

ХРАМОВА

Юлия Владимировна

**НОВЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ ФОЛЛИКУЛОГЕНЕЗА *IN VITRO* И МАНИПУЛЯЦИЯМ С ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫМИ ЭМБРИОНАМИ
МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

Специальность 03.03.05 – биология развития, эмбриология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва 2015

Работа выполнена на кафедре эмбриологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Научный руководитель: доктор биологических наук, доцент
Семенова Мария Львовна
кафедра эмбриологии биологического факультета
ФГБОУ высшего образования «Московский
государственный университет имени М.В.Ломоносова»,
профессор

Официальные оппоненты: Доктор биологических наук
Платонов Евгений Семенович
ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова
Российской академии наук, главный научный сотрудник

кандидат биологических наук
Горкун Анастасия Алексеевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей
патологии и патофизиологии», лаборатория клеточной
биологии и патологии развития, старший научный
сотрудник

Ведущая организация: ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова
РАН

Защита состоится 19 мая 2015 г. в 15 час. 30 мин. на заседании диссертационного совета
Д. 501.001.52 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу:
119234, Москва, Ленинские горы д.1 стр.12 биологический факультет МГУ, аудитория М1

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в Научной библиотеке Московского
государственного университета имени М.В. Ломоносова и на сайте
<http://www.bio.msu.ru/dissertations/view.php?ID=685>

Автореферат разослан « » _____ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
Кандидат биологических наук



Е.Н. Калистратова

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии, ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота, КГФ – клетки гранулезы фолликула, КТФ – клетки теки фолликула, ЛГ – лютеинизирующий гормон, МСК КМ – мезенхимные стволовые клетки, выделенные из костного мозга, ОСП – оптический скальпель – пинцет, ПФА – параформальдегид, ПЦР – полимеразная цепная реакция, РНК – рибонуклеиновая кислота, РТ – редукционное тельце, ФСГ – фолликулостимулирующий гормон, FCS – сыворотка, bFGF – базовый фактор роста фибробластов, GFP – зеленый флуоресцентный белок, PBS – фосфатно-солевой буфер, ZP – *zona pellucida*.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Процесс формирования женских половых клеток – оогенез и сопряженный с ним фолликулогенез – сложный, многокомпонентный процесс, в регуляции которого участвуют многие системы организма. Изучению данного процесса как *in vivo*, так и *in vitro* посвящено большое количество работ как отечественных, так и зарубежных ученых. Особый интерес представляет динамика клеточных элементов в составе овариального фолликула. Так было показано, что лютеинизированные клетки гранулезы под воздействием определенных факторов способны возвращаться в низкодифференцированное состояние, о чем свидетельствовало появление маркеров стволовых и мезенхимных клеток, и впоследствии дифференцироваться в клеточные типы нехарактерные для овариального фолликула (Kossowska-Tomaszczuk et al., 2009). Наряду с вопросами пластичности клеток активно ведется изучение взаимодействия между различными клеточными популяциями в составе фолликула (Zhang et al., 2014), а также со стволовыми клетками его соматического окружения (Kossowska-Tomaszczuk and De Geyter, 2013), так как именно они считаются предшественниками теки фолликула (Tajima et al., 2007). Накопление сведений о поведении клеток в составе фолликула, их динамике и дифференцировке является не только фундаментальной интереснейшей задачей, но также имеет широкое практическое применение, так как позволит решить ряд вопросов, связанных с проблемой бесплодия. В современной человеческой популяции бесплодие является широко распространенным недугом. По статистике Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) с данной проблемой сталкиваются не менее 15% супружеских пар репродуктивного возраста (Mascarenhas et al., 2012). Применяющиеся в настоящее время методы ВРТ основаны на введении пациентке гормональных препаратов для стимуляции фолликулогенеза с целью получения зрелых ооцитов. Однако гормональная стимуляция роста и созревания фолликулов противопоказана при целом ряде заболеваний, в том числе при всех онкологических процессах. Кроме того при использовании современных методов химиотерапии происходит фатальное снижение овариального резерва пациенток за счет повреждения пула примордиальных фолликулов (Kalich-Philosoph et al., 2013; Saleh et al., 2015; Song et al., 2013). Существует несколько подходов к сохранению фертильности женщин с такими диагнозами. Во-первых, это криоконсервация кортикальной ткани яичника перед проведением химиотерапии с последующей трансплантацией ее пациентке (Novatta, 2004; Oktay et al., 2000). Во-вторых, это культивирование овариальной ткани и/или единичных фолликулов *in vitro*. На такую технологию получения зрелых ооцитов возлагают большие надежды, и в последние годы несколько групп исследователей активно работают в данном направлении (Amorim et al., 2009; Bertoldo et al., 2014; Isachenko et al., 2013; Telfer and Zelinski, 2013; Xu et al., 2006a). Ооциты, которые будут получены этим методом, могут

быть оплодотворены при помощи стандартных методов ВРТ, а эмбрионы - криоконсервированы по стандартным, широко применяемым в клинике протоколам или сохранены в течение длительного срока, до тех пор, пока не будут востребованы пациенткой.

В современной клинической практике ВРТ далеко не всегда определяется генетический статус эмбриона. Это связано с тем, что забор клеточного материала эмбриона для проведения преимплантационной генетической диагностики инвазивен и трудоемок. Часто такой анализ проводится только в случае особых показаний (возраст пациентки, наличие генетических заболеваний в семейном анамнезе и т.п.), а основная часть эмбрионов оценивается только по морфологическим критериям качества. При внедрении технологии созревания фолликулов *in vitro*, когда культивирование в условиях, отличающихся от условий *in vivo*, будет проходить существенно дольше, необходимо будет проводить генетический анализ каждого полученного эмбриона. Для этого нужны новые, более эффективные и менее травматичные методы микрохирургии эмбрионов. В последние годы активно развивается новая технология микроманипулирования с единичными клетками – система «ОСП», позволяющая проводить микрохирургические процедуры бесконтактно (Bambardekar et al., 2015). Это открывает новые перспективы для микрохирургии эмбрионов млекопитающих и человека, как в целях проведения преимплантационной генетической диагностики, так и для прецизионного выделения клеток при проведении фундаментальных научных исследований. В частности, технология лазерной бесконтактной микрохирургии может быть также применена при заборе клеточного материала культивируемых фолликулов, что даст возможность провести анализ состояния клеток теки и гранулезы в ходе культивирования и оценить перспективы каждого культивируемого фолликула индивидуально.

Цель исследования: разработать оптимальную систему культивирования первичных многослойных фолликулов *in vitro*, обеспечивающую рост ооцита и соответствующую дифференцировку его соматического окружения, разработать метод проведения микрохирургических манипуляций с преимплантационными эмбрионами мыши при помощи системы «оптический скальпель – пинцет».

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Подобрать условия культивирования *in vitro* овариальных фолликулов, сравнить состояние фолликулов при культивировании в 2D и 3D системах;
2. Провести реконструкцию соматического окружения овариального фолликула с использованием смешанной первичной культуры клеточных элементов стромы яичника мыши, а также с использованием культуры мезенхимных стволовых клеток, выделенных из костного мозга;
3. Провести анализ взаимного влияния компонентов реконструированного фолликула мыши; изучить взаимодействие МСК КМ с первичным многослойным фолликулом при культивировании в 3D условиях;
4. Разработать методику проведения микрохирургических манипуляций (биопсии редуцированного тельца и фрагмента трофэктодермы) эмбриона мыши при помощи системы «оптический скальпель – пинцет»;
5. Оценить влияние лазерного излучения на жизнеспособность эмбрионов мыши после проведения микрохирургических лазерных процедур.

Научная новизна работы

Предложен новый методический подход к культивированию *in vitro* овариальных фолликулов млекопитающих – сокультивирование первичных многослойных фолликулов с МСК КМ, а также со смешанной популяцией клеток стромы яичника. Впервые было показано, что при сокультивировании фолликулов с различными типами соматических клеток в модельной 3D системе «висячая капля» происходит рост и развитие фолликула и увеличивается диаметр его ооцита. Впервые показана возможность использования МСК КМ для реконструкции многослойного овариального фолликула и показана дифференцировка этих клеток в сторону КТФ при сокультивировании с ним в системе «висячая капля». МСК КМ, культивируемые в составе реконструируемого фолликула в «системе висячая» капля теряют характеристики стволовых клеток, меняя фенотип CD34-,CD45-,CD73+,CD90+,CD105+ на CD34+,CD45-,CD73-,CD90+,CD105+ и приобретают маркеры стероидогенных клеток фолликула, начиная экспрессировать ЛГ-рецептор и ключевой фермент синтеза андрогенов - Cyp17a1. Также впервые было показано стимулирующее воздействие МСК КМ, дифференцирующихся в направлении КТФ (LHR+, Cyp17a1+), на пролиферацию и функциональную активность КГФ, о чем свидетельствует повышение уровня экспрессии ароматазы (Cyp19a1) в реконструированных фолликулах. Впервые были разработаны методы микрохирургии преимплантационных эмбрионов млекопитающих при помощи системы «ОСП» на основе фемтосекундного лазера, такие как биопсия РТ и клеток трофэктодермы. Подобраны параметры и протоколы лазерного воздействия, обеспечивающие высокую выживаемость эмбрионов после проведения процедуры.

Практическая и теоретическая значимость

В результате наших исследований было показано, что система «висячая капля» является адекватной системой для культивирования овариальных фолликулов, что открывает новые возможности для создания технологии получения компетентного к оплодотворению ооцита человека в условиях *in vitro*. Разработанная нами модель реконструирования соматического окружения овариального фолликула может быть применена для детального изучения морфогенетических процессов, происходящих при дифференцировке клеток, а также может лечь в основу технологии культивирования овариальных фолликулов человека.

Полученные результаты по изменению фенотипа МСК КМ, в сторону стероидогенных клеток яичника при сокультивировании с первичными многослойными овариальными фолликулами дополняют существующие в настоящее время представления о потенциале данных клеток к направленной дифференцировке под воздействием специализированного микроокружения. Также результаты наших исследований дают возможность подойти к ответу на один из нерешенных вопросов овариального фолликулогенеза – к вопросу о стволовых предшественниках текальных клеток.

Разработанная нами технология лазерной микрохирургии преимплантационных эмбрионов млекопитающих с использованием системы «ОСП» может быть применена как в клинической практике ВРТ для определения генетического статуса эмбрионов и культивируемых фолликулов, так и в экспериментальной биологии.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработана 3D система для реконструирования овариальных фолликулов, которая может быть использована для изучения дифференцировочного потенциала мезенхимных

стволовых клеток, а также для изучения процессов самоорганизации в многокомпонентной системе.

2. Разработана инновационная система лазерной микрохирургии преимплантационных эмбрионов млекопитающих с использованием системы «оптический скальпель – пинцет», позволяющая проводить процедуру биопсии редукционного тельца и клеток трофэктодермы бесконтактным методом.

3. Разработан режим дозированного лазерного воздействия, позволяющий проводить биопсию клеток преимплантационного эмбриона и в то же время не оказывающего достоверного повреждающего воздействия и не снижающего жизнеспособность.

4. Показано, что мезенхимные стволовые клетки, выделенные из костного мозга мыши, и стромальные клетки яичника мыши при культивировании с единичными овариальными фолликулами в системе «висячая капля» демонстрируют элементы самоорганизации, формируя единую морфофункциональную систему с овариальным фолликулом

5. Показано, что мезенхимные стволовые клетки, выделенные из костного мозга мыши, при сокультивировании с овариальным фолликулом в системе «висячая капля» способны направленно дифференцироваться в стероидогенные фолликулярные клетки под воздействием факторов, вырабатываемых фолликулом.

Апробация диссертации

Материалы и результаты диссертационной работы были доложены на международном симпозиуме по репродуктологии «A window into the Reproductive Era Research» (Милан, 2011), на XVIII и XXI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2011, 2014), на V Международной конференции «Современные достижения бионаноскопии» (Москва, 2011), на VIII Европейском конгрессе по биофизике (Будапешт, 2011), на 9-ой конференции по репродуктивной медицине «Conference of ALPHA Scientists in Reproductive Medicine» (Лондон, 2012) и на 50-ой ежегодной конференции FEBS-EMBO (Париж, 2014).

Публикации по теме диссертации

По материалам работы было опубликовано 13 работ, из них 4 – статьи, 3 из которых опубликованы в отечественных и международных журналах и сборниках, соответствующих Перечню ВАК, 9 - тезисы докладов всероссийских и международных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 137 страницах, содержит 5 таблиц, 65 рисунков и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждений, заключения, выводов, списка литературы, включающего 213 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лабораторные животные. В исследовании использовали мышей линии BALBc/J и мышей-гибридов F1 линий C57Bl/6JxCBA/J, полученных из вивария НИИ канцерогенеза РОНЦ РАМН, а также трансгенных мышей с экспрессией GFP, созданных на базе линии C57Bl/6J, любезно предоставленных лабораторией геномики адаптивного иммунитета Института биоорганической химии имени Шемякина и Овчинникова РАН. Животных содержали в условиях вивария при 14-ти часовом световом дне, температуре 20-22°C, доступ к воде и еде *ad libitum*. Для получения датированной беременности самок ссаживали с самцами в вечернее время суток. Факт спаривания

устанавливали на следующее утро по наличию вагинальной пробки. День обнаружения пробки считается 0,5 суток эмбрионального развития.

Выделение и культивирование овариальной ткани, фолликулов и смешанной популяции стромальных элементов яичника. Для получения овариального материала самок умерщвляли и извлекали яичники (Hogan et al., 1994), яичники извлекали, помещали в капли среды для манипуляций, предварительно нагретой до 37°C, снимали капсулу яичника, разрезали с помощью двух острых металлических игл. Для экспериментов отбирали фолликулы, не превосходящие диаметром 140-170 мкм, с помощью наконечника диаметром 170 мкм, вставленного в роликовый насос. Оставшийся материал яичника измельчали и высаживали кусочки на чашки Петри диаметром 35 мм для дальнейшего культивирования или помещали в раствор коллагеназ I и IV типа (ПанЭко), инкубировали при 37°C в течение 90 минут при периодическом встряхивании. Затем фермент инактивировали сывороткой, центрифугировали (10 минут 2000 об./мин.), осадок ресуспендировали в полной ростовой среде (α MEM, 10%FCS, ИТС, гентамицин, bFGF, гепарин, L-глутамин), далее высаживали клетки на чашки Петри. Фрагменты овариальной ткани культивировали на поверхности чашек Петри диаметром 35 мм в среде с 5% или 10% FCS, полную смену среды проводили раз в 2 дня. Фолликулы культивировали в 24-луночных планшетах в группах по 3-5 штук на лунку в 500 мкл полной ростовой среды. Смешанную популяцию стромальных элементов яичника культивировали в 60 мм чашках Петри в условиях CO₂-инкубатора в среде α MEM (ПанЭко) с 10%-ным содержанием FCS (HyClone) с добавлением гентамицина (1:100, ПанЭко), L-глутамина (ПанЭко), ИТС (ПанЭко), bFGF (ПанЭко) и гепарина (ПанЭко). Среду меняли раз в 2 дня, пассирование клеток осуществляли при достижении 80% конфлюэнтности.

Выделение и культивирование МСК КМ. Для выделения МСК КМ мышь умерщвляли по стандартному протоколу (Hogan et al., 1994), окунали в 70% этиловый спирт, тщательно очищали бедренную кость от мышечной и жировой ткани, затем промывали эпифиз кости раствором Хэнкса (ПанЭко, Россия) с гентамицином. Раствор с клетками костного мозга дважды центрифугировали (7 минут 1200 об./мин.), после чего ресуспендировали осадок в полной ростовой среде и высаживали клетки на чашки Петри. МСК КМ культивировали в условиях CO₂-инкубатора в среде, состоящей из смеси сред DMEM (ПанЭко) и F12 (ПанЭко), взятых в равных объемах, с добавлением ИТС (ПанЭко), гентамицина (ПанЭко), L-глутамина (ПанЭко), 10% FCS (HyClone), гепарина (ПанЭко) и bFGF (ПанЭко) в чашках Петри 60 мм (SPL). Среду меняли раз в 2 дня, культивировали до 80% конфлюэнтности.

Культивирование овариальных фолликулов в 3D условиях. 3D условия были реализованы путем культивирования в системе «висячая капля» (Millet and Gillette, 2012). Для этого на крышку чашки Петри наносили капли среды объемом 30 мкл, а донце чашки заполняли средой, чтобы предотвратить высыхание капель и изменение осмолярности раствора. В капли помещали фолликулы, крышку переворачивали, чашку закрывали и убирали в инкубатор (рис.15). Культивирование проводили в среде α MEM с добавлением ИТС (ПанЭко) и гентамицина (ПанЭко) со следующими дополнительными компонентами: 5% FCS; 10% FCS; 5% FCS и ФСТ (0,2 МЕ/мл); 10% и ФСТ (0,2 МЕ/мл); 10% FCS, L-глутамин (2 мМ), гепарин (0,9:1000) и bFGF (0,1 мкг/мл); 10% FCS, L-глутамин (2 мМ), гепарин (0,9:1000) и bFGF (0,1 мкг/мл) и ФСТ (0,2 МЕ/мл).

Сокультивирование фолликулов с клетками. Сокультивирование овариальных фолликулов с клетками разного типа проводили в системе «висячая капля». На поверхности крышек чашек Петри наносили капли среды с суспензией клеток (3000кл/30мкл), в капли помещали по одному фолликулу. Крышку переворачивали, накрывали ей донце чашки, заполненное средой, и культивировали в течение 7 суток.

Получение преимплантационных эмбрионов. Преимплантационные эмбрионы мыши получали согласно стандартному протоколу (Hogan et al., 1994), микроманипуляции с эмбрионами проводили в среде M2 (Millipore), культивирование – в среде M16 (Millipore).

Определение параметров лазерного воздействия на эмбрионы на стадии двух бластомеров. Для определения параметров лазерного воздействия были использованы эмбрионы на стадии двух клеток (1,5 сут. развития). Были отработаны различные режимы воздействия системы ОСП на ZP, цитоплазму и плазматическую мембрану (модель – слияние двух бластомеров эмбриона) в целях оптимизации уровня энергии лазера и числа импульсов. Для этого эмбрионы помещали в экспериментальную чашку с дном из покровного стекла в каплю среды, покрытую минеральным маслом. После проведения манипуляций эмбрионы культивировали в условиях CO₂ – инкубатора. Через 3-е суток определяли стадию развития эмбрионов и делали прижизненные фотографии.

Биопсия редуционного тельца. Микрохирургическую процедуру проводили на зиготах (0,5 сут. развития). Микроскоп фокусировали на ZP и серией импульсов (воздействовали в среднем 10 раз по 10 импульсов) в режиме «лазерный скальпель» получали отверстие в оболочке, достаточное для выхода редуционного тельца. Затем установку переключали на режим «лазерный пинцет» и осуществляли извлечение редуционного тельца из перивителлинового пространства.

Биопсия трофэктодермы. Микрохирургическую процедуру проводили на эмбрионах 3,5 сут. развития. Микроскоп фокусировали на ZP и серией импульсов получали отверстие на стороне, противоположной внутренней клеточной массе (ВКМ), и дожидались начала хэтчинга. После того, как небольшое количество клеток трофэктодермы оказалось снаружи ZP, в режиме «лазерный скальпель» несколькими импульсами отсекали это скопление клеток. Затем в режиме «оптический пинцет» захватывали полученный биоптат и относили его в сторону от эмбриона. После завершения процедуры эмбрионы помещали в четырехлуночный планшет в среду для культивирования. На следующие сутки оценивали жизнеспособность эмбрионов по проценту бластоцист, завершивших хэтчинг.

Окрашивание флуоресцентными красителями. Для определения жизнеспособности клеток эмбрионы и фолликулы окрашивали флуоресцентными красителями Hoechst 33258 (Sigma) и PI (Invitrogen). Объекты помещали в растворы красителей поочередно на 15-20 минут в условиях термостата (37°C). Затем промывали в растворе PBS (5-7 смен) и изготавливали препараты «давленная капля», которые анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert 25F (Zeiss). После процедуры слияния бластомеров эмбрионы окрашивали эндцитозным красителем FM4-64 (Invitrogen) (15 минут, +4°C), фиксировали 4% раствором ПФА, и изготавливали препараты «давленная капля». Анализ препаратов проводили с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Axiovert 200M 510 Meta (Zeiss).

Ультроструктурный анализ. Образцы фиксировали в 2,5% глутаровом альдегиде, дофиксировали 0,5% раствором OsO₄ (тетраоксида осмия), обезвоживали в растворах этилового спирта возрастающих концентраций, переносили в раствор безводного ацетона, после чего либо высушивали в критической точке для анализа образцов с помощью электронного сканирующего микроскопа CamScan S-2 и JSM-638 0LA, либо заключали в эпоксидную смолу (EMS) для последующего изготовления ультратонких срезов и их анализа с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM-1011 в Межкафедральной лаборатории электронной микроскопии Биологического факультета Московского Государственного Университета имени М.В.Ломоносова.

Молекулярно-биологический анализ образцов. Выделение тотальной РНК проводили с помощью TRI Reagent (Sigma). Для удаления примесей геномной ДНК образцы обрабатывали ДНКазой I (Fermentas). РНК переосаждали 4М хлориде лития, измеряли концентрацию РНК с помощью спектрофотометра Nanodrop 8000 (Thermo Scientific). Синтез кДНК на основе выделенной РНК проводили в реакционной смеси, содержащей РНК, 1X буфер (70 mM Tris-HCl, 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 7,5 mM MgCl₂, pH 8,3), случайные гексануклеотиды (10 мкМ), смесь нуклеотидтрифосфатов (0,4 mM каждого), ингибитор РНКаз RiboLock (1 ЕА/мкл) и обратную транскриптазу M-MLV (Евроген) (100 ЕА на 1 мкг РНК). Количественный анализ ПЦР проводили с использованием коммерческой смеси qPCRmix-HS SYBR+LowROX (Евроген), в состав которой входит HS Taq ДНК полимеразы (полимераза с быстрым горячим стартом), краситель SYBR Green I, референсный краситель ROX, смесь нуклеотидтрифосфатов, Mg²⁺, реакционный буфер. Накопление продукта ПЦР регистрировали на стадии элонгации по флуоресценции интеркалирующего красителя SYBR Green нормированной по флуоресценции пассивного референсного красителя ROX. Обработку результатов проводили с помощью программы 7500 Software (Applied Biosystems). Отсутствие праймер-димеров оценивали по кривым плавления. Расчет относительной экспрессии гена проводили методом $\Delta\Delta Ct$.

Измерения и статистический анализ данных проводили на основе цифровых фотографий при помощи программного обеспечения ImageJ (NIH, США). Полученные численные значения анализировали при помощи пакетов программ: Microsoft Excel 2010 (Microsoft corporation) и Statistica 7.0 (Dell). При статистической обработке данных использовали критерий Манна-Уитни (U-критерий); для сравнения двух зависимых групп использовали критерий Уилкоксона (W-критерий). Критический уровень значимости для всех статистических критериев принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Культивирование овариальных фолликулов в 2D и 3D условиях

При культивировании эксплантатов овариальной ткани, содержащей фолликулы на разных стадиях фолликулогенеза, нами было показано, что на 2-е - 3-и сутки культивирования начинается активное выселение фибробластоподобных клеток (рис.1,2), а на 5-е сутки по их поверхности выселяются эпителиоподобные клетки в виде пласта с выраженным краем зоны расселения (рис. 1 Б). К 7 суткам культивирования происходило выселение клеток меньшего размера, которые также имели эпителиоподобный фенотип (рис. 1 В). Эпителиоподобные клетки мы считаем клетками гранулезы, фибробластоподобные клетки – клетками теки, наши предположения подтверждаются данными литературы (Hartshorne, 1997).

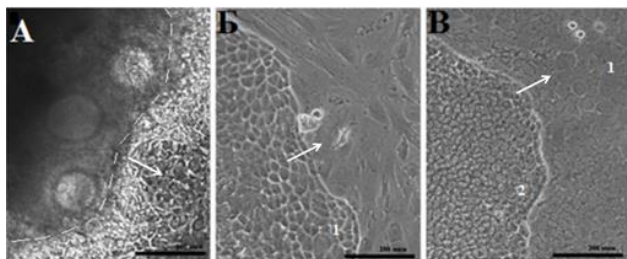


Рис. 1. Выселение клеток из фрагмента ткани яичника мыши. А – 5-е сутки культивирования, граница тканевого эксплантата обозначена пунктирной линией, звездочкой обозначена зона выселения фибробластоподобных клеток; Б – 5-е сутки культивирования, миграция клеток с эпителиоподобным фенотипом по поверхности фибробластоподобных клеток, выселившихся ранее; В – 8-е сутки культивирования, вторая волна миграции – выселение мелких клеток эпителиоподобного фенотипа (2) по поверхности ранее выселившихся более крупных эпителиоподобных клеток (1). Стрелкой указано направление выселения клеток.

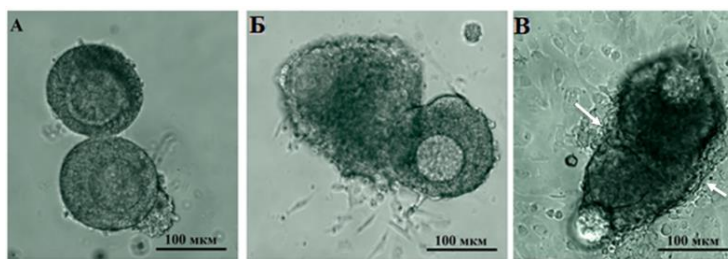


Рис. 2. Динамика выселения клеток теки и гранулезы из состава овариального фолликула. А – 1-е сутки культивирования, фолликулы начинают мигрировать из состава фолликула; Б – 2-е сутки культивирования, веретеновидные фибробластоподобные клетки начинают расселяться по поверхности планшета; В – 3-и сутки культивирования, начинается выселение эпителиоподобных клеток гранулезы (показаны стрелками)

После предварительной серии экспериментов по культивированию фолликулов в 2D условиях мы пришли к выводу о необходимости создания 3D условий, которые были реализованы при помощи системы «висячая капля». При культивировании *in vitro* в этой системе фолликулы сохраняли свою трехмерную организацию (рис. 4). Не происходило выселения клеток теки и гранулезы, сохранялась базальная мембрана. Также было показано, что при 3D культивировании фолликулы не просто сохраняют структуру, но и достоверно увеличиваются в размерах (рис.6).

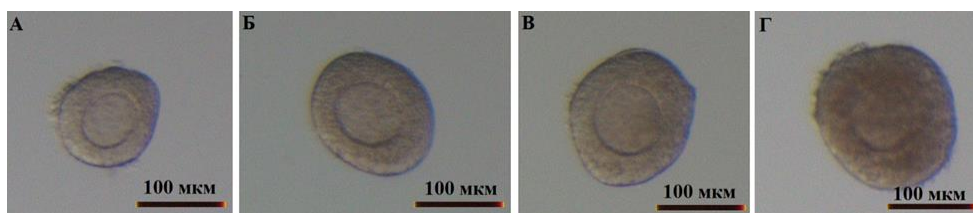


Рис. 4. Динамика роста фолликула в системе «висячая капля». А – 1-е сутки; Б – 3-и сутки; В – 5-е сутки; Г – 7-е сутки.

При изучении образцов с помощью ТЭМ было показано, что происходит активная пролиферация КТФ в фолликуле при культивировании в системе «висячая капля» по сравнению с контрольными фолликулами, зафиксированными непосредственно после выделения из овариальной ткани мыши и находившимися на той же стадии, что и фолликулы, впоследствии помещенные в культуру (рис. 5)

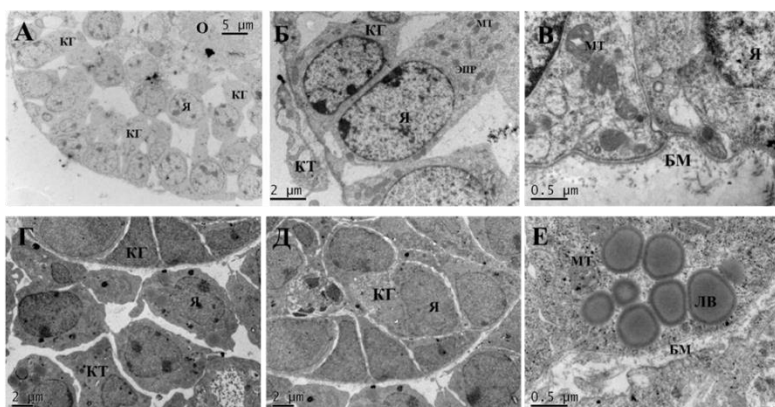


Рис. 5. Наружная зона первичного многослойного овариального фолликула. А, Б, В – фолликул из группы контроля: наблюдаются единичные текальные клетки; Г, Д, Е – фолликул после 7 сут. культивирования в системе «висячая капля»: происходит значительное увеличение числа КТФ. БМ – базальная мембрана; КГ – клетка гранулезы; КТ – клетка теки, ЛВ – липидные включения; МТ – митохондрии; О – ооцит; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; Я – ядро.

КГФ имеют кубическую форму, четко выраженную полярность и плотно располагаются на базальной мембране. На наружной поверхности базальной мембраны фолликула, который культивировали *in vitro* в системе «висячая капля» (рис.5 Г, Д, Е), мы наблюдали несколько слоев КТФ, что свидетельствует об их активной пролиферации. Клетки этого типа расположены более рыхло по отношению друг к другу, чем КГФ. Ядро в КТФ более мелкое, чем ядро КГФ, отсутствует полярность, характерная для КГФ в связи с их эпителиальной природой и расположением на базальной мембране. В цитоплазме некоторых КТФ обнаруживаются липидные включения. Возможно, данный запас липидов будет служить сырьем для синтеза стероидных гормонов на дальнейших этапах развития фолликула. Наблюдаемые нами морфологические черты клеток в составе фолликулов согласуются с данными литературы (Nottola et al., 2011), что позволяет сделать вывод о пригодности системы «висячая капля» для культивирования овариальных фолликулов.

Культивирование овариальных фолликулов *in vitro* в 3D условиях в средах различного состава

Для исследования влияния на рост фолликулов негормональных факторов было проведено культивирование первичных многослойных фолликулов в средах, различающихся по процентному содержанию сыворотки и наличию/отсутствию фактора роста. Для изучения влияния гормонов было проведено культивирование фолликулов в средах с добавлением ФСГ. Продолжительность культивирования во всех группах составляла 7 суток. При анализе результатов эксперимента в качестве количественного параметра использовали отношение площади фолликула или ооцита в последний день культивирования к площади фолликула или ооцита в первый день культивирования (рис.6).

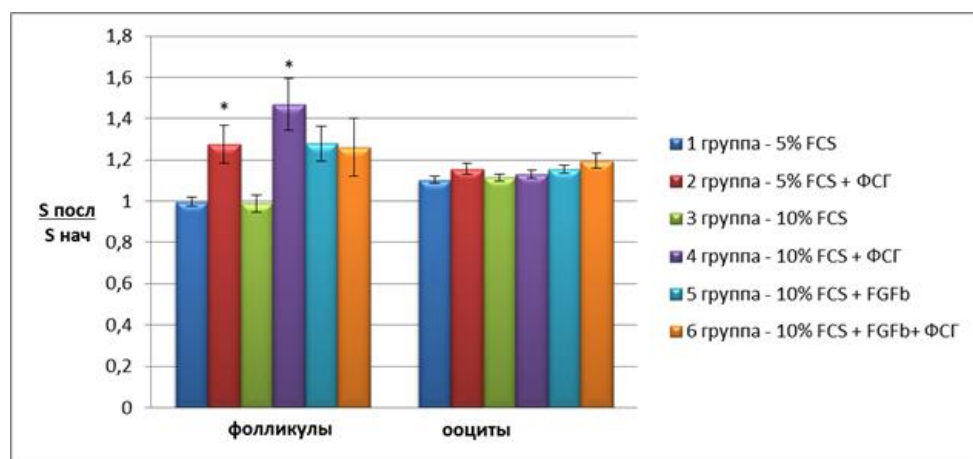


Рис. 6. Изменение эффективности роста фолликулов и ооцитов в средах различного состава. По оси абсцисс указаны исследуемые группы. По оси ординат – среднее значение изучаемого параметра ($S_{\text{посл}}/S_{\text{нач}}$) и ошибка среднего. * - $p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни.

Изменение процентного содержания сыворотки в среде для культивирования не влияет на динамику роста фолликулов, добавление bFGF достоверно улучшало рост фолликулов. Добавление в культуральную среду ФСГ достоверно улучшало рост фолликулов в группах 2 и 4 по сравнению с группами 1 и 3. При добавлении ФСГ в среду, содержащую bFGF (группа 6), не происходило достоверного изменения темпов роста фолликула по сравнению с группой 5. Мы связываем это с тем, что в группе 6 гораздо чаще происходила «овуляция *in vitro*» в конце цикла культивирования и площадь фолликула уменьшалась. Несмотря на то, что во всех экспериментальных группах не было статистически значимых различий по темпам роста ооцитов, наблюдается тенденция к возрастанию исследуемого параметра ($S_{\text{посл}}/S_{\text{нач}}$) в группе 6 по сравнению с другими группами (рис. 6). Данные наблюдения коррелируют с данными литературы.

В работе бразильских исследователей (Almeida et al., 2015) было показано, что ФСГ совместно с FGF способствует увеличению размеров ооцитов и фолликулов при культивировании *in vitro*.

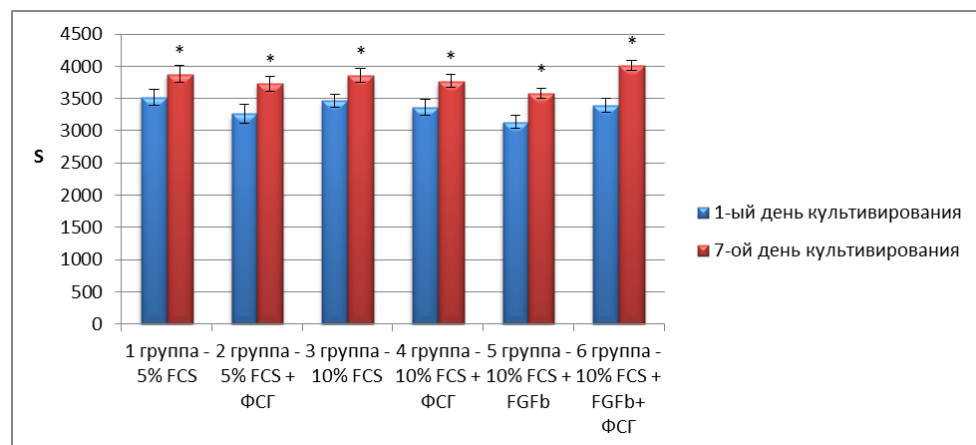


Рис. 7. Сравнение темпов роста ооцитов в средах различного состава. По оси абсцисс указаны исследуемые группы. По оси ординат – среднее значение изучаемого параметра S (площадь ооцита) и ошибка среднего. * - $p < 0,05$, W -критерий Уилкоксона.

При сравнении площадей ооцитов в первый и последний дни культивирования мы убедились в том, что ооцит достоверно растет при культивировании *in vitro* (рис. 7).

Реконструкция соматического окружения первичного многослойного овариального фолликула мыши

Для обогащения внутренней среды фолликула ростовыми факторами мы решили воссоздать соматическое окружение фолликула в условиях *in vitro*. С этой целью было проведено две серии экспериментов: сокультивирование фолликулов с клеточными элементами стромы яичника и сокультивирование фолликулов с МСК КМ.

Сокультивирование овариальных фолликулов со смешанной первичной культурой клеточных элементов стромы яичника мыши. При сокультивировании клеточных элементов стромы яичника с первичными многослойными фолликулами (3000 клеток и 1 фолликул на каплю 30 мкл) было показано, что в течение первых двух суток культивирования клетки и фолликул объединялись в единый агрегат (рис. 8). Когда стромальные клетки окружали фолликул, происходило увеличение размеров как фолликула (мы измеряли площадь фолликула в пределах базальной мембраны), так и ооцита.

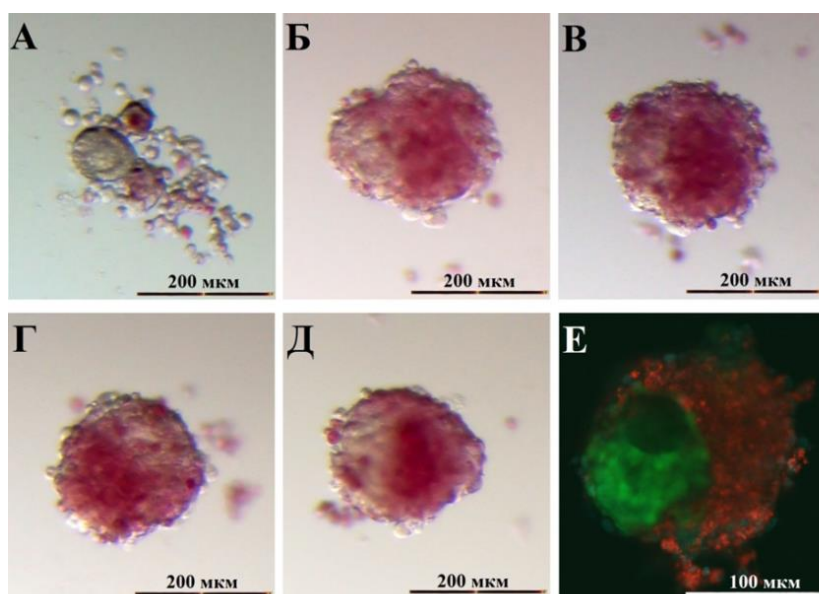


Рис. 8. Сокультивирование фолликулов, выделенных из яичников GFP+ мышей с клеточными элементами стромы яичника, окрашенными липофильным красителем DiI. А – 1-е сутки культивирования (клетки, окрашенные DiI, имеют розовую окраску при использовании светлопольного микроскопа); Б – 2-е сутки; В – 3-и сутки; Г – 4-е сутки; Д – 5-е сутки; Е – флуоресцентное окрашивание подтверждает объединение стромальных клеток (красная флуоресценция) и фолликула (зеленая флуоресценция) в единую структуру (лазерная сканирующая конфокальная микроскопия).

При электронно-микроскопическом анализе образцов с помощью ТЭМ было показано, что на седьмые сутки культивирования клетки, вновь вошедшие в состав фолликула, приобретали

уплощенную форму и черепитчатое расположение. Клетки, которые занимают более центральное положение, лежат более рыхло, чем клетки на периферии и отличаются большим количеством митохондрий в цитоплазме (рис.9 А, Б, Г). Кроме того мы наблюдали существенные различия размеров и строения митохондрий в клетках на периферии реконструированного фолликула и в клетках более глубоких слоев (рис.9 В, Г).

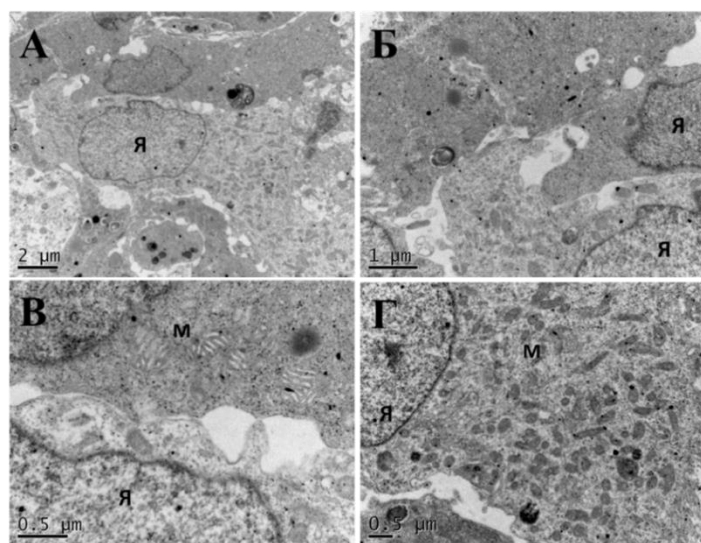
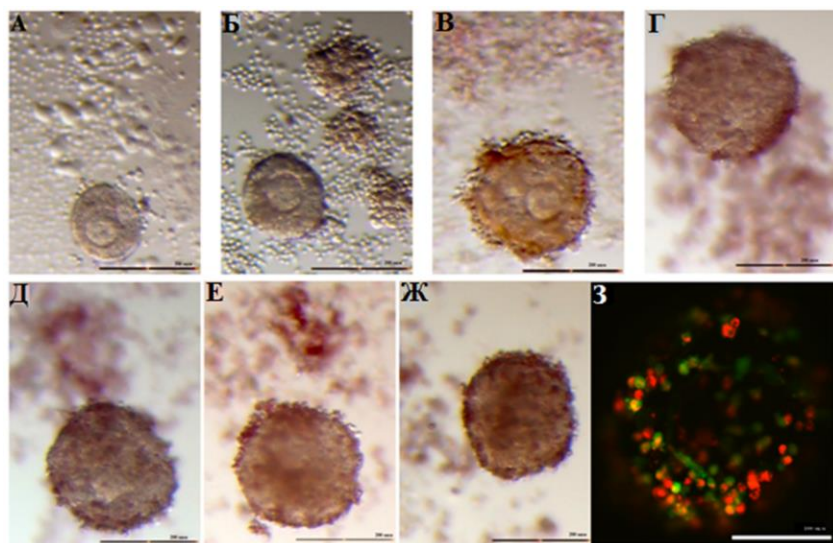


Рис. 9. Ультраструктура клеток краевой и внутренней зоны реконструированных фолликулов. А – внешний вид клетки из внутренней зоны; Б – рыхлое расположение клеток во внутренней зоне; В – митохондрии в клетках краевой зоны; Г – митохондрии в клетках центральной зоны. Я – ядро; М – митохондрии

Морфологические различия между клетками, а также их пространственное расположение позволяет предположить, что под действием стимулирующих факторов, исходящих от ооцита и фолликулярных

клеток, клеточные компоненты стромы яичника демонстрируют элементы самоорганизации, пытаясь занять свое место в общей структуре реконструированного фолликула.

Сокультивирование овариальных фолликулов с мезенхимными стволовыми клетками, выделенными из костного мозга мыши. В ряде работ изучали влияние МСК из различных источников на восстановление функции яичников, фолликулогенез в которых был прекращен воздействием химиотерапевтических агентов. Положительная динамика состояния яичников была зарегистрирована при внутривенной инъекции клеток кроликам (Abd-Allah et al., 2013), при внутриовариальной инъекции клеток мышам (Lee et al., 2007), однако в работах был описан только эффект, а судьба клеток не была прослежена. Мы предположили, что МСК КМ, как минимум,



могут оказывать стимулирующее действие на рост фолликула. Для подтверждения гипотезы мы культивировали фолликулы с суспензией МСК КМ (3000 клеток и 1 фолликул на каплю 30 мкл) в системе «висячая капля» в течение 7-ми суток. В результате мы наблюдали увеличение размеров фолликула, уже начиная со второго дня культивирования (рис. 10).

Рис. 10. Сокультивирование GFP+ МСК КМ с первичным многослойным овариальным фолликулом, окрашенным липофильным красителем DiI, в системе «висячая капля». А – 1-е сутки; Б – 2-е сутки; В – 3-и сутки; Г – 4-е сутки; Д – 5-е сутки; Е – 6-е сутки; Ж – 7-е сутки; З – флуоресцентное окрашивание подтверждает объединение клеток и фолликула в единую структуру (GFP+ МСК КМ – зеленая флуоресценция; клетки фолликула, окрашенные DiI – красная флуоресценция).

МСК КМ образуют с фолликулом единую структуру, как и клеточные элементы стромы яичника, однако этот процесс идет медленнее. Анализ окрашенных образцов с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (рис.10 3) показал, что МСК не просто покрывают фолликул, но вступают во взаимодействие с фолликулярными клетками. В связи с этим нами была выдвинута гипотеза, согласно которой МСК КМ под воздействием индуцирующих сигналов со стороны фолликула способны дифференцироваться в направлении фолликулярных клеток, которая требует дальнейшего подтверждения. В пользу этой гипотезы свидетельствуют данные, полученные нами методом сканирующей электронной микроскопии (рис. 11).

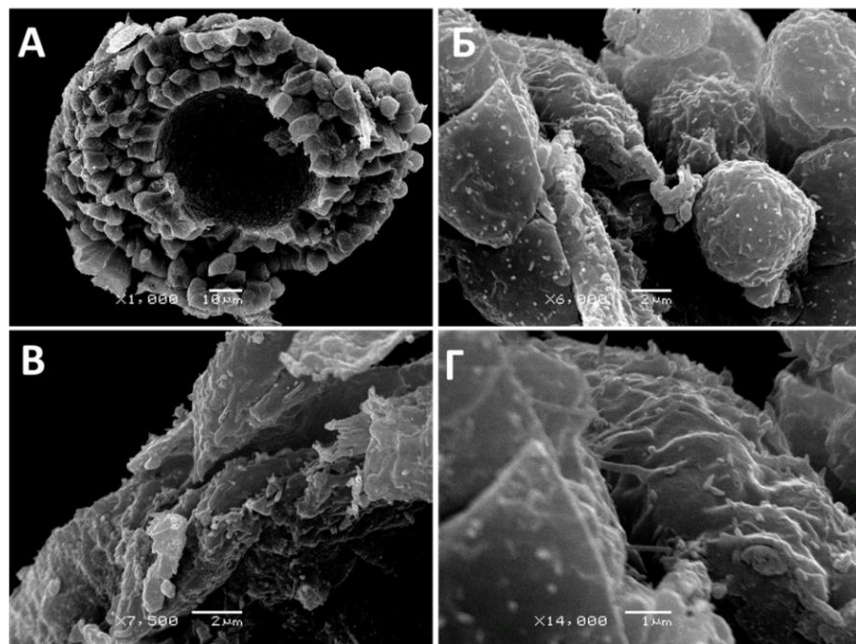


Рис. 11. Клеточное строение реконструированного фолликула мыши после сокультивирования с МСК КМ в течение 7 суток (сканирующая электронная микроскопия). А – общий вид реконструированного фолликула (место ооцита, при сколе попавшего в другой фрагмент фолликула отмечено звездочкой); Б – округлые клетки МСК КМ оседают и распластываются на поверхности фолликула (базальная мембрана обозначена стрелками, звездочкой – клетка теки) ; В – клетки теки; Г – поверхность дифференцирующейся мезенхимной стволовой клетки.

Через 7 суток на поверхности фолликула обнаруживаются клетки, которые отличаются от фолликулярных клеток по морфологическим характеристикам. Данные клетки имеют веретеновидную форму, однако они толще, чем располагающиеся рядом клетки теки. Эти клетки продолжают контактировать с шарообразными МСК и на их поверхности появляются отростки, которыми клетки взаимодействуют также и с текальным слоем. Еще в составе реконструированного фолликула были обнаружены клетки, сохранившие свою округлую форму, но на их поверхности уже начали формироваться отростки, похожие на отростки ранее описанных клеток (рис. 11 Б).

Анализ реконструированных фолликулов методом количественной ПЦР показал, что в отличие от МСК КМ из 2D и 3D условий культивирования, клетки изменяют свой фенотип с CD34⁻,CD45⁻,CD73⁺,CD90⁺,CD105⁺ на CD34⁺,CD45⁻,CD73⁻,CD90⁺,CD105⁺, попутно приобретая следующие маркеры клеток теки: LHR, Cyp17a1 (рис. 12). Изменение уровня экспрессии CD34 закономерно, так как в растущем фолликуле должны присутствовать клетки, которые впоследствии дадут начало эндотелию сосудов в текальной оболочке, также при выделении фолликулов в его составе могло содержаться некоторое количество кроветворных клеток. Существенное повышение уровня экспрессии данного гена в экспериментальной пробе по сравнению с остальными пробами может быть признаком выхода МСК КМ из недифференцированного состояния.

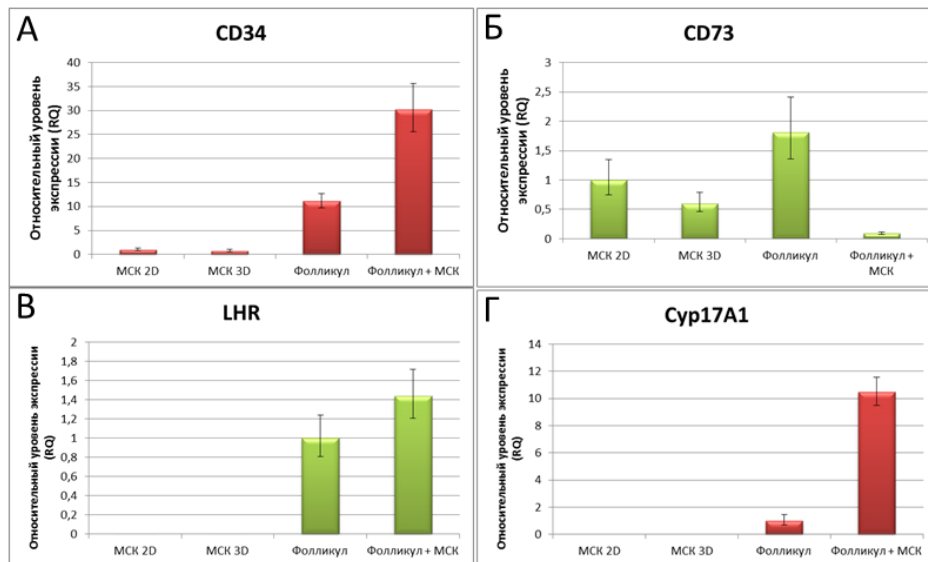


Рис. 12. Сравнение уровня экспрессии негативного маркера MCK CD34, позитивного маркера MCK CD73, ЛГ-рецептора и фермента, отвечающего за стероидогенез в клетках теки – Cyp17A1 в 2D и 3D культуре MCK, в овариальном фолликуле и при сокультивировании

Понижение уровня экспрессии CD73 в экспериментальной группе (рис. 12 Б) может быть признаком того, что MCK KM теряют свой низкодифференцированный статус при сокультивировании с фолликулом и уходят в терминальную дифференцировку в сторону стероидогенных клеток. Мы предполагаем, что повышенный уровень экспрессии данного маркера в фолликуле связан с тем, что при механическом выделении с наружной стороны базальной мембраны фолликула остаются единичные клетки теки. При культивировании *in vitro* в системе «висячая капля» было показано, что идет пролиферация клеточных элементов фолликула (рис. 5). Мы предполагаем, что CD73 экспрессируется на более высоком уровне в активно пролиферирующих клетках, это подтверждается изменением уровня экспрессии данного гена в MCK при переходе от 2D к 3D условиям. Таким образом, высокий уровень экспрессии CD73 в фолликуле можно объяснить наличием активно пролиферирующих клеток. Возможно, что при реконструировании фолликула исчезает необходимость в ускоренной пролиферации клеточных элементов, так как популяция клеток теки пополняется за счет клеток MCK KM и клетки наружной оболочки фолликула быстрее уходят в дифференцировку. Данный результат представляется очень интересным и нуждается в дальнейшем изучении. Некоторое различие в уровнях экспрессии гена LHR в двух пробах (рис. 12 В) мы связываем с тем, что рецепторы к ЛГ есть как на клетках теки, так и в небольшом количестве на клетках гранулы. Общее повышение уровня экспрессии гена, кодирующего рецептор к ЛГ, в экспериментальной группе (фолликул + MCK) может говорить о направленной дифференцировке MCK KM в сторону текальных клеток, но мы не можем исключить и простого стимулирующего воздействия MCK на клетки фолликула. Уровень экспрессии Cyp17a1 (фермента, отвечающего за стероидогенез в клетках теки) в экспериментальной группе (фолликул + MCK KM) превышал уровень экспрессии в фолликуле без MCK в 10,5 раз (рис. 12 Г). Мы считаем, что столь большое различие в уровнях экспрессии подтверждает нашу гипотезу о направленной дифференцировке MCK KM в сторону текальных клеток при сокультивировании MCK с фолликулом. При культивировании индивидуальных фолликулов происходит нарастание клеток теки, однако их количество существенно меньше, чем количество MCK, которые вошли в состав реконструированного фолликула. Разница в уровнях экспрессии служит подтверждением этому. По совокупности полученных нами результатов мы можем подытожить, что наши данные могут свидетельствовать о направленной дифференцировке MCK KM в текальные клетки при сокультивировании MCK KM с фолликулом в 3D условиях.

Подбор параметров лазерного воздействия на преимплантационные эмбрионы мыши

Следующим этапом наших исследований стала разработка технологии микрохирургии преимплантационных эмбрионов при помощи системы «оптический скальпель-пинцет». Мы подобрали параметры установки для воздействия на плазматическую мембрану, цитоплазму и оболочку эмбрионов. При максимально повреждающем воздействии – нарушении целостности плазматической мембраны (модель слияния бластомеров), было показано, что подобранные нами параметры обеспечивали выживание эмбрионов (рис. 13) в 34,57% (Ilina et al., 2012).

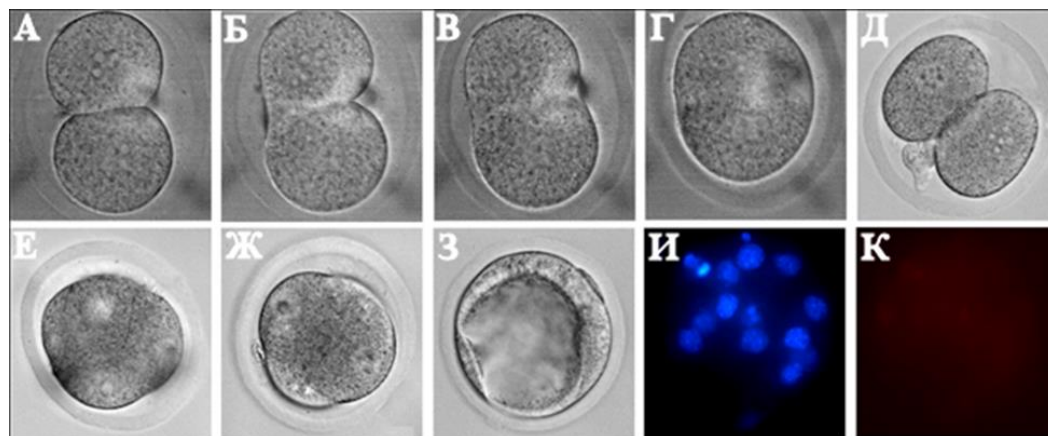


Рис. 13. Слияние бластомеров 2-х клеточного эмбриона и последующее развитие эмбриона при энергии лазерных импульсов 0,5 мкДж. А - эмбрион до подачи лазерного импульса; Б - через 16 минут после подачи лазерного импульса; В - через 20 минут; Г - через 30 минут; Д - первый день после

облучения (первое деление); Е - утро второго дня; Ж - вечер второго дня (компактная морула); З - третий день (бластоциста); И - флуоресцентное окрашивание клеток бластоцисты красителями Hoechst 33258 (Sigma) (флуоресцентная микроскопия); К - флуоресцентное окрашивание клеток бластоцисты красителем Propidium iodide (Invitrogen) (флуоресцентная микроскопия).

Все эмбрионы, подвергшиеся слиянию, развивались в соответствии с таблицами нормального развития (Дыбан и соавт., 1975), однако в зависимости от величины энергии импульса, морфология развивающихся эмбрионов несколько различалась. Так на рисунке 13 видно, что при энергии лазерного импульса 0,5 мкДж у эмбрионов происходит нарушение развития – компактизация малого числа бластомеров, связанная со снижением скорости клеточных делений. У эмбрионов, на которые воздействовали лазерным импульсом с энергией 0,4 мкДж, на второй день после воздействия на стадии морулы насчитывается большее количество клеток, чем при использовании большей энергии импульса. Однако, и в том, и в другом случае эмбрионы выживают и развиваются до стадии бластоцисты. Таким образом, нами была усовершенствована процедура слияния клеток с помощью системы «оптический скальпель – оптический пинцет», и доказано, что после лазерного воздействия клетки выживают. Подобные эксперименты по слиянию ооцитов и бластомеров в составе эмбриона мыши на стадии четырех клеток были проведены группой отечественных ученых с использованием пикосекундного лазера (Krivokharchenko et al., 2012). По данным наших коллег после воздействия лазера с большей длительностью импульса и, следовательно, сильнее нагревающего объект, эмбрионы также развивались до стадии бластоцисты.

Биопсия редуционного тельца

В этой серии экспериментов использовали двухклеточные эмбрионы (1,5 сут. развития) и зиготы мыши (0,5 сут. развития) для отработки методики по разрезанию блестящей оболочки и проведения биопсии редуционного тельца. Процедура биопсии была успешно проведена как на зиготах, так и на двухклеточных эмбрионах (рис.14,15).

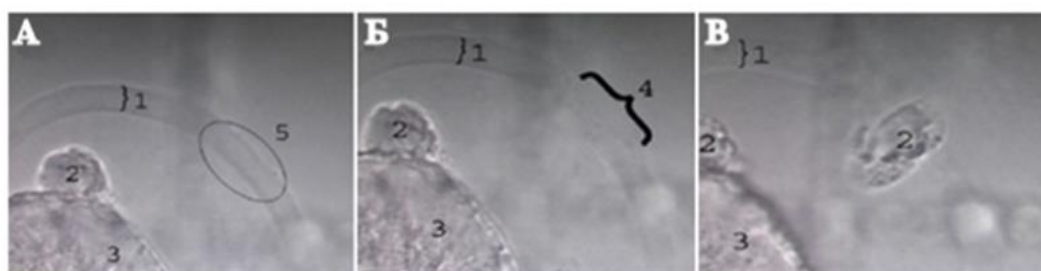


Рис. 14. Биопсия редуционного тельца. А – ориентация эмбриона и выбор места перфорирования zona pellucida; Б - отверстие в оболочке,

полученное с помощью лазера, достаточное для выхода редуционного тельца, В - извлечение редуционного тельца с помощью оптического пинцета через полученное отверстие; 1 - zona pellucida; 2 – редуционное тельце; 3 – эмбрион на стадии зиготы; 4 – полученное отверстие; 5 – место, выбранное для перфорирования.

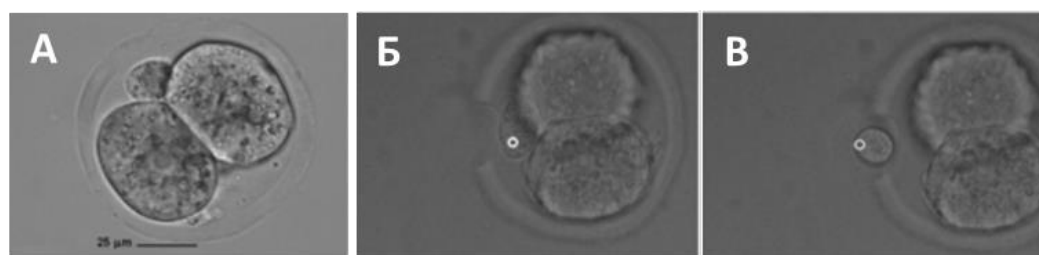


Рис.15. Биопсия редуционного тельца эмбриона на стадии двух клеток. А – эмбрион до воздействия; Б – перфорирование ZP; В – захват

редуционного тельца оптическим пинцетом; Г – извлечение редуционного тельца из-под оболочки эмбриона (Il'ina et al., 2012).

Эффективность процедуры биопсии составила 58%. Интерес представляют и причины неудач проведения этой микрохирургической операции. В отдельных случаях редуционное тельце повреждалось малыми частицами разрушенной ZP и теряло целостность. Также успех процедуры во многом зависел от того, насколько сильно редуционное тельце зажато между эмбрионом и ZP. В том случае, если РТ передвигалось под ZP под воздействием оптического пинцета, процент успешного проведения процедуры его извлечения после локального повреждения ZP был выше. По-видимому, свободному движению РТ мешает его остаточное соединение с ооцитом, которое, по некоторым сведениям, сохраняется в течение целого клеточного цикла после формирования РТ (Дыбан, 1988).

Биопсия трофэктодермы

Задачей этой серии экспериментов было отделить участок трофэктодермы, содержащий 5 - 7 клеток, при помощи системы ОСП без повреждения основной части бластоцисты. Этот процесс представлен на рисунке 15.

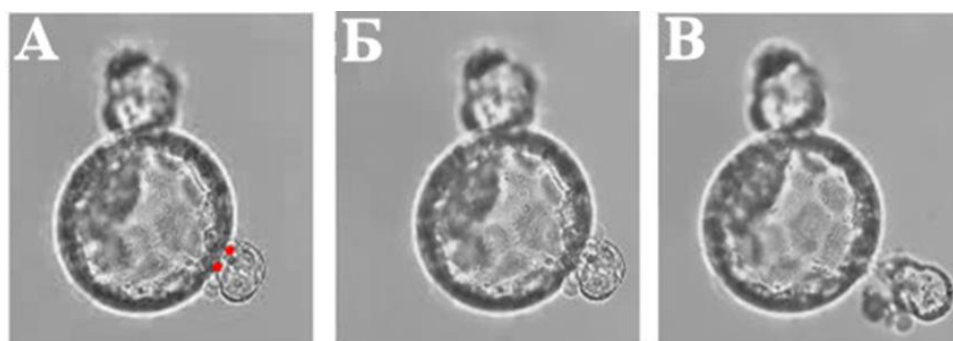


Рис. 15. Обработка лазером участка трофэктодермы. А - эмбрион до воздействия; Б - эмбрион после первого импульса; В - эмбрион после второго импульса. Точки – метки первого и второго импульса

После выполнения процедуры воздействия лазерным скальпелем биоптат захватывали оптическим пинцетом и перемещали на некоторое расстояние от самого эмбриона. Эффективность процедуры составила 62,2%. На следующий день после проведения микрохирургической операции оценивали выживаемость бластоцист путем окрашивания клеток флуоресцентными красителями Hoechst 33258 (Sigma) и PI (Invitrogen). Исследование показало, что после процедуры биопсии трофэктодермы эмбрионы были жизнеспособны: завершали хэтчинг, наблюдалось положительное окрашивание клеток Hoechst 33258, а PI окрашивание отсутствовало, либо окрашивались единичные клетки эмбриона (рис. 16).

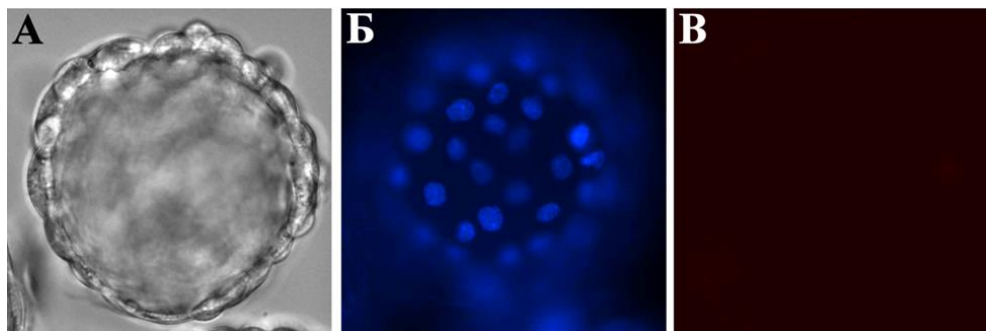


Рис. 16. Бластоциста через сутки после процедуры биопсии трофэктодермы. А - бластоциста, прошедшая хэтчинг; Б - положительное окрашивание Hoechst 33258; В - отрицательное окрашивание PI.

Результаты проведенных экспериментов показали, что процедура биопсии трофэктодермы более эффективна, чем процедура биопсии редуционного тельца. К тому же процедура биопсии трофэктодермы менее трудоемка для оператора лазерной установки. Дальнейшая разработка метода лазерной биопсии трофэктодермы представляется более перспективной, так как в мировой клинической практике для проведения преимплантационной генетической диагностики все чаще обращаются к биопсии трофэктодермы, это связано с тем, что таким образом можно получить больше клеточного материала (5–7 клеток), а значит и получить более результаты при последующем генетическом анализе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе было показано, что 3D система «висячая капля», успешно применяющаяся для культивирования различных типов клеток, является подходящей моделью для культивирования первичных многослойных овариальных фолликулов. При культивировании в данной системе фолликулы не теряют свою трехмерную организацию: сохраняются контакты между клетками в составе фолликула, а также их взаимное расположение, происходит увеличение диаметра фолликулов за счет пролиферации клеток теки и гранулезы, а также возрастает диаметр ооцита. Система «висячая капля» была нами успешно использована для реконструирования соматического окружения овариального фолликула методом сокультивирования со смешанной популяцией клеток стромы яичника, а также с мезенхимными стволовыми клетками, выделенными из костного мозга мыши. При сокультивировании с овариальным фолликулом разнородных клеточных элементов происходили процессы их самоорганизации: уплощенные клетки находились в тесном контакте друг с другом, располагались в черепичном порядке на периферии фолликула, в то время как внутри находились более рыхло лежащие клетки. При сокультивировании фолликула с МСК КМ мы наблюдали образование единой морфофункциональной системы, кроме того происходила направленная дифференцировка мезенхимных стволовых клеток в стероидогенные клетки фолликула, а именно в клетки теки. В реконструированных фолликулах методом количественного ПЦР-анализа было установлено изменение уровня экспрессии маркеров стволовости и маркеров стероидогенных клеток. МСК КМ изменяли свой фенотип с CD34-,CD45-,CD73+,CD90+,CD105+ на CD34+,CD45-,CD73-,CD90+,CD105+, попутно приобретая следующие маркеры клеток теки: LHR, Cyp17a1. Таким образом, использованная нами модель сокультивирования фолликулов с клетками различной природы в системе «висячая капля» может стать достаточно информативной моделью для изучения морфогенетических процессов в растущем фолликуле, а также процессов дифференцировки стволовых клеток при проведении фундаментальных исследований.

В результате проведенных нами исследований был также разработан метод лазерной микрохирургии преимплантационных эмбрионов млекопитающих с использованием системы «оптический скальпель – пинцет», включающий в себя проведение процедуры вспомогательного хэтчинга, биопсии редуccionного тельца и клеток трофэктодермы. Были подобраны условия дозированного лазерного воздействия, не снижающие жизнеспособность эмбрионов при проведении операций различного рода. Разработанный нами метод может быть применен не только для микрохирургии эмбрионов, но также и для микрохирургии клеточных агрегатов, о чем свидетельствуют успешно проведенные процедуры биопсии трофэктодермы. Таким образом, наша технология может быть использована не только в клинической практике ВРТ, но и в экспериментальной биологии, так как обеспечивает прецизионность процедуры, малое повреждающее воздействие, в том числе и температурное в силу краткой длительности лазерных импульсов. В связи с тем, что в современной фундаментальной науке и клинической практике все большее значение приобретает работа с гаметам и эмбрионами в системах *in vitro*, наша работа может являться основой для будущей технологии полного цикла работы с ооцитами и эмбрионами *extra corpora*, начиная от развития и созревания фолликула в системе *in vitro*, до анализа генетического статуса полученного из него ооцита и впоследствии эмбриона с использованием метода лазерной микрохирургии.

ВЫВОДЫ

1. При сокультивировании с единичным овариальным фолликулом в системе «висячая капля» соматические клетки демонстрируют элементы самоорганизации и формируют с фолликулом единую морфофункциональную систему как при использовании смешанной популяции клеток, полученной из стромы яичника, так и при использовании МСК КМ.
2. Впервые показана дифференцировка МСК КМ в сторону клеток фолликула при сокультивировании с единичным овариальным фолликулом: МСК КМ, культивируемые в составе реконструируемого фолликула в системе «висячая капля» теряют характеристики стволовых клеток, меняя фенотип CD34-, CD45-, CD73+, CD90+, CD105+ на CD34+, CD45-, CD73-, CD90+, CD105+ и приобретают маркеры стероидогенных клеток фолликула (LHR, Cyp17a1).
3. Впервые показано стимулирующее воздействие МСК КМ, дифференцирующихся в направлении клеток теки (LHR+, Cyp17a1+), на пролиферацию и функциональную активность клеток гранулезы, о чем свидетельствует повышение уровня экспрессии ароматазы (Cyp19a1) в реконструированных фолликулах.
4. «Висячая капля» является адекватной 3D системой для культивирования единичных овариальных фолликулов, так как при использовании этого метода происходит достоверное увеличение диаметров как ооцита, так и фолликула при сохранении его трехмерной организации.
5. Разработаны протокол и параметры воздействия фемтосекундного лазера на оболочку, цитоплазму и плазматическую мембрану бластомеров преимплантационного эмбриона, подобраны параметры лазерного воздействия, обеспечивающие выживание эмбриона после проведения лазерных микрохирургических процедур.
6. Впервые показана возможность осуществления бесконтактной биопсии редуccionного тельца и биопсии трофэктодермы с помощью установки с функциями лазерного скальпеля и оптического пинцета.
7. Показано, что воздействие фемтосекундного хром-форстеритового лазера не снижает жизнеспособность эмбрионов при проведении процедуры вспомогательного хэтчинга, биопсии редуccionного тельца и микрохирургии трофэктодермы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Inna V. Il'ina; Dmitry S. Sitnikov; Andrey V. Ovchinnikov; Mikhail B. Agranat; Yulia V. Khramova; Maria L. Semenova. Noncontact microsurgery and micromanipulation of living cells with combined system femtosecond laser scalpel-optical tweezers. // Biophotonics: Proc. of SPIE. - 2011. – V.8427. - P. 84270S-1 — 84270S-8. DOI: 10.1117/12.922333

2. Inna V. Ilina, Mikhail M. Rakityanskiy, Dmitry S. Sitnikov, Andrey V. Ovchinnikov, Mikhail B. Agranat, Yulia V. Khramova, Maria L. Semenova. Biomedical and biotechnology applications of noncontact femtosecond laser microsurgery of living cells. // AIP Conf. Proc. - 2012. - V.1464. - P.560-571. DOI: 10.1063/1.4739909

3. И. В. Ильина, А. В. Овчинников, Д. С. Ситников, М. М. Ракитянский, М. Б. Агранат, Ю. В. Храмова, М. Л. Семенова. Применение фемтосекундных лазерных импульсов в биомедицинских клеточных технологиях. // Теплофизика высоких температур. - 2013. – Т. 51. - №2. - С. 198–204. DOI: 10.1134/S0018151X13020089

4. Храмова Ю.В., Филатов М.А., Лебедева Т.С., Семенова М.Л. Культивирование овариальных фолликулов мыши в средах различного состава. // Труды XVIII Международного Форума по проблемам науки, техники и образования./ Под редакцией В.В. Вишневого - М.: Академия наук о Земле. - 2014. – С.81-83.

Тезисы докладов:

1. Храмова Ю.В., Сергеев С.А., Ракитянский М.М. Микрохирургия преимплантационных эмбрионов при помощи системы лазерный скальпель – лазерный пинцет //Тезисы докладов Ломоносов 2010. Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых. Москва. - 2010. - С. 38.

2. Храмова Ю.В., Сергеев С.А., Ракитянский М.М., Семенова М.Л., Агранат М.Б. Микрохирургия преимплантационных эмбрионов млекопитающих при помощи системы «лазерный скальпель – лазерный пинцет». //Сборник тезисов. VIII Всероссийская конференция по патологии клетки. Москва. - 2010. - С. 270-273.

3. Ю.В. Храмова, М.Л. Семенова, С.А. Сергеев, М.Б. Агранат, М.М. Ракитянский. Новый метод микрохирургии эмбрионов млекопитающих с использованием системы «оптический скальпель — оптический пинцет». //Сборник тезисов IV международной конференции «Современные достижения бионаноскопии». Москва. - 2010. - С. 82-83.

4. S.A. Sergeev, M.M. Rakityanskiy, Y.V. Khramova, M.L. Semenova, A.A. Smirnova, M.B. Anshina. A new technique for polar body biopsy with laser tweezers and femtosecond laser zona pellucida drilling. // Abstracts of the 10th International Congress on Preimplantation Genetic Diagnosis. Reproductive BioMedicine Online. - 2010.- V. 20. - S.1. - P. 41-42.

5. Ю.В. Храмова, М.М. Ракитянский, С.А. Сергеев, И.В. Ильина, Д.С. Ситников, А.В. Овчинников, М.Л. Семенова, М.Б. Агранат. Бесконтактный лазерный метод микрохирургии преимплантационных эмбрионов млекопитающих. // Сборник тезисов V международной конференции «Современные достижения бионаноскопии». Москва - 2011. - С. 67.

6. Y.V. Khramova, I.V. Ilyina, D.S. Sitnikov , A.V. Ovchinnikov, M.M. Rakityansky, S.A. Sergeev, M.L. Semenova, M.B. Agranat. A novel optical microsurgery method for trophectoderm biopsy. // Materials of the conference “A window into the Reproductive Era Research”, Milan, Italy. Placenta. - 2011. - V.32. - S.3. - P.279.

7. 13. Rakityanskiy M. M., Ilina I. V., Sitnikov D. S., Ovchinnikov A. V., Agranat M. B., Khramova Y. V., Semenova M. L. Femtosecond laser assisted microsurgery of mammalian cells for medical and biotechnology applications. // 8th European Congress on Biophysics (Budapest, 23-27 august 2011) European Biophysics Journal with Biophysics Letters. - 2011. - Vol. 40. – S.1. – P.237,
8. Yulia Khramova, Sergey Sergeev, Inna Ilina, Dmitry Sitnikov, Andrey Ovchinnikov, Michael Agranat, Maria Semenova. The new contactless method for trophectoderm biopsy. // Reproductive BioMedicine Online. - 2012. - V.24. - S.1. - P.S21.
9. Khramova Y.V., Filatov M., Tatiana L., Semenova M. Ovarian follicle culture in 2D and 3D systems. // FEBS Journal Special Issue: FEBS EMBO 2014 Conference. Paris. – 2014. -V.281. - P.332.