

Экстракорпоральное оплодотворение

In vitro fertilization

SECOND EDITION

KAY ELDER

*Director of Continuing Education
Bourn Hall Clinic*

BRIAN DALE

*Scientific Director
Centre for Reproductive Biology, Naples*



CAMBRIDGE
UNIVERSITY PRESS

КЭЙ ЭЛДЕР,
БРАЙАН ДЭЙЛ

Экстракорпоральное оплодотворение

Перевод с английского



Москва
«МЕДпресс-информ»
2008

УДК 612.613.1
ББК 57.16
Э45

Все права защищены. Никакая часть данной книги не может быть воспроизведена в любой форме и любыми средствами без письменного разрешения владельцев авторских прав.

Авторы и издательство приложили все усилия, чтобы обеспечить точность приведенных в данной книге показаний, побочных реакций, рекомендуемых доз лекарств. Однако эти сведения могут изменяться.

Перевод с английского: Е.Горностаева, С.Дьяконов

Элдер К.

Э45 Экстракорпоральное оплодотворение / Кэй Элдер, Брайан Дэйл ; Пер. с англ. — М. : МЕДпресс-информ, 2008. — 304 с. : ил.
ISBN 5-98322-360-7

Данная книга является практическим руководством по проведению ЭКО. Она описывает наиболее актуальные нововведения в области современных вспомогательных методов оплодотворения, включая применение спермы, полученной из яичек и эпидидимиса, манипуляции с blastocysts, новые перспективы в области технологий криобиологии и криоконсервации, а также содержит дополнительную главу, посвященную предимплантационной генетической диагностике. Вводные главы охватывают вопросы научного обоснования метода ЭКО и включают данные, полученные при последних исследованиях молекулярной биологии оогенеза, оплодотворения ооцитов и раннего эмбрионального метаболизма млекопитающих.

Руководство может быть полезным врачам, применяющим метод ЭКО в своей практике.

УДК 612.613.1
ББК 57.16

ISBN 0-521-77863-8 (англ.)
ISBN 5-98322-360-7 (рус.)

© Kay Elder & Brian Dale 2000
© Издание на русском языке, перевод на русский язык, оформление, оригинал-макет.
Издательство «МЕДпресс-информ», 2008

Посвящается Робби, Бетани, Даниеле, Питеру, Роберте и Ребекке

Содержание

	<i>Предисловие</i>	9
	<i>Благодарности</i>	10
1	Введение	11
	Литература	16
2	Развитие гамет	17
	Рост ооцита	17
	Развитие фолликула	18
	Хранение информации	21
	Региональная организация ооцита: поляризация	24
	Оогенез человека	26
	Остановка и возобновление мейоза	30
	Сперматогенез млекопитающих	35
	Литература	39
3	Взаимодействие сперматозоида с ооцитом	41
	Акросома и вителлиновая оболочка	41
	Слияние сперматозоида и ооцита	43
	Активация сперматозоида	46
	Взаимодействие сперматозоида и ооцита у млекопитающих	49
	Активация ооцита	54
	Корковые реакции	58
	Слияние, центросомы и пронуклеус	63
	Сингамия	68
	Литература	68
4	Первые этапы развития	71
	Активация генома зиготы	73
	Импринтинг	77
	Уплотнение	78
	Причины остановки эмбриогенеза	81

	Требования к метаболизму на ранних стадиях развития эмбриона млекопитающих <i>in vitro</i> · Yves Ménézo	82
	Модели дробления	85
	Сегрегация цитоплазмы и формирование веретен деления	86
	Литература	88
5	Эндокринологический контроль репродуктивных процессов	91
	Литература	95
6	Вспомогательные методы оплодотворения	96
	Искусственная инсеминация	96
	Проведение ЭКО у коров	98
	Выбор пола	103
	Микрохирургия человеческого эмбриона	104
	Литература	109
7	Клинические лаборатории экстракорпорального оплодотворения	111
	Введение	111
	Оснащение лаборатории: оборудование и правила его использования	112
	Среды тканевых культур	118
	Контроль качества процедур	122
	Системы тканевых культур	124
	Базовое оборудование, необходимое для лаборатории ЭКО	126
	Литература	127
8	Анализ спермы и подготовка к вспомогательным репродуктивным технологиям	130
	Исследование спермы	131
	Подготовка спермы для проведения ЭКО и внутриматочной инсеминации	135
	Подготовка спермы к проведению ИКСИ	143
	Ретроградная эякуляция и электроэякуляция: подготовка спермы	145
	Обструктивная и необструктивная азооспермия: эпидидимальная и тестикулярная сперма	145
	Подготовка спермы: оборудование и материалы	147
	Литература	149
9	Забор ооцита и культура эмбрионов	151
	Протоколы контролируемой суперовуляции	151
	Особенности подготовки в каждом конкретном случае	152
	Забор ооцитов и идентификация	156
	Инсеминация	160
	Подведение итогов оплодотворения в первый день после инсеминации	162
	Качество эмбрионов и их отбор для подсадки	166

	Подсадка эмбриона	172
	Подсадка гамет в маточную трубу (GIFT)	178
	Система «транспорта» ЭКО и ИКСИ	179
	Кокультуры	181
	Литература	183
10	Криоконсервация	189
	Преимущества и значение программы криоконсервации эмбрионов	189
	Принципы криобиологии · John Morris	190
	Хранение криоконсервированных образцов	198
	Замораживание и размораживание эмбрионов	199
	Замораживание бластоцист	207
	Клинические аспекты подсадки замороженных эмбрионов	208
	Криоконсервация ооцитов	211
	Криоконсервация ткани яичников	213
	Криоконсервация спермы	214
	Криозащитные среды	216
	Замораживание образцов ткани яичек и эпидидимиса	217
	Криоконсервация спермы онкологических больных	218
	Литература	220
11	Микроманипуляционные технологии	223
	Введение	223
	Интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида	225
	Вспомогательный хэтчинг	239
	Оборудование лаборатории ИКСИ	242
	Установка манипуляторов Narishige для ИКСИ	243
	Подготовка микроинструментов	248
	<i>Приложение. Причины азооспермии</i>	258
	Литература	262
12	Преимплантационная генетическая диагностика · Жоузе Нангер	265
	Генетические аспекты наследственных заболеваний	266
	Скрининг сыворотки крови	273
	Ультразвуковое исследование	274
	Пренатальная диагностика наследственных заболеваний	274
	Преимплантационная генетическая диагностика	278
	Проблемы при ПГД	284
	Мозаицизм и ПГД	286
	Этика и законодательство	287
	Будущее ПГД	287
	Литература	289
	<i>Алфавитный указатель</i>	290

Предисловие

Со времени рождения Луизы Браун (Louise Brown) в 1978 г. на свет во всем мире появилось несколько сотен тысяч детей, рожденных после ЭКО. Применение вспомогательных репродуктивных технологий у человека продолжает развиваться. В начале 1980-х годов отмечены первые роды после применения метода замораживания эмбрионов, в начале 1990-х годов стали возможны выбор пола эмбриона и микроинъекции сперматозоидов при лечении мужского бесплодия. Однако изучение гамет и эмбрионов человека в силу различных политических и этических причин не проводилось. Несмотря на неизбежность тренировок клиницистов на стандартных технологиях культивирования клеток мы также уверены в необходимости наличия у них базовых знаний о биологии высокоспециализированных клеток – гамет. Большая часть имеющейся информации о гаметах и ранних стадиях развития эмбрионов получена из исследований беспозвоночных животных и, в меньшей мере, млекопитающих. Мы представляем общий обзор биологии гамет, сопровождающийся подробным описанием биологии гамет млекопитающих и, по возможности, человека.

Первая часть данной книги описывает развитие и взаимодействие гамет, а также начальные этапы развития эмбриона. Вторая часть посвящена вспомогательным репродуктивным технологиям, применяемым у животных, и новейшим лабораторным технологиям. В последней части книги описывается составление протоколов Клиники Vourn Hall, Кембридж. Протоколы были учреждены в Vourn Hall в 1980 г. профессором Р. Дж. Эдвардсом и Джин Парди, после многих лет исследований в Департаменте физиологии Кембриджского университета и больнице Кершоуз в Олдхеме. Годы спустя эти протоколы были пересмотрены и дополнены многими штатными сотрудниками, имена которых приводятся в списках использованной литературы.

К.Е.
В.Д.

Благодарности

Выражаю особую благодарность Mike Macnamee и Geoff Reeves за поддержку и спонсирование моего обучения, а также моим детям, Robbie и Bethany, за воодушевление и предоставление времени и пространства для проведения моей работы.

Кэй Т. Элдер, B.Sc. (Hons.), M.B., Ch.B., Ph.D.

Я хотел бы посвятить эту книгу Alberto Monroy, открывшему для меня научное видение оплодотворения. Вклад Alberto в науку – его стратегия введения в практику технологий молекулярной биологии и проведения сравнительных исследований – был просто фантастическим. Многие сегодняшние концепции оплодотворения были разработаны в Неаполе. Я надеюсь, нам удастся продолжить эту традицию. Я также выражаю благодарности своей семье и коллегам, прошлым и настоящим, слишком многочисленным, чтобы упомянуть каждого, кто внес вклад в нашу исследовательскую программу в Неаполе.

Брайан Дэйл, Ph.D., D.Sc., F.I.Biol.

Выражаем искренние и теплые благодарности коллегам, которые великодушно предоставили информацию для следующих глав: Yves Ménézo – метаболизм эмбриона, Robert Brittain – ЭКО у коров, John Morris – принципы криобиологии, Terry Leonard – установка микроманипуляторов, Joyce Harper – преимплантационная генетическая диагностика. Мы также благодарим Yves Ménézo, Niel First и Marijo Kent-First за помощь в составлении обзора литературы для второго издания.

Введение

В 1990-е годы, отчасти благодаря успешному использованию культур гамет и эмбрионов в медицинской, ветеринарной и биотехнологической практике, а также в связи с неотложными потребностями современного общества вновь возродился интерес к репродуктивной биологии. В медицине с целью лечения бесплодия начали использоваться методы вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), тогда как в аграрной среде возрастающие потребности мировой популяции обусловили использование новых методов для репродукции скота. Самое раннее упоминание о ВРТ относится к 1783 г., когда Spallazani получил щенков от искусственно оплодотворенной собаки. Этот метод не получил широкого распространения до 1900-х годов, когда российской школой Иванова были разработаны искусственные вагины и технологии инсеминации лошадей, рогатого скота и овец. Значение искусственной инсеминации домашнего скота основано на том, что мужской эякулят содержит много миллионов сперматозоидов, теоретически достаточных для инсеминации сотен женских особей. Основной шаг в этом направлении был сделан в конце 1940-х годов, когда команда, возглавляемая Chis Polge в Кембридже (Англия), разработала технику замораживания и хранения сперматозоидов животных. В этот же период времени были также разработаны методы выделения и манипуляции с женскими гаметами. Оплодотворение *in vitro* ооцитов млекопитающих было впервые описано более 50 лет назад Pincus, впервые наблюдавшим за спонтанным возобновлением мейоза первичного ооцита кролика, вышедшего из фолликула и помещенного в подходящую культурную среду. Ядерное *in vitro*-дозревание ооцитов у коров с бойни было впервые описано в 1968 г. Joe Sreenan, Ирландия. Несмотря на то, что эксперименты на животных, как правило, всегда предшествовали медицинским исследованиям, в случае репродуктивной биологии это происходило не всегда. Многие новые технологии изучались в клинических условиях с использованием гамет человека.

В природе эффективность репродуктивного процесса во многом зависит от синхронизации поведения животных, физиологии их репродуктивных органов и взаимодействия между мужскими и женскими гаметами. Этот фундаментальный принцип синхронизации имеет огромное значение в ВРТ независимо от задействованной техники и методики.

Оплодотворение означает создание нового и уникального индивидуума. Оно символизирует бессмертие генетической информации, переносимой от одного поколения к другому, позволяя действовать законам эволюции. Помимо доставки отцовского генома сперматозоид также запускает метаболическую активность женской гаметы и возобновляет мейоз, что служит началом периода раннего эмбриогенеза. Во многих работах оплодотворение представлено как процесс активации и пенетрации большой клетки маленькой. Вопреки этому мнению оплодотворение является наиболее высокоспециализированной формой межклеточного взаимодействия, где каждая из гамет активизирует клетку партнера. Таким образом, для стимуляции активации метаболизма ооцита сперматозоид должен воспринять сигналы, исходящие от ооцита и его включений, и ответить на них. Взаимодействие ооцита со сперматозоидом является комплексным многоступенчатым процессом, который начинается со специфического распознавания при помощи дополнительных рецепторов, находящихся на поверхности обеих гамет, и завершается слиянием, объединением материнских и отцовских хромосом. Центральным событием является слияние плазматических мембран двух клеток. Активация сперматозоида и яйцеклетки регулируется при помощи специальных внутриклеточных сигнальных агентов, таких как ионы кальция, водорода, циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), циклической аденозиндифосфатрибозы (цАДФр) и инозитол-1,4,5-трифосфата (ИФ3).

Несмотря на то, что гаметы определенного вида одного конкретного животного кажутся весьма схожими, на самом деле популяция этих клеток гетерогенна. Физиологические параметры, начиная от числа ионных каналов в цитоплазматической мембране и вплоть до количества ионов кальция, выделяемых в цитозоль во время активации, могут различаться у разных клеток в десятки раз. С учетом жизнеспособности было отмечено, что, к примеру, у морских ежей только 2% сперматозоидов способны к оплодотворению. Технологии *in vitro* сделали возможным изучение процессов оплодотворения на примере многих животных, но исследования животных, в свою очередь, послужили источником многих неверных концепций. В настоящее время знания о гаметах человека являются довольно скудными, а в их изучении по-прежнему приходится прибегать к моделям животных. Это допустимо для уровня физиологии, где ведется поиск единых концепций, однако необходимы точные данные и на молекулярном уровне.

Первой фазой репродукции животных является гаметогенез, процесс трансформации, в ходе которого обыкновенные клетки становятся высокоспециализированными половыми клетками: сперматогенез мужских половых клеток и оогенез женских. В обоих случаях в гонадах образуется примордиальная клетка. У мышей примордиальные половые клетки впервые обнаруживаются в желточном мешке. Они являются подвижными и способными к инвазии и мигрируют через дорсальную брыжейку задней части кишечника зародыша в гребни гонад, колонизируя недифференцированные гонады, мезодерму на дорсальной стенке туловища. Недифференцированные гонады также содержат элементы регрессирующей первичной почки, дифференцирующейся в сплетение яичек у особи мужского пола или яичниковое сплетение у особи женского пола.

Когда примордиальные зародышевые клетки завершают миграцию, они теряют характеристики подвижности и быстро пролиферируют, делясь в митозе и увеличивая свою численность. За пролиферацией следует период клеточного роста, которой более выражен у женских гамет, чем у мужских. Ключевым событием гаметогенеза как для мужских, так и для женских гамет становится уменьшение числа хромосом вполнину во время мейоза (см. рис. 1.1). Мейоз является специализированным жизненным циклом клеток, состоящим из двух циклов деления хромосом и одиночного цикла репликации ДНК. В результате мейоза образуются дочерние клетки, содержащие вполнину меньше хромосом, чем материнская. Таким образом, поскольку у человека число хромосом составляет 46, каждый ооцит и сперматозоид содержит всего 23 хромосомы. На этом сходство между оогенезом и сперматогенезом заканчивается. У мужских особей каждый первичный сперматозоид в процессе мейоза делится на четыре сперматиды, каждая из которых становится функционально полноценным сперматозоидом. У особей женского пола из четырех клеток, полученных из первичного ооцита, только одна развивается в жизнеспособный ооцит (см. рис. 1.2). В результате неравного распределения цитоплазмы во время деления также образуются три маленькие клетки, полярные тельца, которые впоследствии дегенерируют.

Другим отличием между двумя гаметами является тот факт, что сперматозоид обретает возможность оплодотворять яйцеклетку только по завершении мейоза. У большинства животных ооцит способен к взаимодействию со сперматозоидом еще до окончания мейоза (см. рис. 1.3). Морские ежи и некоторые кишечнорастные являются исключением из этого правила, их ооциты завершают мейоз еще до оплодотворения. Грубо говоря, только в этих двух случаях женские гаметы во время оплодотворения являются «зрелыми яйцеклетками». В остальных случаях они рассматриваются как ооциты. Процесс, в ходе которого ооцит обретает способность к взаимодействию со сперматозоидом, охарактеризованный Delage в 1901 г. как созревание цитоплазмы, скорее всего, не зависит от цикла деления ядер. Важно отметить, что в ооцитах, успешно оплодотворенных до окончания мейоза, мужское ядро остается неподвижным до окончания мейоза.

Сперматозоид имеет менее сложное строение по сравнению с ооцитом. Однако сперматозоиды часто отличаются значительной длиной, достигая 40 мкм у морских ежей, 2–5 мм у некоторых амфибий и 12 мм у некоторых насекомых. Существует великое разнообразие форм сперматозоидов, однако во избежание чрезмерного упрощения упомянем, что морфологически и функционально они состоят из четырех частей:

1. Головка, содержащая ядрышко и акросому.
2. Шейка, содержащая центриоли.
3. Тело, содержащее митохондрии.
4. Хвостик, или жгутик.

Сперматозоид является довольно компактной клеткой с высокоспециализированными цитоплазматическими структурами, включая жгутик, отвечающий за подвижность, и акросому, при помощи которой происходит связывание сперматозоида с ооцитом и их слияние.

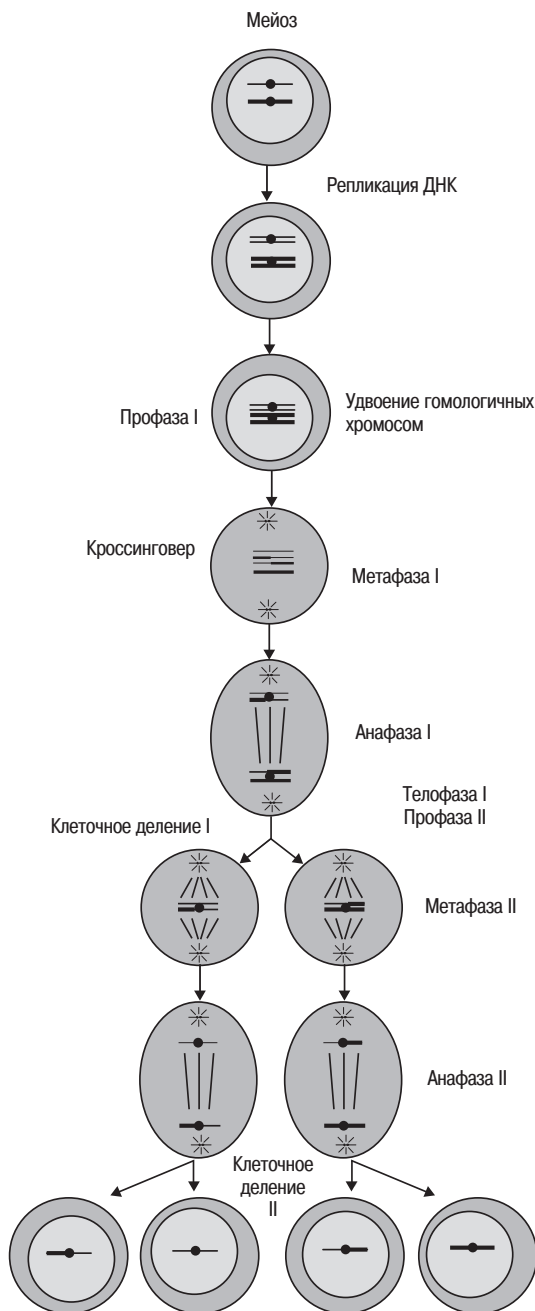


Рис. 1.1 Мейоз. Из каждой диплоидной клетки образуются четыре гаплоидные клетки с уникальным хромосомным набором.

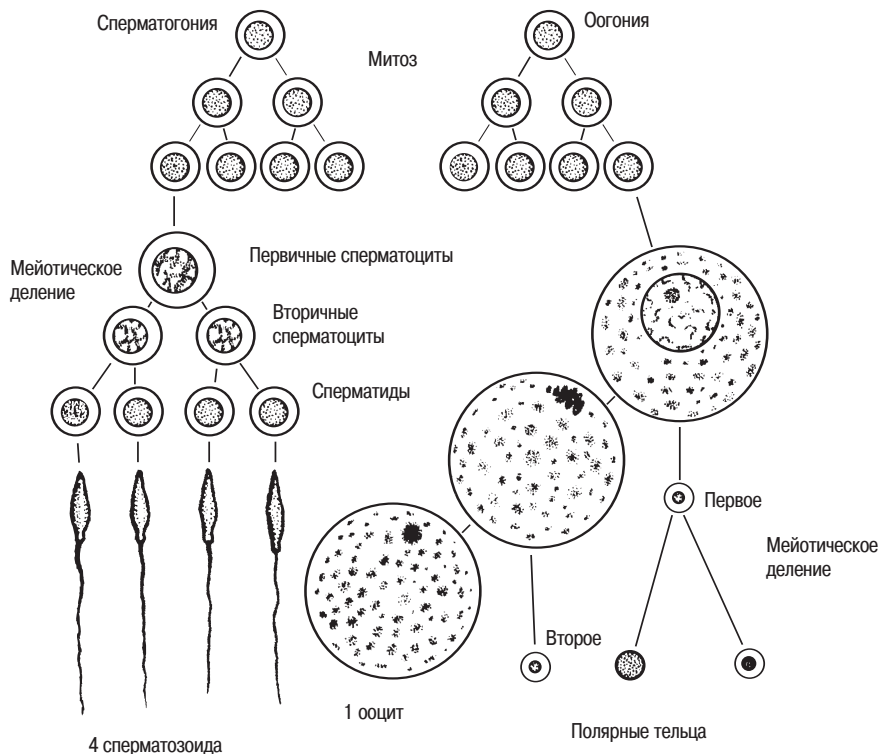


Рис. 1.2 Гаметогенез у мужских особей завершается образованием четырех полноценных сперматозоидов, в то время как у женских особей только одна из дочерних клеток становится полноценным ооцитом. Адаптировано из Dale (1983).

Размеры ооцитов широко варьируют: у морских беспозвоночных они достигают 60–150 мкм в диаметре, у млекопитающих — около 100 мкм, у рыб и амфибий — около 1 мм, а размер птичьего яйца известен каждому. Невзирая на разницу в размерах все они обладают сходным строением.

Во время фазы роста оогенеза наблюдается интенсивный синтез РНК, а также, в меньшей мере, белков. Иными словами, образуется материал, необходимый для поддержки раннего развития эмбриона после оплодотворения. Типичные компоненты цитоплазмы ооцита включают в себя желточные зерна, пигментные гранулы и митохондрии, кортикальные гранулы, слой связанных с мембраной пузырьков, находящийся под плазматической мембраной и одинаковый для всех ооцитов. Большинство ооцитов окружено несколькими внеклеточными оболочками. Внутренний слой образован гликопротеиновой оболочкой, играющей важную роль при взаимодействии ооцита со сперматозоидом. Она известна как вителлиновая оболочка у иглокожих и амфибий, хорион у асцидий и блестящая зона у млекопитающих. Снаружи от нее располагаются различные структуры: желеобразный слой у морских ежей и амфибий, фолликулярные клетки у

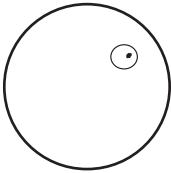
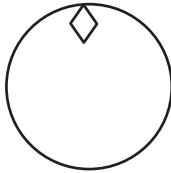
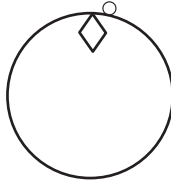
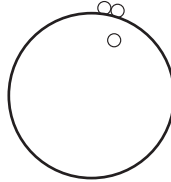
Профаза первого деления	Метафаза первого деления	Метафаза второго деления	Завершенный процесс созревания
<i>Нереида</i> (кольчатые черви)	<i>Четоптерус</i> (кольчатые черви)	Амфибии	Морские ежи
<i>Поматоцероз</i> (кольчатые черви)	Асцидии	Рыбы	Кишечно-полостные
<i>Спикула</i> (моллюски)		Млекопитающие	
			

Рис. 1.3 Различные стадии приостановки мейоза ооцитов у различных типов животных. Адаптировано из Dale (1983).

асцидий, лучистый венчик у млекопитающих (который тоже состоит из фолликулярных клеток). Кроме того, у птиц и рептилий имеется твердая наружная оболочка, неорганическая по составу – скорлупа, образующаяся вокруг ооцита после оплодотворения. Все внеклеточные компоненты, кроме неорганической скорлупы, присутствуют в момент оплодотворения. Таким образом, для слияния с плазматической мембраной ооцита сперматозоид должен взаимодействовать и проникать через все вышеперечисленные слои.

Литература

- Austin, C.R. (1965) *Fertilization*. Prentice-Hall, New Jersey.
- Austin, C.R. & Short, R.V. (1972) *Germ Cells and Fertilization*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Balinsky, B.I. (1965) *An Introduction to Embryology*. Saunders, London.
- Bodmer, C.W. (1968) *Modern Embryology*. Holt, Rinehart and Winston, New York.
- Dale, B. (1983) *Fertilization in Animals*. Edward Arnold, London.
- Hirshfield, A.N. (1991) Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology* **234**:43–55.
- Longo, F. (1987) *Fertilization*. Academic Press, New York.
- Metz, C. & Monroy, A. (1985) *Biology of Fertilization*. Academic Press, New York.
- Wassarman, P. (1987) The biology and chemistry of fertilization, *Science* **235**:553–60.

Развитие гамет

Рост ооцита

Рост ооцитов, как правило, занимает длительный период времени, а прибавка в размере достаточно значительна. Наиболее ярким примером этому служит развитие ооцита лягушки. Молодой ооцит, составляющий в диаметре менее 50 мкм, вырастает за период около трех лет до диаметра 1500 мкм, увеличиваясь примерно в 20 000 раз. Ооциты млекопитающих значительно меньше в размерах, а их период роста составляет менее трех лет. Тем не менее, их увеличение в размерах является достаточно заметным. К примеру, диаметр ооцита мыши увеличивается с 20 до 70 мкм, а его размеры возрастают примерно в 40 раз. Все ооциты обладают достаточно крупными размерами, гораздо большими по сравнению с обыкновенными соматическими клетками, обычно не превышающими в диаметре 10 мкм. Размер завершившего рост ооцита зависит от количества содержащихся в его цитоплазме питательных веществ, хотя ядро также немного увеличивается по мере роста клетки. Характерное ядро неоплодотворенного ооцита называется герминальным пузырьком. Наиболее значимые запасы питательных веществ представлены желтком. В некоторых ооцитах также обнаруживаются значительные запасы гликогена и липидов. Химический состав желтка у различных видов различается по белковому составу и пропорции жиров. У беспозвоночных и низших позвоночных желток, как правило, находится в мелких гранулах, распределенных в цитоплазме, и составляет примерно 20–30% объема ооцита. Желток амфибий, напротив, составляет около 80% объема ооцита и располагается в крупных ровных пластинках. Пластинки различаются по размеру и распределены в цитоплазме неравномерно. Большая часть желтка располагается на одном из полюсов клетки, вегетативном полюсе. У костистых рыб, птиц и рептилий желток образует компактную центральную массу, окруженную тонким наружным слоем цитоплазмы с ядром, расположенным в утолщенной цитоплазматической капсуле на одном из полюсов ооцита – животном полюсе. Ооциты насекомых имеют аналогичное строение, однако помимо периферической слоя цитоплазмы они имеют внутреннюю цитоплазматическую массу, в которой располагается ядро. У многих животных материал, запасенный в ооците во время роста, синтезируется различными

частями тела, отличными от яичников, и доставляется в яичники в растворимом виде кровотоком. К примеру, у позвоночных животных протеины и фосфолипиды продуцируются печенью. Внутри ооцита комплекс Гольджи синтезирует растворимые предшественники желтка в нерастворимых желтковых гранулах. В течение эволюции млекопитающих число яйцеклеток уменьшалось, так же как и количество запасенных в них питательных веществ (желтка). Это было достигнуто в силу того, что яйцеклетки млекопитающих развиваются в репродуктивном тракте, обеспечивающем им необходимую защиту и питание. Рост ооцитов человека является очень медленным процессом и занимает несколько месяцев. Примордиальный ооцит достигает стократного увеличения объема за время созревания, увеличиваясь в диаметре за период около 85 дней от 35 до 120 мкм. Процесс созревания включает в себя координацию интегрированных, но не зависимых друг от друга событий, происходящих в цитоплазме: происходит разрушение герминального пузырька ядра, возобновление мейоза и завершение первого мейотического деления. Созревание цитоплазмы требует изменения локализации органелл и установления полярности ооцита с увеличением числа митохондрий и рибосом. Происходит изменение мембранных транспортных систем, развивающийся аппарат Гольджи расширяется и мигрирует к периферии. В цитоплазме появляются органеллы, отвечающие за запасание и экспорт материалов: мембраносвязанные пузырьки, мультивезикулярные и кристаллиновые тельца, жировые включения и гликогеновые гранулы.

В ооцитах мышей по ходу роста модифицируется комплекс центросом-микротрубочек. В интерфазу в растущих ооцитах появляются длинные микротрубочки, которые образуют микротрубочковые центры вокруг ядра, состоящие из 1–5 микротрубочек. Определенные классы иРНК селективно секвестрируются и образуют рибонуклеопротеиновые частицы, находящиеся в цитоплазме до получения специальных сигналов во время оплодотворения или начала раннего развития.

Развитие фолликула

В течение роста и созревания ооциты окружены слоем или слоями специализированных соматических клеток, называемых фолликулярными, и развивающихся из популяции клеток-предшественников в течение эмбриогенеза человека. Соматические компоненты фолликула (гранулеза, тека, эндотелиальные клетки и поддерживающая соединительная ткань) развиваются из недифференцированных гонад эмбриона. Каждый примордиальный фолликул состоит из единичного маленького ооцита, окруженного несколькими упорядоченными соматическими «прегранулезными» клетками, прилегающими к его собственной базальной мембране. У человека первые примордиальные фолликулы могут быть различимы на четвертом месяце развития эмбриона. После возникновения примордиального фолликула его прегранулезные клетки находятся в состоянии покоя. Их пролиферация инициируется вступлением примордиального фолликула в фазу роста, начинающуюся спустя месяцы или даже годы после его образования.

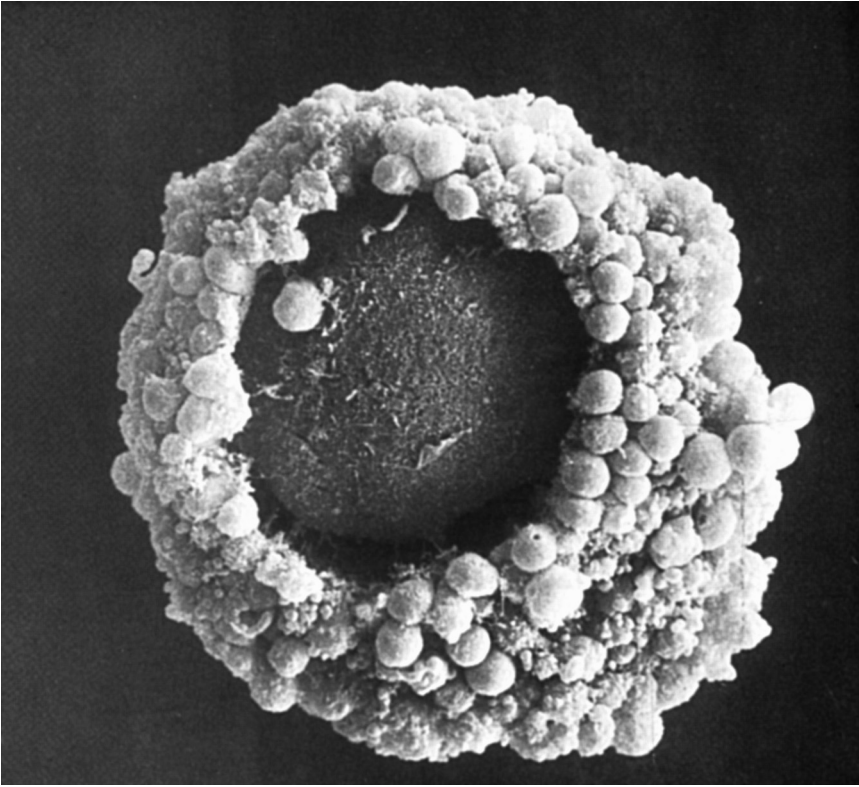


Рис. 2.1 Сканирование ооцита человека и окружающего его лучистого венца при помощи электронного микроскопа. Часть клеток венца была удалена. Предоставлено профессором P.F.Kraicer, Tel Aviv University, и D.Philips, Population Council, New York.

В течение фазы роста образуются внутренняя текальная ткань, содержащая стероидогенные клетки, и наружная текальная ткань, наружный слой которой представлен соединительной тканью. Базальная мембрана должна расширяться или ремоделироваться в соответствии с увеличением размеров ооцита. Она превращается в динамическую систему, питающую ооцит и реагирующую на эндогенные и экзогенные влияния аутокринного и паракринного характера. Маленькие фолликулы не имеют собственного кровоснабжения, но ооциты средних размеров уже окружены сетью анастомозирующих артериол, прилегающей к базальной мембране. Сеть расширится по мере роста фолликула. Каждый зрелый фолликул обладает собственной разветвленной системой кровоснабжения. Гормональные изменения в период фолликулогенеза влияют на состав фолликулярной жидкости, являющейся источником энергии, необходимой для развития ооцита. Ооцит играет наиболее важную роль в развитии фолликула: он контролирует дифференциацию гранулезных клеток фолликула. Гранулезо-ооцитарная связь необходима для завершения развития ооцита.

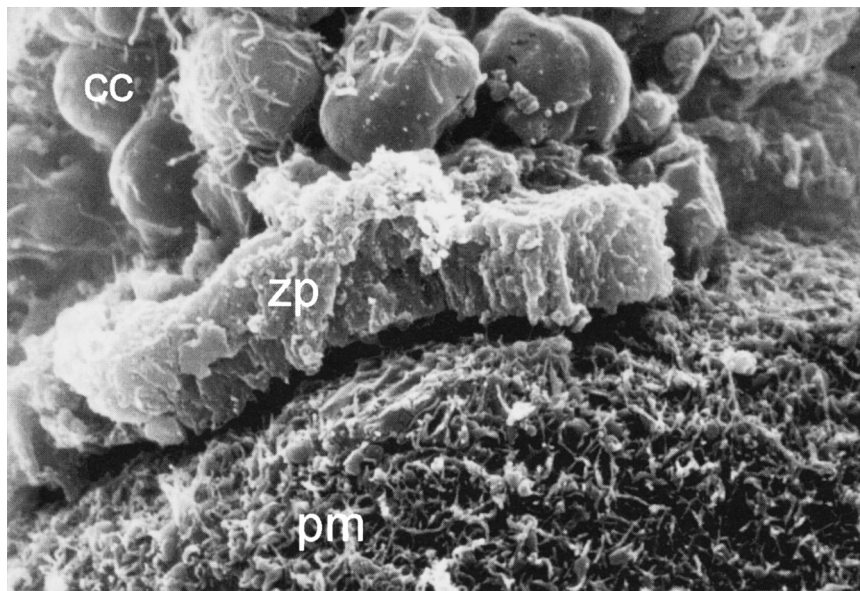


Рис. 2.2 Электронное сканирование поверхности неоплодотворенного ооцита человека в метафазе II с прозрачной зоной (zp) и лучистым венцом (cc), частично иссеченными для демонстрации организации микроворсинок плазматической мембраны (pm).

Лучистый венец, скопление связанных с ооцитом с момента его возникновения до оплодотворения гранулезных клеток, является комплексной тканью, уникальной для плацентарных млекопитающих. Клетки лучистого венца взаимодействуют с интрафолликулярным окружением развивающегося ооцита. Ооцит и окружающие его клетки находятся в тесном взаимодействии (см. рис. 2.1): исследования с использованием электронной микроскопии выявили наличие щелевых контактов между соседствующими мембранами. Эти внутриклеточные контакты аналогичны присутствующим в соматических тканях и служат для межклеточных взаимодействий, в качестве каналов для проникновения ионов и небольших по размеру молекул. На поздних стадиях развития у ооцита появляются многочисленные микроворсинки, возможно, они образуются с целью увеличения площади поверхности ооцита при существующем объеме. Плотный фибриллярный материал, расположенный между ооцитом и его фолликулярными клетками, становится первичной вителлиновой оболочкой, или блестящей зоной у млекопитающих (рис. 2.2). На этом этапе развития фолликулярные клетки по-прежнему контактируют с ооцитом благодаря длинным микроворсинкам, располагающимся между микроворсинками ооцита. Под световым микроскопом зона микроворсинок видна как радиально исчерченный слой, в связи с чем ее долго называли радиальной зоной. У некоторых животных, к примеру, иглокожих и млекопитающих, микроворсинки вступают во взаимодействие незадолго до овуляции, образуя вителлиновую оболочку. У других животных, таких как двустворчатые моллюски, вителли-

новая оболочка остается перфорированной микроворсинками. Клетки фолликула служат для передачи веществ, используемых для роста ооцита, и подают сигналы к триггерам ооцита во время созревания.

Клетки лучистого венца вырабатывают ганглиозид GM3, который используется в распознавании клеток, дифференциации и при подаче сигналов. Блокировка щелевых контактов происходит при перемещении или действии таких молекул, как 2-дезоксиглюкоза, ТГФ- α и митотических агентов ооцита. У многих видов потеря лучистого венца ооцита может прерывать его созревание, выражаясь в неспособности вступить в мейоз. Передача сигналов между ооцитом и лучистым венцом проходит в обоих направлениях. Клетки венца воздействуют на рецепторы факторов роста и иРНК для множества факторов роста. Они также являются источником простагландинов и вырабатывают ангиогенные факторы (васкулярный эндотелиальный фактор роста, ВЭФР), играющие важную роль в неоваскуляризации фолликулов и ангиогенезе участка имплантации эмбриона. Созревание ооцита связано с поляризацией клеток лучистого венца и образованием внеклеточного матрикса из гиалуроновой кислоты. Клетки венца выделяют *in vitro*-связывающие комплемент белки, участвующие в защите эмбриона от комплемента тубальной и маточной жидкостей. Их значительная стероидогенная активность может вызывать местное повышение уровня стероидных гормонов в лютеиновую фазу и в ранние сроки беременности.

Хранение информации

Для достижения готовности к дальнейшему развитию ооцит должен завершить определенные изменения в течение фазы роста. Они включают в себя аккумуляцию специфических макромолекул РНК, которые позже понадобятся для контроля за эмбриогенезом. В клетках животных различают три основных класса РНК-молекул: информационную РНК (иРНК), транспортную РНК (тРНК) и рибосомальную РНК (рРНК). Все три вида участвуют в синтезе белка, относительное количество того или иного из всех трех типов РНК варьирует у разных видов. У амфибии *Xenopus* в течение оогенеза протекает значительный синтез рРНК, продолжающийся до созревания и не определяющийся после начала гастрюлы. Это означает, что рибосомы ооцита присутствуют в значительных количествах для поддержания синтеза белка эмбриона, входя в состав многих тысяч клеток. Как удастся ооциту синтезировать такие огромные количества рРНК, соответствующие результату синтеза 200 000 клеток печени? У амфибий это достигается при помощи процесса, названного усилением гена: ген рРНК подвергается многократной репликации до образования нескольких сотен копий. Герминальный пузырек ооцита *Xenopus* содержит множество ядрышек, каждое из которых содержит гены рРНК и участок рРНК-синтеза. Этот механизм выработки огромных количеств рРНК за относительно короткий период является универсальным и усвоенным, хотя усиление гена встречается также у некоторых беспозвоночных. У некоторых насекомых, в том числе *Drosophila*, защитные клетки активно синтезируют РНК, которая потом поступает в ооцит через цитоплазматические каналы.

У гигантского шелкового червя *Antheraea* ДНК ооцита не участвует в синтезе РНК, вся РНК синтезируется защитными клетками и запасается в ооците. Взаимодействие между защитными клетками и ооцитом представляет собой огромный интерес, однако не следует забывать, что эти два вида клеток имеют общее происхождение. Не все ооциты запасают большое количество РНК. Ооциты млекопитающих содержат небольшое количество РНК, а новая РНК синтезируется после активации генома зиготы в период бластулы. В незрелых ооцитах некоторых позвоночных и беспозвоночных сдвоенные хромосомы значительно удлиняются с образованием тонких петель, являющихся расширением основного стержня. Петли хромосом являются участками активного синтеза РНК и белков. Отношение РНК к ДНК в них в 1000 раз превышает аналогичное в хроматине печени. Изначальное содержание петлевой РНК не сравнимо с количеством рРНК, но она схожа с ДНК, свидетельствуя о том, что это информационная РНК. Каково значение большого количества иРНК? У таких видов, как *Xenopus* и *Drosophila*, эмбрион содержит огромное количество иРНК до начала бластулы для управления синтезом белка при дальнейшем развитии.

В ооцитах млекопитающих транскрипция усиливается по мере роста фолликула. По мере накопления РНК внутри ядра наблюдается значительный рост ядрышек, в состав которых входит значительное количество транслируемой полиаденилированной иРНК. Нуклеосомы содержат ДНК, упакованную в виде хроматина, которая также содержит структурные белки, например гистоны, и отвечает за экспрессию определенных генов в определенный период времени и аккуратную регуляцию механизма транскрипции. Метилирование ДНК выключает процесс транскрипции, а деметилирование происходит при необходимости экспрессии гена. Кроме того, высокий уровень гистонового ацетилирования связан с активностью гена. При «молчании» гена уровень понижается. Процессы деметилирования и ацетилирования всегда взаимосвязаны, оба необходимы для транскрипции ДНК. Метилированные гены являются скорее промоторами/усилителями, регулирующими экспрессию/транскрипцию, чем структурными генами. Терминальные аминокончания сердцевин гистонов являются мишенью для ацетилирования, уменьшающего аффинность окончания гистона к ДНК. Транскрипция основана на связывании последовательности специфических факторов транскрипции с ДНК. Ацетилирование гистонов вызывает изменения организации нуклеосом, позволяющие ацетилированному окончанию контактировать с факторами транскрипции. Нуклеосома претерпевает структурные изменения, аналогичные выпрямлению пружины. Ацетилирование и деацетилирование стержня гистонов включается в механизм преобразования сигнала.

Когда рост ооцита завершен, происходит разрушение зародышевого пузырька, и транскрипция новой РНК почти полностью прекращается до момента активации генома зиготы (АГЗ), когда начинает функционировать новый эмбриональный геном. В течение времени, предшествующего АГЗ, и до слияния ооцит зависит от запасов иРНК, обработанной при помощи специальных механизмов, контролирующих ее экспрессию. Ста-

Кэй Элдер, Брайан Дэйл

ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОЕ ОПЛОДОТВОРЕНИЕ

Перевод с английского

Главный редактор: *В.Ю.Кульбакин*

Ответственный редактор: *Е.Г.Чернышова*

Научный редактор: *К.А.Яворовская*

Корректор: *Е.В.Мышева*

Компьютерный набор и верстка: *И.А.Кобзев, А.Ю.Кишканов*

ISBN 5-98322-360-7



9 785983 223608

Лицензия ИД №04317 от 20.04.01 г.

Подписано в печать 20.05.08. Формат 70×100/16.

Бумага офсетная. Печать офсетная. Объем 19 п.л.

Гарнитура Таймс. Тираж 2000 экз. Заказ №1415

Издательство «МЕДпресс-информ».

119992, Москва, Комсомольский пр-т, д. 42, стр. 3

Для корреспонденции: 105062, Москва, а/я 63

E-mail: office@med-press.ru

www.med-press.ru

Отпечатано с готовых диапозитивов

в ОАО «Типография «Новости»

105005, Москва, ул. Фр. Энгельса, 46