

ВОЗМОЖНОСТИ КОНФОКАЛЬНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ ЛАЗЕРНОЙ МИКРОСКОПИИ ПРИМЕНИТЕЛЬНО К ОЦЕНКЕ ПРОЦЕССОВ АПОПТОЗА В ЯЙЦЕКЛЕТКАХ

Доц. Н. Г. ГРИЩЕНКО

Харьковский национальный медицинский университет

Изучено состояние нормальных и апоптотических яйцеклеток мышей с помощью метода сканирующей конфокальной лазерной микроскопии. Использование микроскопа Carl Zeiss LSM 510 Meta и предложенного набора метчиков дает возможность выявить отличия в состоянии нормально функционирующих и находящихся в состоянии экспериментального либо спонтанного апоптоза яйцеклеток на ранних стадиях.

Ключевые слова: оплодотворение in vitro, яйцеклетка, апоптоз, конфокальная сканирующая лазерная микроскопия.

Оплодотворение in vitro (IVF) является широко распространенной репродуктивной технологией. Причины ее неуспеха часто связывают с неудовлетворительным качеством яйцеклеток и, в частности, с процессами апоптоза в них [1–4].

Метод люминесцентной микроскопии с использованием зондов, отражающих состояние апоптоза в клетках, известен давно [5]. Его техническая база постоянно развивается, предоставляя исследователям все более современное и многофункциональное оборудование. В настоящее время распространение получила лазерная сканирующая конфокальная микроскопия (LSCM — Laser Scanning Confocal Microscopy) [6]. Благодаря устройству современных LSCM-микроскопов используется широкий набор спектральных линий когерентного освещения и становится возможной параллельная регистрация флуоресценции с различными длинами волн, одновременно разделяющая сигналы нескольких флуоресцентных красителей на одном образце. Метод позволяет визуализировать объект в объеме, наблюдать процессы непосредственно внутри клетки. Высокая скорость сканирования обеспечивает получение данных в динамике по времени, что важно для регистрации физиологических процессов в клетках.

Целью работы было изучение состояния нормальных и апоптотических яйцеклеток мышей с помощью метода конфокальной сканирующей лазерной микроскопии* для потенциального использования в прогнозировании успешности IVF.

Было проведено тестирование 150 яйцеклеток экспериментальных животных (мышей)

с помощью маркеров апоптоза. Исследования проводились на ооцитах мышей F1 (CBA × C57Bl) на стадии метафазы II мейоза (MII), которые были получены от самок возраста 6–8 нед. Изучались как нормальные яйцеклетки, так и яйцеклетки, переведенные в состояние апоптоза [7].

Для получения яйцеклеток у самок вызывали суперовуляцию путем внутрибрюшинного введения гонадотропных гормонов: 5 МЕ гонадотропина сывотки жеребых кобыл (ГСЖК) (folligon, Нидерланды) и через 48 ч 7,5 МЕ хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) (chogulon, Нидерланды).

Ооциты были получены по стандартной методике [8]. Самок забивали путем дислокации шейных позвонков. Нормальные яйцеклетки выделяли через 12–14 ч, апоптотические яйцеклетки — через 18 ч после введения ХГЧ. Ооциты на стадии MII мейоза извлекали путем разрыва ампулы яйцепроводов, предварительно отпрепарированных в питательной среде Дюльбекко с добавкой 10%-ной сыворотки эмбрионов коров (FBS, Sigma). Для очищения ооцитов от клеток кумулюса использовали раствор гиалуронидазы (150 ед./мл) (Sigma, США). Выделенные ооциты трижды отмывали в фосфатно-буферной среде Дюльбекко (Sigma) с 10%-ным содержанием FBS. У полученных ооцитов прижизненно оценивалась морфология, а также учитывались состояние цитоплазмы (прозрачность и плотность) и перивителлинового пространства, наличие первого полярного тельца.

Эксперименты проводились по регламенту, который разработан в соответствии с Общими принципами экспериментов на животных, одобренными I Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, Украина, 2001 г.), и согласован с положениями Европейской конвенции защиты позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, Франция, 1985 г.).

* Автор благодарит за помощь: Е. И. Смольянинову и Л. Г. Чернышенко — в методических разработках, Е. И. Гончарук — в планировании и обсуждении результатов работы, В. С. Холодного и И. Ф. Коваленко — в работе на конфокальном микроскопе (Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков).

Использовали следующие красители: JC-1, JC-9 (Molecular Probes), PI (Sigma), AO (Sigma), Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich), DAPI (Sigma), CFSE (Sigma-Aldrich), AnnCy3/6-CFDA (Sigma-Aldrich).

Данный набор люминесцентных зондов позволил оценить жизнеспособность клеток, изменения функционального состояния митохондрий, нарушения структуры хроматина, выявить проницаемость мембран. Все красители добавляли в среду в конечной концентрации 10–5М/л.

Окрашивание проводилось по стандартной для каждого зонда методике. Оценивали люминесценцию с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Carl Zeiss LSM 510 Meta, свечение образцов зависело от длины волн (табл. 1).

Использование лазерного сканирующего конфокального микроскопа благодаря его высокому разрешению и контрасту позволило изучить структуры клеток и их органелл, а также одновременно разделять сигналы нескольких флуоресцентных красителей на одном образце внутри яйцеклетки (рис. 1).

Компьютерная запись серий оптических срезов позволила наблюдать окрашивание зондами в объеме яйцеклетки, не используя трудоемкую методику изготовления и фотографирования серийных гистологических срезов (рис. 2).

Отчетливо просматривалось взаимное пространственное расположение структур и органелл клетки.

Исследованные яйцеклетки мышей характеризовались средним размером 70 ± 10 мкм и характерной морфологией. Нормальные клетки были округлой формы, имели прозрачную цитоплазму средней плотности, одно полярное тельце. Они равномерно окрашивались CFSE, что свидетельствовало об их жизнеспособности. Нормальные ооциты, маркированные JC-1 и JC-9,

характеризовались свечением преимущественно в оранжевой области спектра, что указывало на высокую активность митохондрий. Hoechst 33342 и DAPI окрашивали ядерный материал в синий цвет, позволяя оценить его морфологические характеристики. Ядерный материал акридин оранж (АО) в красный цвет не прокрашивался.

Яйцеклетки, находящиеся в состоянии апоптоза, на ранних стадиях были округлой, но слегка неправильной формы, имели прозрачную цитоплазму средней плотности, характеризовались средним размером 70 ± 10 мкм, на стадии конденсации — размером 50 ± 10 мкм, неправильной формы, часто вогнутой с краю, с цитоплазмой повышенной плотности. На стадии фрагментации происходил распад яйцеклетки на отдельные фрагменты.

Следует отметить, что все клетки дали положительный ответ на окрашивание прижизненным красителем CFSE, что свидетельствует об отсутствии мертвых клеток среди исследованных. Этот краситель, переходя во флуоресцирующую форму при наличии эстеразной активности в клетке, позволял оценивать жизнеспособность яйцеклетки на момент окрашивания. Маркируя содержимое живых клеток, он также дал возможность определить морфологию ооцита (рис. 3).

Было проведено исследование нормальных и апоптотических яйцеклеток с помощью карбоцианиновых зондов JC-1 и JC-9. Являясь сходными, но несколько отличаясь по динамике реагирования и критическому потенциалу, эти красители характеризовали состояние потенциала мембран митохондрий. Окрашивание показало, что значение отношения оранжевого/зеленого свечения в апоптотических клетках по сравнению с нормальными падает. Таким образом, происходит уменьшение количества J-агрегатов, что отображает снижение энергетического статуса апоптотических клеток (рис. 4, 5).

Таблица 1

Длины волн возбуждения/испускания флуоресцентных красителей

Зонд	Возбуждение, нм	Испускание, нм
Пропадидий йодид (PI)	536	623
АО, комплекс с NA	480	520
АО, комплекс с RNA	440–470	650
Хехст 33342 (Hoechst 33342)	340	450
DAPI (4'6-диамидино-2-фенилиндол-цигидрохлорид)	358	461
CFSE	495 (492)	519 (517)
JC-1	520	Мономерная форма 530 ± 15 J-агрегаты в митохондриях $590\pm 7,5$
JC-9	520	Мономерная форма 530 ± 15 J-агрегаты в митохондриях 590–635
AnnCy3/6-CFDA	543 494	max 570 518

Процессы апоптоза в классическом представлении сопровождаются характерными изменениями морфологии ядра клетки, отражающими последовательно происходящие процессы кариопикноза, кариорексиса и кариолизиса.

Флюоресцентные красители DAPI и Hoechst 33342 прокрашивали ядерный материал как нормальных клеток, так и апоптотических, позволяя оценить его морфологию (рис. 6, 7). Так, на рис. 6 (3) четко определяется пронуклеус (III), находящийся в стадии кариолизиса.

Наличие разрывов ДНК при отсутствии яркой морфологической картины может помочь в объяснении снижения способности к оплодотворению ооцитов с визуально неизменной морфологией, оцененной при световой микроскопии. Образующиеся одно- и двунитевые разрывы, выявляемые при окрашивании АО, позволяют констатировать наличие характерных для апоптоза изменений еще до появления морфологических признаков в виде распада ядра на фрагменты и появления апоптотических телец. Окрашивание в красный цвет АО пронуклеусов изученных с помощью этого красителя клеток указывало на наличие однонитевых и двунитевых разрывов ДНК (рис. 8 б, в). В нормальной яйцеклетке отсутствует свечение пронуклеуса в красной области (рис. 8 а).

С помощью флюоресцентного красителя PI — пропидиума йодида — определялась целостность мембран яйцеклеток, так как известно, что он проникает только через поврежденные клеточные мембраны и окрашивает ядерный материал (рис. 9).

С помощью двойной метки — Annexin V-Cy3.18 (AnnCy3) и 6-carboxyfluorescein diacetate (6-CFDA) — можно было различить живые нормальные, апоптотические и некротические клетки.

Жизнеспособные нормальные клетки окрашивались только 6-CFDA в зеленый цвет. Среди исследованных яйцеклеток не обнаружены некротические, которые должны были окрашиваться AnnCy3 в желтый цвет. Апоптотические клетки маркировались обоими красителями (рис. 10).

В результате проведенных исследований выяснилось, что апоптотические яйцеклетки характеризовались следующим набором признаков: значение отношения оранжевого/зеленого свечения по сравнению с нормальными падало (JC-1, JC-9) даже на ранних стадиях, когда форма еще не изменялась; окрашивание в красный цвет пронуклеусов

ооцитов АО указывало на наличие однонитевых и двунитевых разрывов ДНК; ядерный материал у клеток с поврежденными мембранами окрашивался PI; морфология ядер претерпевала характерные изменения, что четко выявлялось с помощью зондов DAPI и Hoechst 33342. Форма апоптотических клеток на ранних стадиях не отличалась от нормальной, а на поздних ее изменения были выявлены с помощью CFSE. Апоптотические клетки окрашивались двойной меткой AnnCy3/6-CFDA в зеленый и желтый цвета.

Таким образом, яйцеклетки мышей, введенные в состояние экспериментального апоптоза, имели характеристики, типичные для его стадий (от начальной до развернутой). Выбранный набор красителей позволил охарактеризовать морфофункциональное состояние клетки, а именно: жизнеспособность, форму, активность энергетической системы, состояние ядерного материала. На основании проведенных экспериментов можно сделать вывод о том, что при использовании сканирующего конфокального микроскопа Carl Zeiss LSM 510 Meta и примененного набора метчиков представляется возможным выявить отличия яйцеклеток, находящихся в состоянии нормального функционирования и экспериментального либо спонтанного апоптоза.

Обнаружение процессов апоптоза в ооцитах на ранних этапах, когда еще отсутствуют морфологические критерии, позволит диагностировать патологическое состояние ооцитов при минимальных изменениях и прогнозировать результаты эмбриологического этапа IVF. Наличие же выраженных признаков апоптоза в неоплодотворенных ооцитах может быть ценной информацией с точки зрения объяснения причин отсутствия оплодотворения в программе IVF.

Следует отметить, что в последние годы большой интерес практиков вызывает проблема селекции эмбрионов для переноса в полость матки с целью минимизации их количества и снижения риска многоплодия в результате IVF. Оценка процессов апоптоза в неоплодотворенных ооцитах и заблокированных эмбрионах, а также экспериментальные исследования на модели в перспективе дадут возможность определить новые неморфологические критерии оценки жизнеспособности, метаболизма, а следовательно, качества яйцеклетки и эмбриона.

Литература

1. Antczak M., Van Blerkom J. Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains // Hum. Reprod.— 1999.— Vol. 14 (2).— P. 429–447.
2. Apoptosis in the pre-implantation embryo / R. Levy, M. Benchaib, H. Cordonier, J. F. Guerin // Contracept. Fertil. Sex.— 1998.— Vol. 26 (7–8).— P. 536–541.
3. Hyperglycemia induces apoptosis in pre-implantation embryos through cell death effector pathways / K. H. Moley, M. M. Chi, C. M. Knudson et al. // Nat. Med.— 1998.— Vol. 4 (12).— P. 1421–1424.
4. Expression of 11 members of the BCL-2 family of apoptosis regulatory molecules during human preimplantation embryo development and fragmentation / A. D. Metcalfe, H. R. Hunter, D. J. Bloor et al. // Mol. Reprod. Dev.— 2004.— Vol. 68 (1).— P. 35–50.

5. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флюоресцентные зонды в исследованиях биологических мембран.— М.: Наука, 1980.— 320 с.
6. Methods in cell biology. Vol. 70. Cell biological applications of confocal microscopy.— 2-nd ed. / Ed. B. Matsumoto.— N. Y.: Acad. Press, 2002.— 507 p.
7. Takase K., Ishikawa M., Hoshiai H. Apoptosis in the degeneration process of unfertilized mouse ova // Tohoku J. Exp. Med.— 1995.— Vol. 175.— P. 69–76.
8. Биология развития млекопитающих. Методы / Под ред. М. Манк.— М.: Мир, 1990. — 406 с.

МОЖЛИВОСТІ КОНФОКАЛЬНОЇ СКАНУЮЧОЇ ЛАЗЕРНОЇ МІКРОСКОПІЇ ЩОДО ОЦІНКИ ПРОЦЕСІВ АПОПТОЗУ В ЯЙЦЕКЛІТИНАХ

М. Г. ГРИЩЕНКО

Вивчено стан нормальних і апоптотичних яйцеклітин мишей за допомогою метода скануючої конфокальної лазерної мікроскопії. Використання мікроскопу Carl Zeiss LSM 510 Meta і запропонованого набору мітчиків дає можливість виявити відмінності у стані нормально функціонуючих і таких, що перебувають у стані експериментального або спонтанного апоптозу, яйцеклітин на ранніх стадіях.

Ключові слова: запліднення *in vitro*, яйцеклітина, апоптоз, конфокальна скануюча лазерна мікроскопія.

CAPABILITIES OF CONFOCAL SCANNING LASER MICROSCOPY IN ASSESSMENT OF APOPTOSIS PROCESSES IN OVA

N. G. GRISCHENKO

The state of normal and apoptotic ova of mice was investigated using scanning confocal laser microscopy. The use of Carl Zeiss LSM 510 Meta microscope and the suggested kit of labels allow early revealing the difference in the state of normally functioning and in the state of the ova with experimental or spontaneous apoptosis.

Key words: *in vitro* fertilization, ovum, apoptosis, confocal scanning laser microscopy.

Поступила 19.05.2010