

ОБЗОР ОСНОВНЫХ МЕТОДОВ ВИЗУАЛИЗАЦИИ РАЗВИТИЯ ЭМБРИОНА

© А.И. Трофименко², Д.А. Певзнер¹, В.В. Лазарев¹, Е.Е. Лысов¹, Т.Р. Парасунько¹

Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Российская Федерация (1)
Научно-исследовательский институт – Краевая клиническая больница №1 имени
профессора С.В. Очаповского, Краснодар, Российская Федерация (2)

Эмбриональное развитие является одним из наиболее важных этапов формирования организма животных, поэтому его изучение никогда не теряло актуальность. Однако, детальный процесс развития эмбриона на сегодняшний день остаётся за «ширмой», которую создала сама природа, что создает определенные технические трудности, справиться с которыми позволяют различные методы визуализации эмбриона, которые мы представили в данной статье. Это не только относительно простые 2D методики, позволяющие увидеть эмбрион в плоскости, но и новые 3D методики, предоставляющие возможность наблюдать за эмбрионом в объёме. Поскольку инвазивные методы оставляют неблагоприятные последствия в ходе наблюдения за эмбрионом, что негативно сказывается на получаемых научных данных и может привести к их неверной интерпретации, в последнее время всё чаще стали использовать неинвазивные методы, которые позволяют сохранить целостность структур эмбриона, уменьшить риск нарушений развития, возникающих в процессе наблюдения. Инновационным прорывом стала технология таймлапс, позволяющая визуализировать события в реальном времени, происходящие во время эмбрионального развития. Таймлапс представляет собой покадровую съемку, в процессе которой полученные статические изображения группируются в один непрерывный видеоролик. Монтаж кадров проводится с помощью специальной аппаратуры. Данная система нашла свое применение в большом количестве научных экспериментов. Высокая разрешающая способность современной техники позволяет наблюдать за формированием эмбриональных структур, производить реальную оценку роста и развития организма согласно установленным параметрам, наблюдать изменения, возникающие при действии различных факторов.

Ключевые слова: эмбрион; тайм-лапс система; эмбриональное развитие.

MAJOR EMBRYONIC DEVELOPMENT VISUALIZATION METHODS REVIEW

A.I. Trofimenko², D.A. Pevzner¹, V.V. Lazarev¹, E.E. Lysov¹, T.R. Parasunko¹

Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation (1)
Scientific Research Institute – Ochapovsky Regional Clinical Hospital №1, Krasnodar, Russian Federation (2)

Embryonic development is one of the most important stages in the formation of the animal organism, so its study never lost its relevance. However, today, the detailed process of embryo development remains behind the «screen» that nature created by itself, which in turn creates certain technical

difficulties that can be coped with by various methods of visualization of the embryo that are presented in this article. These are not only relatively simple 2D techniques that permit to see the embryo in the plane, but also novel 3D techniques that permit observation of an embryo in its volumetric structure. Since invasive methods are associated with unfavourable consequences during observation of the embryo, which produce a negative effect on the obtained scientific data and can lead to their misinterpretation, recently, non-invasive methods are more often used that allow to preserve the integrity of the structures of the embryo and reduce the risk of developmental disorders that occur during the observation process. The time-lapse technology was an innovative discovery which permits to visualize real-time events during embryonic development. Time-lapse is a frame-by-frame shooting, which collects the obtained static images into one continuous video. Frame montage is carried out using special equipment. This system has found application in a large number of scientific experiments. High resolution of modern technical devices permits to observe the formation of embryonic structures, to make a real assessment of an embryo growth and development according to the established parameters, and to observe changes induced by different factors.

Keywords: *embryo; time-lapse system; embryonic development.*

Один из первых, описанных в литературе случаев применения системы покадровой съемки (time-lapse imaging – TLI) в эмбриологии относится к 1968 г., когда были проведены исследования воздействия тератогенных доз гипоксии на развитие куриных эмбрионов [1]. При этом только лишь в 2008 г. опубликована серия статей, посвященная использованию TLI для изучения преимплантации эмбриона человека, в которых с позиции клинической эмбриологии четко продемонстрированы преимущества методики для определения жизнеспособности эмбриона [2], [3]. Первая коммерчески доступная TLI система появилась в Европе в 2011 г. С этого времени метод TLI широко используется во всем мире, что, в частности, позволяет в разы увеличить шансы на беременность у женщин, использующих вспомогательные репродуктивные технологии [4].

Преимущества использования технологии тайм-лапс визуализации

Ранее, до внедрения TLI, эмбриологам было необходимо извлекать эмбрионы из инкубатора как минимум раз в сутки для оценки их развития. Эмбрионы плохо переносят переход из оптимальных условий культивирования, что ограничивает количество наблюдений, которые могли быть произведены. Эта проблема является чрезвычайно важной для эмбриологии, и тех-

нология TLI позволяет ее успешно преодолеть. С помощью метода цифровой визуализации развитие эмбрионов можно легко контролировать, не вынимая при этом их из инкубатора. Камера, встроенная в инкубатор, производит фотосъемку эмбрионов с заданной частотой, далее с помощью соответствующего программного обеспечения формируется видеоролик, который отображает полный цикл эмбрионального развития. Данный тип мониторинга позволяет собирать гораздо больше информации об этапах развития эмбриона, в том числе в режиме реального времени [5].

Обзор наиболее распространенных систем тайм-лапс

В настоящее время используются различные системы с использованием метода покадровой съемки. Две из наиболее распространенных – системы PrimoVision (Vitrolife) [6] и Embryoscope (Fertilitech) [7], используют технологию светлого поля, тогда как система EEVA [8] (ранняя эмбриональная оценка жизнеспособности, Аухогун) основана на применении темнопольной микроскопии. Все системы оснащены цифровым инвертированным микроскопом, который фотографирует эмбрионы с интервалом 5-20 минут. Изображения обрабатываются путем сбора последовательных кадров, а затем отображаются на экране компьютера. Изображения, сделан-

ные с заданными интервалами, затем соединяются в короткие видеоролики, которые можно детально анализировать.

Embryoscope (Fertilitech) представляет собой инкубатор с интегрированной системой покадровой съемки, где эмбрионы, культивируемые индивидуально на планшете в микролунках, перемещаются в поле зрения встроенного микроскопа. Использование планшетов позволяет контролировать до 12 отдельно культивируемых эмбрионов. Embryoscope производит съемку каждые 12-20 минут и может оценить эмбрионы в 7 фокальных плоскостях. Он использует красную светодиодную подсветку с низкой интенсивностью (635 нм) и экспозицию изображения <0,5 секунд [7].

PrimoVision – это компактная цифровая инвертированная система покадровой съемки, предназначенная для размещения внутри существующих традиционных инкубаторов малого и крупного размера. Контроль системы, формирование базы данных пациентов, анализ развития эмбрионов и принятие решений выполняются вне инкубатора через блок управления. Эмбрионы в системе PrimoVision также культивируются в планшетах с 9-16 лунками. Система PrimoVision использует светодиодную подсветку низкой интенсивности (550 нм), а также позволяет оценить эмбрионы в 11 фокальных плоскостях. Каждый контрольный блок системы способен одновременно следить за 96 эмбрионами [6].

Как и другие подобные системы, EEVA требует, чтобы в инкубатор помещался специальный микроскоп. Эта система основана на использовании темнопольной микроскопии, что позволяет лучше визуализировать контуры клеточных мембран, контролировать деление клеток. Однако метод дает гораздо меньше информации о внутриклеточной морфологии [6,8].

Использование тайм-лапс систем при ЭКО

Организм матери хорошо защищает яйцеклетки и эмбрионы, и обеспечивает им оптимальные условия для развития. Вне организма человека они чрезвычайно

чувствительны к колебаниям условий внешней среды, поэтому крайне важно приблизить условия культивирования эмбрионов к естественным. Внедрение технологий TLI позволяет осуществлять осмотр, оценку качества и темпов развития эмбрионов, не открывая инкубатор и не извлекая их наружу. Это стало возможным благодаря тому, что использование TLI позволяет в режиме реального времени производить цифровую фотосъемку непосредственно в инкубаторе и таким образом отслеживать все этапы развития эмбрионов без изменений условий культивирования. Применение нового подхода в наблюдении за эмбрионами внутри инкубаторов существенно повышает стабильность условий их развития. Но это не единственное преимущество технологии TLI, так как в циклах ЭКО эмбриолог чаще всего имеет дело с несколькими эмбрионами зачастую различными по качеству, то одной из важнейших задач ЭКО, является отбор наиболее перспективных эмбрионов для переноса в полость матки. Для решения данной задачи эмбриолог оценивает морфологию эмбрионов по ряду параметров. С появлением технологии непрерывного наблюдения за эмбрионами, эмбриолог получает максимально детальную видео-хронику раннего развития каждого эмбриона. В ходе своей жизнедеятельности эмбрион переживает определённые стадии развития, которые, в свою очередь, являются важным показателем при оценке его качества и потенциала имплантации [9]:

1. Сразу после оплодотворения идет проверка признаков того, что процедура ЭКО проходит успешно. Эта проверка осуществляется бесконтактным путем благодаря технологии наблюдения и оценки TLI. Для этого оцениваются пронуклеусы: наличие, количество, внутреннюю структуру, симметричность, внешний вид. Критерии нормы: пронуклеусов должно быть два, они должны располагаться рядом, их размеры должны быть одинаковыми, внутри должны визуализироваться «ядрышки» (пронуклеоли), «ядрышки» долж-

ны иметь правильное расположение и количество. На данном этапе развития эмбрионов может формироваться множество патологий, которые ведут к их гибели. Например: присутствие одного пронуклеуса вместо двух (оплодотворение не состоится), наличие трех пронуклеусов (эмбрион нежизнеспособен, так как будет иметь тройной хромосомный набор). Нежизнеспособные эмбрионы сразу отбраковывают, так как дальнейшее их использование не имеет смысла.

2. На второй день культивации при наблюдении с помощью TLI можно анализировать процесс деления клетки и образования бластомеров. Критериями качества развития эмбриона на данном этапе являются его размеры, форма, степень фрагментации (объем, который внутри эмбриона занимают безъядерные элементы цитоплазмы). Чем больше внутри эмбриона бластомеров и чем меньше степень фрагментации, тем более жизнеспособным он считается. Такой зародыш имеет наибольший потенциал к нормальному росту и развитию.

3. Нормальный эмбрион на третий день развития имеет от 7 до 9 бластомеров. На данном этапе многие зародыши прекращают свое развитие. Это происходит по причине наличия дефектов генетического материала. «Блок развития» – так называют эмбриологи явление, которое обеспечивает естественный отбор.

4. На четвертый день зародыш состоит из 10-16 бластомеров – морула. Он становится более компактным, его поверхность выглядит более гладкой, чем на третий день, что ясно можно увидеть с помощью TLI. Заканчивается данная стадия кавитацией. Так называется процесс образования полости внутри эмбриона.

5. На пятый день развития эмбрион достигает стадии бластоцисты, полость внутри достигает 50% и более от его общего объема. Бластоциста состоит из:

1) Трофобласт. Представляет собой наружный слой клеток. Эта часть эмбриона отвечает за его внедрение (имплантацию) в слизистую оболочку матки. Из него

будет развиваться плацента и прочие внезародышевые оболочки.

2) Эмбриобласт – внутренний слой клеток. Из него в дальнейшем будут формироваться органы и ткани плода. На данном этапе развития критериями качества эмбриона являются – размер внутренней полости, степень проникновения эмбриона за оболочку (хэтчинг), количество и плотность клеток. Именно на этой стадии в большинстве случаев врачи пересаживают эмбрион в матку женщины. Также при необходимости эмбрионы можно замораживать. Это делают, чтобы сохранить «лишние» эмбрионы на следующий цикл. Таким образом, изучение морфологии и темпов развития эмбрионов позволило выработать морфокинетические критерии для оценки качества эмбрионов, что существенно дополняет традиционные подходы.

Благодаря технологии TLI [10] в арсенале эмбриолога появился новый инструмент, позволяющий улучшить отбор наиболее перспективных эмбрионов и повысить тем самым вероятность наступления беременности.

Идентификация биомаркеров с использованием тайм-лапс технологии

Трансплантация эмбриона является предпочтительной процедурой при лечении бесплодия в условиях *in vitro*. Однако для того, чтобы улучшить число положительных исходов беременности, существует необходимость в надежных биомаркерах, которые способны помочь в отборе эмбрионов с самым высоким потенциалом развития. Биомаркеры, идентифицированные с помощью технологии TLI, позволяют определить, какие эмбрионы наиболее подходят для проведения эмбриологических процедур по трансплантации эмбриона. Тем не менее, принятие любого нового биомаркера требует серьезной научной основы и надежной технологии количественной оценки. Поэтому, прежде чем биомаркеры будут внедрены в клиническую практику повсеместно, необходима дополнительная проверка их безопасности и эффективности технологии.

Биомаркеры D3 и Eeva, идентифицированные с помощью тайм-лапс технологии, используются в клиническом отборе эмбрионов и имеют уникальные преимущества. В многочисленных публикациях показаны корреляции между биомаркерами D3 и Eeva и развитием эмбрионов, качеством эмбрионов и потенциалом имплантации [11].

Основные методы и техники визуализации эмбриона в условиях *in vitro*

Цифровая визуализация эмбриона позволяет произвести качественную оценку раннего формирования органов и тканей с использованием множества новых методов, включая оптическую когерентную томографию, микроскопию с многофотонным возбуждением, рамановскую спектроскопию, конфокальную лазерную микроскопию, ультразвуковое сканирование, поверхностную цифровую микроскопию, магнитно-резонансную томографию, компьютерную импедансную томографию.

Оптическая когерентная томография

В последнее десятилетие разработаны методы оптической когерентной томографии (ОКТ) для трехмерной визуализации эмбрионов, с высокими пространственными и временными разрешениями в условиях *in vivo*. Первоначально разработанная в 1991 г. как метод для визуализации сетчатки [12], [13], ОКТ в настоящее время помимо клинической офтальмологии широко применяется в дерматологии, кардиохирургии, онкологии. ОКТ представляет собой интерферометрический метод с низкой когерентностью, способный к неинвазивному и глубокому отображению ткани с пространственным разрешением в микрометрическом масштабе [13]. При ОКТ для зондирования биоткани используется оптическое излучение ближнего инфракрасного диапазона (~1 мкм), а не акустические волны, как при воздействии ультразвука. В своей базовой конфигурации свет от широкополосного источника распадается и переходит на исследуемый образец, а также в интерферометр типа Майкельсона. Трехмерное изображение тради-

ционно выполняется путем сканирования луча по образцу в направлениях *x* и *y* с использованием зеркал на гальванометре.

Внедрение доплеровских измерений в ОКТ позволяет получать как структурные, так и скоростные данные при одном и том же пространственном и временном разрешении. При этом ОКТ значительно превосходит другие методы визуализации эмбриона. В сравнении с лазерной сканирующей микроскопией, ОКТ имеет большую глубину проникновения в ткани, с ультразвуком – большее пространственное разрешение. Поэтому метод оптической когерентной томографии может стать идеальным инструментом для изучения развития эмбриональных структур.

Недавно несколько исследовательских групп успешно применили ОКТ для визуализации динамики кровотока и развития сердечно-сосудистой системы (ССС) в опытах на *Drosophila* [14] и *Xenopus laevis* [15]. К большому сожалению, на сегодняшний день исследования по ОКТ-картированию сердечно-сосудистой системы эмбрионов млекопитающих ограничены и не находят широкого практического применения.

Микроскопия с многофотонным возбуждением

Метод визуализации эмбриональных структур с использованием мультифотонной микроскопии в последнее время приобрел большую значимость. Многофотонное возбуждение происходит, когда два или более фотона взаимодействуют одновременно друг с другом, с выделением суммарной энергии, достаточной для возбуждения флуорофора. Использование ближнего инфракрасного света для возбуждения флуорофора в видимом диапазоне позволяет многофотонной микроскопии глубже проникать внутрь тканей, в сравнении с конфокальной микроскопией. Кроме того, чувствительность и глубина проникновения импульсов значительно увеличивается, за счет того, что импульсы пространственно ограничены фокальной плоскостью исследуемого объекта. При

этом устраняется необходимость в конфокальном отверстии для генерации оптически разделенных изображений. Эти преимущества определяют многофотонную микроскопию как идеальный выбор для глубокой съемки исследуемого эмбриона в условиях реального времени.

Многофотонная или двухфотонная микроскопия является хорошей альтернативой конфокальной и деконволюционной микроскопии, так как имеет определенные преимущества при получении трехмерных изображений объекта наблюдения. Метод двухфотонного возбуждения значительно превосходит другие при наблюдении неповрежденных тканей, таких как срезы головного мозга, эмбрионы, целые органы. При данном типе возбуждения поглощаются два фотона вместо одного. Инфракрасный свет (800 нм), имеющий меньшее рассеяние биологической ткани, позволяет глубже проникать (до 2 мм) в исследуемые образцы тканей животных [16]. Многофотонная микроскопия используется для изучения динамических морфогенных процессов и клеточного моделирования в глубоких тканях у дрозофил, данио-рерио, эмбрионов птиц и мышей.

Применение ультразвука

Высокочастотная ультразвуковая визуализация стала достаточно значимым методом функциональной оценки органов и тканей организмов в различные периоды онтогенеза. Так на мышах проведены детальные исследования *in vivo* с использованием высокочастотных ультразвуковых волн, с помощью которых было продемонстрировано нормальное развитие сердца и сосудов [17]. До недавнего времени высокочастотное ультразвуковое исследование в меньшей степени использовалось в научных исследованиях. Однако данный метод имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами визуализации эмбриональных структур. Процедура может быть выполнена неинвазивно и проводится в режиме реального времени. Кроме того, количественный функционал оценки органов и тканей может проводиться с исполь-

зованием множества доплеровских технологий, включая импульсный спектральный доплер и цветное картирование доплеровского потока.

Ранние исследования с использованием ультразвука в опытах на куриных эмбрионах были ограничены изучением только сердечно-сосудистой системы. Кларк и Ху (1982) впервые использовали непрерывный волновой доплеровский микропередатчик для получения сигналов скорости кровотока в дорсальной аорте куриного эмбриона [18]. В 1990 г. они одни из первых, опубликовали научную работу с использованием дуплексной ультразвуковой визуализации сердечно-сосудистой системы куриного эмбриона [19].

Одним из вариантов ультразвуковых исследований в клинической и экспериментальной медицине, является использование ультразвуковых контрастных веществ, состоящих из небольших пузырьков газа покрытых оболочкой, обычно размером в несколько микрон [20]. Микропузырьки вводятся внутривенно, далее попадая в кровоток, они пульсируют, вызывая увеличение или уменьшение собственного диаметра. Данный процесс сопровождается сильным ЭХО в перфузированной ткани. Использование микропузырькового контрастирования в сочетании с оптическими методами визуализации в условиях *in vivo*, позволяет проводить двумерную визуализацию эмбриональных структур и органов [21].

Поверхностная цифровая микроскопия

Современная наука сталкивается с проблемой визуализации биологических структур, начиная от клеток и тканей и заканчивая органом и организмом в целом. Поверхностная цифровая микроскопия (ПЦМ) позволяет увидеть объемное изображение структур в разных масштабах. Данную технологию используют для изучения развития эмбрионов. ПЦМ расширяет наши возможности при воспроизведении трехмерного изображения эмбриона в высоком разрешении с использованием сверхконтраста. Качество изображения ПЦМ не ограничено глубиной или оптическими свойствами

вышележащей ткани. ПЦМ обеспечивает более точное трехмерное представление эмбриона, чем конфокальная микроскопия. Непосредственное применение этой технологии позволяет продвинуться в визуализации и понимании сложных морфогенетических процессов, а также в детальном сравнении нормальных и генетически модифицированных эмбрионов.

Суть метода состоит в том, что изображение образца просматривается через линзы объектива под дихроичным лучом светоделиителя (dichroic beam splitter), проходя через эмиссионный фильтр формируются послойные 2D изображения. Результирующий набор данных ПЦМ почти изотропен, так как разрешение в плоскости объектива микроскопа соответствует толщине удаленных участков и глубине резкости изображения, определяемой глубиной проникновения света в образец. Поле зрения микроскопа определяет размер образца в плоскости. Непосредственным результатом ПЦМ является зарегистрированная серия двумерных (2D) изображений, которые затем вычислительно восстанавливаются в 3D-объем [22].

Многие современные методы визуализации не очень хорошо подходят для образцов миллиметрового масштаба с микронным разрешением. Основным техническим преимуществом ПЦМ перед blockface методом визуализации [23] является получение 3D наборов данных. Осевое разрешение любого метода получения 3D-изображения лучше всего сравнивать, оценивая ортогональные сечения $x-z$ и $y-z$ через набор данных. При этом, уровень разрешения, контраста и детализации сохраняется неразличимым в трех измерениях. В этом заключается основная сила ПЦМ: сохранение структуры ткани и полости в плоскости ПЦМ сравнимо с тем, что достигается в тонких парафиновых срезах или конфокальных оптических срезах, и его сквозное разрешение в настоящее время не имеет себе равных на больших, толстых образцах.

Существует несколько методов, которые по своей сути получают 3D-изобра-

жения. Среди них оптическая когерентная томография (ОКТ), магнитно-резонансная томография (МРТ) и оптическая проекционная томография (ОПТ). ОКТ-технология отражает свет, исходящий от образца, и техника имеет потенциал для изображения 3 мм в живом образце, но делает это с разрешением от 12 до 15 микрон с несколькими вариантами специфического контраста [24]. Мощное магнитное поле МРТ превосходно для образцов больших размеров в разрешении от 50 до 100 микрон. В фиксированных образцах, разрешение от 35 до 50 микрон достигимо с длинными периодами развертки и большими магнитными полями [25]. В свою очередь ОПТ не подходит для эмбрионов, которые содержат очень плотные ткани, такие как хрящ или кость. Сочетание простоты обзора первичных данных и легкости их передачи позволяет ПЦМ обеспечить новые возможности для использования в изучении патологий эмбрионального периода развития.

Рамановская спектроскопия

Суть метода заключается в том, что через образец исследуемого вещества пропускают луч с определенной длиной волны, который при контакте с образцом рассеивается. Полученные лучи с помощью линзы собираются в один пучок и пропускаются через светофильтр, отделяющий слабые (0,001% интенсивности) рамановские лучи от более интенсивных (99,999%) рэлеевских. «Чистые» рамановские лучи усиливаются и направляются на детектор, который фиксирует частоту их колебания [26].

Раман-спектрометр состоит из источника монохроматического излучения (лазер), системы освещения образца и фокусировки лучей, светофильтра, системы обнаружения и компьютерного контроля. Лазерный луч достаточно близок к идеальной плоской монохроматической волне, поэтому его можно сфокусировать на образце в пятно, сечение которого будет ограничено только дифракционным пределом волновой оптики (т. е. порядка десятых долей микрона для видимого диапазона). Рассеянные лучи направляют на

светофильтр чаще с помощью системы сборных и фокусирующих линз, хотя также применяют системы зеркал. Система ахроматических линз может иметь две конфигурации, в зависимости от того, фиксируются рассеивающиеся лучи под углом 90° или под углом 180° [27]. Как правило, используются интерференционные фильтры, в которых две оптические плоскости способны пропускать только лучи с длинами волн, кратными удвоенной толщине фильтра. В связи с малой интенсивностью рамановского сигнала, к детекторам применяются серьезные требования, которым соответствуют высокочувствительные фотодетекторы.

Рамановская спектроскопия представляет собой достаточно новый, неинвазивный метод, который можно использовать для количественного измерения изменений клеточной активности в отдельных живых клетках и даже эмбрионах. Метод позволяет изучать метаболизм эмбриона, сравнивать данные его развития, и возможность его использования (при соответствии всех показателей норме) при дальнейшей ЭКО, для получения более прогнозируемого благоприятного исхода. Использование РС составляет основу метаболомного подхода в оценке жизнеспособности эмбриона [28].

РС метаболизма пирувата

Существует два главных пути образования АТФ, которая необходима для энергетического клеточного метаболизма: окислительное фосфорилирование и анаэробный гликолиз. Гликолиз преобладает в раннем предимплантационном развитии, где пируват и лактат являются основными источниками энергии эмбриона, а поглощение глюкозы минимально [29]. Следовательно, поглощение пирувата эмбрионами в культуре может быть использовано в качестве возможного маркера жизнеспособности и потенциала их роста. В частности, показано более высокое поглощение пирувата эмбрионами, которые развиваются до стадии бластоцисты. Однако дальнейшие исследования продемонстрировали обратную связь между поглощением

пирувата 2-8-клеточными эмбрионами с жизнеспособностью эмбриона и успешной беременностью [30]. Также предполагается, что эмбрионы демонстрируют широкий диапазон значений поглощения пирувата, но вариация показателя уменьшается в наиболее качественных эмбрионах. Также выявлено, что поглощение пирувата на 4-й дпк значительно выше у эмбрионов, которые продолжают образовывать бластоцисту, по сравнению с эмбрионами, которые не развиваются до стадии бластоцисты, в соответствии с первоначальными отчетами.

РС метаболизма глюкозы

Способность метаболизировать глюкозу значительно возрастает при переходе от стадии морулы к стадии бластоцисты, а также отражает потенциал развития и жизнеспособность эмбриона [31]. В частности, эмбрионы имплантации которых приводит к беременности, имеют более высокое потребление глюкозы в культуре.

РС метаболизма аминокислот

Используя рамановскую спектроскопию [32] стало возможным определение аминокислот выделяемых и поглощаемых человеческим эмбрионам на разных стадиях предимплантационного развития в режиме реального времени. Показана связь между снижением содержания глицина и лейцина и повышением уровня аспарагина в культуральных средах с последующим развитием беременности. Известно, что эмбрионы с большей жизнеспособностью имеют относительно более низкий метаболизм аминокислот. Существуют аналогичные данные в отношении криоконсервированных эмбрионов, что тем самым предоставляет дополнительную поддержку гипотезе «спокойного эмбриона», продемонстрировав, что метаболическая активность эмбрионов на стадии бластоцисты положительно коррелирует с существующим повреждением ДНК [33].

Значение РС

Описанные выше исследования проведены с помощью РС. Согласно полученным данным показано, что существуют определённые метаболические различия

эмбрионов до имплантации. [34], [35]. Однако применение технологии РС в клинической практике остается ограниченным по ряду причин. Многие из данных методик требуют сложного оборудования и специального обученного персонала, что затрагивает экономический вопрос исследования. До настоящего времени ни одна из технологий РС не была перспективно подтверждена на тестовом наборе образцов культурных сред, демонстрируя корреляцию с имплантационным потенциалом эмбрионов, которые были трансплантированы. Таким образом, сохраняется потребность в проверенной технологии РС, которая предсказывает жизнеспособность эмбрионов неинвазивно, путем интерактивной оценки метаболома нескольких образцов.

Магнитно-резонансная томография

Магнитно-резонансная томография (МРТ) является относительно новым методом получения качественных изображений эмбриона и плода с помощью высокотехнологичной методики, в основе которой лежит использование электромагнитного излучения, не оказывающего повреждающего воздействия на ткани. Преимуществом МРТ является отсутствие ионизирующей радиации, высокая тканевая контрастность, получение многоплоскостного и объемного изображения плода, независимо от его положения и гестационного возраста [36].

Трехмерное изображение, получаемое в ходе МРТ плода, может быть выведено в нескольких плоскостях, а минимальное расстояние между срезами достигает нескольких миллиметров. Это позволяет выявлять даже слабо выраженные аномалии развития и мелкие патологические образования. МРТ с успехом используют в неонатологии. Ранее главным ограничением для применения данной процедуры являлась двигательная активность плода. Решение проблемы найдено в виде сверхбыстрых томографов нового поколения, так МРТ высокого разрешения с использованием современного оборудования позволяет провести сканирование в любой удобной плоскости менее чем за 1 сек [37,38].

Используя этот метод можно диагностировать пороки развития плода, врожденные и генетические заболевания, патологию плаценты и пуповины, в мельчайших подробностях рассмотреть интересующую область с целью составления прогноза о развитии плода и его жизнеспособности, выбрать тактику ведения беременности, родов и послеродовых мероприятий. МРТ позволяет выявить патологию центральной нервной системы, полное или частичное отсутствие больших полушарий головного мозга, костей свода черепа и мягких тканей. Также с помощью МРТ можно сформировать группу риска по хромосомной патологии плода на основании измерения толщины воротникового пространства. Увеличение данного показателя косвенно свидетельствует о возможности наличия у ребенка синдрома Дауна (трисомия по 21 хромосоме). Кроме того, исследуются такие анатомические структуры эмбриона как: позвоночник, желудок, передняя брюшная стенка (на наличие внутриутробных грыж), мочевого пузыря, кости конечностей.

При проведении МРТ исследуются также такие внезародышевые органы, как желточный мешок и хорион. Желточный мешок существует до 12 недель беременности, является необходимым для раннего развития эмбриона, после 12 недель перестает функционировать, уменьшается в размерах и остается в основании пуповины. Его размер (внутренний диаметр) важен и, если он недоразвит, это может привести к смерти эмбриона. Хорион совместно со стенкой матки в дальнейшем образует плаценту. Его локализация дает представление о дальнейшей локализации плаценты, а изменение толщины может свидетельствовать о наличии внутриутробного инфицирования эмбриона, резус-конфликте, а также о нарушении питания плода [39].

Компьютерная импедансная томография

Электроимпедансная томография (ЭИТ) представляет собой метод получения изображений распределения электрического импеданса внутри тела с помощью

неинвазивных электрических измерений и последующего решения обратной задачи для уравнений, описывающих электрическое поле внутри неоднородной проводящей среды. Первые работы по ЭИТ были выполнены в Шеффилдском университете (Великобритания) [40]. На сегодняшний день известно, что электрические свойства (в частности, электропроводность) патологических тканей значительно отличаются от свойств окружающих здоровых тканей. Используя метод импедансной томографии, возможно оценить гемодинамические показатели плода и диагностировать повышенное давление в аорте плода, изменение фракции сердечного выброса, аритмии, что в свою очередь может являться признаком недостаточной состоятельности сердечной деятельности эмбриона [41].

Обработка полученных изображений

Каждый из вышеупомянутых методов визуализации *in vivo* ограничен пространственным и / или временным разрешением, или же методы не достигают необходимой глубины резкости. Для получения данных из первоначально полученных статических изображений разработаны методики для расширения их разрешающей способности. Условно они могут быть разделены на три категории: (1) сбор изображения, (2) обработка изображения и (3) анализ изображения.

Сбор изображения

Для динамической системы, на которой проводится тайм-лапс съемка, определяющим моментом является время получения изображения и фиксирование исследуемого образца для ограничения движений (гейтинг). Гейтинг может быть разработан и выполнен во время визуализации объекта (перспективный) или после того, как набор данных от изображения был получен (ретроспективный). Перспективный гейтинг синхронизирует сбор изображений с конкретным сигналом, испускаемым исследуемым образцом. Ретроспективный гейтинг производит сбор всех возможных изображений в наборе данных, а после сортирует их на основе периодических

пространственных или временных сигналов. В частности, данный подход был использован для проведения визуализации развития эмбрионального сердца [42].

Обработка изображений

Целью восстановления изображения является улучшение границ обнаружения и локального контраста в искомом наборе данных, полученном от исследуемого образца. Имеются два ключевых подхода – обратная свертка изображения (деконволюция) и регистрация (наложение). Деконволюция – это один из способов обработки изображения, позволяющий избавиться от некоторых нежелательных эффектов, возникающих при прохождении лучей света через микроскоп. При этом качество итогового изображения после деконволюции сравнимо с качеством изображения, получаемого на конфокальном микроскопе [43]. В процессе регистрации изображений происходит трансформация различных наборов данных в одну координатную систему. В основе данного метода лежит сопоставление искаженного изображения с эталонным той же области. Также возможно совместное применение как деконволюции, так и регистрации изображения, для максимального улучшения качества получаемого изображения.

Анализ изображений

Основой анализа изображений является перевод интенсивного показателя каждого изображения в цифровую информацию, которая может быть количественно изучена в сравнении с другими данными. Разработаны и внедрены многочисленные алгоритмы для этих целей, активно используются приложения для обработки изображений (например, NIH ImageJ) [44]. Количественно измеряемые данные, полученные в ходе анализа изображений, можно использовать в вычислительном моделировании при имитации биологических условий для оценки местных и глобальных функциональных параметров, которые невозможно измерить напрямую. Например, моделирование 3D и 4D геометрических структур эмбриональ-

ных сердец было использовано для количественной оценки локальных изменений сердца и сосудов при воздействии стрессовыми факторами на исследуемый образец в ходе его развития [45].

Заключение

В настоящее время, мы можем наблюдать развитие методов визуализации эмбриона от давно вошедших в клиническую практику методов покадровой съемки изображений в условиях светлого и темного

поля при световой микроскопии до новых перспективных методик, позволяющих в режиме реального времени оценивать как морфокинетические параметры, так и метаболомный профиль эмбриона.

Дополнительная информация

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, о которых необходимо сообщить в связи с публикацией данной статьи.

Литература

- Grabowski C.T., Schroeder R.E. A time-lapse photographic study of chick embryos exposed to teratogenic doses of hypoxia // *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 1968. Vol. 19, №3. P. 347-362.
- Lemmen J.G., Agerholm I., Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes // *Reproductive Biomedicine Online*. 2008. Vol. 17, №3. P. 385-391. doi:10.1016/S1472-6483(10)60222-2
- Mio Y., Maeda K. Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2008. Vol. 199, №6. P. 660.e1-5. doi:10.1016/j.ajog.2008.07.023
- Kirkegaard K., Agerholm I.E., Ingerslev H.J. Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment // *Human Reproduction*. 2012. Vol. 27, №5. P. 1277-1285. doi:10.1093/humrep/des079
- Conaghan J., Chen A.A., Willman S.P., et al. Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial // *Fertility and Sterility*. 2013. Vol. 100, №2. P. 412-419.e5. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.04.021
- Kaser D.J., Racowsky C. Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic review // *Human Reproduction Update*. 2014. Vol. 20, №5. P. 617-631. doi:10.1093/humupd/dmu023
- Liu Y., Chapple V., Roberts P., et al. Prevalence, consequence, and significance of reverse cleavage by human embryos viewed with the use of the Embryoscope time-lapse video system // *Fertility and Sterility*. 2014. Vol. 102, №5. P. 1295-1300. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.07.1235
- Chen A.A., Tan L., Suraj V., et al. Biomarkers identified with time-lapse imaging: discovery, validation, and practical application // *Fertility and Sterility*. 2013. Vol. 99, №4. P. 1035-1043. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.01.143
- Trounson A., Wood C. Extracorporeal fertilization and embryo transfer // *Clinics in Obstetrics and Gynaecology*. 1981. Vol. 8, №3. P. 681-713.
- Mastenbroek S., Twisk M., Echten-Arends J., et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening // *New England Journal of Medicine*. 2007. Vol. 357, №1. P. 9-17. doi:10.1056/NEJMoa067744
- Conaghan J., Chen A.A., Willman S.P., et al. Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial // *Fertility and Sterility*. 2013. Vol. 100, №2. P. 412-419. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.04.021
- Drexler W., Sattmann H., Hermann B. Enhanced visualization of macular pathology with the use of ultrahigh-resolution optical coherence tomography // *Archives of Ophthalmology*. 2003. Vol. 121, №5. P. 695-706. doi:10.1001/archophth.121.5.695
- Huang D., Swanson E.A., Lin C.P., et al. Optical coherence tomography // *Science*. 1991. Vol. 254, №5035. P. 1178-1181. doi:10.1126/science.1957169
- Choma M.A., Izatt S.D., Wessells R.J., et al. In vivo imaging of the adult *Drosophila melanogaster* heart with real-time optical coherence tomography // *Circulation*. 2006. Vol. 114, №2. P. 35-36. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.593541
- Mariampillai A., Standish B.A., Munce N.R., et al. Doppler optical cardiogram gated 2D color flow imaging at 1000 fps and 4D in vivo visualization of embryonic heart at 45 fps on a swept source OCT system // *Optics Express*. 2007. Vol. 15, №4. P. 1627-1638. doi:10.1364/OE.15.001627
- Diaspro A., Chirico G., Collini M. Two-photon fluorescence excitation and related techniques in biological microscopy // *Quarterly Reviews of Biophysics*. 2005. Vol. 38, №2. P. 97-166. doi:10.1017/S0033583505004129
- Wang Z., Bovik A.C., Sheikh H.R., et al. Image quality assessment: from error visibility to structural similarity // *IEEE Transactions on Image Processing*. 2004. Vol. 13, №4. P. 600-612. doi:10.1109/TIP.2003.819861
- Clark E.B., Hu N. Developmental hemodynamic changes in the chick embryo from stage 18 to 27 // *Circulation Research*. 1982. Vol. 51, №6. P. 810-

815. doi:10.1161/01.RES.51.6.810
19. Wagman A.J., Hu N., Clark E.B. Effect of changes in circulating blood volume on cardiac output and arterial and ventricular blood pressure in the stage 18, 24, and 29 chick embryo // *Circulation Research*. 1990. Vol. 67, №1. P. 187-192. doi:10.1161/01.RES.67.1.187
20. Qin S., Caskey C.F., Ferrara K.W. Ultrasound contrast microbubbles in imaging and therapy: physical principles and engineering // *Physics in Medicine and Biology*. 2009. Vol. 54, №6. P. 27. doi:10.1088/0031-9155/54/14/c01
21. Garbin V., Cojoc D., Ferrari E., et al. Changes in microbubble dynamics near a boundary revealed by combined optical micromanipulation and high-speed imaging // *Applied Physics Letters*. 2007. Vol. 90, №11. P. 114103. doi:10.1063/1.2713164
22. Pedrini G., Tiziani H.J. Short-coherence digital microscopy by use of a lensless holographic imaging system // *Applied Optics*. 2002. Vol. 41, №22. P. 4489-4496. doi:10.1364/AO.41.004489
23. Weninger W.J., Mohun T. Phenotyping transgenic embryos: a rapid 3-D screening method based on episcopic fluorescence image capturing // *Nature Genetics*. 2002. Vol. 30, №1. P. 59. doi:10.1038/ng785
24. Tearney G.J., Boppart S.A., Bouma B.E., et al. Scanning single-mode fiber optic catheter – endoscope for optical coherence tomography // *Optics Letters*. 1996. Vol. 21, №7. P. 543-545. doi:10.1038/nbt892
25. Dhenain M., Ruffins S.W., Jacobs R.E. Three-dimensional digital mouse atlas using high-resolution MRI // *Developmental Biology*. 2001. Vol. 232, №2. P. 458-470. doi:10.1006/dbio.2001.0189
26. Colthup N., Daly L., Wiberley S. Introduction to infrared and Raman spectroscopy. 3rd ed. Academic Press; 1990.
27. Shen A.G., Peng J., Zhao Q.H., et al. Accurate and noninvasive embryos screening during in vitro fertilization (IVF) assisted by Raman analysis of embryos culture medium // *Laser Physics Letters*. 2012. Vol. 9, №4. P. 322-328. doi:10.1002/lapl.201110134
28. Uyar A., Seli E. Metabolomic assessment of embryo viability. *Seminars in reproductive medicine* // NIH Public Access. 2014. Vol. 32, №2. P. 141. doi:10.1055/s-0033-1363556
29. Aydiner F., Yetkin C.E., Seli E. Perspectives on emerging biomarkers for non-invasive assessment of embryo viability in assisted reproduction // *Current Molecular Medicine*. 2010. Vol. 10, №2. P. 206-215. doi:10.2174/156652410790963349
30. Conaghan J., Chen A.A., Willman S.P., et al. Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial // *Fertility and Sterility*. 2013. Vol. 100, №2. P. 412-419. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.04.021
31. Cohen J., Elder K., editors. *Human Preimplantation Embryo Selection*. Informa UK Ltd; 2007.
32. Brison D.R., Houghton F.D., Falconer D., et al. Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover // *Human Reproduction*. 2004. Vol. 19, №10. P. 2319-2324. doi:10.1093/humrep/deh409
33. Leese H.J., Brison D.R., McEvoy T.G., et al. Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited // *Molecular Human Reproduction*. 2008. Vol. 14, №12. P. 667-672. doi:10.1093/molehr/gan065
34. Leese H.J. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on // *Reproduction*. 2012. Vol. 143, №4. P. 417-427. doi:10.1530/REP-11-0484
35. Zhang S. Physiological and molecular determinants of embryo implantation // *Molecular Aspects of Medicine*. 2013. Vol. 34, №5. P. 939-980. doi:10.1016/j.mam.2012.12.011
36. Chen M.M., Coakley F.V., Kaimal A., et al. Guidelines for computed tomography and magnetic resonance imaging use during pregnancy and lactation // *Obstetrics & Gynecology*. 2008. Vol. 112, №2. P. 333-340. doi:10.1097/AOG.0b013e318180a505
37. Kubik-Huch R.A., Huisman T.A., Wisser J., et al. Ultrafast MR imaging of the fetus // *American Journal of Roentgenology*. 2000. Vol. 174, №6. P. 1599-1606. doi:10.2214/ajr.174.6.1741599
38. Hosny I.A., Elghawabi H.S. Ultrafast MRI of the fetus: an increasingly important tool in prenatal diagnosis of congenital anomalies // *Magnetic Resonance Imaging*. 2010. Vol. 28, №10. P. 1431-1439. doi:10.1016/j.mri.2010.06.024
39. French J., Gingles N., Stewart J., et al. Use of magnetic resonance imaging (MRI) and micro-computed tomography (micro-CT) in the morphological examination of rat and rabbit fetuses from embryofetal development studies // *Reproductive Toxicology*. 2010. Vol. 30, №2. P. 292-300. doi:10.1016/j.reprotox.2010.04.016
40. Brown B.H., Barber D.C., Seagar A.D. Applied potential tomography: possible clinical applications // *Clinical Physics and Physiological Measurement*. 1985. Vol. 6, №2. P. 109. doi:10.1088/0143-0815/6/2/002
41. Lindsey S.E., Butcher J.T., Yalcin H.C. Growth and hemodynamics after early embryonic aortic arch occlusion // *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*. 2015. Vol. 14, №4. P. 735-751. doi:10.1007/s10237-014-0633-1
42. Liebling M., Forouhar A.S., Gharib M., et al. Four-dimensional cardiac imaging in living embryos via postacquisition synchronization of nongated slice sequences // *Journal of Biomedical Optics*. 2005. Vol. 10, №5. P. 054001. doi:10.1117/1.2061567
43. Markham J., Conchello J.A. Parametric blind deconvolution: a robust method for the simultaneous estimation of image and blur // *JOSAA*. 1999. Vol. 16, №10. P. 2377-2391. doi:10.1364/JOSAA.16.002377
44. Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis //

- Nature Methods. 2012. Vol. 9, №7. P. 671. doi:10.1038/nmeth.2089
45. Liu A., Nickerson A., Troyer A., et al. Quantifying blood flow and wall shear stresses in the outflow tract of chick embryonic hearts // *Computers & Structures*. 2011. Vol. 89, №11-12. P. 855-867. doi:10.1016/j.compstruc.2011.03.003
- References**
1. Grabowski CT, Schroeder RE. A time-lapse photographic study of chick embryos exposed to teratogenic doses of hypoxia. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 1968;19(3):347-62.
 2. Lemmen JG, Agerholm I, Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reproductive Biomedicine Online*. 2008;17(3):385-91. doi:10.1016/S1472-6483(10)60222-2
 3. Mio Y, Maeda K. Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2008;199(6):660.e1-5. doi:10.1016/j.ajog.2008.07.023
 4. Kirkegaard K, Agerholm IE, Ingerslev HJ. Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Human Reproduction*. 2012;27(5):1277-85. doi:10.1093/humrep/des079
 5. Conaghan J, Chen AA, Willman SP, et al. Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial. *Fertility and Sterility*. 2013;100(2):412-9.e5. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.04.021
 6. Kaser DJ, Racowsky C. Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic review. *Human Reproduction Update*. 2014;20(5):617-31. doi:10.1093/humupd/dmu023
 7. Liu Y, Chapple V, Roberts P, et al. Prevalence, consequence, and significance of reverse cleavage by human embryos viewed with the use of the Embryoscope time-lapse video system. *Fertility and Sterility*. 2014;102(5):1295-300. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.07.1235
 8. Chen AA, Tan L, Suraj V, et al. Biomarkers identified with time-lapse imaging: discovery, validation, and practical application. *Fertility and Sterility*. 2013;99(4):1035-43. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.01.143
 9. Trounson A, Wood C. Extracorporeal fertilization and embryo transfer. *Clinics in Obstetrics and Gynaecology*. 1981;8(3):681-713.
 10. Mastenbroek S, Twisk M, Echten-Arends J, et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *New England Journal of Medicine*. 2007;357(1):9-17. doi:10.1056/NEJMoa067744
 11. Conaghan J, Chen AA, Willman SP, et al. Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial. *Fertility and Sterility*. 2013;100(2):412-9. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.04.021
 12. Drexler W, Sattmann H, Hermann B. Enhanced visualization of macular pathology with the use of ultrahigh-resolution optical coherence tomography. *Archives of Ophthalmology*. 2003;121(5):695-706. doi:10.1001/archophth.121.5.695
 13. Huang D, Swanson EA, Lin CP, et al. Optical coherence tomography. *Science*. 1991;254(5035):1178-81. doi:10.1126/science.1957169
 14. Choma MA, Izatt SD, Wessells RJ, et al. In vivo imaging of the adult Drosophila melanogaster heart with real-time optical coherence tomography. *Circulation*. 2006;114(2):35-6. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.593541
 15. Mariampillai A, Standish BA, Munce NR, et al. Doppler optical cardiogram gated 2D color flow imaging at 1000 fps and 4D in vivo visualization of embryonic heart at 45 fps on a swept source OCT system. *Optics Express*. 2007;15(4):1627-38. doi:10.1364/OE.15.001627
 16. Diaspro A, Chirico G, Collini M. Two-photon fluorescence excitation and related techniques in biological microscopy. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 2005;38(2):97-166. doi:10.1017/S0033583505004129
 17. Wang Z, Bovik AC, Sheikh HR, et al. Image quality assessment: from error visibility to structural similarity. *IEEE Transactions on Image Processing*. 2004;13(4):600-12. doi:10.1109/TIP.2003.819861
 18. Clark EB, Hu N. Developmental hemodynamic changes in the chick embryo from stage 18 to 27. *Circulation Research*. 1982;51(6):810-5. doi:10.1161/01.RES.51.6.810
 19. Wagman AJ, Hu N, Clark EB. Effect of changes in circulating blood volume on cardiac output and arterial and ventricular blood pressure in the stage 18, 24, and 29 chick embryo. *Circulation Research*. 1990;67(1):187-92. doi:10.1161/01.RES.67.1.187
 20. Qin S, Caskey CF, Ferrara KW. Ultrasound contrast microbubbles in imaging and therapy: physical principles and engineering. *Physics in Medicine and Biology*. 2009;54(6):27. doi:10.1088/0031-9155/54/14/c01
 21. Garbin V, Cojoc D, Ferrari E, et al. Changes in microbubble dynamics near a boundary revealed by combined optical micromanipulation and high-speed imaging. *Applied Physics Letters*. 2007;90(11):114103. doi:10.1063/1.2713164
 22. Pedrini G, Tiziani HJ. Short-coherence digital microscopy by use of a lensless holographic imaging system. *Applied Optics*. 2002;41(22):4489-96. doi:10.1364/AO.41.004489
 23. Weninger WJ, Mohun T. Phenotyping transgenic embryos: a rapid 3-D screening method based on episcopic fluorescence image capturing. *Nature Genetics*. 2002;30(1):59. doi:10.1038/ng785
 24. Tearney GJ, Boppart SA, Bouma BE, et al. Scanning single-mode fiber optic catheter – endoscope for optical coherence tomography. *Optics Letters*. 1996;21(7):543-5. doi:10.1038/nbt892

25. Dhenain M, Ruffins SW, Jacobs RE. Three-dimensional digital mouse atlas using high-resolution MRI. *Developmental Biology*. 2001;232(2):458-70. doi:10.1006/dbio.2001.0189
26. Colthup N, Daly L, Wiberley S. *Introduction to infrared and Raman spectroscopy*. 3rd ed. Academic Press; 1990.
27. Shen AG, Peng J, Zhao QH, et al. Accurate and non-invasive embryos screening during in vitro fertilization (IVF) assisted by Raman analysis of embryos culture medium. *Laser Physics Letters*. 2012;9(4):322-8. doi:10.1002/lapl.201110134
28. Uyar A, Seli E. Metabolomic assessment of embryo viability. *Seminars in reproductive medicine. NIH Public Access*. 2014;32(2):141. doi:10.1055/s-0033-1363556
29. Aydiner F, Yetkin CE, Seli E. Perspectives on emerging biomarkers for non-invasive assessment of embryo viability in assisted reproduction. *Current Molecular Medicine*. 2010;10(2):206-15. doi:10.2174/156652410790963349
30. Conaghan J, Chen AA, Willman SP, et al. Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial. *Fertility and Sterility*. 2013;100(2):412-9. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.04.021
31. Cohen J, Elder K, editors. *Human Preimplantation Embryo Selection*. Informa UK Ltd; 2007.
32. Brison DR, Houghton FD, Falconer D, et al. Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Human Reproduction*. 2004;19(10):2319-24. doi:10.1093/humrep/deh409
33. Leese HJ, Brison DR, McEvoy TG, et al. Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Molecular Human Reproduction*. 2008;14(12):667-72. doi:10.1093/molehr/gan065
34. Leese HJ. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. *Reproduction*. 2012;143(4):417-27. doi:10.1530/REP-11-0484
35. Zhang S. Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Molecular Aspects of Medicine*. 2013;34(5):939-80. doi:10.1016/j.mam.2012.12.011
36. Chen MM, Coakley FV, Kaimal A, et al. Guidelines for computed tomography and magnetic resonance imaging use during pregnancy and lactation. *Obstetrics & Gynecology*. 2008;112(2):333-40. doi:10.1097/AOG.0b013e318180a505
37. Kubik-Huch RA, Huisman TA, Wissner J, et al. Ultrafast MR imaging of the fetus. *American Journal of Roentgenology*. 2000;174(6):1599-606. doi:10.2214/ajr.174.6.1741599
38. Hosny IA, Elghawabi HS. Ultrafast MRI of the fetus: an increasingly important tool in prenatal diagnosis of congenital anomalies. *Magnetic Resonance Imaging*. 2010;28(10):1431-9. doi:10.1016/j.mri.2010.06.024
39. French J, Gingles N, Stewart J, et al. Use of magnetic resonance imaging (MRI) and micro-computed tomography (micro-CT) in the morphological examination of rat and rabbit fetuses from embryo-fetal development studies. *Reproductive Toxicology*. 2010;30(2):292-300. doi:10.1016/j.reprotox.2010.04.016
40. Brown BH, Barber DC, Seagar AD. Applied potential tomography: possible clinical applications. *Clinical Physics and Physiological Measurement*. 1985;6(2):109. doi:10.1088/0143-0815/6/2/002
41. Lindsey SE, Butcher JT, Yalcin HC. Growth and hemodynamics after early embryonic aortic arch occlusion. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*. 2015;14(4):735-51. doi:10.1007/s10237-014-0633-1
42. Liebling M, Forouhar AS, Gharib M, et al. Four-dimensional cardiac imaging in living embryos via postacquisition synchronization of nongated slice sequences. *Journal of Biomedical Optics*. 2005;10(5):054001. doi:10.1117/1.2061567
43. Markham J, Conchello JA. Parametric blind deconvolution: a robust method for the simultaneous estimation of image and blur. *JOSAA*. 1999;16(10):2377-91. doi:10.1364/JOSAA.16.002377
44. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. 2012;9(7):671. doi:10.1038/nmeth.2089
45. Liu A, Nickerson A, Troyer A, et al. Quantifying blood flow and wall shear stresses in the outflow tract of chick embryonic hearts. *Computers & Structures*. 2011;89(11-12):855-67. doi:10.1016/j.compstruc.2011.03.003

Информация об авторах [Authors Info]

***Трофименко А.И.** – к.м.н., н.с., научно-организационный отдел, Научно-исследовательский институт – Краевая клиническая больница №1 имени профессора С.В. Очаповского, Краснодар, Российская Федерация. E-mail: artemtrofimenko@mail.ru

SPIN: 8810-2264, ORCID ID: 0000-0001-7140-0739.

A.I. Trofimenko – MD, PhD, Research Associate, Scientific and Organizational Department, Scientific Research Institute – Ochapovsky Regional Clinical Hospital №1, Krasnodar, Russian Federation.

SPIN: 8810-2264, ORCID ID: 0000-0001-7140-0739.

Певзнер Д.А. – студент, Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Российская Федерация.

SPIN: 8964-8719, ORCID ID: 0000-0003-0232-0334.

D.A. Pevzner – Student, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation.

SPIN: 8964-8719, ORCID ID: 0000-0003-0232-0334.

Лазарев В.В. – студент, Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Российская Федерация.

SPIN: 8934-9330, ORCID ID: 0000-0002-8047-2707.

V.V. Lazarev – Student, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation.

SPIN: 8934-9330, ORCID ID: 0000-0002-8047-2707.

Лысов Е.Е. – студент, Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Российская Федерация.

SPIN: 7922-2618, ORCID ID: 0000-0002-9743-0394.

E.E. Lysov – Student, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation.

SPIN: 7922-2618, ORCID ID: 0000-0002-9743-0394.

Парасулько Т.Р. – студент, Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Российская Федерация.

SPIN: 4362-6730, ORCID ID: 0000-0003-4533-7590.

T.R. Parasunko – Student, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation.

SPIN: 4362-6730, ORCID ID: 0000-0003-4533-7590.

Цитировать: Трофименко А.И., Певзнер Д.А., Лазарев В.В., Лысов Е.Е., Парасулько Т.Р. Обзор основных методов визуализации развития эмбриона // Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2021. Т. 9, №1. С. 121-135. doi:10.23888/HMJ202191121-135

To cite this article: Trofimenko AI, Pevzner DA, Lazarev VV, Lysov EE, Parasunko TR. Major embryonic development visualization methods review. *Science of the young (Eruditio Juvenium)*. 2021;9(1):121-35. doi:10.23888/HMJ202191121-135

Поступила / Received: 21.02.2020
Принята в печать / Accepted: 01.03.2021