

[Превод на български език]



## Препоръчителни техники за контраст в асистираниите репродуктивни технологии



# Препоръчителни техники за контраст в асистираниите репродуктивни технологии

Автор: Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия

Дата: февруари 2019

## Въведение

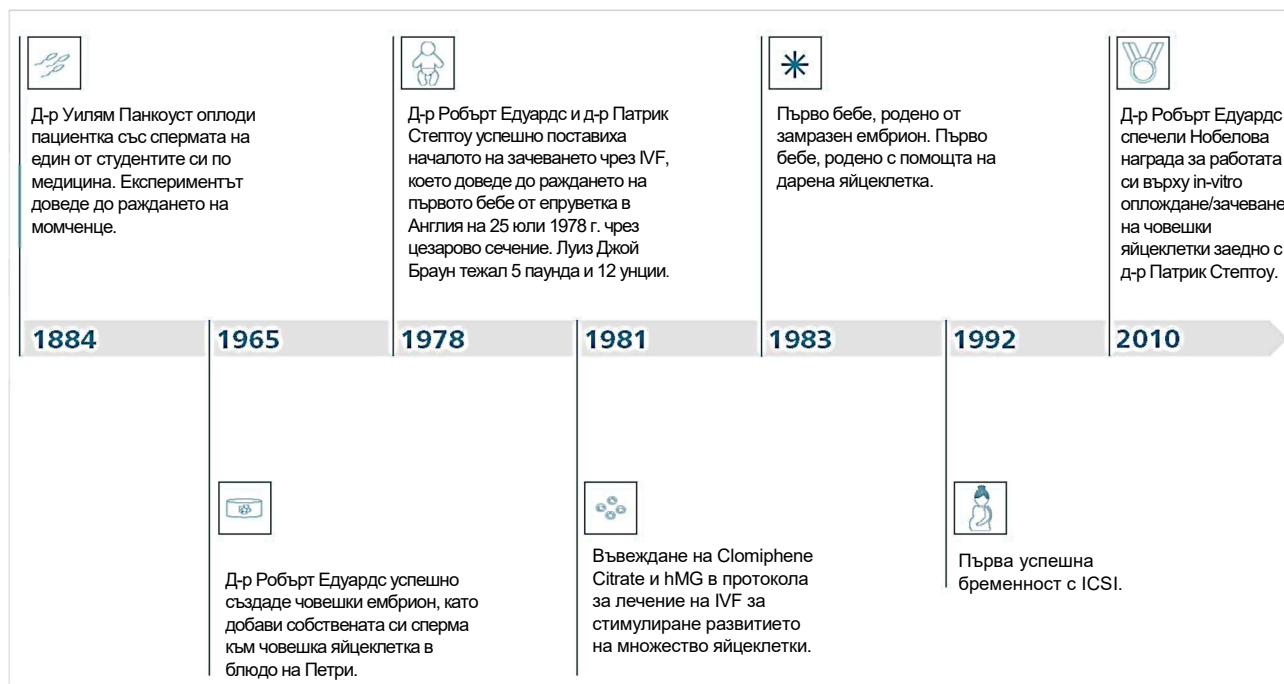
Исторически погледнато, микроскопията играе важна роля в нашето разбиране за морфологията и ролята на сперматозоидите и яйцеклетките в репродукцията, изяснявайки тяхното поведение преди и по време на тяхното сливане и ни помага да разберем ранните етапи на развитие на зиготата. Асистиранията репродуктивна технология (ART) претърпя бързо развитие (фигура 1) след въвеждането на ин витро оплождането (IVF) в края на 70-те години.

IVF, интра-цитоплазмено инжектиране на сперматозоиди (ICSI) и интра-цитоплазмено морфологично подбрано инжектиране на (IMSI) са репродуктивни техники, при които яйцеклетките се оплождат *in vitro* със сперматозоиди. След което получените оплодени яйцеклетки (зиготи) се имплантират в матката, за да се установи бременност. Микроскопията е основен компонент на тези ART процедури, осигуряваща подробна визуализация на гамети и зиготи, даваща

възможност за оценка на ключови клинични параметри и позволяваща на ембриолозите да извършват техники за микроманипулация, без да повлияят неблагоприятно на жизнеспособността на клетките или ембрионите.

Подходящите контрастни техники за микроскопия с предавана светлина, които са специализирани за живи и неочветени проби, са от съществено значение в областта на ART.

При микроскопията разликите в интензитета и/или цвета създават контрасти, които позволяват да се видят индивидуалните характеристики и детайли на пробата. Като общо правило се изисква стойност на контраста не по-малко от 2 %, за да може човешкото око да различи обект от фона или детайл от останалата част от структурата. Тази стойност може да се различава за други детектори, като видеокамери или фотодетектори. Единичните живи клетки са по същество безцветни и прозрачни, което ги прави трудни за визуализиране.



Фигура 1 Основни стъпки в развитието на ART

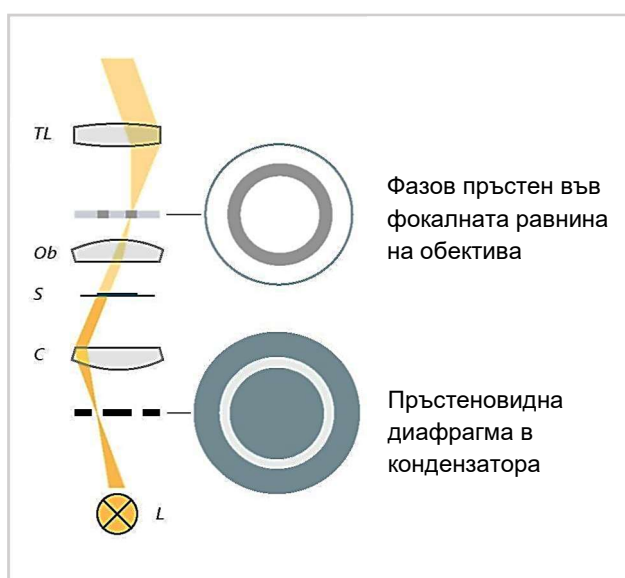
В ART не могат да се използват усилващи контраста багрила, тъй като те биха компрометирали здравето и жизнеспособността на клетките. Абсорбцията обаче не е единственият начин, по който светлината може да взаимодейства с клетката. Други явления като разсейването на светлината и дифракцията се използват също и в микроскопията, за постигане на оптимален контраст, без да се засяга клетъчното здраве. По тази причина ART лабораториите се оборудват с широка гама от комбинирани и стерео микроскопски системи с различни техники за създаване на контраст.

### Фазово контрастна микроскопия

Фазово контрастната микроскопия ефективно превежда малките фазови вариации в съответстващи амплитудни разлики, създавайки видим контраст на изображението. Тази техника е идеална за тънки, нецветени образци, като култивирани клетки в блюда на Петри, които са с дебелина приблизително 5 до 10 микрометра.

При фазово контрастен микроскоп кондензаторът съдържа пръстен, наречен „фазов стоп“, който произвежда кух светлинен конус, осветяващ образеца в точката на фокуса. Когато светлината преминава през обекта, лъчите се отклоняват от първоначалната си посока. Размерът на фазовия стоп зависи от числовата апертура на обектива и кондензатора (NA).

Светлината навлиза в обектива и в задната фокална равнина се създава изображение на фазовия стоп, известно като зеница на обектива. Разположеният в задната фокална равнина на обектива фазов пръстен се подравнява с фазовия стоп на кондензатора.



**Фигура 2** Принцип на фазовия контраст

Път на лъча: (L – източник на светлина, C – кондензатор, S – образец, Ob – обектив, TL – тръбна леща)

Светлината, която преминава през образеца, обикновено се забавя с една четвърт от дължината на вълната, докато фоновата светлина обикновено се ускорява с една четвърт от дължината на вълната. Това води до разлика между отклонената (преминаваща през образеца) и неотклонената (фонова) светлина с до половин дължина на вълната (фигура 2). Въпреки че човешкото око не е в състояние да различи фазовите измествания, фазово контрастният микроскоп превежда тези разлики във видими промени на амплитудата/интензитета, което води до контраст на детайлите, така че да изглеждат по-тъмни на светъл фон.

Фазовият контраст е отличен метод за увеличаване на контраста при изобразяване на живи, нецветени клетки. Фазовите изображения обаче често са заобиколени от ярки ореоли, които се появяват по границите около образеца и контрастните детайли. Те възникват, защото кръглият, забавящ фазата пръстен с неутрална плътност от фазовата плака на обектива също така предава и дифрагирана светлина от образеца. Техниката не е подходяща за визуализиране на дебели екземпляри, тъй като те често имат силно припокриващи се структури, произвеждащи по-сериозни проявления чрез ореол. В ART фазовият контраст често се използва за визуализация на сперматозоидите и оценка на подвижността им.

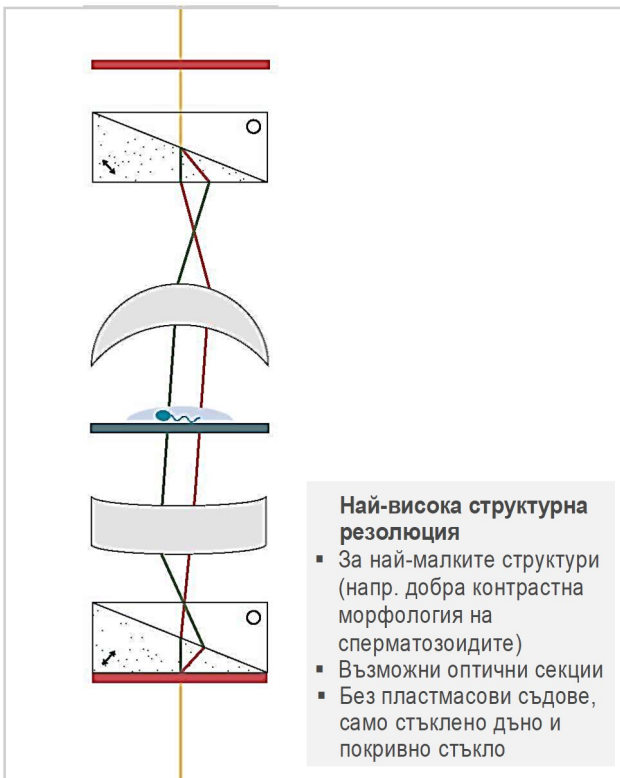
Таблицата по-долу подчертава някои от предимствата и недостатъците на фазово-контрастната микроскопия:

Предимства	Недостатъци
• Висок контраст	• Арефакти от ореол
• Добра разделителна способност	• Пръстенът може да ограничи бледата и да намали разделителната способност
• Работи добре за тънки проби	• Не е подходящ за дебели образци
• Икономичен	
<b>Препоръчва се за:</b>	
• Визуализация на сперматозоиди	
• Оценка на подвижността на сперматозоидите	

**Таблица 1** Предимства и недостатъци на фазово контрастната микроскопия

### Микроскопия с диференциален интерферентен контраст (DIC)

DIC микроскопията е в състояние да достави резки, детайлни изображения за визуализиране на тънки структури в клетките и тъканите чрез използване на поляризирана светлина за откриване на разликите в коефициента на пречупване и дебелината на пробите. Повечето микроскопи с ярко поле могат да бъдат модернизирани с компонентите, необходими за прилагане на тази техника. Необходимите елементи на DIC система (фигура 3) са:



**Фигура 3** Принцип на микроскопия с диференциален интерферентен контраст (DIC)

- Поляризатор, поставен между източника на светлина и кондензатора, който произвежда линейно поляризирана светлина.
- Призма на Номарски, използвана за разделяне на линейно поляризирана светлина на два лъча.
- Призма на обектива (втора призма на Номарски) за рекомбиниране на двата разделени лъча.
- Анализатор, който е втори поляризационен филтър, обикновено разположен зад призмата на обектива и ориентиран перпендикулярно на пътя на предаване на първия поляризатор. Тук възниква интерференцията, която генерира изображението от DIC.



**Фигура 4** Сперматозоиди, наблюдавани чрез DIC

Пробата е ефективно осветена от два разделени лъча с ортогонална поляризация, които са пространствено леко изместени (срязвани). Двата вълнови фронта преминават през съседни области на пробата. Ако за двата лъча има разлика в коефициента на пречупване или дебелината на образеца, те ще имат различни дължини на оптичния път, което води до промени във фазовата разлика на двата вълнови фронта. При призмата на обектива двата лъча рекомбинират, преди да преминат през анализатор (поляризатор), където възниква интерференция поради фазовата разлика. Полученото DIC изображение се формира чрез преобразуване на фазовите разлики във видими промени на яркостта. Пробата се появява като псевдо-3D релеф, който не трябва да се приема като представяне на реалната топография.

DIC микроскопията предоставя изображения с висока разделителна способност на нецветени биологични проби (фигура 4), а основното ѝ предимство пред фазовия контраст е способността да се използва инструментът при пълна NA без ефектите на намаляване на светлината от фазовите плаки или пръстените на кондензатора. Въпреки че DIC микроскопията е основната техника, използвана за морфологично оценяване на сперматозоидите в IMSI, тя изисква съдове за култури със стъклено дъно (за да се запази поляризацията на светлината) заедно с високо увеличение и маслени обективи с висока NA.

Таблицата по-долу подчертава някои от предимствата и недостатъците на DIC микроскопията:

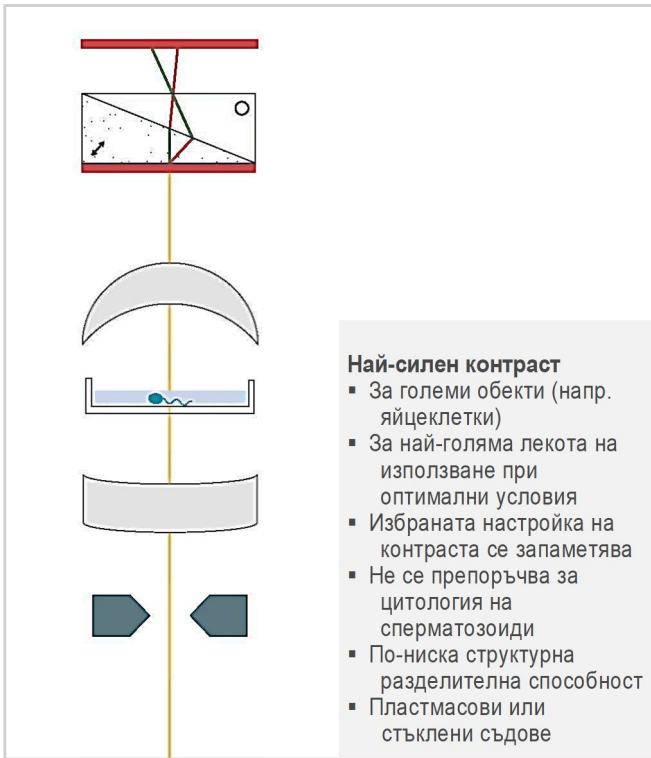
Предимства	Недостатъци
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Осигурява висока разделителна способност и контраст, дори при дебели екземпляри</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Изисква съдове за културите със стъклено дъно (следователно несъвместими с рутинните пластмасови)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Без ореол артефакти</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Високи разходи за настройка и експлоатация</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Може да се комбинира с флуоресцентна микроскопия без загуба на сигнал</li> </ul>	
<p><b>Препоръчва се за:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Морфологично оценяване на сперматозоиди в IMSI</li> </ul>	

**Таблица 2** Предимства и недостатъци на DIC микроскопията

### PlasDIC микроскопия

PlasDIC микроскопията е въведена от ZEISS като иновативна контрастна техника за рутинно наблюдение на живи, нецветени проби, включително гамети и ембриони. Както подсказва името, това е вариант на DIC микроскопия, който е подходящ за използване с контейнери за култури с пластмасово дъно, които са не само по-евтини, но предлагат по-малко враждебна среда за растеж от стъклото. Докато PlasDIC използва същите принципи като DIC микроскопия, пробата вместо това се





Фигура 5 Принцип на PlasDIC микроскопия

осветява с неполяризирана светлина, а както поляризаторът, така и призмата на Номарски се поставят, след двойно пречупващият образец, предизвикващ фазово изкривяване на вълновия фронт. Призмата на Номарски разделя вълновия фронт на две и анализаторът следващ по веригата, ориентиран на 45°, позволява предаване само на светлина, която осцилира в същата равнина и следователно може да пречи. След това възниква интерференцията, когато двата вълнови фронта станат кохерентни в междинната равнина на изображението. Тъй като пробата и контейнерът с културата лежат извън зоната, чувствителна към поляризация, наличието на пластмаса няма неблагоприятен ефект върху изображението.



Фигура 6 Ооцит, наблюдаван чрез PlasDIC

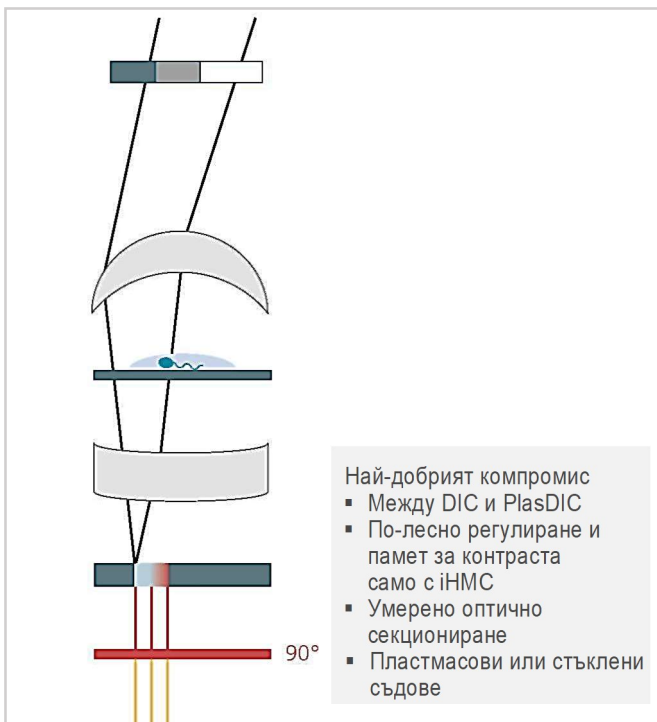
PlasDIC микроскопията осигурява отчетлив релефен контраст и впечатляващо псевдо-3D изображение (фигура 6). Могат да се визуализират добре детайли относно zona pellucida, оолема, както и пипетите. Освен това, PlasDIC е особено подходящ за ICSI, тъй като може да се използва стандартна пластмасова лабораторна посуда.

Таблицата по-долу подчертава някои от предимствата и недостатъците на PlasDIC микроскопията:

Предимства	Недостатъци
• Сравнително евтин	• Диафрагмата с цепнатина намалява достъпното осветление
• Лесна настройка	• По-ниска структурна разделителна способност в сравнение с DIC
• Най-висока лекота на използване – при превключване на увеличенията	• Най-висока лекота на използване – при превключване на увеличенията
• Без ореол артефакти	• Висококонтрастно изображение подобно на DIC, дори със стандартни пластмасови съдове
<b>Препоръчва се за:</b>	
• ICSI, като може да се използват стандартни пластмасови съдове	
• Добра визуализация на zona pellucida, oolemma и пипети	

Таблица 3 Предимства и недостатъци на PlasDIC микроскопията

**Контрастна микроскопия с модулация на Хофман**  
 онтрастната микроскопия с модулация на Хофман (HMC) е техника за наклонено осветяване, която постига подобрен контраст в живи проби чрез преобразуване на фазовите градиенти в структурата на пробата в промени на амплитудата (или яркостта) и създаване на псевдо-3D изображения на неоцветени проби. Модулаторът на Хофман, който е оптичен амплитуден пространствен филтър, се вмъква в задната фокална равнина на обектива. Модулаторът има три зони: (1) малка, тъмна зона, предаваща фиксиран нисък процент светлина; (2) тясна сива зона с 15 % пропускане на светлина; и (3) останалата чиста или прозрачна зона, пропускаща 100 % от светлината. За разлика от фазовата плака, използвана във фазово контрастната микроскопия, модулаторът не внася никаква промяна във фазата на светлината, преминаваща през тези зони. Свързан с модулатора на обектива е отвор с процеп, разположен в предната фокална равнина на кондензатора, насочващ наклонено осветление към образца. Ефективната ширина на процепа може да бъде модулирана от поляризатора. Процепът се регулира така, че пропускането на светлина през процепа да пада върху сивата област (15 %) на модулатора..



Фигура 7 Принцип на контрастната микроскопия с модулация на Хофман

Светлината, която преминава през хомогенни зони в пробата, няма да се пречупи, а ще премине през централната сива област на модулатора и ще стане сива. В областите на пробата, където структура причинява оптичен фазов градиент, ще настъпи пречупване; пътят на пречупената светлина ще бъде изместен или към прозрачната, или към тъмната зона на модулатора. Това води до появата на псевдо-3D изображение. За разлика от DIC микроскопията, HMC не използва призми за разделяне на лъча, а двата поляризатора са монтирани оптически преди пробата; по този начин, HMC може да се използва в комбинация с двойнопречупващи образци и с материали като пластмасови блюда на Петри. Подобреният HMC (iHMC) от ZEISS осигурява отчетлив релефен контраст и разкрива дори най-фините структури в клетъчното ядро, формата на ядрото и нуклеолите (фигура 8).

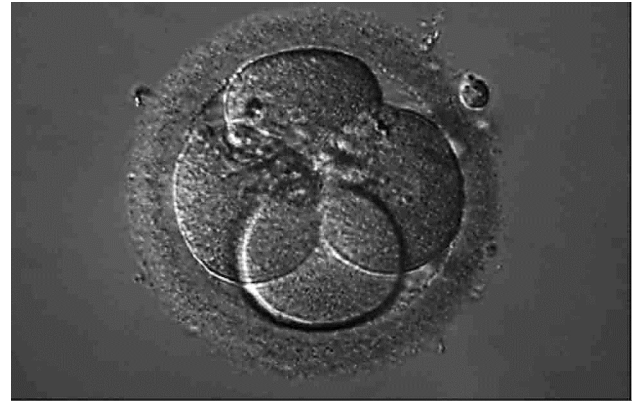
HMC е най-широко използваната контрастна техника в ART, използваща обърнати микроскопи, тъй като предлага добър компромис между разделителна способност и контраст. Тази техника се използва рутинно за ICSI и оценка на качеството на ембриона, а също така е подходяща за бързи морфологични изследвания на сперматозоидите.

Препратки:

[1] Kashir J, Jones C, Ramadan W, Kang YJ, Carver J, Griffiths T, Turner K, Coward K (2012)

Magnifying human fertility: microscopy and assisted reproductive technology. InFocus, 25, 23-41

[2] In Vitro Fertilization and Reproductive Medicine A summary of IVF, ICSI and IMSI with recommended microscope systems for each ART technique.



Фигура 8 Изображение на ембрион, получено чрез iHMC

Таблица 4 подчертава някои от предимствата и недостатъците на HMC микроскопията.

Предимства	Недостатъци
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Подходяща за тънки или дебели образци</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• По-високи разходи за настройка от PlasDIC</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• „Contrast memory“ от ZEISS прави подравняването по-лесно</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Промените в увеличението също изискват смяна на диафрагмата на кондензатора</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Съвместим със стандартни</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Без ореол артефакти</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Предлага добър компромис между разделителна способност и контраст</li> </ul>	
<b>Препоръчва се за:</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• ICSI</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Оценка на качеството на ембриона</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Бързо изследване на морфологията на сперматозоидите</li> </ul>	

Таблица 4 Предимства и недостатъци на HMC микроскопията

### Обобщение на ART контрастните техники

В заключение, днес има множество контрастни техники, използвани в репродуктивната медицина, всяка от които е подходяща за определени приложения, отговарящи на специфичните изисквания, както на пробата, така и на работата, която трябва да бъде извършена..

Микроскопска техника	Основни приложения	Материал на съдовете
Фазов контраст	Преброяване на сперматозоидите, оценка на подвижността на сперматозоидите	Съкло/пластмаса
DIC	IMSI	Съкло
PlasDIC	ICSI	Пластмаса/стъкло
iHMC	ICSI	Пластмаса/стъкло