

УДК: 575.3:57-76

## Предсказание имплантационного потенциала эмбрионов на основе морфологической оценки

Е. А. Храмцова<sup>а</sup>, И. В. Капралова, Л. М. Межевикина

Учреждение Российской академии наук Институт биофизики клетки РАН,  
142290, г. Пушкино, Московская область, ул., Институтская, 3

E-mail: <sup>а</sup>hramelan@gmail.com

Ранние зародыши на стадии бластоцисты, полученные *in vitro*, имеют низкий имплантационный потенциал. Данная работа посвящена оценке морфологии бластоцист, способных имплантироваться после микроинъекции. Скорость восстановления объема бластоцист после микроинъекции позволяет оценивать активность клеток трофобласта, участвующих в имплантации. Предложена модель для прогнозирования эффективности развития зародышей мышей на стадии бластоцисты *in vitro*. Показано, что скорость восстановления морфологии бластоцисты является наиболее важной характеристикой имплантационного потенциала зародышей. Максимальная скорость восстановления внутреннего объема (35.7 % от исходного объема в течение 1 ч) коррелирует со способностью бластоцист формировать первичные колонии эмбриональных клеток через 72 ч *in vitro*, что соответствует процессу имплантации. С помощью ROC-анализа и значения AUC (area under curve) установлено, что комбинация таких признаков как стадия бластоцисты (например средняя или поздняя бластоциста) и скорость восстановления внутреннего объема обладают высокой ценностью для предсказания имплантационного потенциала.

Ключевые слова: стадия бластоцисты, микроинъекция, морфология, имплантация

### Prediction of embryo implantation potential by morphology assessment

E. A. Khramtsova, I. V. Kapralova, L. M. Mezhevikina

*Institute of Biophysics of Cell RAS, 3 Institutskaya str., Pushchino, Moscow region, 142290, Russia*

**Abstract.** – The early embryos developing *in vitro* to the blastocyst stage have low implantation potential. In the current work the microinjection was used to evaluate the most viable blastocysts with high implantation ability on the basis of morphology changing. The recovery rate of the embryo volume allows assessing the functional activity of trophoblast cells that involved in implantation. The predictive model is suggested to forecast the development effectiveness of blastocysts *in vitro*. It's shown the recovery rate of the blastocyst volume after microinjection is the most important feature of implantation potential of early embryos. The maximal recovery rate of blastocyst volume (35.7 % of initial volume per 1 h) correlates with the embryos ability to generate the colonies 72 h after microinjection. By the area under receiver operator curve (AUC) it was shown that combination of such characteristics as blastocyst stage (middle and late) and recovery rate after microinjection allowed to predict the blastocyst development.

Keywords: blastocyst stage, culture, microinjection, morphology, implantation potential

Citation: *Computer Research and Modeling*, 2010, vol. 2, no. 1, pp. 111–116 (Russian).

## Введение

При оплодотворении *in vitro* в матку переносят несколько эмбрионов для повышения эффективности их имплантации. Культивирование эмбрионов от момента оплодотворения до стадии бластоцисты часто приводит к тому, что бластоцисты имеют низкий потенциал к развитию в организме приемной матери. Причинами могут служить хромосомные аномалии и отсутствие в среде культивирования регуляторных факторов, продуцируемых в период беременности. Существующая в настоящее время тенденция пересаживать один эмбрион для того, чтобы избежать развития многоплодных беременностей, предусматривает создание надежных и достоверных критериев морфологической оценки бластоцист перед трансплантацией. Но даже при переносе одной бластоцисты хорошего качества эффективность имплантации не превышает 50 % [Guerif et al., 2009].

Вспомогательный хэтчинг (assisted hatching technology), способствующий выходу бластоцисты из оболочки (*zona pellucida*), увеличивает процент имплантировавшихся эмбрионов [Primi et al., 2004; Guerif et al., 2009]. Процедура микроинъекции, как и вспомогательный хэтчинг, является не только методом физического воздействия на оболочку, но и влияет на развитие бластоцист *in vitro*. Однако при этом происходит перераспределение клеток внутренней клеточной массы (ВКМ) и трофобласта (ТБ), меняется морфология самого зародыша за счет прокола и выхода жидкости из полости.

Объективными критериями оценки морфофункционального состояния на стадии бластоцисты могут служить следующие показатели: объем самого зародыша без оболочки ( $V_i$ ), объем внутренней полости, толщина *zona pellucida* (ZP), а также количество и соотношение клеток ВКМ и ТБ. Эти параметры позволяют оценить имплантационный потенциал каждого отдельно взятого эмбриона с учетом его морфологии и последующее развитие в организме матери. Стадия бластоцисты – это уникальная модель для анализа и моделирования процессов развития в условиях *in vitro*.

Целью данного исследования была разработка точных критериев морфофункционального состояния бластоцист мышей с использованием методов микроинъекции, которые широко применяются в современных репродуктивных технологиях.

## Материалы и методы

**Выделение эмбрионов на стадии бластоцисты.** Бластоцисты вымывали средой M2 (Sigma) из рогов матки мышей линии 129 на 4.5 день беременности.

**Оценка морфологии.** Сразу после выделения бластоцисты оценивали под инвертированным микроскопом с объективом по Хоффману (Olympus XI 70). Разделяли по стадиям развития с учетом размера полости и локализации клеток ВКМ и ТБ. Критерии оценки морфофункционального состояния бластоцист приведены на рис. 1.

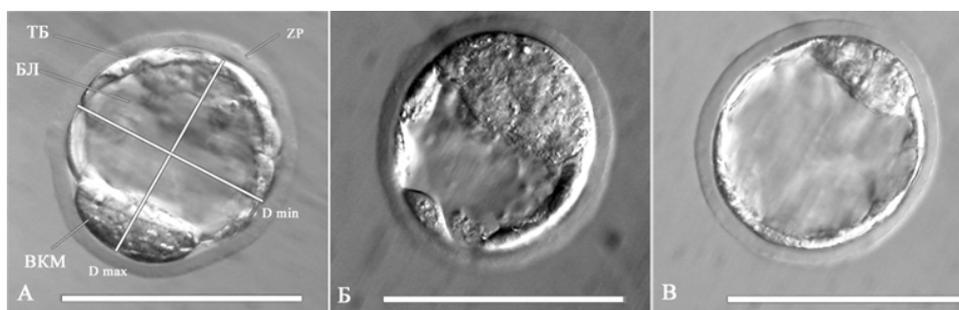


Рис. 1. Схема измерения внутреннего объема  $V_i$  (A)  $V_i = \pi/6 \times D_{\max}^2 \times D_{\min}$ , где  $D_{\max}$  – максимальный диаметр;  $D_{\min}$  – минимальный диаметр; ВКМ – внутренняя клеточная масса; ТБ – трофобласт; БЛ – бластоцель; ZP – *zona pellucida*. Стадии развития бластоцист: средняя (Б), поздняя (В); шкала – 100 мкм

**Микроинъекция.** В полость средних и поздних бластоцист без видимых признаков аномалий развития вводили с помощью микроманипулятора (Erpendorf, Германия) 30–50 нл среды Виттена для культивирования мышинных эмбрионов. Изменение объема ( $V_i$ ) после микроинъекции выражали в относительных единицах для каждого отдельно взятого эмбриона, принимая за 100 % значение этого показателя до микроинъекции. Измерения объемов проводили в течение 3 ч для определения скорости восстановления морфологии в условиях *in vitro*.

**Развитие бластоцист *in vitro*.** Динамику развития бластоцист после микроинъекции оценивали через каждые 24 ч культивирования в стандартных условиях (37° С, 5 % CO<sub>2</sub>) на протяжении 3-х суток. Эффективность развития оценивали по способности бластоцисты выйти из оболочки (24 ч), адгезии к субстрату (48 ч) и формированию первичных колоний эмбриональных клеток (72 ч).

**Статистическая обработка.** Сравнения объемов средних и поздних бластоцист до и после МИ проводили с помощью дисперсионного анализа. Выживаемость зародышей сравнивали с помощью критерия Пирсона ( $\chi^2$ -анализ). Была создана модель, позволяющая предсказывать способность бластоцисты к имплантации на основе математических расчетов таких параметров как скорость восстановления объема и/или морфологии после микроинъекции. Положительным результатом такой оценки считалась способность бластоцисты к адгезии и формированию первичных колоний эмбриональных клеток через 72 ч культивирования. Рассчитывали OR (*Odds Ratio*) отношение шансов, или отношение вероятности, что событие произойдет, к вероятности, что оно не произойдет. Прикрепление бластоцисты к поверхности эмбриологической чашки и наличие первичных колоний в культуре принимали за 1, отсутствие развития – за 0. Для оценки информативности и прогностической ценности модели использовали метод ROC-анализа (*Receiver Operating Characteristic analysis*), включающий в себя соотношение верно классифицированных исходов (результатов) к неверно классифицированным отрицательным результатам. В частности, вначале давали предварительную оценку средним и поздним бластоцистам по морфологии, а затем классифицировали эти стадии по их развитию в культуре. Исходя из этого, определяли чувствительность и специфичность модели. Предсказательную силу (качество) модели оценивали по интервалу AUC (*Area Under Curve*) под ROC-кривой, принимая во внимание, что чем ближе этот показатель к единице, тем выше прогностическая сила модели [Fawsett, 2006]. Использовали следующие критерии оценки модели:

0,9 – 1,0	Отличное
0,8 – 0,9	Очень хорошее
0,7 – 0,8	Хорошее
0,6 – 0,7	Среднее
0,5 – 0,6	Неудовлетворительное.

## Результаты

**1. Развитие мышинных бластоцист *in vitro*.** В работе использовали 68 эмбрионов мышей линии 129/Sv на стадиях средней и поздней бластоцисты, из них 44 бластоцисты подвергались процедуре микроинъекции (МИ). Остальные 24 бластоцисты были интактными и служили в качестве контроля. Результаты развития в опыте и контроле (рис. 2а) показывают, что через 24 ч инкубирования 86.3 % средних и поздних бластоцист после МИ находятся в стадии выхода из оболочки, что достоверно больше по сравнению с 66.7 % в контроле. Через 48 ч вышедшие из оболочки бластоцисты, как правило, прикрепляются к поверхности эмбриональной чашки. И на этом этапе развития в опытной группе прикрепленных (адгезивных) бластоцист было больше, чем в контроле (68.2 % и 45.8 % соответственно). Аналогичная тенденция сохранялась в течение 72 ч культивирования, когда бластоцисты начинают формировать колонии эмбриональных клеток (61.4 % сформированных колоний против 37.5 % в контроле).

Сравнительная оценка средних и поздних бластоцист (рис. 2б) показывает, что процедура МИ стимулирует преимущественно активность поздних бластоцист, у которых хорошо сфор-

мирована внутренняя полость. Поздние бластоцисты после МИ эффективно развиваются в виде первичных колоний (72.7 %), что указывает на высокий имплантационный потенциал. В контрольной группе формируется не более 37.5 % колоний от общего числа бластоцист (рис. 2, а). Полагаем, что такие различия вызваны разными причинами, среди которых центральное место занимает способность бластоцист восстанавливать свою структуру и функции в зависимости от стадии развития.

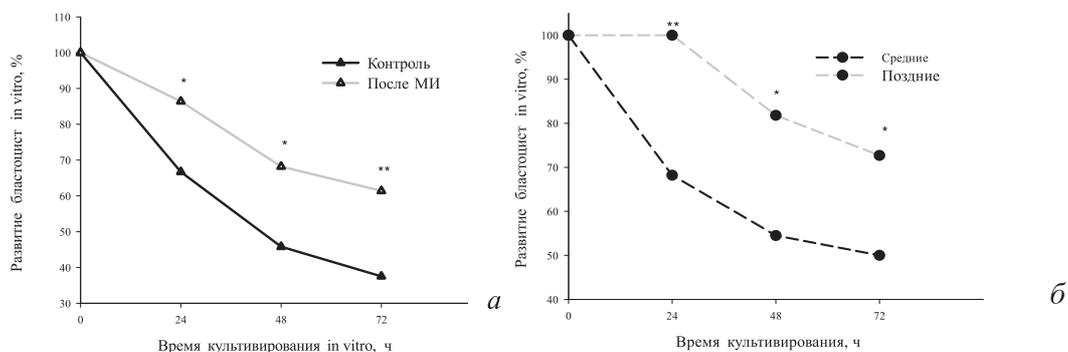


Рис. 2. Эффективность развития мышей линии 129/Sv на стадиях средней и поздней бластоцисты до и после микроинъекции (а), выживаемость средних и поздних бластоцист после микроинъекции (б). МИ – микроинъекция; \* –  $p < 0.05$ ; \*\* –  $p < 0.01$

**2. Изменение объема бластоцисты после микроинъекции.** Было установлено, что после МИ внутренний объем ( $V_i$ ) средней бластоцисты уменьшается на  $22,3 \pm 2,6$  %, поздней бластоцисты – на  $31,6 \pm 2,2$  % (рис. 3а). Следует отметить, что такое значительное сокращение объема бластоцисты происходит сразу же после извлечения микроиглы из полости, а для восстановления объема до исходного уровня требуется около 2 ч как для средних, так и поздних бластоцист. Причем максимальная скорость восстановления объема бластоцисты наблюдается в течение первого часа после МИ.

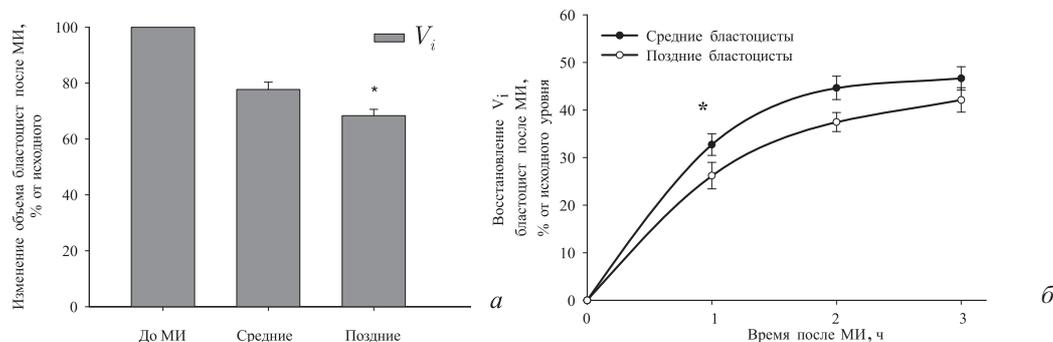


Рис. 3 Морфологические изменения зародышей мышей линии 129/Sv после микроинъекции. Изменение внутреннего объема –  $V_i$  средних и поздних бластоцист мыши после микроинъекции (а). Скорость восстановления нормальной морфологии в течение 3 часов после прокола (б). МИ – микроинъекция; \* –  $p < 0.05$

Способность восстанавливать нормальную морфологию, независимо от стадии, на которой бластоцисты находились во время прокола, позволяет оценить функциональную активность клеток ТБ, которые играют важную роль в процессах транспорта жидкости в полость бластоцисты и в имплантации (табл. 1). Так, было показано, что зародыши, сформировавшие колонии через 72 культивирования в среднем быстрее восстанавливали прежний объем после МИ по сравнению с зародышами, остановившимися в развитии: средние бластоцисты в 2.6 раза, а поздние в 1.5 раза.

Зародыши, медленнее восстанавливающие объем  $V_i$  после МИ ( $18,6 \pm 2,5$  % в ч,  $n = 17$ ), медленнее выходили из оболочки через 24 ч, также медленнее прикреплялись к поверхности

через 48 ч и формировали первичные колонии через 72 ч. Такая задержка вызвана, возможно, блоком развития при отсутствии необходимых факторов в культуральной среде. Блоки развития служат причиной несовпадения по времени развития бластоцист и готовности матки имплантировать эмбрион.

Таблица 1

Сравнение скорости восстановления  $V_i$  бластоцист мыши

Стадия бластоцисты	Скорость восстановления $V_i$ после МИ, % в ч	
	Колонии через 72 ч	Отсутствие развития
Средние; $n = 22$	$35.2 \pm 2.3^*$ ; $n = 11$	$13.6 \pm 1.2$ ; $n = 11$
Поздние; $n = 22$	$36.2 \pm 2.2^*$ ; $n = 16$	$23.6 \pm 4.2$ ; $n = 6$

\* –  $p < 0,05$ ;  $n$  – количество бластоцист.

Напротив, бластоцисты, которые быстро восстанавливали исходный объем ( $37.5 \pm 2.2$ ,  $n = 22$ ), соответственно формировали колонии через 72 ч без видимых задержек в развитии. Поэтому скорость восстановления  $V_i$  для каждого зародыша как фактор, позволяющий оценить работу клеток ТБ, использовали в качестве ключевого параметра для предсказания эффективности развития (табл. 2).

Таблица 2

Сравнение развития средних и поздних бластоцист мыши в сочетании со скоростью восстановления  $V_i$ 

	Средние бластоцисты + Скорость восстановления $V_i$	Поздние бластоцисты + Скорость восстановления
AUC (area under curve)	0.81**	0.93*
Стандартная ошибка	0.08	0.05
Доверительный интервал	0.725 – 1.027	0.833 – 1.028
Cut off (порог отсечения)	31.2	43.8
Чувствительность (Se)	0.364	0.758
Специфичность (Sp)	1.000	1.000

\* –  $p < 0.001$ ; \*\* –  $p < 0.01$ .

Для предсказания исхода (формирование колоний или их отсутствие) использовали следующие параметры: стадия бластоцисты и скорость восстановления  $V_i$  после МИ. Порог отсечения для скорости восстановления  $V_i$  составляет для средних бластоцист – 31.2 % в ч и для поздних – 43.8 % в ч. Согласно данным AUC составляет 0.81 для средних и 0.93 – для поздних бластоцист. Высокая специфичность данной модели ( $Sp = 1$  для средних и поздних бластоцист) говорит о том, что зародыши со скоростью восстановления ниже порогового значения с меньшей вероятностью способны формировать колонии первичных эмбриональных клеток, а следовательно, и имплантироваться.

## Дискуссия

Предимплантационные зародыши чувствительны к условиям окружающей среды, в частности к осмотичности. Зародыши на стадии бластоцисты формируют полость бластоцеля за счет активного транспорта жидкости через слой трофобласта (ТБ). Также после выхода зародыша из оболочки слой ТБ участвует в имплантации и формировании плаценты. Функциональную активность ТБ можно оценить с помощью микроинъекции в полость бластоцеля. Способность восстанавливать прежний объем зародыша и полости бластоцеля является важным параметром, позволяющим предсказать развитие и способность имплантироваться для бластоцист на разных стадиях развития – средней и поздней. В нашей работе было показано, что поздние бластоцисты лучше развиваются *in vitro*, чем средние  $OR = 2.04$  (0.78–5.39,  $p < 0.05$ ). Поздние

бластоцисты в среднем быстрее восстанавливают внутренний объем  $V_i$  после МИ и, следовательно, быстрее формируют первичные колонии через 72 ч  $OR = 2.65$  (0.95–7.38,  $p < 0.05$ ). На основании данных мы предположили, что скорость восстановления объема как функциональная характеристика слоя ТБ позволяет предсказать развитие бластоцист и их имплантационный потенциал, поскольку это значение коррелирует с эффективностью развития зародышей *in vitro*. Так, если средние и поздние бластоцисты способны восстанавливать объем после микроинъекции с максимальной скоростью (37.5 % в ч), такие зародыши, скорее всего, не будут иметь блоки в развитии *in vitro*. С помощью ROC-анализа было показано, что использование этой характеристики позволяет предсказать имплантационный потенциал бластоцист.

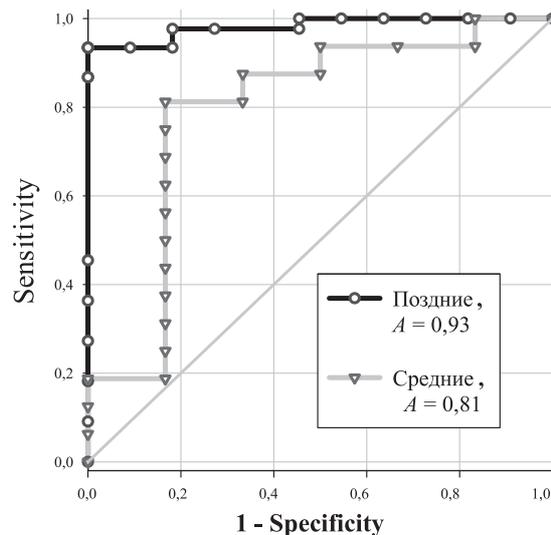


Рис. 4 ROC-анализ предсказания развития зародышей мыши *in vitro* после микроинъекции на стадии средней и поздней бластоцист с учетом скорости восстановления  $V_i$

## Список литературы

- Dessolle L., Freour T., Barriere P., Darai E., Ravel C., Jean M., Coutant C. A cycle-based model to predict blastocyst transfer cancellation // *Human Reprod.* 2010, 25:3; P. 598–604.
- Guerif F., Le Gouge A., Giraudeau B., Poindron J., Bidault R., Gasnier O., Royere D. Limited value of morphological assessment at days 1 and 2 to predict blastocyst development potential: a prospective study based on 4042 embryos // *Hum Reprod.* 2007, 22:7; P. 1973–1981.
- Guerif F., Lemseffer M., Blanchard M., Royere D. Top quality embryos at day 2: a prerequisite for single blastocyst transfer? An observational cohort study in women under 36 // *J Assist Reprod Genet.* 2009, 26:8; P. 443–449.
- Fawcett T. An introduction to ROC analysis // *Pattern Recognition Letters* 2006, 27; P. 861–874.
- Primi M.-P., Sennl A., Montag M., Van der Ven H., Mandelbaum J., Veiga A., Barri P., Germond M. A European multicentre prospective randomized study to assess the use of assisted hatching with a diode laser and the benefit of an immunosuppressive/antibiotic treatment in different patient populations // *Human Reprod.* 2004; 19:10; P. 2325–2333.