

ATLAS OF TIME LAPSE EMBRYOLOGY

EDITED BY

Alison Campbell, BSc(Hons), MMedSci, Dip RC Path
Head of Embryology, CARE Fertility Group, Nottingham, UK

Simon Fishel, PhD
Managing Director, CARE Fertility Group, Nottingham, UK



CRC Press
Taylor & Francis Group
Boca Raton London New York

CRC Press is an imprint of the
Taylor & Francis Group, an **informa** business

АТЛАС

ЭМБРИОЛОГИИ

Последовательные покадровые изображения (timelaps-технология)

ПОД РЕДАКЦИЕЙ

Алисон Кэмпбел и Саймона Фишела

Перевод с английского



Москва
«МЕДпресс-информ»
2018

УДК 611.013
ББК 28.03
А92

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

Перевод с английского: Н.С.Шмитова.

Атлас эмбриологии. Последовательные покадровые изображения (timelaps-технология) / А92 под ред. А.Кэмпбел, С.Фишела. – М. : МЕДпресс-информ, 2018. – 120 с. : ил.
ISBN 978-5-00030-577-5

Атлас представляет собой первое в своем роде издание, посвященное новому методу мониторинга и отбора эмбрионов, который выводит современную науку на новый уровень понимания процессов развития. В книге вводятся общие понятия покадровой визуализации, описываются используемые устройства и методы, а также рассматриваются изменения, происходящие в ходе развития *in vitro*. В каждом разделе атласа содержатся как опубликованные, так и новые расчеты и наблюдения, сделанные с помощью замедленной покадровой съемки. Они сопровождаются последовательными изображениями и описаниями клинических примеров из выборки, насчитывающей свыше 9000 преимплантационных эмбрионов человека. Атлас завершается обзором мнений пациентов, проходящих лечение с помощью ЭКО, об использовании метода замедленной покадровой съемки, который позволяет им наблюдать за развитием их будущих детей.

Атлас будет полезен эмбриологам, желающим расширить свои познания о развитии человеческого эмбриона перед имплантацией, а также всем специалистам, занимающимся ЭКО и желающим внедрить эту перспективную технологию в свою практику.

УДК 611.013
ББК 28.03

ISBN 978-1-4822-1446-8

© 2015. All rights reserved. Authorized translation from the English language edition published by CRC Press, a member of the Taylor & Francis Group LLC

ISBN 978-5-00030-577-5

© Издание на русском языке, перевод на русский язык, оформление, оригинал-макет. Издательство «МЕДпресс-информ», 2018

Содержание

Авторы	6
Благодарности	7
Сокращения	8
Введение	9
Видеоматериалы	10
1. Оборудование, необходимое для замедленной покадровой съемки при экстракорпоральном оплодотворении	11
Louise Best	
2. Клинические аспекты замедленной покадровой съемки	17
Alison Campbell	
3. Покадровая съемка, клеточный цикл, распределение морфокинетических этапов во времени и данные с известной имплантацией	22
Alison Campbell	
4. Пол эмбриона и морфокинетические параметры	27
Samantha Duffy	
5. Выделение полярного тельца	28
Colleen Lynch, Mercedes Regueira	
6. Оплодотворение: образование и исчезновение пронуклеусов	32
Louise Kellam, Laina Murphy	
7. Клинические данные: динамические особенности – фрагментация	39
Sue Montgomery	
8. Количество пронуклеусов и плоидность эмбрионов, полученных в результате ЭКО/ИКСИ	44
Abigail A. Burchill	
9. Динамические особенности: компактизация	48
Sue Montgomery	
10. Бластуляция	54
Sue Montgomery	
11. Вылупление (хэтчинг) человеческой бластоцисты	63
Louise Kellam	
12. Нарушения дробления	69
Kathryn Berrisford, Ellen Cater	
13. Обратное дробление/слияние бластомеров	73
Davina Hulme	
14. Агрегаты гладкого эндоплазматического ретикулума	75
Cath Drezet	
15. Многоядерность	78
Claire Shearer	
16. Вакуолизация	81
Rachel Smith	
17. Зернистость цитоплазмы	91
Sarah Foley	
18. Дефекты блестящей оболочки	96
Gerri Emerson	
19. Мнение пациентов	116
Samantha Duffy	

Введение

С конца 1970-х годов, когда родилась Луиза Браун, ставшая первым в мире ребенком, зачатым с помощью экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), эмбриологические методы, применяемые в клинической практике, были значительно усовершенствованы. Некоторые аспекты практической эмбриологии, такие как состав питательных сред и условия культивирования, оптимизированы и дополнены, а другие, такие как интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в яйцеклетку (ИКСИ; от *англ.* ICSI – IntraCytoplasmic Sperm Injection) и биопсия эмбрионов, разработаны и внедрены в практику. Эти научные достижения позволили иметь детей тем пациентам, которые при отсутствии подобных разработок никогда не смогли бы стать родителями. В последние годы стал доступен еще один метод, который позволяет получать важную информацию о динамике дробления эмбрионов человека, культивируемых *in vitro*, и, что особенно важно, может увеличить частоту наступления беременности, о чем свидетельствуют результаты исследований. Этот новый метод заключается в использовании безопасных, закрытых инкубационных систем, в которых эмбрионы могут в течение нескольких дней непрерывно оставаться в оптимальной для них среде, в то время как наблюдение за ними происходит путем высокочастотной покадровой съемки. Такая методика быстро становится мощным неинвазивным инструментом мониторинга и отбора эмбрионов. Несмотря на то что покадровую съемку впервые использовали для изучения оплодотворения и раннего дробления эмбриона человека более 15 лет назад, применение этой методики в повседневной клинической практике стало возможным только сейчас, когда в продаже появились высокотехнологичные системы, описанные в главе 1.¹

Появляется все больше публикаций, в которых технология покадровой съемки используется для определения прогностических маркеров жизнеспособности и имплантационного потенциала эмбриона на основе морфокинетических параметров. Широкое применение этой методики способствует разработке большого количества разнообразных моделей и алгоритмов отбора эмбрионов.^{2–5} Непосредственной целью клинических исследований является поиск универсальной модели, увеличивающей вероятность выбора наиболее жизнеспособного эмбриона. Другим важным требованием к разработанной модели считается возможность ее использования в других лабораториях. Итоговые показатели, которые применяются для выбора эмбрионов на основе морфокинетической модели, варьируют в широких пределах (от бластуляции до родов), а также коррелируют с плоидностью эмбриона (генетическим статусом эмбриона), успешной имплантацией и ро-

дами. Использование таких моделей в будущем, а также возможность выбраковывания эмбрионов с аномальным дроблением имеют большой потенциал для повышения эффективности циклов ЭКО.

В этом атласе, первом в своем роде, вводятся общие понятия покадровой визуализации, описываются используемые устройства и методы, а также рассматриваются изменения, происходящие в ходе развития *in vitro*. Данные timelaps-мониторинга дополняют уже имеющиеся знания, полученные в прошлом с помощью статических изображений, что позволяет вывести современную науку на новый уровень понимания процессов развития. В каждом разделе этой книги содержатся как опубликованные, так и новые расчеты и наблюдения, сделанные с помощью замедленной покадровой съемки. Они сопровождаются последовательными изображениями и описаниями клинических примеров из выборки, насчитывающей свыше 9000 преимплантационных эмбрионов человека. Атлас завершается обзором мнений пациентов, проходящих лечение с помощью ЭКО, об использовании метода замедленной покадровой съемки, который позволяет им наблюдать за развитием их будущих детей.

Мы надеемся, что данный атлас будет полезен всем специалистам, занимающимся ЭКО и желающим внедрить эту перспективную технологию в свою практику. Мы считаем, что опыт большого коллектива CARE Fertility, включенный в эту книгу, будет интересен эмбриологам, желающим расширить свои познания о развитии человеческого эмбриона перед имплантацией.

Alison Campbell, Simon Fishel

ЛИТЕРАТУРА

1. Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod.* 1997;12:532–541.
2. Wong CC, Loewke KE, Bossert NL et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol.* 2010;28(10):1115–1121.
3. Meseguer M, Herrero J, Tejera A et al. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod.* 2011;26(10):2658–2671.
4. Campbell A, Fishel S, Bowman N et al. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reprod BioMed Online.* 2013;26:477–485.
5. Basile N, Nogales M, Bronet F et al. Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis. *Fertil Steril.* 2014 Mar;101(3):699–704.

Оборудование, необходимое для замедленной покадровой съемки при экстракорпоральном оплодотворении

Louise Best

Замедленная покадровая съемка человеческих эмбрионов используется с начала 1990-х годов для изучения оплодотворения и раннего развития человеческого эмбриона.¹ Первая покадровая съемка отображала ооциты в течение 4 ч с интервалом в 1 мин. Она была проведена при низком уровне освещения с помощью цветной видеокамеры, расположенной во временной инкубационной камере Perspex на инвертированном микроскопе с 200-кратным увеличением, которое было усилено на мониторе до $\times 1064$. С тех пор технологии продвинулись настолько, что позволяют получить последовательные изображения ооцита, сделанные через фиксированные промежутки времени, на протяжении всего периода культивирования от момента инсеминации и далее, без необходимости удалять культуральную чашку из стабильной среды вплоть до переноса или криоконсервации эмбрионов.

В отличие от обычных ежедневных наблюдений, timelaps-технология производит много сотен изображений, что позволяет оценить точные сроки ключевых событий развития эмбриона, а также рассмотреть особенности дробления и обнаружить кратковременные, но значительные изменения. Полученные изображения объединяют при помощи программного обеспечения в последовательный видеоряд продолжительностью в несколько минут, отражающий развитие эмбриона в течение нескольких дней. Сохранение показателей каждого эмбриона позволяет создать базу данных замедленной покадровой съемки. Изображения можно дополнить комментариями и проанализировать ретроспективно в контексте данных о судьбе эмбриона и исходе лечения.

Первые успешные роды после беременности, наступившей в результате ЭКО с применением технологии замедленной покадровой съемки, были описаны в работе С. Pribenszky и соавт. (2010)². С тех пор покадровая визуализация эмбрионов быстро стала ключевым инструментом для клинических целей и исследований в области репродукции человека.

Для автоматизированных покадровых наблюдений в лаборатории ЭКО необходимо, чтобы получение и запись микроскопических изображений происходили в то время, как чашка с эмбрионами остается в среде инкубации. Основными элементами такой системы являются микроскоп с высокой разрешающей способностью; культуральная чашка, ограничивающая свободное перемещение эмбрионов; программное обеспечение для сбора, анализа и записи изображений; система культивирования. Для лабораторий ЭКО оправданно использование нескольких клинических систем для покадровой съемки. Каждая из систем имеет свои особенности устройства и эксплуатации. Ключевым звеном всех систем является ручная или полуавтоматическая запись и интерпретация специфических событий преимплантационного развития. Это могут быть переменные, определяемые системой или пользователем, которые затем обрабатывают с помощью программного обеспечения, чтобы рассчитать интересующие параметры, такие как длительность интервала между последовательными

делениями эмбриона или время появления/исчезновения определенных структур эмбриона. Результаты измерений и расчеты можно использовать в дальнейшем в качестве дополнительной информации при выборе эмбриона(ов) для переноса или замораживания.

В этой главе описаны четыре системы для замедленной покадровой съемки, которые доступны на сегодняшний день.

Primo Vision (Vitrolife, Швеция)*

Устройство Primo Vision Time-Lapse представляет собой модульную систему, которая помещается в обычный лабораторный инкубатор и связывается с блоком управления, находящимся вне инкубатора, для непрерывного наблюдения за эмбрионами (рис. 1.1). Для каждого пациента требуется отдельный модуль. В зависимости от внутренних размеров инкубатора в нем можно разместить разное количество модульных блоков Primo. Primo Vision Evo представляет собой компактный цифровой инвертированный микроскоп со встроенной оптикой, контрастом Хоффмана и светодиодной подсветкой зеленого цвета (550 нм); он позволяет вести съемку с 3–11 фокальных плоскостей.

Модульная конструкция позволяет расширять систему в любое время путем установки дополнительных микроскопов. Система рассчитана на подключение до 6 микроскопов и дает возможность при максимальной нагрузке записывать показания 96 эмбрионов от 6 пациентов. Чашки остаются неподвижными на протяжении всего времени культивирования, а съемка эмбрионов осуществляется снизу.

Культуральные чашки Primo Vision, разработанные для этой системы, соответствуют требованиям Европейского союза по безопасности, охране здоровья и защите окружающей среды (маркировка CE), они протестированы на мышиных эмбрионах и индивидуально упакованы (рис. 1.2). В зависимости от потребностей пациента чашки могут вмещать до 9 или 16 эмбрионов, размещенных в 3 рядах по 3 капли или в 4 рядах по 4 капли соответственно. Дизайн чашек позволяет проводить групповое культивирование, в то время как эмбрионы находятся в индивидуальных ячейках точно в области экспозиции микроскопа Primo Vision (2,5×2,5 мм). Чашки можно использовать и в обычном стереомикроскопе, где при необходимости эмбрионы также можно идентифицировать (см. рис. 1.2).

Программное обеспечение Primo Vision фиксирует, анализирует и представляет изображения для просмотра в ручном режиме. Это дает возможность сравнивать и анализировать развитие эмбрионов. Используя программное обеспечение, можно создавать персонализированные отчеты и графики, а видеоролики, детализирующие развитие эмбрионов, могут совместно использовать эмбриологи,

* В РФ систему для замедленной покадровой съемки Vitrolife (Primo Vision, Швеция) представляет ООО «БМТ», www.bmtltd.ru.

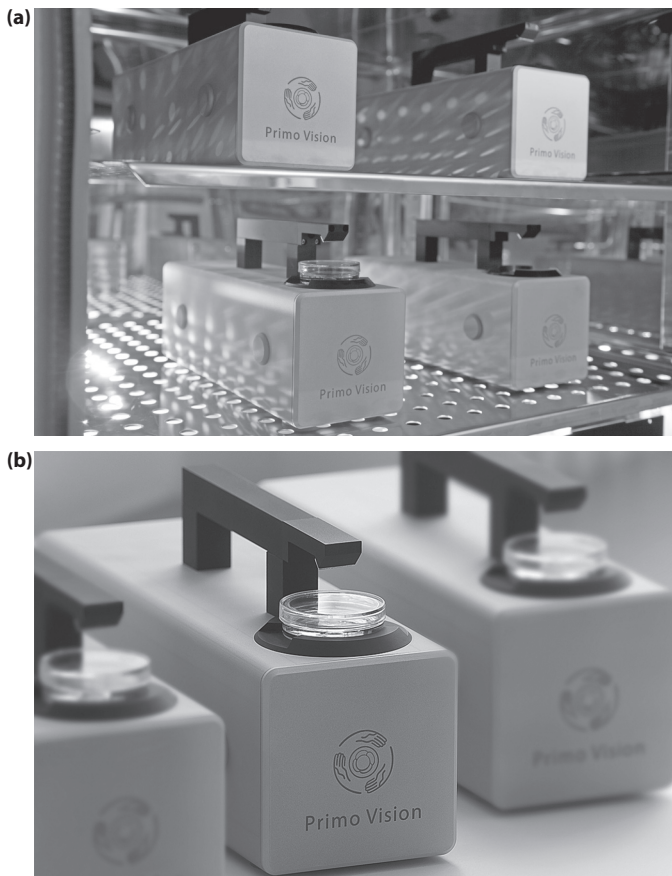


Рис. 1.1. (а) Несколько модульных блоков Primo Vision Evo, установленных внутри стандартного инкубатора. (б) Устройство Primo Vision Evo. (Предоставлено Vitrolife, Швеция.)



Рис. 1.2. Чашка для культивирования эмбрионов Primo Vision. (Предоставлено Vitrolife, Швеция.)

клиницисты и пациенты. Система позволяет пользователю устанавливать и изменять параметры регистрации морфокинетических переменных и обеспечивает точное наблюдение за динамикой развития эмбрионов с момента выделения полярных телец и образования пронуклеуса до времени и интервалов дробления. Значимые события, которые могут встречаться более одного раза (такие как пульсация бластоцеля, фрагментация и особенности дробления), также могут быть записаны для дополнительной информации. Программное обеспечение позволяет использовать опубликованные или собственноручно разработанные алгоритмы для сравнительной классификации эмбрионов.

С помощью функции удаленного доступа можно подключиться к программе визуализации за пределами лабо-

ратории. Это означает, что коллеги или другие специалисты могут оценить эмбрионы онлайн. Primo Vision iPad Viewer позволяет профессионалам и пациентам клиники ЭКО просматривать отдельные кадры.

Поскольку Primo Vision Evo размещается в пределах инкубационной системы лаборатории, это дает возможность отслеживать условия культивирования в разных инкубаторах, что служит полезным инструментом для контроля и улучшения качества работы лаборатории. Изучая воздействие различных условий культивирования на развитие эмбрионов, можно улучшить рабочие протоколы, так как это позволяет выявить и устранить негативные факторы, влияющие на результат.

Eeva (Auxogyn, США)

Система Eeva (от *англ.* Early Embryo Viability Assessment – ранняя оценка жизнеспособности эмбрионов) также относится к разряду модульных, она размещается в уже существующем лабораторном инкубаторе (рис. 1.3). Однако данная система характеризуется тем, что осуществляет съемку в темном поле в одной фокальной плоскости и автоматически следит за делением клеток. В системе используется программное обеспечение, разработанное компанией Auxogyn на основе собственных исследований временных параметров деления клеток в процессе раннего развития эмбрионов. Это программное обеспечение предоставляет количественные данные о потенциале развития каждого эмбриона на стадии бластоцисты.³

Программное обеспечение Auxogyn – тест ранней оценки жизнеспособности эмбрионов (Eeva Test) – призвано предоставить клиникам и пациентам объективную информацию о жизнеспособности эмбрионов, благодаря отслеживанию их развития в течение 2 дней после оплодотворения с последующей оценкой потенциала каждого эмбриона на стадии бластоцисты. Прибор Eeva подходит для большинства стандартных инкубаторов ЭКО, он обеспечивает автоматическую съемку в темном поле и отслеживание клеточного деления без вмешательства эмбриолога или чрезмерного воздействия света на эмбрионы. Количественные объективные данные в сочетании со стандартной морфологической классификацией позволят клиникам, занимающимся ЭКО, принимать более обоснованные решения относительно выбора эмбрионов на раннем этапе дробления на 2-й день и оптимизировать стратегию лечения пациентов. В тесте Eeva используется программное обеспечение, которое автоматически анализирует время развития эмбрионов, сравнивая его с утвержденными показателями, и позволяет более объективно оценивать развитие эмбрионов по сравнению с ручными методами (см. рис. 1.3). Исследователи компании Auxogyn проанализировали множество неинвазивных маркеров и данные экспрессии генов для оценки жизнеспособности эмбриона и выяснили, что наибольшую прогностическую силу имеет время, потребовавшееся каждому эмбриону для достижения определенных этапов развития в течение первых 2 дней после оплодотворения *in vitro*: 1) продолжительность первого цитокинеза (т.е. периода от начала первого деления до момента его завершения); 2) интервал между цитокинезом 1 и цитокинезом 2 (т.е. временем от двух- до трехклеточной стадии); 3) интервал между цитокинезом 2 и цитокинезом 3 (т.е. временем от трех- до четырехклеточной стадии).³ Это позволяет переносить эмбрионы на 3-й день после инсеминации без дополнительных дней культивирования *in vitro*, которое влечет соответствующий риск, включая предполагаемые

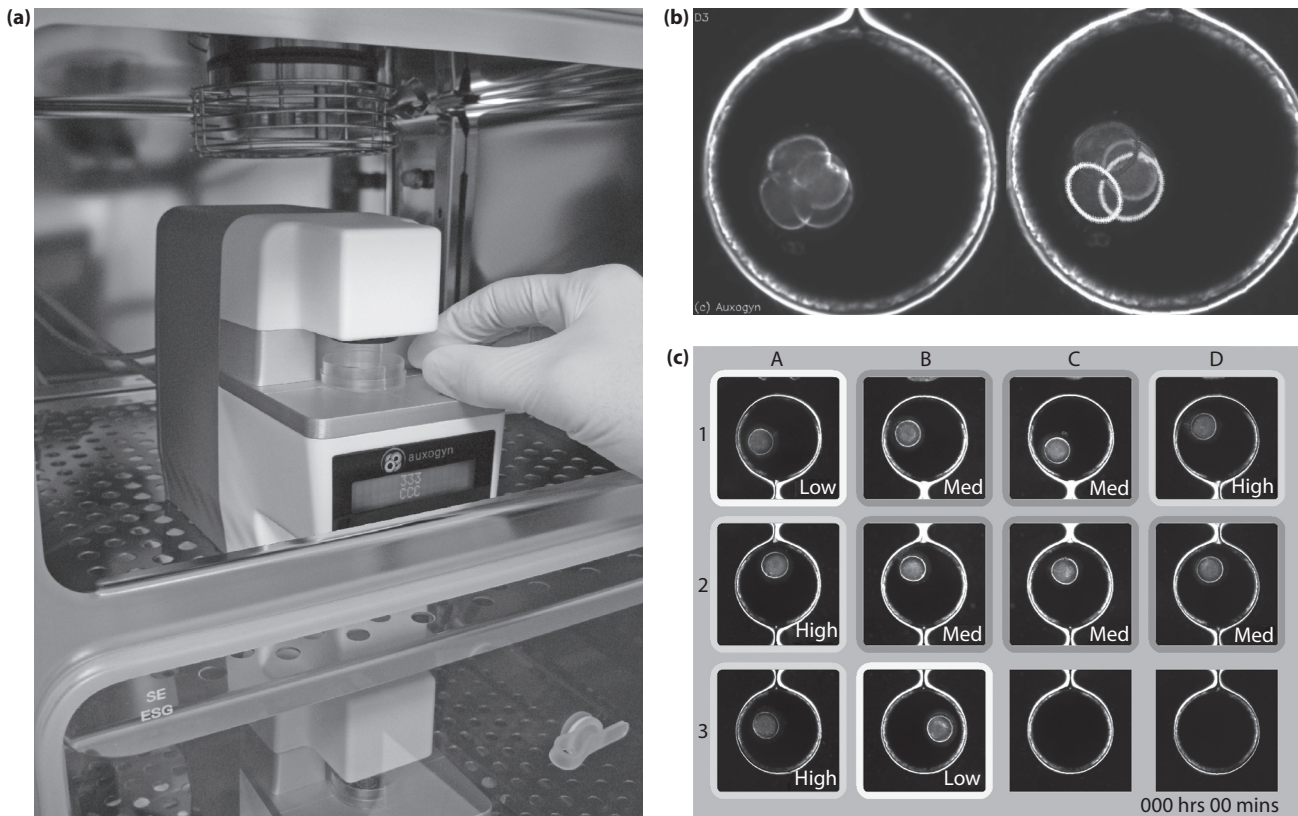


Рис. 1.3. (а) Прибор Eeva, установленный в стандартном инкубаторе. (б) Пример автоматической идентификации бластомеров с помощью Eeva, используемой для определения времени деления клеток. (с) Результаты тестов Eeva, показывающие, имеет ли эмбрион высокий (High), средний (Med) или низкий (Low) потенциал развития. (Предоставлено Auhogyn, США.)

эпигенетические эффекты.⁴ В чашке Eeva расположено 9 микролунок, которые позволяют отслеживать индивидуальное развитие 9 эмбрионов, используя групповое культивирование. С помощью программного обеспечения Eeva можно просматривать изображения и видеоролики, относящиеся к конкретному пациенту. Загруженные отчеты и видеоматериалы помогают при консультировании пациентов и позволяют развеять их опасения.

EmbryoScore (FertiliTech, Дания)*

EmbryoScore – автономный инкубатор/микроскоп, в котором, используя специальные слайды, можно разместить эмбрионы 6 пациентов. Это инкубатор без увлажнения, с внутренней циркуляцией воздуха, стерилизованного с помощью ультрафиолетового излучения и пропущенного через систему фильтрации микрочастиц и летучих органических соединений. Инкубатор оснащен встроенной системой подсветки с красным светодиодом (635 нм), которая обеспечивает стабильное и непрерывное изображение в режиме реального времени. Сухая инкубация без водяных лотков исключает конденсацию воды и связанный с ней рост грибка на поверхностях (рис. 1.4).

EmbryoScore может отображать до 72 эмбрионов и делать снимки с 9 расположенных на одинаковом расстоянии фокальных плоскостей. Эта система включает в себя программное обеспечение для моделирования выбора эмбрионов и предоставляет инструменты, позволяющие накапливать информацию путем ретроспективного анализа данных о развитии эмбриона.

* В РФ систему для замедленной покадровой съемки EmbryoScore (FertiliTech, Дания) представляет ООО «БМТ», www.bmtltd.ru.

В EmbryoScore используется слайд для культивирования, вмещающий до 12 эмбрионов. Каждый эмбрион находится в 25 мкл среды в лунке с центральной впадиной диаметром 0,2 мм. На краю слайда расположен вертикальный держатель (киль), который обеспечивает надежную фиксацию и безопасность манипуляций, а крышка имеет небольшой выступ для легкого отсоединения. Идентификация каждого эмбриона осуществляется с помощью микромаркировки рядом с дном лунки, которая видна под микроскопом. Слайд с эмбрионами идеально вписывается в держатель, что обеспечивает прямую передачу тепла к лункам, заполненным средой. Водонепроницаемый полимер, используемый для производства слайда, вместе со слоем минерального масла предотвращает обезвоживание во время работы в лабораториях с низкой влажностью и в сухих инкубаторах. Слайды индивидуально упакованы и протестированы на наличие эндотоксинов и токсичность на мышинных эмбрионах. Рабочая станция EmbryoViewer позволяет оператору просматривать, комментировать и сравнивать сохраненные видеоматериалы, отражающие развитие выбранных эмбрионов. Несколько приборов могут быть подключены к одной рабочей станции, а эмбрионы можно наблюдать удаленно в прямом эфире. Сервер ZoI поддерживает безопасный обмен данными внутри клиник, использующих EmbryoScore, и между ними. Данные пациента можно собрать из нескольких связанных инкубаторов и объединить в общем хранилище.

Miri (Esco, Дания)

В приборе Esco Miri TL имеется 6 полностью отдельных камер для культивирования, каждая из которых может содержать до 14 эмбрионов, а общая емкость прибора составляет



Рис. 1.4. (а) Блок инкубатора/микроскопа EmbryoScope. (б) Рабочая станция EmbryoScope для просмотра изображений. (с) Слайд для EmbryoScope. (Предоставлено FertilTech, Дания.)

84 эмбриона. Культивирование происходит в чашках под названием CultureCoins, которые находятся в отдельных камерах. Прямое нагревание чашек в камерах обеспечивает постоянную температуру, а восстановление температуры после закрывания дверцы происходит в течение 1 мин. Использование газовой смеси обеспечивает точный контроль среды внутри камер, а полная продувка/замена газа в системе восстанавливает оптимальную для развития эмбрионов газовую среду менее чем за 3 мин после закрывания камеры инкубатора. В каждой камере установлен встроенный датчик температуры РТ-1000, а также (в стандартной конфигурации) имеется порт для датчика рН (рис. 1.5).

Для покадрового мониторинга используются изображения, снятые с нескольких оптических плоскостей с интервалом 5 мин в течение всего периода культивирования. Взаимодействие с пользователем осуществляется с помощью встроенного сенсорного экрана с высоким разрешением, а результаты отображаются на большом светодиодном дисплее.

В заключение можно сказать, что в настоящее время для клинического применения доступны различные аль-

тернативные системы замедленной покадровой съемки. С увеличением количества данных, подтверждающих целесообразность использования систем timelaps, эта многообещающая технология может расширить наши знания о развитии эмбриона перед имплантацией и установить связь между особенностями развития и клиническими исходами.⁵⁻⁷ Ключевое различие между системами, доступными в настоящее время, состоит в их интегрированности в существующие лабораторные инкубаторы или полной автономности. В первом случае изображение получают с помощью системы с видеочкамерой, которая помещается в существующий инкубатор, во втором – с помощью интегрированной системы, включающей и инкубатор, и микроскоп.

При выборе устройства стоит руководствоваться возможностью улучшить результаты лечения, а также обращать внимание на перспективы дальнейших разработок и технического усовершенствования, спецификацию, количество фокальных плоскостей, качество изображения, емкость, наличие сертификата и лицензии (где это требуется), размер, стоимость, доступность обслуживания и ремонта, а также обучения персонала (табл. 1.1).

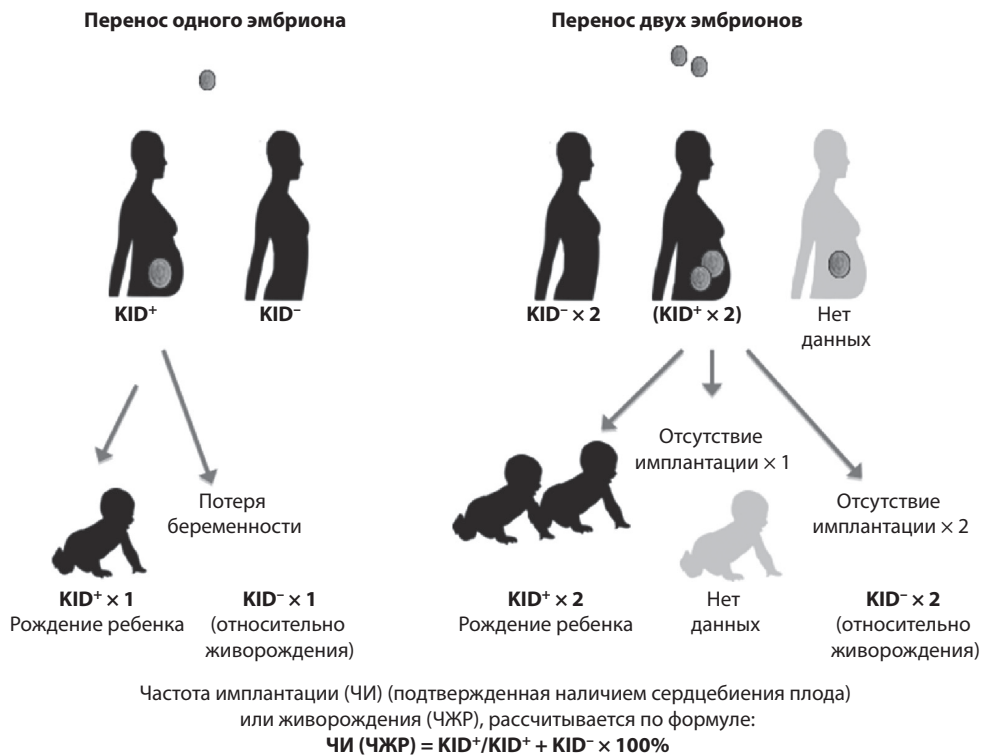


Рис. 3.2. Схема учета KID. (Цит. по: Campbell A. Non-invasive techniques: embryo selection by time-lapse imaging / In: «A Practical Guide to Selecting Gametes and Embryos». M.Montag (ed.). – Boca Raton, FL: CRC Press, 2014; с изменениями.)

эмбрионов, что позднее деление на 2 клетки (t2) связано со сниженным потенциалом имплантации.⁸ Верхний предел времени t2 у KID⁺-эмбрионов составляет 31 чпи, однако большинство эмбрионов в этой когорте перенесены не были. Рисунок 3.4 также показывает, что первое дробление редко происходит раньше 21 чпи (1,2%; n = 9391) и что эмбрионы, претерпевающие раннее первое дробление (до 21 чпи), могут иметь более низкую частоту импланта-

ции по сравнению с эмбрионами с t2, находящимся в диапазоне от 21 до 31 чпи.

Рисунок 3.4 отчетливо демонстрирует предпочтительный диапазон значений t2, коррелирующий с высокой частотой имплантации, а также (на примере t2) возможности динамической оценки как инструмента исключения эмбрионов с t2, находящимся вне допустимого диапазона.

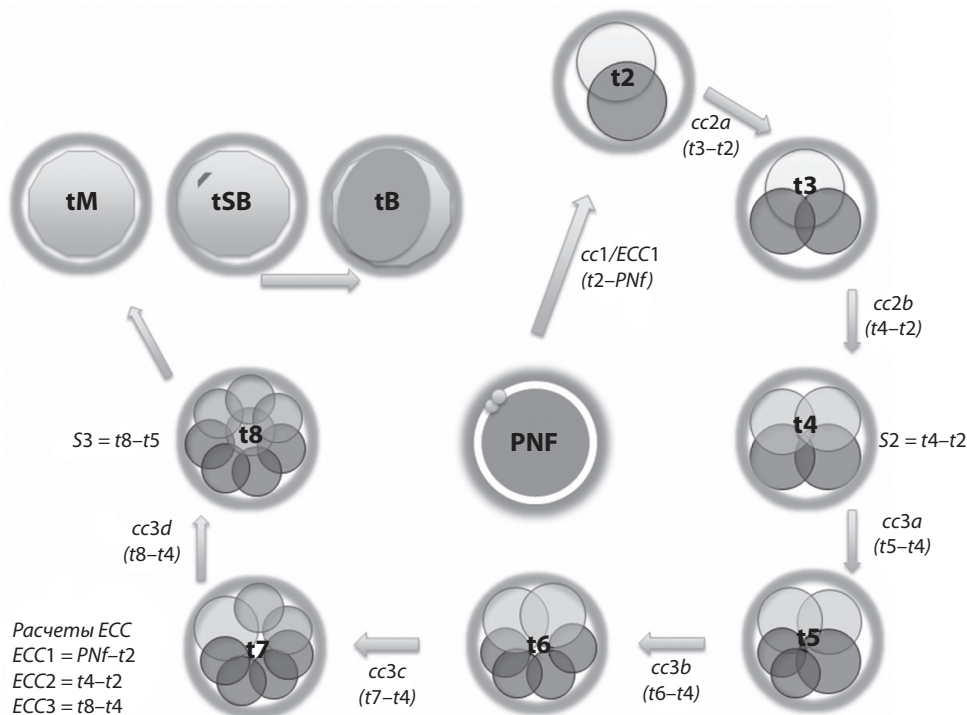


Рис. 3.3. Морфокинетические переменные. PNF – исчезновение пронуклеусов, cc – клеточный цикл, S3 – синхронизация для ECC3, tM – время образования морулы, tSB – время начала бластуляции, tB – время формирования полной бластоцисты.



Рис. 3.4. Распределение значений переменной t_2 среди всех эмбрионов и среди KID⁺-эмбрионов.

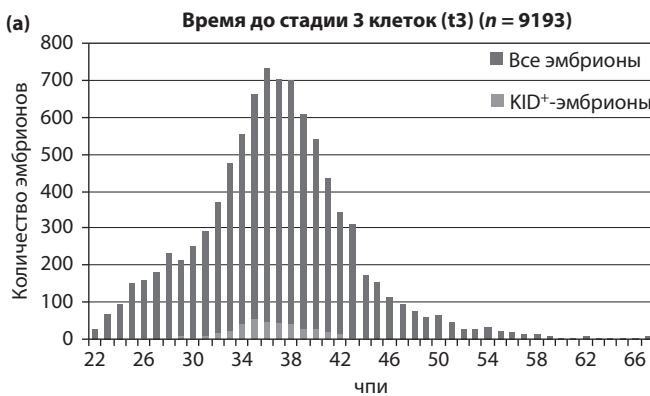


Рис. 3.5. (a) Распределение значений морфокинетической переменной t_3 . (b) Распределение значений морфокинетической переменной t_4 .

Время до стадии трех (t_3) и четырех (t_4) клеток

На рисунке 3.5 представлены негауссовы распределения значений t_3 и t_4 . Оптимальные значения переменных t_3 и t_4 наблюдаются в диапазоне с самой высокой долей KID⁺-эмбрионов. Однако они соответствуют общей закономерности распределения по данному параметру.

Время до стадии пяти (t_5) и восьми (t_8) клеток

На рисунке 3.6 приведены негауссовы распределения значений морфокинетических переменных t_5 и t_8 . Диапазоны t_5 и t_8 для KID⁺-эмбрионов широко варьируют, а структура распределения в целом отличается от структуры, характерной для t_3 и t_4 , показанной на рисунке 3.5.

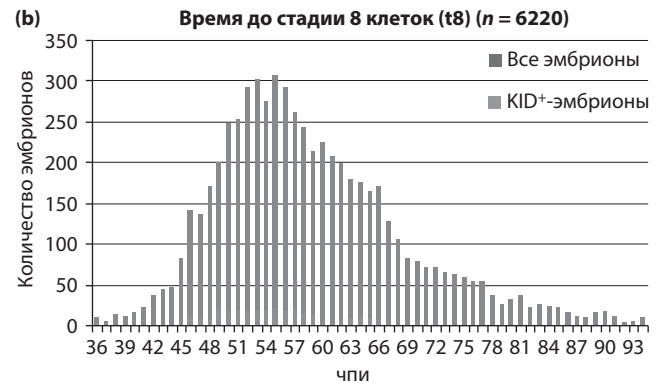


Рис. 3.6. (a) Распределение значений морфокинетической переменной t_5 . (b) Распределение значений морфокинетической переменной t_8 .

Время начала бластуляции (t_{SB}) и время образования полной бластоцисты (t_B)

На рисунке 3.7 показаны негауссовы распределения значений морфокинетических переменных t_{SB} и t_B . Для этих переменных, в отличие от хронологически более ранних, медианные значения для t_{SB} и t_B в KID⁺-когортах меньше, чем медианные значения для когорты в целом. С помощью преимплантационного генетического скрининга выявлено, что значения данных морфокинетических переменных были повышены в группе анеуплоидных эмбрионов по сравнению с эуплоидными, поэтому их отметили как потенциальные морфокинетические переменные для моделей отбора бластоцист.⁷

Второй клеточный цикл

Исследования быстрого дробления до стадии трех клеток (менее чем за 5 ч), проведенные с помощью замедленной покадровой съемки, показали, что этот морфокинетический критерий достоверно связан со снижением частоты имплантации. Частота имплантации эмбрионов, демонстрирующих прямое дробление на три клетки, составляла 1,2% по сравнению с 20,2% при переносе эмбрионов, дробящихся нормально.⁸

Анализ продолжительности второго клеточного цикла, включающий более 9000 эмбрионов, выполненный группой CARE Fertility, показывает бимодальное распределение с различной дисперсией; прямое деление одной клетки до трех клеток (трихотомный митоз), отраженное в первом пике, происходило реже, чем дробление, при котором двухклеточная стадия была более продолжительной (рис. 3.8). Аномальный тип деления в этой когорте, представленный

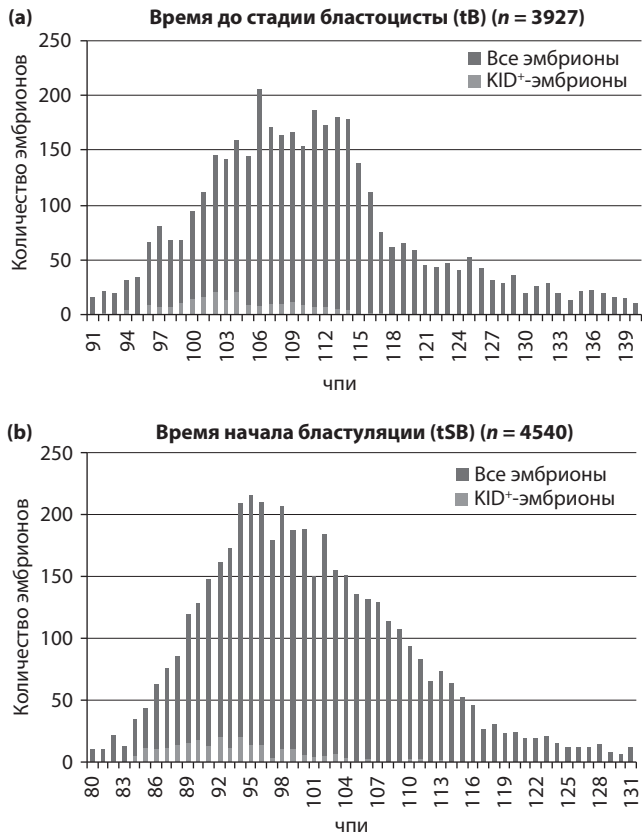


Рис. 3.7. (a) Распределение значений морфокинетической переменной tB. (b) Распределение значений морфокинетической переменной tSB.



Рис. 3.8. Продолжительность второго клеточного цикла (t3-t2) (n = 8988).

первым пиком, был также связан со значительным снижением частоты имплантации.

Анализ этой большой когорты эмбрионов показал, что 26,3% эмбрионов подвергаются аномальному дроблению с непосредственным или быстрым переходом от одной до трех клеток менее чем за 5 ч. Эти события сложно наблюдать при статических методах оценки.

Оптимальная продолжительность второго клеточного цикла наблюдается там, где присутствует наибольшее количество KID⁺-эмбрионов (см. рис. 3.8).

БЛАГОДАРНОСТЬ

Благодарим Louise Best за подготовку графиков распределения переменных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ramsing NB, Callesen H. Detecting timing and duration of cell divisions by automatic image analysis may improve selection of viable embryos. *Fertil Steril.* 2006;86(suppl 3):S189.
2. Ramos L, de Boer P. The role of the oocyte in remodeling of the male chromatin and DNA repair: are events in the zygotic cell cycle of relevance to ART? *Biennial Rev Infertility.* 2011;2:227–243.
3. Aguilar J, Motato Y, Escribá MJ et al. The human first cell cycle: impact on implantation. *Reprod Biomed Online.* 2013;28:475–484.
4. Meseguer M, Herrero J, Tejera A et al. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod.* 2011;26:2658–2671.
5. Wong C, Loewke KE, Bossert NL et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol.* 2010;28:1115–1124.
6. Meseguer M, Herrero J, Tejera A et al. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod.* 2011;26(10):2658–2671.
7. Campbell A, Fishel S, Bowman N et al. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reprod Biomed Online.* 2013;26:477–485.
8. Rubio IR, Kuhlmann R, Agerholm I et al. Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study. *Fertil Steril.* 2012;98:1458–1463.
9. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod.* 2011;26:1270–1283.
10. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Reprod Biomed Online.* 2011;22:632–646.

Пол эмбриона и морфокинетические параметры

Samantha Duffy

До настоящего времени не опубликовано работ, описывающих взаимосвязь пола и морфокинетики эмбрионов с помощью замедленной покадровой съемки. Ранее были описаны различия в скорости развития эмбрионов, обнаруженные традиционным методом микроскопии. Тогда установили, что эмбрионы мужского пола в исследуемой когорте достигали стадии полной бластоцисты быстрее, чем эмбрионы женского пола. Кроме того, среди эмбрионов высокого качества значительно преобладали эмбрионы мужского пола.¹

Влияние пола эмбриона на показатели преимплантационного развития в настоящее время изучает независимая группа центров CARE Fertility, занимающаяся ЭКО. Они провели ретроспективный анализ морфокинетических данных, полученных с помощью системы замедленной покадровой съемки EmbryoScope (FertiliTech, Дания), тех эмбрионов, перенос которых завершился рождением ребенка и, соответственно, пол которых известен. Было исследовано 43 эмбриона (19 женского и 24 мужского пола) после 69 свежих циклов ЭКО с ИКСИ. Для эмбрионов известного пола были зафиксированы средние значения 11 морфокинетических показателей, выраженные в часах после инсеминации, такие как время первого деления; время образования более девяти клеток, морулы, полной бластоцисты и экспандированной бластоцисты.

Хотя статистически значимых различий при таком объеме выборки обнаружено не было, общая тенденция, наблюдавшаяся в этой когорте эмбрионов, заключалась в том, что скорость развития эмбрионов мужского пола была выше до стадии восьми клеток и полной компактизации, а формирование и увеличение бластоцисты происходило медленнее, чем у эмбрионов женского пола.

Гипотеза о влиянии пола эмбриона на морфокинетические параметры представляет научный интерес. Результаты предварительных исследований с помощью замедленной покадровой съемки не согласуются с недавними публикациями, основанными на изучении закономерностей развития эмбрионов известного пола с помощью традиционных статических наблюдений. Это может быть связано с большей субъективностью традиционного метода, а также с его меньшей чувствительностью, ведь морфокинетические различия, которые фиксируют системы замедленной покадровой съемки, трудноуловимы при однократном наблюдении с помощью микроскопа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alfarawati S, Fragouli E, Colls P et al. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality and embryo gender. *Fertil Steril*. 2011;95(2):520–524.

Выделение полярного тельца

Colleen Lynch, Mercedes Regueira

Выделение первого полярного тельца происходит в конце первого мейотического деления ооцита и примерно совпадает с моментом овуляции. Как правило, наблюдение за процессом выделения первого полярного тельца в клинической практике не проводится. После завершения первого мейоза начинается второе мейотическое деление, которое вскоре останавливается на стадии метафазы II. Наличие

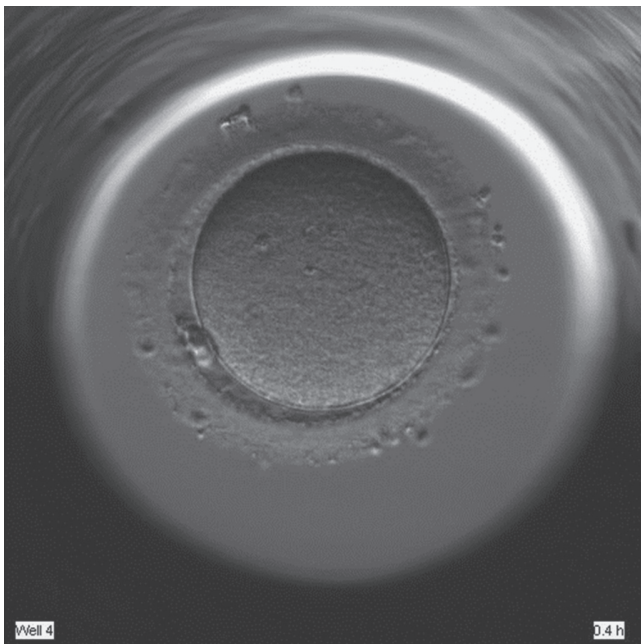


Рис. 5.1. Ооцит на стадии метафазы II.

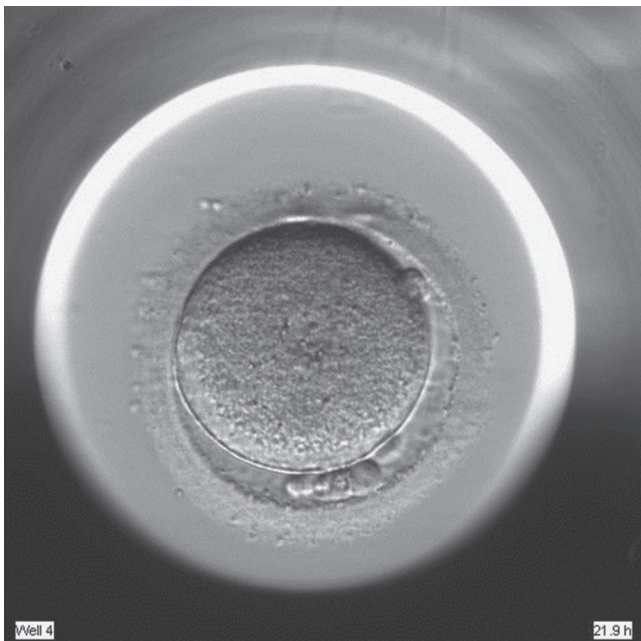


Рис. 5.2. Один пронуклеус и три полярных тельца.

первого полярного тельца свидетельствует о зрелости ооцита и возможности его оплодотворения (рис. 5.1).

Предполагается, что положение первого полярного тельца отражает положение материнского веретена деления, и поэтому, чтобы не повредить веретено, при ИКСИ сперматозоид вводится в горизонтальной плоскости на 3 часа, при полярном тельце в положении на 12 или 6 часов. После инъекции сперматозоида можно наблюдать за зрелыми ооцитами посредством замедленной покадровой съемки. При нормальном оплодотворении происходит выделение второго полярного тельца. Экструзия второго полярного тельца является завершением второго мейотического деления и первым видимым проявлением оплодотворения. Это не может считаться окончательным показателем нормального оплодотворения, так как при аномальном оплодотворении с одним пронуклеусом ооциты также могут выделять второе полярное тельце (рис. 5.2). При другой патологии оплодотворения – наличии трех пронуклеусов в ооцитах после ИКСИ – второе полярное тельце обычно удерживается (рис. 5.3). На видео 5.1 показано образование трех пронуклеусов в ооците с одним полярным тельцем. Видео можно посмотреть по ссылке: <http://goo.gl/ixaDhA>.

Впервые данные, полученные при помощи замедленной покадровой съемки, были использованы для изучения и описания событий, происходящих в процессе оплодотворения, более 20 лет назад.¹ В своих первых наблюдениях D.Рауне и соавт. установили, что нормальное оплодотворение следовало за определенной последовательностью событий, и отметили, что время описанных событий варьирует между ооцитами. В большинстве оплодотворенных ооцитов (92%) наблюдались кольцевые волны грануляции

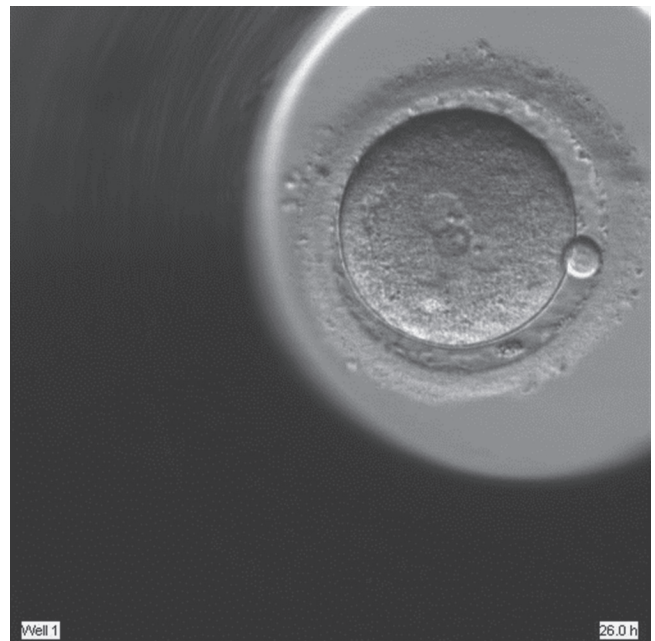


Рис. 5.3. Трипронуклеарная зигота с одним полярным тельцем.

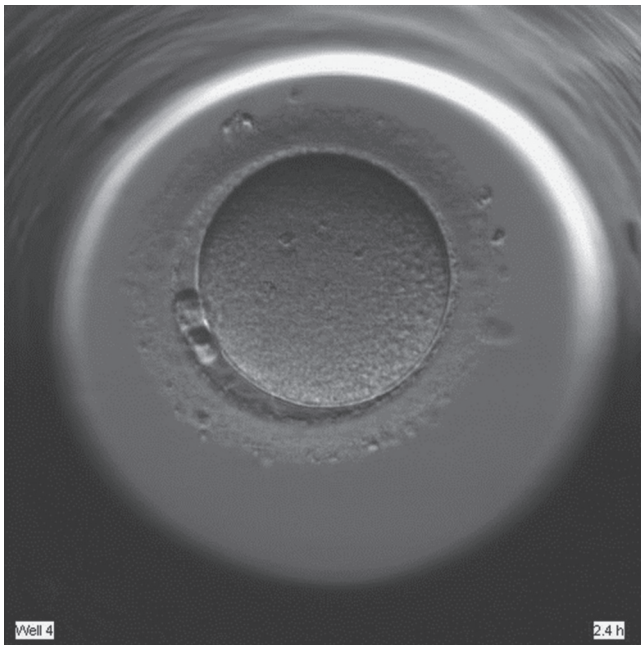


Рис. 5.4. Отделившиеся полярные тельца перед образованием пронуклеусов.

внутри ооциты. Затем следовала экструзия второго полярного тельца и образование пронуклеусов.

Использование замедленной покадровой съемки в клинической практике позволяет наблюдать за видимыми изменениями цитоплазмы, сопровождающими оплодотворение. D.Рауне и соавт. описали кратковременное отхождение органелл от поверхности ооцита, сопровождающееся просветлением его цитоплазмы, усиливающимся от центра к периферии (гало цитоплазмы).¹ На видео 5.2 показано выделение второго полярного тельца, движение цитоплазмы, образование пронуклеусов и их исчезновение. Видео можно посмотреть по ссылке: <http://goo.gl/5r43hV>.

В исследованиях на мышинных ооцитах показана связь между периодическими движениями цитоплазмы и развитием до стадии бластоцисты.² Эти циклические движения цитоплазмы происходят за счет сокращений актомиозино-

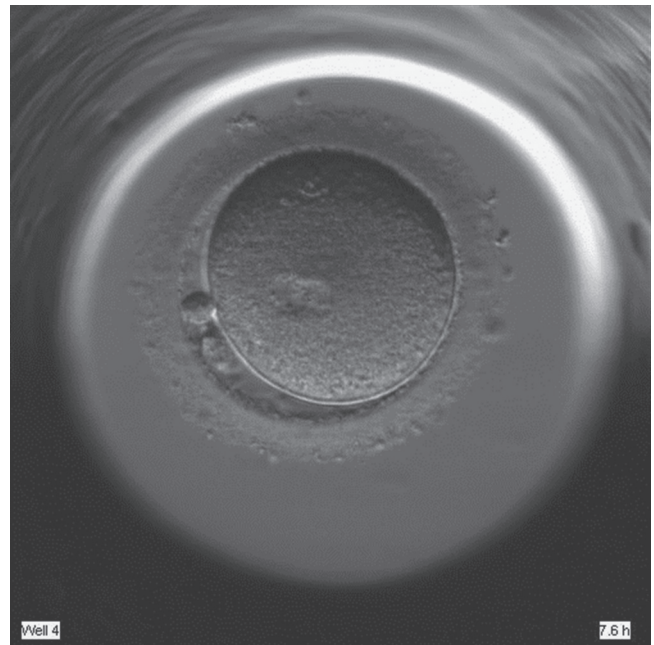


Рис. 5.5. Пронуклеусы и отделившиеся полярные тельца.

вого цитоскелета в ответ на колебания концентрации Ca^{2+} , вызванные оплодотворением. Исследований на человеческих ооцитах проведено мало, но подобные волнообразные движения тоже были описаны, однако их связь с дальнейшим развитием эмбриона не установлена.³

Женский пронуклеус формируется в цитоплазме вблизи второго полярного тельца одновременно или несколько позже, чем появляется мужской пронуклеус в центре клетки (см. видео 5.2). Образование пронуклеусов, как правило, происходит в течение нескольких часов после выделения второго полярного тельца, но у разных ооцитов может варьировать в широких пределах (рис. 5.4 и 5.5). Во время второго мейоза и выделения второго полярного тельца первое полярное тельце также может поделиться.

Второе полярное тельце не всегда выделяется рядом с первым (рис. 5.6). Смещение между ними может варьи-

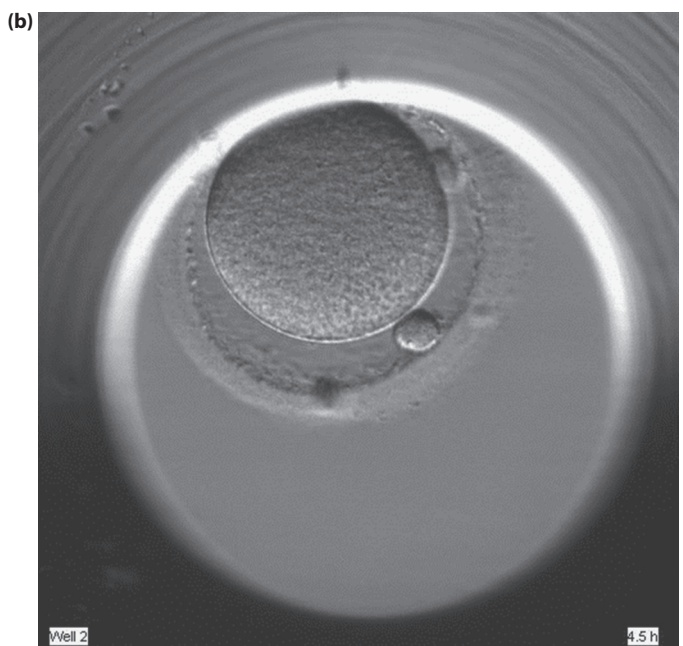
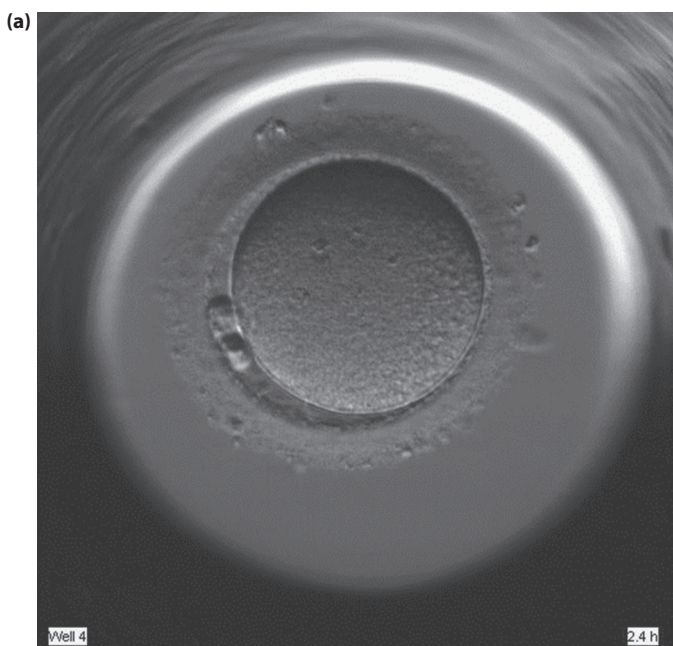


Рис. 5.6. Близкое (a) и отдаленное (b) расположение полярных телец.