

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Филатов Максим Алексеевич

**Культивирование овариальных фолликулов млекопитающих с
целью получения зрелых ооцитов**

03.03.05 – Биология развития, эмбриология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена на кафедре эмбриологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.

- Научный руководитель** – *Семенова Мария Львовна, доктор биологических наук, доцент*
- Официальные оппоненты** – *Краснопольская Ксения Владиславовна, доктор медицинских наук, профессор, ГБУЗ МО «МОНИИАГ», руководитель отделения репродуктологии*
- Курило Любовь Федоровна, доктор биологических наук, профессор, ФГБУ «МГНЦ» РАМН, лаборатория генетики нарушений репродукции, главный научный сотрудник*
- Погорелов Александр Григорьевич, доктор биологических наук, профессор, ФГБУН «ИТЭБ» РАН, заведующий лабораторией функциональной микроскопии биоструктур*

Защита диссертации состоится «19» ноября 2019 г. в 17:00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.09 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, МГУ, д.1, стр. 12, Биологический факультет, ауд. М-1.

E-mail: dis_kalsov@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/235358078/>

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е.Н. Калистратова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Вопрос сохранения женской фертильности является одним из актуальных вопросов репродуктивных технологий. На сегодняшний день пациенткам, страдающим от различных видов злокачественных новообразований и многих аутоиммунных заболеваний, в качестве лечения предлагается агрессивная терапия, которая негативно влияет на состояние половых клеток (Verga Falzacappa et al., 2012; Di Leva et al., 2013). Сегодня вопрос возможности сохранения фертильности актуален и для женщин, откладывающих наступление беременности.

Одним из актуальных подходов к решению вопроса сохранения фертильности у женщин является культивирование *in vitro* овариальной ткани или единичных фолликулов в целях получения зрелых и компетентных к оплодотворению и дальнейшему развитию ооцитов. Применение данного подхода не требует проведения процедур по обратной пересадке овариальной ткани пациентке, а позволяет получить зрелую яйцеклетку вне тела женщины. Полученные таким образом ооциты могут быть оплодотворены и криоконсервированы или перенесены в матку суррогатной матери (Filatov et al., 2015; Filatov et al., 2016).

Степень разработанности темы. Первые работы, посвящённые культивированию *in vitro* яичников и овариальных фолликулов млекопитающих, были проведены более 50 лет назад (Fainstat, 1968; Grob, 1969). С тех пор данное направление приобрело значительное развитие. Так, была показана возможность получения в результате культивирования овариальных фолликулов *in vitro* ооцитов, способных к оплодотворению (Xu et al., 2006; Jin et al., 2010). Однако статус ооцитов, получаемых в результате культивирования овариальных фолликулов *in vitro*, остаётся малоизученным. Имеются лишь единичные работы, посвящённые изучению уровней экспрессии непосредственно в ооцитах, полученных после культивирования овариальных фолликулов *in vitro* (Sánchez et al., 2012; Jiao, Woodruff, 2013). Таким образом, изучение состояния ооцитов в контексте культивирования овариальных фолликулов *in vitro* является одной из ключевых задач современной репродуктивной биологии.

Цель работы: разработать систему культивирования вторичных преантральных овариальных фолликулов *in vitro*, способную обеспечить рост фолликулов и получение зрелых ооцитов, а также разработать систему оценки качества ооцитов.

Задачи работы:

1. Подобрать оптимальные условия культивирования овариальных фолликулов мыши *in vitro* в условиях альгинатного гидрогеля.
2. Оценить морфологическое и функциональное состояние ооцитов, полученных в результате культивирования овариальных фолликулов *in vitro*.
3. Изучить динамику протекания мейоза в ооцитах, полученных от мышей различных возрастов *in vivo*, а также в результате культивирования овариальных фолликулов *in vitro*.

4. Определить стабильно экспрессирующиеся в ооцитах мышцы гены сравнения (референсные гены).
5. Сравнить уровни экспрессии генов, отвечающих за протекание деления в ооцитах мышцы, полученных из овариальных фолликулов культивированных *in vitro*, с уровнями экспрессии в ооцитах, полученных *in vivo*.

Объект и предмет исследования. В качестве объектов исследования в настоящей работе были использованы овариальные фолликулы и ооциты мышц различных возрастов линии C57Bl/6J. Предметом изучения являлось протекание процессов фолликулогенеза и оогенеза на морфологическом и молекулярном уровнях.

Научная новизна. Наиболее распространёнными методиками оценки эффективности культивирования овариальных фолликулов *in vitro* являются методики, основанные на подсчёте числа ооцитов, успешно прошедших мейотическое созревание (Xu et al., 2009; Jin et al., 2010; Dunning et al., 2011; Shikanov et al., 2009), оценке гормонального статуса культивированного фолликула (Skory et al., 2015), а также молекулярно-генетических методов диагностики, позволяющих оценить уровень экспрессии ряда генов в культивированных фолликулах (Jiao et al., 2013). Однако применяемые подходы не позволяют в должной мере оценить качество получаемых ооцитов, поскольку нормальные уровни экспрессии генов в фолликулярных клетках и гормональный статус фолликула или способность ооцита к завершению мейотического деления ещё не свидетельствуют о наличии у ооцита компетенции к нормальному развитию в дальнейшем после оплодотворения.

Нами была разработана система 3D культивирования овариальных фолликулов мышцы в альгинатном гидрогеле, позволяющая получать зрелые, способные к оплодотворению ооциты. Были разработаны новые подходы, позволяющие оценить эффективность культивирования овариальных фолликулов в системах *in vitro*: впервые в ооцитах, полученных в результате культивирования овариальных фолликулов *in vitro*, были изучены уровни экспрессии ряда ключевых генов, отвечающих за формирование и активную работу MPF-комплекса, а также некоторых элементов MAP-киназного пути. Также впервые были исследованы уровни экспрессии гена *Erap*, который играет важную роль в регуляции процессов трансляции в ооцитах млекопитающих.

Были получены новые данные об оптимальных генах сравнения (референсных генах) в ооцитах млекопитающих, что позволило получить достоверные молекулярно-биологические данные об уровнях экспрессии ряда исследованных целевых генов.

Впервые был использован метод цейтраферной микрофотосъемки для анализа изменения морфологического статуса ооцитов, полученных в результате культивирования овариальных фолликулов *in vitro*.

Теоретическая и практическая значимость. Было показано, что разработанная система культивирования овариальных фолликулов в условиях трёхмерного альгинатного гидрогеля, является адекватной для получения

зрелых ооцитов, находящихся на стадии МII мейотического деления. Эта система может быть применена в качестве тест-системы для анализа воздействия различных веществ, в том числе лекарственных препаратов, на процессы фолликулогенеза и оогенеза у млекопитающих. Разработка протоколов и методов анализа качества культивирования *in vitro* может служить основой для дальнейших разработок по созданию более эффективных культуральных систем овариальной ткани или овариальных фолликулов *in vitro* для млекопитающих, в том числе и человека. Используемая нами оценка состояния ооцита методом ПЦР анализа в режиме реального времени дала возможность непосредственно оценить эффективность системы культивирования овариальных фолликулов в условиях трёхмерного альгинатного гидрогеля *in vitro*.

Подобранный для этой работы комплекс референсных генов имеет ключевое значение для дальнейшего использования в исследованиях, посвящённых изучению уровней экспрессии различных генов интереса в ооцитах.

Личный вклад автора. Соискатель самостоятельно проводил анализ актуальной научной литературы, планировал и проводил эксперименты, осуществлял обработку и интерпретацию полученных данных, самостоятельно представлял результаты исследований на конференциях и принимал участие в подготовке публикаций результатов.

Методология и методы исследования. В работе были использованы современные методы биологии развития, клеточной и молекулярной биологии, методы математического и статистического анализа. Была разработана трёхмерная мультикомпонентная система культивирования овариальных фолликулов мыши *in vitro*. Для оценки эффективности культивирования овариальных фолликулов *in vitro* использовали метод количественной ПЦР в режиме реального времени для определения уровней экспрессии ряда генов в ооцитах.

Изучение состояния фолликулов и ооцитов также производили, базируясь на их морфологических характеристиках. В том числе морфологическое состояние ооцитов определяли с использованием цейтраферной микрофотосъёмки. Морфологическое состояние овариальных фолликулов оценивали с использованием методов световой, а также электронной трансмиссионной и растровой микроскопии.

Анализ локализации нуклеиновых кислот и белков в фолликулах и ооцитах проводили с помощью иммуноцитохимического окрашивания клеток с последующим анализом с помощью методов флуоресцентной и конфокальной электронной микроскопии.

Статистический анализ данных. С использованием критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Вилка были проверены гипотезы о нормальности распределений исследуемых показателей. Для сравнения двух независимых групп использовали критерий Манна-Уитни (U-критерий); для сравнения большего числа независимых групп использовали непараметрический аналог однофакторного дисперсионного анализа –

критерий Крускала-Уоллиса (Н-критерий). Для сравнения двух зависимых групп использовали критерий Уилкоксона для связанных выборок.

Критический уровень значимости для всех статистических критериев принимали равным 0,05, за исключением случаев множественных сравнений. При использовании критерия Манна-Уитни (U-критерий) в случае множественных сравнений критический уровень значимости вычисляли с учётом поправки Бонферрони, где критический уровень значимости p принимали равным $0,05/m$, где m – количество различных групп, задействованных в попарных сравнениях.

Положения, выносимые на защиту

1. При культивировании *in vitro* морфологический статус овариального фолликула не является однозначным индикатором состояния ооцита, заключенного в данном фолликуле.
2. Система культивирования *in vitro* преантральных овариальных фолликулов мыши на основе альгинатного гидрогеля, позволяет получать зрелые ооциты.
3. Динамика протекания мейотического созревания различается среди ооцитов, полученных *in vivo* и *in vitro*.
4. Уровни экспрессии ряда генов отличаются в группах ооцитов, полученных *in vivo* и *in vitro*.

Степень достоверности и апробация результатов. Представленные результаты были получены с использованием современного оборудования. Достоверность данных подтверждена их воспроизводимостью при проведении нескольких независимых экспериментов, в том числе с использованием положительных и отрицательных контрольных групп. По теме диссертации опубликовано 7 статей в рецензируемых научных журналах. Результаты работы представлены на 6 международных конференциях.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 255 страницах, содержит 16 таблиц, 38 рисунков и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, включающего 488 источника (8 русскоязычных и 480 англоязычных).

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

1. Анализ состояния овариальных фолликулов, выделенных механическим способом

Механический способ выделения фолликула предпочтителен в сравнении с ферментативным, так как при механическом выделении фолликулов из ткани яичника сохраняются клетки теки, которые принимают активное участие в выработке гормонов стероидного ряда (Choi et al, 2013a). Метод световой просвечивающей микроскопии не позволяет оценить наличие клеток теки в выделенном фолликуле. Методом просвечивающей электронной микроскопии нами было показано, что при механическом методе выделения клетки теки сохраняются в составе фолликула (рисунок 1).

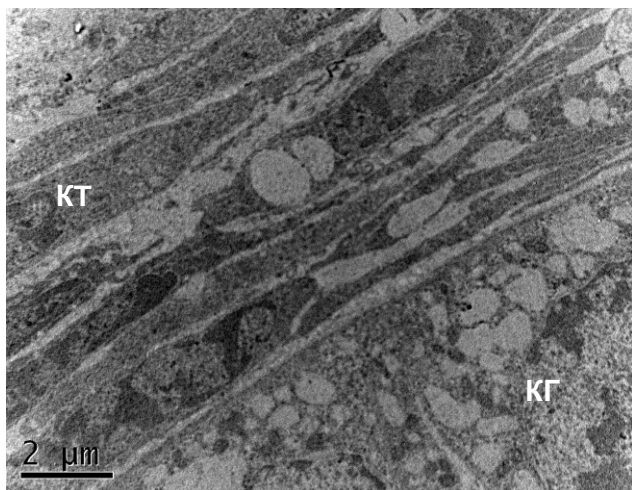


Рис. 1. Ультраструктура фолликула, выделенного механическим путём: после выделения клетки теки сохраняются и располагаются вдоль базальной мембраны. Просвечивающая электронная микроскопия. КГ – клетки гранулёзы, КТ – клетки теки

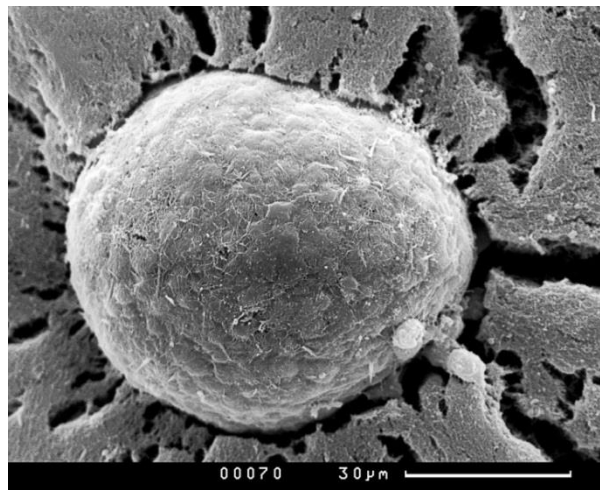


Рис. 2. Общий вид фолликула, выделенного механическим путём и инкапсулированного в альгинатный гидрогель. Растровая электронная микроскопия

Наличие текальных клеток у выделенных механическим путём фолликулов также было подтверждено с помощью метода растровой (сканирующей) электронной микроскопии. На Рисунке 2 продемонстрировано изображение фолликула, выделенного из овариальной ткани с помощью механического метода, а затем инкапсулированного в альгинатный гидрогель: на клетках теки имеются специфические выросты, формирующие «корзину» вокруг текального компартмента, что позволяет сохранить данному типу клеток целостность во время выделения.

2. Культивирование овариальных фолликулов в альгинатном гидрогеле

Альгинатный гидрогель сохраняет пористую структуру в течение всего периода культивирования, что делает возможным транспорт веществ к растущему фолликулу. Также он является достаточно структурированным, чтобы предотвратить механическую деградацию фолликула. В работе были использованы 0,75% w/v альгинатные гидрогели, полимеризованные в 0,2М растворе хлорида кальция.

Было показано, что выбранная культуральная система поддерживает рост фолликулов. На Рисунке 3 представлена последовательная серия фотографий фолликула, вступившего в рост. Размеры фолликулов (диаметр) по окончании культивирования были статистически значимо больше размеров фолликулов в начале культивирования ($p < 0,01$). Диаграмма, отображающая динамику роста фолликулов, приведена на Рисунке 4.

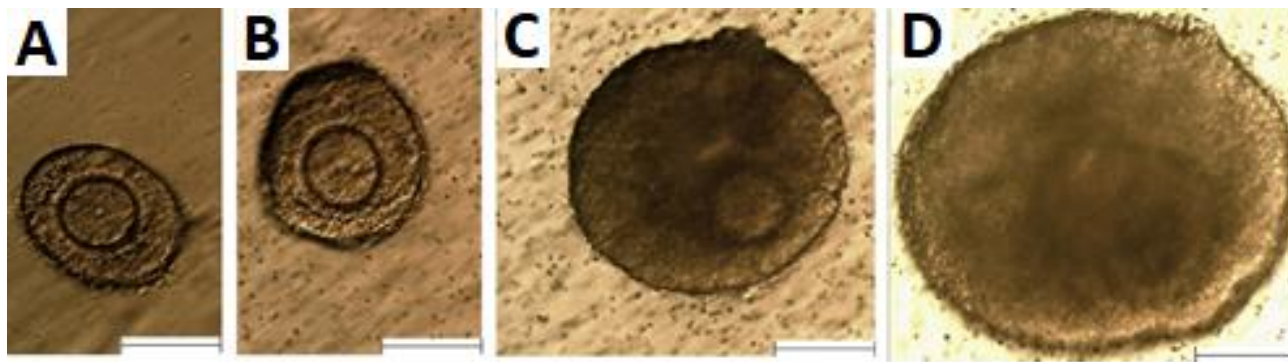


Рис. 3. Рост фолликула, индивидуально инкапсулированного в альгинатный гидрогель. Дни культивирования: **А** – первый; **В** – второй, **С** – четвёртый, **Д** – шестой. Масштабный отрезок – 100 мкм

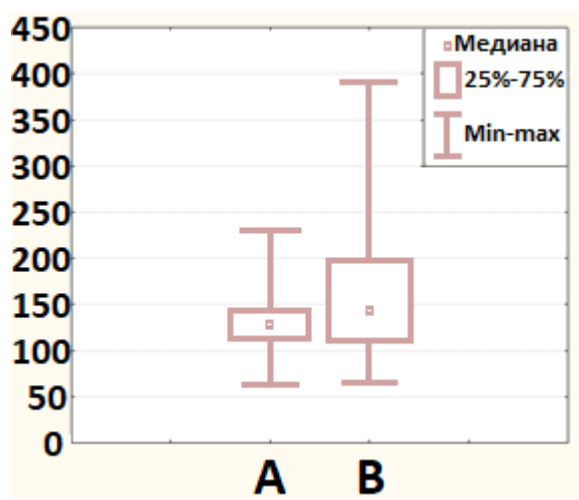


Рис. 4. Динамика изменения диаметра овариальных фолликулов различных размеров при культивировании в 0,75% альгинатном гидрогеле. **А** – диаметр (мкм) фолликулов в начале культивирования, **В** – диаметр (мкм) фолликулов в конце культивирования (8 суток). Имеются статистически значимые различия ($p < 0,01$), $n_{\text{фолликулов}} = 430$

Однако популяция овариальных фолликулов, прошедших культивирование в альгинатном гидрогеле *in vitro* не является однородной по способности к росту, это проиллюстрировано на Рисунке 5.

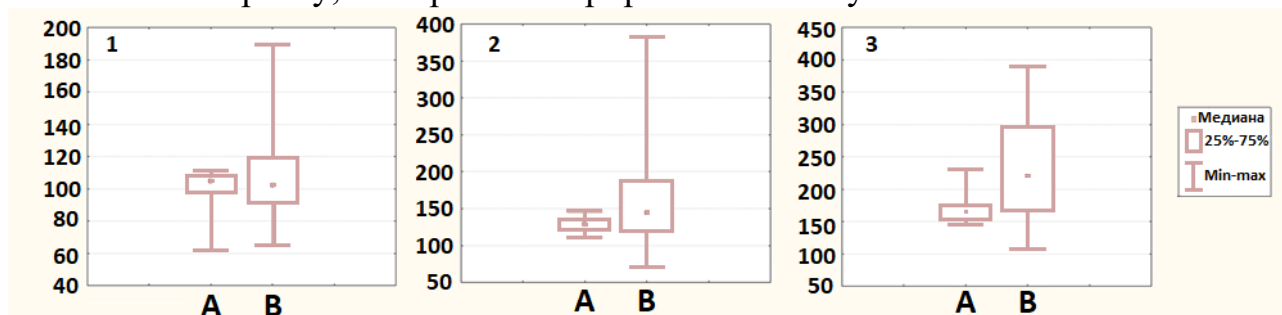


Рис. 5. Динамика изменения диаметра овариальных фолликулов при культивировании в 0,75% альгинатном гидрогеле. **А** – диаметр (мкм) фолликулов в начале культивирования, **В** – диаметр (мкм) фолликулов в конце культивирования (8 суток):

1. фолликулы с начальным диаметром менее 115 мкм, статистически значимые различия отсутствуют ($p > 0,05$), $n_{\text{фолликулов}} = 107$;
2. фолликулы с начальным диаметром от 115 до 145 мкм, имеются статистически значимые различия ($p < 0,01$), $n_{\text{фолликулов}} = 216$;
3. фолликулы с начальным диаметром более 145 мкм, имеются статистически значимые различия ($p < 0,01$), $n_{\text{фолликулов}} = 107$

Фолликулы, имеющие размер до 115 мкм в диаметре, преимущественно не демонстрировали роста. Тогда как фолликулы, имевшие больший размер при начале культивирования (свыше 115 мкм в диаметре), иллюстрировали рост. Особенно интенсивный рост наблюдался среди фолликулов, чей начальный диаметр превышал 145 мкм. На Рисунке 6 представлены диаграммы, иллюстрирующие рост фолликулов, имеющих различный размер в первый день культивирования. Таким образом, разработанная система культивирования овариальных фолликулов *in vitro* в альгинатном гидрогеле позволяет поддерживать рост, среди фолликулов, диаметр которых превышает 115 мкм.

Сохранение жизнеспособности фолликулов после культивирования в альгинатном гидрогеле. Для оценки жизнеспособности фолликулов после культивирования в альгинатном гидрогеле извлечённые из альгината фолликулы окрашивали флуоресцентными красителями: Hoechst 33258 (bis-benzimide, определение локализации ДНК в образцах) и Йодистого Пропидия (Propidium Iodide, определение локализации погибших клеток). На Рисунке 6 показана фотография фолликула, сохраняющего жизнеспособность через неделю культивирования в альгинатном гидрогеле: позитивное окрашивание йодидистым пропидием обнаруживается лишь в единичных клетках фолликула.

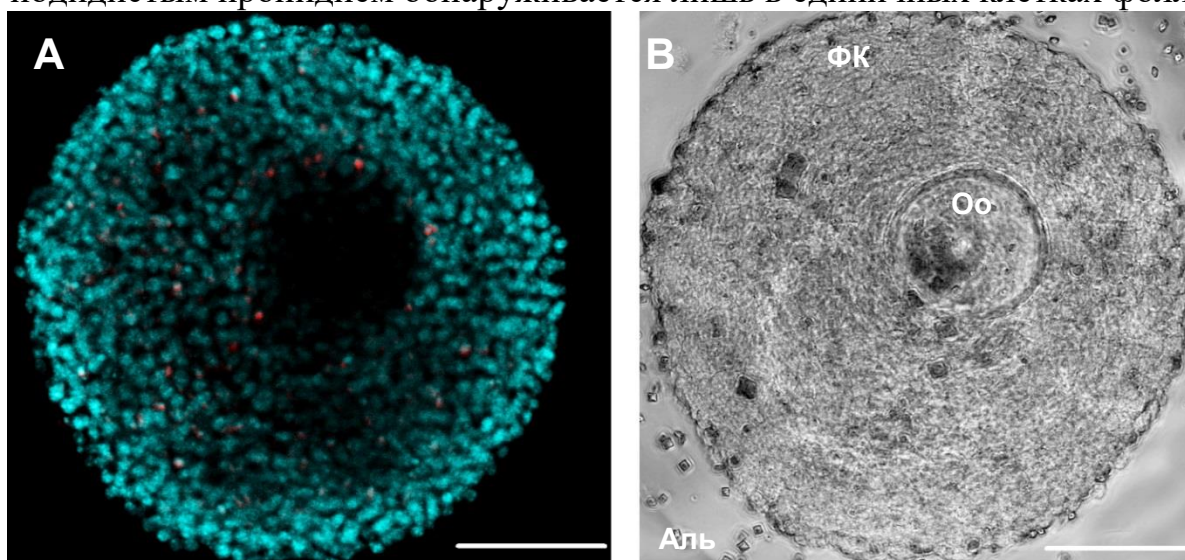


Рис. 6. Фолликул через неделю культивирования в альгинатном гидрогеле: **А** – окрашивание йодистым пропидием (красный) и Hoechst 33258 (голубой), фолликул сохраняет жизнеспособность спустя неделю культивирования; **В** – общий вид, фазовый контраст. Масштабный отрезок – 70 мкм. **Аль** – альгинат, **ФК** – фолликулярные клетки, **Оо** – ооцит. Конфокальная микроскопия

3. Оплодотворение ооцитов, полученных после культивирования, и развитие эмбрионов

В результате оплодотворения ооцитов, выделенных из овариальных фолликулов, культивированных *in vitro*, нам удавалось получить эмбрионы, которые демонстрировали начало процесса дробления. Пример фолликула, из которого был получен подобный ооцит, а также протекание развития эмбриона после оплодотворения данного ооцита, приведены на Рисунке 7.

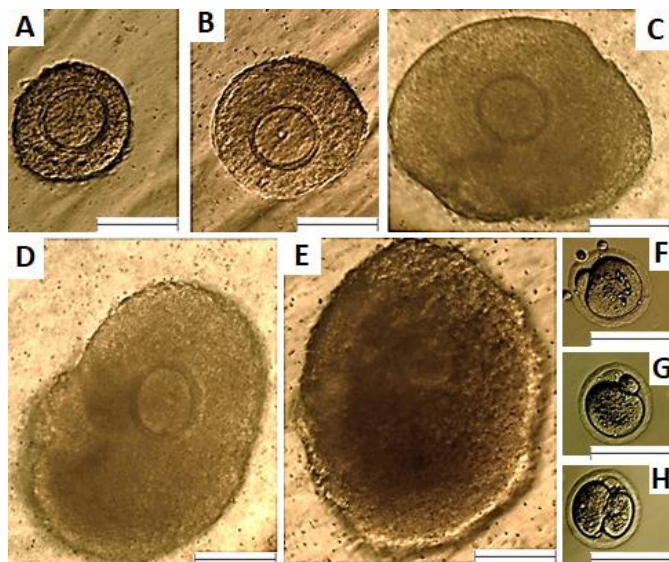


Рис. 7. А – 1-ые сутки культивирования; В – 2-ые сутки; С – 4-ые сутки; D – 6-ые сутки; Е – 9-ые сутки; F – ооцит, выделенный из фолликула на 9-ые сутки (видно отделившееся первое редукционное тельце); G – зигота (утро 10-ых суток, видны первое и второе отделившиеся редукционные тельца); H – дробление (вечер 10-ых суток культивирования). Световая просвечивающая микроскопия, применён контраст Хоффмана. Масштабный отрезок – 100 мкм

Несмотря на то, что в данной работе удалось получить в результате культивирования овариальных фолликулов *in vitro* ооциты, способные к оплодотворению, развития эмбрионов до стадии бластоцисты не происходило.

4. Оценка степени ядерной зрелости ооцитов и эмбрионов, полученных после культивирования овариальных фолликулов *in vitro* в альгинатном гидрогеле

Чтобы изучить возможные причины остановок развития, полученные после культивирования овариальных фолликулов *in vitro* ооциты и эмбрионы были окрашены флуоресцентными красителями и проанализированы с помощью методов конфокальной и флуоресцентной микроскопии. На Рисунках 8–9 приведены изображения различных ооцитов, выделенных из фолликулов, культивированных в альгинатном гидрогеле *in vitro*.

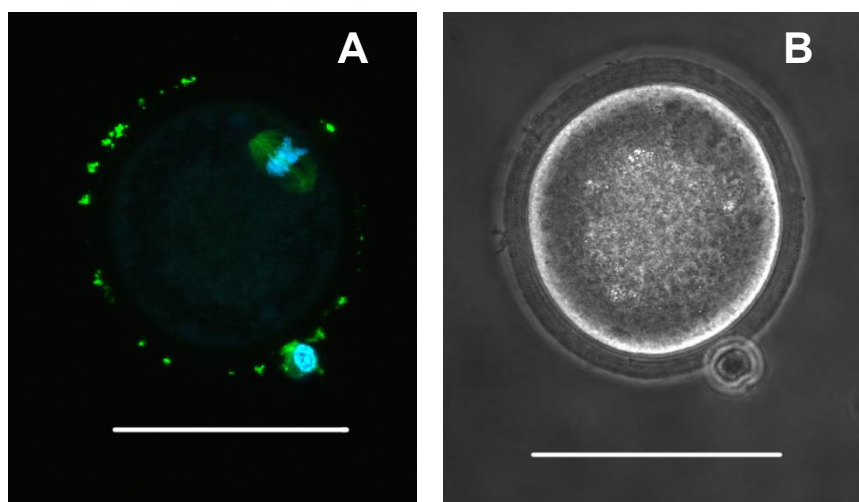


Рис. 8. Ооцит, полученный после культивирования овариальных фолликулов *in vitro*.

А – Hoechst 33258 (синий цвет, ДНК) и Taxol (зелёный цвет, тубулин). В – Фазовый контраст. Масштабный отрезок – 70 мкм

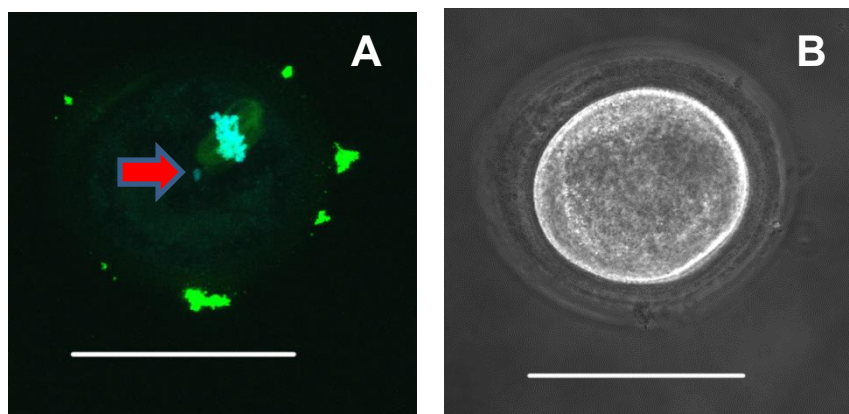


Рис. 9. Ооцит, полученный после культивирования овариальных фолликулов *in vitro*.

А – Hoechst 33258 (синий цвет, ДНК) и Taxol (зелёный цвет, тубулин).

В – Фазовый контраст. Стрелкой обозначена хромосома, не закрепленная на веретене деления. Масштабный отрезок – 70 мкм

Были обнаружены как ооциты, обладающие морфологически нормальным веретеном деления (Рисунок 8), так и ооциты, у которых были выявлены хромосомы, не прикрепленные к веретену деления (пример такого ооцита приведён на Рисунке 9). На Рисунке 10 приведены изображения ооцита, полученного в результате культивирования овариального фолликула в альгинатном гидрогеле, и затем подвергнутого оплодотворению: были обнаружены сформированные пронуклеусы. Формирование пронуклеусов иллюстрирует тот факт, что оплодотворение ооцитов действительно имело место, и наблюдаемое выделение редукционных телец не является фрагментацией.

На Рисунке 11 приведены фотографии эмбриона, полученного после оплодотворения ооцита, выделенного из культивированного *in vitro* фолликула. Было показано формирование аномального веретена деления, что способно приводить к остановкам в развитии и образованию анеуплоидного эмбриона.

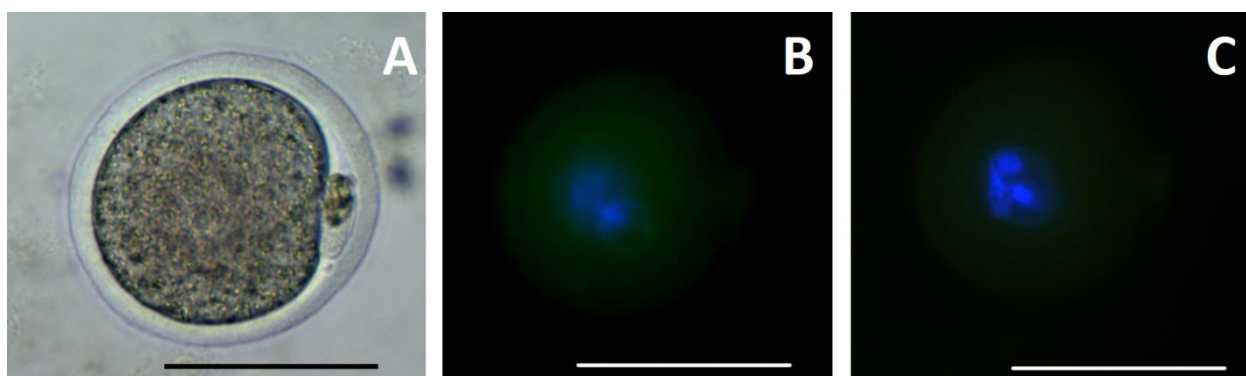


Рис. 10. Ооцит, выделенный из альгинатного гидрогеля, оплодотворённый *in vitro*. **А** – проходящий свет, отчетливо видно наличие первого редукционного тельца, **В, С** – флуоресцентное окрашивание Hoechst, видны два пронуклеуса в разных оптических планах. Масштабный отрезок – 70 мкм

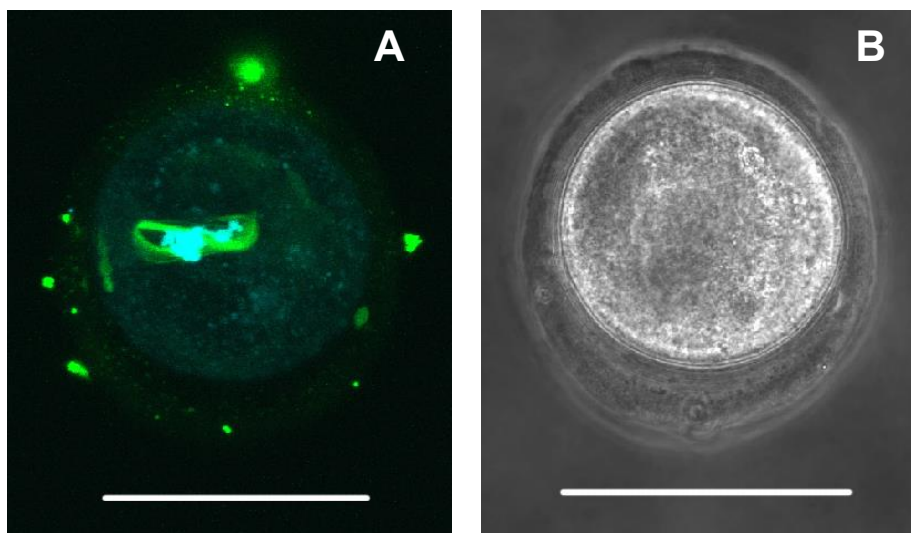


Рис. 11. Эмбрион, полученный после оплодотворения ооцита, выделенного из культивированного *in vitro* фолликула.

А – Hoechst 33258 (синий цвет, ДНК) и Taxol (зелёный цвет, тубулин).

В – Фазовый контраст. Масштабный отрезок – 70 мкм

5. Динамика протекания мейотического деления и морфология ооцитов, выделенных из фолликулов, культивированных *in vitro*, в сравнении с контрольными ооцитами

Для анализа были рассчитаны значения внутренних диаметров ооцитов различных групп. На Рисунке 12 приведена диаграмма, иллюстрирующая изменение диаметров ооцитов, заключенных в фолликулы, культивированные в альгинатном гидрогеле.

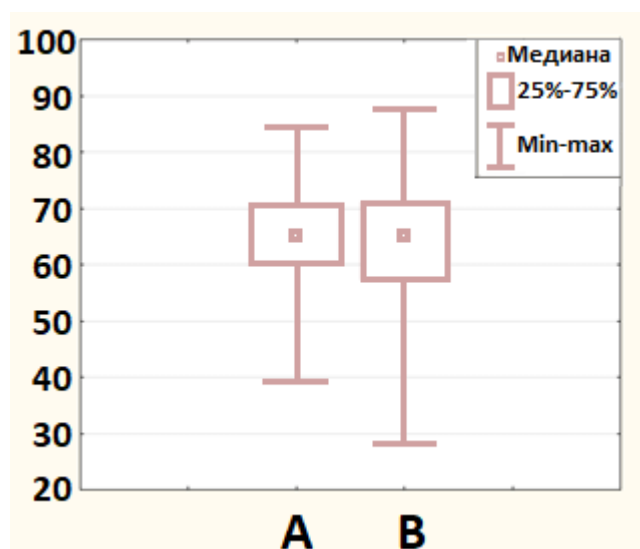


Рис. 12. Изменения диаметров ооцитов, заключенных в фолликулы, при культивировании в 0,75% альгинатном гидрогеле. **А** – диаметр (мкм) ооцитов в начале культивирования, **В** – диаметр (мкм) ооцитов в конце культивирования (7 суток). Статистически значимые различия отсутствуют ($p > 0,05$), $n_{\text{ооцитов}} = 414$

Было обнаружено, что изменения диаметра ооцитов в ходе культивирования фолликулов *in vitro* не происходит. Были изучены данные отдельно по различным группам ооцитов, имеющих различные диаметры при начале культивирования. На Рисунке 13 приведены диаграммы, иллюстрирующие изменение диаметров ооцитов различных групп при культивировании овариальных фолликулов *in vitro*.

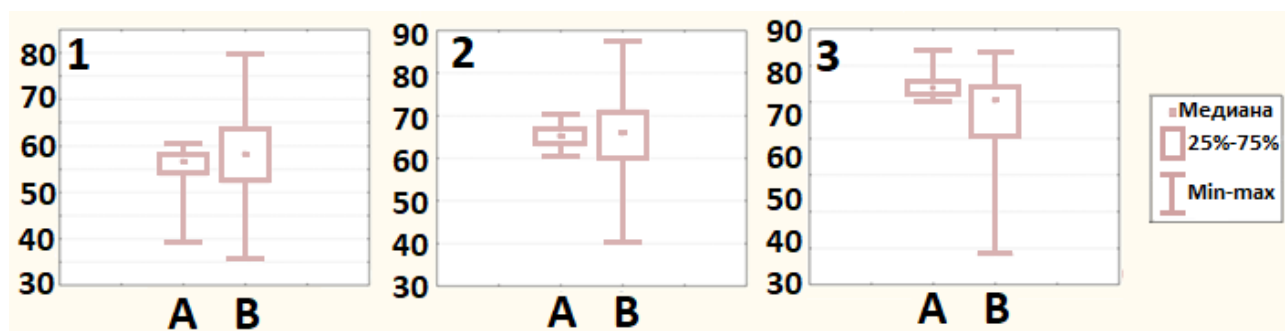


Рис. 13. Динамика изменения диаметра ооцитов, заключенных в овариальные фолликулы, при культивировании в 0,75% альгинатном гидрогеле. **А** – диаметр (мкм) ооцитов в начале культивирования, **В** – диаметр (мкм) ооцитов в конце культивирования (7 суток):

1. ооциты с начальным диаметром менее 61 мкм, наблюдается достоверное **увеличение** диаметров ооцитов ($p < 0,01$), $n_{\text{ооцитов}} = 103$;
2. ооциты с начальным диаметром от 61 до 71 мкм, статистически значимые различия отсутствуют ($p > 0,05$), $n_{\text{ооцитов}} = 208$, **размер ооцитов не изменяется**;
3. ооциты с начальным диаметром более 71 мкм, наблюдается достоверное **уменьшение** диаметров ооцитов ($p < 0,01$), $n_{\text{ооцитов}} = 103$

Разработанная система культивирования овариальных фолликулов поддерживает рост заключенных в них ооцитов лишь до определённого предела, примерно до 70 мкм.

Применяемая в данной работе система культивирования овариальных фолликулов *in vitro* позволяла получить ооциты, способные инициировать мейотическое деление в 74% случаев (стадии GVBD и MII). Морфологическое состояние ооцитов по окончании культивирования овариальных фолликулов в альгинатном гидрогеле постадийно описано в таблице 1.

Таблица 1. Морфологическое состояние ооцитов после культивирования фолликулов в альгинатном гидрогеле (7 суток в средах роста + 1 сутки в среде созревания).

Стадия мейотического созревания	Количество от общей выборки (n=126)
GV	15 (12%)
GVBD	37 (29%)
МИИ	57 (45%)
Деградировавшие	17 (14%)

В работе изучали динамику протекания мейотического деления и морфологическое состояние в ооцитах мыши из трёх различных групп. На Рисунке 14 представлена диаграмма, иллюстрирующая размеры ооцитов из трёх различных групп на стадии GV, которые были использованы для проведения цейтраферной микрофотосъёмки. На Рисунке 15 приведены микрофотографии типичных ооцитов из трёх различных групп.

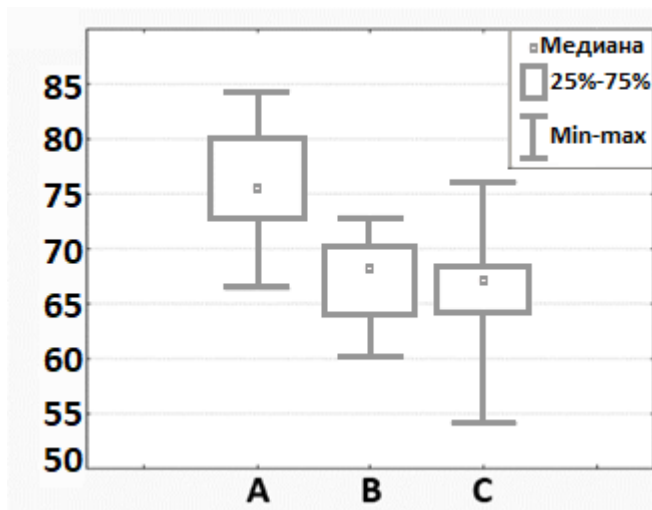
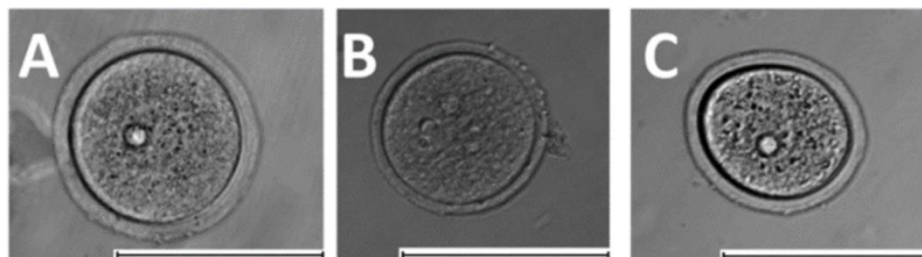


Рис. 14. Диаграмма диаметров ооцитов, полученных *in vivo* от половозрелых мышей линии C57Bl/6J на стадии проэструса (возраст 3 месяца, группа А, n=31), и ооцитов, полученных от неполовозрелых мышей линии C57Bl/6J (возраст 3 недели, группа В, n=45), ооциты, выделенные из фолликулов после культивирования в альгинатном гидрогеле (C57Bl/6J 2 недели, группа С, n=21). По оси ординат отложены

диаметры ооцитов, мкм. Имеются статистически значимые различия в диаметрах ооцитов между группами А и В ($p < 0,01$), А и С ($p < 0,01$), статистически значимых различий между группами В и С нет ($p > 0,05$)

Рис. 15. Ооциты на стадии GV, А – ооцит, выделенный из мыши на стадии проэструса в возрасте 3 месяцев, В – ооцит, выделенный из

мышы в возрасте 3 недель, С – ооцит, полученный из выращенного вторичного многослойного фолликула (выделенного из 2 недельной мыши), культивированного *in vitro*. Масштабный отрезок – 100 мкм. Просвечивающая световая микроскопия, контраст Хоффмана



Для анализа скорости протекания мейотического деления в ооцитах была сконструирована установка, позволяющая осуществлять цейтраферную микрофотосъемку для наблюдения за развитием ооцитов и фиксировать три различные морфологические стадии, наблюдаемые при протекании мейотического деления в ооцитах: GV, GVBD и отделение первого редукционного тельца (рисунок 16). Различия в протекании мейотического деления в трёх различных группах ооцитов приведены в таблицах 2-3.

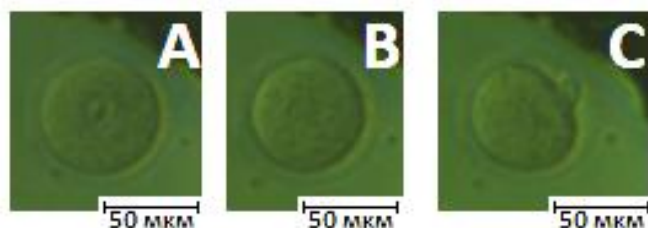


Рис. 16. Ключевые морфологические стадии ооцитов: GV (А), GVBD (В), МII (С) – отделение первого редукционного тельца. Цейтраферная микрофотосъёмка

Протекание мейотического деления в ооцитах, полученных от неполовозрелых мышей и в ооцитах, полученных в результате культивирования

овариальных фолликулов в подобранных условиях *in vitro*, не соответствует нормальному течению мейоза в ооцитах, полученных от половозрелых самок.

Таблица 2. Процентное соотношение ооцитов, достигших по окончании культивирования (40 часов) различных морфологических стадий. Преждевременное разрешение мейоза до начала культивирования ингибировано действием пимобендана.

	GV	GVBD	MII
Группа А (ооциты от половозрелых мышей, n=31)	0/31 (0%)	2/31 (7%)	29/31 (93%)
Группа В (ооциты от неполовозрелых мышей, n=45)	7/45 (16%)	24/45 (53%)	14/45 (31%)
Группа С (ооциты после культивирования фолликулов, n=21)	4/21 (19%)	8/21 (38%)	9/21 (43%)

Таблица 3. Медианное время, необходимое для перехода от одной морфологической стадии мейоза к другой в различных группах ооцитов.

	GV->GVBD	GVBD->MII
Группа А (ооциты от половозрелых мышей)	85 мин n=31	570 мин n=29
Группа В (ооциты от неполовозрелых мышей)	90 мин n=38	1020 мин n=14
Группа С (ооциты после культивирования фолликулов)	110 мин n=17	1195 мин n=9

6. Молекулярно-биологический анализ ооцитов

Для анализа методом количественной ПЦР в реальном времени были использованы ооциты на стадии GV, поскольку именно на этой стадии мРНК в ооцитах находится в наиболее стабильном состоянии (Mehlmann, 2013).

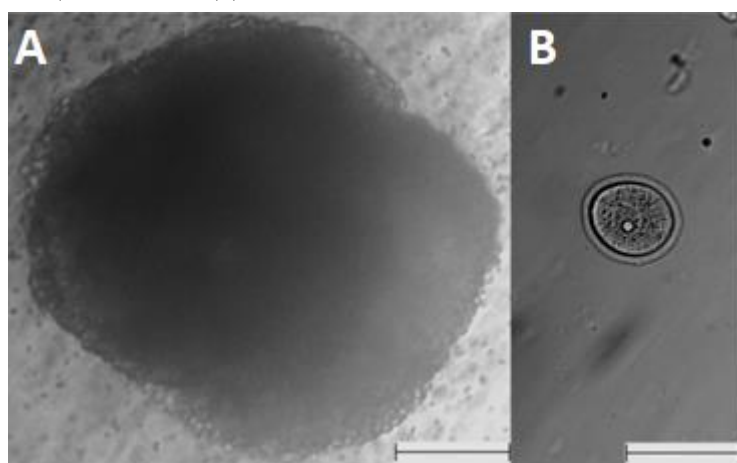


Рис. 17. А – пример фолликула, помещенного в раствор для созревания, содержащий пимобендан; В – выделенный из данного фолликула ооцит на стадии GV. Световая просвечивающая микроскопия, применён контраст Хоффмана. Масштабный отрезок – 100 мкм

Для предотвращения разрушения герминативной везикулы был использован селективный ингибитор фосфодиэстеразы 3А типа – пимобендан. Оптимальной концентрацией пимобендана, позволяющей поддерживать блок мейоза в течение 4-х часов на стадии GV в ооцитах мыши и при этом не вызывающей токсических эффектов, является 35 мкг/мл. На Рисунке 17

изображён фолликул, на который при созревании воздействовали пимобенданом. В результате данного воздействия удаётся получить ооциты на стадии GV.

7. Выбор референсных генов для GV-ооцитов мыши.

Была проведена оценка стабильности экспрессии референсных генов в ооцитах, полученных от двух групп мышей: половозрелых (возраст – 3 месяца) и неполовозрелых (возраст – 3 недели). Для оценки были выбраны семь референсных генов, принадлежащих к различным функциональным классам: actin beta (*Actb*), eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon 1 (*Eef1e1*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*), H2A histone family, member Z (*H2afz*), peptidylprolyl isomerase A (*Ppia*), ribosomal protein L4 (*Rpl4*) и ubiquitin C (*Ubc*). Данные каждого из эталонных генов были проанализированы с помощью утилит GeNorm, BestKeeper и NormFinder. Результаты ранжирования референсных генов по уровню стабильности экспрессии приведены в таблице 4.

Таблица 4. Ранжирование референсных генов по стабильности их уровня экспрессии в GV-ооцитах мышей с помощью утилит geNorm, BestKeeper, NormFinder. Гены, рассматриваемые, как наиболее стабильно экспрессирующиеся, выделены жирным.

Ранг	geNorm	BestKeeper	NormFinder
1	<i>Gapdh</i>	<i>Rpl4</i>	<i>Gapdh</i>
2	<i>Rpl4</i>	<i>Ppia</i>	<i>H2afz</i>
3	<i>H2afz</i>	<i>Gapdh</i>	<i>Rpl4</i>
4	<i>Ppia</i>	<i>H2afz</i>	<i>Eef1e1</i>
5	<i>Actb</i>	<i>Eef1e1</i>	<i>Actb</i>
6	<i>Ubc</i>	<i>Ubc</i>	<i>Ppia</i>
7	<i>Eef1e1</i>	<i>Actb</i>	<i>Ubc</i>

Для дальнейшего анализа в качестве наиболее стабильно экспрессирующихся референсных генов были выбраны *Gapdh*, *Rpl4* и *H2afz* (Filatov et al., 2019).

8. Изучение уровней экспрессии целевых генов в различных ооцитах

В данной работе мы сравнивали уровни экспрессии ряда ключевых генов в ооцитах мыши из трёх различных групп. Для анализа качества ооцитов с помощью метода количественной ПЦР в режиме реального времени в настоящей работе изучали уровни экспрессии ключевых генов, ответственных за протекание мейоза и митоза: *Ccnb* и *Cdk1* (кодируют белки-субъединицы MPF-комплекса), *Ccnh* и *Wee2* (белки, кодируемые данными генами, отвечают за регуляцию работы MPF-комплекса), *Mos* (его одноименный белок является ключевым элементом MAPK-пути) и *Eraab* (кодируемый им одноименный белок ePAB, связывается с поли(А) концом мРНК и запускает их трансляцию). На Рисунке 18 приведены диаграммы, иллюстрирующие уровни экспрессии перечисленных выше генов в различных группах ооцитов мыши.

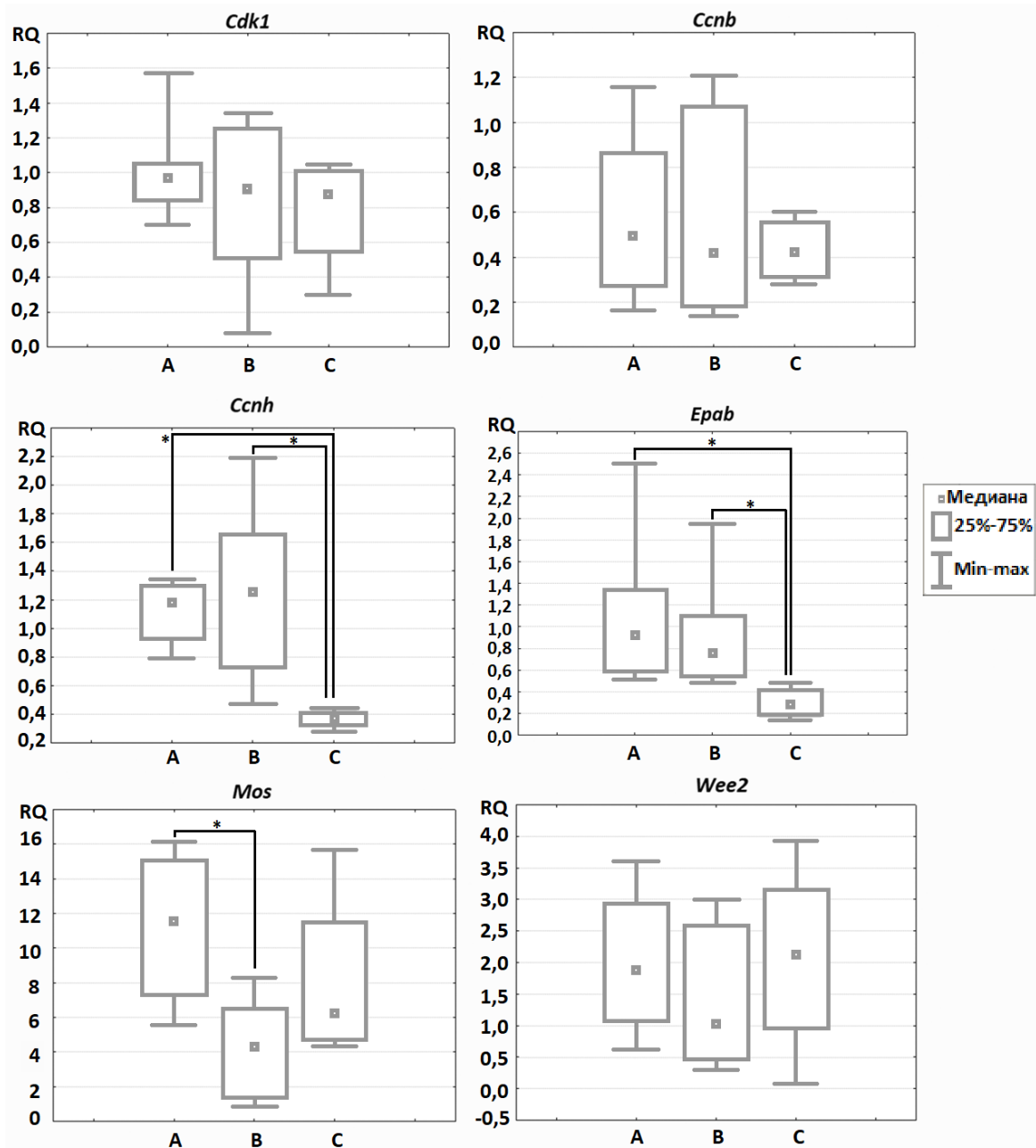


Рис. 18. Диаграммы уровней экспрессии генов *Cdk1*, *Ccnb*, *Ccnh*, *Epab*, *Mos* и *Wee2* в различных группах ооцитов мыши. По оси ординат отложена величина RQ – нормировка по трём референсным генам: *H2afz*, *Gapdh*, *Rpl4*. Группа А – ооциты, выделенные из половозрелых мышей (возраст – 3 месяца); группа В – ооциты, выделенные из неполовозрелых мышей (возраст – 3 недели); группа С – ооциты, выделенные из фолликулов, культивированных *in vitro*. Статистически значимые различия показаны звёздочками ($p < 0,017$)

Были выявлены различия в уровнях экспрессии генов *Epab* и *Ccnh* в ооцитах, полученных в результате культивирования овариальных фолликулов в альгинатном гидрогеле в подобранных условиях *in vitro* по сравнению с ооцитами, полученными от половозрелых и неполовозрелых мышей. Снижение уровня экспрессии гена *Ccnh* может являться причиной замедленного разрушения герминативной везикулы в ооцитах. Снижение концентрации белков, инициирующих трансляцию (еРАВ), может привести к нарушениям в протекании мейотического деления, а также в замедленном развитии эмбриона.

Замедление протекания мейоза в ооцитах, полученных в результате культивирования овариальных фолликулов *in vitro*, по сравнению с ооцитами, полученными *in vivo*, согласуется с данными, полученными о различиях в уровнях экспрессии гена *Erap* в различных группах ооцитов.

Были выявлены различия в уровнях экспрессии гена *Mos* в ооцитах, полученных от половозрелых и неполовозрелых мышей. Данный ген кодирует одноименный белок, который является участником МАРК-сигнального пути. Активация данного пути приводит к разрушению герминативной везикулы. Работа данного каскада также необходима для нормального протекания более поздних фаз мейоза. Таким образом, снижение уровня экспрессии *Mos* может являться причиной, по которой наблюдалось снижение числа ооцитов с нормальным протеканием мейоза среди ооцитов, полученных от неполовозрелых мышей, по сравнению с ооцитами, полученными от половозрелых самок.

Таким образом, несмотря на то, что ооциты, полученные от неполовозрелых мышей, и ооциты, полученные в результате культивирования овариальных фолликулов в подобранных условиях *in vitro*, имеют сходный размер и демонстрируют нарушения в протекании мейоза по сравнению с ооцитами, выделенными из половозрелых самок, причины аномального развития ооцитов из этих двух групп различаются.

Выводы:

1. Разработан трёхступенчатый протокол культивирования ранних преантральных овариальных фолликулов мыши в альгинатном гидрогеле *in vitro*, при использовании которого в полученных ооцитах инициация мейоза наступает в 74% случаев, а выделение первого РТ наблюдается в 45% случаев.
2. Предложено использование пимобендана (35 мкг/мл) для ингибирования наступления стадии GVBD в ооцитах, получаемых в результате стимуляции овуляции воздействием ХГЧ на фолликулы, культивируемые *in vitro*.
3. Ооциты, выделенные из фолликулов после культивирования, и ооциты, полученные от неполовозрелых мышей, имеют меньший диаметр и пониженную способность к созреванию по сравнению с ооцитами, полученными от половозрелых мышей.
4. Определены референсные гены для ооцитов мыши на стадии GV: *Gapdh*, *H2afz*, *Rpl4*.
5. Уровни экспрессии генов, кодирующих белки MPF-комплекса (*Cdk1*, *Ccnb*), а также *Wee2*, не различаются в ооцитах, выделенных из фолликулов, культивированных *in vitro*, и в ооцитах, полученных из яичников половозрелых и неполовозрелых мышей.
6. Уровни экспрессии генов *Erap* и *Ccnh* в ооцитах, выделенных из фолликулов, культивированных *in vitro*, достоверно ниже таковых в ооцитах, выделенных из яичников от половозрелых и неполовозрелых мышей.
7. Уровни экспрессии гена *Mos*, ответственного за протекание мейоза и митоза, достоверно ниже в ооцитах, полученных от неполовозрелых мышей, по сравнению с половозрелыми.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Соискатель имеет 16 опубликованных работ, в том числе 7 статей по теме диссертации, опубликованных в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных системах цитирования (Web of Science, Scopus, PubMed) и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.03.05 – Биология развития, эмбриология.

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ М.В. Ломоносова

- 1) **Filatov M.A.**, Khramova Y.V., Semenova M.L. *In Vitro* Mouse Ovarian Follicle Growth and Maturation in Alginate Hydrogel: Current State of the Art. // *Acta Naturae*. – 2015. – V.7. – №2. – P.48-56. **Импакт-фактор (WoS) – 1.657**
- 2) **Filatov M.A.**, Khramova Y.V., Kiseleva M.V., Malinova I.V., Komarova E.V., Semenova M.L. Female fertility preservation strategies: cryopreservation and ovarian tissue *in vitro* culture, current state of the art and future perspectives. // *Zygote*. – 2016. – V.24. – №5. – P.635-653. **Импакт-фактор (WoS) – 1.278**
- 3) **Filatov M.**, Khramova Y., Parshina E., Bagaeva T., Semenova M. Influence of gonadotropins on ovarian follicle growth and development *in vivo* and *in vitro*. // *Zygote*. – 2017. – V.25. – №3. – P.235-243. **Импакт-фактор (WoS) – 1.278**
- 4) **Filatov M.**, Khramova Y., Semenova M. Molecular Mechanisms of Prophase I Meiotic Arrest Maintenance and Meiotic Resumption in Mammalian Oocytes. // *Reprod. Sci.* – 2018. doi: 10.1177/1933719118765974 **Импакт-фактор (WoS) – 2.559**
- 5) Nikishin D.A., **Filatov M.A.**, Kiseleva M.V., Bagaeva T.S., Konduktorova V.V., Khramova Y.V., Malinova I.V., Komarova E.V., Semenova M.L. Selection of stable expressed reference genes in native and vitrified/thawed human ovarian tissue for analysis by qRT-PCR and Western blot. // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2018. – V.35. – №10. – P.1851-1860. **Импакт-фактор (WoS) – 2.82**
- 6) Il'ina I.V., Khramova Y.V., **Filatov M.A.**, Sitnikov D.S. Femtosecond laser is effective tool for zona pellucida engraving and tagging of preimplantation mammalian embryos. // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2019. – V.36. – №6. – P.1251-1261. **Импакт-фактор (WoS) – 2.82**
- 7) **Filatov M.**, Nikishin D., Khramova Y., Semenova M. Reference genes selection for real-time quantitative PCR analysis in mouse GV oocytes. // *Zygote*. – 2019. doi: 10.1017/S0967199419000492 **Импакт-фактор (WoS) – 1.278.**

Другие публикации по теме диссертации

- 1) Реконструирование соматического окружения овариальных фолликулов в системе *in vitro*. Храмова Ю.В., Никишин Д.А., Багаева Т.С., **Филатов М.А.**, Семенова М.Л. *Research'n Practical Medicine Journal*. 2015; с. 48-48.
- 2) Ovarian follicle culture in 2D and 3D systems. Khramova Y.V., **Filatov M.**, Lebedeva T., Semenova M. *FEBS Journal Special Issue: FEBS EMBO 2014 Conference, 2014; том 281, с. 332-332.*
- 3) Культивирование овариальных фолликулов мыши в средах различного состава. Храмова Ю.В., **Филатов М.А.**, Лебедева Т.С., Семенова М.Л.

Материалы конференций

- 1) **Филатов М.А.** Применение многоступенчатых систем культивирования овариальных фолликулов мыши в альгинатном гидрогеле *in vitro*. XXIV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2017». Секция "Биология", Москва, Россия, 10-14 апреля 2017.
- 2) **Филатов М.А.**, Семенова М.Л. Изучение воздействия факторов культуральной среды и механического микроокружения на рост фолликулов яичника и созревания ооцитов мыши *in vitro*. Репродуктивные технологии в онкологии, Обнинск, Россия, 22-23 мая 2015.
- 3) Семенова М.Л., **Филатов М.А.**, Малинова И.В., Комарова Е.В., Киселева М.В. Эксплантационное культивирование овариальной ткани. Репродуктивные технологии в онкологии, Обнинск, Россия, 22-23 мая 2015.
- 4) Храмова Ю.В., Никишин Д.А., Багаева Т.С., **Филатов М.А.**, Семенова М.Л. Новые экспериментальные подходы к реконструированию соматического окружения овариальных фолликулов и изучению взаимодействия между клеточными элементами *in vitro*. 19 международная пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века», г. Пушкино, Россия, 20-24 апреля 2015.
- 5) **Филатов М.А.** Влияние механического микроокружения и факторов культуральной среды на рост овариальных фолликулов и созревание ооцитов мыши в альгинатном гидрогеле в условиях *in vitro*. XXII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2015", Москва, Россия, 13-17 апреля 2015.
- 6) Khramova Y.V., **Filatov M.**, Lebedeva T., Semenova M. Ovarian follicle culture in 2D and 3D systems. FEBS EMBO 2014 Conference, Paris, France, 2014.