

МАРКЕРЫ АПОПТОЗА КАК ПРЕДИКТОРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Доц. Н. Г. ГРИЩЕНКО

Харьковский национальный медицинский университет

Показано, что классические маркеры апоптоза и оценка морфологического состояния могут иметь предиктивную значимость при селекции компетентных яйцеклеток в рамках вспомогательных репродуктивных технологий. Не выявлено связи между уровнем sFas в фолликулярной жидкости и исходом экстракорпорального оплодотворения. Обнаружено разобщение процессов апоптоза и иммунных механизмов регуляции при хроническом воспалительном процессе.

Ключевые слова: апоптоз, бесплодие, яйцеклетки, эмбрионы, экстракорпоральное оплодотворение, воспаление.

Несмотря на стремительное развитие и распространение вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), частота наступления беременности в результате *in vitro fertilization* (IVF) все еще остается относительно низкой и не превышает 40% на один лечебный цикл [1].

Не вызывает сомнений тот факт, что морфофункциональное состояние яйцеклетки отражается на ее способности к оплодотворению, формированию морфологически полноценного эмбриона, способного к имплантации и перспективного для криоконсервирования, что является одним из факторов, определяющих результаты IVF. Крайне важно как с практической, так и с этической точек зрения иметь набор достоверных тестов, позволяющих на самых ранних этапах определять состояние яйцеклетки, прогнозировать результат IVF и проводить селекцию эмбрионов, пригодных для криоконсервирования. Существуют исследования, которые позволяют предположить, что причину неуспеха ВРТ надо искать в области, связанной с апоптозом [2–5]. Как известно, апоптоз — это форма запрограммированной клеточной гибели, вовлеченная в процессы эмбрионального развития и затем клеточного гомеостаза на протяжении всей жизни [5]. Результаты исследований убедительно доказали, что процессы апоптоза непосредственно участвуют в определении судьбы фолликула и играют большую роль в фолликулярной атрезии [6]. Возможно, что именно апоптотический процесс является инструментом элиминации ооцитов, неспособных к оплодотворению [7].

Есть указания на то, что апоптоз может быть вызван субоптимальными условиями культивирования, но существует большая вероятность того, что первичной причиной неудовлетворительного исхода ВРТ является предварительно инициированный в яйцеклетке каскад апоптотических реакций [4]. Привлекательной представляется перспектива использования маркеров апоптоза в качестве современного теста селекции компетентных яйцеклеток и эмбрионов, которые ранее

отбирались посредством оценки преимущественно морфологических критериев.

Таким образом, существует потребность идентифицировать новые маркеры, особенно вовлеченные в ранние события в пределах регуляции апоптотических процессов в клетке. На подобную роль претендуют члены семейства каспаз, рецептор тирозин-киназы NrkB, IL-6 и цитокины суперсемейства фактора некроза опухолей [8–10], в частности трансмембранный белок Fas. Открытый около 20 лет назад специализированный рецептор для индукции апоптоза CD-95 (Fas/APO-1) размещен на цитоплазматической мембране. Связывание с ним моноклональных антител или специфического лиганда (FasL) индуцирует апоптоз в апоптоз-чувствительных Fas-положительных клетках. Имеются данные, что эта сигнальная система характерна для индуцирования апоптоза в яичнике в постнатальном периоде [11]. Так, установлено, что FasL экспрессируется в ооцитах, полученных из первичных, вторичных и третичных фолликулов. Это является дополнительным доказательством того факта, что система Fas/Fas-L принимает непосредственное участие в процессах апоптоза в яйцеклетке [12]. Более того, активация Fas-индуцированного апоптоза в процессе созревания ооцита *in vitro* приводит к интенсификации процессов апоптоза в клетках кумулюса [13] и гранулезы [14].

Существует растворимая форма этого рецептора — sFas, которая конкурирует с мембранно-связанным Fas в связывании лиганда. Предполагается, что sFas выступает в качестве ингибитора связывания Fas с FasL и блокирует Fas-опосредованный апоптоз. Известно, что он обнаруживается в достаточных высоких концентрациях как в фолликулярной жидкости, так и в культуральной среде, в которой инкубировали ооцит-кумуляные комплексы [15].

Задачей нашего исследования было определение возможных связей между маркерами апоптоза, морфофункциональным состоянием ооцитов,

эмбрионов, профилем иммунокомпетентных клеток и цитокинов в периферической крови и фолликулярной жидкости. Целью исследования был поиск прогностических апоптотических маркеров, позволяющих оценивать исход оплодотворения яйцеклетки в IVF.

Клинический материал (неоплодотворившиеся ооциты, а также ооциты с признаками аномального оплодотворения) был получен у пациенток, обратившихся в центр репродукции «Имплант» для лечения бесплодия и у добровольных доноров яйцеклеток, согласившихся участвовать в исследовании.

Перед включением в протокол индукции суперовуляции бесплодные супружеские пары и доноры ооцитов были обследованы в общепринятом объеме согласно клиническому протоколу МЗ Украины, регламентирующему тактику ведения женщин с бесплодием [16].

При индукции суперовуляции был использован общепринятый «длинный протокол» с десенситизацией гипофиза, начинающейся в лютеиновой фазе цикла, предшествующего лечебному, с применением «дейли»-форм аналогов гонадотропин-рилизинг гормона (трипторелин, диферелин, Beaufour Ipsen Pharma). Для индукции фолликулогенеза применялся препарат рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (гонал-ф, Serono). Мониторинг фолликулогенеза и изменений структуры эндометрия проводили с помощью динамической фолликулометрии при ультразвуковом сканировании органов малого таза с интервалом 1–3 сут. Исследование осуществлялось ультразвуковым экспертным монохромным сканером Falcon 2101 EXL B-K Medical (Дания). При этом использовался вагинальный секторальный датчик с частотой сканирования 7,5 МГц. Через 34–35 ч после введения триггерной дозы хорионического гонадотропина (10000 ЕД, прегнил, Schering-Plough), имитирующего эндогенный пик лютеинизирующего гормона, у всех пациенток, включенных в исследование, под ультразвуковым контролем в асептических условиях была проведена аспирация содержимого фолликулов с использованием специализированного аспиратора (Cook Aspiration Unit, K-MAR-5200 Vacuum Pump, COOK MEDICAL INC).

Эмбриолог проводил поиск в аспиратах ооцит-кумулюсных комплексов и перенос их в среду культивирования.

Инсеминация яйцеклеток и культивирование эмбрионов осуществлялись в секвенционных коммерческих средах COOK (William A. Cook Australia Pty. Ltd) согласно общепринятым протоколам и рекомендациям производителя. Контроль оплодотворения производился через 18 ч после инсеминации ооцитов.

Для дальнейшего анализа использовался исключительно тот материал, который невозможно применить в клинических целях. Данные биологические объекты отбирались эмбриологами,

оценивались коллегиально двумя специалистами и передавались в исследовательскую лабораторию в течение 40 мин в культуральной среде, содержащей HEPES буфер в условиях гипотермии (на хладагенте).

Были изучены 135 неоплодотворившихся ооцитов от 35 женщин — IVF-пациентов (возраст в 22% случаев составлял около 30 лет, а в 78% приближался к 35 годам). Работа с жизнеспособными яйцеклетками по этическим соображениям не проводилась, потому условным контролем служили нормальные яйцеклетки мыши, полученные после индукции суперовуляции ($n = 35$). Эксперименты на животных проводили согласно с Общими принципами экспериментов на животных, одобренными I Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, Украина, 2001 г.) и положениями Европейской конвенции защиты позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, Франция, 1985).

Для оценки процессов апоптоза в ооцитах использовались следующие красители: JC-1 (НТК «Институт монокристаллов» НАНУ, г. Харьков), JC-9 («Molecular Probes» Europe BV), пропидиум йодид, PI (Sigma-Aldrich), акридин оранж, AO (Sigma-Aldrich), Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich), DAPI (Sigma-Aldrich), CFSE (Sigma-Aldrich), аннексин-флюоресцеин, AnnCy3/6-CFDA (Sigma-Aldrich). Все красители добавлялись в среду в конечной концентрации 10^{-5} моль/л.

Окрашивание осуществляли по стандартной для каждого зонда методике. Оценка люминесценции проводилась с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Carl Zeiss 510 Meta и люминесцентного микроскопа ЛОМО-МИКМЕД-2.

Для определения растворимого Fas в фолликулярной жидкости (ФЖ) человека использовался метод ИФА (ELISA-набор sCD95, Diaclone, Франция).

Исследованы пробы фолликулярной жидкости 109 пациенток следующих групп: контроль — здоровые доноры яйцеклеток ($n = 24$); группа 1 ($n = 48$) — IVF пациентки с хроническим воспалением органов малого таза, которые дополнительно были разделены на 2 подгруппы в зависимости от результата IVF (подгруппа 1.1 — беременность наступила ($n = 28$), подгруппа 1.2 — беременность не наступила ($n = 20$); группа 2 ($n = 20$) — IVF-пациентки с хроническим воспалением органов малого таза после курса иммунокоррекции экстрактом плаценты (Extractum Placentae, Биофарма, Украина); группа 3 ($n = 17$) — IVF-пациентки с хроническим воспалением органов малого таза после иммунокоррекции криоэкстрактом плаценты (криоцелл — криоэкстракт плаценты, криоцелл КП, сертификат о гос. регистрации Украины № 604/06300200000 от 04.07.2006 г.).

В фолликулярной жидкости и периферической крови были изучены популяции и субпопуляции Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, НК-клеток.

Кроме того, рассчитывался иммунорегуляторный индекс (ИРИ) как отношение содержания (в %) $CD4^+$ клеток (Т-хелперы) к $CD8^+$ (Т-супрессоры). Были оценены также содержание клеток с фенотипом $CD4^+CD25^+$ (Т-reg) и степень экспрессии антигенов главного комплекса гистосовместимости II класса (HLA-DR) на клетках лимфоцитарного и нелимфоцитарного ряда. Основные технологические процессы аттестации вышеуказанных показателей были выполнены на проточном цитометре FACS-Calibur (США) с использованием моноклональных антител Becton Dickinson (США) к соответствующим антигенным эпитопам.

Определение концентрации интерлейкинов IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 в периферической крови и ФЖ пациентов проводили на микропланшетном микроанализаторе Stat Fax 2100 (США) иммуноферментным методом с применением набора реактивов ООО «Цитокин» (Россия) согласно рекомендациям производителя.

Первым этапом нашего исследования было тестирование яйцеклеток экспериментальных животных (мышей) с помощью маркеров апоптоза [17]. Предполагалось, что выбранный набор люминесцентных зондов позволит оценить изменения функционального состояния митохондрий, структуру хроматина, а также выявить проницаемость мембран.

На рис. 1 представлены микроскопические изображения свежeweделенных ооцитов мыши на стадии мейоза М II. Оценка морфологии ооцитов и состояния хромосомного аппарата с помощью PI и Hoechst 33342, а также аннексина-флюоресцеина показала интактную морфологию: наличие полярного тельца, правильную округлую форму яйцеклетки, прозрачную цитоплазму (рис. 1–3). Во всех изученных образцах признаки апоптоза не наблюдались.

Затем были исследованы неоплодотворившиеся ооциты женщин — IVF-пациентов с бесплодием, обусловленным хроническими воспалительными заболеваниями органов малого таза. Все ооциты человека имели нарушения морфологии: от минорных до выраженной степени. Эти изменения проявлялись в деформации клеток (рис. 4.1), конденсации цитоплазмы и ядерного материала, инвагинации плазматической мембраны (рис. 4.2), в ряде случаев наблюдалась морфологическая картина «виноградной грозди» (рис. 4.3).

Наряду с ооцитами без признаков оплодотворения встречались яйцеклетки с проникшими внутрь сперматозоидами. Примерно в 30% яйцеклеток было аномальное (рис. 5) количество пронуклеусов (3–5).

Изучение ядерного материала, проведенное с использованием красителей Hoechst 33342 и DAPI, показало наличие фрагментации ядер у 54 из 135 исследованных объектов, что составляет 40% (рис. 6).

Как известно, в клетках, находящихся на ранней стадии апоптоза, снижается мембранный

потенциал митохондрий. Его падение обусловлено увеличением проницаемости внутренней мембраны митохондрий вследствие образования пор. Изучение функционального состояния энергетической системы неоплодотворившихся яйцеклеток с помощью зондов JC-1 и JC-9 показал — уровень активности митохондрий в той или иной степени был ниже контрольного уровня, на что указывало более высокое соотношение зеленого/оранжевого свечения. Подобные изменения состояния митохондриального аппарата свидетельствуют о наличии начальных стадий апоптоза. С течением времени при вхождении яйцеклетки в более глубокий апоптоз наблюдалось дальнейшее увеличение коэффициента соотношения зеленого/оранжевого свечения, что свидетельствовало о падении потенциала на внутренних мембранах митохондрий.

При маркировании АО в 46,2% случаев изученных с помощью этого красителя клеток определялось окрашивание ядерного аппарата в красный цвет, что указывало на наличие однонитевых и двунитевых разрывов ДНК (рис. 7).

Повреждение мембран, определяемое посредством окрашивания PI, было выявлено в 37% изученных случаев (рис. 8).

Краситель DAPI выявил поздние стадии апоптоза у 65% изученных яйцеклеток. Таким образом, изменения, свидетельствующие о тех или иных стадиях апоптоза, наблюдались во всех исследуемых неоплодотворившихся яйцеклетках. Морфологические признаки, а также результаты люминесцентной микроскопии указывают на то, что ранняя стадия апоптоза наблюдалась приблизительно у 20% изученных яйцеклеток, средняя стадия (стадия конденсации) — в 40% случаев, манифестная (стадия фрагментации) — у 40% исследованных объектов. Полученные результаты согласуются с известными данными о процессах апоптоза в ооцитах как причины нарушения репродуктивной функции, в том числе отсутствия оплодотворения [4, 11, 15, 18].

Взаимосвязи между общей степенью зрелости пула полученных яйцеклеток и картиной апоптоза в изученных зрелых неоплодотворившихся яйцеклетках не установлено.

Таким образом, выбранный набор красителей позволяет охарактеризовать морфофункциональное состояние клетки, а именно ее жизнеспособность, морфологию, активность энергетической системы, состояние ядерного материала. Неоплодотворившиеся ооциты женщин — IVF-пациентов имели характеристики, типичные для стадий апоптоза — от начальной до развернутой. Апоптотические яйцеклетки характеризовались следующим набором признаков: значение отношения зеленого/оранжевого свечения в апоптотических клетках по сравнению с нормальными увеличивалось (JC-1, JC-9) даже на ранних стадиях, когда морфологические признаки отсутствуют; окрашивание в красный цвет АО указывало на наличие однонитевых и двунитевых разрывов ДНК; ядерный

материал у клеток с поврежденными мембранами окрашивался PI. При маркировании Hoechst 33342 и DAPI выявлялась фрагментация ядерного материала. Проведенные эксперименты позволяют сделать вывод о том, что с помощью примененного набора метчиков представляется возможным выявить отличия в состоянии нормально функционирующих и апоптотических яйцеклеток.

Следующим этапом работы было исследование содержания растворимого Fas (sFas) в фолликулярной жидкости человека методом ИФА. Результаты количественного определения sFas представлены на рис. 9.

Достоверных различий между выделенными группами по концентрации sFas в фолликулярной жидкости пациенток выявлено не было. Интересно отметить, что тест определения sFas, который ингибирует Fas-опосредованный апоптоз, был выбран нами как перспективный в прогностическом плане на основании данных работы Ariadne Malamitsi-Puchner et al. [15], в которой были установлены связи между концентрацией sFas и качеством эмбрионов на небольшой выборке (11 пациенток). Наши исследования, проведенные на значительно большей выборке (157 пациенток), не подтвердили данную тенденцию и связь между уровнем sFas в микроокружении ооцита и результатами ВРТ не была обнаружена. Возможно, такое положение вещей характерно для пациенток с хроническими воспалительными заболеваниями органов малого таза, которые составили 1-ю, 2-ю и 3-ю клинические группы. Достаточно сложно определить роль хронического воспалительного процесса в индуцировании апоптоза в ооцитах. Однако следует отметить, что при корреляционном анализе взаимосвязь между концентрацией sFas в ФЖ и эмбриологическими показателями ВРТ не была установлена и в контрольной группе здоровых доноров. Коэффициенты корреляции с такими показателями, как количество (-0,17), морфология (-0,10) и степень зрелости (-0,13) ооцитов, доля ооцитов с признаками нормального оплодотворения (0,26) и эмбрионов 1-го класса (0,26), частота имплантации (0,04) свидетельствуют об отсутствии или крайне незначительной взаимосвязи с концентрацией sFas в фолликулярной жидкости.

Onalan G. C. et al. также изучали уровень растворимого Fas в фолликулярной жидкости нескольких групп пациенток и обнаружили достоверное снижение концентрации sFas у пациенток

с эндометриозом. При этом уровень sFas не был связан с различными результатами IVF — наступившей беременностью и ее отсутствием [19].

Тем не менее при корреляционном анализе полученных данных (рис. 10, 11) выявлено, что этот показатель соотносится с показателями клеточного звена системного (иммунокомпетентные клетки в периферической крови) и местного иммунитета (иммунокомпетентные клетки в ФЖ).

При отсутствии связи между признаками коэффициента корреляции равен 0, при полной прямой и обратной зависимости он равен 1. Коэффициент корреляции, равный по модулю 0,2–0,3, выражает слабую степень связи между событиями; от 0,3 до 0,5 — умеренную степень; от 0,5 до 0,7 — значительную; от 0,7 и выше — высокую степень связи.

В нашем исследовании корреляционные связи наиболее выражены по количеству и силе в группе здоровых доноров яйцеклеток. И, напротив, в 1-й группе (пациенты с хроническими воспалительными заболеваниями органов малого таза) наблюдалось отсутствие корреляционных связей с концентрацией иммунокомпетентных клеток в периферической крови и очевидное уменьшение количества и силы корреляционных связей с содержанием иммунокомпетентных клеток в ФЖ (рис. 11). Следовательно, можно сделать предварительный вывод о разобщении процессов апоптоза и иммунных механизмов регуляции при хроническом воспалительном процессе.

Для изученного спектра интерлейкинов (IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α) в плазме крови и ФЖ умеренных и сильных корреляционных связей с концентрацией sFas обнаружено не было.

Таким образом, в данной работе показано, что классические маркеры апоптоза, такие как мечение флюоресцентными красителями и оценка морфологического состояния, являются применимыми для характеристики состояния апоптоза в ооцитах в циклах ВРТ и могут иметь предиктивную значимость при селекции компетентных яйцеклеток.

Нами не выявлено связи между уровнем sFas в ФЖ и положительным исходом ВРТ, однако обнаружено разобщение процессов апоптоза и иммунных механизмов регуляции при хроническом воспалительном процессе как на системном, так и на местном уровнях. Данный феномен может быть предметом дальнейшего исследования в сфере изучения фундаментальных механизмов бесплодия.

Литература

1. Основы репродуктивной медицины: Практическое руководство / Под ред. проф. В. К. Чайка.— Донецк: ООО «Альматео», 2001.— 618 с.
2. 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.
3. 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.
4. Haouzi D., Hamamah S. Pertinence of apoptosis markers for the improvement of in vitro fertilization

- (IVF) // *Current Med. Chemistry.*— 2009.— Vol. 16.— P. 1905–1916.
5. Барышников А. Ю., Шишкин Ю. В. Иммунологические проблемы апоптоза.— М.: Эдиториал УРСС, 2002.— 320 с.
 6. Feldmann, G., Benifla, J. L., Madelenat P. Apoptosis of granulosa cells as a predictive marker of in vitro fertilization success? // *Gynecol. Obstet. Fertil.*— 2006.— Vol. 34 (7–8).— P. 547–582.
 7. Hurst P. R., Mora J. M., Fenwick M. A. Caspase-3, TUNEL and ultrastructural studies of small follicles in adult human ovarian biopsies // *Hum. Reprod.*— 2006.— Vol. 21 (8).— P. 1974–1980.
 8. Relationships between concentrations of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide in follicular fluid and oocyte quality / K. S. Lee, B. S. Joo, Y. J. Na et al. // *J. Assist. Reprod. Genet.*— 2000.— Vol. 17 (4).— P. 222–228.
 9. Cytokine involvement in oocytes and early embryos / M. Zolti, Z. Ben-Rafael, R. Meirum et al. // *Fertil. Steril.*— 1991.— Vol. 6 (2).— P. 265–272.
 10. The role of interleukin-6 in the regulation of granulosa cell apoptosis during follicular atresia in pig ovaries / A. Maeda, N. Inoue, F. Matsuda-Minehata et al. // *J. Reprod. Dev.*— 2007.— Vol. 53 (3).— P. 481–490.
 11. Tilly J. L. Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*— 2001.— Vol. 2 (11).— P. 838–848.
 12. Granulosa cell apoptosis induced at the penultimate stage of follicular development is associated with increased levels of Fas and Fas ligand in the rat ovary / J. M. Kim, D. L. Boone, A. Auyeung, B. K. Tsang // *Biol. Reprod.*— 1998.— Vol. 58.— P. 1170–1176.
 13. Role of Fas-mediated apoptosis and follicle-stimulating hormone on the developmental capacity of bovine cumulus oocyte complexes in vitro / F. J. Rubio Pomar, B. A. Roelen, K. A. Slot et al. // *Biol. Reprod.*— 2004.— Vol. 71 (3).— P. 790–796.
 14. Cross-Talk between Fas/Fas ligand system and nitric oxide in the pathway subserving granulosa cell apoptosis: a possible regulatory mechanism for ovarian follicle atresia / Q. Chen, T. Yano, H. Matsumi et al. // *Endocrinology.*— 2005.— Vol. 146 (2).— P. 808–815.
 15. Soluble Fas concentrations in the follicular fluid and oocyte-cumulus complex culture medium from women undergoing in vitro fertilization: association with oocyte maturity, fertilization, and embryo quality / A. Malamitsi-Puchner, A. Sarandakou, S. Baka et al. // *J. Soc. Gynecol. Investig.*— 2004.— Vol. 11 (8).— P. 566–569.
 16. Наказ МОЗ України від 15 грудня 2003 р. № 582 «Про затвердження клінічних протоколів з акушерської та гінекологічної допомоги».
 17. Грищенко Н. Г. Возможности конфокальной сканирующей лазерной микроскопии применительно к оценке процессов апоптоза в яйцеклетках // *Международ. мед. журн.*— 2010.— Т. 16, № 3 (63).— С. 63–66.
 18. Wu J., Zhang L., Wang X. Maturation and apoptosis of human oocytes in vitro are age-related // *Fertil. Steril.*— 2000.— Vol. 74 (6).— P. 1137–1141.
 19. Serum and follicular fluid levels of soluble Fas and soluble Fas ligand in IVF cycles / G. Onalan, B. Selam, R. Onalan et al. // *Eur. J. of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.*— 2006.— Vol. 125.— P. 85–91.

МАРКЕРИ АПОПТОЗУ ЯК ПРЕДИКТОРИ ЕФЕКТИВНОСТІ ДОПОМІЖНИХ РЕПРОДУКТИВНИХ ТЕХНОЛОГІЙ

М. Г. ГРИЩЕНКО

Показано, що класичні маркери апоптозу й оцінка морфологічного стану можуть мати предиктивне значення при селекції компетентних яйцеклітин в рамках допоміжних репродуктивних технологій. Не виявлено зв'язку між рівнем sFas у фолікулярній рідині і результатом екстракорпорального запліднення. Виявлено роз'єднання процесів апоптозу та імунних механізмів регуляції при хронічному запальному процесі.

Ключові слова: апоптоз, безпліддя, яйцеклітини, ембріони, екстракорпоральне запліднення, запалення.

APOPTOSIS MARKERS AS PREDICTORS OF AUXILIARY REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES EFFICACY

N. G. GRISCHENKO

It is shown, that classic markers of apoptosis and assessment of the morphological state can have predictive value at selection of competent oocytes in the framework of auxiliary reproductive technologies. The association between the level of sFas in the follicular fluid and outcome of extracorporeal fertilization was not revealed. Discrepancy in the processes of apoptosis and immune mechanisms of regulation at chronic inflammatory processes was revealed.

Key words: apoptosis, infertility, oocytes, embryos, extracorporeal fertilization, inflammation.

Поступила 16.09.2010

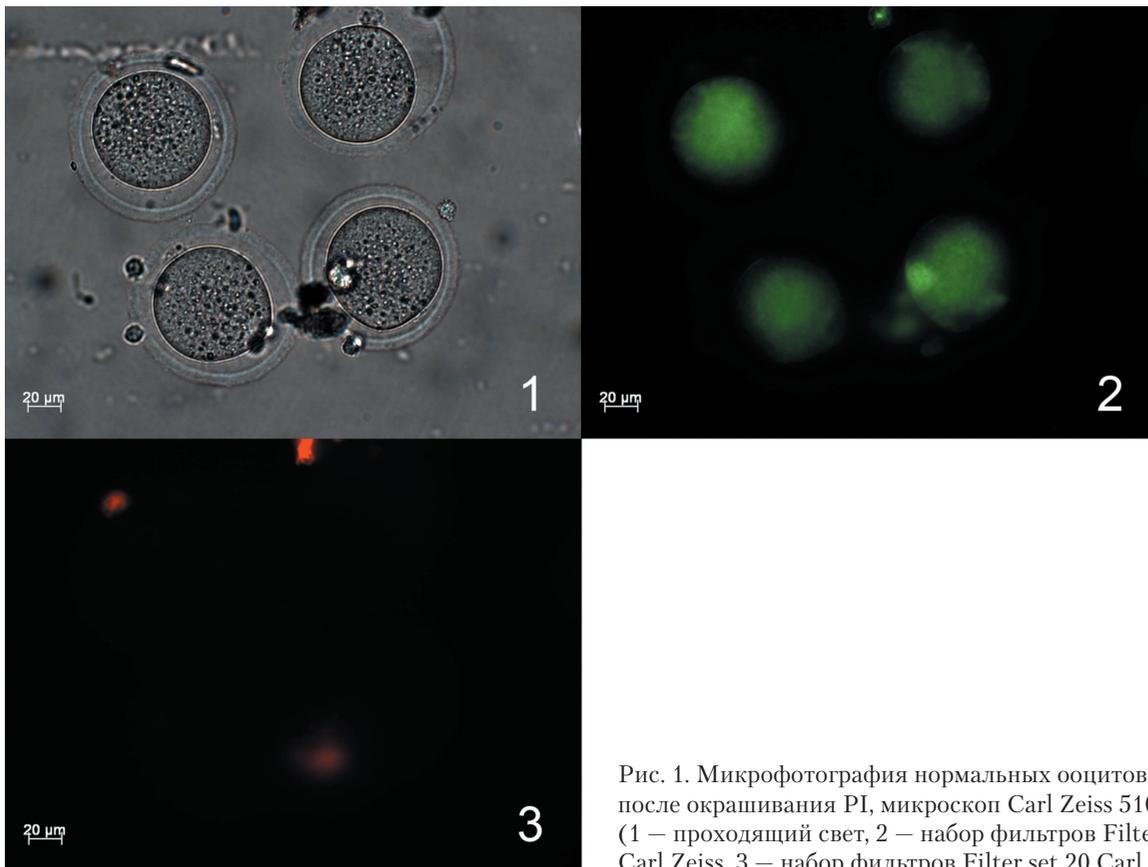


Рис. 1. Микрофотография нормальных ооцитов мыши после окрашивания PI, микроскоп Carl Zeiss 510 Meta (1 – проходящий свет, 2 – набор фильтров Filter set 10 Carl Zeiss, 3 – набор фильтров Filter set 20 Carl Zeiss)

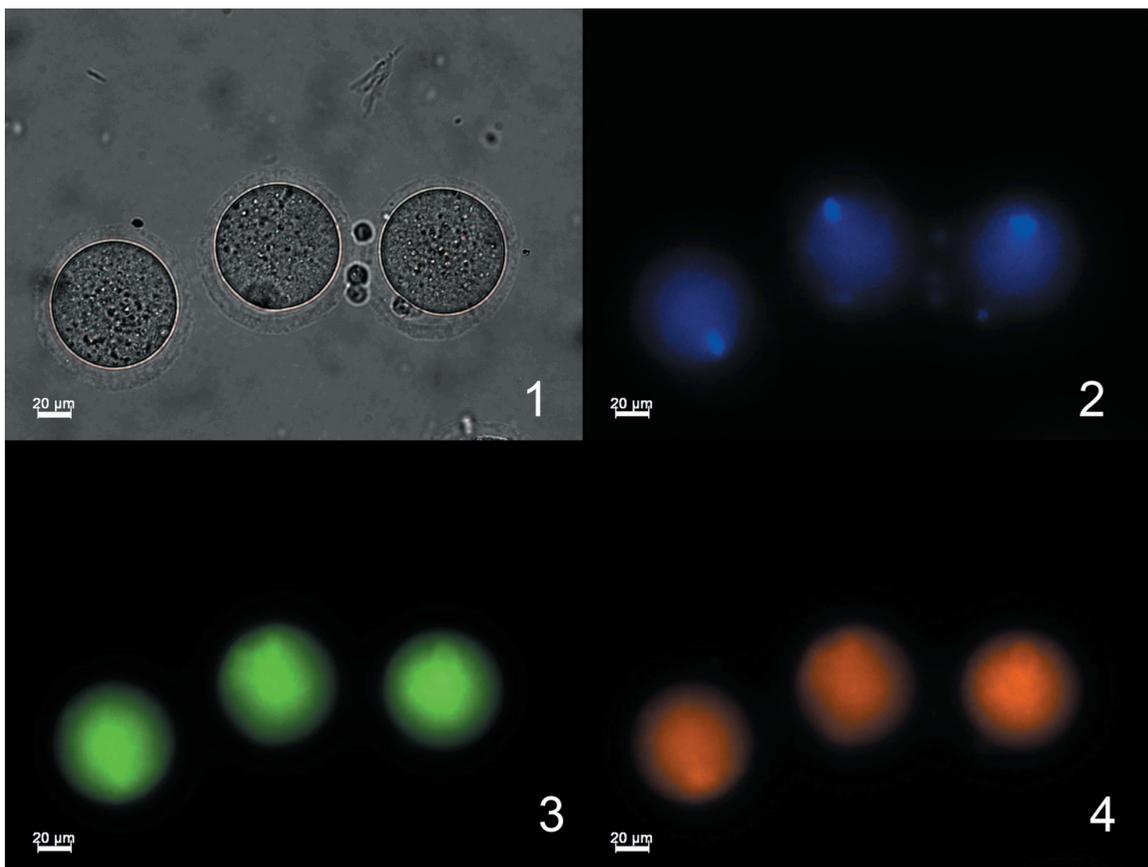


Рис. 2. Микрофотография нормальных ооцитов мыши после окрашивания Hoechst 33342+JC-9, сделанная на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Carl Zeiss 510 Meta (1 – проходящий свет, 2 – набор фильтров Filter set 49 Carl Zeiss, 3 – набор фильтров Filter set 10 Carl Zeiss, 4 – набор фильтров Filter set 20 Carl Zeiss)

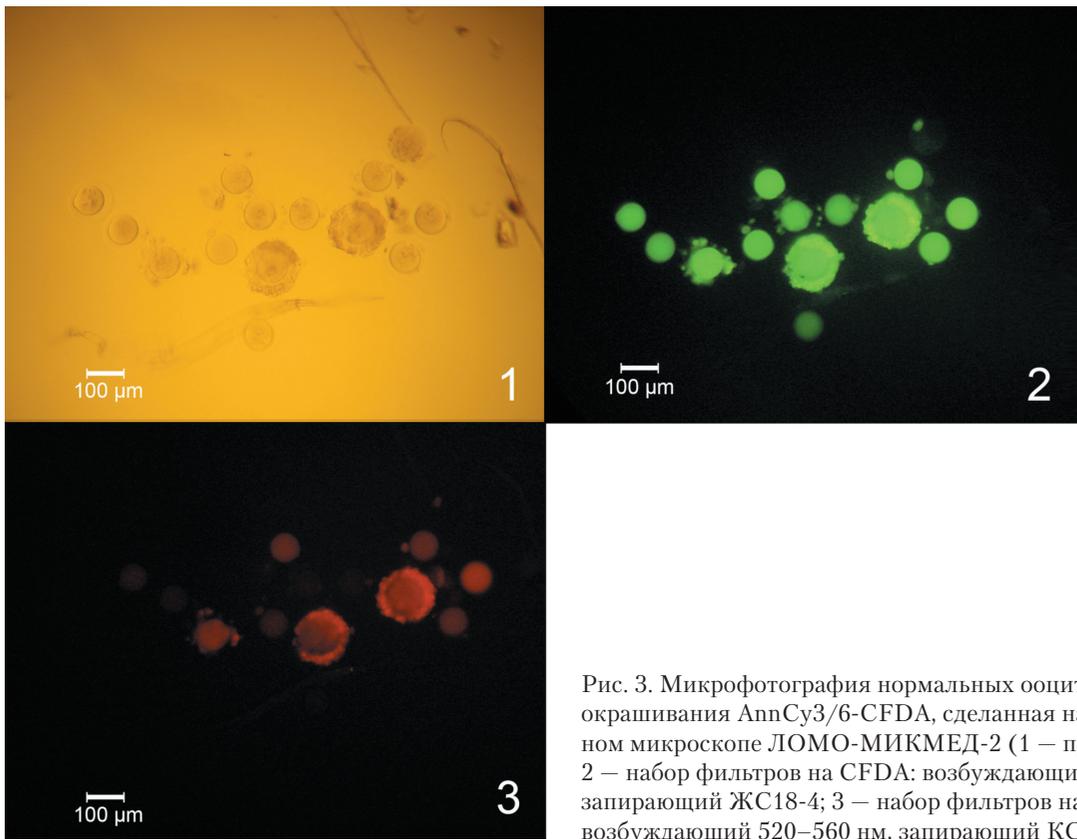


Рис. 3. Микрофотография нормальных ооцитов мыши после окрашивания AnnCy3/6-CFDA, сделанная на люминисцентном микроскопе ЛОМО-МИКМЕД-2 (1 – проходящий свет; 2 – набор фильтров на CFDA: возбуждающий 450–485 нм, запирающий ЖС18-4; 3 – набор фильтров на аннексин: возбуждающий 520–560 нм, запирающий КС13-1)

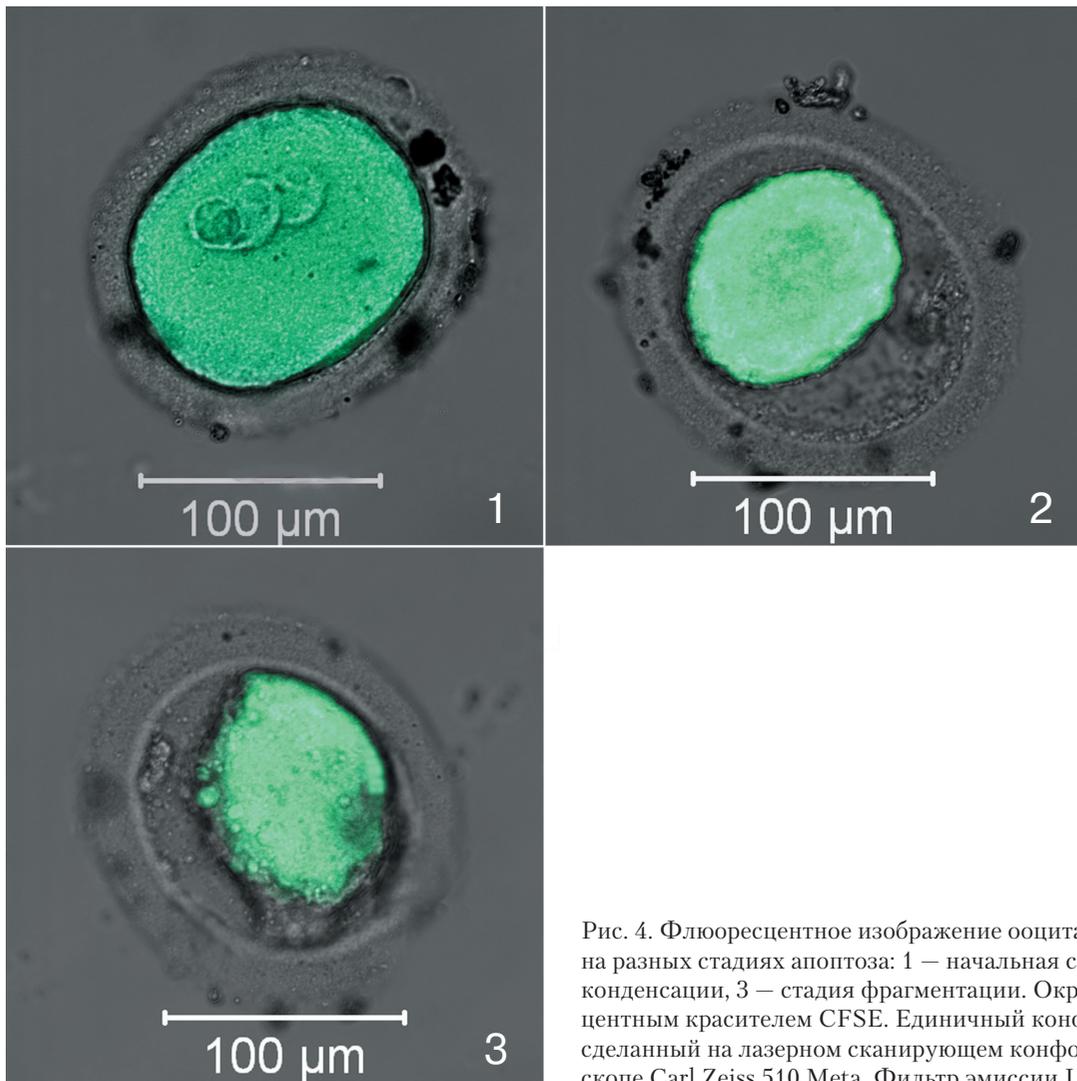


Рис. 4. Флюоресцентное изображение ооцита человека на разных стадиях апоптоза: 1 – начальная стадия, 2 – стадия конденсации, 3 – стадия фрагментации. Окрашено флюоресцентным красителем CFSE. Единичный конфокальный план, сделанный на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Carl Zeiss 510 Meta. Фильтр эмиссии LP 505

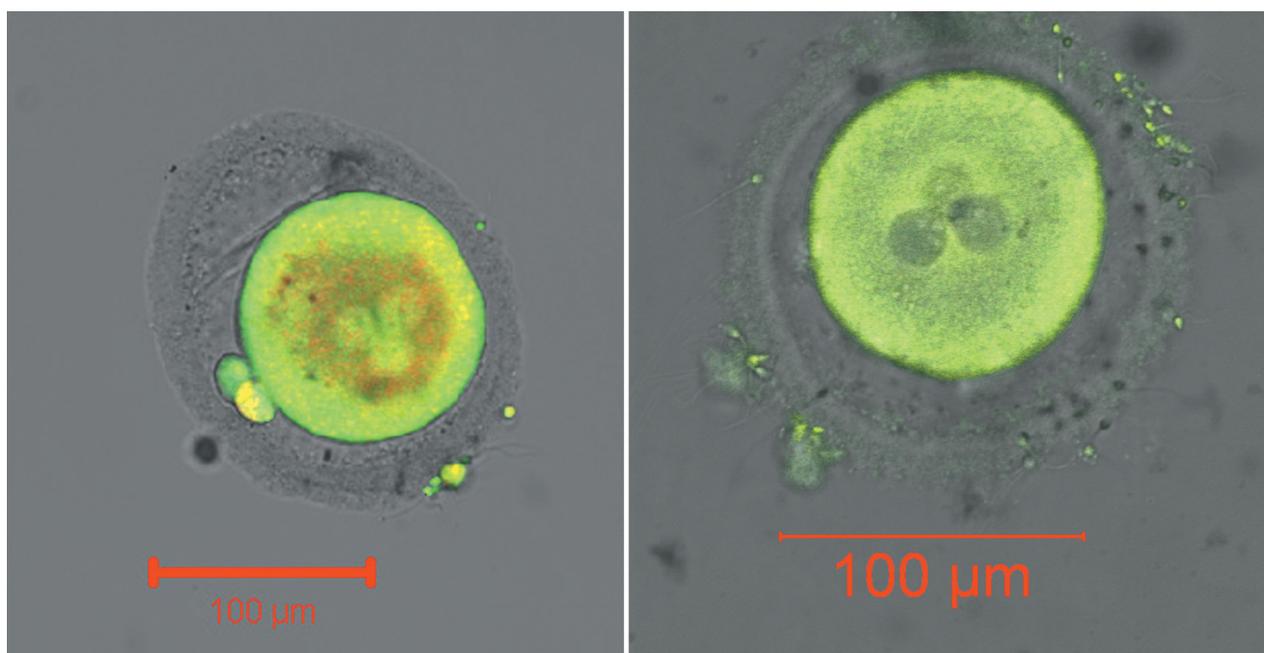


Рис. 5. Флюоресцентное изображение ооцитов человека с 3 пронуклеусами. Окрашено красителями: 1 – АО, 2 – JC-9. Единичные конфокальные планы, сделанные на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Carl Zeiss 510 Meta

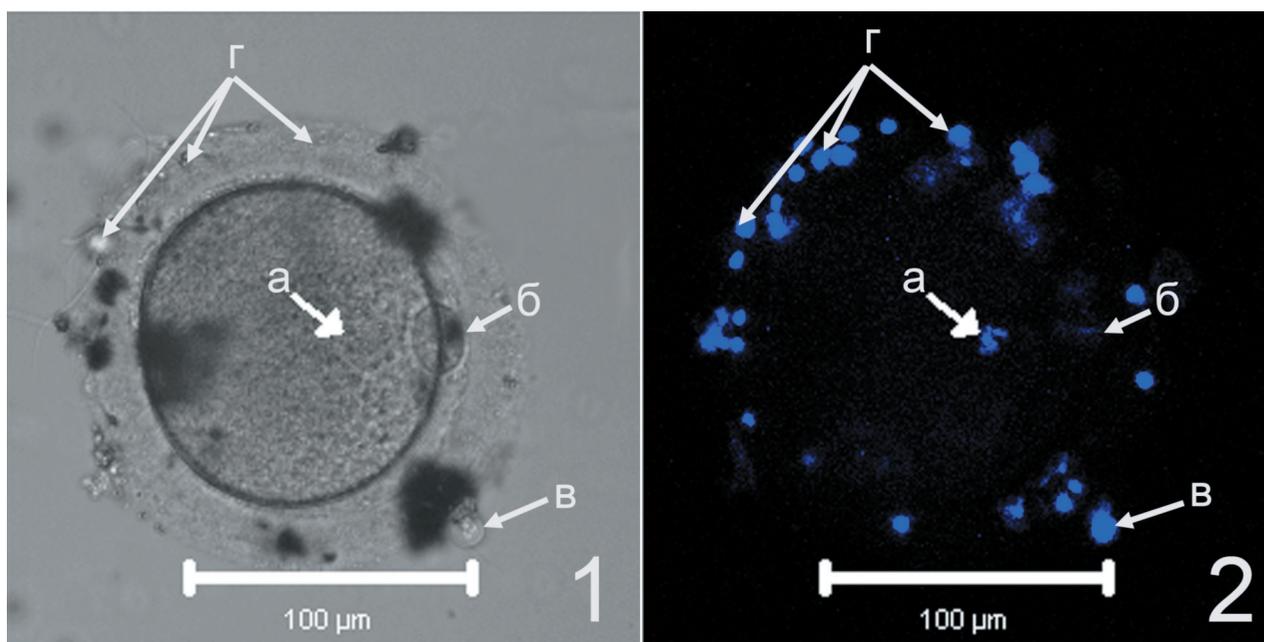


Рис. 6. Флюоресцентное изображение неоплодотворившегося ооцита человека, окрашено DAPI (а – фрагментированный пронуклеус, б – полярное тельце, в – клетка кумулюса, г – сперматозоиды). Единичные конфокальные планы, сделанные на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Carl Zeiss 510 Meta (1 – проходящий свет, 2 – фильтр эмиссии 422–476 нм (DAPI))

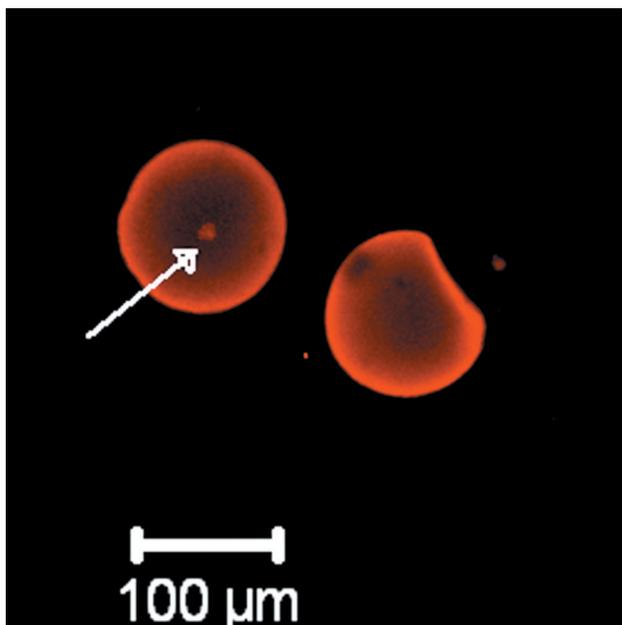


Рис. 7. Флюоресцентное изображение ооцитов человека. Окрашено красителем АО. Стрелкой указан окрашенный пронуклеус. Единичный конфокальный план, сделанный на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Carl Zeiss 510 Meta. Фильтр эмиссии 583–754 нм

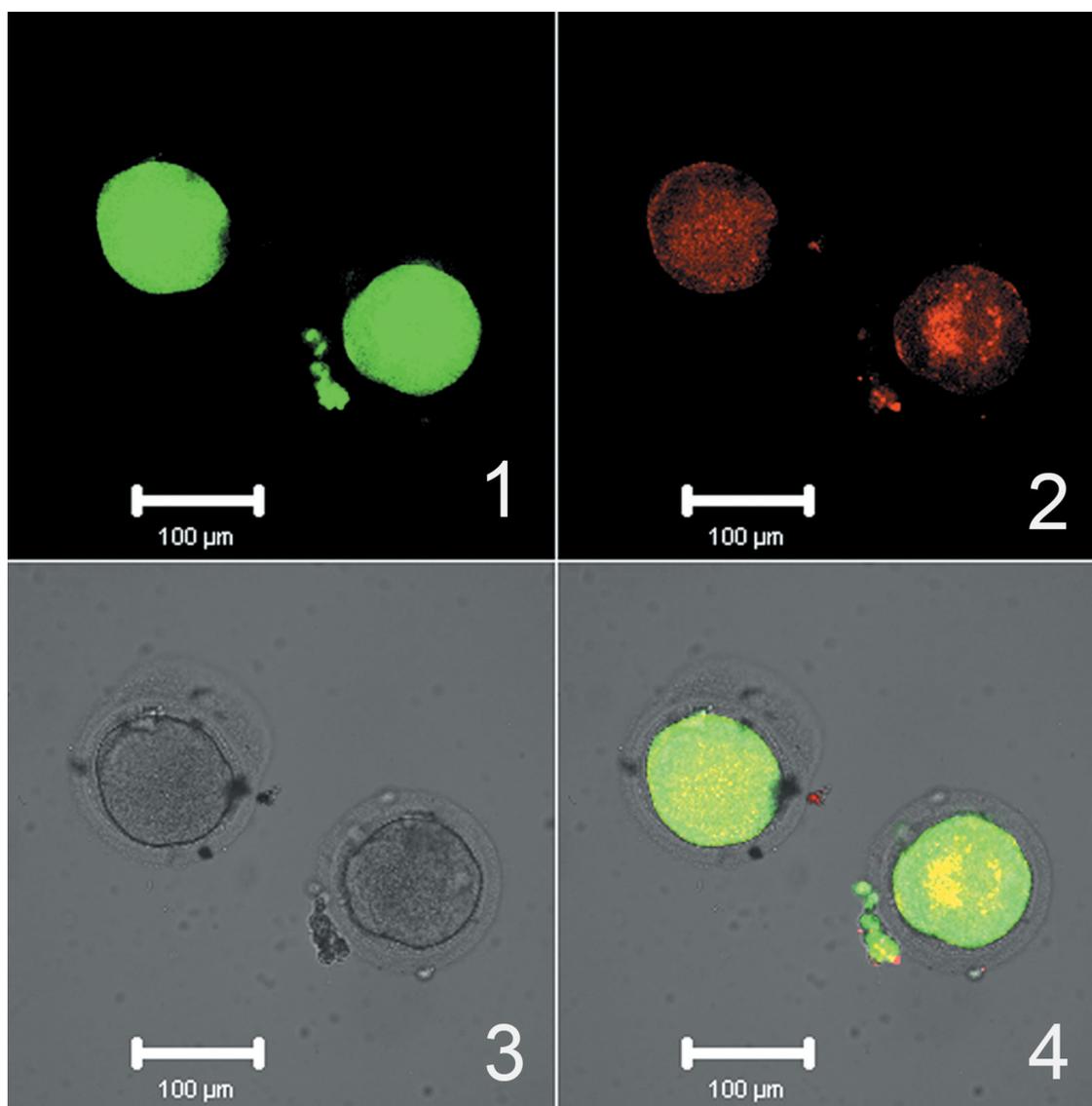


Рис. 8. Флюоресцентное изображение ооцитов человека с поврежденной клеточной мембраной. Окрашено красителем PI. Единичный конфокальный план, сделанный на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Carl Zeiss 510 Meta (1 – фильтр эмиссии 508–561 нм, 2 – фильтр эмиссии 583–754 нм, 3 – проходящий свет, 4 – совмещенный план)

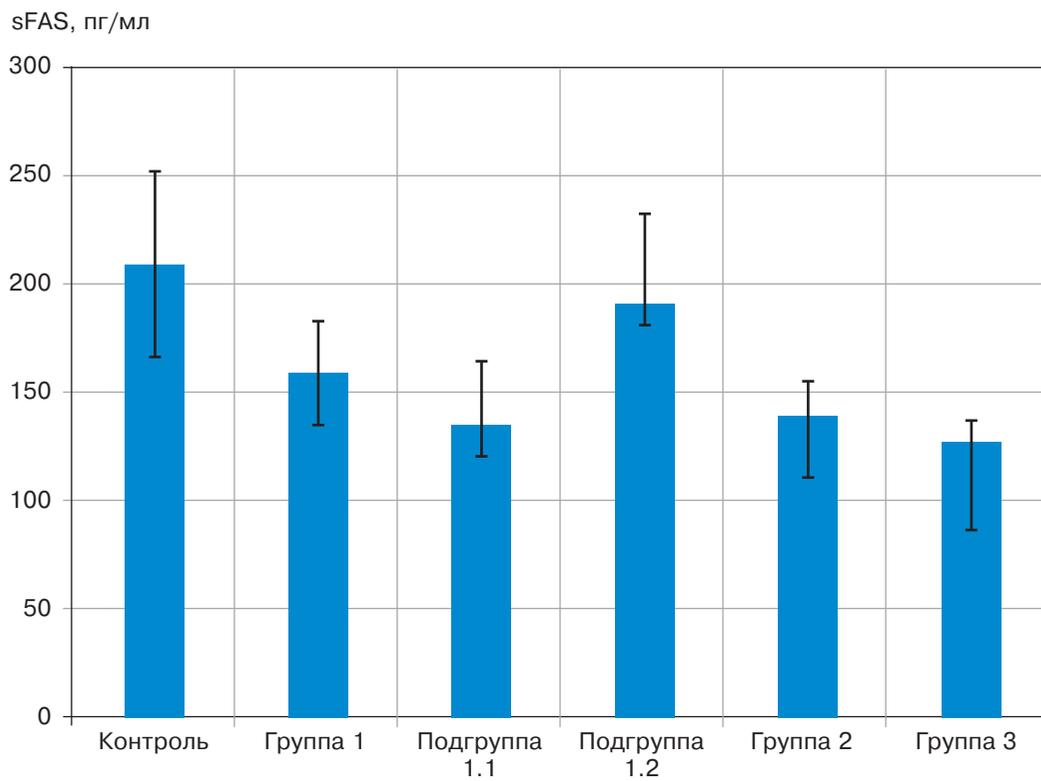


Рис. 9. Концентрация sFas в фолликулярной жидкости пациенток

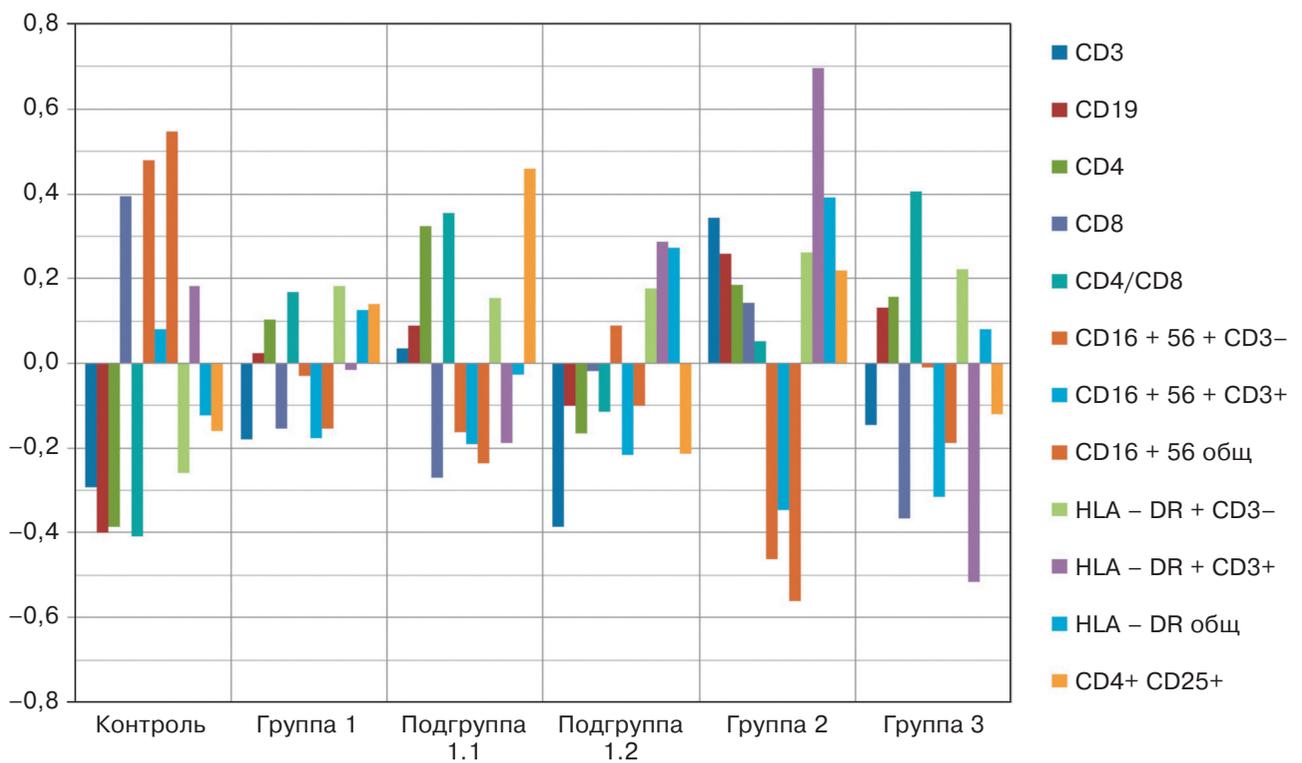


Рис. 10. Корреляция между содержанием sFas в фолликулярной жидкости и профилем иммунокомпетентных клеток в периферической крови пациенток с бесплодием, обусловленным хроническими воспалительными заболеваниями органов малого таза

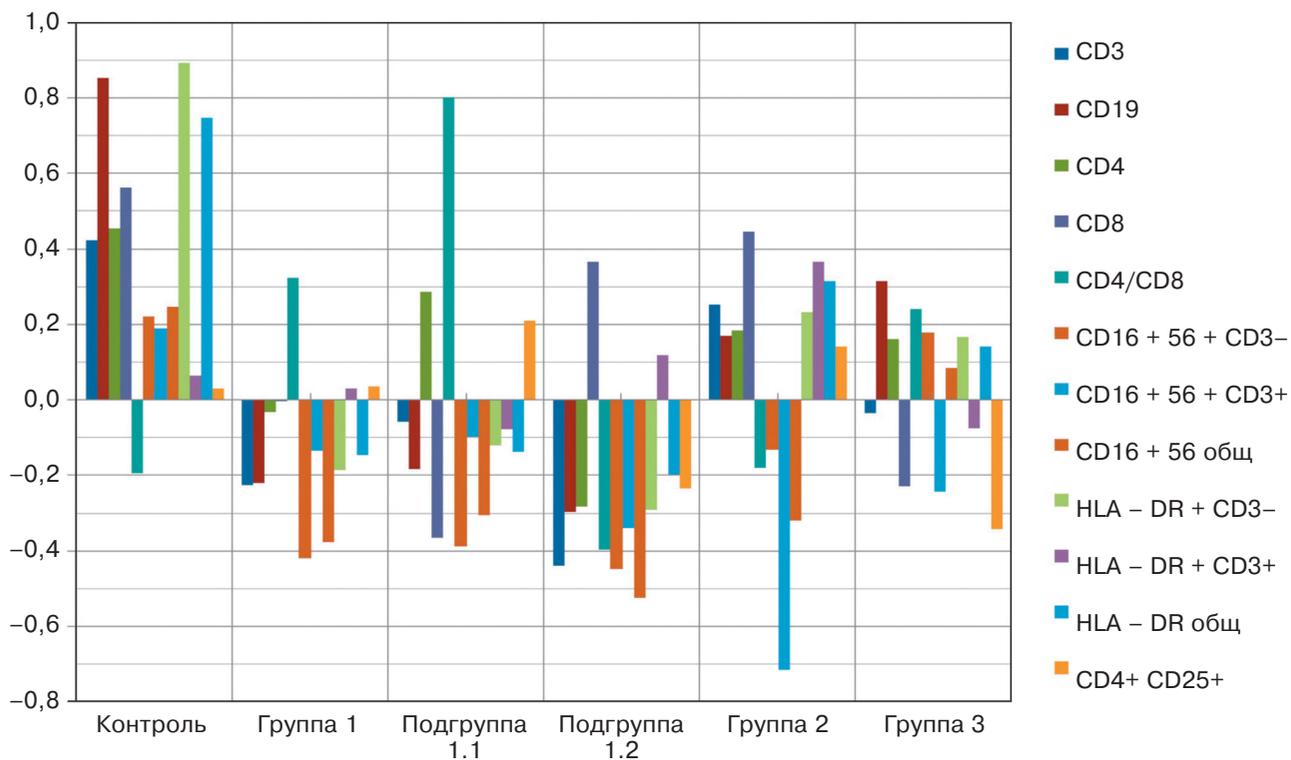


Рис. 11. Корреляция между содержанием sFas и профилем иммунокомпетентных клеток в фолликулярной жидкости пациенток с бесплодием, обусловленным хроническими воспалительными заболеваниями органов малого таза