

УДК 543.645.9

ЛАЗЕРНАЯ МИКРОТОМОГРАФИЯ ЗРЕЛОГО ООЦИТА ЧЕЛОВЕКА В ПРОТОКОЛЕ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ

© 2021 г. А. Г. Погорелов^{1,*}, Н. П. Макарова², Е. А. Калинина², А. И. Панаит¹,
В. Н. Погорелова¹, академик РАН Г. Т. Сухих²

Поступило 29.01.2021 г.

После доработки 15.02.2021 г.

Принято к публикации 15.02.2021 г.

В технологии экстракорпорального оплодотворения качество ооцита является определяющим фактором, который оказывает непосредственное влияние на оплодотворение и развитие доимплантационного эмбриона. Перед оплодотворением *in vitro* клинический эмбриолог проводит прижизненную оценку ооцитов человека с использованием морфологических критериев. В настоящее время, чтобы оценить женскую половую клетку, применяют единственный неразрушающий клетку метод – визуализацию посредством обычного светового микроскопа. Цель данной работы заключалась в том, чтобы адаптировать неинвазивный метод лазерной томографии (QLSM – Quantitative Laser Scanning Microtomography) для изучения морфологических особенностей женской половой клетки *in vitro*. Посредством данного метода послойно изучали внутреннее строение ооцита человека. Последующая компьютерная 3-D реконструкция позволила определить клеточный объем ооцита. Величина объема и особенности внутриклеточного строения использовали в качестве новых критериев для оценки состояния яйцеклетки после стресса, обусловленного процедурой криоконсервирования.

Ключевые слова: женская половая клетка, количественная лазерная микротомография (QLSM), экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), криоконсервирование

DOI: 10.31857/S2686738921030112

Зрелые ооциты представляют собой неоднородную популяцию, из которой только половина способна завершить мейоз, поэтому эффективность оплодотворения зависит от качества яйцеклетки [1, 2]. В связи с этим в технологии ЭКО актуальной задачей является диагностическое описание строения женской половой клетки [3–7]. В настоящее время набор инструментов, которые не повреждают яйцеклетку, ограничен только визуальным наблюдением [5, 8, 9]. Для характеристики полноценного созревания ооцита используют морфологические признаки: размер клетки, состояние внеклеточного пространства, внешний вид полярного тельца, перивителлинового пространства, а также наличие разного рода цитоплазматических включений. Дополнительные данные о строении живой яйцеклетки человека

можно получить или уточнить их с помощью QLSM – метода экспериментальной биофизики, разработанного для бесконтактного тестирования микрообъекта [10].

QLSM основан на послойной томографии, что позволяет получить стопку последовательных оптических срезов по глубине объекта микронных размеров. Изначально данный метод корреляционной микроскопии был предложен для изучения препарата, процедура подготовки которого вызывает гибель клетки [11]. Однако нет причин, которые ограничивают возможность изучения нативного ооцита посредством QLSM. Цель работы состояла в том, чтобы адаптировать данный метод для диагностики женской половой клетки, инкубируемой в физиологической среде. В результате должно реализоваться основное достоинство послойной томографии – неинвазивная визуализация внутреннего строения живой яйцеклетки, а также количественная оценка важных пространственных характеристик, например, клеточного объема.

Использование женских половых клеток в биомедицинских целях разрешено этическим комитетом ФГБУ НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова МЗ РФ. Для научных исследований брали замо-

¹ ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пушкино, Россия

² ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова, Москва, Россия

*e-mail: agpogorelov@rambler.ru

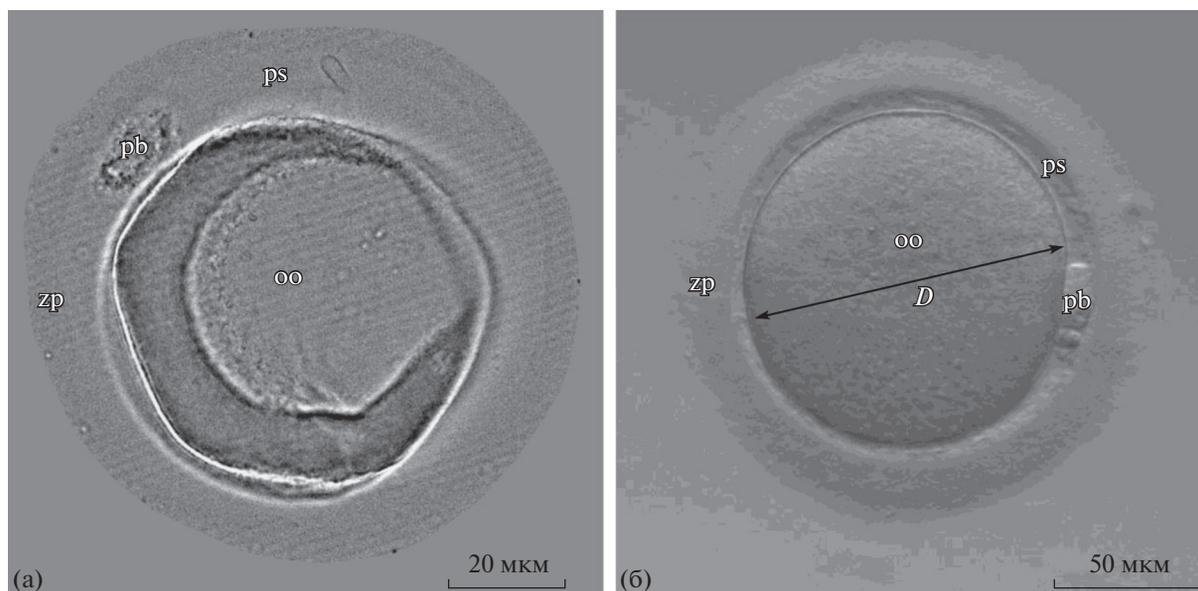


Рис. 1. Характерное изображение женской половой клетки на заключительных этапах протокола криоконсервирования: (а) вид яйцеклетки непосредственно после размораживания, (б) отмывтая от криопротектора (DMSO) яйцеклетка, готовая к оплодотворению. Обозначения: zp – зона пеллюцида (оболочка), oo – ооплазма, pb – полярное тельце, ps – пространство между клеткой и оболочкой ооцита; D – эффективный диаметр яйцеклетки в проекции поля зрения микроскопа.

рожденные ооциты донора, что обусловлено доступностью такого клинического материала, разрешенного этическим комитетом. Материал получали из криобанка указанного учреждения. После размораживания и отмывки отдельную яйцеклетку изучали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SPE в режиме бесконтактной лазерной микротомографии (красный лазер – 635 нм, в проходящем свете). Принципы и технические особенности метода QLSM детально описаны ранее [10, 12, 13]. Отметим существенную деталь, интервал воздействия лазера на ооцит при получении стопки срезов (50 штук) составляет не более 60 с. Чтобы предотвратить высыхание анализируемого образца, яйцеклетки в капле физиологического раствора помещали в микрокамеру микроскопа, где поддерживали атмосферу насыщенного пара воды. На рис. 1 приведены микрофотографии женской половой клетки, полученной после размораживания и последующей отмывки от криопротектора (DMSO).

Размороженная яйцеклетка представляет собой деформированный диск неправильной формы (рис. 1а). Такой вид ооцит принимает в результате замещения клеточной воды криопротектором (DMSO) на этапе подготовки к замораживанию в жидком азоте. После отмывки, следующей за размораживанием, возвращается округлая форма (рис. 1б). К сожалению, в поле зрения светового микроскопа наблюдается результат наложения изображений внутренних структур клетки по всей ее толщине, что ограни-

чивает возможность изучения тонкой внутренней морфологии ооцита. Еще один недостаток заключается в том, что микрообъект визуализируется в одной проекции, что не позволяет оценить пространственные особенности изучаемой яйцеклетки. Например, на основе диаметра (104 мкм) ооцита, видимого в поле зрения микроскопа (рис. 1б), рассчитывается клеточный объем, значение которого равно ~590 пЛ. Данная величина будет соответствовать истинному объему клетки, только если ооцит не распластался при инкубации, оставаясь по форме близким к шару. Бесконтактная лазерная микротомография преодолевает отмеченные ограничения, дополняя ряд диагностических признаков деталями внутреннего строения на разных уровнях ооцита, его формой и объемом (рис. 2).

Из рисунка видно, что посредством QLSM реализована послойная визуализация внутренней структуры живой женской половой клетки. Иллюстрируя данный режим, приведены микрофотографии оптического среза у “макушки” (рис. 2а) и в экваториальной плоскости (рис. 2б) ооцита. На обоих изображениях наблюдается скопление везикул в кортикальной области яйцеклетки. Указанный морфологический признак может отражать реакцию клетки на процесс замещения криопротектора водой, поступающей из внеклеточного пространства [14]. Наблюдаемый дисморфизм, возможно, обусловлен увеличением размера ооцита по мере отмывки DMSO, что вызывает скопление липидных везикул, являю-

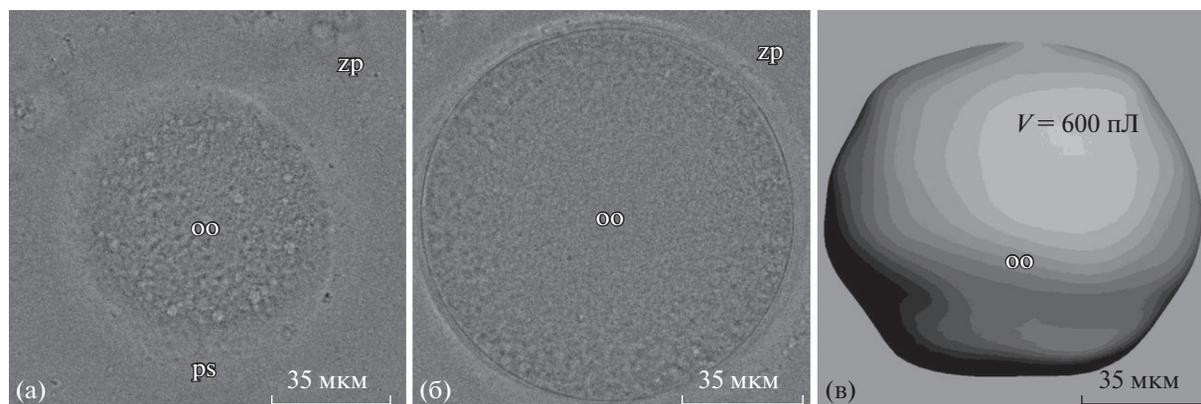


Рис. 2. Результаты неинвазивной лазерной микротомографии (QLSM) живой женской половой клетки, инкубируемой в физиологическом растворе: (а) внутреннее строение яйцеклетки в плоскости оптического среза № 5 – вид сверху, (б) внутреннее строение яйцеклетки в плоскости оптического среза № 20 – вид сверху, (в) компьютерная 3-D модель живой яйцеклетки человека – вид сбоку, где V – значение объема (пЛ, пиколитры) исследуемого ооцита. Обозначения: zp – зона пеллюцида (оболочка), oo – ооплазма, ps – пространство между ооцитом и оболочкой.

щихся строительным материалом для цитоплазматической мембраны [15]. Таким образом, изображение на оптических срезах содержит основные структурные элементы, характерные для зрелого ооцита, что позволяет оценить наличие дисморфизма.

На рис. 2в представлено изображение ооцита после его 3-D реконструкции. Видно, что после размораживания-отмывки яйцеклетка восстановила свою обычную округлую форму, а объем (600 пЛ) компьютерной модели значимо не отличается от величины, рассчитанной на основе сферической экстраполяции и значения эффективного диаметра ооцита (рис. 1б).

В завершение можно сделать следующие выводы. В технологии ЭКО бесконтактная лазерная микротомография является эффективным подходом для диагностического описания морфологии женской половой клетки. Посредством данного метода реализовано основное достоинство послойной томографии – неинвазивная визуализация внутреннего строения нативного ооцита человека. Показано скопление мелких везикул в кортикальной области отмытого ооцита. Данный дисморфизм может быть обусловлен незавершенностью процесса установления равновесного состояния после отмытки криопротектора. Последующая компьютерная 3-D реконструкция позволила дополнить характеристику ооцита значением клеточного объема, что отражает важный функциональный признак – осмотический статус яйцеклетки.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

В части развития методов изучения структуры микроробъектов исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 20-16-00019).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Balaban B., Urman B. // *Reprod. Biomed. Online*. 2006. V. 12. P. 608–615.
2. Rienzi L., Ubaldi F.M., Iacobelli M., et al. // *Fertil. Steril.* 2008. V. 90. P. 1692–1700.
3. Ebner T., Moser M., Sommergruber M., et al. // *Hum. Reprod. Update*. 2003. V. 9. P. 251–262.
4. Lasiene K., Lasys V., Glinskyte S., et al. // *J. Reprod. Stem Cell Biotechnol.* 2011. V. 2. P. 1–13.
5. Orazov M.R., Radzinsky V.Y., Ivanov I.I., et al. // *Gynecol. Endocrinol.* 2019. V. 35. P. 24–26.
6. Yi X.F., Xi H.L., Zhang S.L., et al. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. ID 7215.
7. Yu E.J., Ahn H., Lee J.M., et al. // *Clin. Exp. Reprod. Med.* 2015. V. 42. P. 156–162.
8. Ceviren A.K., Ozcelik N.T., et al. // *IVF Lite*. 2014. V. 1. P. 88–93.
9. Otsuki J. // *J. Mamm. Ova. Res.* 2009. V. 26. P. 26–31.
10. Pogorelov A.G., Pogorelova V.N. // *J. Microsc.* 2008. V. 232. P. 36–43.
11. Gulin A., Nadtochenko V., Astafiev A., et al. // *Analyst*. 2016. V. 141. P. 4121–4129.
12. Pogorelova M.A., Golichenkov V.A., Pogorelov A.G. // *Optics and Spectroscopy*. 2014. V. 116. P. 488–493.
13. Pogorelova M.A., Panaut A.I., Pogorelov A.G. // *Biophysics*. 2016. V. 61. P. 445–452.
14. Richani D., Gilchrist R.B. // *Hum. Reprod. Update*. 2018. V. 24. P. 1–14.
15. De Silva N.S., Siug C-H. // *J. Biol. Chem.* 1981. V. 256. P. 5845–5850.

LASER MICROTOMOGRAPHY FOR IVF OOCYTE OF HUMAN

**A. G. Pogorelov^{a,#}, N. P. Makarova^b, E. A. Kalinina^b, A. I. Panait^a,
V. N. Pogorelova^a, and Academician of the RAS G. T. Sukhih^b**

^a *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow, Russian Federation*

^b *Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after V.I. Kulakov, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: agpogorelov@rambler.ru*

For *in vitro* fertilization technology, the quality of oocytes has a direct impact on the egg fertilization and developmental competence of early embryo. The morphological criteria are used for the estimation of oocyte quality before its fertilization *in vitro*. To date, only one method is known to determine the maturity of oocyte. This is the routine observation with light microscope. The aim of this article was to adapt the non-invasive quantitative laser scanning microtomography (QLSM) for the investigation of morphological features of a human oocyte *in vitro*. This approach was used to accumulate the Z-stack gallery of optical sections of IVF oocyte. The layer-by-layer acquisition allows the fine cytoplasmic structure imaging. Applying the QLSM Z-stack of optical sections, the cellular volume was calculated with quantitative 3D reconstruction of a human oocyte. The volume value and intracellular structure were used as novel criteria to assess the oocyte state after the stress evoked by cryopreservation procedure.

Keywords: human mature oocyte, quantitative laser microtomography (QLSM), *in vitro* fertilization technology (IVF), cryopreservation