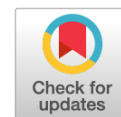


УДК 618-019

DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar109074>

Научная статья



Митохондриальные сети клеток кумулюса и качество ооцитов

Е.В. Панферов¹, Н.И. Тапильская², К.С. Масиева³, К.В. Обьедкова², А.М. Гзгзян²¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;² Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия;³ Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург, Россия

Актуальность. Митохондрии играют жизненно важную роль в поддержании нормального функционирования ооцитов, внутриутробного развития эмбриона и являются важным индикатором качества и функциональной полноценности ооцитов. Митохондриальная дисфункция ооцитов коррелирует с нарушением оплодотворения и развитием эмбриона, что клинически проявляется бесплодием, нарушением имплантации и редукцией эмбриона. Значительную роль в цитоплазматическом созревании ооцитов и формировании достаточного митохондриального пула играют клетки кумулюса.

Цель: провести сравнительный анализ между состоянием митохондриальных сетей клеток кумулюса и качеством ооцитов.

Материалы и методы. В исследование включено 22 пациентки в возрасте от 28 до 37 лет включительно (средний возраст $32,3 \pm 1,2$ года) с трубно-перитонеальным фактором бесплодия. В процессе протоколов вспомогательных репродуктивных технологий получено 74 ооцита, из которых 39 было хорошего качества, а 35 имели негативные морфологические признаки. Одновременно с ооцитами из фолликулярной жидкости были выделены клетки кумулюса, которые окрашивались прижизненным митохондриальным флюоресцентным красителем. Методом конфокальной микроскопии выполнялся анализ трехмерной организации митохондрий в 20–30 клетках одного пула фолликулярной жидкости. Для оценки митохондриальной сети использовались следующие параметры: время затухания флюоресценции и ее интенсивность.

Результаты. Время затухания флюоресценции в клетках кумулюса, взятых из фолликулярной жидкости, окружающей ооцит хорошего качества, было достоверно выше ($p = 0,032$) аналогичного показателя в случае идентификации ооцитов с негативными признаками.

Заключение. Структура митохондриальных сетей в клетках кумулюса коррелирует ($r = 0,76$) с качеством ооцитов.

Ключевые слова: вспомогательные репродуктивные технологии; качество ооцитов; клетки кумулюса; митохондриальные сети; невынашивание беременности; репродуктивная сфера; яйцеклетки.

Как цитировать:

Панферов Е.В., Тапильская Н.И., Масиева К.С., Обьедкова К.В., Гзгзян А.М. Митохондриальные сети клеток кумулюса и качество ооцитов // Известия Российской Военно-медицинской академии. 2022. Т. 41. № 3. С. 303–308. DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar109074>

DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar109074>

Research Article

Mitochondrial networks of cumulus cells and oocyte quality

Egor V. Panferov¹, Natalya I. Tapilskaya², Kristina S. Masieva²,
Ksenia V. Ob'edkova², Alexander M. Gzgyan²¹ Institute of Cytology Russian Academy of Science, Saint Petersburg, Russia;² Ott Research institute of obstetrics, gynecology and reproductology, Saint Petersburg, Russia;³ Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

BACKGROUND: Mitochondria play vital roles in oocyte functions and they are critical indicators of oocyte quality which is important for fertilization and development into viable offspring. Quality-compromised oocytes in which mitochondrial dysfunction plays a significant role are correlated with infertility, developmental disorders and embryo loss. A significant role in the oocytes of cytoplasmic accumulation and a sufficient amount of the mitochondrial pool of oocytes is played by the cumulus cells surrounding it.

AIM: to conduct a comparative analysis between the state of mitochondrial networks of cumulus cells and the quality of oocytes.

MATERIALS AND METHODS: The study included 22 women aged 28 to 37 years inclusive (mean age 32.3 ± 1.2 years) with tubal infertility. During the assisted reproductive technology procedures, 74 oocytes were obtained. 39 good quality oocytes and their cumulus cells were compared with 35 bad quality oocytes and their cumulus cells respectively. After puncture of ovarian follicles cumulus cells were isolated and stained with fluorescent dye for cell tracing and mitochondrial imaging *in vivo*. The method of confocal microscopy was used to analyze the three-dimensional organization of mitochondria in 20–30 cells of one pool of follicular fluid. The following parameters were used to evaluate the mitochondrial network: fluorescence decay time and fluorescence intensity.

RESULTS: The decay time of fluorescence in cumulus cells associated with a good quality oocyte was significantly higher ($p = 0.032$) than in the case of identification of oocytes with negative signs.

CONCLUSION: The structure of mitochondrial networks in cumulus cells correlates ($r = 0.76$) with the quality of oocytes.

Keywords: assisted reproductive technologies; cumulus cells; eggs; miscarriage; mitochondrial networks; oocyte quality; reproductive sphere.

To cite this article:

Panferov EV, Tapilskaya NI, Masieva KS, Ob'edkova KV, Gzgyan AM. Mitochondrial networks of cumulus cells and oocyte quality. *Russian Military Medical Academy Reports*. 2022;41(3):303–308. DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar109074>

Received: 29.06.2022

Accepted: 14.07.2022

Published: 30.09.2022

АКТУАЛЬНОСТЬ

Нарушения фертильности является растущей проблемой в развитых странах, при этом ассоциированная с бесплодием митохондриальная дисфункция была продемонстрирована у женщин как при определенных соматических заболеваниях, так и идиопатическом бесплодии. Митохондрии ооцитов в отличие от соматических клеток обеспечивают выработку АТФ гликолитическим и пентозофосфатным путями, а не путем окислительного фосфорилирования, что обеспечивает активную энергетическую аранжировку на ранних этапах эмбриогенеза. Значительную роль в достижении ооцитами цитоплазматического созревания и формировании достаточного митохондриального пула ооцитов играют окружающие его клетки кумулюса [1].

Функциональные митохондриальные нарушения являются взаимосвязанным фактором многочисленных заболеваний, в том числе и в репродуктивной сфере [2]. Данный тезис привел к предположению, что как аномальные метаболические маркеры митохондрий, так и количественные и качественные нарушения функционирования митохондриальных сетей ассоциированы с неблагоприятным репродуктивным прогнозом [3]. Повышенные маркеры оксидативного стресса у женщин репродуктивного возраста ассоциированы как с митохондриальными дисфункциями и наличием репродуктивно-значимой патологией (например, синдром поликистозных яичников), так и с высоким риском бесплодия и невынашивания беременности [4]. С другой стороны, маркеры оксидативного стресса являются результатом субклинических нарушений, в то время как до появления лабораторных маркеров уже на протяжении определенного времени имеются ультраструктурные изменения, отражающие функциональный потенциал клеток [5]. Одним из таких изменений является состояние митохондриальных сетей в функциональных и вспомогательных клетках [6].

Цель исследования — провести сравнительный анализ между состоянием митохондриальных сетей клеток кумулюса и качеством ооцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование было проведено на материале, полученном при выполнении пункции фолликулов в протоколах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) отделения репродуктологии НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта. При исследовании фолликулярной жидкости, полученной от 22 пациенток в возрасте от 28 до 37 лет включительно (средний возраст $32,3 \pm 1,2$ года) с трубно-перитонеальным фактором бесплодия, после отбора ооцитов были выделены клетки кумулюса, после чего суспензия высевалась на покровные стекла в шестилуночных культуральных планшетах.

После суточной инкубации при температуре 37°C клетки окрашивались прижизненным митохондриальным красителем (митотрекером) в течение 45 мин в бессывороточной среде. Фиксация на предметные стекла выполнялась в 10 % растворе нейтрального забуференного формалина в течение 10 мин. Визуализация осуществлялась при помощи конфокального микроскопа Leica TCS SP5 II с аналитической системой SMD FLCS. Для анализа трехмерной организации митохондрий с каждого препарата выбиралось от 20 до 30 клеток, для каждой из которых снимался z-стек, полностью захватывающий все митохондрии в клетке. Размер вокселя подбирался в соответствии с критерием Найквиста для возможности проведения пространственной деконволюции, которая осуществлялась при помощи специальной компьютерной программы, рассчитывающей функцию рассеивания точки. Полученные в результате деконволюции данные сегментировались в программе Bitplane Imaris с использованием модуля Filament Tracer. В статистический анализ включались средние значения параметра Filament Length для каждой клетки, включаемые в анализ как параметр длины ветви митохондриальной сети, а также количество таких ветвей сети. Ветви длиной менее 0,7 мкм принимались за артефакт сегментации и не учитывались при обработке данных. Число ветвей митохондриальной сети косвенно оценивалось по среднему времени затухания флуоресценции (τ , мс).

В дальнейшем результаты исследования митохондриальных сетей клеток кумулюса сравнивались с качеством полученных в протоколах ВРТ ооцитов. Качество ооцитов оценивалось на основании внешнего вида цитоплазмы, вителлинового слоя, полярного тельца. Исследование выполнено в полном соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы научных и медицинских исследований с участием человека», действующими порядками и стандартами оказания медицинской помощи, а также другими регуляторными требованиями к проведению клинических исследований и наблюдательных программ в Российской Федерации.

РЕЗУЛЬТАТЫ

По результатам оценки эмбриологических протоколов было получено 74 ооцита, при этом 39 ооцитов были хорошего качества и отличались гомогенной цитоплазмой однородного цвета и отсутствием гранулярности, 35 ооцитов имели негативные признаки и характеризовались наличием вакуолей, темной окраской, включениями, деформацией и/или гранулярностью. Среднее время затухания в клетках кумулюса при ооцитах хорошего качества составило 3,11 (2,64; 3,53) мс, было достоверно выше при анализе данных клеток при ооцитах с негативными признаками и составило 0,97 (0,60; 1,95) мс ($U = 276,5$, $p = 0,032$). Корреляционный анализ ранжированных

значений (по Спирмену) продемонстрировал, что время затухания флуоресценции имело сильную прямую корреляцию ($r = 0,76$) с числом ветвей митохондриальной сети. Таким образом, степень разветвления (структура) митохондриальной сети клеток кумулюса коррелирует с качеством ооцита.

При исследовании внутриклеточной структуры клеток кумулюса было установлено, что увеличение длины ветвей митохондриальной сети обратно коррелировало с количеством митохондрий. Основываясь на этом факте, можно предположить, что в данном случае это, скорее всего, является следствием фракционирования сети, а не нарастания массы митохондрий путем их деления, поскольку биогенез митохондрий не сопряжен с распадом митохондриальных сетей [7]. Достоверных различий в интенсивности флуоресценции не получено, однако при увеличении длины ветвей увеличивается интенсивность флуоресценции, что было установлено на основании уменьшения среднего значения τ при снижении увеличения средней длины ветви митохондриальной сети. Вероятно, данные изменения связаны с тем, что для работы электрон-транспортной цепи создаются более благоприятные условия и/или в более крупных митохондриях генерируется меньше активных форм кислорода либо они более эффективно нейтрализуются [8]. Полученные различия в клетках кумулюса можно связать с механизмом самоконтроля качества и количества митохондрий клеткой. Имеются данные, что с увеличением генерации активных форм кислорода все большее количество внутриклеточных элементов оказываются поврежденными, что приводит к более активному отделению от сети митохондрий с поврежденными комплексами электронно-транспортной сети в результате модификации активности аппарата деления митохондрий [9]. Средняя длина ветви митохондриальной сети при этом также несколько уменьшается.

Развитие научно-технического прогресса за счет внедрения молекулярно-генетических методов диагностики качества эмбриона в виде предимплантационной генетической диагностики решило вопрос эмбриональной селекции, т. е. отбора генетически полноценных эмбрионов и выбраковывания анеуплоидных эмбрионов. Однако в настоящее время достаточно остро стоит проблема отсутствия имплантации генетически полноценных эмбрионов даже при нормальном состоянии эндометрия, что при достаточном количестве репродуктивного материала еще больше усложняет процесс селекции эмбриона для переноса. Настоящая работа является пилотным проектом по оценке митохондриального потенциала ооцитов,

основанным на оценке структуры митохондриальной сети основных клеток, окружающих ооцит, — клеток кумулюса, которые извлекаются вместе с яйцеклеткой при пункции фолликулов в протоколах ВРТ. Отсутствие возможности, за исключением морфологических данных, выполнить оценку ооцита стимулирует научный поиск маркеров качества репродуктивного материала. В первые часы эмбриогенеза митохондрии ооцита являются источником энергии для развивающегося эмбриона, который получает минимальное количество питательных веществ до момента инвазии трофобласта в эндометрий [10].

Любой вариант неинвазивной для эмбриона диагностики его возможного качества может рассматриваться как вариант предиктивной аналитики в вопросах эмбриональной селекции, базирующийся на оценке их перспективности. В дополнении к информации об отсутствии генетических аномалий у эмбриона сведения о качестве эмбриона, основанные на данных о состоянии митохондриальных сетей клеток кумулюса, могут быть крайне полезными для выбора эмбриона-кандидата для переноса в полость матки.

Если состояние митохондриальных сетей клеток кумулюса имеет достаточную степень корреляции с качеством и количеством митохондрий ооцита, это может быть вариантом неинвазивной диагностики определения качества эмбриона, полученного при оплодотворении *in vitro* ооцитов с известными данными.

Вывод. На основании флуоресценции митохондрий в клетках кумулюса установлено, что структура митохондриальных сетей в клетках, формирующих непосредственное окружение ооцита при созревании фолликула, коррелирует с качеством ооцитов и, соответственно, качеством эмбрионов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Финансирование данной работы не проводилось.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Этическая экспертиза. Исследование выполнено на биологическом материале, подлежащем обязательной утилизации, в силу чего одобрение локального этического комитета не требуется.

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Park S.U., Walsh L., Berkowitz K.M. Mechanisms of ovarian aging // *Reproduction*. 2021. Vol. 162, No. 2. Art. R19–R33. DOI: 10.1530/REP-21-0022
2. Duckney P.J., Wang P., Hussey P.J. Membrane contact sites and cytoskeleton-membrane interactions in autophagy // *FEBS Lett*. 2022. Vol. 596. P. 2093–2103. DOI: 10.1002/1873-3468.14414

3. Quinlan C.L., Perevoshchikova I.V., Hey-Mogensen M., et al. Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates // *Redox biology*. 2013. Vol. 1, No. 1. P. 304–312. DOI: 10.1016/j.redox.2013.04.005
4. Murphy M.P. Mitochondrial thiols in antioxidant protection and redox signaling: distinct roles for glutathionylation and other thiol modifications // *Antioxidants & redox signaling*. 2012. Vol. 16, No. 6. P. 476–495. DOI: 10.1089/ars.2011.4289
5. von Mengden L., Klamt F., Smitz J. Redox biology of human cumulus cells: basic concepts, impact on oocyte quality, and potential clinical use // *Antioxidants & redox signaling*. 2020. Vol. 32, No. 8. P. 522–535. DOI: 10.1089/ars.2019.7984
6. Richani D., Dunning K.R., Thompson J.G., et al. Metabolic co-dependence of the oocyte and cumulus cells: essential role in determi-

- ning oocyte developmental competence // *Human reproduction update*. 2021. Vol. 27, No. 1. P. 27–47. DOI: 10.1093/humupd/dmaa043
7. Friedman J.R., Nunnari J. Mitochondrial form and function // *Nature*. 2014. Vol. 505, No. 7483. P. 335–343. DOI: 10.1038/nature12985
8. Schofield J.H., Schafer Z.T. Mitochondrial reactive oxygen species and mitophagy: a complex and nuanced relationship // *Antioxidants & redox signaling*. 2021. Vol. 34, No. 7. P. 517–530. DOI: 10.1089/ars.2020.8058
9. Ikonomi N., Werle S.D., Schwab J.D., Kestler H.A. Discrete Logic modeling of cell signaling pathways // *Methods Mol. Biol.* 2022. Vol. 2488. P. 159–181. DOI: 10.1007/978-1-0716-2277-3_12
10. Rodríguez-Varela C., Labarta E. Role of mitochondria transfer in infertility: A Commentary // *Cells*. 2022. Vol. 11, No. 12. Art. 1867. DOI: 10.3390/cells11121867

REFERENCES

1. Park SU, Walsh L, Berkowitz KM. Mechanisms of ovarian aging. *Reproduction*. 2021;162(2): R19–R33. DOI: 10.1530/REP-21-0022
2. Duckney PJ, Wang P, Hussey PJ. Membrane contact sites and cytoskeleton-membrane interactions in autophagy. *FEBS Lett*. 2022;596:2093–2103. DOI: 10.1002/1873-3468.14414
3. Quinlan CL, Perevoshchikova IV, Hey-Mogensen M, et al. Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox biology*. 2013;1(1):304–312. DOI: 10.1016/j.redox.2013.04.005
4. Murphy MP. Mitochondrial thiols in antioxidant protection and redox signaling: distinct roles for glutathionylation and other thiol modifications. *Antioxidants & redox signaling*. 2012;16(6):476–495. DOI: 10.1089/ars.2011.4289
5. von Mengden L, Klamt F, Smitz J. Redox biology of human cumulus cells: basic concepts, impact on oocyte quality, and potential clinical use. *Antioxidants & redox signaling*. 2020;32(8):522–535. DOI: 10.1089/ars.2019.7984
6. Richani D, Dunning KR, Thompson JG, et al. Metabolic co-dependence of the oocyte and cumulus cells: essential role in determining oocyte developmental competence. *Human reproduction update*. 2021;27(1):27–47. DOI: 10.1093/humupd/dmaa043
7. Friedman JR, Nunnari J. Mitochondrial form and function. *Nature*. 2014;505(7483):335–343. DOI: 10.1038/nature12985
8. Schofield JH, Schafer ZT. Mitochondrial reactive oxygen species and mitophagy: a complex and nuanced relationship. *Antioxidants & redox signaling*. 2021;34(7):517–530. DOI: 10.1089/ars.2020.8058
9. Ikonomi N, Werle SD, Schwab JD, Kestler HA. Discrete Logic modeling of cell signaling pathways. *Methods Mol Biol*. 2022;2488:159–181. DOI: 10.1007/978-1-0716-2277-3_12
10. Rodríguez-Varela C, Labarta E. Role of mitochondria transfer in infertility: A Commentary. *Cells*. 2022;11(12):1867. DOI: 10.3390/cells11121867

ОБ АВТОРАХ

Егор Валерьевич Панферов, магистр Института цитологии РАН; e-mail: panferov.aux@gmail.com

***Наталья Игоревна Тапильская**, докт. мед. наук, профессор, ведущий научный сотрудник; адрес: Россия, 199034, г. Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5309-0087>; Scopus Author ID: 23013489000; eLibrary SPIN: 3605-0413; Author ID: 167924; e-mail: tapnatalia@yandex.ru

AUTHORS' INFO

Egor V. Panferov, master of the Institute of cytology of the Russian Academy of Sciences; e-mail: panferov.aux@gmail.com

***Natalya I. Tapilskaya**, M.D., D.Sc. (Medicine), Professor, leading research scientist; address: 3, Mendeleevskaya lane, Saint Petersburg, 199034, Russia; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5309-0087>; Scopus Author ID: 23013489000; eLibrary SPIN: 3605-0413; Author ID: 167924; e-mail: tapnatalia@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ОБ АВТОРАХ

Кристина Сабухиевна Масиева, студентка 6 курса;
e-mail: masieva98@mail.ru

Ксения Владимировна Обьедкова, канд. мед. наук,
научный сотрудник отдела репродукции;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2056-7907>;
Scopus Author ID: 57201161145;
eLibrary SPIN: 2709-2890; Author ID: 1048781;
e-mail: obedkova_ks@mail.ru

Александр Мкртичевич Гзгзян, докт. мед. наук,
заведующий отделом репродукции;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3917-9493>;
eLibrary SPIN: 6412-4801; Author ID: 231438;
e-mail: iagmail@ott.ru

AUTHORS' INFO

Kristina S. Masieva, 6th year student;
e-mail: masieva98@mail.ru

Ksenia V. Ob'edkova, M.D., Ph.D. (Medicine),
research scientist of the Reproduction Department;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2056-7907>;
Scopus Author ID: 57201161145;
eLibrary SPIN: 2709-2890; Author ID: 1048781;
e-mail: obedkova_ks@mail.ru

Alexander M. Gzgzyan, M.D., D.Sc. (Medicine),
Head of the Reproduction Department;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3917-9493>;
eLibrary SPIN: 6412-4801; Author ID: 231438;
e-mail: iagmail@ott.ru