

УДК 611.013.17:57.085.23

Рост и созревание фолликулов яичника мыши в альгинатном гидрогеле *in vitro*: состояние проблемы

М. А. Филатов*, Ю. В. Храмова, М. Л. Семёнова

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

*E-mail: maxfilat@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.11.2014

После доработки 06.03.2015

РЕФЕРАТ В обзоре рассмотрены основные факторы, влияющие на развитие овариального фолликула мыши в условиях *in vitro* в трехмерной системе альгинатного гидрогеля: концентрация альгината, присутствие в гидрогеле веществ, влияющих на жесткость субстрата (коллаген, фибрин); атмосфера культивирования; базовый состав культуральных сред, присутствие в средах для культивирования специальных добавок, проявляющих свойства антиоксидантов (соли аскорбиновой кислоты, глутатион) или способствующих улучшению липидного обмена (*L*-карнитин), гормональных препаратов и факторов роста. Обсуждаются основные методические подходы группового культивирования фолликулов в альгинатном гидрогеле, а также сокультивирования инкапсулированных в альгинат фолликулов с различными клеточными популяциями.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА альгинат, гидрогель, фолликул, яичник мыши.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БСА – бычий сывороточный альбумин; ИТС – инсулин, трансферрин, селенит; ЛГ – лютеинизирующий гормон; 2D – двухмерный; 3D – трехмерный; ФСГ – фолликулостимулирующий гормон; ХГЧ – хорионический гонадотропин человека; ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка; ЭФР – эпидермальный фактор роста.

ВВЕДЕНИЕ

Создание системы, позволяющей получать зрелые ооциты в условиях *in vitro*, представляет большой интерес для исследователей. По различным причинам женщине может потребоваться получить зрелые ооциты из ткани яичника в искусственных условиях. Например, при гормонзависимом раке молочной железы для снижения выработки половых гормонов применяют овариоэктомию [1]. При других видах рака применяют лучевую и химиотерапию, что также негативно сказывается на состоянии яичника. Под действием химиотерапевтических агентов клетки яичника деградируют по пути апоптоза. Этот процесс затрагивает как строму, так и собственно фолликулярную систему яичника [2] и приводит к уменьшению численности в том числе и примордиальных фолликулов, а следовательно, к снижению овариального резерва и развитию бесплодия [3]. В настоящее время больным предлагается проведение криоконсервации овариальной ткани в расчете на то, что после успешного лечения данную ткань можно будет вернуть в организм пациентки [4]. Такие процедуры сопряжены с рядом трудностей: как при заборе овариальной ткани, так и при аутооттрансплан-

тации необходимо хирургическое вмешательство, а для инициации роста и созревания фолликулов и ооцитов требуется гормональная стимуляция. Все эти действия могут негативно отразиться на ослабленном здоровье пациентки, включая повышение риска возобновления онкологического процесса.

Выходом в подобных ситуациях может стать культивирование ткани яичника в условиях *in vitro* с дальнейшим получением зрелых, способных к оплодотворению ооцитов, которые могут быть подвергнуты криоконсервированию и в дальнейшем использоваться в программах вспомогательных репродуктивных технологий. В последние годы методы культивирования *in vitro* овариальной ткани и единичных фолликулов активно разрабатываются на различных модельных объектах. К таким модельным объектам относятся собака [5], макака-резус [6], но в большинстве случаев используют ткань яичника мыши [7–11]. Хотя за последнее время получен ряд обнадеживающих результатов [7, 8, 10], многие вопросы, касающиеся регуляции роста фолликулов и созревания ооцитов в условиях *in vitro*, до сих пор не решены. Регуляция роста фолликулов и созревания в них ооцитов *in vivo* зависит от гормонов, вы-

деляемых гипофизом и клетками яичника, ростовых факторов, а также других веществ, роль которых до сих пор до конца не установлена. Рост фолликула во многом зависит также от механических свойств окружающей овариальной ткани. Для успешного культивирования фолликулов *in vitro* необходимо воспроизведение всех этих условий.

Большая часть исследователей применяет культивирование единичных фолликулов, выделенных из яичника механическим или ферментативным способом. При механическом способе сохраняется большее число клеток фолликула, в том числе и клеток теки, что способствует лучшему росту фолликула в условиях *in vitro* [12, 13].

Культивирование единичных фолликулов может проводиться в условиях 2D (плоскостных, двухмерных) или 3D (пространственных, трехмерных) систем. Пространственные системы обладают рядом преимуществ по сравнению с плоскостными. Главный минус 2D-систем – низкое соответствие микроокружения культивируемого фрагмента условиям *in vivo*. При двухмерном культивировании клетки фолликула и окружающей его стромы мигрируют по плоскости, фолликулы теряют форму, и ооциты лишаются нормального клеточного окружения. Регуляцию функционирования 2D-систем можно осуществлять лишь за счет изменения концентраций химических соединений (факторов роста, гормонов и т.п.) в культуральной среде, тогда как при использовании 3D-технологий культивирования регуляцию можно осуществлять также с помощью подбора физических параметров трехмерного микроокружения эксплантата.

При создании трехмерных систем культивирования в качестве субстратов используют агарозу, коллаген, матригель или производные альгинатов [14]. Альгинатные гидрогели, получающиеся в результате растворения солей альгиновой кислоты (альгинатов), имеют преимущества перед другими веществами: для их полимеризации необходимо лишь добавить раствор, содержащий связывающий агент – ионы Ca^{2+} или Mg^{2+} . При этом не требуется воздействие высоких температур или ультрафиолетового излучения, губительных для живых клеток. Кроме того, альгинаты имеют растительное происхождение (их получают из бурых водорослей), что делает возможным их использование в проектах, в которых требуется использовать системы, содержащие компоненты только неживотного происхождения («animal free»). На рис. 1 показана схема образования альгинатного гидрогеля за счет полимеризации альгината натрия с помощью ионов кальция. Изменяя концентрацию солей кальция и магния, используемых при полимеризации, концентрацию альгинатов в растворе, а так-

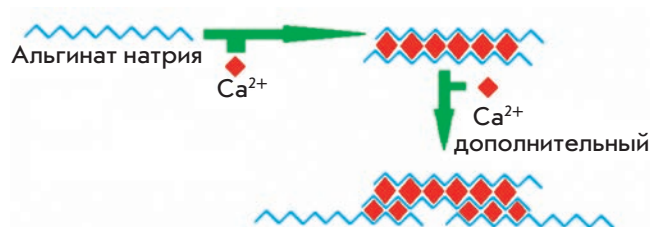


Рис. 1. Схема образования альгинатного гидрогеля

же время полимеризации можно добиться получения гидрогелей различной структуры и плотности, т.е. обладающих разными механическими свойствами.

Механическое окружение фолликула

Важное значение для нормального роста фолликула и созревания ооцита имеют механические напряжения, возникающие в клетках фолликула. В публикациях нескольких независимых групп исследователей, посвященных изучению экспрессии генов в фолликулах яичников мыши, было показано, что выращивание фолликулов в менее концентрированных, а следовательно, более мягких альгинатных субстратах в большей степени соответствует условиям роста и созревания фолликулов *in vivo*, нежели культивирование в более жестких альгинатных субстратах [9, 15, 16].

В ходе культивирования фолликулов с использованием 0.25% альгинатных гидрогелей (0.25 г альгината натрия растворены в 100 мл раствора) в ооцитах происходило увеличение числа транскриптов таких генов, как *Gdf9*, *Bmp15*, *Tcl1* и *Zp3*, высокий уровень экспрессии которых характерен для нормального оогенеза *in vivo*, в сравнении с 1.5% альгинатным гидрогелем (1.5 г альгината натрия растворены в 100 мл раствора). Кроме того, показано, что культивирование фолликулов в более мягких альгинатных гидрогелях (0.25%) приводит к более интенсивному увеличению размеров ооцита и фолликула в целом в сравнении с культивированием в более жестком альгинатном гидрогеле (1.5%) [9].

Группой исследователей из США показано, что при культивировании фолликулов в жестких альгинатных гидрогелях (1.5%), снижающих темпы роста и развития фолликулов, в сравнении с более мягкими альгинатными гидрогелями (0.5%) наблюдается избыточное увеличение экспрессии таких генов, как *Star* (регулирующего внутриклеточный транспорт холестерина, необходимого для синтеза половых гормонов), *Cyp11a1* (отвечающего за превращение холестерина в прегненолон), *Hsd3b1* (кодирующего гидрокси- δ -5-стероиддегидрогеназу). Кроме того, при культивировании в 0.5% альгинатном гидрогеле (в

сравнении с 1.5% гидрогелем) усиливалась экспрессия *Lhcgr*, гена рецептора лютеинизирующего гормона и хорионического гонадотропина. Также между нулевым и восьмым днем культивирования фолликула в клетках гранулезы возрастает уровень экспрессии гена *Cyp19a1*, отвечающего за превращение андростендиона в эстрадиол. Этот процесс идет более эффективно в 0.5% альгинатном гидрогеле – уровень экспрессии *Cyp19a1* повышается в 34 раза, а в 1.5% гидрогеле – только в 15 раз. В результате этого в фолликулах, культивированных с использованием более жестких субстратов, наблюдали существенно меньшую выработку эстрадиола [15].

Также особый интерес представляет сравнение уровней экспрессии генов при развитии овариальных фолликулов *in vivo*, а также при их культивировании *in vitro* в альгинатном гидрогеле [16]. В этой работе у 12-дневных неполовозрелых мышей из яичников выделяли фолликулы, содержащие два слоя клеток гранулезы (двухслойные фолликулы), после чего их инкапсулировали в 0.25% альгинатный гидрогель и культивировали в течение 4 дней. Сравнивали уровни экспрессии генов в клетках фолликулов после культивирования в альгинатном гидрогеле и в клетках многослойных фолликулов, выделенных из яичников 16-дневных мышей. Выделенные фолликулы имели диаметр от 150 до 180 мкм, что соответствовало размеру фолликулов, полученных после культивирования *in vitro*. Установлено, что овариальные фолликулы, культивируемые в 0.25% альгинатном гидрогеле, и фолликулы, растущие в условиях *in vivo*, имеют сходные паттерны экспрессии, в том числе таких генов, как *Fshr* (кодирующего рецептор к ФСГ), *Inha* (отвечающего за образование α -субъединицы ингибина), *Igf1* (инсулиноподобного фактора роста первого типа, влияющего на рост фолликула), *Zp2* (кодирующего один из гликопротеинов, входящих в состав *zona pellucida*), *Lhcgr*.

Хотя при использовании мягких альгинатных гидрогелей удастся добиться лучших результатов, чем при культивировании фолликулов в более жестком механическом окружении, культивирование в гидрогелях с низкой концентрацией альгината имеет ряд технологических сложностей. При применении менее концентрированных растворов деструкция капель гидрогеля наступает быстрее, так как между молекулами альгината образуется меньшее количество поперечных сшивок, а, следовательно, структура получается менее прочной. Слабо концентрированные растворы альгинатов перспективны в случае технологий культивирования, способных обеспечить инкапсуляцию фолликулов в гидрогель и смену среды культивирования таким образом, чтобы при этом не происходило повреждения гидрогеля.

Воссоздание кортикально-медуллярной структуры яичника *in vitro*

В условиях *in vivo* фолликул в процессе роста переходит из более плотной (кортикальной) зоны яичника в менее ригидную (медуллярную) [17]. Таким образом, в естественных условиях происходит постепенное уменьшение механических напряжений в клетках фолликула. На сегодняшний день разработаны две различные методики, связанные с использованием альгинатов и позволяющие воссоздать кортикально-медуллярную структуру для единичного фолликула: культивирование в фибриново-альгинатном или в альгинат-коллагеновом гидрогеле.

Для воссоздания условий изменяющихся механических напряжений были разработаны методики культивирования фолликулов в фибриново-альгинатном гидрогеле [17–20], который образуется в результате одновременной полимеризации альгината и фибрина: альгината с помощью ионов кальция (Ca^{2+}), а фибрина с помощью тромбина и фактора свертываемости крови XIII. Фолликул в процессе роста выделяет в окружающую среду литические ферменты – протеазы, которые разрушают полимеризованный фибрин. В результате механические напряжения, существующие вокруг фолликула, культивируемого в фибриново-альгинатном гидрогеле, снижаются, что позволяет фолликулу сильнее увеличиться в размерах [18]. При использовании фибриново-альгинатного гидрогеля, основанного на 0.25% альгинате, выработка эстрадиола и прогестерона фолликулами значительно усиливается, а размер ооцитов увеличивается гораздо значительно, чем при использовании стандартного 0.25% альгинатного гидрогеля без добавления фибрина [20].

Другой способ создания динамического окружения фолликула, обладающего различными уровнями жесткости, – альгинат-коллагеновая система. При таком типе культивирования в центре капли, в которую инкапсулирован фолликул, находится коллаген, а по периферии – альгинатный гидрогель. Коллаген значительно более мягкий субстрат, чем альгинатный гидрогель, поэтому получается гетерогенная по уровню жесткости система, имитирующая микроокружение фолликула в яичнике в условиях *in vivo* – кортикальная часть более жесткая, а медуллярная более мягкая [21]. На *рис. 2* показана схема строения альгинат-коллагеновой капли с инкапсулированным фолликулом.

Одной из последних разработок является методика инкапсуляции фолликулов в двухслойную систему, состоящую из альгината и коллагена, с помощью технологии микрофлюидики. Эта технология позволяет получать капли, состоящие из различных веществ, взятых в необходимых пропорциях, за счет



Рис. 2. Схема строения альгинат-коллагеновой системы культивирования: фолликул находится в зоне перехода из более плотной области (кортикальной) в менее плотную (медуллярную). В процессе развития он разрастается в медуллярную область

направленных микротоков разных жидкостей, которые создаются по заданной схеме в заранее изготовленном чипе [22]. С помощью данной технологии можно получать капли необходимого размера, в том числе соответствующие объему единичного фолликула, что позволяет упростить этапы дальнейшего культивирования [21].

В табл. 1 представлены основные типы систем культивирования фолликулов, а также показатели, характеризующие эффективность систем данного рода, такие, как выживаемость и процент развития ооцитов до стадии метафазы II мейоза (MII). Наилучшие результаты получены при использовании фолликулов с начальным диаметром более 130 мкм; фолликулы размером менее 100 мкм в диаметре в таких исследованиях не используются, хотя в яичнике фолликулов такого размера достаточно много. По-видимому, для успешного роста фолликулов и созревания ооцита в альгинатных гидрогелях необходим некоторый минимальный объем клеточного микроокружения.

Состав сред для культивирования фолликулов

При культивировании фолликулов, инкапсулированных в альгинатный гидрогель, обычно используется двухступенчатая система культивирования. На первом этапе культивирование проводят в среде, способствующей росту фолликула – IVC (*In vitro culture medium*), а на втором этапе фолликулы помещают в среду для созревания ооцитов – IVM (*In vitro maturation medium*). В табл. 2 показаны основные типы сред для культивирования фолликулов, инкапсулированных в альгинатные гидрогели, и их производные.

Как правило, для роста и созревания фолликулов используется полная среда α -MEM с различными добавками. Для роста фолликулов в среду добавляют инсулин, селенит, трансферрин (ИТС), бычий сывороточный альбумин (БСА) или эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС), фолликулостимулирующий

гормон (ФСГ). Иногда в культуральную среду вносят вещества, обладающие антиоксидантными свойствами (аскорбиновая кислота) или усиливающие липидный обмен (*L*-карнитин).

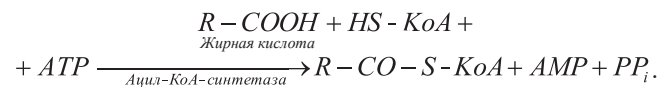
В среду для созревания ооцитов обязательно вносят хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) для стимуляции овуляции. Также в эту среду в большинстве работ добавляют факторы роста, в том числе эпидермальный фактор роста (ЭФР), который способствует нормальному протеканию мейоза [30].

На сегодняшний день не разработано единой методики культивирования, хотя большинство авторов придерживаются двухступенчатой системы культивирования, позволяющей сначала стимулировать рост фолликулов, а затем активировать созревание в них ооцитов. Изучение целесообразности внесения в двухступенчатые культуральные среды различных добавок, способных индуцировать рост и развитие фолликулов и ооцитов, является первоочередной задачей дальнейших исследований, связанных с получением ооцитов, способных к оплодотворению, в условиях *in vitro*.

Регуляция липидного обмена при фолликулогенезе

Как правило, при культивировании фолликулов в условиях *in vitro* значительное внимание уделяется метаболизму углеводов. В большинстве случаев в среду вносят сами углеводы в качестве энергетического субстрата: базовым компонентом большинства сред для культивирования фолликулов является α -MEM, в состав которого входит пируват натрия. Для полноценного развития ооцита и эмбриона важен не только углеводный трофический путь, но и путь β -окисления липидов. Однако внимание обмену липидов при культивировании фолликулов и эмбрионов уделяется лишь в единичных работах [7, 31]. Для метаболизма липидов по пути β -окисления необходим карнитин, который помогает липидам проникать в митохондрию, принимая участие в формировании так называемого карнитинового тоннеля [32].

Образование АТФ при разложении липидов происходит в митохондриях в результате β -окисления жирных кислот. На первом этапе липидного обмена на наружной поверхности мембраны митохондрий активируются жирные кислоты. В активации участвуют АТФ, коэнзим А (HS-КоА) и ионы Mg^{2+} . Реакция катализируется ферментом ацил-КоА-синтетазой:



В результате реакции образуется ацил-КоА, который является активной формой жирной кислоты. На втором этапе липидного обмена активированная

Таблица 1. Развитие методик культивирования фолликулов яичников мыши в альгинатных гидрогелях различного состава (по [23] с дополнениями)

Состав гидрогеля	Продолжительность культивирования, дни	Начальный размер фолликула, мкм	Выживаемость, %	Наступление МП, %	Дополнительные наблюдения в рамках исследования	Источник
2% альгинат (кортекс), 0.5% альгинат (ядро) vs 2% альгинат (кортекс), 0.5% коллаген типа I (ядро)	Более 9	100–130	Нет данных	Нет данных	Развитие до стадии антрального фолликула происходит чаще при использовании коллагена	[21]
Альгинат, 0.25% vs 1.5%	8	130–150	Нет данных	86 vs 63.8	Уровни экспрессии основных генов фолликулогенеза выше при более мягких субстратах	[9]
0.25% альгинат с фибрином	8	130–150	Нет данных	Нет данных	Фолликул, разрушая фибрин протеазами, уменьшает механические напряжения	[18]
0.25% альгинат с фибрином	12	Нет данных	75	88	Образование двухклеточных эмбрионов после оплодотворения ооцитов, полученных из фолликулов <i>in vitro</i>	[20]
0.25% альгинат	12	100–130	78	59	Исследование щелевидных контактов в фолликулярных клетках	[24]
Альгинат, 1.5% vs 0.5%	2–8	150–180	82.7 vs 84.3	Нет данных	Мягкий субстрат (0.5%) способствует росту фолликула в сравнении с более жестким (1.5%)	[15]
0.25% альгинат с фибрином	12	100–130	77–81	75–82	Нет данных	[19]
Альгинат, 0.7, 1.5, 3%	8–12	100–130 150–180	31–66 46–91	Нет данных	Исследования секреции эстрогенов фолликулами	[25]
Различные системы культивирования (как индивидуальный альгинатный гидрогель, так и его комплексы с различными пептидами): 1.5% раствор альгината 1.5% раствор альгината с коллагеном I типа 1.5% раствор альгината с фибронектином 1.5% раствор альгината с трипептидами (аргинин, глицин, аспарагиновая кислота) 1.5% раствор альгината с коллагеном типа IV 1.5% раствор альгината с ламинином	8	100–130 vs 150–180	64 vs 69 65 vs 67 70 vs 72 72 vs 62 72 vs 48 63 vs 61	40 44 71 65 50 71	Культивирование в комплексах альгината с коллагеном I типа и с трипептидами приводило к росту фолликулов, использование гидрогелей, содержащих фибронектин, трипептиды или ламинин, стимулировало образование ооцитов на стадии МП	[26]
Альгинат, 1.5%	8	150–180	93	71	Рождение живых мышат после оплодотворения ооцитов, полученных из фолликулов <i>in vitro</i>	[27]
Альгинат, 0.25, 0.5, 1, 1.5%	12	100–130	74–85	56–67	Изучение эффектов жесткости субстратов: более мягкие субстраты способствуют развитию ооцитов	[28]

Таблица 2. Сравнение сред, используемых при культивировании фолликулов мыши в альгинатном гидрогеле

Состав среды для роста фолликулов	Состав среды для созревания ооцитов	Наступление МП, %	Источник
α-МЕМ, 3 мг/мл БСА, 1 мг/мл бычий фетуин, 10 мМЕ/мл ФСГ, 5 мкг/мл инсулин, 5 мкг/мл трансферрин и 5 нг/мл селенит	Не использовалась	Нет данных	[11]
α-МЕМ, 3 мг/мл БСА, 1 мг/мл бычий фетуин, 5 мкг/мл инсулин, 5 мкг/мл трансферрин, 5 нг/мл селенит (ИТС), 0.01 МЕ/мл рекомбинантный человеческий ФСГ, 50 мкг/мл натриевой соли аскорбиновой кислоты	Не использовалась	Нет данных	[29]
α-МЕМ, глутамакс (3 мМ), пенициллин и стрептомицин (100 МЕ/мл), 5 мг/мл человеческий сывороточный альбумин, инсулин (5 мкг/мл), трансферрин (5 мкг/мл), селенит (5 нг/мл), аскорбиновая кислота (50 мкг/мл), ФСГ (0.01 МЕ/мл)	Не использовалась	Нет данных	[10]
α-МЕМ, 5% ЭТС, 0.01 МЕ/мл ЛГ, 0.1 МЕ/мл ФСГ, 1 мМ L-карнитин	α-МЕМ, 10% ЭТС, 1.5 МЕ/мл ХГЧ	51	[7]
α-МЕМ, 1% ЭТС	α-МЕМ, 10% ЭТС, 1.5 МЕ/мл ХГЧ, 5 нг/мл ЭФР	88	[20]
α-МЕМ, 0.01 МЕ/мл рекомбинантный ФСГ, 3 мг/мл БСА, 1 мг/мл бычий фетуин, 5 мкг/мл инсулин, 5 мкг/мл трансферрин, 5 нг/мл селенит	α-МЕМ, 10% ЭТС, 1.5 МЕ/мл ХГЧ, 5 нг/мл ЭФР	59	[24]
α-МЕМ, 0.01 МЕ/мл рекомбинантный ФСГ, 3 мг/мл БСА, 1 мг/мл бычий фетуин, 5 мкг/мл инсулин, 5 мкг/мл трансферрин, 5 нг/мл селенит	α-МЕМ, 10% ЭТС, 1.5 МЕ/мл ХГЧ, 5 нг/мл ЭФР	75–82	[19]
α-МЕМ, 0.01 МЕ/мл рекомбинантный ФСГ, 3 мг/мл БСА, 1 мг/мл бычий фетуин, 5 мкг/мл инсулин, 5 мкг/мл трансферрин, 5 нг/мл селенит	α-МЕМ, 0.25 пг/мл ЭФР, 0.045 МЕ/мл ХГЧ	Нет данных	[25]
α-МЕМ, 0.01 МЕ/мл рекомбинантный ФСГ, 3 мг/мл БСА, 5 мкг/мл инсулин, 5 мкг/мл трансферрин, 5 нг/мл селенит	α-МЕМ, 1.5 МЕ/мл ХГЧ, 5 нг/мл ЭФР	40–71	[26]

жирная кислота должна проникнуть в митохондрию. Ключевой и одновременно лимитирующий фактор этого процесса – карнитин-пальмитоилтрансфераза I (CPT1B), для функционирования которой необходим карнитин [31]. Третий этап липидного обмена протекает в матриксе митохондрий, где в цикле трикарбоновых кислот и цепи переноса электронов синтезируются молекулы АТФ [31].

Показано, что ингибирование карнитин-пальмитоилтрансферазы I препятствует нормальному протеканию мейоза [31, 33], из чего можно сделать вывод, что использование L-карнитина необходимо для нормального развития и созревания ооцитов *in vitro*.

Эксперименты, проведенные на фолликулах мыши, культивированных в альгинатном субстрате [7], свидетельствуют о том, что добавление L-карнитина в среду для созревания ооцитов приводит к увеличению числа нормально развивающихся эмбрионов, полученных в результате оплодотворения ооцитов, выращенных в условиях *in vitro* с использованием L-карнитина.

Активация всех систем энергетического обмена (не только системы углеводного, но и липидного) важна для стимуляции созревания ооцитов. Поэтому следу-

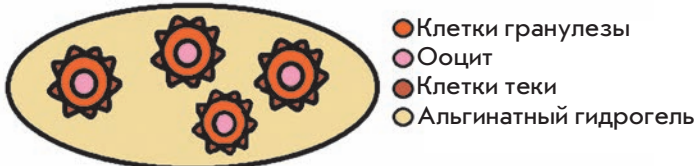


ет ожидать появления работ, связанных с использованием L-карнитина и других кофакторов, позволяющих стимулировать липидный обмен, и разработки методик эффективного культивирования фолликулов с получением зрелых ооцитов.

Влияние окислительного стресса на рост и созревание фолликулов

Культивирование фолликулов яичников млекопитающих осуществляют, как правило, в условиях классического углекислотного инкубатора с соотношением газов: 5 об.% CO₂/воздух. Таким образом, атмосфера, в которой проводится культивирование, имеет следующее соотношение газов (об.%): 5 CO₂, 20 O₂ и 75 N₂ [34]. При таком соотношении газов в культуральной атмосфере парциальное давление кислорода в культивируемых тканях составляет около 140 мм рт. ст. [6]. В то время как парциальное давление кислорода в перитонеальной полости равно примерно 40 мм рт. ст. [35], что соответствует 5 об.% O₂ в атмосфере инкубатора для культивирования.

Повышению жизнеспособности фолликулов, культивируемых в условиях пониженной концентрации кислорода, очевидно, способствует низкий уровень

Таблица 3. Основные системы сокультивирования фолликулов

Тип сокультивирования	Схема опыта	Источник
1. Неконтактное сокультивирование большого числа фолликулов	 <ul style="list-style-type: none"> ● Клетки гранулезы ● Ооцит ● Клетки теки ● Альгинатный гидрогель 	[8]
2. Фолликулы в среде, кондиционируемой эмбриональными фибробластами	 <ul style="list-style-type: none"> ● Клетки гранулезы ● Ооцит ● Клетки теки ● Альгинатный гидрогель ● Эмбриональные фибробласты ● Кондиционируемая среда 	[43]
3. Фолликулы в предварительно кондиционированной среде	 <ul style="list-style-type: none"> ● Клетки гранулезы ● Ооцит ● Клетки теки ● Кондиционированная среда 	[13]

образующихся активных форм кислорода (АФК), в то время как при культивировании фолликулов яичников млекопитающих в условиях повышенного парциального давления кислорода происходит активное образование АФК, вызывая в клетках окислительный стресс, что негативно сказывается на росте и развитии фолликулов [36].

В ряде работ [10, 37] показано, что культивирование при пониженных концентрациях кислорода (5 об.% по сравнению с 20 об.% O₂) в атмосфере инкубатора приводит к повышению жизнеспособности и улучшению роста фолликулов яичников мыши.

Особое внимание необходимо уделять концентрации O₂ в атмосфере инкубатора на ранних стадиях культивирования фолликулов (примордиальных, первичных, а также ранних вторичных). В условиях *in vivo* эти фолликулы располагаются в корковом слое яичника, степень васкуляризации которого значительно меньше, чем в мозговом слое, вследствие чего ранние фолликулы фактически находятся в условиях особо острой гипоксии. Поэтому для их развития *in vitro* необходимо воссоздавать подобные условия. Так, при культивировании ранних вторичных фолликулов мыши (диаметр 100–120 мкм) их рост, выживаемость, а также выработка фактора роста эндотелия сосудов А (vascular endothelial growth factor

А – VEGFA), лактата, ингибина В, антимюллерова гормона достоверно повышаются при культивировании в условиях 2.5 об.% атмосферы O₂ по сравнению с культивированием в атмосфере 20 об.% O₂ [11].

С другой стороны, показано, что при повышенных концентрациях кислорода образуются ооциты более высокого качества как при культивировании фолликулов [38], так и при созревании ооцит-кумулясных комплексов *in vitro* [39]. Известно, что под воздействием низких концентраций кислорода в ооците может нарушаться активность моторных белков, в том числе динеина и динактина, регуляторных факторов, отвечающих за формирование веретена деления, а также белков, контролирующих клеточный цикл [38]. Кроме того, при пониженной концентрации кислорода в культуральной среде в клетках нарушается функционирование митохондрий, что, в свою очередь, ведет к снижению выработки АТФ. Возможно, именно этот процесс влечет за собой нарушения функционирования всех перечисленных групп белков. Культивирование и созревание фолликулов при низких концентрациях кислорода может привести также к десинхронизации процессов ядерного и цитоплазматического созревания ооцитов [38].

Неоднозначность данных об оптимальной концентрации кислорода в культуральной атмосфере де-

лает исследования более актуальными, поскольку подбор правильных условий определяет качество эмбрионов, развивающихся из ооцитов. Вероятно, стоит ожидать разработки многоступенчатых систем культивирования, сочетающих использование разных концентраций кислорода на различных этапах культивирования. Перспективной представляется трехступенчатая система культивирования. На первом этапе (при культивировании ранних фолликулов) необходимо использовать сверхнизкие концентрации кислорода. На втором этапе (при культивировании более поздних фолликулов, антральных) нужно повышать концентрацию кислорода в атмосфере инкубатора. На третьем этапе (при созревании ооцит-кмулюсных комплексов, выделенных из культуры) требуется, вероятно, дополнительное повышение концентрации кислорода в атмосфере инкубатора. Впрочем, число этапов культивирования и процентное содержание кислорода в культуральной среде на каждом этапе еще не установлены. Возможно, что более высоких результатов удастся добиться не при ступенчатом изменении концентрации кислорода в культуральной атмосфере, а при ее плавном и постепенном увеличении в ходе всего культивирования.

Снижение уровня свободных радикалов в культивируемых фолликулах можно обеспечить и иным способом – путем внесения в культуральную среду антиоксидантов. Для снижения уровня образования активных форм кислорода при культивировании фолликулов в среду можно добавлять различные антиоксиданты, такие, как кверцетин [40], аскорбиновая кислота [29, 41], 7,8-дигидроксифлавонол [42], глутатион [29]. В то же время показано, что положительное влияние на рост фолликулов натриевой соли аскорбиновой кислоты обусловлено не ее антиоксидантными свойствами, а способностью к стимуляции образования контактов клеток фолликула с внеклеточным матриксом. А добавление глутатиона при культивировании фолликулов мыши, инкапсулированных в альгинатный гидрогель, не приводило к увеличению их выживаемости и роста в сравнении с фолликулами, которые культивировали в среде с добавлением натриевой соли аскорбиновой кислоты. Антиоксидантная активность как аскорбиновой кислоты, так и глутатиона, по всей видимости, не оказывала значительного воздействия на фолликулогенез *in vitro* [29].

Использование методик сокультивирования

Естественные условия роста и созревания фолликулов в условиях *in vitro* воссоздают, внося в культуральную среду гормональные препараты (ФСГ, ХГЧ, ЛГ) [7, 16, 17], факторы роста [20, 25] и другие

компоненты [7, 10, 29]. Тем не менее воссоздать в лаборатории условия, в которых находятся фолликулы *in vivo*, пока не представляется возможным. Помимо гормонов клетки, гранулезы и теки фолликула вырабатывают большое количество факторов роста, создавая локально обогащенную ими специфическую зону, которая наилучшим образом способствует росту и развитию фолликулов, а также созреванию в них ооцитов.

Некоторые исследователи, создавая обогащенную многочисленными ростовыми факторами и гормонами среду для культивирования фолликулов, применяют принципиально другой подход – сокультивирование группы фолликулов. Предполагается, что при совместном культивировании нескольких фолликулов овариальные компоненты будут стимулировать рост и развитие друг друга путем обогащения среды секретлируемыми паракринными факторами в концентрациях, необходимых для нормального роста фолликулов. В настоящее время разрабатываются три основных типа сокультивирования: неконтактное сокультивирование большого числа фолликулов в составе одной капли альгинатного гидрогеля [8], сокультивирование фолликулов с эмбриональными фибробластами [29, 43], культивирование фолликулов в кондиционированной среде [13, 43]. В табл. 3 представлены схемы наиболее распространенных систем сокультивирования фолликулов.

При неконтактном сокультивировании несколько фолликулов помещают в одну каплю альгинатного гидрогеля, однако при этом фолликулы непосредственно не контактируют друг с другом и между ними остается место для роста. Коммуникации между фолликулами в таком случае осуществляются путем выделения в окружающее фолликулы пространство паракринных факторов. Наилучшие результаты достигнуты при сокультивировании 10 фолликулов в группе [8].

Сокультивирование фолликулов с эмбриональными фибробластами проводят по следующей схеме: фолликулы, инкапсулированные в альгинатный гидрогель, помещают на монослой инактивированных мышечных эмбриональных фибробластов, кондиционирующих среду для культивирования различными паракринными факторами. В таких условиях возможно более успешное выращивание фолликулов меньшего диаметра (начиная с 80–90 мкм), чем в системах без фидерного слоя, которые поддерживают рост фолликулов диаметром свыше 100 мкм.

При культивировании фолликулов в кондиционированной среде предварительно выращивают различные клеточные культуры (эмбриональные фибробласты мыши, овариальные клеточные компоненты), а затем собирают среду, в которой эти клетки куль-

тивировали, и помещают в нее инкапсулированные в альгинатный гидрогель фолликулы. Такая среда содержит различные паракринные факторы, в том числе необходимые факторы роста, которые диффундируют в толщу гидрогеля, создавая условия для роста фолликула.

Каждый из трех основных методов имеет свои преимущества и недостатки. При неконтактном сокультивировании большого числа фолликулов очень сложно проследить за процессом роста и созревания каждого фолликула в отдельности. При гибели даже одного фолликула в группе будет наблюдаться также снижение темпов роста оставшихся фолликулов. В то же время метод неконтактного сокультивирования фолликулов технологически прост и позволяет получать достаточно высокие результаты при культивировании. Использование фидерного слоя инактивированных эмбриональных фибробластов для сокультивирования с фолликулами сопряжено с рядом трудностей. В частности, при использовании данной методики необходимо поддерживать оптимальный баланс в составе сред культивирования, так как для нормального роста и развития фолликулов и эмбриональных фибробластов необходимо присутствие различных веществ в среде. Кроме того, возможность применения этого метода в медицинской практике также остается под вопросом, поскольку подобная система подразумевает использование при сокультивировании фетальных клеток. Культивирование фолликулов в предварительно кондиционированной среде также является технологически сложным процессом. Данная система сокультивирования подразумевает прохождение нескольких этапов, на каждом из которых необходимо избежать контаминации культуральной среды. Кроме того, процесс кондиционирования среды

пролиферирующей клеточной популяцией сложно стандартизировать – в каждой партии кондиционированной среды может быть разная концентрация активных веществ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Технологии культивирования компонентов овариальной ткани млекопитающих с течением времени становятся все более и более сложными, все в большей степени соответствуя условиям *in vivo*. Учитывая значительное число различных аспектов, исследователям удается добиваться более высоких результатов культивирования: полученные ооциты созревают в большем числе случаев, чаще наблюдается рост фолликулов до более поздних стадий. В будущем, нас, вероятно, ожидает обнаружение новых компонентов, которые необходимо добавлять в культуральные среды для лучшего роста и созревания фолликулов, а также проведение работ, связанных с воссозданием архитектуры яичника в условиях *in vitro*, позволяющих культивировать фолликулы в оптимальных условиях. Учитывая многочисленные факторы (механические напряжения, обмен веществ в фолликуле, концентрация газов в культуральной атмосфере, гормональный фон, влияние паракринных факторов и т.д.), можно разработать высокоэффективную систему культивирования фолликулов. Поэтому, вероятно, в ближайшем будущем стоит ожидать появления работ, в которых сочетается использование всех необходимых для нормального роста и развития фолликула факторов, что позволит стабильно получать компетентные к оплодотворению и дальнейшему развитию ооциты. ●

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 14-50-00029).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Di Leva G., Piovan C., Gasparini P., Ngankeu A., Taccioli C., Briskin D., Cheung D.G., Bolon B., Anderlucci L., Alder H., et al. // *PLoS Genet.* 2013. V. 9. № 3. e1003311.
- Verga Falzacappa C., Timperi E., Bucci B., Amendola D., Piergrossi P., D'Amico D., Santaguida M.G., Centanni M., Misiti S. // *J. Endocrinol.* 2012. V. 215. № 2. P. 281–289.
- Oktom O., Oktay K. // *Cancer Res.* 2007. V. 67. № 21. P. 10159–10162.
- Meirow D., Baum M., Yaron R., Levron J., Hardan I., Schiff E., Nagler A., Yehuda D.B., Raanani H., Hourvitz A., Dor J. // *Leuk. Lymphoma.* 2007. V. 48. № 8. P. 1569–1576.
- Songsasen N., Woodruff T.K., Wildt D.E. // *Reproduction.* 2011. V. 142. № 1. P. 113–122.
- Xu J., Lawson M.S., Yeoman R.R., Pau K.Y., Barrett S.L., Zelinski M.B., Stouffer R.L. // *Hum. Reprod.* 2011. V. 26. № 5. P. 1061–1072.
- Dunning K.R., Akison L.K., Russell D.L., Norman R.J., Robker R.L. // *Biol. Reprod.* 2011. V. 85. № 3. P. 548–555.
- Hornick J.E., Duncan F.E., Shea L.D., Woodruff T.K. // *Reproduction.* 2013. V. 145. № 1. P. 19–32.
- Jiao Z.X., Woodruff T.K. // *Fertil. Steril.* 2013. V. 99. № 5. P. 1453–1459.
- Gook D.A., Edgar D.H., Lewis K., Sheedy J.R., Gardner D.K. // *Mol. Hum. Reprod.* 2014. V. 20. № 1. P. 31–41.
- Makanji Y., Tagler D., Pahnke J., Shea L.D., Woodruff T.K. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2014. V. 15. № 306(8). e893–903.
- Figueiredo J.R., Hulshof S.C., Van den Hurk R., Ectors F.J., Fontes R.S., Nusgens B., Bevers M.M., Beckers J.F. // *Theriogenology.* 1993. V. 40. № 4. P. 789–799.
- Choi J.K., Agarwal P., He X. // *Tissue Eng. Part. A.* 2013. V. 19. № 23–24. P. 2626–2637.
- West E.R., Shea L.D., Woodruff T.K. // *Semin. Reprod. Med.* 2007. V. 25. № 4. P. 287–299.
- West-Farrell E.R., Xu M., Gomberg M.A., Chow Y.H., Woodruff T.K., Shea L.D. // *Biol. Reprod.* 2009. V. 80. № 3. P. 432–439.

16. Parrish E.M., Siletz A., Xu M., Woodruff T.K., Shea L.D. // *Reproduction*. 2011. V. 142. № 2. P. 309–318.
17. Xu J., Lawson M.S., Yeoman R.R., Molskness T.A., Ting A.Y., Stouffer R.L., Zelinski M.B. // *Hum. Reprod.* 2013. V. 28. № 8. P. 2187–2200.
18. Shikanov A., Xu M., Woodruff T.K., Shea L.D. // *J. Vis. Exp.* 2011. V. 15. № 49. P. 2695.
19. Shikanov A., Xu M., Woodruff T.K., Shea L.D. // *Biomaterials*. 2009. V. 30. № 29. P. 5476–5485.
20. Jin S.Y., Lei L., Shikanov A., Shea L.D., Woodruff T.K. // *Fertil. Steril.* 2010. V. 93. № 8. P. 2633–2639.
21. Choi J.K., Agarwal P., Huang H., Zhao S., He X. // *Biomaterials*. 2014. V. 35. № 19. P. 5122–5128.
22. Streets A.M., Huang Y. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014. № 25. P. 69–77.
23. Desai N., Alex A., AbdelHafez F., Calabro A., Goldfarb J., Fleischman A., Falcone T. // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2010. V. 14. № 8. P. 119.
24. Xu M., Banc A., Woodruff T.K., Shea L.D. // *Biotechnol. Bioeng.* 2009. V. 103. № 2. P. 378–386.
25. West E.R., Xu M., Woodruff T.K., Shea L.D. // *Biomaterials*. 2007. V. 28. № 30. P. 4439–4448.
26. Kreeger P.K., Deck J.W., Woodruff T.K., Shea L.D. // *Biomaterials*. 2006. V. 27. № 5. P. 714–723.
27. Xu M., Kreeger P.K., Shea L.D., Woodruff T.K. // *Tissue Eng.* 2006. V. 12. № 10. P. 2739–2746.
28. Xu M., West E., Shea L.D., Woodruff T.K. // *Biol. Reprod.* 2006. V. 75. № 6. P. 916–923.
29. Tagler D., Makanji Y., Tu T., Bernabé B.P., Lee R., Zhu J., Kniazeva E., Hornick J.E., Woodruff T.K., Shea L.D. // *Biotechnol. Bioeng.* 2014. V. 111. № 7. P. 1417–1429.
30. Conti M., Hsieh M., Park J.Y., Su Y.Q. // *Mol. Endocrinol.* 2006. V. 20. № 4. P. 715–723.
31. Dunning K.R., Cashman K., Russell D.L., Thompson J.G., Norman R.J., Robker R.L. // *Biol. Reprod.* 2010. V. 83. № 6. P. 909–918.
32. Montjean D., Entezami F., Lichtblau I., Belloc S., Gurgan T., Menezo Y. // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2012. V. 29. № 11. P. 1221–1225.
33. Downs S.M., Mosey J.L., Klinger J. // *Mol. Reprod. Dev.* 2009. V. 76. № 9. P. 844–853.
34. Xu J., Bernuci M.P., Lawson M.S., Yeoman R.R., Fisher T.E., Zelinski M.B., Stouffer R.L. // *Reproduction*. 2010. V. 140. P. 685–697.
35. Tsai A.G., Friesenecker B., Mazzoni M.C., Kerger H., Buerk D.G., Johnson P.C., Intaglietta M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. P. 6590–6595.
36. Silva A.E., Rodriguez P., Cavalcante L.F., Rodrigues B.A., Rodrigues J.L. // *Reprod. Domest. Anim.* 2009. V. 44. Suppl 2. P. 259–262.
37. Adam A.A., Takahashi Y., Katagiri S., Nagano M. // *Jpn. J. Vet. Res.* 2004. V. 52. № 2. P. 77–84.
38. Hu Y., Betzendahl I., Cortvrindt R., Smitz J., Eichenlaub-Ritter U. // *Hum. Reprod.* 2001. V. 16. № 4. P. 737–748.
39. Banwell K.M., Lane M., Russell D.L., Kind K.L., Thompson J.G. // *Hum. Reprod.* 2007. V. 22. № 10. P. 2768–2775.
40. Kang J.T., Kwon D.K., Park S.J., Kim S.J., Moon J.H., Koo O.J., Jang G., Lee B.C. // *J. Vet. Sci.* 2013. V. 14. № 1. P. 15–20.
41. Kere M., Siriboon C., Lo N.W., Nguyen N.T., Ju J.C. // *J. Reprod. Dev.* 2013. V. 59. № 1. P. 78–84.
42. Choi J.Y., Kang J.T., Park S.J., Kim S.J., Moon J.H., Saadeldin I.M., Jang G., Lee B.C. // *J. Reprod. Dev.* 2013. V. 59. № 5. P. 450–456.
43. Tagler D., Tu T., Smith R.M., Anderson N.R., Tinggen C.M., Woodruff T.K., Shea L.D. // *Tissue Eng. Part. A*. 2012. V. 18. № 11–12. P. 1229–1238.