR-301a-5p, gga-miR-6701-3p) и целевых генов (*TGFB2*, *DMRT1*) в нативном и замороженно-оттаянном семени;
4. Проанализировать корреляционные взаимосвязи между экспрессией микроРНК и функциональными параметрами сперматозоидов;
5. Оценить фертильность криоконсервированного семени от петухов с различной криорезистентностью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования	Петухи русской белоснежной породы, в возрасте 32-44 нед. жизни (n=8)
Криоконсервация семени	Ленинградская криозащитная среда (ЛКС) + 6% DMA; эквilibрация 18→5°C (40 мин); замораживание в гранулах (-196°C); оттаивание при 60°C
Оценка качества семени	Цитология: объём, концентрация (Accuread), ОП/ПП (CASA ArgusSoft-Poultry) Проточная цитометрия (CytoFLEX): PI ⁻ /AN ⁻ (жизнеспособность), PI ⁻ /AN ⁺ (апоптоз), TMRE ⁺ (митохондрии)
Выделение РНК	Набор «Лира» (ООО «Biolabmix»); спайк-контроль cel-miR-39-3p
qPCR	МикроРНК (gga-miR-301a-5p, gga-miR-6701-3p): Stem-loop RT + TaqMan;; нормализация (контроль) - <i>U6</i> ; Целевые гены (<i>TGFB2</i> , <i>DMRT1</i>): SYBR Green; нормализация (контроль) <i>GAPDH</i>
Статистический анализ	Кластеризация криоконсервированной спермы по показателям подвижности; Дисперсионный анализ, корреляционный анализ



КЛАСТЕРИЗАЦИЯ ПО ОБЩЕЙ (ОП) И ПРОГРЕССИВНОЙ (ПП) ПОДВИЖНОСТИ СПЕРМАТОЗОИДОВ

На основе ОП и ПП выделено 2 кластера (n = 8, p < 0,0001):

Кластер 1 ●
«Устойчивые»

Кластер 2 ●
«Чувствительные»

ОП, %	55,97 ± 9,77	26,13 ± 10,23
ПП, %	30,70 ± 9,02	13,13 ± 5,69

Дополнительные параметры (p > 0,05):

- Жизнеспособность (PI-/AN-)
- Апоптоз (PI+/AN+)
- Митохондриальная активность (TMRE+)

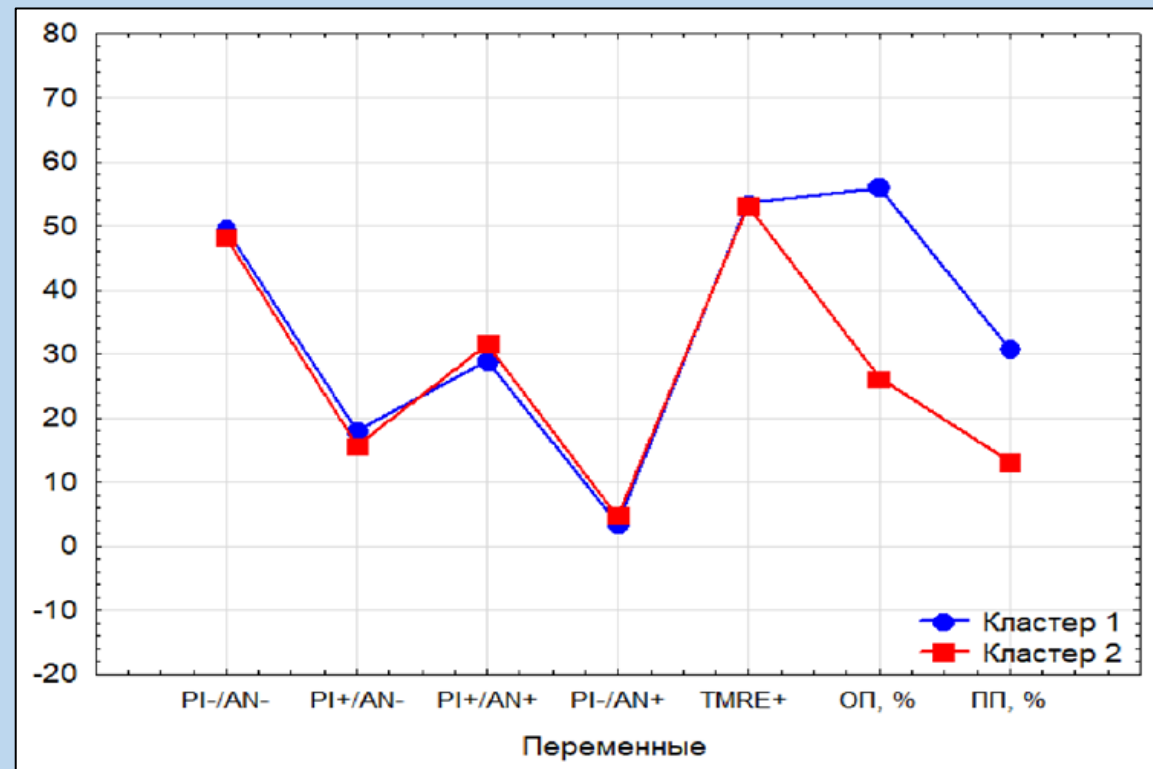


Таблица 1. Результаты дисперсионного анализа по показателям качества з/о семени

Показатель	Между, SS	df	Внутри, SS	df	F	p-value
PI-/AN-	57,295	1	4121,740	36	0,50042	0,483869
PI+/AN-	54,517	1	1924,453	36	1,01983	0,319299
PI+/AN+	158,616	1	4039,639	36	1,41353	0,242254
PI-/AN+	1,317	1	287,486	36	0,16492	0,687070
TMRE+	19,747	1	3897,496	36	0,18240	0,671862
ОП, %	9363,082	1	3987,374	36	84,53456	0,000000
ПП, %	3674,770	1	2229,115	36	59,34718	0,000000

Рисунок 1. График средних значений для каждого кластера

Динамика уровней экспрессии miR-301a-5p → TGFB2 в кластерах 1 и 2 до и после криоконсервации

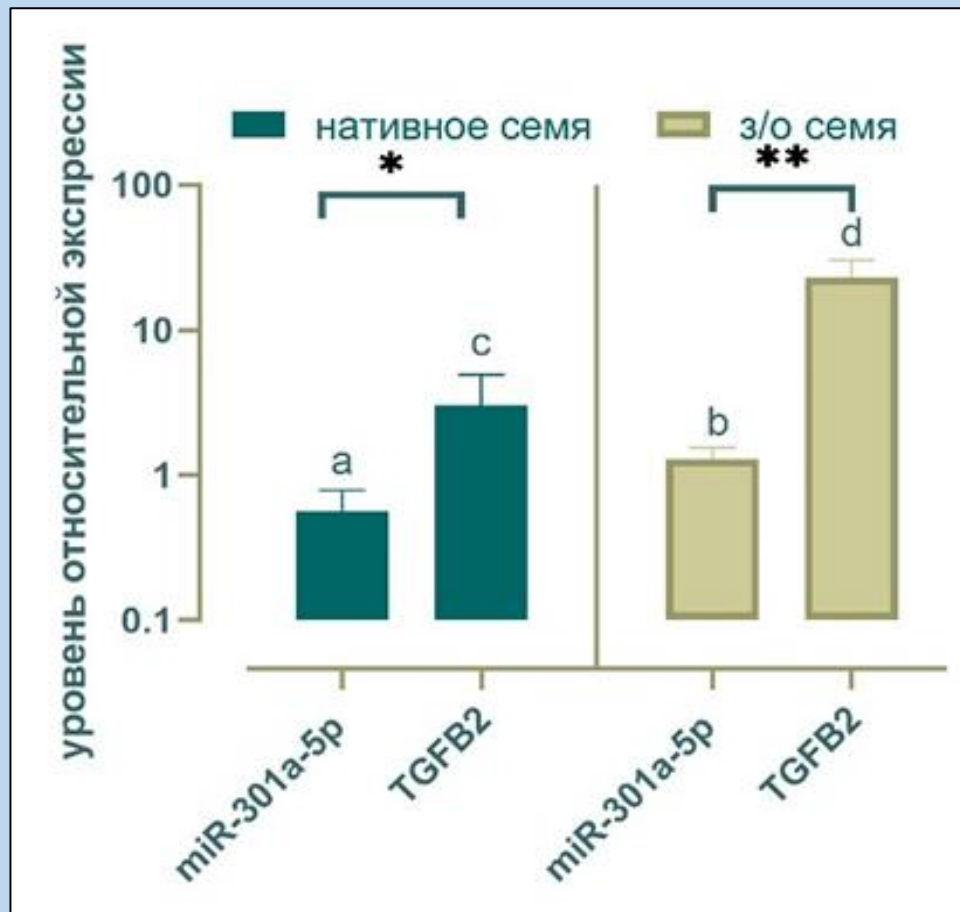


Рисунок 2. Уровень относительной экспрессии miR-301a-5p и TGFB2 для образцов спермиев, полученных из нативного и заморожено-оттаянного семени для **кластера 1**
 a,b p<0,0001; c,d p<0,005
 * p<0,01; ** p<0,001

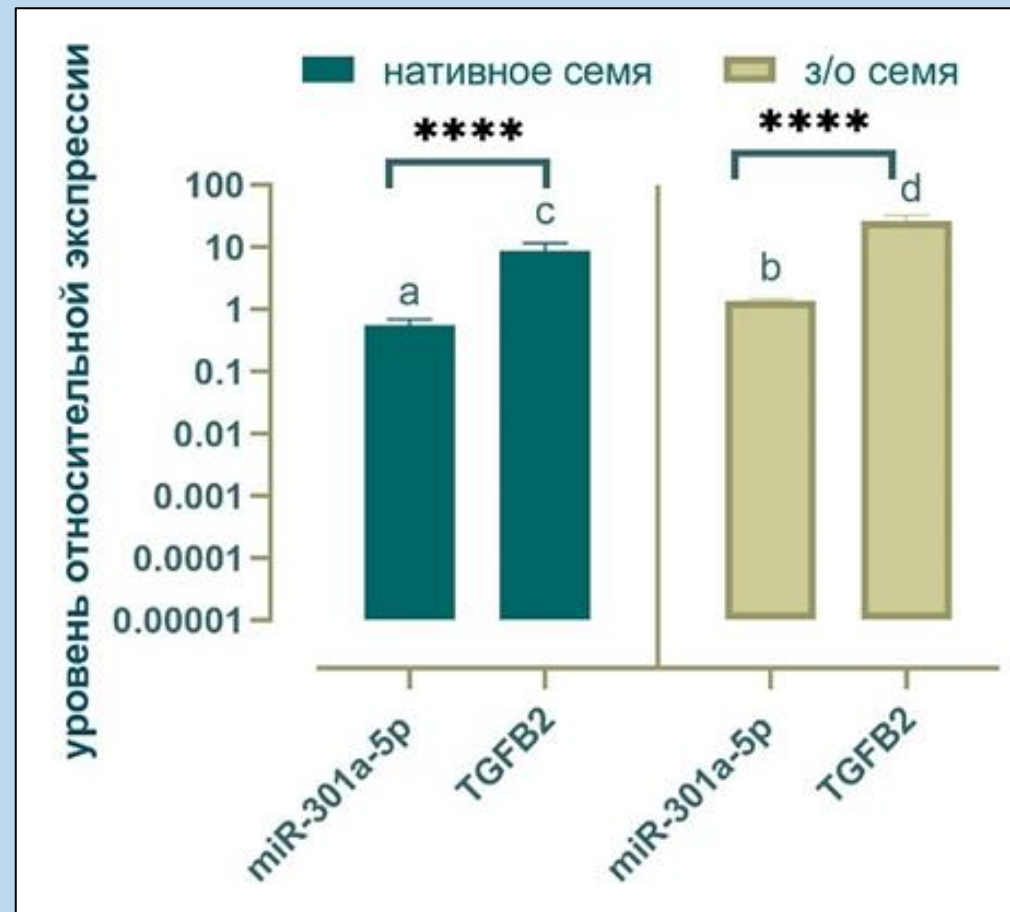
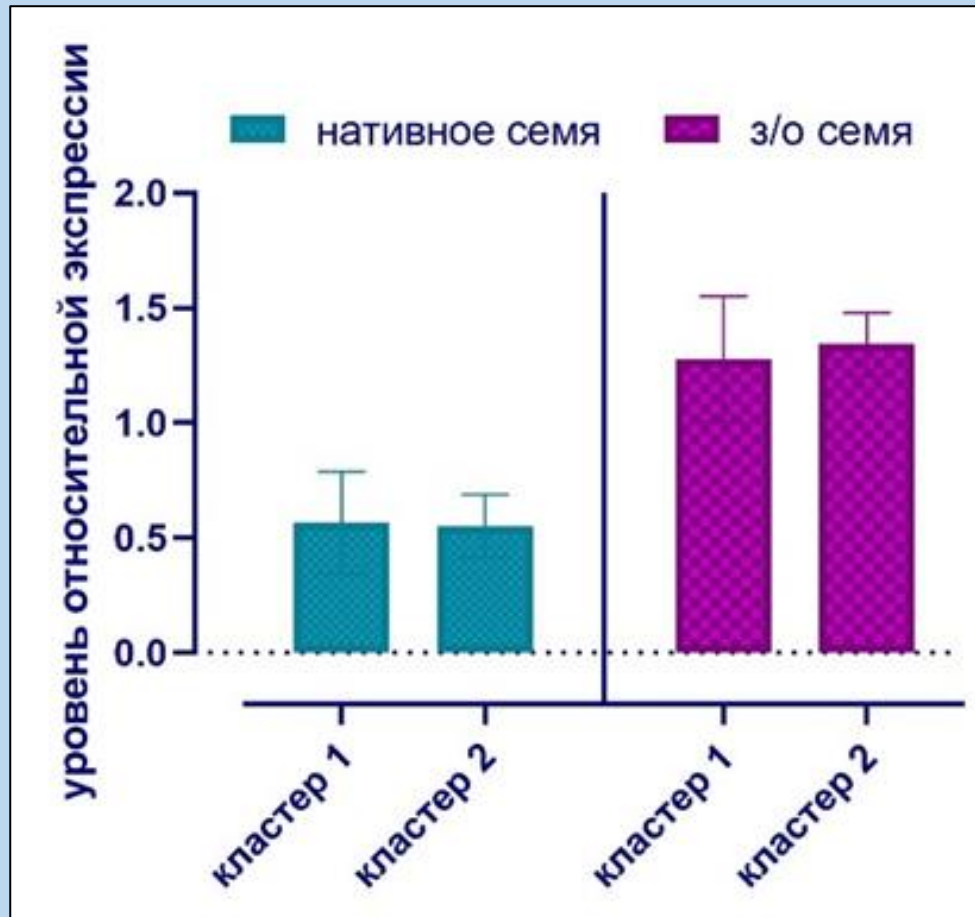
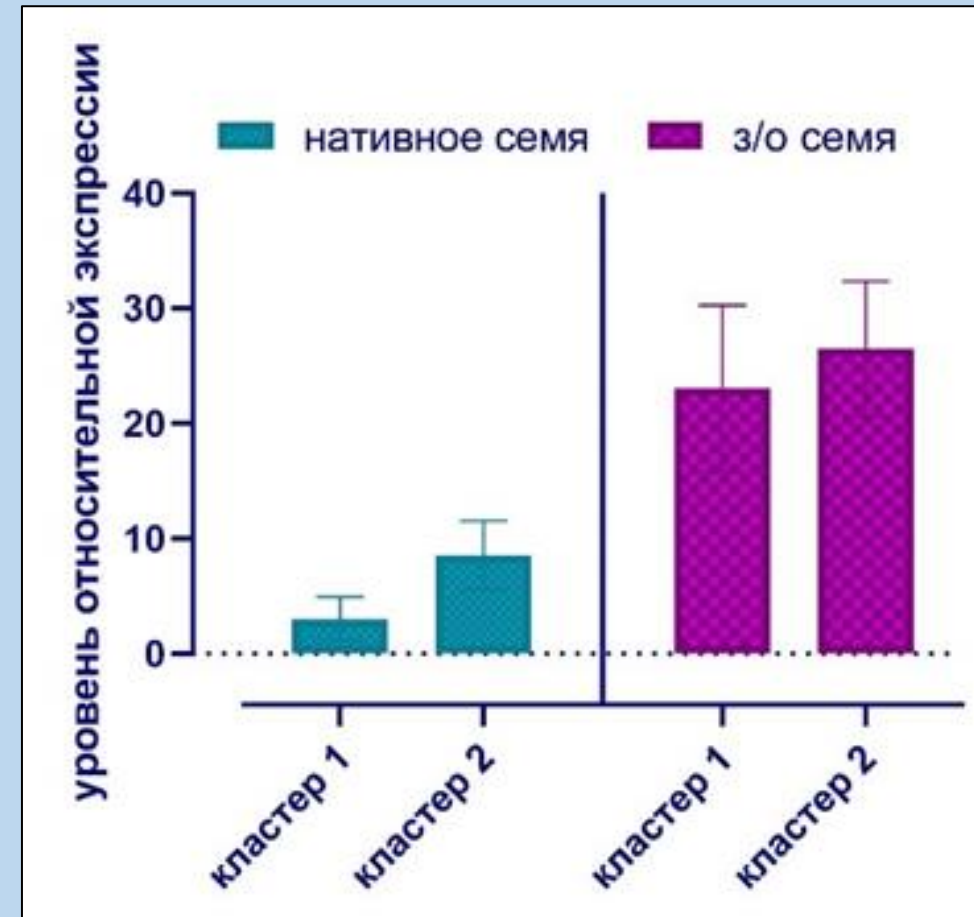


Рисунок 3. Уровень относительной экспрессии miR-301a-5p и TGFB2 для образцов спермиев, полученных из нативного и заморожено-оттаянного семени для **кластера 2**
 a,b p<0,0002; c,d p<0,01
 **** p<0,0001;

Сравнительный анализ уровней экспрессии для miR-301a-5p → *TGFB2* в обоих кластерах



А



Б

Рисунок 4. Уровень относительной экспрессии miR-301a-5p (А) и ее целевого гена *TGFB2* (Б) для образцов спермиев, полученных из нативного и заморожено-оттаянного семени в разных кластерах.

Достоверных различий нет, однако после криоконсервации уровень обоих транскриптов повышается.

Динамика уровней экспрессии miR-6701-3p → DMRT1 в кластерах 1 и 2 до и после криоконсервации

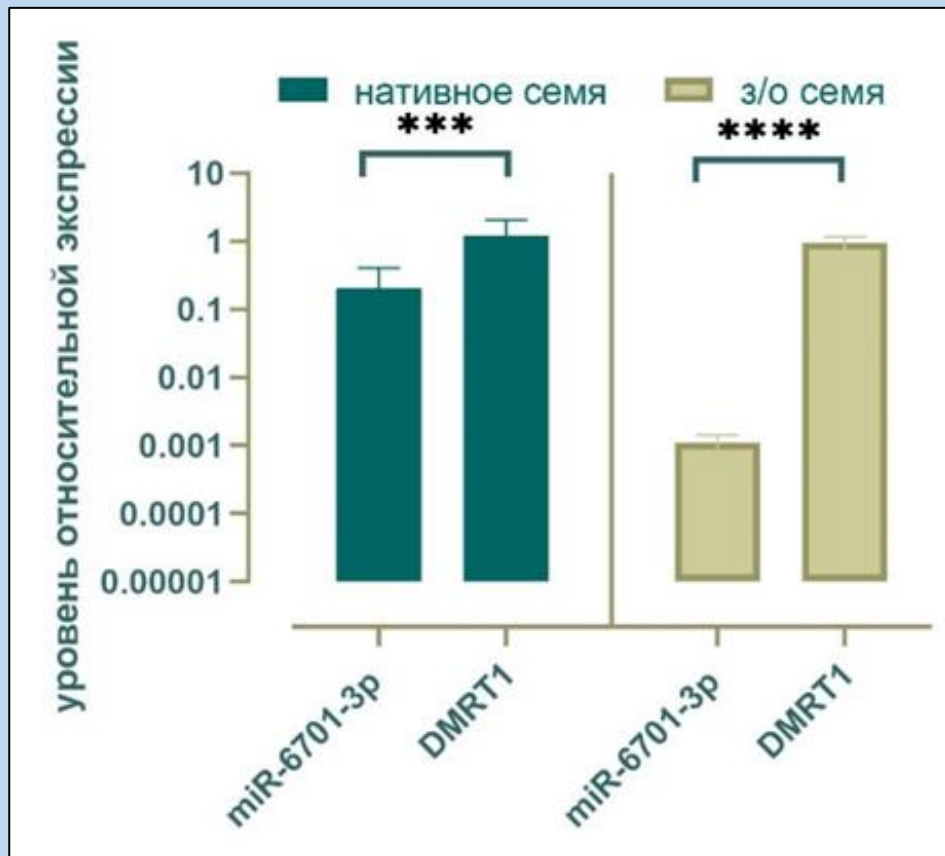


Рисунок 5. Уровень относительной экспрессии miR-6701-3p и *DMRT1* для образцов спермиев, полученных из нативного и заморожено-оттаянного семени для **кластера 1**
 *** $p < 0,0007$; **** $p < 0,0001$;

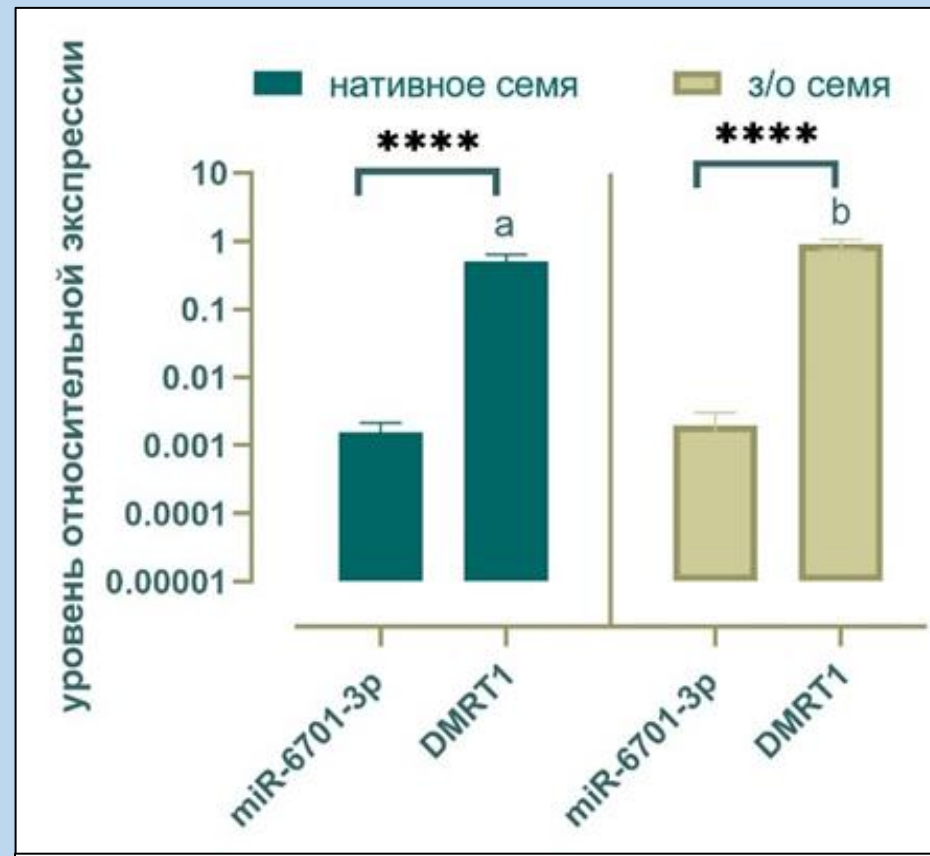
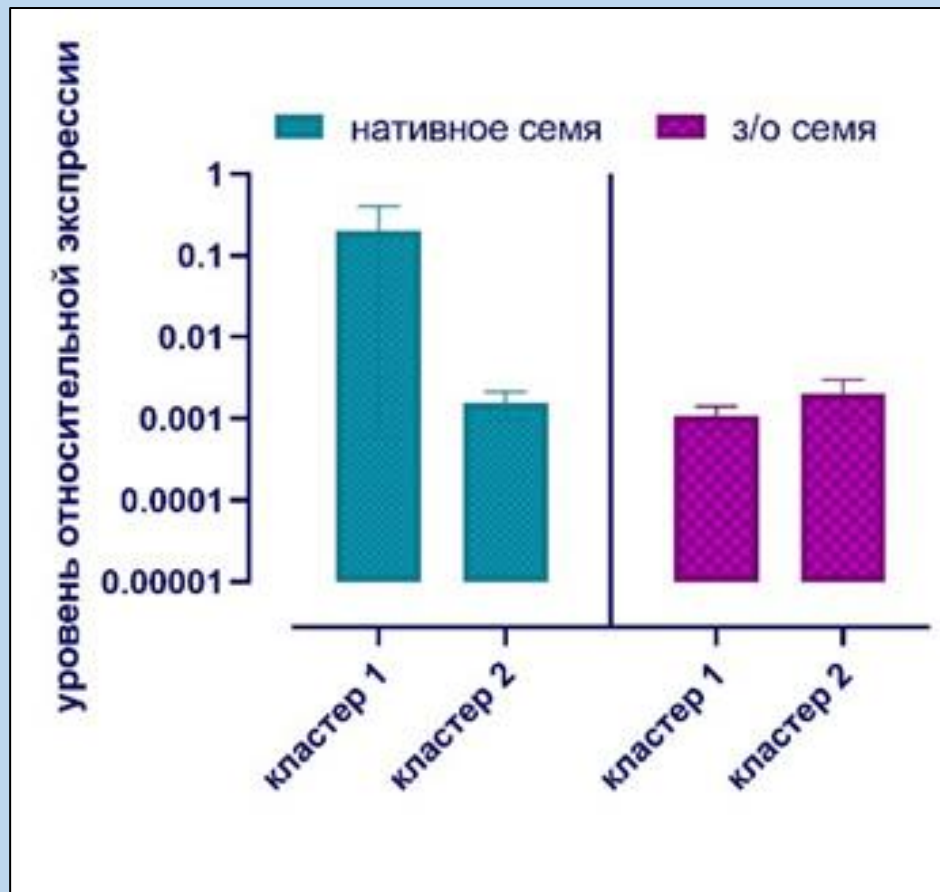
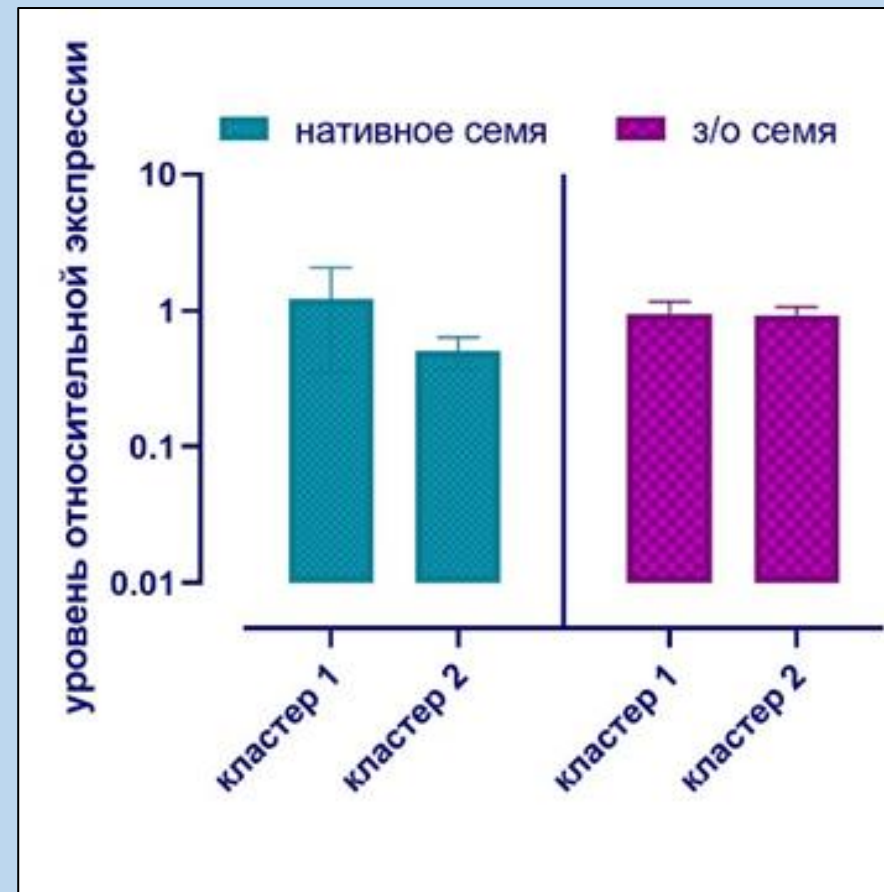


Рисунок 6. Уровень относительной экспрессии miR-6701-3p и *DMRT1* для образцов спермиев, полученных из нативного и заморожено-оттаянного семени для **кластера 2**
 a,b $p < 0,02$; **** $p < 0,0001$;

Сравнительный анализ уровней экспрессии для miR-6701-3p → *DMRT1* в обоих кластерах



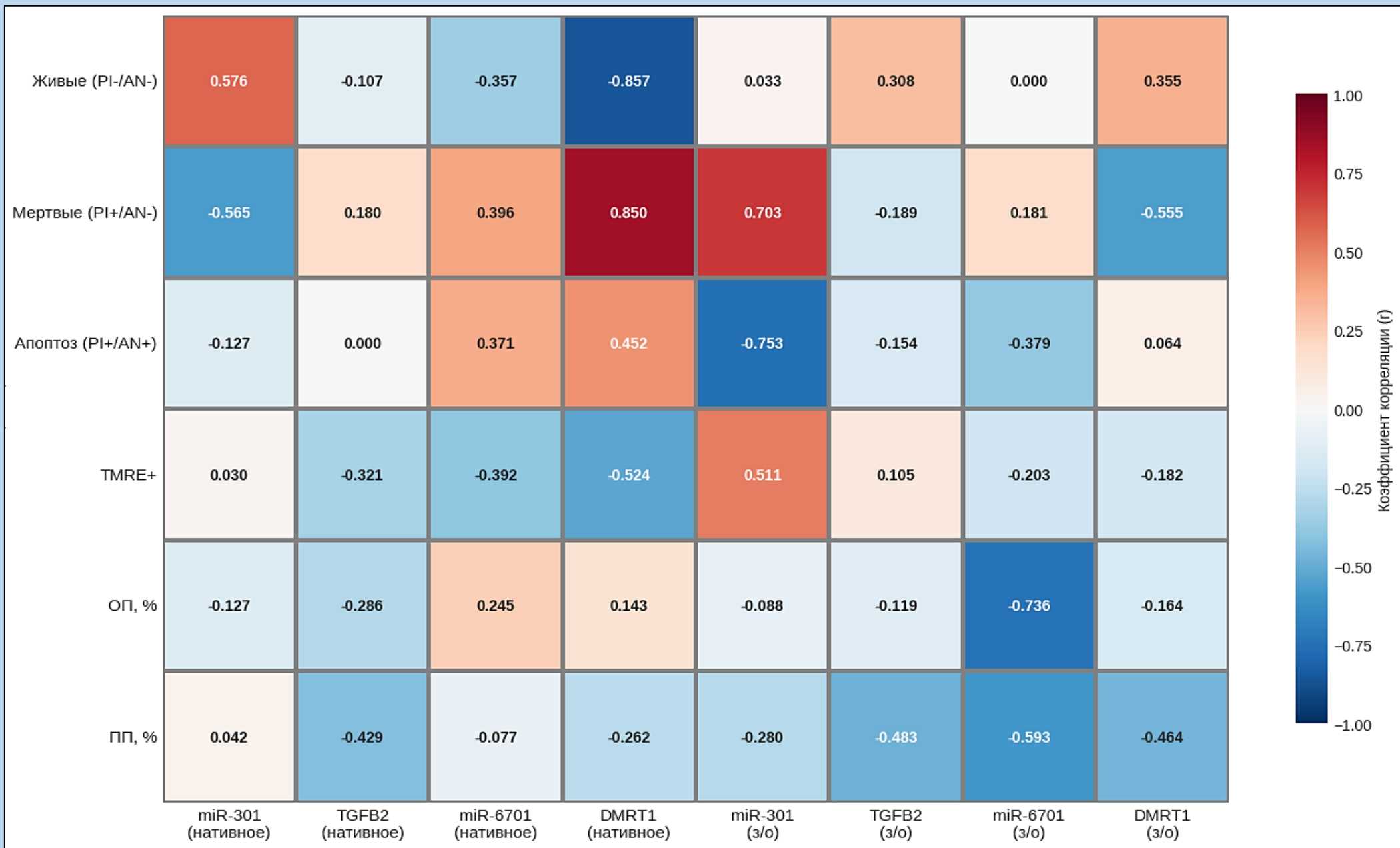
А



Б

Рисунок 7. Уровень относительной экспрессии miR-6701-3p (А) и ее целевого гена *DMRT1* (Б) для образцов спермиев, полученных из нативного и заморожено-оттаянного семени в разных кластерах

Анализ корреляционных связей между показателями качества спермы и уровнями экспрессии микроРНК и генов для кластера 1 (в нативном и з/о семени)



Анализ корреляционных связей между показателями качества спермы и уровнями экспрессии микроРНК и генов для кластера 2 (в нативном и з/о семени)



Выводы

1. Методом кластерного анализа выделены две группы петухов, достоверно различающиеся по подвижности сперматозоидов после криоконсервации ($p < 0,0001$), при этом различия касаются преимущественно моторных функций, а не общей жизнеспособности клеток;
2. Уровни экспрессии микроРНК (*gga-miR-301a-5p*, *gga-miR-6701-3p*) и их целевых генов (*TGFB2*, *DMRT1*) не различаются между кластерами, однако криоконсервация вызывает однонаправленное повышение экспрессии всех изученных транскриптов;
3. Корреляционный анализ выявил качественные различия между кластерами: в кластере 1 обнаружена сильная отрицательная связь между *gga-miR-6701-3p* и подвижностью после криоконсервации ($r = -0,736$, $p < 0,01$), тогда как в кластере 2 значимые корреляции отсутствуют, что может свидетельствовать о дезорганизации регуляторных сетей;
4. Оценка оплодотворяемости подтвердила функциональную значимость кластеризации: самцы кластера 1 обеспечивали стабильную оплодотворяемость ($CV = 10\%$), в то время как у представителей кластера 2 наблюдалась высокая вариабельность ($CV = 87\%$);
5. Криорезистентность спермы петухов, по-видимому, определяется не уровнем экспрессии отдельных молекул, а архитектурой регуляторных взаимодействий между микроРНК и функциональными параметрами сперматозоидов.

