

На правах рукописи

УДК 591.3:577.113

КОШЕЛЕВА НАСТАСЬЯ ВЛАДИМИРОВНА

**АНАЛИЗ НАРУШЕНИЙ РАННЕГО ЭМБРИОНАЛЬНОГО
РАЗВИТИЯ И ИХ КОРРЕКЦИЯ С ПОМОЩЬЮ
АНТИСМЫСЛОВЫХ ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДОВ**

03.00.30 – биология развития, эмбриология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

МОСКВА
-2007-

Работа выполнена на кафедре эмбриологии Биологического факультета
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова
(заведующий кафедрой – профессор В.А. Голиченков)

Научный руководитель: кандидат биологических наук, доцент
Мария Львовна Семенова

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Татьяна Клеониковна Дубовая

кандидат биологических наук
Дмитрий Александрович Исаев

Ведущая организация: Институт Биологии Развития РАН

Защита диссертации состоится **17 апреля 2007 года в 15 часов 30 минут**
на заседании Диссертационного Совета Д.501.001.52
при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова
по адресу: 119992, Москва, Ленинские Горы, МГУ, д.1, корпус 12,
Биологический факультет, аудитория М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического
факультета МГУ им М.В. Ломоносова

Автореферат разослан " **16** " марта 2007 года

Ученый секретарь
Диссертационного Совета,
кандидат биологических наук

Е.Н. Калистратова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Закономерности раннего эмбрионального развития активно изучают, начиная с 60-ых годов прошлого столетия, когда была разработана методика культивирования ранних эмбрионов *in vitro* [Biggers *et al.*, 1965]. Высокая исследовательская активность в изучении доимплантационного периода развития млекопитающих связана не только с изучением фундаментальных закономерностей и познавательным интересом, но имеет большое медико-биологическое и социальное значение. Практические задачи этого направления исследований связаны с усовершенствованием методов искусственного оплодотворения, сохранением биоразнообразия и генофонда, племенным разведением сельскохозяйственных животных [Pope, 2000; Solti *et al.*, 2000; Allen, 2005]. Проблема лечения бесплодия человека в настоящее время приобретает не только медицинское, социально-демографическое, но и экономическое значение. Результативность лечения бесплодия методами экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) во многом зависит от способности полученных ооцитов к оплодотворению *in vitro* и последующему развитию. Одним из отягчающих факторов при лечении бесплодия является возраст пациенток - после 30 лет резко снижается жизнеспособность эмбрионов и частота рождения детей после программы ЭКО [Templeton *et al.*, 1996; Боярский, Василевская, 1998].

Жизнеспособность ранних эмбрионов обусловлена многими факторами, в том числе, зрелостью и генетическим статусом гамет, активацией эмбрионального генома, стадиоспецифичной экспрессией генов, межклеточными взаимодействиями. У всех млекопитающих некоторая часть эмбрионов погибает на доимплантационных стадиях развития. При культивировании эмбрионов *in vitro* нарушения могут быть вызваны как генетическим статусом развивающегося зародыша, так и влиянием ряда внешних факторов (например, нехваткой факторов роста, увеличением количества токсичных метаболитов, окислительным стрессом) [O'Neill, 1998; Agarwal *et al.*, 2005]. Эмбрионы млекопитающих до компактизации обладают наибольшей чувствительностью к изменениям микроокружения и внешним воздействиям [Ribas *et al.*, 2006; Zander *et al.*, 2006]. Культивирование *in vitro* замедляет темпы развития [Fischer, 1987; Van der Auwera, D'Hooghe, 2001], изменяет уровень экспрессии ряда регуляторных факторов [Lee *et al.*, 2001;

Zheng et al., 2005; Chandrakanthan et al., 2006], нарушает экспрессию импринтированных генов [*Gardner, Lane, 2005; Исаев и др., 2005*], снижает количество жизнеспособных и увеличивает число гибнущих и фрагментированных клеток в эмбрионах [*Hardy, 1999*]. Но в условиях культивирования *in vitro* трудно разграничить аномалии, вызванные условиями культивирования, и нарушения, связанные с генетикой объекта. Поэтому представляется актуальным исследование нарушений раннего развития, обусловленных генетикой объекта.

Качество развивающихся эмбрионов оценивают по ряду морфологических признаков, учитывающих степень фрагментации, форму и размеры бластомеров. Многие исследователи связывают нарушения раннего развития с апоптотической гибелью клеток в эмбрионах [*Exley et al., 1999; Van Blerkom et al., 2001; Jurisicova et al., 2003*], поэтому перспективным представляется изучение возможности коррекции спонтанных и индуцированных нарушений раннего развития путем воздействия на проапоптотические факторы. В последнее время для специфического блокирования экспрессии генов все чаще применяют антисмысловые олигодезоксинуклеотиды (АсОДН), представляющие собой короткие дезоксирибонуклеотидные последовательности. АсОДН присоединяются к специфической мРНК, препятствуют трансляции и, следовательно, выработке белка (рис. 1). Эта технология дает возможность временно и направленно воздействовать практически на любой процесс в клетке с высочайшей специфичностью, не затрагивая целостность генома. Создание препаратов на основе антисмысловых олигонуклеотидов - одно из новейших направлений лекарственных разработок для лечения ряда заболеваний, например в онкологии [*Mullen et al., 2004*], для лечения гипертонической болезни [*Phillips et al., 2005*], аллергических расстройств [*Ball et al., 2004*], некоторых вирусных и бактериальных инфекций [*Geller, 2005*].

В связи с этим, изучение генетически обусловленных и индуцированных нарушений раннего развития эмбрионов млекопитающих и возможность их коррекции посредством обратимых воздействий является актуальным вопросом, как биологии развития, так и практической репродуктивной медицины.

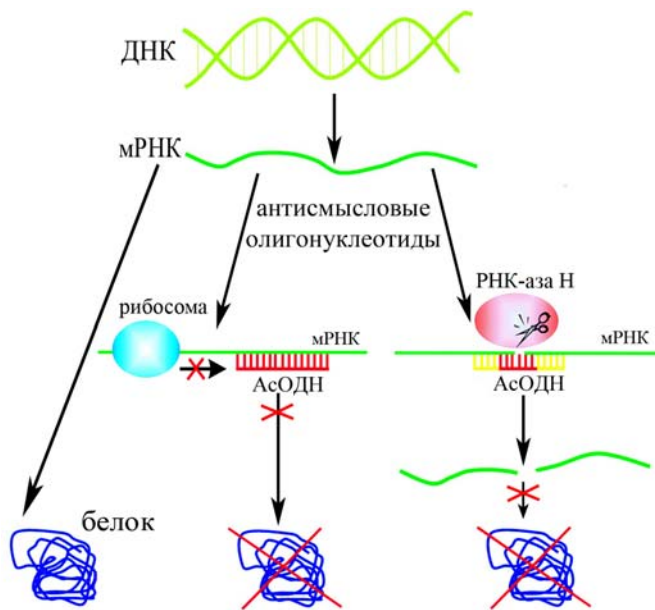


Рис 1. Принцип действия антисмысловых олигодезоксинуклеотидов (АсОДН)

Существует два основных механизма действия АсОДН. Первый, приводящий к деградации мРНК, связан с активацией РНК-азы Н, расщепляющей РНК в месте образования гетеродуплекса ДНК-РНК (РНК-аза Н присутствует в цитоплазме и в ядре клеток и в норме принимает участие в репликации ДНК). Второй механизм действия АсОДН останавливает трансляцию белка с молекулы мРНК за счет создания стерического препятствия для посадки и скольжения рибосомы.

Цели и задачи работы. Целью явилось изучение генетически обусловленных и индуцированных нарушений раннего развития, исследование возможности их коррекции в культуре *in vitro*. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать генетически обусловленные нарушения раннего развития у мышей линий SAM.
2. Изучить нарушения раннего эмбрионального развития при проапоптотическом воздействии.
3. Изучить особенности раннего эмбрионального развития в условиях введения ксеногенных низкодифференцированных клеток в эмбрион.
4. Исследовать возможные токсические эффекты олигонуклеотидных последовательностей на эмбриональное и постнатальное развитие.
5. Изучить влияние немодифицированных АсОДН на дифференцировку клеток.
6. Исследовать влияние немодифицированных АсОДН к мРНК гена *Harakiri* (*Hrk*) на раннее эмбриональное развитие.

Научная новизна работы. Впервые охарактеризованы спектр и динамика генетически обусловленных нарушений раннего развития у мышей линии SAMP1, склонной к ускоренному старению. Впервые показано влияние проапоптотического агента блеомицина на раннее эмбриональное развитие в случае высокого уровня нарушений доимплантационного развития (SAMP1) и при нормальных репродуктивных показателях (ICR, C57Bl6/DBA). При введении в полость бластоцисты мыши ксеногенных низкодифферен-

цированных клеток (нейральных и стромальных клеток костного мозга человека) показано их включение в состав как трофэктодермы, так и внутренней клеточной массы. Обнаружено отсутствие отсроченного действия немодифицированных олигонуклеотидных последовательностей на развитие, поведение и репродуктивные показатели мыши. Показано воздействие немодифицированных АсОДН на дифференцировку клеток на модели адипогенной дифференцировки стромальных клеток жировой ткани в культуре *in vitro*. Выявлена возможность стабилизации адипогенной дифференцировки в культуре стромальных клеток жировой ткани с использованием АсОДН. Впервые установлено, что в случае индуцированных нарушений раннего развития, АсОДН к мРНК гена *Hrk* улучшают качество выживших эмбрионов.

Практическая значимость работы. Исследованные в работе генетически обусловленные (у линии мышей SAMP1) и индуцированные аномалии раннего развития могут быть использованы как модель нарушений развития эмбрионов человека в области вспомогательных репродуктивных технологий. Подобраны условия химеризации ранних эмбрионов, обеспечивающие эффективное включение нейральных стволовых и прогениторных клеток человека в состав внутренней клеточной массы бластоцист. Выявленное стабилизирующее влияние специфичных немодифицированных АсОДН на уровень адипогенной дифференцировки в культуре *in vitro* (снижение и поддержание на низком уровне количества жировых клеток) расширяет возможность использования этих соединений в клеточной терапии. Проведенное исследование эмбрионального и постнатального развития мыши после кратковременной экспозиции с немодифицированными олигонуклеотидами в доимплантационный период показало отсутствие немедленных и отсроченных токсических и тератогенных эффектов. Продемонстрировано, что культивирование доимплантационных эмбрионов в среде с олигонуклеотидами в дальнейшем не влияет на поведенческие и репродуктивные показатели взрослых животных. Также было показано положительное влияние АсОДН, специфичных к мРНК гена *Hrk* мыши, на индуцированные проапоптотическим воздействием *in vitro* нарушения раннего развития. На основании полученных результатов разработан способ управления качеством ооцитов и эмбрионов и разработаны

композиции для добавления в среду культивирования ооцитов и эмбрионов (патенты РФ № 2281777 и № 2281778 от 20 августа 2006).

Апробация работы. Основные положения диссертации были доложены на научном семинаре кафедры эмбриологии Биологического ф-та МГУ им. М.В. Ломоносова и на следующих конференциях: V Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2002); III всероссийской конференции с международным участием "Механизмы функционирования висцеральных систем" (Санкт-Петербург, 2003); Всероссийской научной конференции "Гистологическая наука в России в начале XXI века: итоги, задачи, перспективы" (Москва, 2003); XI международной конференции и дискуссионном научном клубе "Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии IT+ME 2003" (Гурзуф, Украина, 2003); VIII Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, Россия, 2004); Всероссийской конференции молодых исследователей "Физиология и медицина" (Санкт-Петербург, 2005); конференции "Биология стволовых клеток: фундаментальные аспекты" (Москва, 2005); "BioScience 2005: from genes to systems" (Glasgow, UK, 2005); 22th Annual Meeting of the ESHRE (Prague, Czech Republic, 2006).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 17 печатных работ, из них два патента РФ на изобретение.

Благодарности. Автор выражает благодарность своему научному руководителю доценту М.Л.Семенову и всем сотрудникам кафедры эмбриологии Биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова. Автор глубоко признателен И.Н.Сабуриной, Е.Е.Захаровой, С.Ю.Залетову, В.В.Заевой, Р.А.Шафеи, И.И.Полетаевой и Е.Б.Яровой.

Объем и структура работы. Материалы диссертации изложены на страницах машинописного текста и сгруппированы в следующие разделы: введение, обзор литературы, описание методов исследования, изложение экспериментальных результатов, обсуждение, заключение, выводы, список литературы и приложение. Работа содержит 32 иллюстрации (микрофотографии, графики и рисунки), 31 таблицу. Список цитированной литературы включает источники.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объекты исследования. Эксперименты были выполнены на мышах инбредных линий SAM (*senescence-accelerated mouse*): SAMP1 (*senescence-accelerated mouse prone*) и SAMR1 (*senescence-accelerated mouse resistant*), любезно предоставленных проф. Т.Такедой и проф. М.Хосокавой (Университет Киото, Япония). С 1995 года эти линии мышей разводят в виварии кафедры эмбриологии Биологического ф-та МГУ. В работе также использовали мышей линий CBA, ICR и мышей-гибридов C57Bl6/DBA, BALB/DBA. Объектом служили ранние эмбрионы мыши (от двухклеточной стадии до бластоцисты), плоды на стадиях 17.5 и 18.5сут. развития, мышата в возрасте 2-3 месяцев (табл. 1). В серии опытов на культурах клеток использовали культуры стромальных клеток жировой ткани (СКЖТ) человека. Материал был получен в хирургических отделениях городских больниц при плановых операциях с добровольного согласия пациентов.

Таблица 1. Общая структура исследования (эксперименты на животных).

Серии экспериментов		кол-во животных	кол-во эмбрионов	линия животных
Изучение нарушений раннего развития <i>in vivo</i>		109	853	SAMP1
		25	131	SAMR1
		19	144	ICR
		49	356	C57Bl6/DBA
		51	358	BALB/DBA
Исследование спонтанных и индуцированных нарушений раннего развития <i>in vitro</i> ; влияние АсОДН к мРНК гена Hrk мыши		82	280	SAMP1
		21	90	ICR
		60	317	C57Bl6/DBA
Изучение раннего развития после введения ксеногенных клеток		53	339	CBA
Исследование влияния АсОДН к мРНК генов HRK, FASL и BAX человека	на раннее эмбриональное развитие	131	623	C57Bl6/DBA
	на постимплантационное развитие		110 плодов	C57Bl6/DBA
	на поведение и репродукцию	70		C57Bl6/DBA
		94		F1 C57Bl6/DBA

Олигонуклеотидные последовательности. Поиск нуклеотидных последовательностей мРНК генов HRK FASL, BAX, PPAR γ человека, а также гена Hrk мыши, осуществляли с помощью интегрированной базы данных NCBI. Вторичные структуры мРНК генов HRK (GeneID: 8739), FASL (GeneID: 356)

BAX (GeneID: 581), PPAR γ (GeneID: 5468) человека и гена Hrk мыши (GeneID: 12123), а также АсОДН к данным мРНК были подобраны с использованием программы «Mfold» для 37⁰С [Zuker, 2003]. Специфичность подобранных АсОДН была проверена при помощи программы BLAST 2.2 (*Basic Local Alignment Search Tool*). В работе применяли немодифицированные АсОДН, синтез которых был осуществлен по нашему заказу ЗАО «Синтол», олигонуклеотиды были очищены с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, обессолены и лиофилизированы.

Изучение спонтанных нарушений раннего развития. Для анализа спектра и динамики нарушений раннего развития у мышей линии SAMP1, склонных к ускоренному старению, анализировали состояние доимплантационных эмбрионов на сроках 1.5, 2.5 и 3.5сут. На 18.5сут. развития у самок оценивали доимплантационную смертность по разности между количеством желтых тел и числом мест имплантации. Эмбрионы оценивали по морфологическому критерию и с использованием флуоресцентных красителей: бис-бензимида (3,2нмоль/мл, 30 минут, 37⁰С) - для маркировки ядер, красителей кита LIVE/DEAD (30 минут, 25⁰С) - для выявления погибших клеток. По морфологическому критерию эмбрионы разделяли на нормальные и имеющие аномалии развития. Группу с аномалиями развития подразделяли на подгруппы в зависимости от формы аномалии: фрагментация, дегенерация, остановка развития в период дробления, отставание в развитии, нарушения компактизации, нарушения кавитации.

Оценка влияния ксеногенных клеток на раннее развитие. Влияние ксеногенных низкодифференцированных клеток на раннее развитие и оптимальные условия включения клеток в состав бластоцисты оценивали на модели получения инъекционных химер по методу, предложенному Гарднером и Бринстером [Gardner, Johnson, 1975; Brinster, 1979]. Суспензии нейральных стволовых и прогениторных клеток (НСК) и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (МСК) человека, меченые витальным флуоресцентным красителем бис-бензимидам, были любезно предоставлены лабораторией новых клеточных технологий Института реабилитации и клеточных технологий им. А.Я.Фриденштейна. Использовали следующие суспензии клеток: свежие и после 24 часовой экспозиции при +4⁰С. Клетки суспендировали в растворе Хэнкса или в 10% растворе инфукола ГЭК, хорошо

удерживающем воду и способствующем сохранности суспензий. Состояние бластоцист и распределение введенных клеток оценивали через сутки после инъекции.

Культивирование эмбрионов мыши *in vitro*. Доимплантационные эмбрионы мыши культивировали со стадии ранней морулы (6-8 клеток; - 2.5сут.) в течение 48 часов в среде Т6 с БСА. Для оценки спонтанных нарушений раннего развития эмбрионы мышей различных линий культивировали в среде без добавок. Химическую индукцию нарушений раннего развития осуществляли добавлением в среду антибиотика блеомицина (1мкг/мл). Для изучения влияния на частоту спонтанных и индуцированных нарушений раннего развития, в культуральную среду добавляли АсОДН, специфичные к мРНК проапоптотического гена *Hrk* мыши. Воздействие АсОДН, специфичных к мРНК генов *HRK*, *FASL* и *BAX* человека, оценивали на эмбрионах мышей C57Bl6/CBA, подсчитывая долю эмбрионов с нормальной морфологией и долю бластоцист с хэтчингом от общего числа бластоцист. Все олигонуклеотидные последовательности добавляли в среду в концентрации 0,1нмоль/мл, подобранной ранее в нашей лаборатории [Захарова, 2006].

Трансплантация эмбрионов мыши и анализ постимплантационных стадий развития. Эмбрионы мышей C57Bl6/DBA на стадии бластоцисты после 48 часов культивирования с добавлением АсОДН, специфичных к мРНК генов человека *HRK*, *FASL* и *BAX* (опытные группы) или без добавок (контрольные группы) трансплантировали псевдобеременным самкам белых беспородных мышей в количестве не более 7 эмбрионов в 1 рог матки. На 17.5 и 18.5сут. самок умерщвляли дислокацией шейных позвонков. По разности между количеством желтых тел и числом мест имплантации оценивали индекс имплантации эмбрионов, отмечали количество нормальных плодов и исследовали их состояние. У плодов выявляли аномалии внутренних органов и оценивали нарушения формирования скелета по стандартной методике [Neubert *et al.*, 1977]. Часть оперированных самок были оставлены до родов, в дальнейшем у полученных мышат оценивали поведенческие и репродуктивные показатели.

Оценка поведенческих показателей. Поведение животных исследовали параллельно в трех группах: (1) опытная группа - животные, полученные после трансплантации эмбрионов, которые культивировали в среде с добавлением АсОДН, специфичных к мРНК генов *HRK* и *FASL* человека, (2) контрольная

группа - животные, полученные после трансплантации эмбрионов, которые культивировали в среде без добавок, (3) интактный контроль. Тестирование проводили в течение 6 дней на базе лаборатории физиологии и генетики поведения кафедры высшей нервной деятельности Биологического факультета МГУ им М.В.Ломоносова под руководством д.б.н. И.И.Полетаевой. Общий уровень активности, исследовательского поведения, поведения страха-тревоги и склонность к депрессии оценивали в четырех тестах: "открытое поле", "скользящая воронка", "стартл-реакция" и в закрытом крестообразном лабиринте.

Эксперименты в культуре *in vitro* на клетках человека были выполнены на базе лаборатории новых клеточных технологий Института реабилитации и клеточных технологий им. А.Я.Фриденштейна под руководством к.б.н. И.Н.Сабуриной. В культурах СКЖТ на пятом пассаже визуально по количеству клеток с липидными гранулами в течение пяти дней оценивали спонтанную адипогенную дифференцировку. Параллельно ставили следующие серии культивирования: (1) культивирование в ростовой среде без добавок, (2) культивирование в ростовой среде с добавлением гепарин-зависимого фактора роста bFGF (2нг/мл), (3) культивирование в ростовой среде с добавлением bFGF (2нг/мл) и немодифицированных АсОДН, специфичных к мРНК гена PPAR γ человека (1нмоль/мл).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 и SPSS 11.5. С использованием критериев Шапиро-Вилка и χ^2 Пирсона были проверены гипотезы о нормальности распределений исследуемых показателей. При сравнении параметров, имевших нормальное распределение, использовали t-тест для независимых выборок в предположении неравных дисперсий или однофакторный дисперсионный анализ с последующим применением метода множественных сравнений. При сравнении параметров, имевших ненормальное распределение, использовали критерий Манна-Уитни или критерий Крускала-Уоллиса. Для анализа таблиц сопряженности 2x2 применяли либо точный двусторонний критерий Фишера, либо критерий χ^2 с поправкой на непрерывность Йейтса. Для выявления временных изменений использовали непараметрический критерий Фридмана. С использованием бинарной логистической регрессионной модели вычисляли отношение шансов наличия

определенного признака в двух сравниваемых группах. Критический уровень значимости для всех статистических критериев принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спонтанные нарушения раннего развития у мышей линий SAM. У мышей линий SAM с укороченной средней продолжительностью жизни отмечено снижение плодовитости [Miyamoto et al. 1995; Semenova et al., 2001]. Мы исследовали состояние доимплантационных эмбрионов мышей линии SAMP1 на разных сроках развития (1.5, 2.5 и 3.5 сут.), охарактеризовав спектр генетически обусловленных нарушений раннего развития. Были обнаружены следующие формы аномалий: фрагментация и дегенерация (в течение всего доимплантационного периода), остановки развития в период дробления и нарушения компактизации (с 2.5 сут.), нарушения кавитации (с 3.5 сут.), а также отставания в развитии (рис. 2).

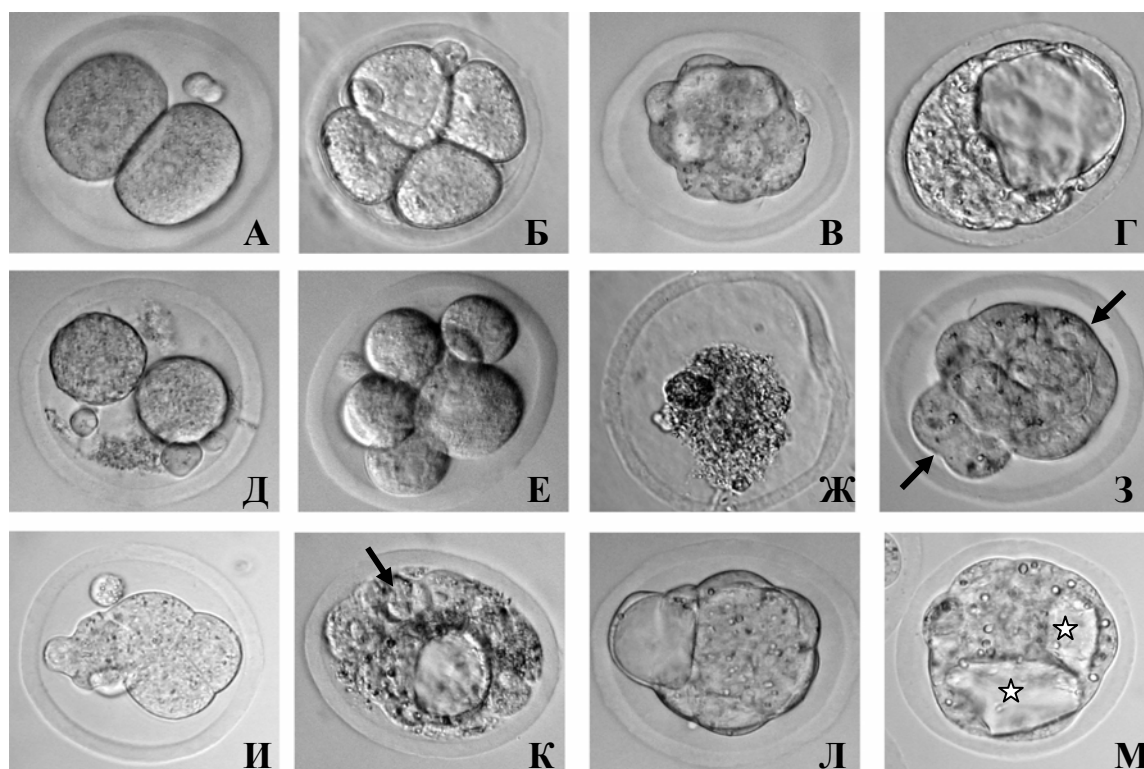


Рис. 2. Морфология эмбрионов мышей линии SAMP1 in vivo на стадиях 1.5 (А, Б, Д), 2.5 (В, З, И) и 3.5 (Г, Е, Ж, К-М) суток развития
Нормальные эмбрионы: 2-ух (А); 4-ех клеточные (Б); морула (В); бластоциста (Г).
Нарушения раннего развития: остановки развития в период дробления (Д, Е) с фрагментацией бластомеров (Д); дегенерация (Ж); аномалии компактизации – два центра компактизации (З, обозначены стрелками); компактизация из малого числа клеток (И); бластоциста с клетками, не участвовавшими в процессе компактизации (отмечены стрелкой, К); аномалии кавитации - бластоциста с малым числом клеток в трофэктодерме (Л); бластоциста с двумя полостями (обозначены звездочками, М).

Стадии 1.5 и 2.5сут. не различались по числу полученных от одного животного эмбрионов, а также по числу нормальных и аномальных эмбрионов (рис. 3). На 3.5сут., по сравнению с 1.5сут., нарушения были зарегистрированы в большем числе случаев ($p < 0,000$). В течение всего доимплантационного периода развития у мышей линии SAMP1 примерно треть эмбрионов фрагментировалась и дегенерировала (рис. 3). На 3.5сут. по сравнению с 2.5сут. было обнаружено увеличение числа эмбрионов с остановками развития в период дробления ($p < 0,000$). Данная особенность, вероятно, связана с накоплением ошибок при прохождении клеточных циклов, которые в бластомерах идут быстрее, чем в соматических клетках [Heyer *et al.*, 2000].

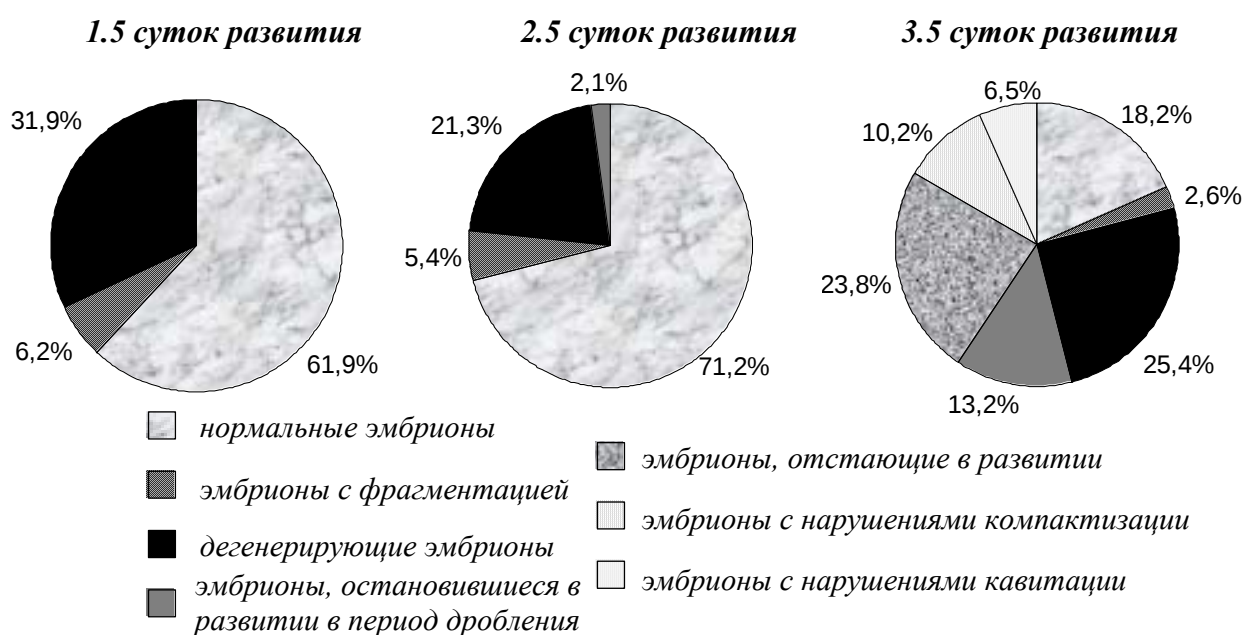


Рис. 3. Распределение эмбрионов у самок мышей линии SAMP1 по морфологическим группам в доимплантационный период развития

В процессе компактизации у SAMP1 были отмечены следующие нарушения: компактизация не из 8-16 (норма), а из 4-5 клеток (рис. 2, И); появление нескольких центров компактизации (рис. 2, 3); компактизация, в которой не участвовала часть бластомеров (рис. 2, К). Аномалии в процессе кавитации были связаны с отсутствием внутренней клеточной массы (ВКМ), небольшим (1-3) числом клеток в трофэктодерме (рис. 2, Л), формированием нескольких полостей (рис. 2, М), образованием бластоцист из небольшого числа клеток с исключением и оттеснением на периферию отдельных бластомеров (рис. 2, К).

Цветная вставка 1

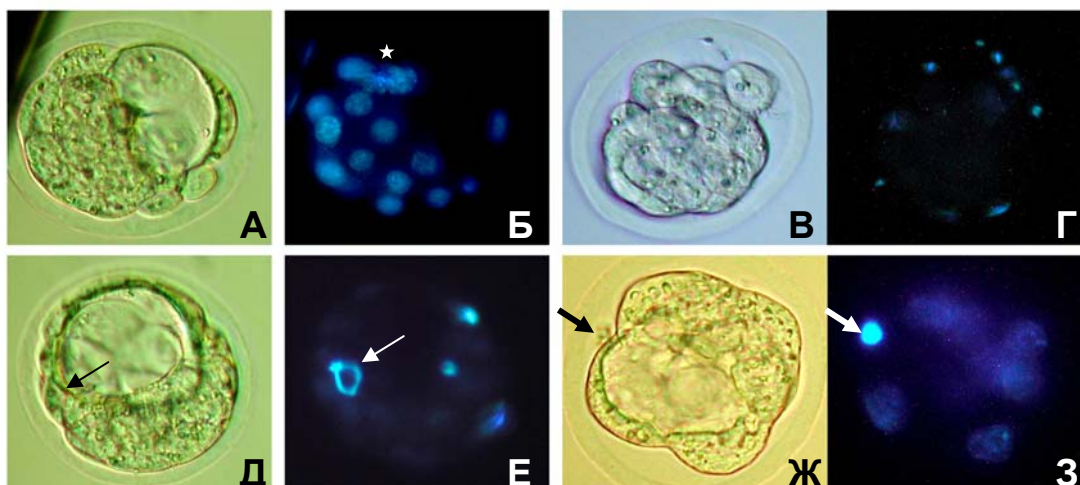


Рис. 4. Морфология ядер ранних эмбрионов мышей линии SAMP1 после окрашивания бис-бензими́дом (красителем Хехст 33258)

Интерфазные и метафазное (звездочка) ядра в бластоцисте (А, Б); сперматозоиды на поверхности блестящей оболочки морулы (В, Г); ядра с пристеночной конденсацией хроматина в бластомере (стрелка) муральной трофэктодермы бластоцисты (Д, Е); дегенерирующее редуцированное тельце с пикнотическим ядром (стрелка) (Ж, З)

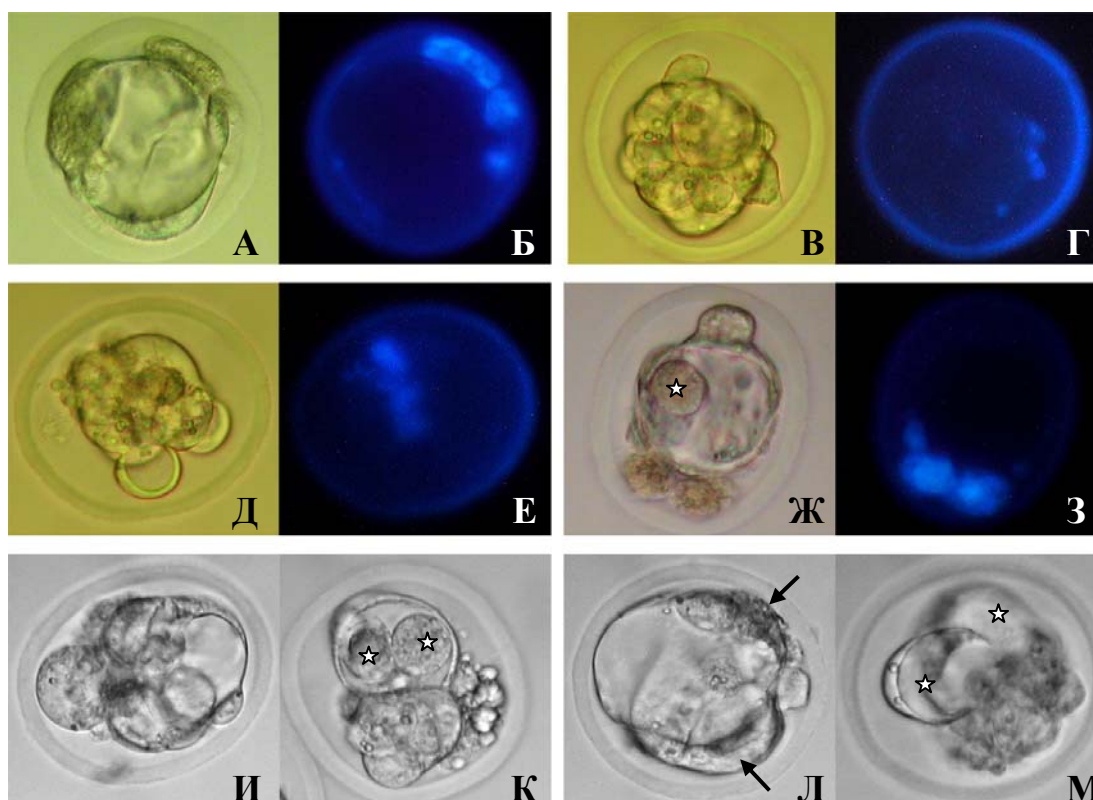
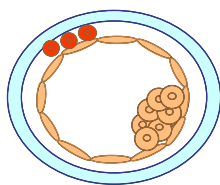


Рис. 6. Нарушения компактизации и кавитации после культивирования с блеомицином эмбрионов мышей линий ICR (А-З) и SAMP1 (И-М)

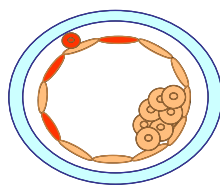
Бластоцисты с кавитацией из малого числа клеток (А, В, Ж, И, К), красителем кита LIVE/DEAD окрашены отдельные погибшие клетки, не участвовавшие в компактизации (Б, Г, З); звездочками отмечены живые клетки, не участвующие в развитии и находящиеся в полости эмбриона (Ж, К); бластоциста с двумя ВКМ (Л, стрелки); бластоциста с двумя полостями (звездочки, М); эмбрион с нарушением компактизации и кавитацией единичных бластомеров (Д, Е)

Цветная вставка 2



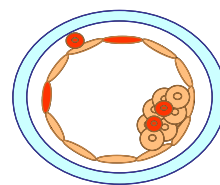
1) вариант:

клетки не вошли
в состав
бластоцисты



2) вариант:

клетки в трофэктодерме
бластоцисты



3) вариант:

клетки в трофэктодерме и ВКМ
бластоцисты

Рис. 8. Распределение клеток человека (красным) в бластоцистах мыши через 24 часа после инъекции; ВКМ – внутренняя клеточная масса

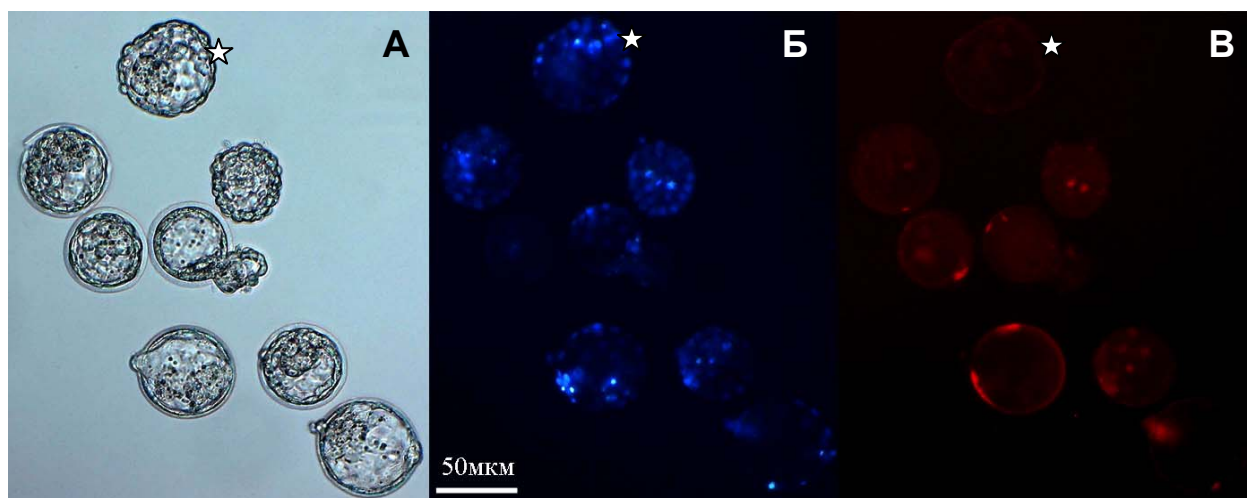


Рис. 9. Бластоцисты мыши через 24 часа после инъекции свежей суспензии МСК человека в растворе Хэнкса

Бластоцисты (А); инъекцированные клетки и их потомки окрашены витальным флуоресцентным красителем бис-бензими́дом - Хехст 33258 (Б); лишь некоторые инъекцированные клетки окрашены красителем кита LIVE/DEAD, то есть погибли (В); у бластоцисты, отмеченной звездочкой, инъекцированные клетки не окрашены красителем кита LIVE/DEAD, они сохранили жизнеспособность (В)

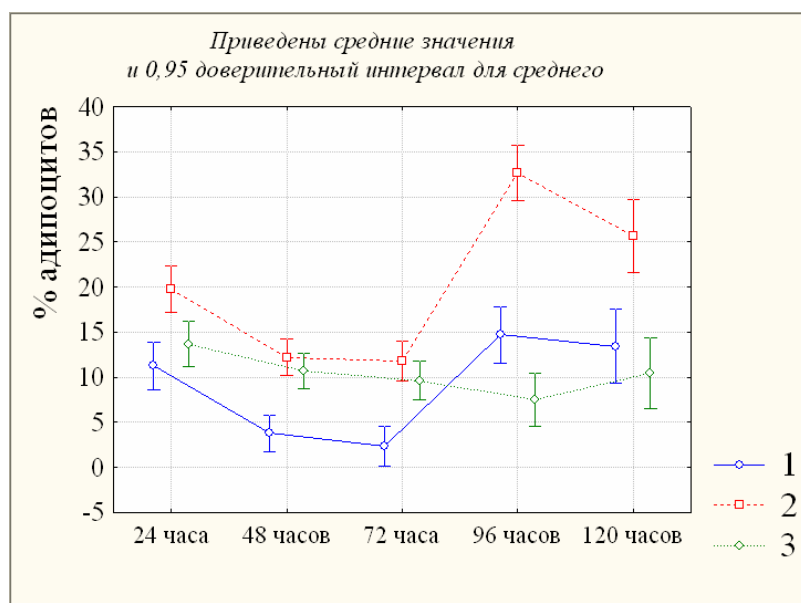


Рис. 10. Динамика изменения количества адипоцитов в течение 120 часов культивирования стромальных клеток из подкожной жировой ткани в среде без добавок (1), с добавлением bFGF (2), или с добавлением bFGF и AcOH, специфичных к мРНК гена PPAR γ (3). Культуры пассировали в начале эксперимента (0 часов) и через 72 часа

Последнее может быть связано с отставанием исключенных из развития бластомеров по фазам клеточного цикла. В отдельных клетках муральной трофэктодермы нормальных бластоцист были выявлены ядра с пристеночной конденсацией хроматина (рис. 4; цветная вставка 1). Подобные особенности отмечены и в ранних эмбрионах человека [Hardy *et al.*, 2003], что указывает на сходство генетически обусловленных нарушений раннего развития у мышей линии SAMP1 и аномалий раннего развития человека.

Оценка функциональной значимости выявленных нарушений была произведена путем сопоставления общего количества аномальных эмбрионов, обнаруженных у мышей на стадиях 1.5, 2.5, 3.5сут. развития и доимплантационной гибели эмбрионов, определенной на стадии 18.5сут. Только на стадии 3.5сут. количество эмбрионов с нарушениями развития превышало количество эмбрионов, погибших в доимплантационный период ($p < 0,000$). По-видимому, часть эмбрионов, попавших согласно нашей классификации в группу «аномалии развития», способна имплантироваться и развиваться дальше. Отставание по стадии и нарушения компактизации могут не влиять на формирование полноценных бластоцист [Bevilacqua *et al.*, 1989].

При проведении сравнения раннего развития у мышей линий SAM (SAMP1 и SAMR1), ICR и гибридов независимо от линейных особенностей, на 2.5сут. были обнаружены одинаковые виды аномалий. В общей структуре аномалий развития во всех линиях преобладала дегенерация. Между линией ICR и гибридами не было выявлено различий в количественных характеристиках полученных эмбрионов, нормальных и аномальных (рис. 5). Это позволило произвести дальнейший анализ эмбрионов линий SAM, используя ICR в качестве контроля. Самки мышей линий SAMP1 и ICR не различались по общему количеству эмбрионов и по количеству нормальных эмбрионов, но число аномальных эмбрионов у самок SAMP1 и SAMR1 было повышено ($p < 0,005$ и $p < 0,001$, сравнение с ICR). Самки SAM не отличались от ICR по количеству эмбрионов, остановившихся в период дробления и фрагментирующихся эмбрионов, но у них было увеличено количество дегенерирующих эмбрионов ($p < 0,012$ – SAMP1; $p < 0,039$ – SAMR1). После культивирования *in vitro* у эмбрионов всех проанализированных линий мышей были выявлены все виды нарушений развития, обнаруженные *in vivo*.

Таким образом, для мышей линий SAM характерен генетически обусловленный высокий уровень нарушений развития эмбрионов в

доимплантационный период, как *in vivo*, так и после культивирования *in vitro*. Нарушения компактизации, обнаруженные у мышей линии SAMP1 *in vivo* и после культивирования *in vitro* полностью соответствуют одной из систем оценки качества эмбрионов человека [Alikani et al., 2000]. Эмбрионы мышей линий SAM могут быть использованы, как модель нарушений развития эмбрионов человека в области вспомогательных репродуктивных технологий.

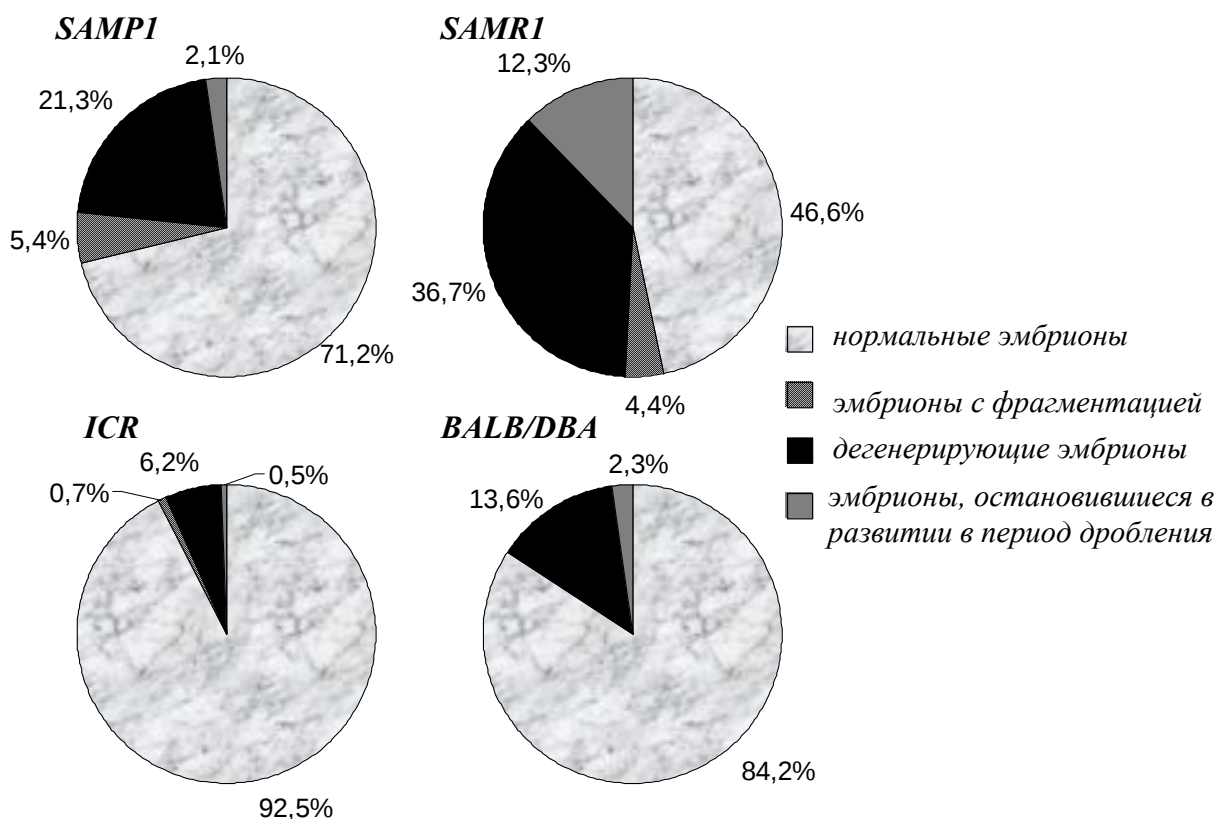


Рис. 5. Распределение эмбрионов у самок мышей разных линий по морфологическим группам на 2.5 сутки развития *in vivo*

Нарушения раннего эмбрионального развития у мышей разных линий *in vitro* при проапоптотическом воздействии. Эмбрионы мышей с изначально высоким (SAMP1) и низким (ICR, C57Bl6/DBA) уровнями нарушений раннего развития культивировали *in vitro* в среде без добавок (контроль) и с добавлением антибиотика блеомицина (опыт). Блеомицин обладает выраженным цитотоксическим действием, связанным с разрушением ДНК и индукцией апоптотической гибели клеток [Wingard et al., 1991]. В опыте как у эмбрионов мышей SAMP1, так и у ICR и гибридов наблюдали описанные выше варианты аномалий процессов компактизации и кавитации, отмечали гибель исключенных из развития клеток (рис. 6; цветная вставка 1). Независимо от линии мышей добавление блеомицина увеличивало количество нарушений

развития, а доля нормальных эмбрионов уменьшалась (рис. 7). Однако в спектре аномалий у SAMP1 преобладали аномалии процессов компактизации и кавитации ($p < 0,008$ и $p < 0,000$, сравнение с контролем), у ICR возрастало количество отстающих в развитии и дегенерирующих эмбрионов ($p < 0,019$ и $p < 0,009$, сравнение с контролем), у C57Bl6/DBA увеличивались нарушения компактизации и дегенерация ($p < 0,001$ и $p < 0,019$, сравнение с контролем). Можно предположить, что при воздействии проапоптотического агента на эмбрионы линии мышей с исходно высоким уровнем генетических аномалий (SAMP1) нарушения развития в основном связаны с аномалиями морфогенетических процессов. А в случае воздействия проапоптотического агента на эмбрионы мышей с нормальными репродуктивными показателями гибель эмбрионов преимущественно связана с цитотоксическим действием блеомицина.

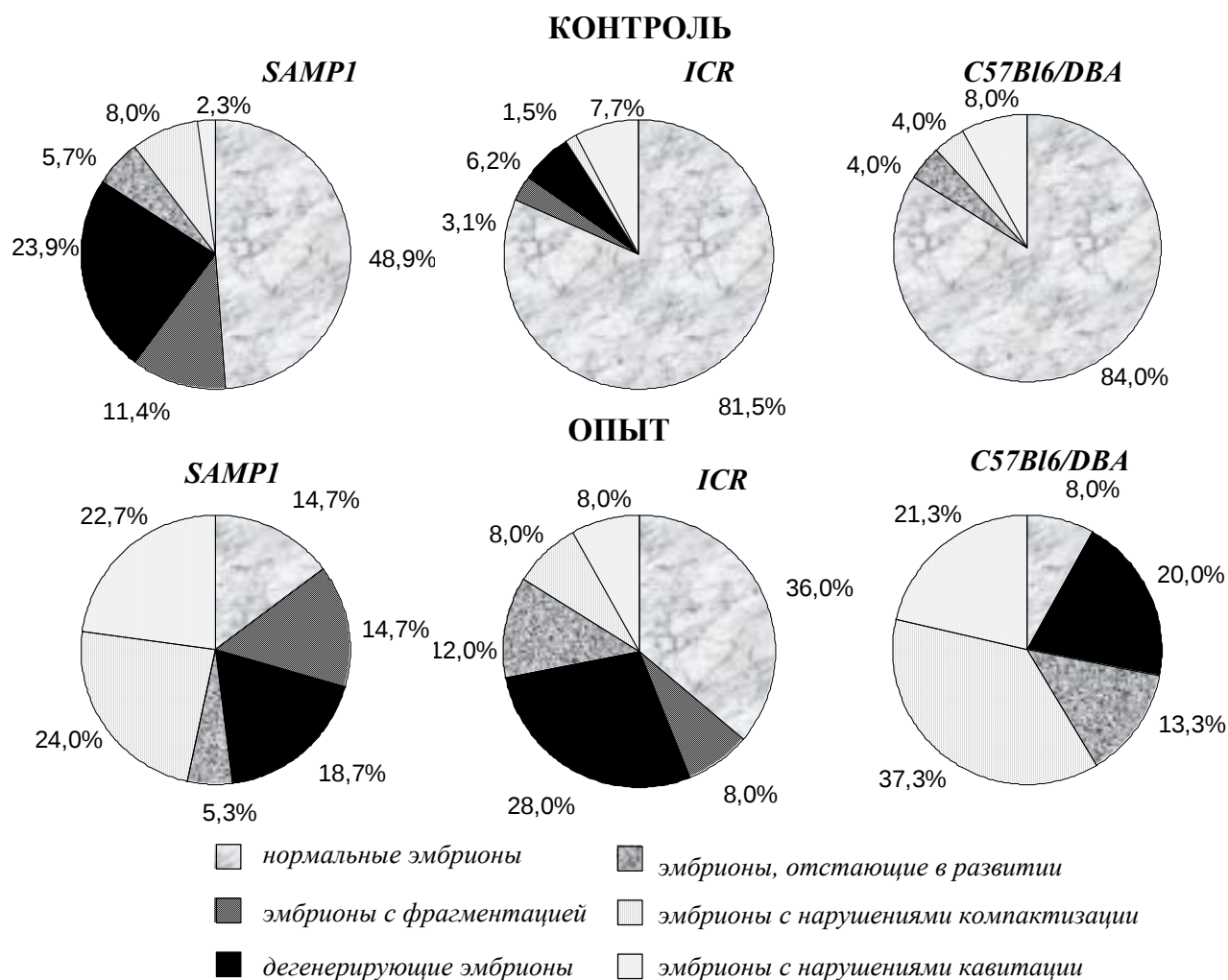


Рис. 7. Распределение эмбрионов мышей разных линий по морфологическим группам после культивирования без (контроль) и с блеомицином (опыт)

Раннее развитие после введения в бластоцисты мышцы низкодифференцированных клеток человека. В данной работе для получения инъекционных химер были использованы суспензии нейральных прогениторных и стволовых клеток (НСК) и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (МСК) человека. В целом, независимо от типа вводимых клеток через сутки после инъекции было отмечено три варианта их распределения в бластоцистах (рис. 8; цветная вставка 2). Инъекция в бластоцисты мышцы ксеногенных низкодифференцированных клеток не влияла на жизнеспособность эмбрионов (рис. 9; цветная вставка 2). Включение инъектированных клеток в состав бластоцист зависело от типа клеток, а также от состава и условий хранения суспензий. Ни в одной из суспензий мы не обнаружили различий между МСК и НСК по частоте включения клеток только в состав трофэктодермы (вариант 2). При инъекции свежей суспензии клеток в растворе Хэнкса шанс включения в состав не только трофэктодермы, но и ВКМ (вариант 3) у МСК был в 5,09 раз больше, чем у НСК ($p < 0,035$). Однако 24 часовая экспозиция суспензии при $+4^{\circ}\text{C}$ или использование 10% раствора инфукола ГЭК уравнивали шансы НСК и МСК, не влияя на МСК, но увеличивая вероятность попадания НСК в формирующийся зародыш. НСК в большей степени, чем МСК экспрессируют белки клеточной адгезии [Campos, 2004; Yu, Yanagisawa, 2006]. Раствор инфукола, используемый для клинической инфузии, снижает агрегацию тромбоцитов и эритроцитов, уменьшает высвобождение циркулирующих молекул адгезии [Гольдина, Горбачевский, 1998]. Возможно, в наших экспериментах применение 10% раствора инфукола и 24 часовая экспозиция при $+4^{\circ}\text{C}$ изменяли адгезивные свойства НСК, способствуя их дезагрегации и увеличивали вероятность встраивания этих клеток в состав ВКМ бластоцист.

Исследование эмбрионального и постнатального воздействия олигонуклеотидных последовательностей, добавляемых в среду при культивировании *in vitro*. В молекулярной медицине для генной терапии широко используют антисмысловые олигодезоксинуклеотиды (АсОДН) [Зеленин и др., 1998; Kim et al., 2005]. Мы исследовали АсОДН, специфичные к мРНК генов HRK, FASL, BAX человека, контролем служили параллельные культуры без олигонуклеотидных последовательностей. Ни в одной из серий экспериментов не было выявлено достоверных различий между опытными и соответствующими им контрольными группами по количеству эмбрионов,

достигших стадии бластоцисты и по количеству бластоцист, прошедших хэтчинг. После трансплантации эмбрионов псевдобеременным самкам между контрольной и опытными группами не было обнаружено различий в индексе беременности, индексе имплантации и постимплантационной смертности. На 17.5 и 18.5сут. в опытных группах (87 плодов) не было обнаружено аномалий в состоянии внутренних органов и скелета; опытная и контрольная группы не различались по кранио-каудальным размерам плодов, массе и диаметру плацент. На 17.5сут. масса плодов в опытной группе с добавлением АсОДН к мРНК генов HRK и FASL человека ($0,78 \pm 0,18$ г) была больше, чем в контрольной группе ($0,91 \pm 0,16$ г; $p < 0,047$), но к 18.5сут. это различие исчезало. В дальнейшем был проведен анализ поведения мышат, полученных от суррогатных матерей после имплантации им эмбрионов опытной и контрольной групп. Мышата того же возраста, что и животные опытной и контрольной групп (2-3 месяца) составили группу интактного контроля. Нарушений поведения ни в одной из групп не было выявлено. В целом, зарегистрированные показатели поведения мышей опытной и контрольных групп находились в пределах вариации величин, свойственных лабораторным мышам [Markina et al., 2001]. Животные опытной и контрольных групп не различались и по репродуктивным показателям.

Таким образом, результаты изучения последствий влияния АсОДН на ранние эмбрионы свидетельствовали об отсутствии немедленных и отсроченных токсических и тератогенных эффектов. Культивирование доимплантационных эмбрионов в среде с олигонуклеотидными последовательностями в дальнейшем не влияет на поведенческие и репродуктивные показатели взрослых животных.

Влияние АсОДН, специфичных к мРНК гена PPAR γ , на адипогенную дифференцировку клеток, полученных из жировой ткани. Изучение эффектов антисмыслового ингибирования *in vitro* обычно осуществляют с помощью модифицированных устойчивых, но токсичных фосфотиоатных производных АсОДН [Baertschi, 1994]. Вопрос о возможности влияния немодифицированных АсОДН на дифференцировочные процессы остается открытым. Мы оценили влияние немодифицированных АсОДН, специфичных к мРНК гена PPAR γ , на формирование адипоцитов в культуре стромальных клеток жировой ткани (СКЖТ). В полученной культуре СКЖТ клетки имели

фибробластоподобный фенотип, экспрессировали CD105, CD90 и не экспрессировали CD45, CD34, CD11b. При культивировании СКЖТ была отмечена адипогенная дифференцировка, причем, в случае добавления bFGF, доля адипоцитов была выше, чем в среде без фактора роста в течение всего периода наблюдения ($p < 0,0002$); после пассирования доля адипоцитов, независимо от присутствия bFGF, кратковременно увеличивалась (рис 10, 1, 2; цветная вставка 2). Для подавления адипогенной дифференцировки в культурах СКЖТ к ростовой среде каждые 24 часа добавляли АсОДН, специфичные к мРНК гена PPAR γ . Ген PPAR γ кодирует один из ключевых транскрипционных факторов адипогенеза, регулирующий начальные этапы дифференцировки преадипоцитов [Gregoire et al., 1998; Floyd et al., 2006]. Через сутки после начала эксперимента доля адипоцитов в среде с bFGF превышала долю адипоцитов в среде без добавок ($p < 0,000$). Добавление АсОДН в присутствии bFGF позволило уменьшить число адипоцитов ($p < 0,002$, сравнение со средой с bFGF), уравнив их с числом адипоцитов в среде без добавок. Наблюдение за динамикой изменения адипоцитов в течение 5 суток показало, что доля адипоцитов колебалась в среде без добавок ($p < 0,000$) и в среде с bFGF ($p < 0,000$), а под действием АсОДН к мРНК гена PPAR γ этот показатель стабилизировался (рис. 10; цветная вставка 2).

Считается, что СКЖТ, обладающие способностью дифференцироваться в различные производные, в том числе и в адипоциты, являются перспективными кандидатами для аутологических трансплантаций [Трактувев и др., 2006]. Выявленное влияние специфичных немодифицированных АсОДН на уровень адипогенной дифференцировки в культуре *in vitro* (снижение и поддержание на низком уровне количества жировых клеток) расширяет возможность использования этих соединений в клеточной терапии.

Влияние АсОДН, специфичных к мРНК гена Nr1h3 мыши, на динамику спонтанных и индуцированных нарушений раннего развития.

Последствия антисмыслового ингибирования проапоптотического гена Nr1h3 были изучены с использованием моделей, для которых ранее нами был выявлен широкий спектр нарушений раннего развития – спонтанных или индуцированных. Моделью спонтанных нарушений явились мыши линии SAMP1, индуцированные нарушения провоцировали добавлением блеомицина. Добавление в культуральную среду АсОДН, специфичных к мРНК гена Nr1h3, не

повлияло на спектр и частоту генетически обусловленных нарушений раннего развития у мышей линии SAMP1. Однако в серии с добавлением блеомицина и с дополнительной добавкой АсОДН к мРНК Hrk доля бластоцист от общего числа эмбрионов составила 11/70 (15,7%), шесть из них прошли хэтчинг, в то время как в среде с антибиотиком без АсОДН бластоцист было только 6/75 (8,0%), и ни одна не прошла хэтчинг ($p < 0,043$). Итак, при химически индуцированных нарушениях доимплантационного развития добавление АсОДН к мРНК гена Hrk не влияло на количество нарушений, но улучшало качество выживших эмбрионов - увеличивало хэтчинг бластоцист.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для мышей линии SAMP1, склонной к ускоренному старению, характерен высокий уровень нарушений раннего развития. Наряду с фрагментирующимися и дегенерирующими эмбрионами у этой линии *in vivo* и *in vitro* в значительном количестве присутствуют эмбрионы, отстающие по стадии и остановившиеся в развитии, эмбрионы с нарушениями процессов компактизации и кавитации. Эти генетически обусловленные нарушения не поддавались коррекции с помощью АсОДН, специфичных к мРНК проапоптотического гена Hrk. Блеомицин - агент, индуцирующий апоптотическую гибель клеток, у мышей SAMP1 увеличивал количество эмбрионов с нарушениями компактизации и кавитации, не влияя на число дегенерировавших эмбрионов. Как правило, ошибки в раннем развитии вызывают гибель бластомеров или всего эмбриона, после воздействия блеомицина на эмбрионы мышей с нормальными репродуктивными показателями (ICR, C57Bl6/DBA) отмечалось увеличение числа дегенерировавших эмбрионов. Возможно, у мышей линии SAMP1 нарушены механизмы естественной элиминации поврежденных бластомеров и эмбрионов.

При исследовании раннего развития, проблемы, связанные с изучением взаимного влияния клеток, можно оценить в условиях создания химерных организмов. Работы по инъекции ксеногенных клеток в полость бластоцисты мыши немногочисленны, полученные результаты противоречивы [Максимовский и др., 1998; Harder et al., 2002; Koestenbauer et al., 2007]. Мы показали, что инъекция в бластоцисты мыши ксеногенных низкодифференцированных клеток (НСК и МСК человека) не влияла на

жизнеспособность эмбрионов. Включение инъецированных клеток в бластоцисты мыши зависело от типа клеток, а также от условий хранения и состава суспензий. Использование 10% раствора инфукола или 24 часовая экспозиция суспензии при +4°C увеличивали вероятность попадания НСК в формирующийся зародыш (ВКМ бластоцист), уравнивая их по этому показателю с МСК, возможно за счет изменения адгезивных свойств.

Широкую возможность корректирующего не затрагивающего целостность генома влияния на клетки предоставляют АсОДН [Зеленин и др., 1998; Kurreck, 2003]. В проведенном комплексном исследовании было показано, что немодифицированные олигонуклеотиды не обладают эмбриотоксическим и отсроченным тератогенным эффектами, в дальнейшем не влияют на поведение и репродукцию взрослых животных. В культуре *in vitro* на модели адипогенной дифференцировки стромальных клеток жировой ткани было продемонстрировано влияние АсОДН на адипогенез. Полученный результат (уменьшение количества адипоцитов) показывает специфичность влияния немодифицированных АсОДН на дифференцировку клеток в культуре. Немодифицированные АсОДН, специфичные к мРНК проапоптотического гена *Hrk*, улучшали качество эмбрионов мыши с индуцированными блеомицином нарушениями раннего развития. По-видимому, частичное подавление трансляции белка *harakiri* сохраняло целостность мембран митохондрий, препятствовало высвобождению проапоптотических факторов и предохраняло эмбрионы от токсического воздействия блеомицина.

Положительное действие АсОДН, специфичных к мРНК проапоптотических генов, на раннее развитие эмбрионов *in vitro* получило подтверждение в области вспомогательных репродуктивных технологий. Так АсОДН, специфичные к мРНК проапоптотических генов *HRK* и *FASL* человека, улучшают качество эмбрионов человека и увеличивают частоту наступления беременности после культивирования ооцитов и эмбрионов в среде с добавлением АсОДН к мРНК генов *HRK* и *FASL* [Захарова, 2006; Семенова и др. 2006; Zaletov et al., 2006]. Разработанная композиция для добавления в среду культивирования ооцитов и эмбрионов (патенты РФ № 2281777 и № 2281778 от 20 августа 2006) позволяет улучшать качество ранних эмбрионов.

ВЫВОДЫ

1. Родственные линии мышей SAMP1 и SAMR1 характеризуются высоким уровнем нарушений раннего эмбрионального развития как *in vivo*, так и при культивировании *in vitro*. Это выражается в аномалиях процессов компактизации и кавитации, отставаниях по стадии и остановках развития, фрагментации и дегенерации.
2. При воздействии проапоптотического агента блеомицина на эмбрионы линии мышей с исходно высоким уровнем генетических аномалий (SAMP1) нарушения развития в основном связаны с нарушениями процессов компактизации и кавитации. При воздействии на эмбрионы мышей с нормальными репродуктивными показателями (ICR, C57Bl6/DBA) гибель эмбрионов преимущественно связана с увеличением числа дегенерирующих эмбрионов.
3. Инъекция в бластоцисты мыши ксеногенных клеток (НСК и МСК человека) не влияет на жизнеспособность эмбрионов. Использование 10% раствора инфукола ГЭК или 24 часовая экспозиция суспензии при +4°C приводят к возрастанию числа случаев встраивания донорских НСК во внутреннюю клеточную массу бластоцисты.
4. Немодифицированные АсОДН, специфичные к мРНК генов HRK, FASL и BAX человека, в концентрации 0,1 нмоль/мл не обладают токсическим влиянием на эмбрионы и отсроченным тератогенным воздействием на плоды мыши, и в дальнейшем не влияют на поведенческие и репродуктивные показатели взрослых животных.
5. Воздействие немодифицированных АсОДН, специфичных к мРНК гена PPAR γ , на культуру стромальных клеток жировой ткани человека приводит к уменьшению доли адипоцитов и стабилизации этого показателя после пассирования культуры.
6. Немодифицированные АсОДН, специфичные к мРНК проапоптотического гена Hrk, улучшают качество выживших эмбрионов мыши с индуцированными блеомицином нарушениями раннего развития.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кошелева Н.В. Нарушения доимплантационного эмбрионального развития у мышей линии SAMP1. // Материалы V Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Человек и его здоровье». Санкт-Петербург. 2002. С.130-131.
2. Захарова Е.Е., Семенова М.Л., Есипов Д.С., Кошелева Н.В., Козлова А.Ю., Голиченков В.А. Возможности использования эмбриональной модели для изучения модуляции генной экспрессии методом антисмыслового ингибирования. // Приложение к журналу «Открытое образование» «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии». 2003. С.375-377.
3. Семенова М.Л., Захарова Е.Е., Есипов Д.С., Кошелева Н.В., Козлова А.Ю., Ходаков Д.А., Голиченков В.А. Антисмысловые олигонуклеотиды как действующие агенты для эмбриональной генной терапии. // Сборник статей «Труды Международного биотехнологического центра МГУ». 2003. С.17-22.
4. Кошелева Н.В., Захарова Е.Е., Семенова М.Л. Особенности нарушений раннего эмбрионального развития у мышей линии SAMP1. // Материалы Всероссийской научной конференции "Гистологическая наука России в начале XXI века: итоги, задачи, перспективы". Москва. 2003. С.63-64.
5. Захарова Е.Е., Кошелева Н.В., Есипов Д.С., Козлова А.Ю., Ходаков Д.А., Семенова М.Л. Введение in utero тиомодифицированных антисмысловых олигонуклеотидов, специфических к мРНК гена Sry мыши. // Материалы Всероссийской научной конференции "Гистологическая наука России в начале XXI века: итоги, задачи, перспективы". Москва. 2003. С.221-222.
6. Кошелева Н.В., Захарова Е.Е., Семенова М.Л. Влияние прерывистой гипоксической тренировки на эмбриогенез мышей линии SAMP1. // Тезисы докладов III Всероссийской конференции с международным участием "Механизмы функционирования висцеральных систем". Санкт-Петербург. 2003. С.159-160.
7. Захарова Е.Е., Козлова А.Ю., Кошелева Н.В., Есипов Д.С., Семенова М.Л. Антисмысловое ингибирование генной экспрессии в эмбриональный период развития на модели формирования мужской половой системы. // Материалы VIII Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пущино. 2004. С.112.
8. Кошелева Н.В., Комарова М.Н. Трансплантация стволовых клеток, полученных из костного мозга человека, в полость бластоцисты мыши. // Биотехнология, экология, охрана окружающей среды. Сборник научных

- трудов под ред. А.П. Садчикова, С.В. Котелевцева Москва: Изд-во ООО «Графикон-принт». 2005. С.136-139.
9. Кошелева Н.В., Захарова Е.Е., Семенова М.Л. Химерные эмбрионы как модель для исследования потенций стволовых и прогениторных клеток. // Материалы Всероссийской конференции молодых исследователей "Физиология и медицина", Санкт-Петербург. 2005. С.58.
 10. Кошелева Н.В., Сабурова И.Н., Комарова М.Н., Семенова М.Л. Влияние инъекционной среды на результаты трансплантации клеток в полость бластоцисты. // Материалы конференции "Биология стволовых клеток: фундаментальные аспекты". Москва. 2005. С.39-40.
 11. Zakharova E., Semenova M., Kosheleva N., Zaeva V., Zaletov S. Using of antisense oligonucleotides for modulation of gene expression in early human embryo. Abstracts of the BioScience 2005 - From genes to systems, SECC, Glasgow UK. 2005. P.190.
 12. Захарова Е.Е., Семенова М.Л., Кошелева Н.В. «Дети из пробирки»: экстракорпоральное оплодотворение // Биология в школе. 2005. №6. С.10-15.
 13. Семенова М.Л., Захарова Е.Е., Кошелева Н.В., Заева В.В., Залетов С.Ю. Антисмысловые олигонуклеотиды как действующие агенты для улучшения качества эмбрионов человека при культивировании *in vitro*. // Проблемы репродукции. 2006. № 1. С.46-52.
 14. Zaletov S., Zaeva V., Semenova M., Zakharova E., Kosheleva N. An antisense approach can improve pregnancy rate. // Abstracts of the 22th Annual Meeting of the ESHRE. Prague Czech Republic. 2006. P.122.
 15. Kosheleva N.V., Semenova M.L. Preimplantation development of SAMP1 mice and the influence of intermittent hypoxic training on SAMP1 embryogenesis. //Ann. reports on SAM studies. 2006. V.21. P.49-50.
 16. Семенова М.Л., Захарова Е.Е., Кошелева Н.В., Залетов С.Ю., Заева В.В. Способ управления качеством ооцитов и композиция для добавления в среду культивирования ооцитов. // Патент РФ на изобретение № 2281777 от 20 августа 2006.
 17. Семенова М.Л., Захарова Е.Е., Кошелева Н.В., Залетов С.Ю., Заева В.В. Способ культивирования зиготы и/или эмбриона и композиция для добавления в среду культивирования зигот и/или эмбрионов. // Патент РФ на изобретение № 2281778 от 20 августа 2006.