

Обзоры литературы

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Шестакова М.А.¹, Проскурнина Е.В.², Фёдорова М.В.³, Соснова Е.А.⁴

ОВАРИАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ: МИНИ-ОБЗОР

¹ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, г. Москва, Россия;²ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова», 115522, г. Москва, Россия;³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», 119991, г. Москва, Россия;⁴ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)» Минздрава России, 119991, г. Москва, РоссияДля корреспонденции: Проскурнина Елена Васильевна, д-р мед. наук, доцент, главн. науч. сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова», 115522, г. Москва; e-mail: proskurnina@gmail.com

Обнаружение герминативных стволовых клеток в человеческих яичниках в постнатальном онтогенезе — одна из наиболее значимых и неоднозначных находок в современной биологии развития. В данном обзоре представлены краткие сведения об основных классах овариальных стволовых клеток, их происхождении, морфофункциональных особенностях и сходстве с тестикулярными стволовыми клетками. Приведены литературные данные о физиологической роли постнатального нео-оогенеза и его возможном участии в патогенезе некоторых гинекологических заболеваний. Отдельно рассматриваются перспективы использования этого открытия в репродуктивной медицине.

Ключевые слова: ооциты; гаметы; стволовые клетки; оогенез.

Для цитирования: Шестакова М.А., Проскурнина Е.В., Федорова М.В., Соснова Е.А. Овариальные стволовые клетки: мини-обзор. *Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирёва*. 2020; 7(2): 60–66.
DOI <http://doi.org/10.17816/2313-8726-2020-7-2-60-66>

Shestakova M.A.¹, Proskurnina E.V.², Fedorova M.V.³, Sosnova E.A.⁴

OVARIAN STEM CELLS: A MINI-REVIEW

¹N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, 117997, Moscow, Russian Federation;²N.P. Bochkov Research Centre for Medical Genetics, 115522, Moscow, Russian Federation;³M.V. Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Russian Federation;⁴I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119991, Moscow, Russian Federation

The discovery of germline stem cells in adult human ovaries is one of the most remarkable yet controversial findings in modern developmental biology. In the present article, a brief overview is given on ovarian stem cells' types, origin, morphofunctional features and similarities to testicular stem cells. The physiological role of postnatal neo-oogenesis and its possible participation in the pathogenesis of some gynecological diseases are discussed. Particular attention is paid to the prospects for practical application to the discovery in reproductive medicine.

Keywords: oocytes; germ cells; stem cells; oogenesis.

For citation: Shestakova M.A., Proskurnina E.V., Fedorova M.V., Sosnova E.A. Ovarian stem cells: a mini-review. *V.F. Snegirev Archives of Obstetrics and Gynecology, Russian journal*. 2020; 7 (2): 60–66. (in Russ.).
DOI: <http://doi.org/10.17816/2313-8726-2020-7-2-60-66>

For correspondence: Elena V. Proskurnina, MD, PhD, Chief Researcher at the Laboratory of Molecular Biology of N.P. Bochkov Research Centre for Medical Genetics, 115522, Moscow, e-mail: proskurnina@gmail.com

Information about authors:

Shestakova M.A., <https://orcid.org/0000-0002-6154-9481>Proskurnina E.V., <http://orcid.org/0000-0002-8243-6339>Fedorova M.V., <https://orcid.org/0000-0002-7859-6698>Sosnova E.A., <http://orcid.org/0000-0002-1732-6870>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 13.02.2020

Accepted 03.03.2020

Введение

С момента выхода первой публикации, посвящённой овариальным стволовым клеткам, в которой опровергался постулат об отсутствии постнатального оогенеза у млекопитающих, прошло более десяти лет [1]. Несмотря на сохраняющиеся противоречия по вопросу

существования стволовых клеток в яичниках взрослых особей [2–7], потенциальный вклад этого открытия в репродуктивную медицину трудно переоценить. В настоящее время идёт обсуждение прикладного использования овариальных стволовых клеток в рамках вспомогательных репродуктивных технологий [8], вос-

становления эндокринной функции, в том числе и после терапии рака [7]. Кроме того, пристально изучается связь овариальных стволовых клеток с развитием рака яичников [9].

Овариальные стволовые клетки: классификация, морфофизиология, локализация

По имеющимся литературным данным в яичнике существуют 2 разновидности овариальных стволовых клеток. Первая представлена плюрипотентными клетками диаметром 2–4 мкм (VSEL — very small embryonic-like stem cells). Аналогичные популяции очень небольших по своим размерам стволовых клеток с эмбриональными маркерами обнаружены во многих органах и тканях взрослого организма: красном костном мозге, пуповинной крови, эпидермисе, сердце, поджелудочной железе, семенниках, эпителии бронхов [9]. Согласно данным D. Bhartiya и соавт., для гонадных VSEL характерны сферическая форма, высокое ядерно-цитоплазматическое отношение, экспрессия маркеров плюрипотентности (OCT-4A, SSEA-4, Nanog, Sox-2, Rex), примордиальных стволовых клеток (STELLA, FRAGILIS) и половых клеток (VASA/MHV, DAZL) [10]. Они также дают окрашивание на щелочную фосфатазу, однако менее интенсивное, чем эмбриональные стволовые клетки [11].

Вторая разновидность стволовых клеток яичника, достигающих 5–8 мкм в диаметре — это коммитированные предшественники, или прогениторные клетки (OSC — ovarian stem cells, собственно овариальные стволовые клетки) [6]. Отличительной чертой OSC по сравнению с VSEL является изменение экспрессии ядерной изоформы транскрипционного фактора OCT-4 (OCT-4A) на цитоплазматическую (OCT-4B), указывающее на утрату плюрипотентности и запуск программы дифференцировки [12].

В яичниках и семенниках взрослых особей VSEL представляют собой популяцию наиболее примитивных плюрипотентных клеток. Они способны к самоподдержанию за счёт редких асимметричных делений и дают начало коммитированным предшественникам (сперматогониям и OSC). Последние претерпевают мейоз и дифференцируются в сперматозоиды и ооциты II порядка соответственно [6]. При этом для OSC характерно деление путём неполного цитокинеза (клональная экспансия) с образованием кластеров — «гнезд» дочерних клеток, соединённых цитоплазматическими мостиками [12].

Культивирование человеческих и овечьих овариальных стволовых клеток *in vitro* в среде DMEM/F12 с высоким содержанием глюкозы и добавлением 20% фетальной бычьей сыворотки в течение 3 нед приводило к прогрессивному падению теломеразной активности, спонтанной утрате плюрипотентности и дифференцировке в ооцитоподобные клетки среднего диаметра 130 мкм, окружённые оболочкой, напоминающей *zona pellucida*. При этом у некоторых из описываемых кле-

ток наблюдался процесс, напоминающий экструзию полярного тельца [13, 14]. Также в работе Y. White и соавт. мышинные и человеческие овариальные стволовые клетки спустя 24–48 и 72 ч культивирования соответственно дифференцировались в крупные (35–50 мкм в диаметре) сферические клетки, которые экспрессировали ооцитарные маркеры — Ddx4, c-Kit, Nobox, Lhx8, Gdf9 и гликопротеины *zona pellucida* — Zp1, Zp2, Zp3. Кроме того, наблюдалась экспрессия маркера диплотеины Ybx2/Msy2, критически необходимого для протекания мейоза и гаметогенеза у мышей и человека [15].

Интересно отметить, что VSEL, выделенные из яичников женщин в постменопаузе, при непродолжительном (до 20 дн) культивировании оказывались способны к формированию трёхмерных бластоцистоподобных структур (эмбрионных телец) с заполненной жидкостью центральной полостью [13, 14]. J. Paschiarotti и соавт. удалось выявить в эмбрионных тельцах, полученных из первичной культуры овариальных стволовых клеток мышей, экспрессию и иммуногистохимическое окрашивание на специфические маркеры трёх зародышевых листков [16].

Полагают, что овариальные стволовые клетки являются предшественниками не только ооцитов, но и соматического компонента примордиальных фолликулов — примитивной гранулёзы. Так, клетки, полученные соскобом с поверхности яичника женщины, после 5–6-дневного культивирования в присутствии эстрогенового стимула (феноловый красный) дифференцируются в крупные (180 мкм) клетки с фенотипом ооцитов, претерпевающие распад герминативного пузырька, отделение полярного тельца и экспрессию белков *zona pellucida*. С другой стороны, в среде без фенолового красного стволовые клетки яичников дают начало мелким клеткам (15 мкм) с фенотипом гранулёзы (что подтверждалось результатом иммуногистохимического окрашивания на цитокератины-5, -6, -7, -8 и гликопротеины *zona pellucida* в перинуклеарном пространстве) [17].

Необходимо отметить, что первичные культуры стволовых клеток яичников, получаемые соскобом с поверхности яичника, могут содержать не только стволовые клетки на разных стадиях жизненного цикла, но также фибробласты, клетки белковой оболочки яичника, лимфоциты и дендритные клетки, эндотелиоциты, перициты [18]. Стромальные клетки яичника способны к продукции андрогенов, которые могут быть далее превращены в эстрадиол ароматазой фибробластов, тем самым создаются благоприятные условия для трансформации герминогенных клеток в ооциты *in vitro* [19].

Кроме того, овариальные стволовые клетки (VSEL и OSC), как и гранулёза, способны реагировать на фолликулостимулирующий гормон (ФСГ). Показано, что они экспрессируют альтернативную форму рецептора (FSH-3R), подобно тестикулярным стволовым клеткам [12].

В создании модели оогенеза *in vitro*, помимо гормональных влияний, важную роль играют контакты

овариальных стволовых клеток с гранулёзой. Контакт аутогенных клеток гранулёзы с ооцитоподобными клетками считается необходимым для полноценного созревания ооцита и дальнейшего возобновления мейоза II. Полагают, что ооциты, полученные в модельной системе «овариальные стволовые клетки — гранулёза» в будущем смогут быть использованы для целей вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Для успешного ведения культуры стволовых клеток яичников *in vitro* в среду рекомендуется добавлять гранулёзу из аутологичных малых антральных фолликулов. Альтернативой может служить кумулюс, полученный в цикле ВРТ, или донорская гранулёза, выделенная из яичников фертильных женщин после овариоэктомии [20].

В то же время нет убедительных сведений о том, какие именно физиологические стимулы активируют покоящиеся стволовые клетки *in vivo* в яичнике взрослых особей. Исследования на мышах не подтвердили гипотезу о том, что активация нео-оогенеза связана с аблацией большого числа ооцитов [7]. Облучение половозрелых мышей стерилизующими дозами гамма-излучения приводило к абляции всех примордиальных фолликулов без признаков дальнейшего неофолликулогенеза [20].

Первичные культуры овариальных стволовых клеток получают соскобом с поверхности яичника (у мышей из-за малого размера органа применяют частичное ферментативное расщепление) и затем определяют популяционную принадлежность клеток при помощи специфических маркеров методами иммуногистохимии или проточной цитофлуориметрии. При этом маркеры мейоза удаётся обнаружить только на активированных стволовых клетках, участвующих в процессе нео-оогенеза [6]. Наиболее часто для выделения овариальных стволовых клеток применяют антитела к маркеру стволовых клеток MVH (*mouse vasa homologue*) у мышей и Ddx4 (DEAD box polypeptide 4) у человека. Кроме того, использование маркера FRAGILIS (также известного как *interferon-inducible transmembrane protein 3*, IFITM3) позволяет существенно увеличить выход герминативных стволовых клеток из мышинного яичника методом иммуномагнитного сортирования [21].

Более слабая по сравнению с соматическими клетками адгезия стволовых клеток к желатиновому матриксу позволила J. Liu и соавт. разработать альтернативный протокол их выделения из яичников новорождённых мышей без использования антител к мембранным маркерам. Получаемые таким образом герминативные стволовые клетки собраны в кластеры в виде цепочек (до 8 клеток) посредством *E-кадгерин-содержащих межклеточных контактов* [22].

До сих пор нет общего мнения о происхождении постнатальных овариальных стволовых клеток. По одной из версий, источник стволовых клеток во взрослом яичнике — это мезенхимальные предшественники из белковой оболочки яичника. Белковая оболочка яичника — это тонкая оболочка из коллагеновых и эластиче-

ских волокон, продолжение базальной мембраны, окружающей поверхностный эпителий яичника. Во время эмбрионального развития белковая оболочка отсутствует и яичники покрыты пролиферирующими клетками поверхностного эпителия. Полноценная белковая оболочка формируется в постнатальном периоде. Возможно, что её появление представляет собой результат эпителиально-мезенхимального перехода, который наблюдается в культуре стволовых клеток. В этом случае не исключено, что во взрослом организме клетки белковой оболочки могут претерпевать обратный мезенхимально-эпителиальный переход и служить источником овариальных стволовых клеток [23].

Ранее высказывалось предположение о том, что предшественниками ооцитов в яичниках пациенток после химиотерапии могут выступать стволовые клетки костного мозга. Однако в настоящее время преобладает точка зрения, что эти клетки играют в нео-оогенезе вспомогательную роль [6]. По мнению A. Bukovsky и соавт., стволовые клетки яичников могут попадать в периферический кровоток, рециркулировать и вступать в фолликулогенез в эпителиальных «гнездах» или эпителиальных криптах глубоких отделов кортекса ипси- или контралатерального яичника [24].

В половых железах мужских особей, тестикулах, также присутствуют стволовые клетки — сперматогонии. Они располагаются в семенных канатиках и окружены клетками Сертоли, создающими для них подходящее микроокружение. В отличие от яичников, процесс гаметогенеза у особей мужского пола протекает постоянно (но с различной скоростью у разных видов: каждые 64 дня у человека, каждые 35 дней у мышей) [25].

Поскольку существование тестикулярных стволовых клеток является давно установленным научным фактом, проведено большое количество исследований, посвящённых культивированию, криоконсервации и трансплантации этих клеток. Например, разработаны методики, позволяющие восстанавливать фертильность у мальчиков, прошедших лучевую и химиотерапию, с помощью клеточного материала тестикулярной биопсии [25]. Жизнеспособные сперматогонии удаётся обнаружить даже в семенниках с атрофией у старых крыс. Поэтому возрастное снижение фертильности объясняют главным образом утратой функций соматических клеток, составляющих микроокружение герминогенных стволовых клеток [26].

Роль микроокружения в нео-оогенезе и репродуктивном старении

Многочисленные литературные данные позволяют говорить о ключевой роли микроокружения стволовых клеток в фолликулогенезе; неоптимальные условия дифференцировки и созревания будущих ооцитов могут служить причиной овариальной дисфункции даже при сохранении пула овариальных стволовых клеток.

В частности, показано, что трансплантация OSC пациентки с мозаичной формой синдрома Тёрнера в ткань

яичника здорового донора с последующим трёхнедельным культивированием *ex vivo* приводила к появлению фолликулов, содержащих ооцит и многослойный фолликулярный эпителий. В то же время OSC здоровой пациентки не были способны инициировать фолликулогенез в ткани яичника пациентки с синдромом Тёрнера *ex vivo* [27]. Результаты данного исследования указывают на неспособность овариальной стромы поддерживать образование фолликулов при синдроме Тёрнера, несмотря на наличие популяции герминативных стволовых клеток в яичниках при этом заболевании.

Предположительно, герминативные стволовые клетки яичника сохраняют способность вступать в оогенез на протяжении всей жизни особи, и реализация этой способности полностью зависит от микроокружения. Так, Y. Niikura и соавт. удалось добиться возобновления фолликулогенеза в овариальной ткани мышей с полностью истощённым овариальным резервом. Для этого авторы исследования трансплантировали фрагменты яичников старых мышей под капсулу яичников молодых самок. По прошествии 6 недель эксперимента в трансплантате обнаруживались примордиальные фолликулы [28].

В ряде экспериментальных работ трансплантация мезенхимальных стволовых клеток различного происхождения (костный мозг, жировая ткань, кожа, пуповинная кровь) в ткань яичников грызунов и человека приводила к усилению фолликулогенеза — вероятно, за счёт создания подходящего микроокружения для созревания OSC [29]. Например, введение стволовых клеток из пуповинной крови в яичники крыс после гонадотоксичной терапии циклоспорином приводило к увеличению числа преантральных фолликулов, а также повышению уровней антимюллерова гормона и эстрадиола в сыворотке крови. При этом пересаженные клетки сохраняли жизнеспособность в яичнике не менее 8 нед. Авторы объясняют стимулирующий эффект, который оказывает трансплантация на овариальную ткань, способностью мезенхимальных стволовых клеток секретировать многочисленные ростовые факторы — сосудистый эндотелиальный фактор роста VEGF, плацентарный фактор роста PGF, трансформирующий фактор роста-бета (TGF- β), фактор роста гепатоцитов HGF [30].

К аналогичным результатам приводила пересадка стволовых клеток кожи в яичники мышей с моделью преждевременной яичниковой недостаточности. При этом авторам удалось показать увеличение экспрессии ооцит-специфических транскрипционных факторов, характерных для раннего фолликулогенеза (Nobox, Nanos3, Lhx8) в яичниках после трансплантации [31]. Аналогично у женщин с синдромом преждевременного истощения яичников трансплантация аутологичных мезенхимальных клеток костного мозга в яичники приводила к восстановлению менструального цикла [32].

С учётом наличия в гонадах герминативных стволовых клеток, в настоящее время обсуждаются две

основные причины, ведущие к репродуктивному старению или ускоряющие его. Это экзогенные факторы (приводящие к повреждению ДНК, повышению уровня активных форм кислорода, укорочению теломер и нарушению метаболизма соматических и стволовых клеток) и эндогенное микроокружение.

В частности, показана тесная связь между подавлением иммунной системы и нарушением функционирования яичников [8]. В то же время ежемесячное внутривенное введение костномозговых стволовых клеток (не менее 15 инфузий) от молодых мышей позволяло значительно продлевать фертильность стареющих самок, не подвергавшихся гонадотоксичному влиянию. Донорские клетки демонстрировали способность мигрировать в яичники и сохранялись там не менее 4 нед после инфузии [33].

Кроме того, некоторые авторы предполагают существование популяции овариально-специфических Т-лимфоцитов, которые попадают в яичники из периферического кровотока и стимулируют дифференцировку стволовых клеток яичников в новые ооциты [24].

Говоря о роли эндогенных факторов в поддержании фертильности, нельзя исключить, что изменение гормонального профиля (снижение уровня эстрадиола, повышение уровня гонадотропных гормонов) в менопаузе способствует прекращению нео-оогенеза. К сожалению, данные о влиянии гормонозаместительной терапии на стволовые клетки яичника у женщин в постменопаузе в настоящее время отсутствуют.

Стволовые клетки яичников и ВРТ

Стволовые клетки яичников представляют большой интерес в качестве возможного инструмента для восстановления репродуктивной функции у пациенток с овариальной дисфункцией различного генеза.

Среди многочисленных экспериментальных подходов к лечению женского бесплодия можно выделить две стратегии:

- получение зрелых аутологичных ооцитов путём нео-оогенеза *in vitro*;
- возобновление фолликулогенеза *in vivo* (например, трансплантация стволовых клеток после химиотерапии для восстановления функции яичника) [34].

В настоящее время получены первые положительные результаты по воспроизведению фолликулогенеза *ex vivo* у человека. Так, разработана двухэтапная методика, которая предполагает: 1) культивирование примордиальных фолликулов в полосках овариального кортекса до стадии преантральных; 2) доразривание изолированных фолликулов до стадии антральных, после чего из них могут быть получены ооцит-кумулюсные комплексы для проведения экстракорпорального оплодотворения [35].

В то же время выделение овариальных стволовых клеток и их сокультивирование с другими клетками яичника является альтернативным подходом к моделированию оогенеза и фолликулогенеза в условиях *in vitro*.

Достигнуты определённые успехи в получении линий овариальных стволовых клеток, прежде всего у лабораторных животных. К. Zou и соавт. удавалось длительно культивировать овариальные стволовые клетки неонатальных и взрослых мышей на питательном слое клеток STO (на момент публикации 15 и 6 мес соответственно) с сохранением их первоначальных свойств. Кроме того, клетки хорошо выживали после криоконсервации и разморозки [11]. По данным J. Raschiarotti и соавт. ведение клеточной линии мышинных овариальных стволовых клеток в течение года не влияет на их теломеразную активность, кариотип и экспрессию специфических маркеров [16].

Отдельный вопрос связан с созданием оптимальных условий для дифференцировки стволовых клеток яичника *in vitro*. Овариальные стволовые клетки, по морфологическим и транскрипционным параметрам соответствующие VSEL, удавалось выделить из поверхностного эпителия яичников пациенток в постменопаузе и при синдроме преждевременного истощения яичников. В ходе 20-дневного культивирования авторы наблюдали интенсивный рост клеток (максимальный диаметр — 95 мкм). Морфологические характеристики и транскрипционный профиль (наличие экспрессии *c-kit*, OCT-4A, OCT-4B, VASA и ZP; отсутствие маркеров мейоза) делают эти клетки похожими на незрелые ооциты *in vivo*. Важно отметить, что ооцитоподобные клетки в культуре развивались в непосредственном контакте с фибробластами, которые могут служить источником ростовых факторов (таких как фактор роста фибробластов) [13].

К сожалению, несмотря на обнадеживающие данные, даже в экспериментах на животных не освещенным пока остаётся вопрос о качестве эмбрионов и здоровье потомства, которое можно было бы получить при искусственном оплодотворении ооцитов, дифференцировавшихся из овариальных стволовых клеток [36].

Вместе с тем, по сравнению с дифференцировкой *in vitro*, введение стволовых клеток непосредственно в яичники могло бы привести к более физиологичному нео-оогенезу с образованием новой популяции гормонально-активных фолликулов [6]. В наиболее ранних исследованиях трансплантация взвеси овариальных стволовых клеток в яичники самок мышей, подвергшихся химической стерилизации, приводила к восстановлению репродуктивной функции и рождению здорового фертильного потомства [11]. Y. White и соавт. инъецировали взвесь стволовых клеток яичника, меченных геном зелёного флуоресцентного белка (GFP), в биоптаты овариального кортекса человека и трансплантировали иммунодефицитным мышам линии NON-SCID. Через 14 дней в ткани ксенотрансплантатов обнаруживали примордиальные фолликулы с центрально расположенными GFP-позитивными ооцитами [15].

Терапевтическое использование эмбриональных и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток сопряжено с возникновением злокачественных новооб-

разований. Поэтому важно отметить, что введение овариальных стволовых клеток иммунодефицитным мышам Balb/c nude не приводило к образованию тератом в течение 8-недельного периода наблюдения [11]. Аналогичный результат приводится в другой работе [15], где изолированные OSC вводили подкожно мышам линии NOD-SCID с фенотипом диабета и тяжёлого комбинированного иммунодефицита; авторы отмечают, что инъекция эмбриональных стволовых клеток в той же концентрации приводила к развитию тератом у 100% мышей в группе сравнения. Эти данные позволяют говорить о сравнительной безопасности применения овариальных стволовых клеток в клеточной терапии.

Важное направление развития ВРТ — совершенствование существующих протоколов экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). В частности, считается, что одной из причин бесплодия служит митохондриальная дисфункция ооцитов. В связи с этим в последние годы разрабатываются различные методы так называемой митохондриальной заместительной терапии; при этом источником митохондрий для аутологичного переноса в ооцит могут служить как дифференцированные (гранулёза или кумулюс) [37], так и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки [37] или соматические стволовые клетки (например, из жировой ткани [38]). В числе прочих для улучшения исходов ЭКО была предложена процедура AUGMENT (Autologous Germline Mitochondrial Energy Transfer). В работе E. Labarta и соавт. в ооциты, полученные от 93 пациенток со сниженным овариальным резервом и историей неудачных ЭКО, вводили митохондрии из Ddx4⁺ овариальных стволовых клеток в ходе модифицированной процедуры ICSI (IntraCytoplasmic Sperm Injection). Овариальные стволовые клетки предварительно выделяли из биоптата яичника, полученного при лапароскопии. Частота оплодотворения в экспериментальной группе не отличалась от контроля, однако выход бластоцист был достоверно снижен. Тем не менее доля зуплоидных эмбрионов и содержание митохондриальной ДНК (мтДНК) в трофобластической оболочке не различались между группами. На момент публикации с использованием описанной методики родились 17 здоровых детей. Полученные данные не позволяют говорить о каких-либо преимуществах процедуры AUGMENT по сравнению с конвенциональным методом ICSI [39].

Наконец, использование овариальных стволовых клеток, вероятно, позволит улучшить существующие методики восстановления фертильности у онкологических пациенток после терапии, ведущей к ятрогенной стерильности. Известно, что криоконсервация овариального кортекса с его последующей трансплантацией повышает риск рецидива заболевания (особенно при лейкозах, когда опухолевые клетки находятся в кровотоке). Получение же ооцитов с последующей криоконсервацией эмбрионов у таких пациенток сопряжены с гормональной стимуляцией, которая может ускорить рост гормонозависимых опухолей молочной железы и

эндометрия [40]. Тем не менее в литературе описано по крайней мере 185 случаев успешных родов после ауто-трансплантации овариальной ткани пациенткам, прошедшим противоопухолевую терапию. Американская ассоциация репродуктивной медицины в 2019 г. призвала более не считать этот метод лечения ятрогенного бесплодия экспериментальным [41].

Для криоконсервации овариальной ткани в настоящее время применяют протокол медленного замораживания и витрификацию; оба метода дают сопоставимые результаты по выживаемости фолликулов после разморозки ткани. В то же время в недавнем исследовании на мышах Р. Теггасиано и соавт. продемонстрировали более высокое содержание MVH⁺ герминативных стволовых клеток в ткани яичника, подвергшейся витрификации, по сравнению с медленным замораживанием. Эти результаты могут говорить о преимуществах метода витрификации с точки зрения восстановления фертильности пациенток после ауто-трансплантации; однако требуются дальнейшие исследования с использованием овариальной ткани человека [42].

Отдельно необходимо отметить, что согласно исследованию К. Срирамана и соавт., VSEL в отличие от OSC сохраняют жизнеспособность, пролиферируют и претерпевают дифференцировку под действием ФСГ в яичниках мышей после химиоабляции [43]. Таким образом, изучение стволовых клеток яичника открывает новые перспективы в области профилактики и лечения бесплодия у онкологических пациенток.

Заключение

Подводя итог имеющимся в литературе данным, можно сделать следующие выводы.

Определены две различные популяции стволовых клеток яичников млекопитающих, связанные друг с другом в своем развитии: плюрипотентные очень малые эмбриоподобные клетки размером 2—4 мкм (VSEL) и овариальные стволовые клетки размером 5—8 мкм (OSC). Обе эти популяции располагаются в поверхностном эпителии яичника. Эти популяции аналогичны таковым у тестикулярных стволовых клеток; одну из популяций можно считать dormantной, другую — активной.

Дормантные (молчащие) стволовые клетки располагаются в яичниках и яичках взрослых особей, они устойчивы к химиотерапии и имеют потенциал восстановления репродуктивной функции. ФСГ оказывает прямое действие на стволовые клетки яичника, способствуя их пролиферации, нео-оогенезу и неофолликулогенезу.

Стволовые клетки поддерживают гомеостаз яичников на протяжении всей жизни, скомпрометированная функция нишеобразующих клеток для овариальных стволовых клеток с возрастом приводит к овариальному старению.

Терапевтический потенциал овариальных стволовых клеток заключается в отсрочивании наступления

менопаузы, лечении бесплодия, восстановлении функции яичников после лечения рака.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Johnson J., Canning J., Kaneko T., Pru J.K., Tilly J.L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 2004; 428(6979):145-50.
2. Yuan J., Zhang D., Wang L., Liu M., Mao J., Yin Y. et al. No evidence for neo-oogenesis may link to ovarian senescence in adult monkey. *Stem Cells*. 2013; 31(11): 2538-50.
3. Bristol-Gould S.K., Kreeger P.K., Selkirk C.G., Kilen S.M., Mayo K.E., Shea L.D. et al. Fate of the initial follicle pool: empirical and mathematical evidence supporting its sufficiency for adult fertility. *Dev. Biol.* 2006; 298(1):149-54.
4. Byskov A.G., Hoyer P.E., Yding Andersen C., Kristensen S.G., Jespersen A., Møllgård K. No evidence for the presence of oogonia in the human ovary after their final clearance during the first two years of life. *Hum. Reprod.* 2011; 26(8):2129-39.
5. Lei L., Spradling A.C. Female mice lack adult germ-line stem cells but sustain oogenesis using stable primordial follicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013; 110(21): 8585-90.
6. Bhartiya D., Patel H. Ovarian stem cells — resolving controversies. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2018; 35: 393-8.
7. Horan C.J., Williams S.A. Oocyte stem cells: fact or fantasy? *Reproduction*. 2017; 154(1): R23-R35.
8. Ye H., Zheng T., Li W., Li X., Fu X., Huang Y. et al. Ovarian Stem Cell Nests in Reproduction and Ovarian Aging. *Cell Physiol. Biochem.* 2017; 43(5):1917-25.
9. Parte S.C., Smolenkov A., Batra S.K., Ratajczak M.Z., Kakar S.S. Ovarian Cancer Stem Cells: Unraveling a Germline Connection. *Stem Cells Dev.* 2017; 26(24):1781-803.
10. Bhartiya D., Sriman K., Parte S., Patel H. Ovarian stem cells: absence of evidence is not evidence of absence. *J. Ovarian Res.* 2013; 6(1):65.
11. Zou K., Yuan Z., Yang Z., Luo H., Sun K., Zhou L. et al. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat. Cell Biol.* 2009; 11(5):631-6.
12. Patel H., Bhartiya D., Parte S., Gunjal P., Yedurkar S., Bhatt M. Follicle stimulating hormone modulates ovarian stem cells through alternatively spliced receptor variant FSH-R3. *J. Ovarian Res.* 2013; 6: 52.
13. Virant-Klun I., Rozman P., Cvjetanin B., Vrtacnik-Bokal E., Novakovic S., Rüllicke T. et al. Parthenogenetic embryo-like structures in the human ovarian surface epithelium cell culture in postmenopausal women with no naturally present follicles and oocytes. *Stem Cells Dev.* 2009; 18(1):137-49.
14. Parte S., Bhartiya D., Telang J., Daithankar V., Salvi V., Zaveri K. et al. Detection, characterization, and spontaneous differentiation in vitro of very small embryonic-like putative stem cells in adult mammalian ovary. *Stem Cells Dev.* 2011; 20(8):1451-64.
15. White Y.A., Woods D.C., Takai Y., Ishihara O., Seki H., Tilly J.L. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nat. Med.* 2012; 18(3): 413-21.
16. Pacchiarotti J., Maki C., Ramos T., Marh J., Howerton K., Wong J. et al. Differentiation potential of germ line stem cells derived from the postnatal mouse ovary. *Differentiation*. 2010; 79(3):159-70.
17. Bukovsky A., Svetlikova M., Caudle M.R. Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2005; 3:17.
18. Bukovsky A. Novel methods of treating ovarian infertility in older and POF women, testicular infertility, and other human functional diseases. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2015; 13:10.
19. Bukovsky A., Caudle M.R. Immunoregulation of follicular renewal, selection, POF, and menopause in vivo, vs. neo-oogenesis in vitro, POF and ovarian infertility treatment, and a clinical trial. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2012; 10: 97.
20. Kerr J.B., Brogan L., Myers M., Hutt K.J., Mladenovska T., Ricardo S. et al. The primordial follicle reserve is not renewed after chemical or γ -irradiation mediated depletion. *Reproduction*. 2012; 143(4):469-76.
21. Zou K., Hou L., Sun K., Xie W., Wu J. Improved efficiency of female germline stem cell purification using fragilis-based magnetic bead sorting. *Stem Cells Dev.* 2011; 20(12): 2197-204.

22. Liu J., Shang D., Xiao Y., Zhong P., Cheng H., Zhou R. Isolation and characterization of string-forming female germline stem cells from ovaries of neonatal mice. *J. Biol. Chem.* 2017; 292(39):16003-13.
23. Bukovsky A., Virant-Klun I. Adult stem cells in the human ovary. In: Simon C., Pellicer A., eds. *Stem cells in reproductive medicine: basic science & therapeutic potential*. London: Informa Healthcare; 2006: 53-70.
24. Bukovsky A., Copas P., Virant-Klun I. Potential new strategies for the treatment of ovarian infertility and degenerative diseases with autologous ovarian stem cells. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2006; 6(4): 341-65.
25. Brinster R.L. Male germline stem cells: from mice to men. *Science.* 2007; 316(5823): 404-5.
26. Ryu B.Y., Orwig K.E., Oatley J.M., Avarbock M.R., Brinster R.L. Effects of aging and niche microenvironment on spermatogonial stem cell self-renewal. *Stem Cells.* 2006; 24(6):1505-11.
27. Anderson R., McLaughlin M., Woods D., Tilly J., Telfer E. Evaluation of oogonial stem cells and neo-oogenesis in ovaries of girls and women with Turner Syndrome. *Human Reprod.* 2013; 28(suppl.1): i52-i55.
28. Niikura Y., Niikura T., Tilly J.L. Aged mouse ovaries possess rare premeiotic germ cells that can generate oocytes following transplantation into a young host environment. *Aging (Albany NY).* 2009; 1(12): 971-8.
29. Fazeli Z., Abedindo A., Omrani M.D., Ghaderian S.M.H. Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Therapy for Recovery of Fertility: a Systematic Review. *Stem Cell Rev.* 2017.
30. Song D., Zhong Y., Qian C., Zou Q., Ou J., Shi Y. et al. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Therapy in Cyclophosphamide-Induced Premature Ovarian Failure Rat Model. *Biomed. Res. Int.* 2016; 2016: 2517514. Doi: 10.1155/2016/2517514
31. Lai D., Wang F., Dong Z., Zhang Q. Skin-derived mesenchymal stem cells help restore function to ovaries in a premature ovarian failure mouse model. *PLoS One.* 2014; 9(5): e98749.
32. Edessy M., Hosni H.N., Wafa Y., Bakry S., Shady Y., Kamel M. Stem cells transplantation in premature ovarian failure. *World J. Med. Sci.* 2014; 10:12-6.
33. Selesniemi K., Lee H.J., Niikura T., Tilly J.L. Young adult donor bone marrow infusions into female mice postpone age-related reproductive failure and improve offspring survival. *Aging (Albany NY).* 2008; 1(1): 49-57.
34. Vanni V.S., Viganò P., Papaleo E., Mangili G., Candiani M., Giorgione V. Advances in improving fertility in women through stem cell-based clinical platforms. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2017; 17(5): 585-93.
35. McLaughlin M., Albertini D.F., Wallace W.H.B., Anderson R.A., Telfer E.E. Metaphase II oocytes from human unilaminar follicles grown in a multi-step culture system. *Mol. Hum. Reprod.* 2018; 24(3):135-42.
36. Oatley J., Hunt P.A. Of mice and (wo)men: purified oogonial stem cells from mouse and human ovaries. *Biol. Reprod.* 2012; 86(6): 196.
37. Ou X.H., Sun Q.Y. Mitochondrial replacement techniques or therapies (MRTs) to improve embryo development and to prevent mitochondrial disease transmission. *J. Genet. Genomics.* 2017; 44(8): 371-4.
38. Wang Z.B., Hao J.X., Meng T.G., Guo L., Dong M.Z., Fan L.H. et al. Transfer of autologous mitochondria from adipose tissue-derived stem cells rescues oocyte quality and infertility in aged mice. *Aging (Albany NY).* 2017; 9(12): 2480-8.
39. Labarta E., de Los Santos M.J., Herraiz S., Escribá M.J., Marzal A., Buigues A. et al. Autologous mitochondrial transfer as a complementary technique to intracytoplasmic sperm injection to improve embryo quality in patients undergoing in vitro fertilization — a randomized pilot study. *Fertil. Steril.* 2019; 111(1): 86-96.
40. Silvestris E., D'Oronzo S., Cafforio P., D'Amato G., Loverro G. Perspective in infertility: the ovarian stem cells. *J. Ovarian Res.* 2015; 8: 55.
41. Silber S., Fan Y.S., Goldsmith S. World wide update: results with cryopreserved ovarian tissue transplant. *Fertil. Steril.* 2019; 112(3): e85.
42. Terraciano P.B., Garcez T.A., Berger M., Durli I., Kuhl C.P., Batista V.O. et al. Ovarian tissue vitrification is more efficient than slow freezing to preserve ovarian stem cells in CF-1 mice. *JBRA Assist Reprod.* 2020; 24(1):13-9.
43. Sriraman K., Bhartiya D., Anand S., Bhutda S. Mouse Ovarian Very Small Embryonic-Like Stem Cells Resist Chemotherapy and Retain Ability to Initiate Oocyte-Specific Differentiation. *Reprod. Sci.* 2015; 22(7): 884-903.

Поступила 13.02.2020

Принята к печати 03.03.2020

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Проскурнина Елена Васильевна, д.м.н. [Elena V. Proskurnina, MD, PhD]; адрес: 115522, г. Москва, Россия; [address: 115522, Moscow, Russian Federation]; e-mail: proskurnina@gmail.com, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0102-5491>

Шестакова Майя Андреевна [Mayya A. Shestakova]; e-mail: chrysolite7@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6154-9481>

Фёдорова Мария Витальевна [Mariya V. Fedorova]; e-mail: theklazontag@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7859-6698>

Соснова Елена Алексеевна, д.м.н., профессор [Elena A. Sosnova, MD, PhD, Professor]; e-mail: sosnova-elena@inbox.ru, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1732-6870>