# МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

## имени М.В.ЛОМОНОСОВА

Биологический факультет

На правах рукописи

Храмова Юлия Владимировна

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

Специальность - 03.03.05 – Биология развития, эмбриология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Доктор биологических наук,

профессор

Семенова М.Л.

Москва – 2015

## ОГЛАВЛЕНИЕ

1.	BI	ведеі	НИЕ	4
	1.1.	Акт	уальность проблемы	4
	1.2.	Цел	и и задачи исследования	6
	1.3.	Нау	чная новизна	7
	1.4.	Пра	ктическая и теоретическая значимость	8
	1.5.	Пол	южения, выносимые на защиту	8
	1.6.	Апр	робация диссертации	9
	1.7.	Пуб	бликации по теме диссертации	9
	1.8.	Стр	уктура и объем диссертации	9
2.	Ol	БЗОР.	ПИТЕРАТУРЫ	10
	2.1.	Фор	омирование и строение яичника млекопитающих	10
	2.2.	Фол	іликулогенез	12
	2.2	2.1.	Строение фолликулов и их классификация	12
	2.2	2.2.	Гормональная регуляция фолликулогенеза	20
	2.2	2.3.	Взаимодействие между компонентами фолликула	23
	2.3.	Экс	периментальные подходы к изучению фолликулогенеза млекопитающих	27
	2.3	3.1.	Способы сохранения фертильности	28
	2.3	3.2.	Культивирование в 2D условиях	31
	2.3	3.3.	Культивирование в 3D условиях	34
	2.4.	Лаз	ерная микрохирургия клеток, ооцитов и эмбрионов	36
	2.4	4.1.	Мембранная хирургия	37
	2.4	4.2.	Фотопорация и трансфекция	38
	2.5.	Опт	гический пинцет	39
	2.5	5.1.	Принципы работы оптического пинцета	40
	2.5	5.2.	Применение системы оптического манипулирования к единичным клеткам	42
	2.5	5.4. Пр	облемы, сопутствующие применению оптического пинцета	46
	2.6.	Бис	псия ооцитов и преимплантационных эмбрионов	47
3.	Μ	ATEP	ИАЛЫ И МЕТОДЫ	50
	3.1.	Лаб	ораторные животные	50
	3.2.	Пол	учение биоматериала для эксперимента	50
	3.2	2.1.	Получение овариальной ткани и фолликулов	50
	3.2	2.2.	Получение преимплантационных эмбрионов	51
	3.2	2.3.	Выделение МСК КМ	51

	3.3. По	остановка экспериментов
	3.3.1.	Культивирование клеток и фолликулов52
	3.3.2.	Сокультивирование фолликулов с клетками53
	3.3.3.	Лазерная микрохирургия преимплантационных эмбрионов
	3.4. Ai	нализ данных, полученных при проведении экспериментов
	3.4.1.	Цитологический анализ59
	3.4.2.	Анализ объектов методом электронной микроскопии
	3.4.3.	Молекулярно-биологический анализ образцов62
	3.4.4.	Измерения и статистический анализ данных65
4.	РЕЗУЛ	ЪТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ66
4	4.1. По	одбор оптимальных условий для культивирования овариальных фолликулов <i>in vitro</i> 66
	4.1.1.	Культивирование овариальных фолликулов в 2D и 3D условиях
	4.1.2. cocmae	Культивирование овариальных фолликулов in vitro в 3D условиях в средах различного га 72
2	4.2. Ре фолликул	конструкция соматического окружения первичного многослойного овариального а мыши76
	4.2.1. клеточ	Сокультивирование овариальных фолликулов со смешанной первичной культурой ных элементов стромы яичника мыши77
	4.2.2. клетка	Сокультивирование овариальных фолликулов с мезенхимными клетками стволовыми ми, выделенными из костного мозга мыши81
	4.2.3.	Молекулярно-биологическое исследование реконструированных фолликулов
4	4.3. По	одбор параметров лазерного воздействия на преимплантационные эмбрионы мыши97
	4.3.1. цитопл	Определение оптимальных параметров лазерного воздействия на пазматическую мембрану клеток эмбриона97
	4.3.2. клеток	Определение оптимальных параметров лазерного воздействия на цитоплазму эмбриона
	4.3.3. эмбрио	Определение оптимальных параметров лазерного воздействия на оболочку на мыши
4	4.4. Би	юпсия редукционного тельца
4	4.5. Би	юпсия трофэктодермы110
5.	ЗАКЛН	ОЧЕНИЕ114
6.	выво	ДЫ116
СГ	ІИСОК С	ОКРАЩЕНИЙ117
7.	СПИС	ОК ЛИТЕРАТУРЫ119

#### 1. ВВЕДЕНИЕ

#### 1.1. 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 состояния клеточных элементов в составе овариального фолликула. Так было показано, что лютеинизированные клетки гранулезы воздействием определенных факторов способны возвращаться под в низкодифференцированное состояние, о чем свидетельствовало появление маркеров стволовых и мезенхимных клеток, и впоследствии дифференцироваться в клеточные типы, не характерные для овариального фолликула (Kossowska-Tomaszczuk et al., 2009). Наряду с вопросами пластичности клеток в составе фолликула активно ведется изучение взаимодействия между клетками в составе фолликула (Zhang et al., 2014), а также со стволовыми клетками соматического окружения фолликулов (Kossowska-Tomaszczuk and De Gevter, 2013), так как считается, что именно они являются предшественниками теки (Tajima et al., 2007). Накопление сведений о поведении клеток в составе фолликула и динамике их развития и дифференцировки 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). В настоящее время для лечения бесплодия различной этиологии широко применяются методы вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) и за последние годы количество циклов экстракорпорального оплодотворения существенно возросло и к настоящему времени в мире после проведения данной процедуры родилось более 5 миллионов человек (Hyrapetian et al., 2014). 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 (Hovatta, 2004; Oktay et al., 2000). Это направление в настоящее время активно развивается, и во всем мире создаются криобанки овариальной ткани с индивидуальным хранением образцов. Однако ретрансплантация ткани пациентке возможна далеко не всегда, в том числе и по причине первичного диагноза. Другое ограничение этого методического подхода – его низкая эффективность. В настоящее время не удается добиться высоких результатов при пересадке криоконсервированной овариальной ткани, а число детей, рожденных после этой процедуры, составляет всего несколько десятков (Dolmans et al., 2013; Donnez et al., 2012, 2011).

Другим возможным подходом к восстановлению фертильности является культивирование овариальной ткани и/или единичных фолликулов *in vitro*. На эту технологию 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., 2006а). Ооциты, которые будут получены таким методом, могут быть оплодотворены при помощи стандартных методов ВРТ, а эмбрионы - криоконсервированы по стандартным, широко применяемым в клинике протоколам и 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, поэтому часто такой анализ проводится только в случае особых показаний (возраст пациентки, наличие генетических заболевание в семейном анамнезе и т.п.), а основная часть эмбрионов оценивается только по морфологических 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. Микрохирургия является важной составляющей работы с ооцитами и преимплантационными эмбрионами и применяется не только в медицинской практике, но и в экспериментальных исследованиях. Различные типы микрохирургических

манипуляций можно производить на эмбрионах от стадии зиготы до стадии бластоцисты. В клиниках репродукции производят забор редукционного тельца на стадии зиготы для проведения преимплантационной диагностики, а на стадиях дробления, может быть забор редукционного тельца, так и одного из бластомеров. сделан как В экспериментальной эмбриологии микрохирургия применяется как для введения клеток в полость бластоцисты (Guo et al., 2014; Longenecker and Kulkarni, 2009), так и для забора внутренней клеточной массы бластоцисты с целью получения эмбриональных стволовых клеток (Xu et al., 2014), а также для введения генетических конструкций в пронуклеусы (Horii et al., 2014; Liu et al., 2013). И в клиниках, и в исследовательских лабораториях для осуществления всех этих процедур используют микроманипуляторы, и во всех случаях эмбрион должен быть закреплен на специальной присоске – холдере, даже в тех случаях, когда процедура биопсии происходит с применением лазерного скальпеля (Greco et al., 2015; Griesinger et al., 2009; Magli et al., 2011; Milachich, 2014). В последние годы активно развивается новая технология микроманипулирования с единичными клетками – система «оптический скальпель-пинцет», позволяющая проводить микрохирургические процедуры бесконтактно (Bambardekar et al., 2015). Это открывает новые перспективы для микрохирургии эмбрионов млекопитающих и человека, как в целях проведения преимплантационной генетический 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.

#### 1.2. Цели и задачи исследования

<u>Цель исследования</u> - 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;

 Провести анализ взаимного влияния компонентов реконструированного фолликула мыши; изучить взаимодействие МСК КМ с первичным многослойным фолликулом при культивировании в 3D условиях;

 Разработать методику проведения микрохирургических манипуляций (биопсии редукционного 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.

#### 1.3. Научная новизна

Предложен новый методический подход к культивированию *in vitro* овариальных фолликулов млекопитающих – сокультивирование первичных многослойных фолликулов с мезенхимными стволовыми клетками, выделенными из костного мозга, 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 клеток теки фолликула при сокультивировании с ним в системе «висячая капля». МСК КМ, культивируемая в составе реконструируемого фолликула в «системе висячая» капля теряет характеристики стволовых клеток, меняя фенотип CD34-,CD45-,CD73+,CD90+,CD105+ на CD34+,CD45-,CD73-,CD90+,CD105+ и приобретает маркеры стероидогенных клеток фолликула, начиная экспрессировать ЛГ-рецептор и ключевой фермент синтеза андрогенов - Сур17а1. Также впервые было показано стимулирующее воздействие МСК КМ, дифференцирующихся в направлении клеток теки (LHR+, Cyp17a1+), на пролиферацию и функциональную активность клеток гранулезы, о свидетельствует повышение уровня экспрессии (Cyp19a1) чем ароматазы В реконструированных фолликулах. Впервые были разработаны методы микрохирургии преимплантационных эмбрионов млекопитающих при помощи системы «оптический скальпель-пинцет» на основе фемтосекундного лазера, такие как биопсия редукционных телец и клеток трофэктодермы. Подобраны параметры и протоколы лазерного воздействия, обеспечивающие высокую выживаемость эмбрионов после проведения процедуры.

#### 1.4. 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 мезенхимных стволовых клеток, выделенных из костного мозга, 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 «оптический скальпель – пинцет» может быть применена как в клинической практике ВРТ для определения генетического статуса эмбрионов и культивируемых фолликулов, так и в экспериментальной биологии.

#### 1.5. 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.

#### 1.6. 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).

#### 1.7. 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.

#### 1.8. 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 (18 русскоязычных и 195 англоязычных).

#### 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

#### 2.1. Формирование и строение яичника млекопитающих

Яичник – это орган репродуктивной системы, который выполняет генеративную функцию – формирование женских половых клеток, и эндокринную функцию – выработка эстрогена и прогестерона. По происхождению яичники относятся к производным мезодермы. Гонада образуется на вентромедиальной границе мезонефроса: клетки в каудальной части этой области формируют половой валик (Carlson, 2009), клетки целомического эпителия дают начало клеткам гранулезы, клетки мезонефроса – предшественники клеток теки (Боярский, 2004). Согласно принятой на данный момент теории развитие яичника связано с действием трех основных факторов: Wnt-4, FGF-9 и Sox-9. При этом Wnt-4 подавляет экспрессию FGF-9, что ведет к снижению экспрессии Sox-9, подавлению формирования структур семенника и дифференцировке половой железы по женскому типу (Carlson, 2009). Ген Dax1 также отвечает за дифференцировку гонады по женскому пути (Wertz and Herrmann, 2000). Для нормального развития яичника необходимо заселение гонады первичными половыми клетками (ППК). После миграции ППК в гонаду они распределяются по кортикальному слою или в районе кортикомедуллярной границы (Carlson, 2009). Детально выделении линии ППК исследовано у мышей и предполагается, что у других млекопитающих данный процесс идет аналогично. Линия ППК выделяется в зародышевой области эпибласта в начале гаструляции. За дифференцировку ППК из полипотентных клеток отвечают такие факторы, как ВМР4 и ВМР8b. Источником данных факторов являются клетки соседней внезародышевой эктодермы. Еще один фактор – ВМР2, который вырабатывается клетками гипобласта. BMP активируют Smad-1,4,5,8 – внутриклеточные сигнальные молекулы, вызывающие экспрессию генов, отвечающих за дифференцировку ППК (Кожухарь, 2011). Характерными признаками этих клеток является активность щелочной фосфатазы, экспрессия Oct-4 (отвечает за плюрипотентность), c-kit (отвечает за митотическое деление ППК), ErbB2, ErbB (фактор, оказывающий влияние на деление ППК в культуре), Vasa (экспрессируется при колонизации гонад) (Боярский, 2004), Nanog и Sox-2 (также отвечают за плюрипотентность) (Кожухарь, 2011). В направленной миграции ППК принимают участие интегрины α3, 6, V, β-1 (Боярский, 2004). Оогонии в эмбриональном яичнике активно пролиферируют (у человека — до начала 4-го месяца развития, у мыши — до 13,5 суток развития). Затем, под влиянием сигналов мезонефроса, одним из которых является секретируемая клетками мезонефроса ретиноевая кислота, часть оогоний переходит в профазу первого деления мейоза. В этот период в яичнике

четко различаются медуллярная и кортикальная области. Кортикальная область содержит все пролиферирующие оогонии и ооциты первого порядка. Ооциты в профазе мейоза начинают формировать ассоциации с фолликулярными клетками, образуя фолликулы. В настоящее время считается, что предшественниками фолликулярных клеток являются клетки целомического эпителия области полового валика. Однако в классических гистоморфологических работах приводятся данные, что возможно R пул предшественников фолликулярных клеток вносит некоторый вклад подэпителиальная мезенхима полового валика и возможно, фолликулярные клетки имеют двойное происхождение (Witschi et al., 1957).По завершении митотических делений все половые клетки женской гонады находятся в составе фолликулов, в основном в составе примордиальных фолликулов.

Яичник половозрелой самки млекопитающих (рис.1) покрыт белочной оболочкой (tunica albuginea), сформированной соединительной тканью, далее располагается корковый слой (кортекс), в глубине - мозговое вещество (медулла). Медулла состоит из рыхлой соединительной ткани, обильно снабженной кровеносными и лимфатическими сосудами, также в этой области располагаются нервные окончания. В яичнике человека клетки медуллы обнаруживаются на 6-7 неделе внутриутробного развития (Kurilo, 1980). В кортикальном слое происходит формирование фолликулов и созревание ооцитов.



**Рисунок 1.** Строение яичника млекопитающих (Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings)

#### 2.2. Фолликулогенез

Фолликулогенез – это процесс формирования, роста и созревания фолликулов. В течение всей жизни большая часть ооцитов находится в составе примордиальных фолликулов, которые последовательно вступают в рост. Фактически пул примордиальных фолликулов является овариальным резервом, который расходуется в течение всего онтогенеза. Большая часть фолликулов в ходе развития подвергается атрезии, другая часть созревает, доходит до стадии овуляции, после которой клетки фолликула подвергаются латинизации, образуется желтое тело.

#### 2.2.1. Строение фолликулов и их классификация

Овариальный фолликул – многокомпонентная система с большим числом стимулирующих и ингибирующих связей между элементами, которые входят в состав фолликула. На разных этапах фолликулогенеза количество компонентов в фолликуле изменяется. На наиболее продвинутой стадии развития, но до овуляции, в состав фолликула входят ооцит, клетки гранулезы и клетки теки (рис.2).



Рисунок 2. Строение Граафова пузырька (Erickson, 1987).

Ооцит окружают клетки кумулюса, образуя ооцит-кумулюсный комплекс. Клетки кумулюса будут сопровождать ооцит во время овуляции, при оплодотворении и в течение некоторого времени после проникновения сперматозоида в яйцеклетку. Фолликулярные клетки, располагающиеся в несколько рядов вдоль базальной мембраны фолликула, называют клетками гранулезы. После созревания фолликула и овуляции клетки гранулезы перестают пролиферировать и подвергаются лютеинизации. Долгое время считалось, что лютеинизация клеток гранулезы является терминальной дифференцировкой, но недавно было показано, лютеинизированные клетки гранулезы можно дедифференцировать при

культивировании в среде с добавлением ростового фактора LIF. При этом клетки теряют рецепторы к ФСГ, также в них исчезает активность фермента ароматазы, необходимого для синтеза эстрогенов из андрогенов, клетки прекращают секретировать прогестерон. В то же время они постепенно приобретают поверхностные маркеры, характерные для мезенхимных стволовых клеток: CD29 (интегрин  $\beta$ -1), CD44 (рецептор гиалуроновой кислоты), CD90 (антиген тимоцитов 1), CD105 (эндоглин), CD117 (Рецептор фактора роста тучных и стволовых клеток (SCFR), или тирозинкиназа Kit), и CD166 (мембранный белок из суперсемейства иммуноглобулинов, относится к классу молекул клеточной адгезии), но не CD73 (5'-нуклеотидаза). Мультипотентность этих дедифференцированных клеток гранулезы была продемонстрирована путем направленных дифференцировок *in vitro* в те типы клеток, которые в норме не встречаются в фолликулах: в нейроны, хондроциты и остеобласты (Kossowska-Tomaszczuk et al., 2009).

Клетки гранулезы от клеток текальных оболочек и стромы яичника отделяет базальная мембрана фолликула – сеть внеклеточного матрикса, состоящая и в основном коллагена четвертого типа и ламинина, и стабилизированная сшивками из нидогена (энтактина) (Irving-Rodgers et al., 2009). Базальная мембрана фолликула нарабатывается за счет активности как клеток гранулезы, так и за счет прилежащих к ней клеток *theca interna*. Считается, что базальная мембрана обеспечивает поляризацию, пролиферацию и дифференцировку клеток гранулезы (Amsterdam et al., 1989; Richardson et al., 1992). При дегенерации растущего фолликула базальная мембрана дестабилизируется, что приводит к нарушению структуры гранулезы, а клетки текальной оболочки получают возможность проникать внутрь фолликула.

Текальная оболочка фолликула состоит из двух слоев: *theca interna*, которая обращена к базальной мембране, и *theca externa*, контактирующая со стромой яичника. В антральном фолликуле оба слоя теки образованы несколькими рядами мезенхимных клеток. В настоящее время считается, что примордиальные фолликулы не имеют текальной оболочки, а в окружающей их строме существуют некоторые предшественники текальных клеток. Когда фолликул вступает в рост, клетки гранулезы становятся кубическими и начинают активно секретировать ростовые факторы, в том числе LIF, за счет чего происходит рекрутирование текальных клеток. В результате многослойные фолликулы окружены несколькими слоями текальных клеток, однако на гистологических препаратах нет отличий между внутренней и наружной текальными оболочками. В преантральном фолликуле начинается активная дифференцировка клеток *theca interna*, на них выставляются рецепторы к ЛГ, но синтез андрогенов в них пока отсутствует или он

минимальный. Считается, что эта дифференцировка текальных клеток контролируется клетками гранулезы, которые активно выделяют ростовые факторы. Предполагается, что клетки теки, оказавшиеся в зоне действия этих факторов превращаются в клетки *theca interna*, способные продуцировать андрогены (Young and McNeilly, 2010). Внутренний слой теки обильно пронизан кровеносными капиллярами, отвечает за обменные процессы в фолликуле, а также за синтез андрогенов и прогестерона, а наружный слой содержит гладкомышечные клетки, активность которых регулируется цАМФ и прогестероном. После созревания фолликула и овуляции судьба двух слоев теки различна. Гладкомышечные клетки *theca extern*а участвуют в овуляторных процессах, за счет их сокращения повышается фолликулярное давление в овулирующем фолликуле (Erickson et al., 1985). Клетки *theca interna*, как и клетки гранулезы после овуляции завершают пролиферацию и дифференцируются в клетки желтого тела (рис.3).



**Рисунок 3**. Формирование и функционирование клеток теки во время фолликулогенеза (Young and McNeilly, 2010).

Для анализа состояния фолликула во время роста и созревания необходимо иметь четкое представление, о какой стадии фолликулогенеза идет речь. Однако в настоящее время нет одной принятой классификации стадий развития овариальных фолликулов. Одной из наиболее известных является классификация (рис. 4), основанная на размерах фолликулов и количестве клеток, которые входят в его состав, предложенная Педерсеном и Петерсом более 45 лет назад (Pedersen and Peters, 1968).



Рисунок 4. Стадии фолликулогенеза по Педерсону и Петерсу (Pedersen and Peters, 1968).

Однако данная классификация не учитывает морфологию фолликула, в частности форму клеток и её изменение от стадии к стадии. Классификация Педерсена и Петерса довольно подробная, но на практике её достаточно трудно применять, так как подсчет клеток в составе фолликула невозможно осуществить без приготовления серийных гистологических препаратов.

Существуют менее подробные, но более удобные для применения классификации, также основанные на морфологических характеристиках фолликулов (рис. 5). Например, классификация Эмори (Emori and Sugiura, 2014), которая учитывает размер фолликулов и наличие полостей (антрумов). Вместо восьми основных типов и четырех подтипов классификации Педерсена и Петерса Эмори выделяет только 5 типов фолликулов от примордиального и до овуляторного. Форма клеток в этой классификации также не учитывается, но Эмори упоминает, что клетки гранулезы на периферии фолликула и клетки, окружающие ооцит, различаются между собой, однако это различие функциональное, а не морфологическое.



Также пять типов фолликулов выделяет классификация, описанная в пособии под редакцией Голиченкова В.А. и Семеновой М.Л. (табл. 1), однако различают два типа первичных фолликулов, а не третичных. Преимуществом данной классификации является то, что определительным признаком служит еще и форма клеток в составе фолликула, которая может быть с легкостью определена посредством стереомикроскопа. Переход от примордиальных фолликулов к первичным однослойным связан с изменением формы клеток гранулезы, которые обусловлены перестройкой цитоскелета.

Таблица 1. Стадии	развития фоллику	улов (Голиченко	ов и Семенова.	2004)
-------------------	------------------	-----------------	----------------	-------

Тип фолликула	Компоненты	Внешний вид
Примордиальный	Ооцит I порядка Один слой плоских клеток гранулезы	$\bigcirc$
Первичный однослойный	Ооцит I порядка Один слой кубических клеток гранулезы	

Первичный многослойный	Ооцит I порядка Несколько (2-3) слоев кубических клеток гранулезы Формирующийся слой клеток теки	
Вторичный	Ооцит I порядка Несколько слоев кубических клеток гранулезы, между которыми образуются лакуны Формируются слои и клетки theca interna, и theca externa	
Третичный	Ооцит I или II порядка Клетки гранулезы: corona radiata вокруг ооцита; cumulus oophorus – яйценосный бугорок; клетки теки: theca interna, и theca externa	

Еще один способ разделения фолликулов на группы основывается не только на их морфологии, но и на особенностях роста фолликулов (Edson et al., 2009а). В этой классификации дополнительно учитывается восприимчивость фолликулов к гормонам гипофиза и все морфологические стадии роста фолликулов разделяются на две большие группы: гормононезависимый и гормонозависимый периоды развития (рис.6).



(Edson et al., 2009b).

По классификации Эдсона до появления полостей между клетками гранулезы фолликулы не восприимчивы к стимулирующему действию ФСГ и ЛГ, которые выделяются гипофизом в ответ на выработку ГнРГ гипоталамусом. А фолликул, имеющий локальные межклеточные полости, в этой классификации оценивается как антральный, а не как лакунарный.

В последние годы в связи с увеличением числа клинически исследований процесса фолликулогенеза все чаще используются классификации стадий развития фолликулов, учитывающие морфологические особенности и размерные характеристики фолликулов человека. Одна из классификаций, в которой все процессы были разделены на два периода (гормононезависимый и гормонозависимый) была предложена Гугеоном (Gougeon, 1996) В этой классификации гормононезависимый период разделен на две фазы: вступивший в рост фолликул: увеличивает свой размер за счет пролиферации клеток гранулезы и роста ооцита (1); вторичный фолликул, состоящий из нескольких слоев клеток гранулезы с формирующейся текой, подразделенной на внутреннюю и наружную (2). Более детально данная классификация описывает гормонозависимый период фолликулогенеза, в котором выделяют восемь морфологических классов фолликулов (табл.2).

			Количество
Класс	Название	Размер фолликула (мм)	клеток гранулезы
			(*10^3)
1	Преантральный	0,1-0,2	0,6-3,5
2	Ранний антральный	0,2-0,4	3,5-15
3	Малый антральный	0,4-0,9	15-75
4	Антральный	0,9-2	75-375
5	«Рекрутированный»	2-5	375-1870
6	Ранний доминантный	5-10	1870-9400
7	Ранний преовуляторный	10-16	9400-47000
8	Преовуляторный	16-20	-

Таблица 2. Классификация стадий развития овариальных фолликулов человека (по Gougeon, 1996).

В яичнике человека рост фолликулов с первого по четвертый класс занимает около 70 суток и может протекать в присутствии низких концентраций ФСГ. Начиная со стадии «рекрутированного» фолликула (5 класс) рост фолликула в абсолютной степени зависит от гонадотропинов гипофиза – ФСГ и в меньшей степени ЛГ. В это время происходит выбор претендентов на статус доминантного фолликула (Gougeon, 1996).

Еще одна классификация фолликулов человека используется в работах нескольких научных групп, в связи с чем её можно считать наиболее широко применяемой в последние годы (табл.3).

Таблица 3. Стадии роста фолликулов	(по Edson et al. 2009а	; McNatty et al. 1999)
------------------------------------	------------------------	------------------------

тип фолликула	название стадии роста фолликула	морфологические характеристики клеток гранулезы
тип 1	примордиальный	1 слой плоских клеток
тип 2	первичный	1 слой клеток кубической формы
тип 3	вторичный	2-4 слоя клеток

тип 4	большой преантральный	4-6 слоев клеток
тип 5	антральный	>5 слоев клеток
тип 5+	антральный гонадотропин зависимый	>5 слоев клеток

В данной классификации, учитывающей морфологические характеристики растущих фолликулов, количество слоев клеток в составе фолликулов и чувствительность к гонадотропинам, выделяют 6 типов фолликулов. Только последний тип (5+) является гормонозависимым.

Таким образом, разные исследователи, используя одни и те же термины, имеют в виду разные стадии развития фолликулов. В связи с чем отсутствие единой системы классификации осложняет интерпретацию экспериментальных данных, полученных различными исследовательскими группами.

#### 2.2.2. Гормональная регуляция фолликулогенеза

Эндокринная система принимает непосредственное участие в контроле процессов, происходящих при развитии овариальных фолликулов. Все процессы фолликулогенеза можно разделить на два периода: гормононезависимый и гормонозависимый. До появления мелких полостей в составе фолликуле гонадотропины не влияют на его рост, так как клетки теки и гранулезы в этот период не имеют рецепторов к ЛГ и ФСГ. Наличие этих рецепторов необходимо для перехода фолликула к завершающим фазам фолликулогенеза. Так было показано, что при удалении гипофиза, то есть в отсутствии воздействия ЛГ и ФСГ, в яичнике остаются только небольшие многослойные фолликулы, в то время как фолликулы с антрумами полностью исчезают (Дыбан, Баранов, 1977). На более ранних фазах фолликулогенеза рост фолликулов поддерживается локально вырабатываемыми ростовыми факторами и не зависит от уровня гормонов гипофиза. Схема гормональной регуляции фолликулогенеза представлена на рисунке 7.



В период гормонозависимого роста фолликулы становятся восприимчивыми к действию ЛГ и ФСГ, которые вырабатываются гипофизом в ответ на выработку ГнРГ гипоталамусом. На клетках теки и гранулезы появляются рецепторы к ЛГ и ФСГ, взаимодействие гормонов с рецепторами ведет к активизации работы ферментов, отвечающих за стероидогенез: Star (стероидогенный активный регуляторный протеин), Cyp11a1 (фермент, расщепляющий боковую цепь холестерина), Cyp17a1 (фермент, участвующий в синтезе андрогенов), Cyp19a1 (ароматаза, преобразующая андрогены в эстрогены) (рис.8).



**Рисунок 8.** Схема последовательной активации ферментов, необходимых для стероидогенеза, в клетках теки (Young and McNeilly, 2010).

В результате в клетках теки активируется синтез андрогенов, которые поступают в клетки гранулезы и под действием ароматазы превращаются в эстроген, а позднее в прогестерон (Carlson, 2009). Эстрогены и прогестерон, в свою очередь, поступают в кровь, с током которой разносятся по организму к органам-мишеням, в том числе, оказывают влияние на гипоталамо-гипофизарную систему.

#### 2.2.3. Взаимодействие между компонентами фолликула

Предшественниками ооцитов являются ППК. По мере роста ооцит претерпевает два последовательных мейотических деления. Однако кроме процессов, связанных с редукцией количества хромосом, ооцит также активно участвует в формировании и развитии фолликула. Ооцит выделяет два основных фактора, которые принадлежат к семейству TGF<sub>β</sub>: BMP-15 и GDF-9. Показано, что мутации в генах, кодирующих эти факторы, приводят к снижению фертильности (Emori and Sugiura, 2014). Также было показано, что по мере роста и созревания ооцита экспрессия GDF-9 существенно возрастает (Jackowska et al., 2013). В преантральных фолликулах BMP-15 и GDF-9 стимулируют пролиферацию клеток гранулезы. Это связано с активацией двух основных сигнальных путей TGF<sub>β</sub>: SMAD2/3 и SMAD1/5/8. Установлено, что экспрессия сигнальных белков SMAD различается по мере развития фолликулов. Так, например, в однослойных фолликулах экспрессируются SMAD2/3, в небольших преантральных зарегистрирована экспрессия и SMAD2/3, и SMAD1/5/8, а в крупных фолликулах преимущественно экспрессируется SMAD1/5/8 (Fenwick et al., 2013). На рисунке 9 представлена схема влияния факторов из семейства TGF<sub>β</sub>, выделяемых ооцитом на клетки гранулезы и опосредованное влияние на клетки теки.



**Рисунок 9.** Взаимовлияние факторов семейства ТGF $\beta$ , вырабатываемых различными компонентами фолликула (по Knight & Glister 2006).

ВМР-15 и GDF-9 воздействуют на клетки гранулезы через рецепторы типа I и типа II, причем каждому фактору соответствует только один тип рецептора. GDF-9 связывается с рецептором типа I (BMPRI), в то время, как BMP-15 – через рецептор II типа (BMPRII). GDF-9 повышает уровень экспрессии kit-ligand (KL) в клетках гранулезы, что приводит к повышению эффективности рекрутирования клеток теки из окружающей стромы (Knight and Glister, 2006). Этот механизм лежит в основе перехода от примордиального к первичному фолликулу. KL начинает экспрессироваться в клетках гранулезы примордиального фолликула, оказывает влияние на клетки стромы и ооцит, так как на их поверхности есть рецептор к KL – c-kit. KL стимулирует рост ооцита, но продолжает поддерживать блок мейоза (Parrott & Skinner 1999; Liebenthron et al. 2013). На более поздних стадиях развития фолликула факторы, выделяемые ооцитом, совместно с ФСГ регулируют переход от преантрального к антральному фолликулу. При этом ФСГ влияет на клетки гранулезы, стимулируя ИХ к дифференцировке В сторону эстрогенсинтезирующих клеток, а BMP-15 и GDF-9 оказывают влияние на клетки фолликула, окружающие ооцит, вызывая их дифференцировку в клетки кумулюса (Emori and Sugiura, 2014). Также факторы из семейства TGF<sup>β</sup> оказывают влияние на синтез гормонов клетками гранулезы, то есть тоже фактически воздействуют на их дифференцировку. Сигнальные молекулы группы ВМР снижают уровень ФСГиндуцированного синтеза прогестерона, играя роль ингибиторов лютеинизации (Nakamura et al., 2013). Помимо влияния, оказываемого на клетки гранулезы, было показано, что в культуре in vitro BMP-15 и GDF-9 также оказывают влияние на сам ооцит, способствуя его созреванию (Hussein et al., 2006). Считается, что эти факторы принимают непосредственное участие в определении доминантного фолликула. Показано, что в фолликулах, которые впоследствии будут подвергаться атрезии, уровень экспрессии мРНК рецепторов к ВМР I и II типа (ВМРР2 и ВМРР1В) выше, чем в фолликуле, который станет доминантным (Gasperin et al., 2014). Таким образом, GDF-9 и BMP-15 участвуют в процессах фолликулогенеза от начала формирования и роста примордиального фолликула до овуляции.

Кроме ростовых факторов из семейства TGFβ ооцит также выделяет различные факторы из семейства FGF. Так, например, FGF2, вырабатываемый ооцитами в составе примордиальных фолликулов, влияет на клетки гранулезы и активирует начало роста фолликулов (Bonnet et al., 2013). В растущих фолликулах FGF2 предотвращает развитие апоптоза в фолликулярных клетках и способствует росту ооцита (Santos et al., 2014). В то время, другой фактор данного семейства - FGF-9 снижает активность Cyp11a1 – фермента,

расщепляющего боковую цепь холестерина, в клетках гранулезы. Данный фермент необходим на начальных этапах стероидогенеза, так как контролирует превращение холестерина в прегненолон – предшественник всех остальных стероидных гормонов, в том числе и эстрогенов (Schreiber and Spicer, 2012). FGF-10 стимулирует переход фолликулов в фазу активного роста, а в культуре *in vitro* способствует выживанию и сохранению морфологии фолликулов (Almeida et al., 2015; Chaves et al., 2010). FGF-18 является проапоптотическим фактором, он активирует каспазу-3, что приводит к гибели клеток гранулезы (Portela et al., 2015). Из выше описанных экспериментальных данных следует, что регуляция процессов фолликулогенеза является тонкой сбалансированной системой, в которой каждый фактор играет свою роль и должен находиться в равновесии со многими другими факторами.

Известно, что клетки гранулезы происходят из целомического эпителия (Carlson, 2009). Считается, что во время роста фолликула под воздействием факторов, выделяемых ооцитом, в однородной популяции клеток гранулезы выделяется два типа клеток: клетки кумулюса, окружающие ооцит, и клетки гранулезы, занимающие периферическое положение в фолликуле (McNatty et al., 1979). Однако фолликулярные клетки способны не только воспринимать воздействие со стороны ооцита, но и выделять факторы, оказывающие влияние как на клетки теки и ооцит, так и оказывать аутокринное воздействие на соседние фолликулярные клетки. Показано, что клетки гранулезы не только выделяют факторы из семейства TGF<sub>β</sub>: BMP-2,5,6, AMГ, ингибин, активин, но и имеют рецепторы к ним. Так ВМР-2, выделяемый фолликулярными клетками, оказывает влияние на уровень синтеза эстрадиола, а также на уровень синтеза антимюллеровского гормона (АМГ) клетками гранулезы, который в свою очередь модулирует количество рецепторов к  $\Phi$ СГ на тех же клетках (Ogura-Nose et al., 2012; Selvaraju et al., 2013). BMP-2 и ВМР-6 стимулируют пролиферацию клеток теки и одновременно снижают уровень синтеза прогестерона и андростенедиона. Было высказано предположение, согласно которому у полиовулирующих видов данные факторы препятствуют ранней лютеинизации наиболее быстро развивающихся фолликулов, обеспечивая множественную одновременную овуляцию (Brankin et al., 2005). Ингибин совместно с ФСГ стимулирует активизацию фермента Cyp17a1 в клетках теки, что приводит к повышению уровня синтеза андрогенов – сырья для синтеза эстрогенов клетками гранулезы (Hoang et al., 2013). В свою очередь, активин подавляет стероидогенез в клетках теки (Young et al., 2012). Таким образом, факторы семейства ТGF<sup>β</sup>, выделяемые клетками гранулезы, являются важными участниками процессов фолликулогенеза, начиная от инициации формирования примордиального фолликула и повышения компетенции ооцита к развитию, заканчивая контролем над формированием желтого тела после овуляции (Knight et al., 2012).

В последние годы несколькими группами исследователей была зарегистрирована экспрессия факторов из семейства WNT в клетках гранулезы. Было обнаружено, что уровень WNT-4 влияет на активность ферментов, отвечающих за стероидогенез: Cyp11a1, Cyp19a1 (ароматаза) и Star (регуляторный белок стероидогенеза), а также на синтез прогестерона. В клетках гранулезы также экспрессируется другой представитель этого семейства - WNT-2. При культивировании фолликулов *in vitro* он стимулирует пролиферацию клеток, однако его роль при фолликулогенезе *in vivo* однозначно не определена (Boyer et al., 2010). На поздних этапах фолликулогенеза факторы WNT семейства принимают участие в определении доминантного фолликула, в частности оказывают влияние на ФСГ-индуцированное повышение синтеза эстрогена и пролиферацию клеток гранулезы. Было показано, что добавление ингибиторов WNTсигнального пути нивелировало эффекты, вызванные ФСГ (Gupta et al., 2014), а ФСГ, в свою очередь, оказывает влияние на уровень экспрессии мРНК участников сигнального пути WNT в клетках гранулезы, в частности WNT-2 и β-катенина (Castañon et al., 2012).

Инсулиноподобные факторы роста (IGF) также играют одну из ключевых ролей в передаче сигнала пролиферации и дифференцировки клеток теки и гранулезы от гипоталамо-гипофизарной системы. При этом мРНК IGF-I выявлена и в клетках гранулезы, и в клетках теки. В условиях *in vivo* IGF-II был обнаружен только в клетках теки, однако при культивировании фолликулов *in vitro* некоторый уровень его мРНК был зарегистрирован и в клетках гранулезы (Armstrong et al., 2000). Недавно было показано, что в условиях *in vitro* IGF-I активирует уровень экспрессии рецепторов к ЛГ, синтез эстрадиола, прогестерона в мелких и крупных фолликулах, а также синтез андростенедиона в крупных фолликулах (Rawan et al., 2015).

Считается, что клетки теки рекрутируются из стромальных клеток яичника под воздействием индуцирующих сигналов ооцита и клеток гранулезы. По мере дифференцировки данные клетки также начинают выделять факторы, поддерживающие функционирование растущего фолликула. Было показано, что клетки теки наряду с клетками гранулезы являются источником факторов роста, принадлежащих к различным семействам: IGF, TGFβ, FGF и EGF, а также клетки теки несут рецепторы к факторам роста из указанных семейств, что свидетельствует не только о паракринном, но и об

аутокринном влиянии этих факторов (Воробьева, 1989). Фактор ангиогенеза из семейства VEGF экспрессируется в клетках теки и гранулезы и оказывает влияние на формирование сосудов в текальной оболочке фолликула. В клетках теки также обнаруживается экспрессия bFGF, данный фактор стимулирует рост клеток теки и стромы яичника (Young and McNeilly, 2010). Также данный фактор индуцирует развитие примордиальных фолликулов, и переход к первичным фолликулам. Экспрессия рецепторы разных типов к FGF показана в ооцитах на всех стадиях роста фолликулов, в клетках гранулезы и в клетках стромы (Ben-Haroush et al., 2005). Синтез BMP-4 и BMP-7 был обнаружен в клетках стромы и в дифференцирующихся клетках теки. Было показано, что данные факторы оказывают стимулирующее воздействие на первичные фолликулы, а также в целом на рост фолликулов, но BMP-7 замедляет дифференцировку клеток теки, в результате чего снижается уровень синтеза андрогенов (Young and McNeilly, 2010).

Таким образом, контроль фолликулогенеза осуществляют как клетки, которые входят в состав фолликула, так и клетки стромы яичника. Изучению взаимодействия между компонентами фолликула посвящено большое количество работ, по этой тематике регулярно публикуются обзорные статьи (Orisaka et al., 2009; Skinner, 2005). Сложность системы контроля фолликулогенеза не дает возможности выделить один или несколько основных факторов-регуляторов роста и созревания фолликула. Многие факторы оказывают синергическое действие друг на друга, многие являются антагонистами друг друга. Фолликулогенез – тонкий процесс с большим количеством стимулирующих и ингибирующих связей, контролируемый факторами роста и эндокринной системой.

# 2.3. Экспериментальные подходы к изучению фолликулогенеза млекопитающих

Проблема первичного женского бесплодия, а также вторичного бесплодия, связанного с перенесенными заболеваниями репродуктивной системы (эндометриоз, поликистоз и т.д.), онкологическими заболеваниями, становится все более актуальной, как в России, так и за рубежом. В работе отечественных ученых (Адамян и соавт., 2009) было показано, что у женщин, страдающих эндометриозом, количество фолликулов, как примордиальных, так и растущих первичных и вторичных, снижено. Вместе со снижением количества фолликулов происходит и нарушение их морфологии: изменение формы клеток, размытость границ фолликула и ооцита, деконденсация хроматина, утолщение базальной мембраны, вакуолизация цитоплазмы ооцита. При синдроме поликистозных яичников происходит увеличение количества фолликулов на стадии созревания и атретических фолликулов в 2–5 раз. Однако терминальные стадии фолликулогенеза не наступают и в яичнике отсутствуют белые и желтые тела (Захарова, Дворянский, 2010). Химиотерапевтические агенты, применяющиеся при терапии опухолевых заболеваний, оказывают повреждающее воздействие на яичник, в частности, на примордиальные фолликулы, которые оказываются более чувствительными. Гибель примордиальных фолликулов ведет к нарушению функции яичника и бесплодию (Plowchalk and Mattison, 1992). Наблюдаемое во всех этих случаях снижение фолликулярного резерва невозможно восстановить за счет существующих терапевтических методов лечения. Поэтому появляется необходимость разработки новых технологий сохранения фертильности женщин репродуктивного возраста.

#### 2.3.1. Способы сохранения фертильности

Существует несколько подходов к сохранению фертильности женщин. Их можно разделить на две группы: трансплантация криоконсервированной/декриоконсервированной ткани (1); культивирование овариальной ткани и единичных фолликулов (2) с целью получения ооцитов, компетентных к оплодотворению и дальнейшему развитию.

Трансплантация ов<u>ариальной ткани</u> – активно развиваемое направление исследований. Предполагается, что данный технологический подход можно будет использовать при преждевременном наступлении менопаузы у молодых женщин, при овариоэктомии, проведенной по медицинским показаниям, а также для восстановления фертильности после радио- и химиотерапии. При проведении этой процедуры может быть осуществлена как ауто-, так и аллотрансплантация. В отдельных работах предлагается трансплантировать овариальную ткань человека иммунодефицитным животным (мышам) для того, чтобы получить зрелые ооциты, а в дальнейшем провести процедуру искусственного оплодотворения (Dolmans et al., 2007). Данный способ сопряжен с рядом трудностей, связанных в том числе и с разной продолжительностью гормонозависимого периода фолликулогенеза у человека и мышей. Но самой значимой является перспектива внедрения данного протокола в клиническую практику, так как требуются дополнительные исследования и меры предосторожности, чтобы не произошло заражение тканей человека патогенами животного.

Наиболее приемлемым и уже применяемым в клинической практике подходом в настоящее время является аутотрансплантация овариальной ткани. Такая трансплантация может быть как эктопической, так и ортопической.

При эктопической трансплантации на руке пациента на 5-10 см ниже локтевой ямки делают надрез длиной 1,5 см. Между фасцией и подкожной жировой клетчаткой формируют карман, так как данная область является васкуляризированной, и овариальная ткань будет обеспечиваться кровью в достаточном объеме. В карман помещают заранее подготовленную ткань, нанизанную на иглу с шовным материалом. Чтобы не было перемещения трансплантата, с одного конца его закрепляют на стенке кармана. Далее карман зашивают. Показано, что уже через 7 суток наступает реваскуляризация трансплантированной ткани. Пациентке в это время дают аспирин для снижения свертываемости крови и делают инъекции ФСГ для поддержки пула фолликулов в трансплантате. Такой трансплантат может существовать несколько месяцев, в нем активно идут процессы фолликулогенеза, у пациентки повышается уровень стероидных гормонов в плазме крови, однако созревание фолликула при эктопической трансплантации получить не удалось. (Oktay et al., 2003).

Второй вариант – ортопическая трансплантация, когда фрагмент кортикальной ткани яичника пересаживают непосредственно в яичник пациентки. Как правило, у такой пациентки овариальные фолликулы атрофированы после химиотерапевтического и радиобиологического лечения, либо в силу других причин. Протокол такой трансплантации достаточно сложен. Для этого проводят две лапароскопические операции, первую за 7 дней до трансплантации для того, чтобы сделать отверстие в брюшине сразу под воротами яичника и вызвать реваскуляризацию данной области. Вторую операцию 8 первой, полученное делают на сутки после В ранее окно вводят декриоконсервированную ткань (Donnez et al., 2006). Было показано, что после трансплантации ткани у пациентки происходило восстановление менструального цикла (Silber et al., 2008), а также зарегистрированы случаи наступления беременности и рождения ребенка (Donnez et al., 2004; Isachenko et al., 2012a; Revelli et al., 2013). При этом беременность наступает в естественном цикле, не требуется проведение вспомогательных процедур, равно как и использование техники ЭКО или ICSI. Очевидно, что ортопическая трансплантация является более предпочтительной, так как не требует дополнительных манипуляций с созревшими ооцитами, однако в то же время труднее проводить контроль развития фолликулов, чем в случае эктопической трансплантации.

<u>Культивирование на хориоалантоисной мембране</u> занимает промежуточное положение между культурой *in vitro* и трансплантацией в организм реципиента. Культивирование на хориоалантоисной мембране (ХАМ) используют, например, при изучении ангиогенеза в опухолях и при изучении ответа ткани маточного эндометрия на

гормональную стимуляцию. К образцу трансплантированной ткани быстро подрастают сосуды, а из-за отсутствия иммунной реактивности куриного эмбриона до семнадцатых суток не происходит отторжение трансплантата. Кроме того ХАМ является удобной моделью для изучения роли широкого спектра факторов: про- и антиангиогенных факторов, антиоксидантов, цитокинов, ростовых факторов и гормонов (Nap et al., 2005). Внеклеточный матрикс ХАМ по своему составу похож на внеклеточный матрикс брюшины, на которую иногда пересаживают овариальную ткань при ксенотрансплантациях и ортопических аутотрансплантациях (Martinez-Madrid et al., 2009).

В экспериментальных работах, посвященных культивированию фрагментов овариальной ткани на ХАМ, пересадку ткани проводили согласно следующему протоколу: оплодотворенные куриные яйца инкубировали 3 суток при 37°С и 60% влажности и ежечасном переворачивании. На третий день инкубации в скорлупе делали окно (1x1,5 см). Часть белка удаляли, отверстие покрывали пленкой, чтобы предотвратить высыхание. После описанных манипуляций яйца убирали обратно в инкубатор. На десятые сутки инкубации кусочки кортикального слоя овариальной ткани размером 1 мм<sup>3</sup> подсаживали на ХАМ. Подсадку проводили как на ХАМ с локально нарушенным эпителиальным слоем, базальный слой при этом оставался нетронутым, так и под ХАМ через маленькое отверстие. После подсадки ткани яйца инкубировали в течение 5 суток. В результате проведенных исследований было показано, что преантральные фолликулы были жизнеспособны и с нормальной морфологией, в то время как антральные фолликулы погибали (Isachenko et al., 2012b). Наилучшие результаты были получены при культивировании кортикального слоя с фрагментами медуллы. В этих образцах был зарегистрирован неоангиогенез (Isachenko et al., 2013).

<u>Культивирование in vitro</u>овариальной ткани и/или единичных фолликулов представляется наиболее перспективным направлением исследований. Все описанные выше методы восстановления фертильности сопряжены с определенными трудностями: проблема ксенотрансплантации и последующего использования материала после культивирования при культивировании на ХАМ, дополнительная гормональная стимуляция при аутотрансплантации как эктопической, так и ортопической, что не всегда может быть показано пациентке, а также небольшое количество фолликулов, созревающих после трансплантации. Применение технологии получения зрелых ооцитов в культуре *in vitro* позволит избавить пациенток от лапароскопических хирургических процедур и длительной гормональной стимуляции роста и созревания фолликулов. Кроме того пациенткам трансплантируется криоконсервированная ткань, как правило, после нескольких лет низкотемпературного хранения, и жизнеспособность фолликулов в такой ткани чаще всего существенно снижена. В связи с этим культивирование овариальной ткани *in vitro* является одним из перспективных направлений, так как может обеспечить высокий выход ооцитов, компетентных к оплодотворению.

Первые эксперименты по культивированию овариальной ткани и отдельных фолликулов млекопитающих *in vitro* начали проводить еще во второй половине 20 века. Объектами ранних работ были фолликулы и овариальная ткань коров, лошадей, свиней, кроликов, крыс, мышей. Культивирование проводили в различных условиях, использовали среды разного состава. Ниже перечислены основные системы, разработанные для культивирования *in vitro* единичных фолликулов и овариальной ткани.

#### 2.3.2. Культивирование в 2D условиях

2D система является наиболее простым способом культивирования фрагментов ткани, отдельных фолликулов и клеток. Этот методический подход не подразумевает сохранения структуры фрагментов ткани, органных эксплантатов, а также клеточных агрегатов во время культивирования. Для проведения исследований с использованием этой модельной системы клетки или ткани высаживают непосредственно на поверхность стекол, чашек Петри, культуральных планшетов. В работе Корнелии Чаннинг (Channing, 1969) были проведены эксперименты по культивированию клеток гранулезы, теки и стромы на стеклах. Было показано, что клетки гранулезы, выделенные из мелких овариальных фолликулов лошади, при культивировании на стеклах быстро формировали монослой, клетки приобретали фибробластоподобный фенотип. Клетки гранулезы, выделенные из крупных фолликулов, также образовывали колонии и впоследствии формировали монослой, сохраняя при этом эпителиоподобный фенотип. Помимо морфологических различий было обнаружено, что клетки из крупных фолликулов синтезируют прогестерон, в то время как в клетках из мелких фолликулов этот синтез отсутствовал. Для всех фолликулярных клеток была характерна гиперплазия и гипертрофия при культивировании, а также возникали изменения в цитоплазме (появление вакуолей и т.д.), что вместе с продолжением синтеза прогестерона свидетельствовало о лютеинизации клеток гранулезы.

Большая часть пионерских работ в данной области была посвящена изучению стероидогенеза *in vitro*. В исследованиях Макриса и Райяна (Makris and Ryan, 1975), было проведено сравнение стероидогенной активности изолированных клеток теки и гранулезы, а также клеток теки и гранулезы при совместном культивировании. Было

показано, что в условиях *in vitro* (культивирование на чашках Петри в течение 24 часов и 6 суток) клетки способны продуцировать эстрон,  $17\beta$ -эстрадиол, андростенедион, тестостерон и прогестерон. Но при культивировании в течение 6 суток были зарегистрированы признаки лютеинизации клеток гранулезы, описанные ранее в работах Чаннинг (Channing and Grieves, 1969; Channing, 1969). 2D культура является удобной моделью для изучения влияния различных факторов и гормонов на синтез стероидов клетками фолликула. Например, в работе МакНати и соавторов было проанализировано влияние эстрадиола и простагландина F2 $\alpha$  на синтез прогестерона клетками гранулезы человека. Было показано, что простагландин снижает уровень синтеза прогестерона, не снижая жизнеспособности клеток, в то время как эстрадиол наоборот повышал уровень синтеза прогестерона. Таким образом, было выяснено, что простагландин F2 $\alpha$  является лютеолитическим агентом (McNatty et al., 1975) и эти данные до сих пор цитируются в научной литературе.

В работах Эппига, выполненных более сорока лет назад, описано развитие ооцита мыши *in vitro* при культивировании в различных 2D системах. В этих исследованиях проводили культивирование ооцитов, выделенных из яичника 8-ми дневных мышат, сокультивирование ооцитов и клеток яичника, отдельных фолликулов, а также фрагментов яичника. При культивировании ооцитов как индивидуально, так и при сокультивировании с клетками стромы яичника наблюдали гибель ооцитов, а добавление в среду гормонов не приводило к повышению их выживаемости. Культивирование изолированных фолликулов дало наилучшие результаты, однако в этом случае наблюдалось выселение фолликулярных клеток. Для того чтобы сохранить контакт между клетками гранулезы и ооцитом исследователи ссаживали вместе несколько фолликулов и культивировали их в виде общего агломерата. Было показано, что окончанию периода культивирования ооциты несколько увеличивался в размерах, но при потере контакта ооцита с клетками гранулезы всегда происходила их дегенерация. Различий между культивированием в среде с добавлением гормонов и без гормонов в ходе этих исследований не обнаружили. Возможно, это связано с тем, что первичные фолликулы, выделенные из яичников неполовозрелых мышат, находились в гормононезависимом периоде фолликулогенеза. При культивировании фрагментов яичника в среде с добавлением гормонов происходило увеличение количества клеток гранулезы, окружающих ооцит, однако не происходило формирование полноценной теки, а также антральной полости фолликула. При таком культивировании наблюдали увеличение размеров ооцитов, но их созревание не наступало (Eppig, 1977).

В последнее время в 2D условиях культивируют преимущественно фрагменты кортикального слоя яичника. Большая часть подобных работ посвящена изучению влияния ростовых факторов на рост фолликулов. В частности, при культивировании кортикального слоя яичника кошек в 24-луночных культуральных планшетах было показано, что добавление в среду для культивирования EGF повышает выживаемость примордиальных фолликулов в эксплантате (Fujihara et al., 2014). В эксперименте, поставленном группой бразильских ученых, было проведено кратковременное культивирование в 24-луночных планшетах фрагментов кортикального слоя яичника обезьяны капуцина в присутствии β-меркаптоэтанола, ВМР-4 и гонадотропина сыворотки жеребой кобылы. Было казано, что факторы не влияют на активизацию примордиальных фолликулов к росту, но оказывают стимулирующее влияние на рост вторичных фолликулов в культуре in vitro (Brito et al., 2013). В исследовании, проведенном Магалес-Падилом и соавторами, для изучения влияния ФСГ и IGF-I на жизнеспособность и развитие преантральных фолликулов козы использовали долговременное (в течение 16-ти суток) 2D культивирование в 24-луночных планшетах фрагментов кортикального слоя яичника (Magalhães-Padilha et al., 2012). В данной работе было показано, что добавление в среду IGF-I и ФСГ приводит к увеличению диаметров фолликулов и ооцитов, а также к возрастанию количества вторичных фолликулов в кортикальной ткани.

Более поздние работы были посвящены культивированию изолированных фолликулов. Чаще всего фолликулы выделяют либо механическим способом с помощью двух острых металлических стерильных игл, либо химическим способом, ферментативно разрушая окружающие фолликул ткани. Так была показана положительная динамика роста преантральных фолликулов коров при культивировании в 96-луночных планшетах в среде с добавлением EGF, IGF, ФСГ (Gutierrez et al., 2000). Фолликулы выделяли механическим методом, в исследование попадали только фолликулы с неповрежденной базальной мембраной, окруженной клетками теки. В ряде работ используют также комбинированный метод, сочетающий механическое и ферментативное выделение фолликулов. Суть данного метода заключается в предварительной обработке овариальной ткани коллагеназой и последующим механическим выделением фолликулов с помощью острых металлических игл (Dong et al., 2014). Другой комбинированный метод подразумевает предварительное протирание овариальной ткани последовательно через две сетки с различным размером ячеи (500 мкм и 100 мкм), чтобы повысить выход фолликулов материал, оставшийся на 100 мкм сетке подвергали обработке коллагеназой (Figueiredo et al., 1993).

Таким образом, культивирование *in vitro* овариальных фолликулов и фрагментов кортикального слоя яичника в 2D условиях может быть использовано в качестве удобной тест-системы при изучении механизмов действия тех или иных факторов роста и гормонов на процессы фолликулогенеза.

#### 2.3.3. Культивирование в 3D условиях

В последнее время культивирование в 2D условиях становится все менее популярным. Если же данные условия реализуются, то исследователи стремятся максимально сократить площадь поверхности, на которой находится фолликул. От чашек Петри и 24-х луночных планшетов переходят к 96-ти луночным планшетам (Zhang et al., 2013) и системам с использованием мембранных вставок в планшеты (Abdel-Ghani et al., 2014). Однако наиболее популярным становится культивирование в 3D системах. Для реализации данных условий используют инкапсулирование овариальных фолликулов в гидрогели.

Инкапсулирование клеток, фрагментов органов и тканей в гидрогели разного состава и жесткости является одним из способов создания 3D условий. Первые попытки подобного культивирования были сделаны в 70-х годах 20 века. Чэллонер проводила изучение активации фолликулов в отсутствии гонадотропных гормонов (Challoner, 1975). Яичники новорожденного золотого хомячка разрезали пополам, половины помещали в блоки из 2% агар-агара, которые, затем переносили в чашки Петри и заливали средой. В этих исследованиях было показано, что отсутствие гонадотропинов в среде приводило к нарушению развития фолликулов, снижалась скорость их роста, и почти полностью прекращалось рекрутирование клеток теки по сравнению с развитием аналогичных фолликулов *in vivo*. Добавление в среду ЛГ и ФСГ улучшало процессы роста и развития фолликулов, но полной компенсации (в сравнении с развитием *in vivo*) не происходило.

В последние годы в таких экспериментах все чаще используют гидрогели на основе растительных полисахаридов. Так наиболее популярным методом является инкапсулирование фолликулов в альгинатные гидрогели. Данная технология была предложена Ксу и соавторами и в их работах она описана наиболее детально (Xu et al., 2006а, 2006b). Суть данной методики состоит в том, что фолликулы помещают в растворы альгината различной концентрации, затем капли с фолликулами полимеризируют в растворе хлорида кальция, а затем культивируют. Полимеризация в гидрогель предотвращает расселение клеток фолликула и способствует сохранению его трехмерной организации. При использовании данной системы было показано, что мелкие

преантральные фолликулы в условиях *in vitro* способны к росту (Amorim et al., 2009). Данная система также успешно используется при исследовании влияния факторов роста и гормонов на процессы фолликулогенеза in vitro, так, например, в работе Хэйсе и соавторов исследовали влияние ФСГ на рост преантральных фолликулов ювенильных крыс. В присутствии гормона как в растворе альгината, так и в среде для культивирования фолликулы увеличивались в диаметре до 20% по сравнению с контрольной группой (Heise et al., 2005). В раствор альгината до его полимеризации могут быть добавлены различные компоненты, оказывающие влияние на фолликулы, например, молекулы, которые входят в состав внеклеточного матрикса (коллаген I и II типа, ламинин, фибронектин). Эти компоненты оказывают влияние на соматические клетки в составе фолликула, стимулируя их пролиферацию и дифференцировку (Kreeger et al., 2006). Помимо альгинатных гидрогелей также применяют гидрогели на основе полиэтиленгликоля для культивирования преантральных фолликулов (Ahn et al., 2014). Авторы предлагают использовать полиэтиленгликоль для анализа влияния жесткости гидрогеля, создающего трехмерные условия культивирования, на рост фолликулов *in vitro*. В данном исследовании было показано, что жесткость субстрата не только влияет на темпы роста, но и регулирует созревание ооцита.

В последние годы большое внимание в работах, посвященных культивированию фолликулов *in vitro*, уделяется подбору оптимальных условий и оптимального состава сред. В экспериментах, поставленных разными исследовательскими группами, состав сред для культивирования существенно различается (табл.4). Разные авторы используют среды, различающиеся по процентному содержанию сыворотки, добавляемым ростовым факторам, наличию или отсутствию гормонов.

**Таблица 4.** Составы сред, используемых при культивировании овариальных фолликулов *in vitro*.

Объект культивирования	Состав среды	Ссылка на авторов
		исследования
Вторичные фолликулы	αMEM, 1% FCS	(Jin et al., 2010)
мыши		
Вторичные фолликулы	αМЕМ, БСА, ФСГ, фетуин,	(Hirshfeld-Cytron et al., 2011)
мыши (150-163 мкм)	ИТС	
Фолликулы мыши (150 мкм)	αMEM, NAHCO3,	(Nayudu and Osborn, 1992)
с сохраненным слоем теки и	пенициллин, стрептомицин,	

стромальными клетками	5% сыворотка крови мыши,	
вокруг фолликула	инсулин, трансферрин, IGF-	
	1, глутамин, ФСГ	
Примордиальные/первичные	МЕМ, 10% FBS, пируват,	(Camboni et al., 2013)
фолликулы человека	пенициллин, стрептомицин,	
	ИТС	
Ранние вторичные	α-MEM, 5% FBS, ИТС,	(Sánchez et al., 2012)
фолликулы 13-ти дневных	ФСГ, ЛГ	
мышат		
Вторичные фолликулы	αМЕМ, рекомбинантный	(Campbell et al., 2013)
мыши	человеческий ФСГ,	
	аскорбиновая кислота, 5%	
	сыворотки, выделенной из	
	крови взрослых мышей	
	самок F1	
Преантральные фолликулы	Среда МсСоу 5а с	(Gutierrez et al., 2000)
коровы	бикарбонатом, содержащим	
	20 мМ Hepes, пенициллин,	
	стрептомицин, L-глутамин,	
	0,1% БСА, андростенедион,	
	2,5 мкг/мл трансферрина и 4	
	нг/мл селена.	

Использование 3D систем культивирования позволяет создавать *in vitro* условия, близкие к условиям *in vivo*, что, в свою очередь, должно способствовать повышению эффективности культивирования овариальных фолликулов и ооцит-кумулюсных комплексов. Помимо развития способов культивирования *in vitro* фолликулов, ооциткумулюсных комплексов и эмбрионов в настоящее время активно разрабатывают технологии манипулирования с указанными объектами, например, на основе лазеров различного типа.

#### 2.4. Лазерная микрохирургия клеток, ооцитов и эмбрионов

Возможность использования лазерных технологий в клеточной биологии и биологии развития была показана еще несколько десятилетий назад (Daniel and Takahashi, 1965). Первые эксперименты в этой области были поставлены на преимплантационных
эмбрионах млекопитающих (Daniel and Takahashi, 1965). В настоящее время лазерные технологии широко применяются в изучении развития млекопитающих, а также в клинической практике. Так, их используют для разрушения *zona pellucida* ооцитов, которое предшествует введению сперматозоида в цитоплазму (Schopper et al., 1999), для осуществления вспомогательного хэтчинга (Bider et al., 1997) и для проведения биопсии трофэктодермы (Kokkali et al., 2007; Boada et al., 1998). Сходные лазер опосредованные манипуляции осуществляли при пересадке ядер (Chen et al., 2004) и введении эмбриональных стволовых клеток в мышиный эмбрион на стадии восьми клеток (Poueymirou et al., 2007). В последние годы технология лазерного скальпеля, разработанная в основном на эмбриональных объектах, находят все большее применение в клеточной биологии.

## 2.4.1. Мембранная хирургия

В настоящее время активно развивается такое направление, как лазерная нанохирургия. Так, примером применения этой технологии могут служить опыты Kohli et al., в ходе которых фемтосекундным лазером наносили надрезы по коротким и длинным осям клетки (рис.10). Было показано, что как во время, так и после операции клетки сохраняли морфологическую целостность без каких-либо признаков гибели. Лазерную микрохирургию можно применять для отделения внеклеточного матрикса, а, следовательно, для выделения отдельных клеток (Kohli et al., 2005).



**Рисунок 10.** Микронадрезы на мембране клетки, сделанные с помощью фемтосекундного лазера (Kohli et al., 2005); светящаяся точка на снимках – сфокусированный лазерный пучок.

Лазерную хирургию использовали для изучения морфогенеза у беспозвоночных (плоские черви) (Samoiloff, 1973), а также для исследования регенерации нейронов после аксотомии (Yanic et al., 2006). При изучении регенерации использовали титан-сапфировый фемтосекундный лазер, причем перерезку аксонов проводили непосредственно в

организме подопытного животного, C. elegans, при энергии импульса от 10 до 40 нДж, а лазерный пучок фокусировали на объекте через масляный иммерсионный объектив с высокой числовой апертурой.

Во всех этих работах показана высокая выживаемость клеток и эмбрионов после лазерных микрохирургических процедур, хотя их и подвергали достаточно сильному энергетическому воздействию.

# 2.4.2. Фотопорация и трансфекция

При работе на эмбрионах *Danio rerio* фемтосекундные лазерные импульсы применялись для быстрого прободения бластомера с целью осуществления адресной доставки флуоресцентных зондов, в том числе квантовых точек (Q-dots) и доставки плазмидной ДНК (Kohli et al., 2007). Сфокусированный на поверхности бластомера лазерный луч проходит через оболочки эмбриона, не повреждая их фатально, так как зона лазерного прокола минимальна. (Puc.11).



**Рисунок 11.** Лазерная хирургия на живых эмбрионах *Danio rerio* (Kohli et al., 2007): лазерный луч пронзает хорион и фокусируется на границе бластомеров и желтка.

Группа шотландских ученых несколько лет назад провела эксперименты по трансфекции соматических клеток млекопитающих, а точнее клеток яичника китайского хомячка в культуре *in vitro* (Stevenson D. et al., 2006). Для фотопорации мембраны они использовали лазерный пучок, сфокусированный через объектив инвертированного микроскопа с высокой числовой апертурой на мембране клетки. В этой работе использовали фемтосекундный титан-сапфировый лазер с длиной волны излучения 800нм. Через пору, образовавшуюся в результате манипуляций, в клетку проникает чужеродная ДНК.

Д.Стивенсон с соавторами в монослойную культуру клеток яичника хомячка добавляли генетическую конструкцию, содержащую ген зеленого флуоресцентного белка (pEGFP). Клетки облучали лазером от 10 до 250 мс при мощности от 50 до 225 мВт, дважды обмывали средой для культивирования и возвращали чашку в инкубатор. Через 48 часов после процедуры фотопорации с помощью флуоресцентного микроскопа выявляли экспрессию GFP. Эффективность трансфекции рассчитывали путем деления количества клеток, в которых наблюдали экспрессию GFP через 48 часов после облученных клеток в нулевой момент времени. Всего трансфицированными оказались 36 – 50% клеток и морфология всех клеток, экспрессирующих GFP, соответствовала норме.

Помимо прочего в ходе эксперимента оценивали также и выживаемость клеток. По немедленной реакции клетки на воздействие можно сделать вывод об исходе эксперимента. Так, если после выстрела объем клетки быстро и значительно увеличивался, если полученное отверстие было слишком большим или если наблюдали появление вздутий на мембране или грануляцию, то клетка была обречена на гибель. Для доказательства того, что фотопорация действительно происходит под действием лазера, операцию проводили в растворе, содержащем 0,1% трипанового голубого. После процедуры краситель входил в клетку через полученное отверстие. (Рис. 12) (Stevenson D. et al., 2006).



**Рисунок 12.** Оценка жизнеспособности клеток при проведении фотопорации (Stevenson et al., 2006): (a) СНО клетки, подвергающиеся фотопорации в присутствии красителя трипанового голубого; (b) СНО клетки через 30 секунд после процедуры. Стрелками показана единственная клетка, поврежденная в результате лазерного воздействия.

# 2.5. Оптический пинцет.

Манипуляции с одиночной клеткой имеют огромное значение в различных областях биологии и медицины, таких как эмбриология, микробиология, биология стволовых клеток, тканевая инженерия, регенеративная медицина. Для этих целей были

разработаны различные приборы и технологии, важное место среди которых занимает оптический пинцет. Впервые технологию оптической ловушки продемонстрировал Ашкин А. (Ashkin A.) в 1970 году применительно к микроскопическим диэлектрическим частицам (Liang et al., 1996). А. Ашкин также был первым, кто показал возможность использования подобных ловушек для биологических объектов (Ashkin, 1992, 1997). Впоследствии оптический пинцет использовали для молекулярных и клеточных исследований. Так с его помощью изучали различные белки: моторные белки (кинезины, динеины), белки жгутиков, а, кроме того, изменение конформации белка, белок-белковые взаимодействия и ДНК-белковые взаимодействия (цит. по Zhang and Liu, 2008).

# 2.5.1. Принципы работы оптического пинцета

Оптический пинцет использует сфокусированный лазерный пучок для захвата микроскопических нейтрально-заряженных объектов, таких как маленькие диэлектрические сферические частицы, которые взаимодействуют с электрическим полем, созданным световой волной, за счёт индуцированного на сфере дипольного момента. В результате взаимодействия этого диполя с электрическим полем электромагнитной волны, объект перемещается вдоль градиента электрического поля. Кроме градиентной силы, на объект также действует сила, вызванная давлением (отражением) света от его поверхности. Эта сила толкает сферу по направлению пучка света. Однако если луч света сильно сфокусирован, величина градиента интенсивности может быть больше величины давления света.

Более детальный анализ процесса перемещения объекта в лазерном луче был проведен еще создателями метода. Процесс перемещения основан на трех механизмах, в зависимости от размера частицы. В теории рассеяния света известно, что механизм рассеяния света частицей зависит от соотношения размеров частицы и длины световой волны. Если размер рассеивающих частиц намного меньше, чем длина волны света, то имеет место Рэлеевское рассеяние. Когда свет рассеивается на частицах (пыль, дым, водные капельки), которые имеют размер больше, чем длина волны, это рассеяние Ми (по имени немецкого физика Густава Ми). Рассеяние Ми отвечает за белый и серый цвет облаков. В том случае, если размер частиц сопоставим с длиной волны захватывающего лазера, то имеет место третий механизм. На основе анализа этих взаимодействий лазерного луча с частицами была разработана концепция оптического пинцета (Ashkin and Dziedzic, 1987).



**Рисунок 13.** Схема работы оптического пинцета. F<sub>scat</sub> – сила, давление светового потока; F<sub>grad</sub> – градиентная сила. Равнодействующая этих сил перемещает частицу к центру ловушки.

На рисунке 13 изображены силы, действующие на частицу, находящуюся в оптической ловушке. Свет проходит через линзу объектива микроскопа и фокусируется в одной точке. Когда объект находится вне фокуса ловушки, изменяется момент импульса и равнодействующая сила возвращает частицу назад к центру ловушки. Если частица находится в центре ловушки, то отдельные пучки света преломляются одинаково, в результате чего равнодействующая сила равна нулю.

Также некоторый интерес представляет манипулирование клетками С использованием оптической системы с мультиловушками. Для формирования мультиловушки оптический пинцет настраивают таким образом, чтобы можно было захватывать в ловушку несколько частиц одновременно. Проходя через сплиттер, лазерный пучок раздваивается, затем вновь собирается перед тем, как войти в объектив микроскопа.(Fallman and Axner, 1997.).

Также были разработаны технологии, позволяющие создавать контролируемые множественные пучки. Среди них можно назвать VCSEL (поверхностно-излучающий лазер с вертикальным резонатором) — полупроводниковый лазер, излучающий свет в направлении, перпендикулярном поверхности кристалла, в отличие от обычных лазерных диодов, излучающих в плоскости, параллельной поверхности. Несколько лазеров данного типа объединяют вместе таким образом, что каждый лазер фокусируется отдельно и играет роль отдельной ловушки (Ozkan et al., 2003). Другую технику разработал Эриксен Р. (Eriksen R.) с коллегами. Он использовал метод фазового контраста в совокупности с фазовой маской для получения множества лазерных пучков (Eriksen et al., 2002).

# 2.5.2. Применение системы оптического манипулирования к единичным клеткам

Оптический пинцет чаще всего применяют для активного манипулирования с биологическими объектами (чаще всего с единичными живыми клетками), а также для их позиционирования, сортировки и модифицирования. Оптический пинцет использовали для удерживания клеток в статической среде или в потоке жидкости при решении задачи по измерению объема единичной изолированной клетки почки в условиях осмотического шока и для феноменологического анализа водного транспорта. Так при проведении таких исследований нефроцит поддерживался оптическим пинцетом в подвешенном состоянии и не соприкасался ни с подложкой, ни с другими клетками, что исключало воздействие на него окружающих объектов. (Lucio et al., 2003). Когда клетка находится в оптической ловушке, её поверхность нагревается пучком света, что приводит к изменению интенсивности и направления отражения лучей, поэтому можно составить диаграмму по отражению света от единичной клетки в оптической ловушке. Её используют для идентификации различных внутриклеточных структур, разделения живых и мертвых клеток, а также для разделения клеток, отличающихся по размеру, форме, морфологии и коэффициенту преломления.

Совместно с применением оптической ловушки в ряде работ использовали метод спектрометрии для получения необходимой информации о состоянии клетки. Так, например, в 2005 году в Китае группа ученых применила эту методику для идентификации и дифференциации 6-и видов бактерий в различных условиях обитания (Xie et al., 2005). В медицинских целях данную технологию применяли для того, чтобы различать здоровые и модифицированные лимфоциты (Chan et al., 2006), а также раковые и здоровые клетки (Zheng et al., 2007).

Группа ученых под руководством Г.Сингха (Singh G.) использовали одновременно оптический пинцет и метод спектрометрии для количественной оценки ферментативных процессов внутри одиночной дрожжевой клетки в режиме реального времени (Singh et al.,2005). Однако, как правило, клетка в ловушке вращается. Для стабилизации ловушки используют не один, а несколько лучей. П. Джэс (Jess P.) и его коллеги адаптировали технологию для работы с первичными кератиноцитами. Они использовали два дивергентных луча захвата клетки и снимали отдельные спектры с мембраны, цитоплазмы и ядра (Jess et al., 2006).

Комбинирование микро-спектроскопии с оптическим пинцетом и микрофлюидной системой открывает широкие возможности для изучения in vitro мониторинга клеточного ответа на различные химические вещества. Так, в единичную клетку можно ввести тестируемый фармакологический раствор и измерить изменения физических и химических показателей клеточных компонентов.

Перемещение клеток. Оптический пинцет позволяет бесконтактно передвигать клетки в жидкой среде, что является чрезвычайно удобным при работе в стерильных условиях. Так, оптический пинцет применяли для создания групп нейронов путем передвижения отдельных клеток (Townes-Anderson et al., 1998). Одну группу нейронов культивировали на посуде с адгезивным покрытием, другую – на посуде с менее адгезивным покрытием. Нейроны из второй группы захватывали пинцетом и переносили к нейронам из первой группы, чтобы у клеток была возможность взаимодействовать друг с другом. Например, если клетки-палочки сетчатки помещали в группу клеток, содержащих как клетки-колбочки сетчатки, так и мультиполярные нейроны, то наблюдали ингибирование роста нейронов перенесенными клетками-палочками. При этом оптическое манипулирование не влияло на способность нейронов прикрепляться к субстрату, кроме того органеллы, ядро и цитоплазматические структуры клеток, побывавших в оптической ловушке, не были повреждены.

Большое количество работ по исследованию работы оптического пинцета и его воздействию на живые объекты было проведено на бактериях. Ю.Вакамото с коллегами (Wakamoto Y. et al., 2001) сконструировали две микрокамеры для культивирования и анализа, которые были соединены между собой узким каналом, через который транспортировали одну бактерию, E.coli, захваченную лазерным пинцетом. После того, как в камере для анализа E.coli делилась на две дочерние клетки, одну из них захватывали в ловушку и переносили в камеру для культивирования для последующего роста и развития. Эта техника позволяет сравнивать генетически идентичные клетки в среде без загрязняющих веществ, что может помочь в исследовании таких явлений, как неравное деление. Дж. Энгер с коллегами (Enger et al., 2004) разработали подобную систему, где E.coli перемещали по капилляру между двумя камерами, заполненными различными средами. В результате выяснилось, что не происходит никакого загрязнения (смешивания сред из разных контейнеров) при перемещении клеток в контейнер с другой средой. Группа ученых под руководством Э. Эриксона (Eriksson et al., 2007) использовала эту методику для оценки чувствительности клеток к сильно различающимся концентрациям глюкозы в растворах, которыми были заполнены два канала. По этим каналам 25 дрожжевых клеток перемещали между двумя камерами с помощью мультиловушки. Такой подход лежит в основе нового метода для наблюдения клеточного ответа на различные внеклеточные условия в режиме реального времени без удаления из поля зрения микроскопа.

<u>Сортировка клеток</u>. В настоящее время для сортировки клеток широко используют метод проточной цитофлюориметрии, когда клетки отбираются из общей массы по характеру флуоресцентного сигнала. Такой метод называется активной сортировкой (Dholakia et al., 2007), так как необходимо присоединение маркеров к клеткам.

В то же время сортировка клеток возможна и с помощью оптического пинцета, как с использованием флуоресцентных маркеров, так и на основе морфологических особенностей клеток. Впервые это было продемонстрировано в 1987 году (Buican et al., 1987). Они использовали отклоняющий пучок для разделения клеток и движущий пучок для поддержания движения клеток. Другой группой ученых был разработан T-образный микроканал для перемещения клеток и использовали оптический пинцет на основе VCSEL для захвата и перемещения в накопительный резервуар нескольких клеток у-образные каналы (рис. 14). Клетки анализируются в области распознавания, а затем сортируются в области разделения при помощи мультиловушек или одиночных ловушек-переключателей. Фактически, оптический пинцет отбирает нужные клетки, помещает их в специальные резервуары, а все остальные клетки проходят мимо.



**Рисунок 14**. Применение оптического пинцета для сортировки клеток (из работы Wang et al., 2005).

М. Ванг (Wang M.) использовал два лазера в сортере: ближний инфракрасный лазер для оптического переключения и лазер, излучающий в видимом спектре, для распознавания и измерения флуоресценции. Клетки, вытекающие из образца, с помощью гидродинамической фокусировки собираются в узкую струю. Сначала она проходит через аналитическую область, а потом через область оптического переключения. Клетка распознается по типу флуоресцентного сигнала, и сфокусированным лазерным пучком перенаправляется в соответствующий канал, остальные клетки идут через другой канал. Разработаны и другие методы активной сортировки клеток, например, идентификация клеток с помощью видеомикроскопии и их перераспределение с помощью оптического пинцета (Ericsson et al. 2000). Также в настоящее время разработаны методы пассивной сортировки клеток, т.е. без применения маркеров. Отбор клеток в этих случаях идет по размеру, форме, коэффициенту отражения, либо по всем этим параметрам одновременно. Так, М. MacDonald продемонстрировал разделение эритроцитов и лимфоцитов, основанное на различиях в форме (MacDonald et al., 2004).

Сборка и организация клеточных ассоциаций. Оптический пинцет может быть использован для сборки и организации клеток, так из группы клеток можно сформировать сложную структуру. В этом случае оптическая ловушка используется для захвата объекта, который, в свою очередь, может захватывать другие объекты. Так микросфера диаметром 5мкм была первой захвачена в ловушку, а затем использовалась в качестве направляющей для захвата и манипулирования с другими сферами меньшего диаметра (2мкм). Структура из микросфер, собранная таким образом, оставалась стабильной даже при движении по каналу диаметром 100мкм (Ozkan et al., 2003). Данная технология позволяет перемещать частицы по разным осям и реорганизовывать их в трехмерные структуры. Помимо микросфер такая техника применялась и для построения трехмерной структуры из E.coli. Клетки помещали в желатин в строго определенные места. После выключения лазера полученная трехмерная структура оставалась стабильной в течение нескольких дней. Применение этой техники может быть полезно при изучении влияния местоположения, количества и близости соседних клеток на клеточную дифференцировку, а способность клеток образовывать жизнеспособные стабильные трехмерные структуры открывает широкие возможности для тканевой инженерии.

<u>Оптические направляющие</u>. Оптический пинцет был применен для активации роста нейронов в определенном направлении в культуре *in vitro*. Лазерное излучение (800-900нм) фокусировали на лидирующем крае растущей клетки, активизируя процессы роста. Такое оптическое направление роста осуществляется благодаря воздействию пучка света на мономеры актина, в результате которого образуются центры полимеризации, а полимеризация ведет к направленному росту нейронов в заданном исследователем направлении (Ehrlicher et al., 2002).

<u>Комбинирование оптического пинцета и лазерного скальпеля</u>. Наиболее широкие перспективы в экспериментальной биологии имеют приборы, совмещающие оптический пинцет с лазером, который будет делать микроразрез. Это позволяет выделять клетки из кластеров, органеллы, элементы цитоскелета, отдельные хромосомы из клеток. Получение клеточных гибридов также возможно при применении оптического пинцета и

45

лазера. Клетки захватываются в ловушки, приводятся во взаимодействие, а затем в месте их контакта делают разрез несколькими лазерными импульсами. Такая система открывает широкие возможности для проведения микрохирургических процедур на клеточном уровне.

#### 2.5.4. Проблемы, сопутствующие применению оптического пинцета

Поглощение лазерного излучения образцом может привести к повреждениям, так как в оптическом пинцете используется энергия высокой интенсивности (MBt/cm<sup>2</sup>). При работе с биологическими объектами важна также и длина волны излучения. В настоящее время достаточно хорошо изучено влияние ближнего инфракрасного излучения (790 -1064нм) на живые объекты и было показано, что близкое по длине волны излучение может оказывать на клетки совершенно различное действие. Так, для клеток китайского хомячка минимальное фотоповреждение было зарегистрировано при длине волны 930нм, а максимальное – при 970 нм, а для клеток E.coli минимальное повреждение было зарегистрировано при 830 нм, а максимальное – при 870 нм (Liang et al., 1996; Neuman et al., 1999). Опытным путем было показано, что в анаэробных условиях уровень повреждения наиболее низок и, следовательно, кислород играет ведущую роль в этом процессе (Neuman et al., 1999). Однако и излучение на длинах волн меньше 800нм может нанести серьезный ущерб объекту (Konig et al., 1996; Leitz et al., 2002). При исследовании побочных эффектов воздействия оптического пинцета на клетки путем изменения мощности лазера, времени облучения и длины волны, были обнаружены интересные эффекты (Leitz et al., 2002). Эксперименты ставили на трансгенных *C.elegans*, которых использовали в качестве биосенсоров, чувствительных к различным внешним стрессирующим факторам (подопытные животные были носителями гена, транскрипция которого находится под контролем хит-шокового промотора). Клетки подвергали воздействию оптического пинцета при длинах волн от 700 до 850нм на время от 30 до 240 секунд. Активацию экспрессии гена наблюдали с наибольшей частотой при 760 нм, когда воздействие обусловлено фотохимическими процессами и при длине волны свыше 800нм, когда ущерб наносился из-за фототермических процессов.

Термическое воздействие на клетки можно легко зарегистрировать по повышению температуры. При использовании 100мВт оптического пинцета (длина волны излучения 1064нм) наблюдали повышение температуры на 1-2°С. При проведении экспериментов на сперматозоидах, клетках яичника хомячка и липосомах, повышение температуры составило 10, 11,5 и 14,5°С/Вт соответственно, что говорит о необходимости снижения суммарной энергии воздействия, чтобы избежать перегрева клеток. (Liu et al.,1996).

Для того чтобы уменьшить тепловое повреждение объекта при применении оптического пинцета при работе с небиологическими объектами для уменьшения нагревания, рекомендовано использовать тяжелую воду вместо обычной (Dholakia and Reece, 2006). Однако для живых систем необходимо искать другие подходы. Так, в установках используют различные лазеры и проверяют их свойства. Например, вместо Nd:YAG лазера (твердотельного лазера, который в качестве активной среды использует алюмо-иттриевый гранат («YAG», Y3Al5O12) с добавками неодима (Nd)) в качестве источника излучения можно применять Nd:YLF лазер (лазер на фториде иттрия-лития с легированием неодимом) или титан-сапфировый лазер. Другой подход для минимизации повреждающего воздействия лазера – избегать прямого воздействия излучения на клетки. Например, чтобы избежать прямого контакта между фотонами и клетками, к последним можно присоединить одну или несколько частиц, с которыми непосредственно будет взаимодействовать лазер.

# 2.6. Биопсия ооцитов и преимплантационных эмбрионов

Биопсия - метод исследования, при котором проводится прижизненный забор клеток из организма и последующее их микроскопическое исследование. В клиниках ВРТ активно применяют этот метод для проведения последующей генетической диагностики, которая позволяет выявить у эмбриона наличие хромосомных аберраций, моногенных заболеваний, а также заболеваний, сцепленных с полом. Для этого забор клеточного материала проводят на разных стадиях эмбрионального развития: на стадии зиготы, дробления и бластоцисты. Основными методами генетического анализа являются *FISH* (*Fluorescent in situ Hybridization*) и ПЦР (полимеразная цепная реакция).

Теоретически, забор клеток можно проводить на любой стадии преимплантационного развития: от стадии двух клеток до стадии бластоцисты. На более ранней стадии (стадии зиготы) для проведения анализа можно взять только редукционные (полярные) тельца.

Наиболее важным преимуществом проведения биопсии на стадии зиготы является то, что оба полярных тельца – экстраэмбриональный материал и, таким образом, не участвуют в развитии будущего эмбриона. Группой ученых (Verlinsky and Kuliev, 1992) было показано, что удаление полярных телец не влияет ни на процент успешного оплодотворения, ни на количество эмбрионов, приступающих к дроблению, таким образом, экспериментально на мышиной модели показали, что полярные тельца не вносят никакого вклада в развитие эмбриона. В 1996 году те же авторы подтвердили ранее полученные данные и для человеческих эмбрионов (Verlinsky and Kuliev, 1996). Наиболее

важным минусом биопсии полярного тельца является то, что данным способом можно исследовать только вклад материнского генома в развитие эмбриона.

В том случае, когда необходимо оценить еще и вклад отцовского генома, проводят биопсию бластомера на стадии дробления. Для этого очень важно правильно выбрать стадию, на которой следует проводить биопсию. Так, например, экспериментально установлено, что если проводить забор клеточного материала на стадии двух и или четырех клеток, то размер внутренней клеточной массы (ВКМ) на стадии бластоцисты пропорционально уменьшается. Эксперименты проводили как на мышиных (Somers et al., 1990), так и на человеческих эмбрионах (Tarin et al., 1992). Следовательно, на этих стадиях не рекомендуется проводить биопсию.

Наиболее подходящим моментом для биопсии бластомера у эмбрионов человека является стадия 8 клеток, когда эмбрион еще не компактизирован. На более поздней стадии клетки становятся поляризованными на мембранном и на цитоплазматическом уровне (Hardy and Handyside, 1993). Эмбрионы млекопитающих хорошо переносят удаление одной или двух клеток на стадии 8-ми клеток, удаление же большего числа клеток может привести к нарушению формирования ВКМ и гибели эмбриона (Hardy et al., 1990; Tarin et al., 1992).

Помимо стадии дробления биопсию можно проводить и на более поздних стадиях. Наиболее важным преимуществом этой процедуры перед биопсией на более ранних стадиях является возможность забора большего числа клеток. Однако стадия морулы не подходит для биопсии, так как эмбрион уже компактизирован. Процесс компактизации у эмбрионов человека начинается на стадии 16-32 клеток. Длительное инкубирование морул в бескальциевом/безмагниевом растворе для биопсии может оказать негативное воздействие на жизнеспособность эмбриона и даже привести к его гибели после биопсии (Van Blerk et al., 1991). Кроме того, на стадии морулы клетки уже потеряли тотипотентность и невозможно выяснить, из них войдут в состав зародышевого материала, а какие будут составлять внезародышевые ткани. Стадия бластоцисты является более перспективной для проведения биопсии, так как на данном этапе развития эмбриона можно четко различить зародышевые и внезародышевые ткани (трофэктодерму и BKM). Таким образом, можно удалить часть клеток трофэктодермы без риска причинить вред будущему организму, так как BKM остается интактной.

Процедура биопсии состоит из двух последовательных этапов: 1) получение отверстия в *zona pellucida* (*ZP*); 2) извлечение клеточного материала.

Отверстие в *ZP* можно получить тремя способами: механически (частичная диссекция или продольное разрезание *ZP*), химически (с использованием кислого

раствора Тироде) и с помощью лазера. Теоретически, все три способа могут быть использованы для проведения биопсии на любой стадии развития. Но так сложилось, что биопсия полярного тельца чаще всего связана с механическим способом получения отверстия в прозрачной оболочке. В случае проведения биопсии на стадии дробления для перфорирования *ZP* чаще всего используют химический или лазерный метод. Для осуществления биопсии на стадии бластоцисты используют все три возможных способа перфорирования *ZP*.

При проведении биопсии редукционного тельца и бластомера забор материала осуществляют с помощью стеклянной иглы для биопсии. В случае человеческих эмбрионов бластомер извлекают с помощью иглы с внутренним диаметром 35 – 40 мкм. При проведении биопсии трофэктодермы сначала делают вспомогательный хэтчинг, затем культивируют в течение 18-24 часов и лишь после этого производят забор клеточного материала. При этом может быть использован как механический способ (путем перетирания о дно чашки с помощью изогнутой стеклянной иглы) (Dokras et al., 1990) или лазерные технологии (De Vos, Van Steirteghem, 2001).

Лазерные технологии находят все большее применение в различных областях клеточной биологии и микробиологии и могут быть использованы для решения большого числа задач. Таким образом, развитие метода лазерной хирургии, в том числе и для применения его в области микрохирургии эмбрионов млекопитающих и человека является перспективным направлением.

# 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

## 3.1. Лабораторные животные

Исследования фолликулогенеза *in vitro* проводили на неполовозрелых самках мышей линии BALBc/J и мышей-гибридов F1 линий C57Bl/6JxCBA/J в возрасте от 2 до 4 недель постнатального развития, полученных из вивария НИИ канцерогенеза РОНЦ РАМН, а также на трансгенных мышах с экспрессией GFP, созданных на базе линии C57Bl/6J, любезно предоставленных лабораторией геномики адаптивного иммунитета Института биоорганической химии имени Шемякина и Овчинникова РАН.

Для экспериментов по разработке бесконтактного метода манипуляций с преимплантационными эмбрионами использовали мышей F1 C57Bl/6JxCBA/J. 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, которая представляет собой коагулировавшие белки, содержащиеся в семенной жидкости самца. Копулятивная пробка закрывает вход во влагалище, предотвращая повторное спаривание самки с другим самцом. День обнаружения пробки считается 0,5 суток эмбрионального развития, так как мыши обычно спариваются в середине темной фазы суточного цикла.

# 3.2. Получение биоматериала для эксперимента

## 3.2.1. Получение овариальной ткани и фолликулов

Для получения овариального материала самок умерщвляли путем дислокации шейных позвонков по стандартному протоколу (Hogan et al., 1994), вскрывали брюшную полость, яичники извлекали, помещали в капли среды для манипуляций M2 (Millipore, США), предварительно нагретой до 37 °C, очищали от жира, снимали капсулу яичника. Подготовленные таким образом яичники разрезали с помощью двух острых металлических игл, отдельные первичные многослойные фолликулы, которые оставались связанными друг с другом отсепаровывали также с помощью 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, Россия), инкубировали при 37 °C в течение 90 минут при периодическом встряхивании. Затем полученный материал пипетировали, фермент инактивировали сывороткой, центрифугировали (10 минут 2000 об./мин.), супернатант сливали, добавляли в пробирку среду для культивирования, пипетировали, далее высаживали клетки на чашки Петри. Полученную смешанную популяцию клеток стромы, теки и гранулезы, а также фрагменты овариальной ткани культивировали в условиях инкубатора (95% влажности, 5% CO<sub>2</sub> и температуре 37°C) в среде αМЕМ (ПанЭко, Россия) с 10% содержанием сыворотки (HyClone, CША), с добавлением ИТС (1:100 ПанЭко, Россия), L-глутамина (2мМ, ПанЭко, Россия), гентамицина (1:100, ПанЭко, Россия), bFGF (0,6:1000, ПанЭко Россия) и гепарина (0,9:1000, ПанЭко, Россия).

### 3.2.2. Получение преимплантационных эмбрионов

Преимплантационные эмбрионы (0,5 – 2,5 суток развития) получали согласно стандартному протоколу (Hogan et al., 1994) самку умерщвляли путем дислокации шейных позвонков, вскрывали брюшную полость, извлекали яйцеводы. Яйцеводы помещали в капли среды для манипуляций M2 (Millipore, CША), тщательно очищали от жира, разрезали двумя острыми стеклянными иглами. Эмбрионы, вышедшие из яйцевода, отбирали с помощью капилляра диаметром 140 мкм, вставленным в роликовый насос или стриппер. Эмбрионы отмывали в 7-10 каплях среды M2 (Millipore, CША).

Для получения эмбрионов на стадии бластоцисты (3,5 суток развития) из брюшной полости самки извлекали матку, помещали в чистое сухое часовое стекло, с помощью инсулинового шприца, заполненного средой для манипуляций М2, поочередно промывали каждый рог матки. Эмбрионы, вышедшие из матки, отбирали с помощью капилляра под контролем стереомикроскопа(Olympus SZX16, Япония), отмывали последовательно в трех каплях среды M2 (Millipore, США) объемом 100 мкл.

# 3.2.3. Выделение МСК КМ

Для выделения МСК КМ мышь умерщвляли дислокацией шейных позвонков, 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 помещали В пробирку, центрифугировали (7 минут 1200 об./мин.), сливали надосадочную жидкость, заливали свежим раствором Хэнкса (ПанЭко, Россия), ресуспендировали осадок, центрифугировали (7 минут 1200 об./мин.), сливали супернатант, заливали клетки средой, пипетировали и высаживали на чашки Петри.

#### 3.3. Постановка экспериментов

#### 3.3.1. Культивирование клеток и фолликулов

Культивирование овариальной ткани и отдельных фолликулов в 2D условиях. 2D условия - культивирование тканевых эксплантатов на поверхности чашек Петри или планшетов. Фрагменты овариальной ткани культивировали культуральных на поверхности чашек Петри диаметром 35 мм в среде с 5% и 10% содержанием сыворотки (FCS). Полную смену среды проводили раз в 2дня. Фолликулы культивировали в 24луночных планшетах в группах по 3-5 штук на лунку. Лунки планшета заполняли 500 мкл среды для культивирования, приготовленной на основе аМЕМ (ПанЭко, Россия) с содержанием 10% FCS (HyClone, США), гентамицина (1:100, ПанЭко, Россия) и ИТС (1:100, ПанЭко, Россия). Контроль состояния культуры осуществляли один раз в двое суток при помощи инвертированного микроскопа с фазовым контрастом (Nikon TE2000-S, Япония), снабженным также цифровой фотокамерой.

*Культивирование стромальных клеток яичника.* Смешанную популяцию клеток гранулезы, теки и стромы яичника культивировали в 60 мм чашках Петри в условиях CO<sub>2</sub>инкубатора (95% влажности, 5% CO<sub>2</sub> и температуре 37 °C) в среде αМЕМ (ПанЭко, Россия) с 10%-ным содержанием FCS (HyClone, США) с добавлением гентамицина (1:100, ПанЭко, Россия), L-глутамина (2 мМ, ПанЭко, Россия), ИТС (1:100, ПанЭко, Россия), bFGF (0,1 мкг/мл, ПанЭко Россия) и гепарина (0,9:1000, ПанЭко, Россия). Среду меняли раз в 2 дня, пассирование клеток осуществляли при достижении 80% конфлюэнтности. При пассировании среду выливали, клетки 2-3 раза промывали раствором Версена для удаления следов сыворотки, затем заливали раствором трипсина, убирали в инкубатор на 5 минут. Клетки, потерявшие контакт с пластиковой поверхностью отбирали с помощью автоматической пипетки, помещали в пробирку с каплей сыворотки для нейтрализации фермента, центрифугировали (7 минут 1000 об./мин.). Затем сливали супернатант, ресуспендировали клетки в полной ростовой среде и рассаживали на новые чашки.

<u>Культивирование МСК КМ.</u> Мезенхимные клетки культивировали в условиях инкубатора (95% влажности, 5% CO<sub>2</sub> и температуре 37 °C) в среде, состоящей из смеси сред DMEM (ПанЭко, Россия) и F12 (ПанЭко, Россия), взятых в равных объемах, с добавлением ИТС (1:100, ПанЭко, Россия), гентамицина (1:100, ПанЭко, Россия), Lглутамина (2 мМ, ПанЭко, Россия), 10% FCS (HyClone, США), гепарина (0,9:1000, ПанЭко, Россия) и bFGF (0,1 мкг/мл, ПанЭко Россия) в чашках Петри 60 мм (SPL, Корея). Среду меняли раз в 2 дня, культивировали до 80% конфлюэнтности, затем клетки пассировали с использованием раствора Версена и 0,25% раствора трипсина, как описано для клеток стромы яичника. Состояние культуры клеток контролировали при помощи инвертированного микроскопа с фазовым контрастом (Nikon TE2000-S, Япония).

<u>Культивирование овариальных фолликулов в 3D условиях.</u> 3D условия были реализованы путем культивирование в системе «висячая капля» (Millet and Gillette, 2012). При культивировании в системе «висячая капля» на крышку чашки Петри наносили капли среды объемом 30 мкл. 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 аМЕМ с добавлением ИТС (1:100, ПанЭко, Россия) и гентамицина (1:100, ПанЭко, Россия) со следующими дополнительными компонентами:

- 1) 5% FCS;
- 2) 10% FCS;
- 3) 5% FCS и FSH (0,2 МЕ/мл);
- 4) 10% и FSH (0,2 МЕ/мл);
- 5) 10% FCS, L-глутамин (2 мМ), гепарин (0,9:1000) и bFGF (0,1 мкг/мл);
- 6) 10% FCS, L-глутамин (2 мМ), гепарин (0,9:1000) и bFGF (0,1 мкг/мл) и FSH (0,2 МЕ/мл).

Длительность культивирования составила 7-8 суток. Контроль состояния культуры осуществляли один раз в двое суток при помощи стереомикроскопа (Olympus SZX16, Япония), снабженного цифровой фотокамерой.



**Рисунок 15.** Схема культивирования фолликулов в системе «висячая капля». 1-крышка чашки Петри 60 мм с нанесенными каплями среды объемом 30 мкл (20 капель на крышку); 2 – донце чашки Петри, заполненное средой для создания влажной камеры, препятствующей высыханию капель и изменению осмолярности среды в каплях.

# 3.3.2. Сокультивирование фолликулов с клетками

Сокультивирование со смешанной популяцией клеток стромы, теки и гранулезы

<u>яичника.</u> Клетки стромы, теки и гранулезы яичника и фолликулы сокультивировали в 3D

условиях в системе «висячая капля». Культуру клеток промывали раствором Версена (ПанЭко, Россия) (3 раза), затем заливали раствором трипсина, убирали в инкубатор на 5-7 минут, чтобы клетки потеряли контакт с пластиковой поверхностью чашки Петри. Раствор трипсина, содержащий суспензию клеток, отбирали при помощи автоматической пипетки, помещали в пробирку для центрифугирования. Инактивацию фермента проводили с помощью капли FCS. Раствор с клетками подвергали центрифугированию (7 минут 1000 об./мин.). Затем супернатант сливали, осадок ресуспендировали в полной ростовой среде. Проводили подсчет клеток с помощью автоматического счетчика Scepter 2.0 (Millipore, США). Затем раствор с клетками разводили таким образом, чтобы в капле объемом 30 мкл содержалось 3000 клеток. Капли среды с клетками наносили на крышки чашки Петри, в капли помещали единичные фолликулы под контролем стереомикроскопа (Оlympus SZX16, Япония). Крышку переворачивали, накрывали ей донце чашки, заполненное средой, таким образом получали систему «висячая капля». Далее проводили совместное культивирование клеток и фолликулов в течение 7 суток. Контроль состояния культуры проводили с помощью стереомикроскопа с цифровой фотокамерой.

<u>Сокультивирование фолликулов с МСК КМ.</u> Культуру МСК, выделенных из костного мозга трансгенных мышей с экспрессией GFP, подготавливали к сокультивированию по тому же протоколу, что и клетки яичника. Клетки в концентрации 3000 клеток на 30 мкл помещали в капли, под контролем стереомикроскопа в капли помещали фолликулы, культивирование проводили в течение 7 суток. Контроль состояния культуры проводили с помощью стереомикроскопа с цифровой фотокамерой.

#### 3.3.3. Лазерная микрохирургия преимплантационных эмбрионов

Микрохирургические операции проводили на эмбрионах 0,5 - 3,5 сут. развития бесконтактным методом при помощи лазерной установки с функциями «лазерный скальпель – оптический пинцет». В работе был использован лабораторный образец программно-аппаратного комплекса для манипулирования и импульсного лазерного воздействия на различные биологические объекты, разработанный под руководством д.ф.м.н. М.Б.Аграната в Отделе лазерной плазмы Объединенного института высоких температур РАН. Его принципиальная оптическая схема приведена на рис. 16.



Рисунок 16. Аппаратно-программный комплекс, использовавшийся в экспериментах.

1 – осветительная система микроскопа; 2 – шаговые двигатели, перемещающие препаратоводитель по Х, Ү, Z осям; 3 – экспериментальный резервуар на препаратоводителе; 4 – пара захваченных в оптическую ловушку микроскопических объектов, находящихся в экспериментальном резервуаре; 5 – рабочий объектив микроскопа; 6 – ССД-камера; 7 – компьютер, управляющий шаговыми двигателями, фазовым модулятором и ССД-камерой; 8 – джойстик; 9, 10 – зеркала; 11 – телескоп; 12 – оптический пространственный фазовый модулятор; 13 – фемтосекундный лазер (частота повторения импульсов 1 кГц - оптический скальпель); 14 – непрерывный иттербиевый волоконный лазер или фемтосекундный лазер (частота повторения 80 МГц – оптический пинцет).

Отличительной особенностью данного комплекса является наличие наряду с непрерывным иттербиевым волоконным лазером двух современных фемтосекундных лазерных систем ИК диапазона спектра с возможностью преобразования длины волны излучения в видимый и ближний УФ диапазон для решения широкого круга задач, таких как прецизионная деструкция внутриклеточных элементов, перфорация мембраны клеток для селективного слияния последних, их трансфекции, инъекции в клетки объектов наноразмерной величины и т.д. Фемтосекундные лазерные импульсы позволяют минимизировать негативные влияния излучения на физиологию и структуру клеток.

Для реализации оптического захвата и манипулирования биообъектами использовалось как непрерывное излучение иттербиевого волоконного лазера (PYL-10-P, IPG Laser GmbH), так и излучение фемтосекундного импульсно-периодического лазера с активной средой хром-форстерит, генерирующий импульсы длительностью 100 фс на длине волны 1240 нм с частотой повторения 80 МГц и средней мощностью 200 мВт (CrF-65P, ООО "Авеста проект").

55

В качестве оптического лазерного скальпеля используется отечественная фемтосекундная волоконная лазерная система ("ТЕТА-10/100 ООО "Авеста-Проект") с излучением на длине волны 1,028 мкм, частотой повторения 10 кГц, длительностью импульсов менее 300 фс и энергией более 100 мкДж. Также в лазерной системе существует возможность перестройки частоты излучения в видимый и УФ диапазоны спектра путем генерации оптических гармоник. Достоинством данной системы является простота в эксплуатации, высокая надежность, меньшая критичность к изменению температурного режима, по сравнению с традиционными фемтосекундными лазерами с керровской нелинейностью.

Оптический захват биообъектов осуществлялся с использованием инвертированного биологического микроскопа (МИБ-Р, ЛОМО, Россия). Для фокусировки излучения использовались объективы с различной числовой апертурой: М-ФЛЮАР 40х/0,85 Л, М-ФЛЮАР 20 х/0,65 Л.

Также в работе была использована наносекундная лазерная установка, сочетающая в себе функции оптического пинцета и оптического скальпеля, PALM CombiSystem Rel. 4.2 (Carl Zeiss, Германия), для проведения процедуры биопсии трофэктодермы.

<u>Подготовка эмбрионов к облучению</u>. Эмбрионы 0,5 – 3,5 сут. развития под контролем бинокуляра помещали в каплю среды для манипуляций M2 (Millipore, CША), нанесенную на дно 30-ти мм пластиковой чашки Петри. Чашка была приготовлена заранее: в днище было вырезано отверстие, которое затем накрывали покровным стеклом с нанесенной лазером сеткой (10x10 клеток), размер одной клетки – 100x100 мкм. Сверху наслаивали минеральное масло, сбалансированное со средой, в объеме, достаточном для полного покрытия нанесенной капли среды.



Рисунок 17. Чашка для проведения эксперимента. А - схематичное изображение чашки; Б - фотография чашки

Подготовленную чашку ставили на предметный столик микроскопа. Находили эмбрионы, размещенные на сетке, и устанавливали их по центру поля зрения. Затем проводили два типа экспериментов: а) определение параметров лазерного воздействия на эмбрион на стадии двух бластомеров; b) биопсию редукционного тельца и трофэктодермы.

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). Опыт ставили в четырех вариантах: 1) множественными импульсами в режиме «лазерный скальпель» воздействовали точно по линии контакта бластомеров при наведенном фокусе и низких значениях энергии импульса; 2) множественными импульсами в режиме «лазерный скальпель» при наведенном фокусе и высоких значениях энергии импульса воздействовали точно по линии контакта бластомеров; 3) множественными импульса воздействовали точно по линии контакта бластомеров; 3) множественными импульсами в режиме «лазерный скальпель» воздействовали точно по линии контакта бластомеров при смещении вверх относительно фокуса на 3,26-6,52 мкм при низких значениях энергии импульса; 4) одиночным импульсом в режиме «лазерный скальпель» воздействовали при наведенном фокусе и низких значениях энергии импульса точно по линии контакта бластомеров. В качестве модели наиболее повреждающего воздействия была выбрана модель слияния двух бластомеров. После проведения процедуры слияния бластомеров эмбрионы культивировали в течение трех суток до стадии бластоцисты.

Также было проведено исследование влияния лазерного воздействия на жизнеспособность эмбрионов при менее травматичном воздействии. Эмбрионы на стадии двух бластомеров (1,5 суток развития) делили на две группы: контроль и опыт. На дно экспериментальной чашки наносили две капли среды для манипуляций с эмбрионами млекопитающих M2 (Millipore, США), в которые помещали эмбрионы по группам. Деление по группам (опыт и контроль) проводили случайным образом. После этого капли покрывали минеральным маслом, сбалансированным со средой. На цитоплазму каждого бластомера эмбрионов опытной группы воздействовали лазерным импульсом с определенной энергией. Всю процедуру проводили под контролем микроскопа (МИБ-Р, ЛОМО, Россия). Эмбрионы из группы контроля находились в тех же условиях, что эмбрионы из опытной группы, но не подвергались лазерному воздействию. Состояние эмбрионов оценивали визуально при помощи указанного микроскопа. После проведения манипуляций ставили культуру эмбрионов (среда для культивирования M16 (Millipore,

США) 37°С, 5%СО<sub>2</sub>, 98% влажности). Через 3-е суток культуру эмбрионов снимали, делали прижизненные фотографии.

<u>Биопсия редукционного тельца.</u> Процедуру проводили на зиготах 0,5 сут. развития. Для проведения этого эксперимента микроскоп фокусировали на *zona pellucida* и серией импульсов (воздействовали около 10 раз по 10 импульсов) в режиме «лазерный скальпель» получали отверстие в оболочке, достаточное для выхода редукционного тельца. Затем установку переключали на режим «лазерный пинцет» и уже в этом режиме осуществляли извлечение редукционного тельца.

*Биопсия трофэктодермы.* Процедуру проводили на эмбрионах 3,5 сут. развития. Для проведения этого эксперимента микроскоп фокусировали на *zona pellucida* и серией импульсов получали отверстие на стороне, противоположной внутренней клеточной массе (BKM), и дожидались начала хэтчинга. После того, как небольшое количество клеток трофэктодермы оказалось снаружи *zona pellucida*, 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 (рис. 18). После завершения процедуры эмбрионы помещали в четырехлуночный планшет в среду для культивирования. На следующий день оценивали жизнеспособность эмбрионов по проценту бластоцист, прошедших хэтчинг, а также при окрашивании бластоцист флуоресцентными красителями Hoechst 33258 (Sigma, CША) и PI (Invitrogen, CША).



**Рисунок 18**. Схема эксперимента по биопсии трофэктодермы. Линией отмечено место нанесения лазерных импульсов.

#### 3.4. Анализ данных, полученных при проведении экспериментов

## 3.4.1. Цитологический анализ

<u>Окрашивание флуоресцентными красителями</u>. Как после культивирования фолликулов, так и после проведения лазерного воздействия на эмбрионы (в ходе исследования влияния лазерного воздействия на жизнеспособность эмбрионов, проведения процедуры биопсии редукционного тельца и трофэктодермы) проводили окрашивание объектов флуоресцентными красителями Hoechst 33258 (Sigma, CША) и PI (Invitrogen, США). Объекты помещали в растворы красителей поочередно на 15-20 минут в условиях термостата (37°С). Затем промывали в растворе PBS (5-7 смен). После промывания изготавливали препараты «давленая капля», которые анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert 25 (Carl Zeiss, Германия).

После процедуры слияния бластомеров эмбрионы доставали из капли в экспериментальной чашке, отмывали в 2 -3 каплях чистой среды для манипуляций M2 (Millipore, США), проводили окраску эмбрионов эндоцитозным красителем FM4-64 (Invitrogen, США) (15 минут, +4°C), а затем эмбрионы фиксировали 4% раствором ПФА, и изготавливали препараты «давленая капля».

Анализ препаратов проводили с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Axiovert 200M 510 Meta (Zeiss, Германия). Установку размеров пинхола для получения изображений с высоким разрешением проводили согласно рекомендациям производителей системы.

Перед сокультивированием с МСК, выделенными из костного мозга трансгенных мышей с экспрессией GFP, фолликулы окрашивали липофильным флуоресцентным красителем DiI (Invitrogen, CША). Клетки стромы, теки и гранулезы также окрашивали липофильным красителем DiI (Invitrogen, CША) перед сокультивированием с фолликулами, выделенными из яичников трансгенных мышей с экспрессией GFP. Клетки окрашивали в монослое при культивировании на поверхности чашки Петри. Чистую среду для культивирования заменяли на среду с DiI (Invitrogen, CША), окрашивание проводили в течение семи часов, затем среду снова меняли на чистую. После сокультивирования из агрегатов из фолликулов и клеток изготавливали временные препараты «давленая капля», которые анализировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Fluoview FV10i (Olympus, Япония).

Изготовление препаратов митотических пластинок. Из бластоцист, полученных из эмбрионов после процедуры слияния и последующих трех суток культивирования, изготавливали суховоздушные препараты по Тарковскому (Манк, 1990) с целью митотических хромосомных пластинок. Бластоцисты получения помещали R гипотонический раствор 0,9% цитрата натрия, после того, как клетки лопались, в минимальной капле раствора бластоцисты помещали на охлажденное предметное стекло, сверху скапывали фиксатор, приготовленный из ЛУК и метанола (1:3). Для лучшего распластывания хромосом быстро проводили стеклом над пламенем спиртовой горелки. В течение суток препараты сушили, затем окрашивали раствором Гимза. После окрашивания препараты высушивали, заключали в канадский бальзам и анализировали при помощи инвертированного микроскопа (Nikon TE2000-S, Япония).

## 3.4.2. Анализ объектов методом электронной микроскопии

Для анализа состояния клеток, базальной мембраны, ооцита в составе фолликулов и агрегатов, полученных из фолликулов и МСК или клеток стромы, теки, гранулезы, после процедуры культивирования *in vitro* использовали метод электронной микроскопии.

<u>Подготовка образцов для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).</u> Для анализа морфологии фолликулов после культивирования *in vitro*, а также морфологии агрегатов, полученных при сокультивировании фолликулов и клеток, применяли метод СЭМ. Изображения образцов были получены при помощи СЭМ CamScan S-2 и JSM-638 0LA в Межкафедральной лаборатории электронной микроскопии Биологического факультета Московского Государственного Университета имени М.В.Ломоносова.

После культивирования образцы отмывали от остатков среды в PBS (3 раза по 5 минут), помещали в фиксирующий раствор (2,5% глутаровый альдегид, приготовленный на 0,1М какодилатном буфере) и оставляли на ночь при температуре +4°C или на 2 часа при комнатной температуре. По окончании фиксации образцы отмывали в 0,1М какодилатном буфере pH=7,2 (три смены буфера по 5 минут), проводили дофиксацию с помощью 0,5% раствора OsO4 (тетраоксид осмия) в течение одного часа при комнатной температуре. Раствор тетраоксида осмия готовили на 0,1М какодилатном буфере. После дофиксации образцы отмывали в PBS (три смены по 5 минут), обезвоживали в растворах этилового спирта возрастающих концентраций:

- 1) 40% 3 минуты,
- 2) 50% 5 минут,
- 3) 60% 5 минут,

- 4) 70% 10 минут,
- 5) 80%-5 минут,
- 96% − 2 смены по 5 минут,
- 7) 100% 2 смены по 5 минут.

После обезвоживания образцы помещали в безводный ацетон на 3 минуты. Далее образцы помещали в камеры, изготовленные из газа с ячеей 35 мкм и фрагмента пробирки типа «эппендорф». Камеры убирали в бюкс, заполненный безводным ацетоном. В таком виде образцы относили на сушку в критической точке. После лиофилизации образцы с помощью лака закрепляли на поверхности цилиндрических металлических столиков, чтобы получить доступ к внутренней области образца проводили скалывание с помощью игл от инсулиновых шприцев под контролем стереомикроскопа Olympus SZX16 (Olympus. Япония). Хранение образцов проводили в присутствии силикагеля, чтобы предотвратить впитывание влаги из воздуха. Перед сеансом СЭМ проводили напыление слоя золота на образец.

<u>Подготовка образцов для трансмиссионной (просвечивающей) электронной</u> <u>микроскопии (ТЭМ).</u> Для анализа структуры фолликулов после культивирования *in vitro*, а также агрегатов, полученных при сокультивировании фолликулов и клеток, применяли метод ТЭМ. Изображения объектов были получены при помощи просвечивающего (трансмиссионного) электронного микроскопа JEM-1011 в Межкафедральной лаборатории электронной микроскопии Биологического факультета Московского Государственного Университета имени М.В.Ломоносова.

После окончания культивирования образцы отмывали от среды в PBS (3 смены по 5 минут), затем образцы фиксировали в 2,5% глутаровом альдегиде, приготовленном на 0,1М какодилатном буфере в течение ночи при температуре +4°C. На следующий день фиксатор отмывали 0,1М какодилатным буфером (pH=7,2; три смены по 5 минут), образцы дофиксировали 0,5% раствором OsO4 (тетраоксида осмия) в течение 1 часа при комнатной температуре. От тетраоксида осмия образцы отмывали в PBS (три смены по 5 минут), после чего обезвоживали в растворах этилового спирта возрастающих концентраций:

1)40% – 7 минут, 2)50% - 7 минут, 3)70% – 7 минут, 4)80% – 5 минут,
5)96% – 2 смены по 5 минут,
6)100% – 2 смены по 5 минут.

Далее образцы переносили в раствор безводного ацетона (2 смены по 3 минуты), затем в смесь смолы и ацетона (1:3) и убирали в термостат (37°С) на 24 часа. После пропитывания образцы заливали в эпоксидную смолу (EMS, США), полимеризацию проводили в условиях термостата: 24 часа при 37°С, затем еще 36 часов при 57°С. Из полученных заливок изготавливали пирамидки для последующего получения ультратонких срезов, которые были выполнены сотрудниками Межкафедральной лаборатории электронной микроскопии. Срезы помещали на сетки или бленды, контрастировали в 1% растворе уранил ацетата в течение 60 минут. После контрастирования образцы на блендах отмывали в деионизованной воде.

Приготовление эпоксидной смолы для просвечивающей электронной микроскопии. Эпоксидная смола, в которую были заключены образцы, была получена в результате смешивания Epon812 (EMS, CША), DDSA (EMS, CША), MNA (EMS, CША), DMP 30 (EMS, США) в соотношении по объёму 45:35:20:2 соответственно.

# 3.4.3. Молекулярно-биологический анализ образцов

Анализ изменения уровня экспрессии генов в фолликулах, МСК КМ и агрегатах, полученных при сокультивировании фолликулов и МСК КМ, проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (qPCR). Данный метод позволяет получить количественные данные экспрессии интересующих генов в исследуемых образцах.

Выделение тотальной рибонуклеиновой кислоты (РНК) из образца. Тотальную (суммарную) РНК выделяли из образца с использованием TRI Reagent (Sigma, США). К пробе добавляли 1 мл TRI Reagent, вортексировали, добавляли 200 мкл хлороформа, инкубировали 10 минут при комнатной температуре и периодическом вортексировании (2-3 раза), откручивали в охлаждающей центрифуге (14000 g, 0-+4 °C) в течение 20 минут. Отбирали верхнюю прозрачную фазу, в которой содержится РНК, добавляли 500 мкл изопропилового спирта. Оставляли при комнатной температуре на 10 минут, затем центрифугировали (14000 g, 0-+4 °C) в течение 15 минут. РНК осаждалась в виде белесого осадка. От изопропилового спирта РНК отмывали 70% этанолом, высушивали на воздухе и растворяли в воде, обработанной DEPC. Далее проводили измерение концентрации рибонуклеиновой кислоты на спектрофотометре Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, США).

<u>Обработка РНК ДНКазой I.</u> Чтобы удалить примеси геномной ДНК выделенную РНК подвергали обработке ДНКазой I (Fermentas, США). Реакционная смесь содержала РНК, 1X буфер (10 мМ Tris-HCl, 2,5 мМ MgCl2, 0,1 мМ CaCl2, pH 7,5), ингибитор РНКаз RiboLock (1 EA/мкл), ДНКазу I (1 EA на 1 мкг РНК). В смеси инкубировали в течение 30 минут при 37°С. Реакцию останавливали добавлением EDTA (до концентрации 5 мМ) и прогреванием при 70°С в течение 5 минут. Далее РНК переосаждали в 4М хлориде лития в морозильной камере (-20 °C) в течение ночи, после чего центрифугировали 20 минут (14000 g, 0-+4 °C). Полученный осадок РНК отмывали раствором 70% этанола, высушивали на воздухе и растворяли в воде, обработанной DEPC.

<u>Обратная транскрипция.</u> Синтез кДНК на основе выделенной РНК проводили в реакционной смеси, содержащей РНК, 1Х буфер (70 мМ Tris-HCl, 16,6 мМ (NH4)2SO4, 7,5 мМ MgCl2, pH 8,3), случайные гексануклеотиды (10 мкМ), смесь нуклеотидтрифосфатов (0,4 мМ каждого), ингибитор РНКаз RiboLock (1 EA/мкл) и обратную транскриптазу M-MLV (Евроген, Россия) (100 EA на 1 мкг PHK); смесь инкубировали 10 мин при комнатной температуре, 30 мин при 37°С и 1,5 ч при 42°С. Реакцию останавливали нагреванием смеси до 70°С и выдерживанием данной температуры в течение 5 мин.

<u>Полимеразная цепная реакция в реальном времени.</u> Реакцию проводили с использованием коммерческой смеси qPCRmix-HS SYBR+LowROX (Евроген, Россия), в состав которой входит HS Taq ДНК полимераза (полимераза с быстрым горячим стартом), краситель SYBR Green I, референсный краситель ROX, смесь нуклеотидтрифосфатов, Mg2+, реакционный буфер. Согласно протоколу, рекомендованному производителем, к смеси добавляли матрицу (кДНК), праймеры и воду, обработанную DEPC. В качестве праймеров использовали синтетические олигонуклеотиды (Евроген, Россия), подобранные с помощью программы PrimerSelect (DNA STAR, США) на основе последовательностей, выложенных в международной базе данных NCBI (<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov</u>). Список использованных праймеров представлен в таблице 5.

Название гена	Последовательности олигонуклеотидов
GFP	CAT GGC CGA CAA GCA GAA GAA C
	GGC GGC GGT CAC GAA CTC
IGF I	GAC CGA GGG GCT TTT ACT TCA ACA
	GGC GCT GGG CAC GGA TAG

Таблица 5. Перечень использованных праймеров

IGF II	CAG TGG GGA AGT CGA TGT TGG T
	TTG AAG GCC TGC TGA AGT AGA A
Cyp17a1	TGG GGC TGG CGT GGA GAC
	CTG ATA GTT GGT GTG CGG CTG AA
Cyp19a1	TCT CCT CAT CAA ACC AAA CAT CTT CT
	CAG TTG CAA AAT CCA TAC AGT CTT CC
LHR	TTG CCG AAG AAA GAA CAG AAT
	CTC CTC AAA GAT GGC AGA ATA A
CD34	GCT GAG GCT GAT GCT GGT GCT A
	CTG GTG GCT CCC GAT ATC TTG TTT A
CD45	ATT TCA GAG CAT TCC ACG GGT AT
	AGC AAT GTA TTT CCT GGG TTC CTT
CD73	GCG TGG CCC GGC TCT TTA C
	TCA ATC AGT CCT TCC ACA CCG TTA TC
CD90	TTA CCC TAG CCA ACT TCA CCA CCA A
	AGC AGC AGC AGC AGC ATC CA
CD105	CAG CTG CGG CAT GAA AGT GAC
	GAA GTG CGG GCT GAG GTA GAG G

ПЦР проводили на автоматическом амплификаторе 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) по следующей схеме:

- 1. 2 мин при 50°С;
- 2. предварительная денатурация и активация полимеразы 10 мин при 95°С;
- 3. 40 циклов амплификации:
- 3.1. денатурация 15 с при 95°С;
- 3.2. элонгация 1 мин при 60°С;
- 4. диссоциация для построения кривой плавления.

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, США). Отсутствие праймер-димеров оценивали по кривым плавления. Расчет относительной экспрессии гена проводили методом ΔΔСt.

## 3.4.4. Измерения и статистический анализ данных

Измерение площадей фолликулов и ооцитов проводили на основе фотографий при помощи программного обеспечения ImageJ (NIH, США). Полученные численные значения анализировали при помощи пакетов программ: Microsoft Excel 2010 (Microsoft corporation, США) и Statistica 7.0 (Dell, США).

С использованием критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Вилка были проверены гипотезы о нормальности распределений исследуемых показателей. Для величин, имеющих нормальное распределение, данные приводили в виде среднего±стандартное отклонение. Если гипотезы о нормальности распределений были отвергнуты, приводили медиану, квартили (25-75%) и вариацию (минимальное и максимальное значения) величины.

Если распределение изучаемых параметров отличалось от нормального, для сравнения двух независимых групп 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.

# 4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

# 4.1. Подбор оптимальных условий для культивирования овариальных фолликулов *in vitro*

# 4.1.1. Культивирование овариальных фолликулов в 2D и 3D условиях

Наиболее простым и распространенным подходом культивирования тканей и клеток в условия *in vitro* является культивирование в 2D условиях на поверхности чашек Петри или многолуночных планшетов. При культивировании органных эксплантатов в таких условиях происходит оседание эксплантата на поверхность чашки, а затем идет активное выселение из него различных типов клеток (Sergeev et al., 2011). Культивирование эксплантатов овариальной ткани, содержащей фолликулы различного размера (т.е. находящиеся на разных стадиях фолликулогенеза) на поверхности чашки Петри показало, что в начале происходит активное выселение фибробластоподобных клеток (рис.19), а затем по их поверхности выселяются эпителиоподобные клетки.



**Рисунок 19**. 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.

Выселение клеток фибробластоподобного фенотипа начиналось на 2-3 сутки культивирования, к 5 суткам начиналась миграция эпителиоподобных клеток, причем выселение клеток данного типа происходило не единичными клетками, а пластом с выраженным краем зоны расселения (рис. 19 Б). К 7 суткам культивирования наблюдали

выселение клеток меньшего размера, но также имеющие эпителиоподобный фенотип (рис. 19 В). При долговременном культивировании (12 -14 сут.) клетки эпителиоподобного фенотипа демонстрировали элементы самоорганизации – формировались открытые люмены и тубулоподобные структуры (рис.20).



**Рисунок 20.** Формирующиеся люмены (обозначены звездочками) и тубулоподобные структуры по их границе в смешанной культуре клеток теки и гранулезы, выселившихся из тканевого эксплантата овариальной ткани (14 сутки культивирования).

Способность формировать подобные структуры при культивировании на различных субстратах – свойство эпителиальных клеток. Ранее было показано, что при воздействии эпителизирующих факторов эмбриональные стволовые клетки в культуре *in vitro* формируют сходные структуры (Wang et al., 2014). При дифференцировке овариального фолликула возникают полости, заполненные фолликулярной жидкостью, выстилают эти полости клетки пристеночной гранулезы. В условиях культивирования *in vitro* клетки пристеночной гранулезы и клетки кумулюса также образуют тубулоподобные структуры (Antczak and Van Blerkom, 2000). Это позволяет сделать предположение, что

наблюдаемые нами клетки являются именно клетками гранулезы, которые выселились из потерявших целостность овариальных фолликулов.

При культивировании тканевых эксплантатов мы регулярно наблюдали в культуре появление ооцитов, лишенных окружения из фолликулярных клеток. Однако ооциты были незрелыми и, по-видимому, выходили из фолликула после выселения клеток гранулезы в силу разрушения базальной мембраны (рис.21).



**Рисунок 21.** Появление ооцитов при культивировании тканевых эксплантатов в течение 14 суток. А – 3-и сутки культивирования, выселяются фибробластоподобные клетки; Б – 7-е сутки культивирования, истончение эксплантата в результате выселения клеток, разрушение базальной мембраны фолликулов, лежащих на краю тканевого фрагмента; В – 14-е сутки культивирования, незрелые ооциты полностью теряют соматическое окружение; Г – 14-е сутки культивирования, ооцит с отделившимся первым редукционным тельцем (показано стрелкой).

В единичных случаях мы наблюдали появление МІІ ооцитов. Данный факт мы связываем с тем, что в составе эксплантатов были фолликулы на завершающих стадиях развития, когда ооцит готов к первому делению созревания. При потере контакта с соматическим окружением такой ооцит самопроизвольно завершает профазу мейоза и проходит редукционное деление.

При культивировании единичных фолликулов, выделенных из овариальной ткани яичника мыши, мы наблюдали те же процессы клеточной миграции, что и при культивировании фрагмента ткани (рис. 22). Ограниченное количество компонентов, которые входят в состав фолликула, позволяет предположить принадлежность выселяющихся клеток к тому или иному типу. Так фибробластоподобные клетки относятся к клеткам теки, а эпителиоподобные – к клеткам гранулезы.



Рисунок 22. 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).

Наши предположения, основанные на оценке морфологического состояния клеток, подтверждаются данными литературы (Hartshorne, 1997). Также при культивировании в 2D условиях происходит не только выселение клеток из фолликула, но и разрушение базальной мембраны, на которой расположены клетки гранулезы. Все эти события ведут к нарушению трехмерной структуры фолликула. Следовательно, в данной системе невозможна полноценная регуляция процессов роста и созревания ооцита и фолликула, основанная на взаимодействии между ооцитом, клетками теки и гранулезы, в том числе и контактном.

После предварительной серии экспериментов по культивированию фолликулов в 2D условиях мы пришли к выводу о необходимости создания 3D условий. Данная задача была реализована путем культивирования фолликулов в системе «висячая капля», в

которой невозможно выселение клеток из состава фолликула, в связи с отсутствием адгезивной поверхности, по которой клетки могли бы мигрировать. Эффективность данной системы была показана в ряде работ, например, при культивировании сфероидов, полученных из МСК, выделенных из различных источников: костного мозга, жировой ткани, пупочного канатика (Сабурина и соавт., 2009, Горкун и соавт., 2012).

При культивировании *in vitro* в системе «висячая капля» фолликулы сохраняли свою трехмерную организацию (рис. 23). Не происходило выселение клеток теки и гранулезы, сохранялась базальная мембрана. Также было показано, что при культивировании фолликулы не просто сохраняют структуру, но и увеличиваются в размерах.



**Рисунок 23**. Динамика роста фолликула в системе «висячая капля». А – 1-е сутки культивирования; Б – 3-и сутки культивирования; В – 5-е сутки культивирования; Г – 7-е сутки культивирования.

После культивирования фолликулы окрашивали флуоресцентными ядерными красителями: бис-бензимидом натрия (Hoechst 33258) для окрашивания ядер клеток и иодидом пропидия (PI) для окрашивания ядер погибших клеток. По количеству клеток, окрашенных PI, судили о жизнеспособности фолликулов после культивирования *in vitro* (рис. 24).



**Рисунок 24.** Выявление живых и мертвых клеток в составе фолликула после культивирования *in vitro* в системе «висячая капля». А – канал видимого света; Б – окрашивание клеток Hoechst 33258; В – окрашивание ядер погибших клеток PI.

В исследуемых фолликулах наблюдали единичные погибшие клетки (положительное окрашивание PI), расположенные на наружной границе фолликула. Локализация нескольких PI-окрашенных клеток в одной локальной области, скорее всего, связана с тем, что при механическом выделении часть клеток могла получить повреждения.

Методом ТЭМ было показано, что происходит активная пролиферация клеток теки в фолликуле при культивировании в системе «висячая капля» по сравнению с контрольным фолликулом, выделенным из овариальной ткани мыши непосредственно перед фиксацией, но находившимся на той же стадии, что и фолликул, впоследствии помещенный в культуру (рис. 25).



**Рисунок 25**. Наружная зона первичного многослойного овариального фолликула. А, Б, В – фолликул из группы контроля: наблюдаются единичные текальные клетки; Г, Д, Е – фолликул после 7 суток культивирования в системе «висячая капля»: происходит значительное увеличение числа текальных клеток фолликула.

БМ – базальная мембрана; КГ – клетка гранулезы; КТ – клетка теки, ЛВ – липидные включения; МТ – митохондрии; О – ооцит; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; Я – ядро.

Снаружи от базальной мембраны фолликула из группы контроля (рис.25 A, Б, В) наблюдали единичные клетки теки, хотя в зависимости от исходного размера фолликула количество клеток варьировало от 1-2 до 5-7 на срезе. Клетки гранулезы имели кубическую форму и плотно располагались на базальной мембране. У них была четко выражена полярность: ядро, занимающее значительную часть клетки, смещено к

базальной мембране, а органеллы, и в том числе комплекс Гольджи, сосредоточены на противоположной стороне, обращенной к ооциту. На наружной поверхности базальной мембраны фолликула, который культивировали *in vitro* в системе «висячая капля» (рис.25  $\Gamma$ , Д, Е), мы наблюдали несколько слоев клеток теки, что свидетельствует об их активной пролиферации. Клетки этого типа расположены более рыхло по отношению друг к другу, чем клетки гранулезы. Ядро в клетках теки более мелкое, чем ядро клеток гранулезы, отсутствует полярность, характерная для клеток гранулезы в связи с их эпителиальной природой и расположением на базальной мембране. В цитоплазме некоторых клеток теки обнаруживаются липидные включения. Возможно, данный запас липидов будет служить сырьем для синтеза стероидных гормонов на дальнейших этапах развития фолликула. В работе Ноттола и соавторов было проведено детальное изучение ультраструктуры фолликулов мыши, выделенных из состава яичника частично (с элементами стромы) или полностью, после культивирования *in vitro* в 96-ти луночных планшетах с низкоадгезивной поверхностью (Nottola et al., 2011). Морфологические характеристики клеток, описанные в данном исследовании, совпадают с нашими наблюдениями, что позволяет сделать вывод о пригодности системы «висячая капля» для культивирования овариальных фолликулов мыши *in vitro*. В условиях абсолютно неадгезивной поверхности (граница раздела двух сред - воздуха и культуральной среды в висячей капле), клетки теки не имеют возможности к расселению, что способствует сохранению трехмерной организации фолликула, в том числе сохранению целостности базальной мембраны. Это, в свою очередь, позволяет клеткам гранулезы сохранять правильное расположение на базальной мембране фолликула.

# 4.1.2. Культивирование овариальных фолликулов in vitro в 3D условиях в средах различного состава

В связи с тем, что на данный момент не существует стандартизованной среды для культивирования фолликулов *in vitro*, мы решили использовать в нашем исследовании среды различного состава. При подборе оптимального состава культуральной среды мы провели два типа экспериментов. 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. Всего было сформировано 6 экспериментальных групп: 1 группа - 5% FCS; 2 группа - 5% FCS + ФСГ (0,2 МЕ/мл); 3 группа - 10% FCS; 4 группа - 10% FCS + ФСГ (0,2 МЕ/мл); 5 группа - 10% FCS + bFGF
(0,1 мкг/мл); 6 группа - 10% FCS + bFGF (0,1 мкг/мл) + ФСГ (0,2 МЕ/мл). 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.

При культивировании овариальных фолликулов в среде с различным процентным содержанием сыворотки не наблюдали статистически значимых различий между значениями исследуемого параметра в группе 1 и группе 2. (рис.26).



**Рисунок 26.** Сравнение эффективности роста фолликулов и ооцитов в средах с различным содержанием сыворотки и с добавлением фактора роста (bFGF). По оси абсцисс указаны исследуемые группы. По оси ординат – среднее значение изучаемого параметра  $\frac{S \operatorname{nocn}}{S \operatorname{hav}}$  и ошибка среднего. \* - p<0,05, U-критерий Манна-Уитни.

После 7 суток культивирования площади фолликулов практически не изменялись, о чем свидетельствует значение коэффициента  $\frac{S \operatorname{посл}}{S \operatorname{нач}}$  (отношение площади фолликула в последний день культивирования к площади фолликула в первый день культивирования), близкое к единице. Однако происходило некоторое увеличение площади ооцита, а, следовательно, и его диаметра. Добавление в среду фактора роста (bFGF) вызывало статистически достоверное возрастание площади фолликула, площадь ооцита также увеличивалась, но статистически значимых различий между группами выявлено не было. Стимулирующий рост ооцитов и пролиферацию фолликулярных клеток эффект bFGF объясняется его ролью в процессах фолликулогенеза *in vivo*: считается, что именно он отвечает за активацию роста примордиальных фолликулов и стимулирует пролиферацию клеток теки и гранулезы в растущих фолликулах (Nilsson et al., 2001). Также bFGF стимулирует ангиогенез в текальном слое фолликула (Berisha et al., 2000; Liu et al., 2014) и ингибирует апоптоз в фолликулярных клетках (Hsueh et al., 1996; Lynch et al., 2000). Кроме того ранее в экспериментах по культивированию эксплантатов овариальной ткани *in vitro* показано, что в бессывороточной среде bFGF в концентрациях 0.1 мкг/мл и выше стимулирует рост фолликулов, но достоверно значимых различий с контролем выявлено не было даже при увеличении концентрации фактора в среде до 0,3 нг/мл (Garor et al., 2009).

Добавление в культуральную среду ФСГ достоверно улучшало рост фолликулов в группах 2 и 4 по сравнению с группами 1 и 3 (рис. 28). 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*» - процесс, когда ооцит теряет контакты с фолликулярными клетками и выходит из фолликула (рис. 27).



**Рисунок 27**. Выход ооцита из фолликула («овуляция *in vitro*»). А – 1-е сутки культивирования; Б – 3-и сутки культивирования; В – 5-е сутки культивирования, начало выхода ооцита из фолликула; Г – 7-е сутки культивирования, «овуляция *in vitro*» завершена, так как ооцит не был оплодотворен, начинается его организация.

Данный эффект закономерен, так как ФСГ стимулирует развитие фолликулов, вызывает повышение уровня экспрессии рецепторов к ЛГ на клетках гранулезы, что в свою очередь приводит к активизации рецепторов к EGF, участвующих в регуляции овуляторных процессов (El-Hayek et al., 2014). После выхода ооцита из состава фолликула происходило некоторое уменьшение размеров клеточного конгломерата, состоящего из клеток теки и гранулезы. Несмотря на то, что во всех экспериментальных группах не было статистически значимых различий по темпам роста ооцитов, наблюдается тенденция к возрастанию исследуемого параметра  $\frac{S \operatorname{посл}}{S \operatorname{нач}}$  в группе 6 по сравнению с другими группами (рис. 28). Данные наблюдения коррелируют с данными литературы. В работе бразильских исследователей (Almeida et al., 2015) было показано, что ФСГ совместно с FGF способствуют увеличению размеров ооцитов и фолликулов при культивировании *in vitro*.



**Рисунок 28.** Изменение эффективности роста фолликулов и ооцитов при добавлении ФСГ в среды для культивирования. По оси абсцисс указаны исследуемые группы. По оси ординат – среднее значение изучаемого параметра (S посл)/(S нач) и ошибка среднего. \* - p<0,05, U-критерий Манна-Уитни.

При сравнении площадей ооцитов в первый и последний дни культивирования мы убедились в том, что ооцит достоверно растет при культивировании *in vitro*. Наилучшие результаты были также получены при культивировании фолликулов в среде с добавлением и bFGF, и ФСГ (рис. 29).



**Рисунок 29.** 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.

Таким образом, положительная динамика роста фолликулов при культивировании *in vitro* в системе «висячая капля» наблюдается во всех экспериментальных группах. В средах, дополненных факторами роста и гормонами рост идет более интенсивно.

# 4.2. Реконструкция соматического окружения первичного многослойного овариального фолликула мыши

В предварительных сериях экспериментов было показано, что система «висячая капля» пригодна для культивирования первичных многослойных фолликулов *in vitro*. Также было установлено, что в средах минимального состава наблюдается положительная динамика роста фолликулов и ооцитов. Добавление факторов роста в среду способствует более интенсивному росту, однако, учитывая, что фолликул – многокомпонентная система, регулируемая большим количеством факторов, не представляется возможным выбрать небольшое количество факторов роста, которыми следует дополнить среду для культивирования, для достижения оптимальных условий. 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: фолликулов с клеточными сокультивирование элементами стромы яичника И сокультивирование фолликулов с МСК КМ.

# 4.2.1. 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) было показано, что в течение первых двух суток культивирования клетки и фолликул объединялись в единый агрегат (рис. 30). Уже на вторые стуки культивирования практически все стромальные клетки располагались на поверхности фолликула и сохраняли такое положение в течение всего срока культивирования. Вероятно, это обусловлено тем, что ооцит и фолликулярные клетки выделяют сигналы, привлекающие клеточные элементы стромы. Со своей стороны клетки стромы яичника выделяют ростовые факторы, которые могут стимулировать рост и развитие фолликула и ооцита в составе фолликула. Когда стромальные клетки окружали фолликул, происходило увеличение размеров как фолликула (мы измеряли площадь фолликула в пределах базальной мембраны), так и ооцита.



**Рисунок 30.** Сокультивирование фолликулов, выделенных из яичников GFP+ мышей с клеточными элементами стромы яичника, окрашенными липофильным красителем DiI. A – 1 сутки культивирования (клетки, окрашенные DiI, имеют розовую окраску при использовании светлопольного микроскопа); Б – 2 сутки культивирования; В – 3 сутки культивирования; Г – 4 сутки культивирования; Д – 5 сутки культивирования; Е – флуоресцентное окрашивание подтверждает объединение стромальных клеток (красная флуоресценция) и фолликула (зеленая флуоресценция) в единую структуру (лазерная сканирующая конфокальная микроскопия).

Данный результат можно объяснить тем, что в состав культуры клеточных элементов стромы яичника входят как клетки теки, так и клетки гранулезы. Известно, что между этими компонентами фолликула существует взаимовлияние. Так, например, клетки гранулезы выделяют факторы (IGF, KL), вызывающие дифференцировку клеток теки из мезенхимных клеток стромы яичника, в то время как клетки теки также выделяют факторы (EGF, TGFα, BMP-7), оказывающие влияние на рост фолликула (Orisaka et al., 2009).

Однако нас интересовал не только эффект, оказываемый клеточными элементами стромы яичника на рост фолликулов, но и организация полученных клеточнофолликулярных агрегатов. Так 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 (рис. 31).



Рисунок 31. Краевая зона агрегата, состоящего из фолликула и клеточных элементов стромы яичника. Стрелками указаны уплощенные наружные клетки.

Клетки, занимающие более центральное положение, лежат более рыхло, чем клетки на периферии и отличаются большим количеством митохондрий в цитоплазме (рис.32 A, Б, Г). Кроме того мы наблюдали существенные различия размеров и строения митохондрий в клетках на периферии реконструированного фолликула и в клетках более глубоких слоев. Так уплощенные наружные клетки содержали меньшее количество митохондрий, которые были более крупными и с большим просветом между кристами, в то время как во внутренних клетках митохондрии были более мелкими и имели более плотный матрикс (рис. 32 В.Г).



Рисунок 32. 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.

Аналогичные образцы реконструированного фолликула были исследованы методом сканирующей электронной микроскопии (рис. 33). На поверхности

реконструированного фолликула располагается слой клеток, отростки которых контактируют с клетками, занимающими более глубокое положение.



**Рисунок 33.** Поверхностные клетки реконструированного фолликула (сканирующая электронная микроскопия). А – уплощенная клетка, плотно примыкающая к поверхности фолликула (помечена звездочкой); Б – наружные клетки контактируют с расположенным ниже клеточным пластом при помощи множественных отростков (обозначены стрелочками).

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, делают попытки занять свое место в общей структуре реконструированного фолликула. Мы предполагаем, что уплощенные клетки – клетки стромы кортикального слоя яичника (в том числе среди них могут быть и текальные элементы), а округлые, рыхло расположенные клетки – клетки гранулезы.

### 4.2.2. Сокультивирование овариальных фолликулов с мезенхимными стволовыми клетками, выделенными из костного мозга мыши

МСК – мультипотентные клетки, которые могут быть выделены из различных источников: костного мозга (Yoshimatsu et al., 2015), жировой ткани (Shukla et al., 2015), пупочного канатика (Горкун, 2012) и т.д. В ряде работ изучали влияние МСК из различных источников на восстановление функции яичников, фолликулогенез в которых был прекращен воздействием химиотерапевтических агентов. Подобные эксперименты проводили на разных лабораторных животных. Кроликам, у которых инъекциями циклофосфамида вызывали снижение овариального резерва в яичниках, внутривенно вводили МСК КМ, после чего наблюдали повышение уровня эстрогена и VEGF, а также увеличение количества растущих морфологически нормальных фолликулов по сравнению с группой контроля (Abd-Allah et al., 2013). Сходные исследования были проведены на

крысах. МСК КМ инъецировали в яичники крыс, которым предварительно делали инъекции циклофосфамида с целью снижения функции яичников. После инъекции МСК было показано, что функции яичников улучшались по сравнению с контрольной группой, происходило восстановление эстрального цикла. МСК оказывали антиапоптотическое действие на клетки гранулезы (Fu et al., 2008). Сходные результаты были получены и на мышах (Lee et al., 2007). Инъекция МСК, выделенных из жировой ткани, также оказывали благотворное действие на функции яичников в циклофосфамидной модели (Sun et al., 2013). Однако во всех работах описан только эффект, оказываемый стволовыми клетками, однако не прослежена судьба этих клеток и возможные пути их дифференцировки.

В связи с этим мы предположили, что МСК КМ как минимум могут оказывать стимулирующее действие на рост фолликула при совместном культивировании в системе «висячая капля». Для проверки данной гипотезы мы культивировали фолликулы с суспензией МСК КМ (300- клеток и 1 фолликул на каплю) в системе «висячая капля» в течение 7и суток. В результате мы наблюдали увеличение размеров фолликула, уже начиная со второго дня культивирования (рис. 34).



**Рисунок 34.** Сокультивирование МСК, выделенных из костного мозга трансгенных мышей с экспрессией GFP, с первичным многослойным овариальным фолликулом, окрашенным липофильным красителем DiI, в системе «висячая капля». А – 1 сутки культивирования; Б – 2 сутки культивирования; В – 3 сутки культивирования; Г – 4 сутки культивирования; Д – 5 сутки культивирования; Е – 6 сутки культивирования; Ж – 7 сутки культивирования; З – флуоресцентное окрашивание подтверждает объединение клеток и фолликула в единую структуру (GFP+ MCK KM – зеленая флуоресценция; клетки фолликула, окрашенные DiI – красная флуоресценция).

Также нами было показано, что МСК КМ образуют с фолликулом единую структуру, как и клеточные элементы стромы яичника, однако этот процесс идет медленнее. В отличие от экспериментов по сокультивированию фолликулов с клетками стромы яичника, когда почти все клетки образовывали общий агломерат с фолликулом уже на вторые сутки, МСК КМ начинали формировать общую структуру с фолликулом только на третьи сутки сокультивирования. Кроме того, часть МСК КМ не вступала в контакт с фолликулом и до конца культивирования находилась в висячей капле либо в виде суспензии единичных клеток, либо в виде небольших клеточных агломератов (рис.34 В-Ж). Анализ окрашенных образцов с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (рис.34 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 это гипотезы свидетельствуют данные, полученные нами методом сканирующей электронной микроскопии (рис. 35).



Рисунок 35. 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 - более мелкие и округлые. Данный тип клеток располагался снаружи от текального слоя фолликула, клетки которого имеют уплощенную форму (рис. 35 Б, В). Особый интерес представляют клетки, лежащие непосредственно на границе с текальным слоем фолликула (рис 35 В, Г). Данные клетки имеют веретеновидную форму, однако они толще, чем располагающиеся рядом клетки теки. Эти клетки продолжают контактировать с шарообразными МСК, но на поверхности у них появляются отростки, которыми клетки взаимодействуют также и с текальным слоем. Также 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. 35 Б). Данные наблюдения позволяют предположить, что это именно клетки

из популяции МСК КМ. Округлые клетки из той же популяции имеют на поверхности большое количество коротких отростков, напоминающих микровыросты (рис. 36). Возможно, эти отростки служат для взаимодействия с соседними клетками при агрегации МСК КМ с фолликулом.



Рисунок 36. Микровыросты на поверхности округлых клеток.

При анализе образцов с помощью трансмиссионной электронной микроскопии было показано, что на поверхности реконструированных фолликулов располагаются уплощенные клетки, на поверхности которых имеются микровыросты (рис. 37). Уплощенные клетки лежат в 2-3 слоя в черепитчатом порядке, слегка наползая друг на друга. В этих клетках хорошо развит шероховатый эндоплазматический ретикулум, а митохондрии имеют продолговатую форму. Под уплощенными клетками располагаются более крупные кубические клетки. В данных клетках митохондрии имеют более округлую форму, ЭПР менее развит. Количество слоев этих клеток существенно превышает данный параметр в контрольном фолликуле. Морфология этих клеток соответствует морфологии клеток гранулезы. Тот факт, что в реконструированном фолликуле таких клеток существенно больше по сравнению с контрольными образцами позволяет предположить, что клетки МСК КМ в реконструированном фолликуле тимулируют пролиферацию клеток гранулезного слоя.



**Рисунок 37.** Ультраструктура поверхностных клеток и клеток, занимающих более центральное положение. А – уплощенные поверхностные клетки, х6000; Б – микровыросты на поверхности уплощенных клеток, х15000; В – внутренние плотно упакованные клетки, х4000; Г – граница уплощенных и кубических клеток, х5000. МВ – микровыросты; КК – кубические клетки; УК – уплощенные клетки; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; Я – ядро.

#### 4.2.3. Молекулярно-биологическое исследование реконструированных фолликулов

Для того чтобы выяснить изменяется ли генная экспрессия в клетках при сокультивировании МСК КМ с фолликулом был проведен количественный ПЦР-анализ.

#### 4.2.3.1. Сравнение уровня экспрессии маркеров стволовых клеток

Для изучения изменения уровня экспрессии позитивных маркеров стволовости (CD73, 90, 105) и негативных маркеров стволовости (CD34, 45) были подготовлены следующие пробы: кДНК из МСК КМ после 2D культивирования, кДНК из МСК КМ после 3D культивирования, кДНК из фолликула после культивирования в системе «висячая капля», а также к ДНК из фолликула, реконструированного методом сокультивирования с МСК КМ. Для интерпретации полученных результатов производило нормирование уровня экспрессии всех исследуемых генов по GFP, так как в этой серии экспериментов были использованы фолликулы и МСК КМ, полученные от GFP+ мышей.

При изучении изменения уровня экспрессии за условную единицу принимали уровень экспрессии интересующих генов в МСК КМ, культивированных в 2D условиях.

В двух контрольных группах (МСК КМ 2D и МСК КМ 3D) CD34 - маркер ранних кроветворных предшественников, экспрессировался на очень низком уровне, в то время как в контрольных фолликулах и в экспериментальной группе (фолликул +МСК КМ) уровень экспрессии был в 11 и 30 раз выше, соответственно (рис. 38).



**Рисунок 38.** Сравнение уровня экспрессии негативного маркера МСК CD34 в 2D и 3D культуре МСК, в овариальном фолликуле и при сокультивировании клеток с фолликулом.

Экспрессия другого негативного маркера MCK – CD45 - общего лейкоцитарного антигена, была выявлена и в группе MCK KM 2D, и в группе MCK KM 3D (относительный уровень экспрессии – 1 и 0,75, соответственно), в то время как в фолликуле и в экспериментальной группе экспрессия данного гена практически отсутствовала (рис. 39).



**Рисунок 39.** Сравнение уровня экспрессии негативного маркера МСК CD45 в 2D и 3D культуре МСК, в овариальном фолликуле и при сокультивировании клеток с фолликулом.

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 из недифференцированного состояния. Наличие экспрессии CD45 в 2D и 3D культуре МСК КМ можно объяснить тем, что в них содержались примеси лейкоцитарных клеток. В диссертационной работе Кожевниковой М.Н. (Кожевникова, 2008) было показано, что данные клетки сохраняются в культуре МСК КМ до 4 пассажа. Практически полное отсутствие экспрессии фолликуле этого маркера В И экспериментальной пробе можно объяснить тем, что в норме в фолликуле не присутствуют лейкоцитарные клетки, а в реконструированный фолликул они не входят, так как не все МСК КМ агрегируют вокруг фолликула. Считая, что агрегации клеток способствуют индуцирующие сигналы от фолликула, можно предположить, что CD45 позитивные клетки не чувствительны к данным сигналам, в силу чего и не входят в состав реконструированного фолликула.

Также была исследована экспрессия позитивных маркеров МСК. Так CD73 экспрессировался в культуре 2D МСК (относительный уровень экспрессии - 1), экспрессия данного маркера была несколько снижена при культивировании МСК в 3D условиях (относительный уровень экспрессии - 0,6). В фолликулах был зарегистрирован наибольшей уровень экспрессии данного гена - 1,75, в то время как в экспериментальной

группе его экспрессия была минимальной (относительный уровень экспрессии - 0,15) по сравнению с другими пробами (рис.40).



**Рисунок 40.** Сравнение уровня экспрессии позитивного маркера МСК СD73 в 2D и 3D культуре МСК, в овариальном фолликуле и при сокультивировании клеток с фолликулом.

Понижение уровня экспрессии данного гена в экспериментальной группе может быть признаком того, что МСК КМ 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.25). Мы предполагаем, что CD73 экспрессируется на более высоком уровне в активно пролиферирующих клетках, что подтверждается изменением уровня экспрессии данного гена в МСК 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 МСК КМ и клетки наружной оболочки фолликула быстрее уходят в дифференцировку. Данный результат представляется очень интересным и нуждается в дальнейшем изучении.

Другим позитивным маркером мезенхимных стволовых клеток является CD90. Его экспрессия в MCK KM после 2D и 3D культивирования находилась приблизительно на одном и том же уровне (относительные уровни экспрессии - 1 и 0,7, соответственно), а вот экспрессия данного гена в фолликуле была в 60 раз выше. В экспериментальной группе (фолликул + MCK KM) уровень экспрессии снижался, однако все равно превосходил контрольные образцы примерно в 30 раз (рис. 41).



**Рисунок 41**. Сравнение уровня экспрессии позитивного маркера МСК СD90 в 2D и 3D культуре МСК, в овариальном фолликуле и при сокультивировании клеток с фолликулом.

Такие показания уровня экспрессии связаны с тем, что согласно данным литературы клетки гранулезы экспрессируют CD90 наряду с другими маркерами стволовости CD29, CD44, CD105, CD117 и CD166 (Dzafic et al., 2013). В фолликулах при культивировании *in vitro* увеличивается количество клеток гранулезы, что может приводить к повышению уровня экспрессии гена CD90. Снижение уровня экспрессии данного гена в экспериментальной пробе можно объяснить тем, что MCK, дифференцирующиеся в направлении стероидогенных клеток, предположительно клеток теки, вносят свой вклад общий уровень экспрессии и снижают его.

Также мы изучали уровень экспрессии позитивного маркера стволовости – CD105. В МСК, культивированных в 3D условиях, уровень экспрессии данного гена был несколько выше, чем в МСК из 2D условий культивирования (относительные уровни экспрессии - 1,45 и 1, соответственно). В фолликуле экспрессия данного гена зарегистрирована, однако уровень ниже, чем в МСК КМ (относительный уровень экспрессии - 0,3). В экспериментальной группе (фолликул + МСК КМ) уровень экспрессии данного гена был ниже (относительный уровень экспрессии - 1,2), чем в МСК КМ из 3D условий, но выше, чем в фолликуле без МСК КМ и в МСК КМ из 2D системы культивирования (рис. 42).



**Рисунок 42.** Сравнение уровня экспрессии позитивного маркера МСК CD105 в 2D и 3D культуре МСК, в овариальном фолликуле и при сокультивировании клеток с фолликулом.

CD105 – участник рецепторного комплекса к фактору роста TGFβ (Nassiri et al., 2011). Во многих работах показано, что на клетках фолликула есть эти рецепторы, подробно этот вопрос был рассмотрен нами в обзоре литературы (раздел 2.2.3). Считается, что экспрессия CD105 связана с пролиферацией клеток, а также с гипоксией (Duff et al., 2003). В ряде работ было показано, что при культивировании МСК в 3D условиях внутри сфероидов формируется зона гипоксии (Сабурина, Репин, 2010). Возможно, что повышение уровня экспрессии CD105 в клетках из 3D системы культивирования может быть связано с тем, что в МСК КМ происходят морфологические изменения, связанные с занимаемым положение в составе агрегата, а также с появлением локальных зон гипоксии. Промежуточное значение уровня экспрессии CD105 в экспериментальной группе (фолликул + МСК КМ) можно объяснить тем, что повышается количество клеток, на поверхности которых выставлен рецептор к TGF<sub>β</sub>, а также с возможным возникновением локальных участков гипоксии. Однако при исследовании образцов методом трансмиссионной микроскопии не было выявлено морфологических изменений и зон запустения в составе реконструированного фолликула.

# **4.2.3.2.** <u>Сравнение уровня экспрессии факторов роста и маркеров стероидогенных</u> клеток

Для изучения изменения уровня экспрессии факторов роста и маркеров стероидогенных клеток были подготовлены следующие пробы: кДНК из МСК после 2D культивирования, кДНК из МСК после 3D культивирования, кДНК из фолликула после культивирования в системе «висячая капля», а также к ДНК из фолликула, реконструированного методом сокультивирования с МСК КМ. Для интерпретации полученных результатов было произведено нормирование уровня экспрессии всех исследуемых генов по GFP. При изучении изменения уровня экспрессии за условную единицу принимали уровень экспрессии интересующих генов в фолликулах.

В ходе исследования было показано, что уровень экспрессии IGF I в МСК после культивирования в 2D и 3D условиях превышает уровень экспрессии в фолликуле в 6,5 и 12 раз, соответственно. Наивысший уровень экспрессии был зарегистрирован в экспериментальной группе (фолликул + МСК КМ), он был в 17 раз выше, чем в фолликуле без МСК КМ (рис.43).



**Рисунок 43.** Сравнение уровня экспрессии фактора роста IGF I в 2D и 3D культуре МСК, в овариальном фолликуле и при сокультивировании клеток с фолликулом.

По данным литературы известно, что некоторый уровень экспрессии IGF I обнаруживается как в клетках гранулезы, так и в клетках теки (Armstrong et al., 2000), а уровень экспрессии данного фактора роста возрастает по мере роста фолликула (Palma et al., 2012). МСК также выделяют данный фактор роста (Granero-Moltó et al., 2011). В связи со всем выше сказанным повышение уровня экспрессии данного фактора роста при сокультивировании фолликулов с МСК представляется закономерным. Кроме того существенное повышение уровня экспрессии в экспериментальной группе по сравнению с МСК КМ может говорить о стимулирующем воздействии, оказываемом МСК КМ на фолликул.

Уровень экспрессии другого фактора роста из того же семейства, что и предыдущий, IGF II существенно менялся при переходе от 2D к 3D условиям культивирования. Так уровень экспрессии изучаемого фактора роста в МСК КМ из 2D культуры в 44 раза превышал уровень экспрессии в фолликуле. В МСК КМ из 3D культуры уровень экспрессии составил 1,81, а в экспериментальной группе (фолликул + MCK KM) – 2,65 (рис. 44).



**Рисунок 44**. Сравнение уровня экспрессии фактора роста IGF II в 2D и 3D культуре MCK, в овариальном фолликуле и при сокультивировании клеток с фолликулом.

Полученный результат представляется очень интересным, так как четко видна разница, обусловленная лишь изменением условий культивирования (сравнение 2D и 3D MCK). Данный результат мы объясняем тем, что, как правило, если клетки секретируют те или иные факторы, они имеют соответствующие рецепторы. Аутокринное воздействие, в том числе и при фолликулогенезе было показано для многих факторов, относящихся к различным семействам (Reis et al., 2000). В связи с этим при культивировании клеток в 2D условиях в большом объеме среды происходит распределение вырабатываемых клетками ростовых факторов по всему объему и для того, чтобы произошло аутокринное воздействие количество данного фактора. При культивировании в 3D системах в небольшом объеме среды происходит насыщение рецепторов лигандами, в силу чего клетки могут снижать уровень экспрессии гена, отвечающего за выработку фактора. При сравнении проб из 3D систем культивирования показано, что наибольший уровень экспрессии зарегистрирован в экспериментальной группе (фолликул +МСК КМ). Мы видим этому два возможных

объяснения, во-первых, МСК КМ могут оказывать стимулирующее воздействие на фолликул, а, во вторых, как мы предполагаем, МСК КМ способны дифференцироваться в направлении стероидогенных клеток, а именно в клетки теки. Известно, что экспрессия IGF II характерна именно для этого типа клеток в составе фолликула (Armstrong et al., 2000).

Для подтверждения направленной дифференцировки МСК КМ в сторону стероидогенных фолликулярных клеток было проведено сравнение экспрессии генов, специфичных для овариальной ткани. Так нами было показано, что в экспериментальной группе (при сокультивировании фолликулов с МСК КМ) повышается уровень экспрессии ЛГ-рецептора по сравнению фолликулом, культивируемым без МСК КМ (относительный уровень экспрессии – 1,45, если принять уровень экспрессии в фолликуле без МСК за единицу). В МСК КМ как при 2D, так и 3D условиях культивирования, экспрессия данного гена не выявлена, как и предполагалось (рис. 45).



**Рисунок 45.** Сравнение уровня экспрессии LHR в 2D и 3D культуре МСК, в овариальном фолликуле и при сокультивировании клеток с фолликулом.

Небольшое различие в уровнях экспрессии гена LHR в двух пробах мы связываем с тем, что рецепторы к ЛГ есть как на клетках теки, так и в некотором количестве на клетках гранулезы. Однако общее повышение уровня экспрессии гена, кодирующего рецептор к ЛГ, в экспериментальной группе (фолликул + MCK) может говорить о направленной дифференцировке МСК КМ в сторону текальных клеток, но мы не можем исключить и простого стимулирующего воздействия МСК на клетки фолликула.

Также мы проанализировали уровень экспрессии гена Сур17а1, кодирующего фермент 17-альфа-гидроксилазу, которая в клетках теки сначала катализирует синтез 17гидроксипрегненолона и 17-гидроксипрогестерона из прегненолона и прогестерона. 17гидроксипроизводные впоследствии под контролем этого же фермента превращаются в дегидроэпиандростерон и андростенедион. Нами было показано, что в МСК экспрессия данного гена отсутствовала, в то время как в экспериментальной группе (фолликул + МСК КМ) уровень экспрессии Сур17а1 превышал уровень экспрессии в фолликуле без МСК в 10,5 раз (рис. 46).





Мы считаем, что столь большое различие в уровнях экспрессии подтверждает нашу гипотезу о направленной дифференцировке МСК КМ в направлении текальных клеток при сокультивировании МСК с фолликулом. При культивировании индивидуальных фолликулов происходит нарастание клеток теки, однако их количество существенно меньше, чем количество МСК, которые вошли в состав реконструированного фолликула. Разница в уровнях экспрессии служит подтверждением этому.

Еще одним геном, который экспрессируется в стероидогенных клетках является Сур19а1, кодирующий ароматазу – фермент, катализирующий реакцию превращения андрогенов в эстрогены в клетках гранулезы. Результаты наших экспериментов показали, что в МСК КМ данный ген не экспрессируется, в экспериментальной группе (фолликул + МСК КМ) уровень экспрессии Сур19а1 выше, чем в фолликуле без МСК в 3,3 раза (рис. 47).



**Рисунок 47.** Сравнение уровня экспрессии Сур19а1 в 2D и 3D культуре МСК, в овариальном фолликуле и при сокультивировании клеток с фолликулом.

Разница в уровнях экспрессии Cyp19a1 между группами «фолликул +MCK KM» и «фолликул без MCK» меньше, чем у Cyp17a1. Данный результат хорошо укладывается в выдвигаемую нами гипотезу о дифференцировке MCK KM в сторону текальных элементов, так как активация синтеза андрогенов клетками теки способствует повышению синтеза эстрогенов клетками гранулезы в силу существующего взаимодействия между стероидогенными клетками фолликула (Orisaka et al., 2009). Таким образом, увеличение количества текальных клеток в составе реконструированного фолликула может стимулировать наблюдаемое нами в эксперименте повышение уровня экспрессии ароматазы в клетках гранулезы этого же фолликула.

По совокупности полученных нами результатов мы можем подытожить, что наши данные (повышение уровня экспрессии CD34, LHR и Cyp17a1, снижение уровня экспрессии CD73), могут свидетельствовать о направленной дифференцировке MCK KM в текальные клетки при сокультивировании MCK KM с фолликулом в 3D условиях. Таким образом, предложенная нами модельная система (сокультивирование фолликулов с MCK KM в «висячей капле») может быть использована для разработки технологии культивирования овариальных фолликулов с целью получения зрелых ооцитов, компетентных к оплодотворению и развитию.

## 4.3. Подбор параметров лазерного воздействия на преимплантационные эмбрионы мыши

Следующим этапом наших исследований стала разработка технологии микрохирургии преимплантационных эмбрионов при помощи системы «оптический скальпель-пинцет». В связи с тем, что микрохирургическое воздействие вообще, и процедура биопсии в частности, подразумевает воздействие как на оболочку эмбриона (*zona pellucida*), так и на сами клетки, причем под воздействие попадает и мембрана, и цитоплазма, мы отрабатывали параметры режима лазерного воздействия для трех различных типов повреждений: мембраны, цитоплазмы и оболочки эмбриона.

### 4.3.1. Определение оптимальных параметров лазерного воздействия на цитоплазматическую мембрану клеток эмбриона

В предварительной серии экспериментов было разработано три варианта протокола для проведения лазерного воздействия на эмбрионы мыши. В качестве модели воздействия на плазматическую мембрану клеток эмбриона была выбрана модель слияния бластомеров эмбриона на стадии двух клеток. Выстрелы лазерным лучом производили точно по линии контакта бластомеров в трех положениях: точно по центру, правее и левее места первого удара (рис.48).



Рисунок 48. Двухклеточный эмбрион мыши. Звездочками отмечены места выстрелов.

Первую серию опытов проводили при наведенном фокусе и с использованием низких энергий у (0,6 – 1,52 мкДж). Во второй серии опытов лазерное воздействие проводили при наведенном фокусе и с использованием более высоких энергий импульса (1,6 - 4 мкДж). В третьей серии опытов выстрелы проводились при слегка расфокусированном микроскопе и низких значениях энергии порядка 1,4-1,55 мкДж.

Третий вариант протокола позволил получить наилучшие результаты по слиянию бластомеров эмбрионов, эффективность которого составила 45%. Слияние происходило в среднем за 1,5 часа. Первым признаком слияния было сглаживание угла между бластомерами (рис. 49 Б, В). Затем происходило объединение клеток, и эмбрион принимал шарообразную форму (рис. 49 Г – Е).



**Рисунок 49**. Слияние бластомеров 2-х клеточного эмбриона. А - эмбрион до выстрела; Б - сразу после выстрела; В - через 30 минут после выстрела; Г - сразу после второго выстрела; Д - окончательный вид эмбриона; Е - флуоресцентное окрашивание поверхностной мембраны подтверждает слияние бластомеров (лазерная сканирующая конфокальная микроскопия).

Эмбрионы, бластомеры которых успешно слились, отмывали в 2-3 каплях чистой среды M2 (Millipore, CША), окрашивали эндоцитозным красителем FM4-64 (Invitrogen, США) при +4°C в течение 20 минут. При температуре +4°C краситель окрашивает поверхность клеточной мембраны, но не проходит внутрь, так как интенсивность эндоцитоза при такой температуре резко снижена. Затем эмбрионы отмывали от краски при температуре +4°C в 2-3 каплях чистой среды, после чего фиксировали 4% параформальдегидом примерно 2-3 минуты, отмывали в капле среды и изготавливали препарат «давленая капля» для анализа методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Флуоресцентное окрашивание мембраны эмбриона красителем FM4-64 (Invitrogen, США) подтверждает полное слияние бластомеров (Рис.49 Е).

Однако при последующей оценке жизнеспособности эмбрионов выяснилось, что разработанные протоколы не обеспечивают хорошей выживаемости клеток после слияния, вероятно, по причине избыточного высокоэнергетического воздействия на эмбрионы.

Для повышения уровня выживаемости эмбрионов после воздействия мы сократили число лазерных импульсов с трех до одного и постепенно снижали их энергию. Наиболее эффективными были эксперименты, в которых энергия была в диапазоне 0,5 – 0,3 мкДж. Так в опытах по слиянию бластомеров при энергии лазера 0,5 мкДж было использовано 32 эмбриона, из них успешно слились 9 эмбрионов (рис. 50 А-Г). Эффективность слияния составила 28,1%. После процедуры слияния эмбрионы развивались в инкубаторе до стадии бластоцисты (рис. 50 Д-К). Процент выживших эмбрионов – 22,2% (Ильина и соавт., 2013). В экспериментах по слиянию бластомеров эмбрионов, из них успешно слились 6 эмбрионов (рис. 51). Эффективность слияния составила 35,3%. Процент выживших и развивавшихся эмбрионов – 50%.



**Рисунок 50**. 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 после подачи лазерного импульса; Г - через 30 минут после подачи лазерного импульса; Д - первый день после облучения (первое деление); Е - утро второго дня после облучения; Ж - вечер второго дня после облучения (компактная морула); З - третий день после облучения (бластоциста); И - флуоресцентное окрашивание клеток бластоцисты красителями *Hoechst 33258* (Sigma, CША) (флуоресцентная микроскопия); К - флуоресцентная микроскопия).



**Рисунок 51.** Слияние бластомеров 2-х клеточного эмбриона и последующее развитие эмбриона при энергии лазерных импульсов 0,4 мкДж. А - эмбрион до подачи лазерного импульса; Б - через 45 минут после подачи лазерного импульса; В - первый день после лазерного воздействия; Г - второй день после лазерного воздействия; Д - третий день после лазерного воздействия; Е - четвертый день после лазерного воздействия; Ж - флуоресцентное окрашивание клеток бластоцисты красителем *Hoechst 33258* (Sigma, США) (флуоресцентная микроскопия); З - флуоресцентная микроскопия).

В опытах по слиянию бластомеров эмбриона на стадии двух клеток при энергии лазерного импульса 0,3 мкДж было использовано 23 эмбриона, из которых 5 успешно слились. Эффективность процедуры составила 21,7%. Процент выживших и развившихся до стадии бластоцисты эмбрионов – 60%.

Наилучшие результаты в опытах по слиянию были получены при энергии лазерных импульсов 0,35 мкДж. В этой серии экспериментов было задействовано 9 эмбрионов на стадии двух клеток. Из них слились 8 эмбрионов. Таким образом, эффективность процедуры составила 88,9%.

Общая эффективность процедуры слияния бластомеров эмбриона на стадии двух клеток, проводившейся по новому протоколу, составила 34,57% (Ilina et al., 2012).

После достижения эмбрионами стадии бластоцисты были изготовлены препараты по Тарковскому с целью получения митотических хромосомных пластинок, как эмбрионов из группы контроля, так и эмбрионов из опытной группы. В норме кариотип мыши состоит из 40 хромосом. На рисунке видно, что в клетках эмбрионов из опытной группы (рис. 52 Б, В) количество хромосом существенно больше, чем в клетках эмбрионов из группы контроля (рис.52 А).



**Рисунок 52.** Митотические хромосомные пластинки. А - хромосомная пластинка эмбриона из группы контроля; Б, В - хромосомные пластинки эмбрионов из опытной группы.

Таким образом, после визуальной оценки препаратов кариотипа эмбрионов можно заключить, что в результате эксперимента были получены жизнеспособные тетраплоидные эмбрионы мыши.

Подобранный вариант протокола с однократным воздействием на мембрану бластомеров обеспечивает выживание эмбрионов после процедуры слияния, в отличие от протокола, в котором желаемый результат получали после множественного импульсного воздействия. Стадии развития эмбрионов из опытной группы наступали в соответствии с таблицами нормального развития (Дыбан и соавт., 1975). Однако в зависимости от величины энергии импульса, морфология развивающихся эмбрионов несколько различалась (рис.53).



**Рисунок 53**. Сравнение развития эмбрионов на второй и третий день после лазерного воздействия. А, В - эмбрион после воздействия лазерного импульса с энергией 0,5 мкДж; Б, Г - эмбрион после воздействия лазерного импульса с энергией 0,4 мкДж.

Так на представленном рисунке 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 стадии морулы (на второй день после воздействия) насчитывается большее количество клеток. Однако, и в том, и в другом случае эмбрионы выживают и развиваются до стадии бластоцисты. Таким образом, 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 во главе с А.К. Шахбазяном 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. В связи с этим выживание эмбрионов после воздействия лазером с меньшей длиной импульса (фемтосекундного), на базе которого создана наша установка, является закономерным.

### 4.3.2. Определение оптимальных параметров лазерного воздействия на цитоплазму клеток эмбриона

В эксперименте было использовано 20 эмбрионов на стадии двух клеток. Эмбрионы были разделены на две группы опыт 15 эмбрионов и контроль 5 эмбрионов. Основываясь на данных предыдущей серии экспериментов по воздействию на мембрану бластомеров, в данной серии по каждому бластомеру эмбриона производили воздействие импульсом с энергией 0,2-0,3 мкДж. Именно в этом диапазоне энергии мы наблюдали видимое воздействие на цитоплазму в виде всплеска, но не происходило нарушения целостности мембраны бластомеров и не происходило разрушения клеток. Для того чтобы убедится в жизнеспособности эмбрионов, их под контролем стереомикроскопа помещали в лунки заранее подготовленного четырехлуночного планшета для культивирования и ставили в инкубатор (37°C, 5%CO2, 98% влажности).

Эмбрионы, как из опытной, так и из контрольной группы развивались в соответствии с таблицами нормального развития (рис. 54), то есть не было зарегистрировано аномалий развития.



**Рисунок 54.** Выживание эмбрионов после лазерного воздействия на цитоплазму бластомеров. (А) эмбрион до воздействия; (В) на 1-е сутки после воздействия; (С) на 2-е сутки после воздействия.

Таким образом, лазерное воздействие непосредственно на цитоплазму клеток эмбриона не оказывает влияния на последующее развитие эмбриона. Данный результат закономерен, так как при воздействии не повреждали ядро клеток, а, следовательно, и содержащийся в нем генетический материал.

## 4.3.3. Определение оптимальных параметров лазерного воздействия на оболочку эмбриона мыши

В экспериментах было задействовано 40 двухклеточных эмбрионов (1,5 сут. развития), которые были разделены на группы опыта и контроля (25 и 15 штук,

соответственно). В ходе эксперимента у эмбрионов разрушали небольшой участок *ZP*. Для этого требовалось примерно 8-10 импульсов со средней энергией 1,5 мкДж. Данный уровень энергии воздействия был выбран, так как при более низкой энергии не было видимого эффекта повреждения *ZP*, при более высоких значениях энергии происходило кипение манипуляционной среды в зоне воздействия, а эмбрион отскакивал. После манипуляций эмбрионы отмывали в 3-4 каплях стерильной среды. Затем эмбрионы культивировали в 4-х луночных плашках на среде для культивирования M16 (Millipore, CША) под слоем минерального масла, сбалансированного со средой, в течение 3 суток в условиях инкубатора (37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 98% влажности).

По прошествии указанного времени культуру снимали, делали прижизненные фотографии, а затем окрашивали ядерными красителями *Hoechst 33258* (Sigma, CШA) и *PI* (Invitrogen, CШA). Окрашивание проводили при комнатной температуре в течение 40 минут одновременно обоими красителями. Затем эмбрионы отмывали в 3-4 каплях чистой среды для манипуляций, фиксировали 4% параформальдегидом в течение 2-3 минут, затем отмывали в 2-3 каплях среды. После этого изготавливали препараты «раздавленная капля».

Все эмбрионы из опытной группы развивались согласно таблицам нормального развития. На третий день инкубации в опытной группе зарегистрировали 23 бластоцисты с хэтчингом, 1 морулу и 1 бластоцисту без хэтчинга. Проводили цитологический анализ, результаты которого приведены на рисунках, представленных ниже. Флуоресцентное окрашивание эмбрионов показало отсутствие погибших клеток (отрицательное окрашивание *PI*) (рис. 55, 56). В контрольной группе по окончании культивирования наблюдали бластоцисты без хэтчинга. Отсутствие погибших клеток подтверждает отрицательное окрашивание *PI* (рис. 57).



**Рисунок 55**. Бластоциста после процедуры лазерного вспомогательного хэтчинга: А - бластоциста выходит из *zona pellucida* через надрез, сделанный лазерным скальпелем; Б - все клетки бластоцисты не имеют повреждений ("+" *Hoechst 33258*-окрашивание, "-" *PI*).



**Рисунок 56**. Отставший в развитии эмбрион (морула) (А). Б - Все клетки эмбриона не имеют повреждений - "+" *Hoechst 33258*-окрашивание; В - и "–" окрашивание *PI*.



**Рисунок 57**. Бластоциста из группы контроля с морфологической аномалией (А). Б - Все клетки эмбриона не имеют повреждений - "+" *Hoechst 33258*-окрашивание; В - "-" окрашивание *PI*.

В ходе эксперимента по выживанию эмбриона после процедуры вспомогательного лазерного хэтчинга также регистрировали способ выхода бластоцисты из блестящей оболочки. Согласно данным литературы существует один предпочтительный способ выхода бластоцисты мыши из оболочки – вперед трофэктодермой (Alarcon and Marikawa, 2008).

В ходе описанных выше экспериментов разрез ZP проводили в том месте эмбриона, где клетки максимально отстоят от оболочки. При таком воздействии меньше шансов нанести повреждения клеткам эмбриона. Через полученное отверстие и происходило вылупление бластоцисты, причем, как правило, эмбриобластом вперед (рис. 58).



Рисунок 58. Вылупление бластоцист эмбриобластом вперед: А - бластоциста №1; Б - бластоциста №2.

105

Таким образом, эмбрион использовал для вылупления уже имеющееся отверстие в блестящей оболочке, хотя вылупление в большем проценте случаев проходило способом, более характерным для эмбрионов человека, чем для эмбрионов мыши.

#### 4.4. Биопсия редукционного тельца

В этой серии экспериментов использовали 35 двухклеточных эмбрионов (1,5 сут. развития) и 12 зигот мыши (0,5 сут. развития) для отработки методики по разрезанию блестящей оболочки, а также 10 эмбрионов и 10 МІІ ооцитов мыши для проведения биопсии редукционного тельца.

В ходе работы производили разрез *ZP* с целью получения отверстия, достаточного для извлечения редукционного тельца. Для этого давали около 100 импульсов, энергия каждого из которых была в среднем 4мкДж. Повышение уровня энергии по сравнению с предыдущей серией экспериментов связано с изменениями, внесенными разработчиками установки «оптический скальпель-пинцет» в её конструкцию. Успешное разрезание блестящей оболочки без повреждения эмбриона было проведено в 34 из 35 случаев.

Первая серия экспериментов по изъятию редукционного тельца из МІІ ооцитов увенчалась успехом в 4 случаях из 10. Вторая серия, проведенная на зиготах, была успешной в 6 случаях из 12. Для проведения биопсии сначала проводился выбор места перфорирования *ZP*, так чтобы лазерными импульсами не повредить эмбрион или редукционное тельце (рис. 59 А). Затем лазерными импульсами делали отверстие в оболочке (рис. 59 Б), после чего с помощью оптического пинцета извлекали редукционное тельце (рис. 59 В).



**Рисунок 59.** Биопсия редукционного тельца. А - ориентация эмбриона и выбор места перфорирования *zona pellucida*; Б - отверстие в оболочке, полученное с помощью лазера, достаточное для выхода редукционного тельца, В - извлечение редукционного тельца с помощью оптического пинцета через полученное отверстие; 1 - *zona pellucida*; 2 – редукционное тельце; 3 – эмбрион на стадии зиготы; 4 – полученное отверстие; 5 – место, выбранное для перфорирования.

При удачной биопсии редукционное тельце, захваченное лазерным пинцетом, выходило за пределы ZP через отверстие в ней. Однако интерес представляют и причины неудач проведения этой микрохирургической операции. В отдельных случаях редукционное тельце повреждалось малыми частицами разрушенной ZP и теряло целостность. Также успех процедуры во многом зависел от того, насколько сильно редукционное тельце зажато между эмбрионом и ZP. После первых неудач перед проведением процедуры мы стали оценивать перспективность эмбриона по возможности перемещения редукционного тельца под ZP с помощью оптического пинцета. Для этого в начале процедуры, еще до локального повреждения ZP проводился захват PT оптическим пинцетом для проверки его мобильности. На рисунке 60 представлена схема этой процедуры.



**Рисунок 60**. Схема эксперимента по перемещению редукционного тельца под *zona pellucida* с помощью оптического пинцета. Стрелкой указано направление перемещения редукционного тельца.

В том случае, если РТ передвигалось под ZP под воздействием оптического пинцета (рис. 61), 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). Таким образом, эффективность применения установки для проведения биопсии редукционного тельца составляет 50%, при условии, что редукционное тельце может свободно перемещаться под оболочкой при захвате оптическим пинцетом.



**Рисунок 61**. Перемещение редукционного тельца с помощью оптического пинцета под *zona pellucida* (покадровая съемка). Время между кадрами – 2 секунды. Кружок – метка оптического пинцета.

В клинической практике ВРТ биопсию РТ часто проводят на стадии двух бластомеров. Мы также проводили биопсию редукционного тельца на стадии двух бластомеров (1,5 сут. развития). Схема процедуры биопсии на данной стадии развития приведена на рисунке 62 и в целом совпадает с описанным выше методом извлечения РТ на стадии зиготы.


**Рисунок 62.** Схема процедуры биопсии редукционного тельца эмбриона на стадии двух клеток. А – эмбрион до воздействия; Б – перфорирование ZP; В – захват редукционного тельца оптическим пинцетом; Г – извлечение редукционного тельца из-под оболочки эмбриона (Il'ina et al., 2012).

Эффективность процедуры биопсии на данной стадии развития составила 58%: в 7 случаях из 12 процедура прошла успешно (Il'ina et al., 2012). Повышение эффективности процедуры мы связываем с тем, что полностью произошло выделение редукционного тельца, он не связано с бластомерами, и это облегчает захват и извлечение объекта с помощью оптического пинцета. Пространственная организация клеток под оболочкой также облегчает процедуру перфорирования *ZP*, так как появляется свободное от клеток пространство, что снижает риск повреждения эмбриона.

## 4.5. Биопсия трофэктодермы

Наиболее перспективной микрохирургической процедурой в клинической практике ВРТ считается биопсия трофэктодермы, так как дает возможность наиболее точно оценить генетический статус эмбриона. В то же время эта процедура является наиболее травматичной и наиболее сложной по сравнению с другими процедурами микрохирургии преимплантационного эмбриона. Задачей этой серии экспериментов было отделить участок трофэктодермы, содержащий 5 -7 клеток. Прежде всего, подбирали условия для подготовки процедуры биопсии трофэктодермы. В первых сериях экспериментов вымывали эмбрионы на стадии бластоцисты (3,5 сут. развития) непосредственно в день эксперимента. Однако чаще всего эмбрионы еще не приступали к хэтчингу. Их помещали в инкубатор для дальнейшего развития, но, как правило, вылупление эмбриона из оболочки происходило в ночное время, следовательно, большая часть материала не подходила для процедуры. С целью повышения количества эмбрионов, подходящих для проведения процедуры биопсии, протокол модифицировали. Эмбрионы вымывали на 2,5 день развития (на стадии морулы), помещали в инкубатор (37°C, 5% CO2, 98% влажности) и культивировали до стадии бластоцисты, приступившей к хэтчингу.

В рамках подбора условий для проведения процедуры были разработаны два протокола проведения экспериментов. Согласно первому варианту протокола обработку клеток трофэктодермы лазером осуществляли через объектив с 40-кратным увеличением. В этом случае оптимальные значения энергии и фокусировки лазерного луча были 20-50% и 80%, соответственно. Однако в этом случае требовалось большое количество повторений воздействия. Согласно второму варианту протокола обработку осуществляли через объектив с десятикратным увеличением. Оптимальные значения энергии и фокусировки лазерного луча составили также 50% и 80%, соответственно, как и в первом протоколе. Выгодным отличием второго варианта протокола от первого стало существенное снижение числа повторных воздействий. По-видимому, такое различие связано с тем, что объектив 40х поглощает большее количество энергии лазерного луча, чем объектив 10х. Во всех экспериментах мы регистрировали выходящую энергию лазерного луча, но часть его энергии поглощается промежуточными средами в оптическом пути микроскопа, в том числе и оптическим стеклом объективов.

В экспериментах было задействовано 37 эмбрионов, у 23 из них удалось успешно провести процедуру биопсии трофэктодермы (рис. 63). Основные трудности были связаны с тем, что при лазерном воздействии эмбрион изменял свое положение с первого же

110

импульса таким образом, что второй импульс повреждал клетки отделяемой части трофэктодермы.



**Рисунок 63**. 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, моделируя ситуацию, при которой биоптат можно было бы извлечь их капли без риска захватить весь эмбрион (рис.64) Таким образом, эффективность процедуры составила 62,2%.



**Рисунок 64**. Перемещение биоптата с помощью оптического пинцета (покадровая съемка). А - эмбрион до захвата биоптата оптическим пинцетом; Б, В, Г, Д, Е, Ж, З - пошаговое перемещение биоптата с помощью оптического пинцета. Интервал между кадрами – 2 секунды.

На следующий день после проведения микрохирургической операции оценивали выживаемость бластоцист путем окрашивания клеток флуоресцентными красителями *Hoechst 33258* (Sigma, США) и *PI* (Invitrogen, США). Исследование показало, что после процедуры биопсии трофэктодермы эмбрионы были жизнеспособны. Во-первых, они успешно завершали хэтчинг, во-вторых, наблюдалось положительное окрашивание клеток *Hoechst 33258*, а PI окрашивание отсутствовало, либо окрашивались единичные клетки эмбриона (рис. 65).



**Рисунок 65**. Бластоциста через сутки после процедуры биопсии трофэктодермы. А - бластоциста, прошедшая хэтчинг; Б - положительное окрашивание *Hoechst* 33258; В - отрицательное окрашивание *PI*.

Таким образом, процедура биопсии трофэктодермы при помощи системы «оптический скальпель – оптический пинцет» не снижает жизнеспособность эмбриона (Il'ina et al., 2012).

Результаты проведенных экспериментов показали, что процедура биопсии трофэктодермы более эффективна, чем процедура биопсии редукционного тельца. К тому же процедура биопсии трофэктодермы менее трудоемка для оператора лазерной установки, не смотря на то, что непосредственно перед процедурой биопсии приходится проводить вспомогательный хэтчинг путем перфорирования ZP. 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. Например, метод биопсии

трофэктодермы успешно применяется для диагностики различных генетических заболеваний, в частности β-талассемии (Kokkali G. et al., 2005; Kokkali G. et al., 2007). Также биопсия трофэктодермы более перспективна, чем биопсия редукционного тельца, так как в первом случае оценивается генетический материал непосредственно эмбриона, а во втором – только генетический материал матери.

В настоящее время в клинической практике лазерные технологии уже применяются для проведения процедуры биопсии трофэктодермы (McArthur S. J. et al., 2008). Однако лазер применяется только как вспомогательный инструмент и необходимость использовать манипулятор по-прежнему остается. В данном случае перед процедурой биопсии проводят вспомогательный лазерный хэтчинг, затем эмбрионы культивируют в течение 18 – 24 часов. Затем с помощью микроманипулятора ориентируют эмбрион и удерживают его на месте. С помощью иглы для биопсии захватывают вылупляющиеся клетки трофэктодермы, а затем лазерными импульсами отсекают их. Таким образом, процедура, применяемая в настоящее время, очень трудоемка и требует наличия специальной подготовки у оператора микроманипулятора. Разработанная нами технология позволяет использовать лазер как самостоятельный инструмент и не требует дополнительных вспомогательных средств, таких как микроманипулятор.

### 5. 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 сохраняют 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 стромы яичника, а также с мезенхимными стволовыми клетками, выделенными из костного мозга мыши. Мы наблюдали процессы самоорганизации разнородных клеточных элементов при сокультивировании с овариальным фолликулом: уплощенные клетки находились в тесном контакте друг с другом, располагались 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. Изменение морфологии МСК КМ было показано методами электронной микроскопии, методом количественного ПЦР анализа было установлено изменение уровня экспрессии маркеров стволовости маркеров И клеток. МСК КМ изменяли фенотип с CD34-,CD45стероидогенных свой ,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 редукционного тельца и клеток трофэктодермы. Было показано, что лазерное излучение, используемое в данной установке, не снижает жизнеспособность эмбрионов при проведении операций различного

114

рода. Разработанный нами метод может быть применен не только для микрохирургического воздействия на эмбрионы, но также и на клеточные агрегаты, 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 воздействия, малое повреждающее воздействие, в том числе и температурное в силу малой длительности лазерных импульсов.

В связи с тем, что в современной фундаментальной науке и клинической практике все большее значение приобретает работа с гаметами 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.

## 6. 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 редукционного 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 редукционного тельца и микрохирургии трофэктодермы.

# СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АМГ антимюллеровский гормон
- БСА бычий сывороточный альбумин
- ВОЗ всемирная организация здравоохранения
- ВРТ вспомогательные репродуктивные технологии
- ГнРГ гонадотропин-рилизинг гормон
- ДНК дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИТС инсулин-трансферрин-селенит
- ЛГ лютеинизирующий гормон
- ЛУК ледяная уксусная кислота
- МСК КМ- мезенхимные стволовые клетки, выделенные из костного мозга
- ППК первичные половые клетки
- ПФА параформальдегид
- РНК рибонуклеиновая кислота
- РТ редукционное тельце
- СЭМ сканирующий электронный микроскоп (микроскопия)
- ТЭМ трансмиссионная электронная микроскоп (микроскопия)
- ФСГ фолликулостимулирующий гормон
- ХАМ хориоалантоисная мембрана
- цАМФ циклический аденозинмонофосфат
- ЭКО экстракорпоральное оплодотворение
- BMP костный морфогенетический белок (bone morphogenetic protein)
- c-kit тирозинкиназный рецептор steel фактора
- **DEPC** диэтилпирокарбонат

- DMEM среда Игла в модификации Дюльбекко (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
- EGF эпидермальный фактор роста (epidermal growth factor)
- ErbB2, ErbB3 тирозинкиназный рецептор нейрорегулина-бета
- FBS сыворотка (fetal bovine serum)
- FCS сыворотка (fetal clone serum)
- FGF фактор роста фибробластов (fibroblast growth factor)
- bFGF базовый фактор роста фибробластов (basic fibroblast growth factor)
- GDF фактор дифференциального роста (growth differentiation factor)
- GFP зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein)
- IGF инсулиноподобный фактор роста (insulin-like growth factor)
- KL фактор стволовых клеток (kit-ligand или stem cell factor)
- LIF фактор ингибирования лейкемии (leukemia-inhibiting factor)
- PBS фосфатно-солевой буфер
- PI иодид пропидия (propidium iodide)
- qPCR полимеразная цепная реакция в реальном времени
- TGF $\beta$  фактор роста опухоли  $\beta$  (tumor growth factor  $\beta$ )
- VEGF фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor)
- ZP блестящая оболочка (zona pellucida)

аМЕМ – среда Игла, альфа модификация (Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification)

# 7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамян Л.В., Курило Л.Ф., Арсланян К.Н., Шуляк И.Ю. Фолликулогенез при некоторых формах эндометриоза. //Проблемы репродукции. -2009.- №1.- С.78-85.

2. Боярский К. Ю. Молекулярные основы формирования фетального яичника и получение гамет из стволовых клеток (обзор литературы). //Проблемы репродукции. - 2004.- №5. - С.15-21.

3. Воробьева, О.А. Факторы роста новые регуляторы репродукции //Цитология.- 1989.- Т.31. -№ 10.-С.1139-1157.

4. Горкун А.А. Изучение индуцированного васкулогенеза в 3D культуре мультипотентных мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук: 14.03.03, 03.03.04/ Горкун Анастасия Алексеевна. – М. -2012.- – 126 с.

5. Горкун А.А., Сабурина И.Н., Кошелева Н.В., Зурина И.М., Пулин А.А., Шагидулин М.Ю., Онищенко Н.А., Репин В.С. Эндотелиальные прогениторные клетки в мезенхимосфероидах пупочного канатика и их участие в процессах ангиогенеза и васкулогенеза при острой печеночной недостаточности. //Патологическая физиология и экспериментальная терапия. -2012.- № 4. -С.50-53.

6. Дыбан А.П. Раннее развитие млекопитающих. – Л.: «Наука». - 1988.

7. Дыбан А.П., Баранов В.С. Оогенез млекопитающих. / Современные проблемы оогенеза под редакцией Детлаф Т.А. – М.: «Наука». - 1977.

8. Дыбан А.П., Пучков В.Ф., Баранов В.С., Самошкина Н.А., Чеботарь Н.А. Лабораторные млекопитающие: мышь *Mus muculus*, крыса *Rattus norvegicus*, кролик *Oryctolagus cuiculus*, хомячок *Cricetus griseous*. / Объекты биологии развития. – М.: «Наука». -1975.- С.505-566.

9. Захарова Н.Н., Дворянский С.А. Синдром поликистозных яичников. //Вятский медицинский вестник. -2010.- № 2. - С.3-8.

10. Зыбина Е.В. Цитология трофобласта. – Л.: «Наука». - 1986.

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

12. Кожевникова М.Н. Молекулярно-генетическая и иммунофенотипическая характеристика мезенхимных стромальных клеток из миелоидных органов крыс в онтогенезе: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук: 03.00.25/ Кожевникова Мария Николаевна. – М. -2008. – 116 с.

13. Кожухарь В. Г. Первичные половые клетки млекопитающих и человека. Происхождение, идентификация, миграция. //Цитология. -2011.- № 3. - Т. 53. - С.211–220.

14. Манк М. Биология развития млекопитающих. Методы. – М.: Мир. 1990.

15. Практикум по эмбриологии: пособие для студентов университетов под редакцией В.А.Голиченкова и М.Л.Семеновой. –М.: Издательский центр «Академия». - 2004.

16. Сабурина И.Н., Горкун А.А., Кошелева Н.В., Семенова М.Л., Пулин А.А., Репин В.С. Сопоставление поведения стромальных клеток пупочного канатика и мультипотентных стромальных клеток взрослого костного мозга в 2-D и 3-D культуре: моделирование стромальной регенерации. //Вестник новых медицинских технологий. - 2009.- Т. 14. - № 4. - С.9-11.

17. Сабурина И.Н., Репин В.С. 3D-культивирование: от отдельных клеток к регенерационной ткани (к вопросу о феномене эпителио-мезенхимальной пластичности). // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. -2010.- Т.5. - №2. - С.75-86.

18. Татарчук Т.Ф., Сольский Я.П. Эндокринная гинекология (клинические очерки). – К.: Издательство "Заповгг". - 2003.

19. Alarcon V.B. and Marikawa Y. Spatial aignment of the muse bastocyst ais aross the frst ceavage pane is caused by mechanical constraint rather than developmental bias among blastomeres. // Molecular Reproduction and Development. -2008.- V.75. - P.1143–1153.

20. Artus J, Hadjantonakis AK. Generation of chimeras by aggregation of embryonic stem cells with diploid or tetraploid mouse embryos. // Methods Mol Biol. -2011.- V.693. -P.37-56.

21. Ashkin A. Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. //Biophysical Journal. -1992.- V.61. - P.569–582.

22. Ashkin A. Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers. //Proc. Natl Acad. Sci. USA. -1997.- V.94. - P.4853–4860.

23. Ashkin A., Dziedzic J.M. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. //Science. -1987.- V.235. - P.1517–1520.

24. Bider D, Livshits A, Yonish M, Yemini Z, Mashiach S, Dor J. Assisted hatching by zona drilling of human embryos in women of advanced age. //Hum Reprod. -1997.- V.12.- P.317–320.

25. Boada M, Carrera M, De La Iglesia C, Sandalinas M, Barri PN, Veiga A. Successful use of a laser for human embryo biopsy in preimplantation genetic diagnosis: report of two cases. //J Assist Reprod Genet. -1998.- V.15. - P.302–307.

26. Buican TN, Smyth MJ, Crissman HA, Salzman GC, Stewart CC, Martin JC. Automated single-cell manipulation and sorting by light trapping. // Appl Opt. -1987.- V. 26.- No 24. - P.5311-5316.

27. Carlson B.M. Human embryology and developmental biology. Fouth edition. Mosby Inc. - 2009.

28. Chan SA, Lin SW, Yu KJ, Liu TY, Fuh MR. Quantitative analysis of isoflavone aglycones in human serum by solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. // Talanta. -2006.- V. 69. - No 4. - P.952-956.

29. Chen SU, Chang CY, Lu CC, Hsieh FJ, Ho HN, Yang YS. Microtubular spindle dynamics and chromosome complements from somatic cell nuclei haploidization in mature mouse oocytes and developmental potential of the derived embryos. // Hum Reprod. -2004.-V.19. - No 5. - P.1181-1188.

30. Daniel JC, Jr., Takahashi K. Selective laser destruction of rabbit blastomeres and continued cleavage of survivors in vitro. //Exp Cell Res. -1965.- V.39. - P.475–482.

31. De Vos A. and Van Steirteghem A. Aspects of biopsy procedures prior to preimplantation genetic diagnosis. //Prenatal diagnosis. -2001.- V. 21. - P.767–780.

Dholakia K. and Reece P. Optical micromanipulation takes hold. // Nano Today. 2006.- V.1. - P.18-27.

33. Dholakia K., MacDonald MP, Zemánek P, Cizmár T. Cellular and colloidal separation using optical forces. // Methods Cell Biol. -2007.- V. 82. - P.467-495.

34. Dokras A, Sargent IL, Ross C, Gardner RL, Barlow DH. Trophectoderm biopsy in human blastocysts. //Hum Reprod. -1990.- V. 5. - P.821–825.

35. Ehrlicher A, Betz T, Stuhrmann B, Koch D, Milner V, Raizen MG, Kas J. Guiding neuronal growth with light. // Proc Natl Acad Sci U S A. -2002.- V.99. - No25. - P.16024-16028.

36. Enger J, Goksör M, Ramser K, Hagberg P, Hanstorp D. Optical tweezers applied to a microfluidic system. //Lab Chip. -2004.- V.4. - No 3.- P.196-200.

37. Ericsson M., Hanstorp D., Hagberg P., Enger J., Nystrom T. Sorting out bacterial viability with optical tweezers. //Journal of Bacteriology. -2000.- P.5551-5555.

38. Eriksen RL, Mogensen PC, Glückstad J. Multiple-beam optical tweezers generated by the generalized phase-contrast method. // Opt Lett. -2002.- V. 27. - P.267-269.

39. Eriksson E, Enger J, Nordlander B, Erjavec N, Ramser K, Goksör M, Hohmann S, Nyström T, Hanstorp D. A microfluidic system in combination with optical tweezers for analyzing rapid and reversible cytological alterations in single cells upon environmental changes. // Lab Chip. -2007.- V. 7.- No 1. - P.71-76.

40. Fällman E, Axner O. Design for fully steerable dual-trap optical tweezers. Appl Opt. -1997.- V.36. - P.2107-13.

41. Hardy K, Handyside AH. Cell allocation in twin half mouse embryos bisected at the 8-cell stage: implications for preimplantation diagnosis. //Mol Reprod Dev. -1993.- V.36. - P.16–22.

42. Hardy K, Martin KL, Leese HJ, Winston RML, Handyside A. Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. //Hum Reprod. -1990.- V.5 - P.708–714.

43. Hogan B., Beddington R., Costantini F., Lacy E. Manipulation the Mouse Embryo. A laboratory manual. Second edition. //Cold Spring Harbor Laboratory Press, -1994.-P.136-145.

44. Jess PR, Garcés-Chávez V, Smith D, Mazilu M, Paterson L, Riches A, Herrington CS, Sibbett W, Dholakia K. Dual beam fibre trap for Raman micro-spectroscopy of single cells.
// Opt Express. -2006.- V.14. - No12. - P.5779-5791.

45. Karamenyan A.V., Shakhbazyan A.K., Sviridova-Chailakhyan T.A., Krivokharchenko A.S., Chiou A.E., Chailakhyan L.M. Use of Picosecond Infrared Laser for Micromanipulation of Early Mammalian Embryos. // Molecular Reproduction & Development. -2009.- V.76. - P.975–983.

46. Kohli V., Elezzabi A. Performing laser nanosurgery and transfection on living embryos. //Spie. -2008.- P.1-3.

47. Kohli V., Elezzabi A.Y. Laser surgery of zebrafish (*Danio rerio*) embryos using femtosecond laser pulses: Optimal parameters for exogenous material delivery, and the laser's effect on short- and long-term development. //BMC Biotechnology. -2008.- V.8. - No7.

48. Kohli V., Elezzabi A.Y., Acker J.P. Cell nanosurgery using ultrashort (femtosecond) laser pulses: applications to membrane surgery and cell isolation. //Lasers in Surgery and Medicine. -2005.- V.37. - P.227–230.

49. Kokkali G., Traeger-Synodinos J., Vrettou C., Stavrou D., Jones G.M., Cram D.S., Makrakis E., Trounson A.O., Kanavakis E. and Pantos K. Blastocyst biopsy versus cleavage stage biopsy and blastocyst transfer for preimplantation genetic diagnosis of b-thalassaemia: a pilot study. //Human Reproduction. -2007.- V.22. - No.5. - P.1443–1449.

50. Kokkali G., Vrettou C., Traeger-Synodinos J., Jones G.M., Cram D.S., Stavrou D., Trounson A.O., Kanavakis E. and Pantos K. Birth of a healthy infant following trophectoderm biopsy from blastocysts for PGD of b-thalassaemia major: Case report. //Human Reproduction. -2005.- V.20. - No.7. - P.1855–1859.

51. König K, Svaasand L, Liu Y, Sonek G, Patrizio P, Tadir Y, Berns MW, Tromberg BJ. Determination of motility forces of human spermatozoa using an 800 nm optical trap. // Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). -1996.- V. 42. - No 4. - P.501-509.

52. Leitz G., Fallman E., Tuck S., Axner O. Stress response in *Caenorhabditis elegans* caused by optical tweezers: wavelength, power, and time dependence. // Biophysical Journal. -2002.- V.82. - P.2224–2231.

53. Liang H., Vu T.K., Krishnan P., Trang T.C., Shin D., Kimel S., Bems M.W. Wavelength dependence of cell cloning efficiency after optical trapping. Biophysical Journal. - 1996.- V.70. - P.1529-1533.

54. Liu Y., Sonec G.J., Berns M.W., Tromberg B.J. Physiological monitoring of optically trapped cells: assessing the effects of confinement by 1064 nm laser tweezers using microfluorometry. //Biophys J. -1996.- V.71. - P.2158-2167.

55. Lúcio AD, Santos RA, Mesquita ON. Measurements and modeling of water transport and osmoregulation in a single kidney cell using optical tweezers and videomicroscopy. // Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys. -2003.- V. 68. - No 4. - Pt 1.

56. MacDonald MP, Neale S, Paterson L, Richies A, Dholakia K, Spalding GC. Cell cytometry with a light touch: sorting microscopic matter with an optical lattice. // J Biol Regul Homeost Agents. -2004.- V.18. - No 2. - P.200-205.

57. McArthur S. J., Leigh D., Marshall J. T., Gee A. J., De Boer K. A. and Jansen R. P. S. Blastocyst trophectoderm biopsy and preimplantation genetic diagnosis for familial monogenic disorders and chromosomal translocations. //Prenatal diagnosis. -2008.- V.28. - P.434–442.

58. Neuman K.C., Chadd E.H., Liou G.F., Bergman K., Block S.M. Characterization of Photodamage to *Escherichia coli* in Optical Traps. //Biophysical Journal. -1999.- V.77. - P.2856–2863.

59. Ozkan M., Pisanic T., Scheel J., Barlow C., Esener S., Bhatia S.N. electro-optical platform for the manipulation of live cells. //Langmuir. -2003.- V.19. - P.1532-1538.

60. Ozkan M., Wang M., Ozkan C., Flynn R., Birkbeck A., Esener S. Optical manipulation of objects and biological cells in microfluidic devices. //Biomed. Microdevices. - 2003.- V.5. - P.61-67.

61. Poueymirou WT, Auerbach W, Frendewey D, Hickey JF, Escaravage JM, Esau L, Doré AT, Stevens S, Adams NC, Dominguez MG, Gale NW, Yancopoulos GD, DeChiara TM, Valenzuela DM. F0 generation mice fully derived from gene-targeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses. // Nat Biotechnol. -2007.- V. 25. - No 1. - P.91-99.

62. Samoiloff MR. Nematode morphogenesis: localization of controlling regions by laser microbeam surgery. // Science. -1973.- V.180. - P.976-977.

63. Schöpper B, Ludwig M, Edenfeld J, Al-Hasani S, Diedrich K. Possible applications of lasers in assisted reproductive technologies. // Hum Reprod. -1999.- V.1. - P.186-193.

64. Singh G.P., Creely C., Volpe G., Groetsch H., Petrov D.V. Real-time detection of hyperosmotic stress response in optically trapped single yeast cells using Raman microspectroscopy. //Anal. Chem. -2005.- V.77. - P.2564-2568.

65. Somers GR, Trounson AO, Wilton LJ. Allocation of cells to the inner cell mass and trophectoderm of 3/4 mouse embryos. //Reprod Fertil Dev. -1990.- V.2. - P.51–59.

66. Stevenson D., Agate1 B., Tsampoula X., Fische1 P., C. T. A. Brown C. T. A., Sibbett W., Riches A., Gunn-Moore F., K. Dholakia K. Femtosecond optical transfection of cells:viability and efficiency. //Optics Express. -2006.- V.14. - No.16. - P.7125-7133.

67. Tarin JJ, Conaghan J, Winston RML, Handyside AH. Human embryo biopsy on the second day after insemination for preimplantation diagnosis: removal of a quarter of embryo retards cleavage. //Fertil Steril. -1992.- V.58. - P.970–976.

68. Townes-Anderson E. et al. Micromanipulation of retinal neurons by optical tweezers. // Molecular Vision. -1998.- V.4. - No 12. – P.168-173.

69. Van Blerk M, Nijs M, Van Steirteghem A. Decompaction and biopsy of late mouse morulae: assessment of in vitro and in vivo developmental potential. //Hum Reprod. - 1991.- V.6. - P.1298–1304.

70. Verlinsky Y and Kuliev A. Micromanipulation of gametes and embryos in preimplantation genetic diagnosis and assisted fertilization. //Curr Opin Obstet Gynaecol. -1992.-V.4. - P.720–725.

71. Verlinsky Y and Kuliev A. Preimplantation polar body diagnosis. //Biochem Mol Med. -1996.- V.58. - P.13–17.

72. Wakamoto Y, Inoue I, Moriguchi H, Yasuda K. Analysis of single-cell differences by use of an on-chip microculture system and optical trapping. //Fresenius J Anal Chem. -2001.-V.371. - No 2. - P.276-281.

73. Wang MM, Tu E, Raymond DE, Yang JM, Zhang H, Hagen N, Dees B, Mercer EM, Forster AH, Kariv I, Marchand PJ, Butler WF. Microfluidic sorting of mammalian cells by optical force switching. //Nat Biotechnol. -2005.- V. 23. - No 1. - P.83-87.

74. Xie C., Mace J., Dinno M.A., Li Y.Q., Tang W., Newton R.G., Gemperline P.J. Identification of single bacterial cells in aqueous solution using confocal laser tweezers Raman spectroscopy. //Anal. Chem. -2005.- V.77. - P.4390-4397.

75. Yanik M.F., Cinar H., Cinar H.N., Gibby A., Chisholm A.D., Jin Y., Ben-Yakar A. Nerve regeneration in *Caenorhabditis elegans* after femtosecond laser axotomy. //IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics. -2006.- V.12. - No.6. - P.1283-1291.

76. Zhang H. and Liu K. Optical tweezers for single cells. //Journal of the Royal Society Interface. -2008.- V.5.- P.671-690.

77. Zheng F, Qin Y, Chen K. Sensitivity map of laser tweezers Raman spectroscopy for single-cell analysis of colorectal cancer. // J Biomed Opt. -2007.- V.12. - No 3. - P.034002-1 - 034002-9.

78. Abd-Allah S.H., Shalaby S.M., Pasha H.F., El-Shal A.S., Raafat N., Shabrawy S.M., Awad H.A., Amer M.G., Gharib M.A., El Gendy E.A., Raslan A.A., El-Kelawy H.M. Mechanistic action of mesenchymal stem cell injection in the treatment of chemically induced ovarian failure in rabbits. // Cytotherapy. -2013.- V.15. - P.64–75.

79. Abdel-Ghani M.A., Shimizu T., Suzuki H. Expression pattern of vascular endothelial growth factor in canine folliculogenesis and its effect on the growth and development of follicles after ovarian organ culture. // Reprod. Domest. Anim. -2014.- V.49. - I.5. - P.734–739.

80. Ahn J. Il, Kim G.A., Kwon H.S., Ahn J.Y., Hubbell J.A., Song Y.S., Lee S.T., Lim J.M. Culture of preantral follicles in poly(ethylene) glycol-based, three-dimensional hydrogel: a relationship between swelling ratio and follicular developments. // J. Tissue Eng. Regen. Med. -2014.

81. Almeida A.P., Magalhães-Padilha D.M., Araújo V.R., Costa S.L., Chaves R.N., Lopes C.A.P., Donato M.A.M., Peixoto C.A., Campello C.C., Junior J.B., Figueiredo J.R. Effect of sequential medium with fibroblast growth factor-10 and follicle stimulating hormone on in vitro development of goat preantral follicles. // Anim. Reprod. Sci. -2015. - V.152. - P.32–38.

82. Amorim C. a, Van Langendonckt A., David A., Dolmans M.-M., Donnez J. Survival of human pre-antral follicles after cryopreservation of ovarian tissue, follicular isolation and in vitro culture in a calcium alginate matrix. // Hum. Reprod. -2009.- V.24. - P.92–99.

83. Amsterdam A., Rotmensch S., Furman A., Venter E.A., Vlodavsky I. Synergistic effect of human chorionic gonadotropin and extracellular matrix on in vitro differentiation of human granulosa cells: progesterone production and gap junction formation. // Endocrinology. - 1989.- V.124. - P.1956–1964.

84. Antczak M., Van Blerkom J. The vascular character of ovarian follicular granulosa cells: phenotypic and functional evidence for an endothelial-like cell population. // Hum. Reprod. -2000.- V.15. - P.2306–2318.

85. Armstrong D.G., Gutierrez C.G., Baxter G., Glazyrin A.L., Mann G.E., Woad K.J., Hogg C.O., Webb R. Expression of mRNA encoding IGF-I, IGF-II and type 1 IGF receptor in bovine ovarian follicles. // J. Endocrinol. -2000.- V.165. - P.101–113.

86. Bambardekar K., Clément R., Blanc O., Chardès C., Lenne P.-F. Direct laser manipulation reveals the mechanics of cell contacts in vivo. // Proc. Natl. Acad. Sci. -2015. - V.112. - P.1416-1421.

87. Ben-Haroush A., Abir R., Ao A., Jin S., Kessler-Icekson G., Feldberg D., Fisch B. Expression of basic fibroblast growth factor and its receptors in human ovarian follicles from adults and fetuses. // Fertil. Steril. -2005. -V.84 - Suppl.2. - P.1257–1268.

88. Berisha B., Schams D., Kosmann M., Amselgruber W., Einspanier R. Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. // J. Endocrinol. -2000. - V.167 - P.371–382.

89. Bertoldo M.J., Duffard N., Bernard J., Frapsauce C., Calais L., Rico C., Mermillod P., Locatelli Y. Effects of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) supplementation during culture of the sheep ovarian cortex. // Anim. Reprod. Sci. -2014. - V.149. - P.124–134.

90. Bonnet A., Cabau C., Bouchez O., Sarry J., Marsaud N., Foissac S., Woloszyn F., Mulsant P., Mandon-Pepin B. An overview of gene expression dynamics during early ovarian folliculogenesis: specificity of follicular compartments and bi-directional dialog. BMC Genomics. -2013. - V.14. - P.904-923.

91. Boyer A., Goff A.K., Boerboom D. WNT signaling in ovarian follicle biology and tumorigenesis. // Trends Endocrinol. Metab. -2010. - V.21. - P.25–32.

92. Brankin V., Quinn R.L., Webb R., Hunter M.G. BMP-2 and -6 modulate porcine theca cell function alone and co-cultured with granulosa cells. // Domest. Anim. Endocrinol. - 2005. - V.29. - P.593–604.

93. Brito A.B., Santos R.R., van den Hurk R., Lima J.S., Miranda M.S., Ohashi O.M., Domingues S.F.S. Short-term culture of ovarian cortical strips from capuchin monkeys (Sapajus apella): a morphological, viability, and molecular study of preantral follicular development in vitro. // Reprod. Sci. - 2013. - V.20. - P.990–997.

94. Camboni A., Van Langendonckt A., Donnez J., Vanacker J., Dolmans M.M., Amorim C. a. Alginate beads as a tool to handle, cryopreserve and culture isolated human primordial/primary follicles. // Cryobiology. -2013. -V.67. - P.64–69.

95. Campbell L., Trendell J., Spears N. Identification of cells migrating from the thecal layer of ovarian follicles. // Cell Tissue Res. - 2013. - V.353. - P.189–94.

96. Castañon B.I., Stapp A.D., Gifford C.A., Spicer L.J., Hallford D.M., Hernandez Gifford J.A. Follicle-stimulating hormone regulation of estradiol production: possible involvement of WNT2 and  $\beta$ -catenin in bovine granulosa cells. // J. Anim. Sci. - 2012. - V.90. - P.3789–3797.

97. Challoner S. Studies of oogenesis and follicular development in the golden hamster. 3. The initiation of follicular growth in vitro. // J. Anat. - 1975. - V.119. - P.157–162.

98. Channing C.P. Tissue culture of equine ovarian cell types: culture methods and morphology. // J. Endocrinol. - 1969. - V.43. - P.381–390.

99. Channing C.P., Grieves S.A. Studies on tissue culture of equine ovarian cell types: steroidogenesis. // J. Endocrinol. - 1969. - V.43. - P.391–402.

100. Chaves R.N., Lima-Verde I.B., Celestino J.J.H., Duarte A.B.G., Alves A.M.C. V, Matos M.H.T., Campello C.C., Name K.P.O., Báo S.N., Buratini J., Figueiredo J.R. Fibroblast growth factor-10 maintains the survival and promotes the growth of cultured goat preantral follicles. // Domest. Anim. Endocrinol. - 2010. - V.39. - P.249–258.

101. Dolmans M.-M., Jadoul P., Gilliaux S., Amorim C.A., Luyckx V., Squifflet J., Donnez J., Van Langendonckt A. A review of 15 years of ovarian tissue bank activities. // J. Assist. Reprod. Genet. - 2013. - V.30. - P.305–314.

102. Dolmans M.-M., Martinez-Madrid B., Gadisseux E., Guiot Y., Yuan W.Y., Torre A., Camboni A., Van Langendonckt A., Donnez J. Short-term transplantation of isolated human ovarian follicles and cortical tissue into nude mice. // Reproduction. - 2007. - V.134. - P.253–262.

103. Dong F.-L., Ma L., Shi S.-L., Dai S.-J., Liu X.-G., Su Y.-C., Guo Y.-H., Wang F., Sun Y.-P. An research on the isolation methods of frozen-thawed human ovarian preantral follicles. // Int. J. Clin. Exp. Med. - 2014. - V.7. - P.2298–2303.

104. Donnez J., Dolmans M.M., Demylle D., Jadoul P., Pirard C., Squifflet J., Martinez-Madrid B., van Langendonckt A. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. // Lancet. - 2004. - V.364. - P.1405–1410.

105. Donnez J., Dolmans M.M., Demylle D., Jadoul P., Pirard C., Squifflet J., Martinez-Madrid B., Van Langendonckt A. Restoration of ovarian function after orthotopic (intraovarian and periovarian) transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a woman treated by bone marrow transplantation for sickle cell anaemia: case report. // Hum. Reprod. - 2006. - V.21. - P.183–188.

106. Donnez J., Jadoul P., Pirard C., Hutchings G., Demylle D., Squifflet J., Smitz J., Dolmans M.-M. Live birth after transplantation of frozen-thawed ovarian tissue after bilateral oophorectomy for benign disease. // Fertil. Steril. - 2012. - V.98. - P.720–725.

107. Donnez J., Silber S., Andersen C.Y., Demeestere I., Piver P., Meirow D., Pellicer A., Dolmans M.-M. Children born after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. a review of 13 live births. // Ann. Med. - 2011. - V.43. - P.437–450.

108. Duff S.E., Li C., Garland J.M., Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. // FASEB J. - 2003. - V.17. - P.984–992.

109. Dzafic E., Stimpfel M., Virant-Klun I. Plasticity of granulosa cells: on the crossroad of stemness and transdifferentiation potential. // J. Assist. Reprod. Genet. - 2013. - V.30. - P.1255–1261.

110. Edson M.A., Nagaraja A.K., Matzuk M.M. The mammalian ovary from genesis to revelation. // Endocr. Rev. - 2009a. - V.30. - P.624–712.

111. El-Hayek S., Demeestere I., Clarke H.J. Follicle-stimulating hormone regulates expression and activity of epidermal growth factor receptor in the murine ovarian follicle. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. - 2014. - V.111. - P.16778–16783.

112. Emori C., Sugiura K. Role of oocyte-derived paracrine factors in follicular development. // Anim. Sci. J. - 2014. - V.85. - P.627–633.

113. Eppig J.J. Mouse oocyte development in vitro with various culture systems. // Dev. Biol. - 1977. - V.60. - P.371–388.

114. Erickson G.F., Magoffin D.A., Dyer C.A., Hofeditz C. The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. // Endocr. Rev. - 1985. - V.6. - P.371–399.

115. Fenwick M.A., Mora J.M., Mansour Y.T., Baithun C., Franks S., Hardy K. Investigations of TGF- $\beta$  signaling in preantral follicles of female mice reveal differential roles for bone morphogenetic protein 15. // Endocrinology. - 2013. - V.154. - P.3423–3436.

116. Figueiredo J.R., Hulshof S.C., Van den Hurk R., Ectors F.J., Fontes R.S., Nusgens B., Bevers M.M., Beckers J.F. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. // Theriogenology. - 1993. - V.40. - P.789–799.

117. Fu X., He Y., Xie C., Liu W. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves ovarian function and structure in rats with chemotherapy-induced ovarian damage. // Cytotherapy. - 2008. - V.10. - P.353–363.

118. Fujihara M., Comizzoli P., Keefer C.L., Wildt D.E., Songsasen N. Epidermal Growth Factor (EGF) Sustains In Vitro Primordial Follicle Viability by Enhancing Stromal Cell Proliferation via MAPK and PI3K Pathways in the Prepubertal, but Not Adult Cat Ovary. // Biol. Reprod. - 2014. - V.60. - P.1-10.

119. Garor, R. Abir R., Erman A., Felz C., Nitke S., Fisch B. Effects of basic fibroblast growth factor on in vitro development of human ovarian primordial follicles. // Fertil. Steril. - 2009. - 91. - P.1967–1975.

120. Gasperin B.G., Ferreira R., Rovani M.T., Bordignon V., Duggavathi R., Buratini J., Oliveira J.F.C., Gonçalves P.B.D. Expression of receptors for BMP15 is differentially regulated in dominant and subordinate follicles during follicle deviation in cattle. // Anim. Reprod. Sci. - 2014. - V.144. - P.72–78.

121. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. // Endocr. Rev. - 1996. - V.17. - P.121–55.

122. Granero-Moltó F., Myers T.J., Weis J.A., Longobardi L., Li T., Yan Y., Case N., Rubin J., Spagnoli A. Mesenchymal stem cells expressing insulin-like growth factor-I (MSCIGF) promote fracture healing and restore new bone formation in Irs1 knockout mice: analyses of MSCIGF autocrine and paracrine regenerative effects. // Stem Cells. - 2011. - V.29. - P.1537–1548.

123. Greco E., Biricik A., Cotarelo R.P., Iammarone E., Rubino P., Tesarik J., Fiorentino F., Minasi M.G. Successful implantation and live birth of a healthy boy after triple biopsy and double vitrification of oocyte-embryo-blastocyst. // Springerplus. - 2015. - V.4. - V.22. - P.22-26.

124. Griesinger G., Bündgen N., Salmen D., Schwinger E., Gillessen-Kaesbach G., Diedrich K. Polar body biopsy in the diagnosis of monogenic diseases: the birth of three healthy children. // Dtsch. Arztebl. Int. - 2009. - V.106. - P.533–538.

125. Guo J., Wu B., Li S., Bao S., Zhao L., Hu S., Sun W., Su J., Dai Y., Li X. Contribution of Mouse Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells to Chimeras through Injection and Coculture of Embryos. // Stem Cells Int. - 2014. - V.2014. - P.1-9.

126. Gupta P.S.P., Folger J.K., Rajput S.K., Lv L., Yao J., Ireland J.J., Smith G.W. Regulation and regulatory role of WNT signaling in potentiating FSH action during bovine dominant follicle selection. // PLoS One. - 2014. - V.9. - P.1-9.

127. Gutierrez C.G., Ralph J.H., Telfer E.E., Wilmut I., Webb R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. // Biol. Reprod. - 2000. - V.62. - P.1322–1328.

128. Hartshorne G.M. In vitro culture of ovarian follicles. // Rev. Reprod. - 1997. -V.2. - P.94–104.

129. Heise M., Koepsel R., Russell A.J., McGee E. a. Calcium alginate microencapsulation of ovarian follicles impacts FSH delivery and follicle morphology. // Reprod. Biol. Endocrinol. - 2005. - V.3. - P.47-54.

130. Hirshfeld-Cytron J.E., Duncan F.E., Xu M., Jozefik J.K., Shea L.D., Woodruff T.K. Animal age, weight and estrus cycle stage impact the quality of in vitro grown follicles. // Hum. Reprod. - 2011. - V.26. - P.2473–2485.

131. Hoang Y.D., McTavish K.J., Chang R.J., Shimasaki S. Paracrine regulation of theca androgen production by granulosa cells in the ovary. // Fertil. Steril. - 2013. - V.100. - P.561–567.

132. Hogan B., Beddington R., Costantini F., Lacy E. Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. Second edi. ed. // Cold Spring Harbor Laboratory Press. - 1994.

133. Horii T., Arai Y., Yamazaki M., Morita S., Kimura M., Itoh M., Abe Y., Hatada I. Validation of microinjection methods for generating knockout mice by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. // Sci. Rep. - 2014. - V.4. - P.1-6.

134. Hovatta O. Cryopreservation and culture of human ovarian cortical tissue containing early follicles. // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. - 2004. - V.113. - Suppl. - S50–54.

135. Hsueh A.J., Eisenhauer K., Chun S.Y., Hsu S.Y., Billig H. Gonadal cell apoptosis.// Recent Prog. Horm. Res. - 1996. - V.51. - P.433–456.

136. Hussein T.S., Thompson J.G., Gilchrist R.B. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. // Dev. Biol. - 2006. - V.296. - P.514–521.

137. Hyrapetian M., Loucaides E.M., Sutcliffe A.G. Health and disease in children born after assistive reproductive therapies ART. // J. Reprod. Immunol. - 2014. - V.106. - P.21–26.

138. Il'ina I. V., Sitnikov D.S., Ovchinnikov A. V., Agranat M.B., Khramova Y. V., Semenova M.L. Noncontact microsurgery and micromanipulation of living cells with combined system femtosecond laser scalpel-optical tweezers. //Proceedings of SPIE. SPIE. - 2012. - P. 84270-84278.

139. Ilina I. V., Rakityanskiy M.M., Sitnikov D.S., Ovchinnikov A. V., Agranat M.B., Khramova Y. V., Semenova M.L. Biomedical and biotechnology applications of noncontact femtosecond laser microsurgery of living cells. // AIP Publishing. - 2012. - P.560–571.

140. Irving-Rodgers H.F., Morris S., Collett R.A., Peura T.T., Davy M., Thompson J.G., Mason H.D., Rodgers R.J. Phenotypes of the ovarian follicular basal lamina predict developmental competence of oocytes. // Hum. Reprod. - 2009. - V.24. P.936–944.

141. Isachenko V., Isachenko E., Keck G., Dittrich R., Montag M., van der Ven H., Mallmann P., Müller A., Distler W., Beckmann M.W., Rahimi G., First live birth in germany after re-transplantation of cryopreserved ovarian tissue: original device for initiation of ice formation. // Clin. Lab. - 2012a. - V.58. - P.933–938.

142. Isachenko V., Mallmann P., Petrunkina A.M., Rahimi G., Nawroth F., Hancke K., Felberbaum R., Genze F., Damjanoski I., Isachenko E. Comparison of in vitro- and chorioallantoic membrane (CAM)-culture systems for cryopreserved medulla-contained human ovarian tissue. // PLoS One. - 2012b. - V.7. - P.1-9.

143. Isachenko V., Orth I., Isachenko E., Mallmann P., Peters D., Schmidt T., Morgenstern B., Foth D., Hanstein B., Rahimi G. Viability of human ovarian tissue confirmed 5 years after freezing with spontaneous ice-formation by autografting and chorio-allantoic membrane culture. // Cryobiology. - 2013. - V.66. - P.233–238.

144. Jackowska M., Kempisty B., Woźna M., Piotrowska H., Antosik P., Zawierucha P., Bukowska D., Nowicki M., Jaśkowski J.M., Brüssow K.-P. Differential expression of GDF9, TGFB1, TGFB2 and TGFB3 in porcine oocytes isolated from follicles of different size before and after culture in vitro. // Acta Vet. Hung. - 2013. - V.61. - P.99–115.

145. Jin S.Y., Lei L., Shikanov A., Shea L.D., Woodruff T.K. A novel two-step strategy for in vitro culture of early-stage ovarian follicles in the mouse. // Fertil. Steril. - 2010. - V.93. - P.2633–2639.

146. Kalich-Philosoph L., Roness H., Carmely A., Fishel-Bartal M., Ligumsky H., Paglin S., Wolf I., Kanety H., Sredni B., Meirow D. Cyclophosphamide triggers follicle activation and "burnout"; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility. // Sci. Transl. Med. - 2013. - V.5. - P.62-70.

147. Knight P.G., Glister C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. // Reproduction. - 2006. - V.132. - P.191–206.

148. Knight P.G., Satchell L., Glister C. Intra-ovarian roles of activins and inhibins. // Mol. Cell. Endocrinol. - 2012. - V.359. - P.53–65. 149. Kossowska-Tomaszczuk K., De Geyter C. Cells with stem cell characteristics in somatic compartments of the ovary. // Biomed Res. Int. - 2013. - V.2013. - P.1-13.

150. Kossowska-Tomaszczuk K., De Geyter C., De Geyter M., Martin I., Holzgreve W., Scherberich A., Zhang H. The multipotency of luteinizing granulosa cells collected from mature ovarian follicles. // Stem Cells. - 2009. - V.27. - P.210–219.

151. Kreeger P.K., Deck J.W., Woodruff T.K., Shea L.D. The in vitro regulation of ovarian follicle development using alginate-extracellular matrix gels. // Biomaterials. - 2006. - V.27. - P.714–723.

152. Krivokharchenko A., Karmenyan A., Sarkisov O., Bader M., Chiou A., Shakhbazyan A. Laser fusion of mouse embryonic cells and intra-embryonic fusion of blastomeres without affecting the embryo integrity. // PLoS One. - 2012. - V.7. - P.1-12.

153. Kurilo L.F. Development of the human ovary in the prenatal period. // Arkh. Anat. Gistol. Embriol. - 1980. - V.79. - P.73–79.

154. Lee H.-J., Selesniemi K., Niikura Y., Niikura T., Klein R., Dombkowski D.M., Tilly J.L. Bone marrow transplantation generates immature oocytes and rescues long-term fertility in a preclinical mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. // J. Clin. Oncol. - 2007. - V.25. - P.3198–3204.

155. Liebenthron J., Köster M., Drengner C., Reinsberg J., van der Ven H., Montag M. The impact of culture conditions on early follicle recruitment and growth from human ovarian cortex biopsies in vitro. // Fertil. Steril. - 2013. - V.100. - P.483–491.

156. Liu C., Xie W., Gui C., Du Y. Pronuclear microinjection and oviduct transfer procedures for transgenic mouse production. // Methods Mol. Biol. - 2013. - V.1027. - P.217–232.

157. Liu J., Deutsch U., Jeong J., Lobe C.G. Constitutive notch signaling in adult transgenic mice inhibits bFGF-induced angiogenesis and blocks ovarian follicle development. // Genesis. - 2014. - V.52. - P.809–816.

158. Longenecker G., Kulkarni A.B. Generation of gene knockout mice by ES cell microinjection. // Curr. Protoc. Cell Biol. - 2009. - Chapter 19. - Unit 19. - P.1–36.

159. Lynch K., Fernandez G., Pappalardo A., Peluso J.J. Basic fibroblast growth factor inhibits apoptosis of spontaneously immortalized granulosa cells by regulating intracellular free calcium levels through a protein kinase Cdelta-dependent pathway. // Endocrinology. - 2000. - V.141. - P.4209–4217.

160. Magalhães-Padilha D.M., Fonseca G.R., Haag K.T., Wischral A., Gastal M.O., Jones K.L., Geisler-Lee J., Figueiredo J.R., Gastal E.L. Long-term in vitro culture of ovarian cortical tissue in goats: effects of FSH and IGF-I on preantral follicular development and FSH and IGF-I receptor mRNA expression. // Cell Tissue Res. - 2012. - V.350. - P.503–11.

161. Magli M.C., Montag M., Köster M., Muzi L., Geraedts J., Collins J., Goossens V., Handyside A.H., Harper J., Repping S., Schmutzler A., Vesela K., Gianaroli L. Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part II: technical aspects. // Hum. Reprod. - 2011. - V.26. - P.3181–3185.

162. Makris A., Ryan K.J. Progesterone, androstenedione, testosterone, estrone, and estradiol synthesis in hamster ovarian follicle cells. // Endocrinology. - 1975. - V.96. - P.694–701.

163. Martinez-Madrid B., Donnez J., Van Eyck A.-S., Veiga-Lopez A., Dolmans M.-M., Van Langendonckt A. Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) model: a useful tool to study short-term transplantation of cryopreserved human ovarian tissue. // Fertil. Steril. -2009. - V.91. - P.285–292.

164. Mascarenhas M.N., Flaxman S.R., Boerma T., Vanderpoel S., Stevens G.A. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. // PLoS Med. - 2012. - V.9. - P.1-12.

165. McNatty K.P., Heath D.A., Lundy T., Fidler A.E., Quirke L., O'Connell A., Smith P., Groome N., Tisdall D.J. Control of early ovarian follicular development. // J. Reprod. Fertil. Suppl. - 1999. - V.54. - P.3–16.

166. McNatty K.P., Henderson K.M., Sawers R.S. Effects of prostaglandin F2alpha and E2 on the production of progesterone by human granulosa cells in tissue culture.// J. Endocrinol. - 1975. - V.67. - P.231–240.

167. McNatty K.P., Smith D.M., Makris A., Osathanondh R., Ryan K.J. The microenvironment of the human antral follicle: interrelationships among the steroid levels in antral fluid, the population of granulosa cells, and the status of the oocyte in vivo and in vitro. // J. Clin. Endocrinol. Metab. - 1979. - V.49. - P.851–860.

168. Milachich T. New advances of preimplantation and prenatal genetic screening and noninvasive testing as a potential predictor of health status of babies. // Biomed Res. Int. - 2014.
- V.2014. - P.1-8.

169. Millet L.J., Gillette M.U. Over a century of neuron culture: from the hanging drop to microfluidic devices. // Yale J. Biol. Med. - 2012. - V.85. - P.501–521.

170. Nakamura E., Otsuka F., Inagaki K., Tsukamoto N., Ogura-Ochi K., Miyoshi T., Toma K., Takeda M., Makino H. Involvement of bone morphogenetic protein activity in somatostatin actions on ovarian steroidogenesis. // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. - 2013. -V.134. - P.67–74. 171. Nap A.W., Dunselman G.A.J., Griffioen A.W., Mayo K.H., Evers J.L.H., Groothuis P.G. Angiostatic agents prevent the development of endometriosis-like lesions in the chicken chorioallantoic membrane. // Fertil. Steril. - 2005. - V.83. - P.793–795.

172. Nassiri F., Cusimano M.D., Scheithauer B.W., Rotondo F., Fazio A., Yousef G.M., Syro L. V, Kovacs K., Lloyd R. V. Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. // Anticancer Res. - 2011. - V.31. - P.2283–2290.

173. Nayudu P.L., Osborn S.M. Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles in vitro. // J. Reprod. Fertil. - 1992. - V.95. - P.349–362.

Nilsson E., Parrott J.A., Skinner M.K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. // Mol. Cell. Endocrinol. - 2001. - V.175. - P.123–130.

175. Nottola S.A., Cecconi S., Bianchi S., Motta C., Rossi G., Continenza M.A., Macchiarelli G. Ultrastructure of isolated mouse ovarian follicles cultured in vitro. // Reprod. Biol. Endocrinol. - 2011. - V.9. - P.1-13.

176. Ogura-Nose S., Yoshino O., Osuga Y., Shi J., Hiroi H., Yano T., Taketani Y. Anti-Mullerian hormone (AMH) is induced by bone morphogenetic protein (BMP) cytokines in human granulosa cells. // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. - 2012. - V.164. - P.44–47.

177. Oktay K., Buyuk E., Rosenwaks Z., Rucinski J. A technique for transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. // Fertil. Steril. - 2003. - V.80. - P.193–198.

178. Oktay K., Newton H., Gosden R.G. Transplantation of cryopreserved human ovarian tissue results in follicle growth initiation in SCID mice. // Fertil. Steril. - 2000. - V.73. - P.599–603.

179. Orisaka M., Tajima K., Tsang B.K., Kotsuji F. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. // J. Ovarian Res. - 2009. - V.2, P.9-15.

180. Palma G.A., Argañaraz M.E., Barrera A.D., Rodler D., Mutto A.Á., Sinowatz F.
Biology and biotechnology of follicle development. // ScientificWorldJournal. - 2012. - V.2012.
- P.1-14.

181. Parrott J.A., Skinner M.K. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. // Endocrinology. - 1999. - V.140. - P.4262–4271.

182. Pedersen T., Peters H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. // J. Reprod. Fertil. - 1968. - V.17. - P.555–557.

183. Plowchalk D.R., Mattison D.R. Reproductive toxicity of cyclophosphamide in the C57BL/6N mouse: 1. Effects on ovarian structure and function. // Reprod. Toxicol. - 1992. - V.6.
- P.411–21.

184. Portela V.M., Dirandeh E., Guerrero-Netro H.M., Zamberlam G., Barreta M.H.,
Goetten A.F., Price C.A. The role of fibroblast growth factor-18 in follicular atresia in cattle. //
Biol. Reprod. - 2015. - V.92. - P.14-19.

185. Rawan A., Yoshioka S., Abe H., Acosta T. Insulin-Like Growth Factor-1 Regulates the Expression of Luteinizing Hormone Receptor and Steroid Production in Bovine Granulosa Cells. // Reprod. Domest. Anim. - 2015. - P.1-9.

186. Reddy G.R., Xie C., Lindaman L.L., Coss D. GnRH increases c-Fos half-life contributing to higher FSHβ induction. // Mol. Endocrinol. - 2013. - V.27. - P.253–265.

187. Reis F.M., Cobellis L., Luisi S., Driul L., Florio P., Faletti A., Petraglia F. Paracrine/autocrine control of female reproduction. // Gynecol. Endocrinol. - 2000. - V.14. - P.464–475.

188. Revelli A., Marchino G., Dolfin E., Molinari E., Delle Piane L., Salvagno F., Benedetto C. Live birth after orthotopic grafting of autologous cryopreserved ovarian tissue and spontaneous conception in Italy. // Fertil. Steril. - 2013. - V.99. - P.227–230.

189. Richardson M.C., Davies D.W., Watson R.H., Dunsford M.L., Inman C.B., Masson G.M. Cultured human granulosa cells as a model for corpus luteum function: relative roles of gonadotrophin and low density lipoprotein studied under defined culture conditions. // Hum. Reprod. - 1992. - V.7. - P.12–18.

190. Saleh H., Omar E., Froemming G., Said R. Tocotrienol preserves ovarian function in cyclophosphamide therapy. // Hum. Exp. Toxicol. - 2015. - P.1-7.

191. Sánchez F., Romero S., Albuz F.K., Smitz J. In vitro follicle growth under nonattachment conditions and decreased FSH levels reduces Lhcgr expression in cumulus cells and promotes oocyte developmental competence. // J. Assist. Reprod. Genet. - 2012. - V.29. - P.141– 152.

192. Santos J.M.S., Menezes V.G., Barberino R.S., Macedo T.J.S., Lins T.L.B., Gouveia B.B., Barros V.R.P., Santos L.P., Gonçalves R.J.S., Matos M.H.T. Immunohistochemical localization of fibroblast growth factor-2 in the sheep ovary and its effects on pre-antral follicle apoptosis and development in vitro. // Reprod. Domest. Anim. - 2014. - V.49. - P.522–528.

193. Schreiber N.B., Spicer L.J. Effects of fibroblast growth factor 9 (FGF9) on steroidogenesis and gene expression and control of FGF9 mRNA in bovine granulosa cells. // Endocrinology. - 2012. - V.153. - P.4491–4501.

194. Selvaraju S., Folger J.K., Gupta P.S.P., Ireland J.J., Smith G.W. Stage-specific expression and effect of bone morphogenetic protein 2 on bovine granulosa cell estradiol

production: regulation by cocaine and amphetamine regulated transcript. // Domest. Anim. Endocrinol. - 2013. - V.44. - P.115–120.

195. Sergeev S.A., Khramova Y. V, Semenova M.L., Saburina I.N., Kosheleva N. V Behavior of Transplanted Multipotent Cells after in Vitro Transplantation into the Damaged Retina. // Acta Naturae. - 2011. - V.3. - P.66–72.

196. Shukla L., Morrison W.A., Shayan R. Adipose-derived stem cells in radiotherapy injury: a new frontier. // Front. Surg. - 2015. - V.2 - P.1-12.

197. Silber S.J., DeRosa M., Pineda J., Lenahan K., Grenia D., Gorman K., Gosden R.G. A series of monozygotic twins discordant for ovarian failure: ovary transplantation (cortical versus microvascular) and cryopreservation. // Hum. Reprod. - 2008. - V.23. - P.1531–1537.

198. Skinner M.K. Regulation of primordial follicle assembly and development. // Hum. Reprod. Update. - 2005. - V.11. - P.461–471.

199. Song G., Gao H., Yuan Z. Effect of leuprolide acetate on ovarian function after cyclophosphamide-doxorubicin-based chemotherapy in premenopausal patients with breast cancer: results from a phase II randomized trial. // Med. Oncol. - 2013. - V.30. - P.667-674.

200. Sun M., Wang S., Li Y., Yu L., Gu F., Wang C., Yao Y. Adipose-derived stem cells improved mouse ovary function after chemotherapy-induced ovary failure. // Stem Cell Res. Ther. - 2013. - V.4. - P.80-88.

201. Tajima K., Orisaka M., Mori T., Kotsuji F. Ovarian theca cells in follicular function. // Reprod. Biomed. Online. - 2007. - V.15. - P.591–609.

202. Telfer E.E., Zelinski M.B. Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primates. // Fertil. Steril. - 2013. - V.99. - P.1523–1533.

203. Wang Y., Qian D.-J., Zhong W.-Y., Lu J.-H., Guo X.-K., Cao Y.-L., Liu J. TGF- $\beta$ 1 induces the formation of vascular-like structures in embryoid bodies derived from human embryonic stem cells. // Exp. Ther. Med. - 2014. - V.8. - P.52–58.

204. Wertz K., Herrmann B.G. Large-scale screen for genes involved in gonad development. // Mech. Dev. - 2000. - V.98. - P.51–70.

205. Witschi E., Nelson W.O., Segal S.J. Genetic, developmental and hormonal aspects of gonadal dysgenesis and sex inversion in man. // J. Clin. Endocrinol. Metab. - 1957. - V.17. - P.737–753.

206. Xu J., Li Y., Xu Y., Ding C., Li T., Zhou C. A simple and effective method for the isolation of inner cell mass samples from human blastocysts for gene expression analysis. // In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. - 2014. - V.50. - P.232–236.

207. Xu M., Kreeger P.K., Shea L.D., Woodruff T.K. Tissue-engineered follicles produce live, fertile offspring. // Tissue Eng. - 2006a. - V.12. - P.2739–2746.

208. Xu M., West E., Shea L.D., Woodruff T.K. Identification of a stage-specific permissive in vitro culture environment for follicle growth and oocyte development. // Biol. Reprod. - 2006b. - V.75. - P.916–923.

209. Yoshimatsu G., Sakata N., Tsuchiya H., Minowa T., Takemura T., Morita H., Hata T., Fukase M., Aoki T., Ishida M., Motoi F., Naitoh T., Katayose Y., Egawa S., Unno M. The Co-Transplantation of Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells Reduced Inflammation in Intramuscular Islet Transplantation. // PLoS One. - 2015. - V.10. - P.1-18.

210. Young J.M., Henderson S., Souza C., Ludlow H., Groome N., McNeilly A.S. Activin B is produced early in antral follicular development and suppresses thecal androgen production. // Reproduction. - 2012. - V.143. - P.637–650.

211. Young J.M., McNeilly a S. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. // Reproduction. - 2010. - V.140. - P.489–504.

212. Zhang C., Wang X., Wang Z., Niu W., Zhu B., Xia G. Effect of different culture systems and 3, 5, 3'-triiodothyronine/follicle-stimulating hormone on preantral follicle development in mice. // PLoS One. - 2013. - V.8. -P.e61947- e61954.

213. Zhang H., Risal S., Gorre N., Busayavalasa K., Li X., Shen Y., Bosbach B., Brännström M., Liu K. Somatic cells initiate primordial follicle activation and govern the development of dormant oocytes in mice. // Curr. Biol. - 2014. - V.24. - P.2501–2508.