

ЛАЗЕРНАЯ СКАНИРУЮЩАЯ МИКРОСКОПИЯ ПРИМЕНИТЕЛЬНО К РАННЕМУ ЭМБРИОНУ МЫШИ: ЦИТОМЕТРИЯ И ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ КЛЕТКИ

© 2016 г. М.А. Погорелова, А.И. Панаит, А.Г. Погорелов

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская 3*

E-mail: agpogorelov@rambler.ru

Поступила в редакцию 14.03.16 г.

После доработки 11.04.16 г.

Систематизированы данные, полученные в области количественной лазерной сканирующей микроскопии, и обсуждаются возможности данного подхода в области цитометрии и анализа структуры клетки раннего эмбриона и ооцита мыши. Для реализации метода используют стопку оптических срезов, полученных при сканировании микрообъекта в вертикальном направлении, с последующей 3D-реконструкцией. Такой подход применили для трехмерной визуализации клетки, измерения ее объема и площади поверхности, а также изучения внутреннего строения, используя для этого оптические срезы. С целью сохранить пространственные характеристики эмбриона или ооцита разработана методика, которая включает последовательно следующие этапы: быструю криофиксацию, низкотемпературную дегидратацию, заключение препарата в оптически прозрачную заливочную среду, лазерную сканирующую микроскопию. Указанная стратегия обеспечивает измерение объема одиночной клетки даже в составе многоклеточной системы раннего эмбриона мыши.

Ключевые слова: количественная лазерная микротомография, 3D-реконструкция, оптический срез, дифференциально-аксиальный контраст, объем клетки, зрелый ооцит и ранний эмбрион мыши, апоптоз.

Данное исследование следует рассматривать в контексте цикла наших статей, посвященных развитию количественной лазерной сканирующей микротомографии (QLSM) для измерения пространственных характеристик клетки. В списке цитируемой литературы приведены основные работы авторов, в которых описаны физические ограничения применения метода [1], алгоритм обработки последовательной серии оптических срезов (дифференциально-аксиальный контраст) [2], результаты исследования компенсаторной реакции бластомера мыши на осмотический стресс [3], а также роль этого фактора в функции клетки [4,5]. Поэтому, указанные аспекты опущены нами в виду их детального обсуждения в ранних публикациях. Обсуждение роли осмотического стресса в физиологии (патологии) организма и клетки выходит за рамки рассматриваемой статьи. Однако отметим, что указанная научная проблема подробно представлена в обзорах литературы [6,7], а ее значимость в области раннего эм-

бриогенеза обсуждается в статьях [8,9]. Особо следует подчеркнуть обзорные работы, в которых акцент сделан на механизмах адаптации клетки к гипотонии [10,11].

Успех изучения механизмов компенсаторного ответа клетки на осмотический стресс обусловлен наличием метода измерения объема микрообъекта. С этой целью для клеточной культуры использовали интенсивность окраски красителя, введенного в цитоплазму, концентрация которого уменьшалась при набухании клетки [12,13]. Такой подход определения кинетики изменения объема не применим для многоклеточной системы, например эмбриона на стадии доимплантационного развития.

При исследовании млекопитающих лимитирующим фактором также является небольшое количество зародышей, получаемых от одного животного, и их относительно малый размер (~80 мкм в диаметре). Указанные ограничения требуют разработки приемов прямого измерения объема клетки. В случае одноклеточного эмбриона или зрелого ооцита объем оценивали предполагая наличие у них сферической формы [8,14–16]. Указанное приближение уже не кор-

Сокращение: QLSM – количественная лазерная сканирующая микроскопия.

ректно для такого геометрически простого объекта, как двухклеточный эмбрион мыши [15]. Однако пространственная асимметрия не влияет на результат измерения объема при восстановлении формы клетки посредством количественной лазерной сканирующей микроскопии (QLSM), включающей в себя количественную 3D-реконструкцию. Необходимые для этого приемы обработки цифрового изображения на оптических срезах и аппаратный комплекс описаны в предшествующих публикациях [1–3,17–19].

Отметим, наличие аналитической базы само по себе не достаточно, чтобы обеспечить проведение адекватных измерений параметров клеточной стереометрии. Необходимым условием также является сохранение объема и формы клетки в течение подготовки препарата. В наибольшей степени такой задаче соответствуют криогенные методы микроскопии, основанные на быстрой низкотемпературной фиксации [20]. К настоящему времени накоплен достаточный эмпирический опыт в области определения пространственных характеристик микрообъекта посредством QLSM с тем, чтобы обобщить его с целью сформулировать особенности применения метода для измерения объема клетки и изучения ее морфологии на примере ооцита, а также бластомера изолированного эмбриона мыши.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на мышах NMRI (виварий ИТЭБ РАН, г. Пушкино Московской области). Препарат изолированных ранних эмбрионов мыши подготавливали в соответствии с методикой, описанной ранее [3,17,20]. Гипотонические условия создавали уменьшением в среде Дюльбекко концентрации соли NaCl с 140 до 70 мМ. В качестве начальной точки (контроль) использовали эмбрионы, взятые непосредственно перед действием осмотического стресса.

Измерение клеточного объема проводили посредством метода QLST, включающего микротомографию и последующую 3D-реконструкцию эмбриона [2,17]. Чтобы сохранить форму и объем клетки близкими к прижизненному состоянию, использовали быструю криофиксацию эмбриона в жидком пропане с последующей низкотемпературной дегидратацией в вакууме и заключением в заливочную среду Epon 812 [20]. Препараты изучали в лазерном сканирующем микроскопе Leica TCS SPE (Leica, Австрия) в режиме проходящего света «зеленого» лазера длиной волны 532 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Измерение стереометрических характеристик эмбриональной клетки. Ранее предложен метод 3D-реконструкции двухклеточного эмбриона мыши, основанный на обработке серии последовательных лабораторных срезов зародыша, полученных на микротоме [21]. Этапы реализации данного метода схематично иллюстрирует рис. 1.

Основное время 3D-реконструкции двухклеточного эмбриона занимают первые два этапа (рис. 1), в рамках которых последовательно проводят следующие действия. На этапе I получают серию срезов, окрашивают на них морфологию образца и микрофотографированием переводят изображение в цифровой формат. На этапе II полученные изображения эмбриона посредством графического редактора взаимно ориентируют в плоскости так, чтобы на двух параллельных срезах совпали схожие морфологические детали. Эффективное использование описанного метода ограничено его трудоемкостью и длительностью исполнения. Наш опыт показывает, что реконструкция одного двухклеточного эмбриона занимает несколько дней. Низкая производительность не позволяет накапливать статистически значимые результаты и ограничивает возможность метода получением только демонстрационного материала.

Время, необходимое для 3D-реконструкции раннего эмбриона мыши, значительно сократилось в результате применения QLSM. Длительность процедуры, занимавшей несколько дней, уменьшили до минут. Новое качество обеспечивают технические возможности конфокального микроскопа, в котором галерея оптических срезов, полученных на разных по глубине уровнях препарата, заменяет серию лабораторных срезов. При этом все оптические срезы в стопке остаются ориентированными строго по вертикали, а их снимки получают в цифровом формате.

Достоинство QLSM заключается в том, что одновременно с пространственной визуализацией микрообъекта регистрируют значение его объема [1]. На рис. 2 показан двухклеточный эмбрион мыши в разных осмотических условиях, при этом объем бластомера определен посредством QLSM.

Пространственное разрешение QLSM достаточно для того, чтобы после 3D-реконструкции проявились такие детали, как выпячивания на поверхности клетки, образовавшиеся после сжатия эмбриона в гиперосмотической среде (рис. 2а). Показано, что QLSM может быть

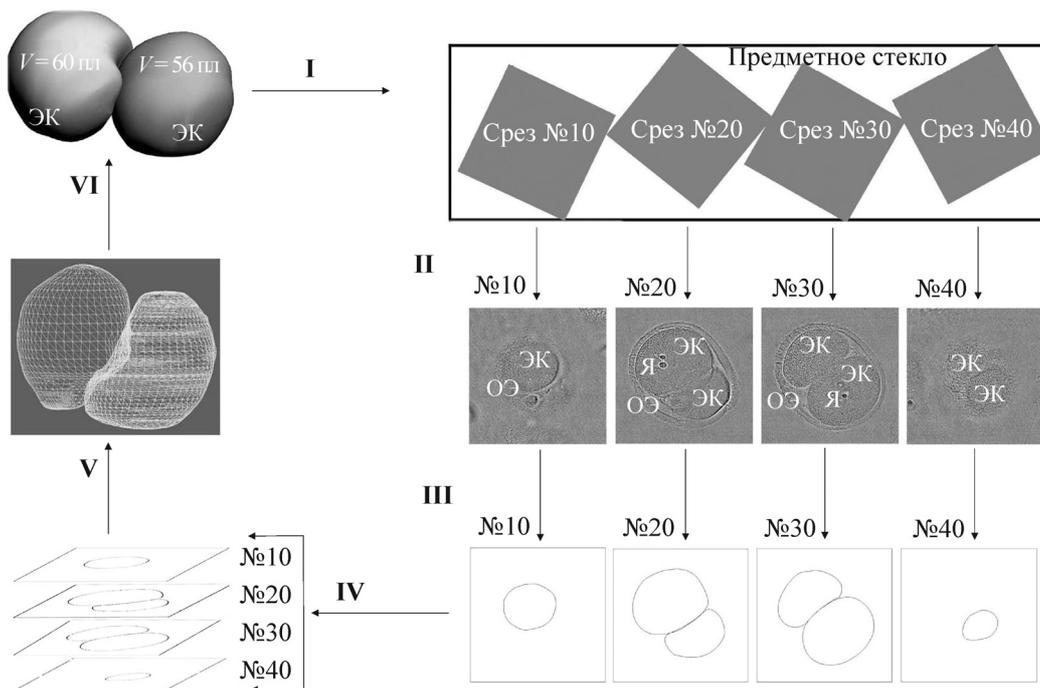


Рис. 1. Этапы протокола 3D-реконструкции раннего эмбриона мыши, основанного на серии последовательных лабораторных срезов зародыша [12]. Этап I – получение на микротоме серии параллельных срезов, их окрашивание и фотографирование в цифровом формате. Последующие этапы (с использованием графического редактора): II – ориентирование в плоскости изображений срезов относительно общей оси; III – оконтуривание периметра клеток на каждом изображении, IV – расположение контуров вертикально в соответствии с толщиной среза, V – создание компьютерной модели эмбриона. Обозначения: ЭК – эмбриональная клетка, ОЭ – оболочка эмбриона, Я – ядро; V – объем клетки в пиколитрах.

применен и к более мелким микрообъектам, например к полярному тельцу, размер которого соизмерим с обычной соматической клеткой [1]. В цитируемой работе также вычисляли площадь поверхности эмбриональной клетки. Возможно определение других стереометрических показателей, например координат центра масс.

В алгоритме QLSM не удалось полностью устранить «человеческий» фактор. Источником

ошибки при измерении объема может быть субъективное восприятие контура объекта оператором, который вручную очерчивает периметр клетки на этапе III (рис. 1). Чтобы оценить этот фактор, провели сличительный эксперимент, в котором несколько подготовленных специалистов независимо определяли объем каждого бластомера двухклеточного эмбриона мыши в одной группе зародышей (см. таблицу).

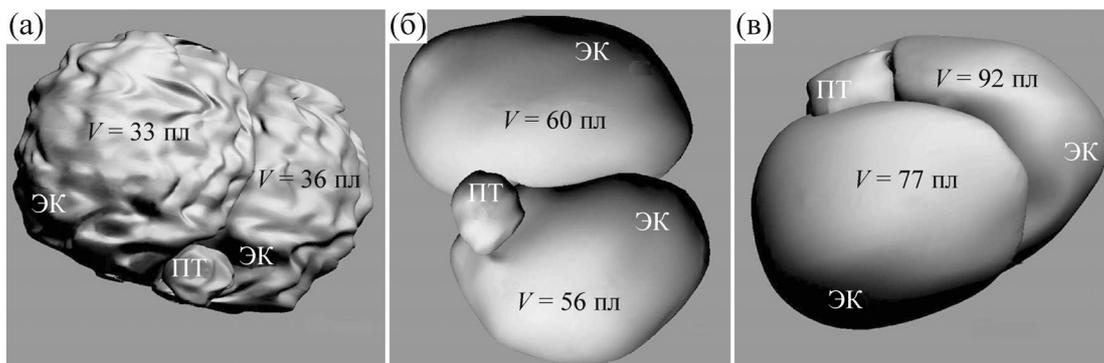


Рис. 2. 3D-реконструированное изображение изолированного двухклеточного эмбриона мыши, полученное посредством QLSM: (а) – эмбрион после инкубации в гиперосмотической (370 мОсм) среде, (б) – эмбрион сразу после выделения из яйцевода в изотоническую (310 мОсм) среду, (в) – эмбрион после 10 мин инкубации в гипотонической (170 мОсм) среде. Обозначения: ЭК – эмбриональная клетка, ПТ – полярное тельце; V – объем клетки в пиколитрах.

Объем (в пиколитрах) бластомера двухклеточного эмбриона мыши, полученный разными операторами методом QLSM в слепом эксперименте

Эмбрион	Оператор № 1		Оператор № 2		Оператор № 3		Оператор № 4	
	бластомер, пл		бластомер, пл		бластомер, пл		бластомер, пл	
	а	б	а	б	а	б	а	б
1	45	53	47	53	46	52	48	53
2	46	51	46	51	47	50	47	49
3	51	53	50	52	50	53	49	51
4	47	50	48	51	49	50	49	49
5	51	34	50	33	49	31	48	32
6	53	53	52	54	50	52	51	53
7	56	38	58	37	57	36	55	34
8	48	47	47	45	46	44	49	46
9	55	48	53	50	54	48	54	49
*	49 ± 6		49 ± 6		48 ± 6		48 ± 6	

Примечания. Изолированные эмбрионы инкубированы в среде Дюльбекко в течение 60 мин; «а» и «б» – отдельные бластомеры двухклеточного эмбриона мыши. * – Данные представлены как среднее ± среднее квадратичное отклонение по всем бластомерам (n = 18) для анализируемой группы двухклеточных эмбрионов.

В таблице обозначения «а» и «б» для маркировки бластомеров введены условно, так как на оптическом срезе отсутствуют морфологические признаки, характеризующие различия в физиологическом состоянии сестринских клеток. Нет таких признаков и для эмбрионов, поэтому в таблице все клетки изучаемой группы зародышей объединены в одну статистическую выборку. Анализ данных, представленных в таблице, показывает незначительное различие в значениях объема отдельного бластомера, полученных отдельными операторами. Однако среднее значение объема, как и среднее квадратичное отклонение, по группе из 18 клеток практически не зависят от специалиста. Данный факт свидетельствует о воспроизводимости результатов QLSM и, следовательно, хорошем контрасте границ бластомера, контур которого на изображении в плоскости оптического среза получен с помощью методики дифференциально-аксиального контраста [2].

Быстрая заморозка, используемая в методике, предполагает подготовку эмбриона в фиксированном во времени состоянии. Учитывая возможные различия между ооцитами, для количественного описания исследуемого процесса каждую точку эксперимента представляли средним значением по группе клеток. На рис. 3 приведена кинетическая кривая осмотического ответа ооцита мыши, полученная по результатам QLSM.

Видно (рис. 3), что ответ ооцита мыши на гипотонические условия можно разделить на две фазы. Сначала клетка увеличивается в раз-

мерах, что характерно для обычного осмометра. Затем включаются компенсаторные механизмы, которые стремятся вернуть объем ооцита к исходной величине. Отметим, что такое поведение свойственно не только ооциту, но и клетке раннего эмбриона мыши [5]. Таким образом, эффективность QLSM позволяет от визуальной демонстрации статического состояния перейти к описанию изменения во времени объема эмбриональной клетки.

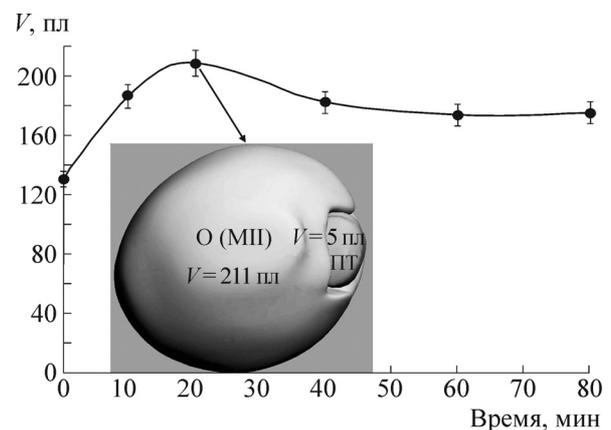


Рис. 3. Кинетика изменения объема ооцита в гипотонических (170 мОсм) условиях. Данные QLSM, полученные для зрелого изолированного ооцита мыши, представлены как среднее и среднее квадратичное отклонение для группы, состоящей из 20 клеток. На врезке – характерное 3D-реконструированное изображение ооцита после 20 мин инкубации в гипотонических (170 мОсм) условиях. Обозначения: О (МII) – зрелый ооцит в метафазе мейоза, ПТ – полярное тельце; V – объем клетки в пиколитрах.

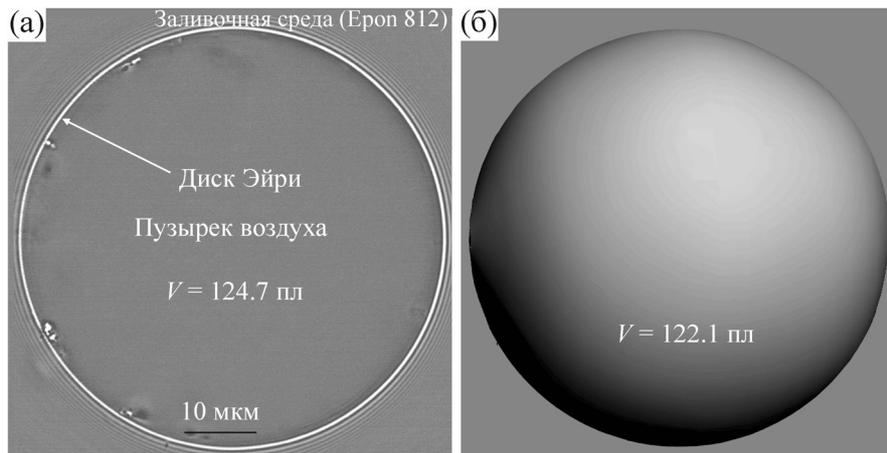


Рис. 4. Объем сферического тест-объекта (пузырек воздуха), заключенного в заливочную среду Epon 812: (а) – изображение сечения воздушного шара ($R = 31$ мкм) в экваториальной плоскости с отметкой диска Эйри и расчетным значением объема ($V = 124,7$ пл); (б) – пространственная визуализация того же тест-объекта и его объем ($V = 122,1$ пл), определенный посредством QLSM.

Верификация является обязательной процедурой для количественного метода, что обусловлено возможностью ошибки в вычислениях из-за не корректного алгоритма расчета. Другими словами, необходимо использовать тест-объект с известными параметрами, значение которых сравнивают с результатом, полученными в эксперименте. В случае QLSM для тестирования нами выбран заключенный в заливочную среду сферический пузырек воздуха, диаметр которого сравним с размером раннего эмбриона мыши (рис. 4).

При 3D-реконструкции тест-объекта его поверхность в сечении оптического среза ограничили окружностью диска Эйри. На срезе, прошедшем через экваториальную плоскость пузырька (рис. 4а), определили диаметр сферы (62 мкм). При указанном значении объем воздушной полости, рассчитанный по известной формуле для шара, составляет 124,7 пл. Для QLSM на каждом оптическом срезе очерчивали периметр диска Эйри, далее по серии полученных контуров проводили 3D-реконструкцию пузырька (рис. 4б). В этом случае объем тест-объекта равнялся 122,1 пл.

Сравнение расчетной и экспериментальной величин показывает их хорошее совпадение, что подтверждает адекватность алгоритма QLSM. Разницу в 2,6 пл можно объяснить «человеческим» фактором. В эксперименте с тест-объектом оператор принимает решение по следующим показателям. Для расчета объема шара, во-первых, следует из стопки отобрать срез с изображением экваториального сечения пузырька. Затем на выбранном срезе измерить

диаметр диска Эйри. Для 3D-реконструкции необходимо вручную очертить контур объекта на всех оптических срезах. Каждая из перечисленных операций вносит погрешность в конечный результат. Однако сличительный эксперимент (см. таблицу) и верификация с помощью тест-объекта (рис. 4) показывают, что ошибка, обусловленная участием исследователя в QLSM, составляет не более 2%.

Изучение морфологии эмбриональной клетки. Для QLSM основным требованием, предъявляемым к образцу, является его оптическая прозрачность. Соблюдая это условие, из методики подготовки препарата исключают красители, контрастирующие фиксаторы или зонды. Как следствие, у изображения изучаемого образца практически отсутствует контраст, что компенсируется обработкой оптических срезов посредством методики дифференциально-аксиального контраста [2]. Указанный алгоритм контраста, основанный на автоматизированном сравнении двух последовательных оптических срезов, реализует в фокусной плоскости оптического среза псевдоконфокальный режим наблюдения. Последовательность преобразования цифрового изображения в технологии QLSM демонстрирует рис. 5.

Изображение эмбриона, полученное с помощью дифференциально-аксиального контраста, обладает достаточным пространственным разрешением не только для 3D-реконструкции, но и для изучения морфологических особенностей эмбриональной клетки (рис. 5б). На рис. 6 приведена галерея микрофотографий зрелого ооцита, непосредственного предшественника

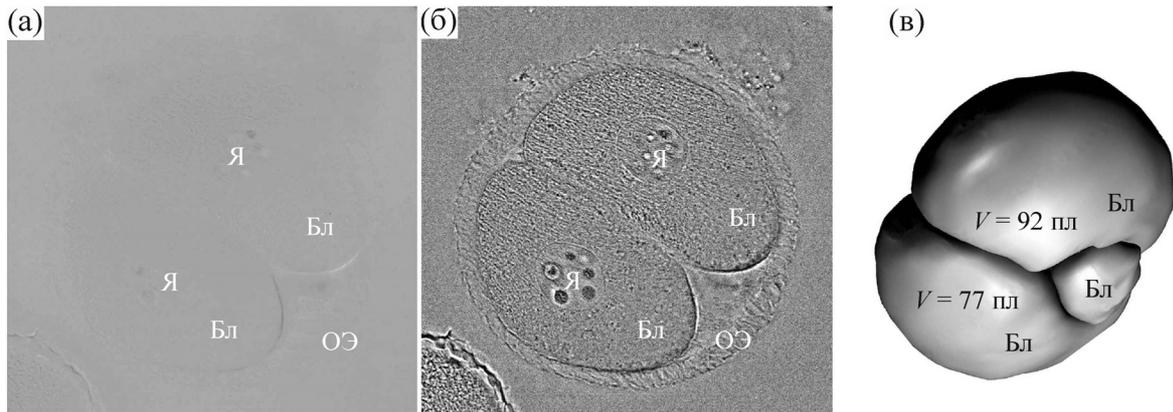


Рис. 5. Последовательность преобразования цифрового изображения в QLSM: (а) – исходное изображение двухклеточного эмбриона на оптическом срезе, полученное в лазерном сканирующем микроскопе (просвечивающий режим); (б) – то же изображение после обработки методом дифференциально-аксиального контраста; (в) – 3D-реконструкция изучаемого эмбриона. Обозначения: Бл – бластомер, ОЭ – оболочка эмбриона, Я – ядро; V – объем эмбриональной клетки в пиколитрах.

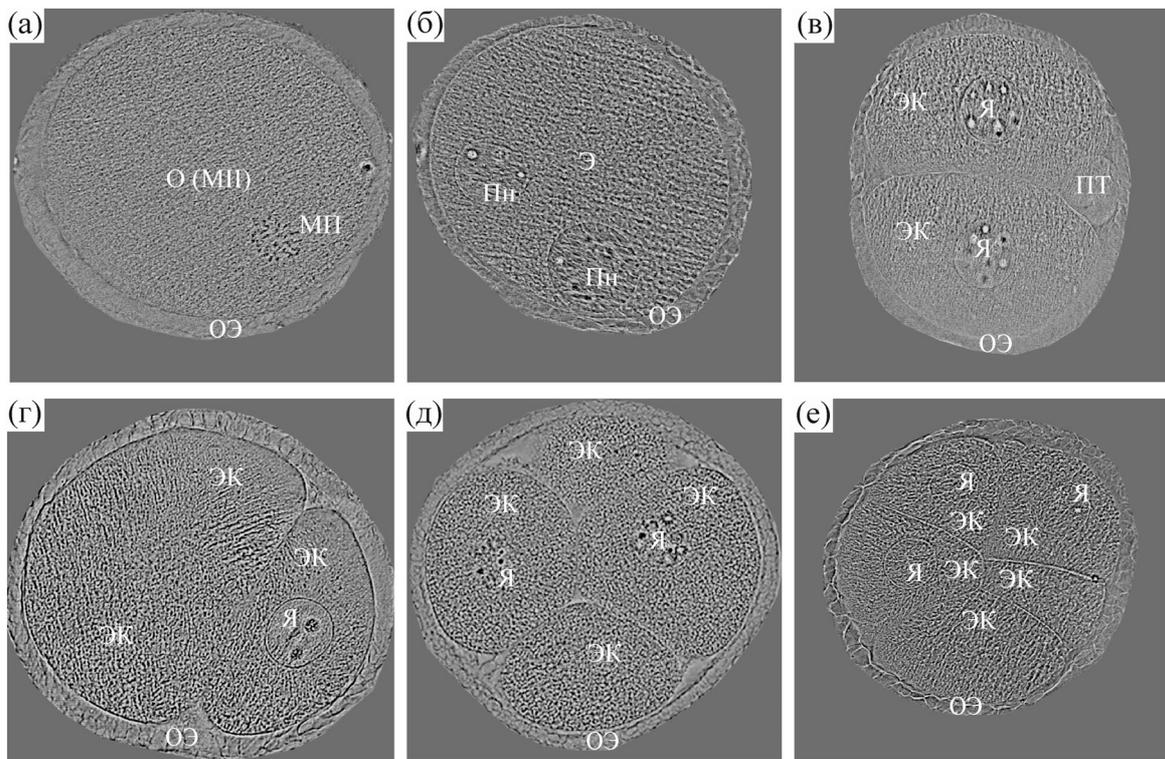


Рис. 6. Микрофотография изолированного ооцита и эмбриона мыши в плоскости оптического среза после дифференциально-аксиального контраста: (а) – зрелый ооцит; (б) – одноклеточный эмбрион; (в) – эмбрион, состоящий из двух клеток; (г) – эмбрион, состоящий из трех клеток; (д) – эмбрион, состоящий из четырех клеток; (е) – эмбрион, состоящий из восьми клеток. Обозначения: О (МП) – зрелый ооцит в метафазе мейоза, МП – мейотическая пластинка, ЭК – эмбриональная клетка, ПТ – полярное тельце, ОЭ – оболочка ооцита или эмбриона, Я – ядро, Э – одноклеточный эмбрион, Пн – пронуклеусы.

доимплантационного эмбриогенеза, а также раннего эмбриона мыши на разных стадиях его развития.

Отметим, что изображения клетки на рис. 6 получены на препаратах без дополнительного

контрастирования посредством обработки фиксатором, красителем или введением зонда. Несмотря на это, хорошо идентифицируется ряд морфологических деталей, например мейотическая пластинка ооцита (рис. 6а) или пронук-

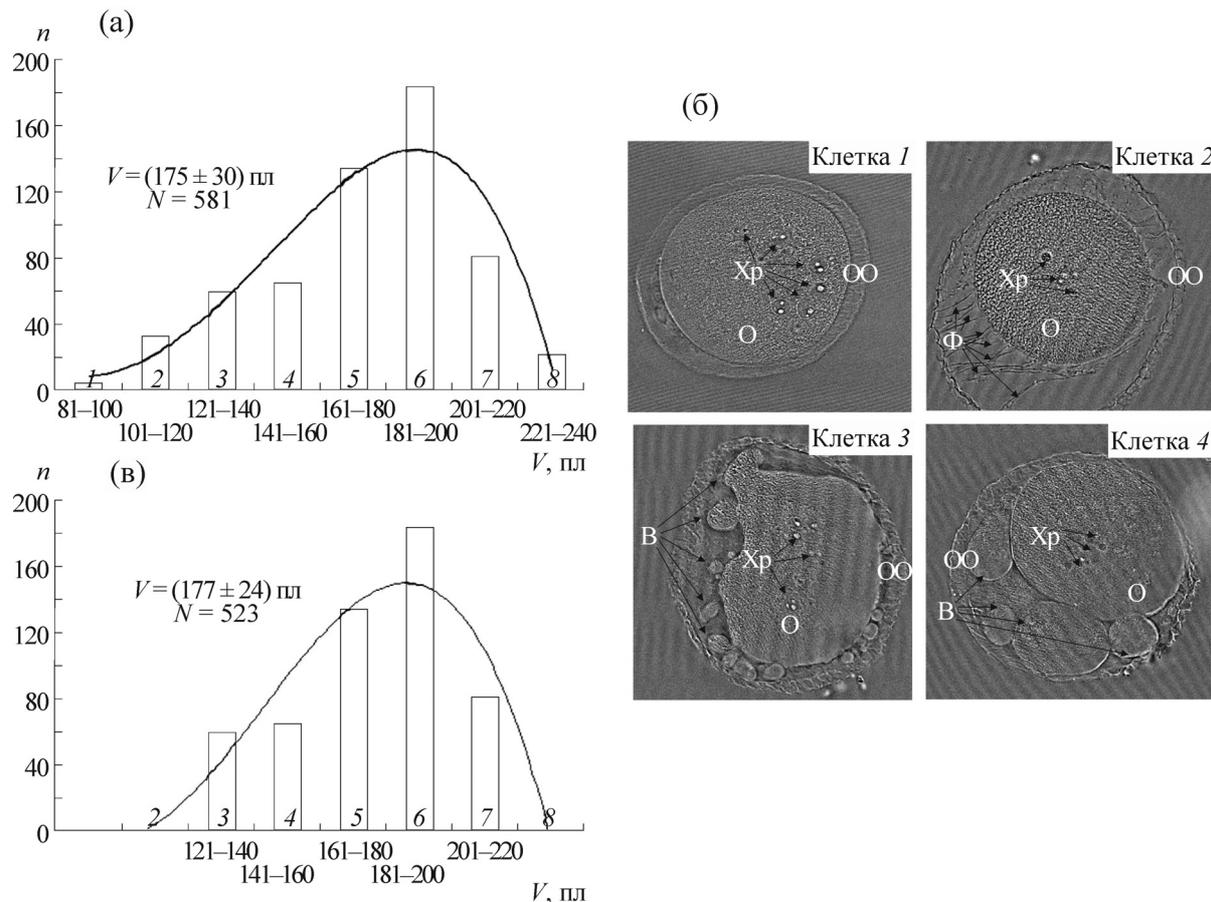


Рис. 7. Гистограмма значений объема для совокупности ооцитов, подверженных в течение 80 мин гипотоническому стрессу (170 мОсм): (а) – распределение для исходной совокупности из 581 клетки с указанием среднего и среднеквадратичного отклонения; (б) – изображение в плоскости оптического среза зрелого ооцита в состоянии апоптоза; (в) – распределение после морфофункциональной коррекции для совокупности из 523 клеток с указанием среднего и среднеквадратичного отклонения. Обозначения: О – зрелый ооцит, Ф – филаменты, Хр – фрагменты конденсированного хроматина, В – выросты на мембране ооцита, ОО – оболочка ооцита; n – количество клеток в группе, N – количество клеток во всей совокупности, V – объем клетки в пиколитрах.

лиусы у зиготы (рис. 6б), а также полярное тельце (рис. 6в) и ядро бластомера (рис. 6в–е). Приемлемое время 3D-реконструкции и точность измерения объема микрообъекта позволяют применить QLSM с целью получения статистически значимых результатов.

Принимая гипотезу о том, что биологические закономерности одинаковы для любого зрелого ооцита, результаты однотипного эксперимента за несколько лет объединили в одну популяцию. Для анализа взяли конечную точку осмотического ответа, когда после 80 мин воздействия ооцит адаптирован к гипотоническим условиям. В результате получена выборка из 581 измерения (клетки), что позволяет построить детальную гистограмму распределения (рис. 7).

Видно (рис. 7а), что значения клеточного объема в популяции ооцитов распределены не

симметрично, объяснением чему может быть наличие функционально разных групп в анализируемой выборке. Гистограмма получена, предполагая, что у всех ооцитов реализуется компенсаторный ответ на гипоосмотический стресс. Однако эта гипотеза не выполняется для клетки в состоянии апоптоза, когда ооцит не реагирует на гипоосмотический стресс и, наоборот, наблюдается его сжатие [11,22]. Нормальную клетку от апоптотической отличает ряд морфологических признаков [23]. Учитывая эти особенности, изучение морфологии клетки позволяет выделить «необычный» ооцит, чтобы исключить его из рассмотрения.

На рис. 7б показана галерея микрофотографий с признаками, характерными для программируемой клеточной смерти, которые наблюдаются у ооцитов, принадлежащих группам 1 и 2 (рис. 7а). В цитоплазме клеток видны

микроядра с фрагментами ДНК (рис. 7б, клетка 1). Результат быстрого сжатия выражен наличием нитей (Φ), соединяющих оболочку ооцита и клетку (рис. 7б, клетка 2), что служит признаком незавершенного созревания [24]. Завершающим стадиям апоптоза соответствует образование мембранных выростов (рис. 7б, клетка 3) и цитоплазматических пузырьков (рис. 7б, клетка 4). Еще одна причина асимметрии распределения ооцитов в группе обусловлена тем, что компенсаторный ответ на гипотонические условия отменяется у клетки с низким содержанием АТФ в цитоплазме [10]. В этом случае не наступает адаптивной фазы уменьшения объема, и, как следствие, после набухания ооцит сохраняет максимальный объем. Данному эффекту соответствует группа 8 гистограммы (рис. 7а).

Исключая подгруппы 1, 2 и 8, в которых ооциты не показывают компенсаторного ответа, получим скорректированную гистограмму (рис. 7в). При этом число клеток в совокупности уменьшилась на 10% от численности исходной популяции. По-видимому, данное количество аномальных ооцитов в группе можно рассматривать, как критерий функциональной однородности выборки. Отметим, что после коррекции среднее значение существенно не изменилось, однако среднеквадратичное отклонение уменьшилось с 17 до 14% (рис. 7а,в).

Используемый статистический критерий среднего требует нормального распределения значений внутри совокупности. Однако данное условие не выполняется даже с учетом морфофункциональных критериев (рис. 7в). Возможно, для ооцитов и ранних эмбрионов мыши более корректно представлять результаты в виде, принятом для непараметрических методов сравнения [25]. В этом случае рекомендуют приводить медиану с указанием границ, отсекающих от краев выборки одинаковые по численности группы. Рассматриваемые способы представления данных показаны на рис. 8.

Сравнение двух способов демонстрации данных (рис. 8а) показывает, что в исходной группе величина среднего (175 пл) мало отличается от медианы (180 пл). Интервал в одно (30 пл) или два среднеквадратичных (60 пл) отклонения включает 69% или 95% от общей численности ооцитов соответственно. Такое же количество клеток содержат интервалы, указанные для медианы, но построенные симметрично относительно краев популяции.

Исключение по морфофункциональным признакам 10% ооцитов привело к изменению вида данных (рис. 8б). После коррекции значение среднего и медианы увеличилось на 2 пл.

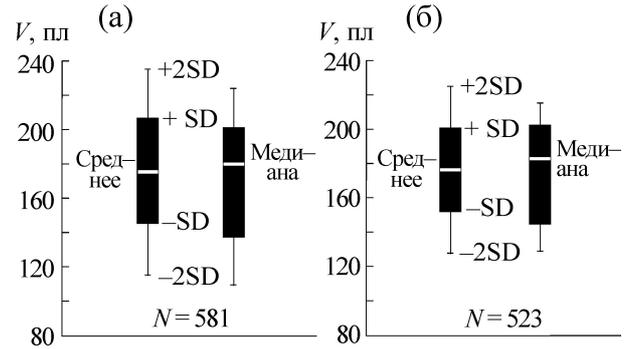


Рис. 8. Среднее значение (показано линией) с интервалом в одно или два среднеквадратичных отклонения, а также медиана (показано линией) с симметричным относительно границ популяции интервалом, включающим 70% (отмечено полосой) или 95% (отмечено чертой) клеток от численности группы: (а) – исходная группа ооцитов; (б) – группа ооцитов после морфофункциональной коррекции. Обозначения: V – объем клетки в пиколитрах, N – количество клеток в совокупности.

Количество ооцитов для интервала в стандартное отклонение (24 пл) уменьшилось до 66%, в то время как для двух стандартных отклонений (48 пл) увеличилось до 97%. Чтобы оценить эффект коррекции на показатели медианы, количество клеток в интервалах оставили тем же (69 и 95%), что применяли для исходной группы (рис. 8а). В результате коррекции медиальное представление данных выглядит более компактным (рис. 8б).

Завершая обсуждение можно сформулировать следующий вывод. В области цитометрии изолированного ооцита или отдельного бластомера раннего эмбрионе млекопитающих QLSM позволяет реализовать следующие режимы количественного и качественного анализа: 1) пространственную визуализацию клетки; 2) определение стереометрических показателей клетки посредством ее количественной трехмерной реконструкции; 3) изучение внутреннего строения клетки послойно, используя серию последовательных оптических срезов; 4) статистическую оценку качества распределения клеток в популяции ооцитов на основе морфофункциональных критериев.

Отметим, что метод QLSM сохраняет препарат. Это позволяет комбинировать перечисленные выше возможности с другими подходами, основанными на исследовании лабораторных срезов, например световой или электронной микроскопией, а также TOF-SIMS [26] и EPMA [27].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 16-16-00020).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. G. Pogorelov and V. N. Pogorelova, *J. Microscopy* **232**, 36 (2008).
2. М. А. Погорелова, В. А. Голиченков и А. Г. Погорелов, *Оптика и спектроскопия* **116** (3), 167 (2014).
3. М. А. Погорелова, В. А. Голиченков, В. Н. Погорелова и др., *Клеточные технологии в биологии и медицине*, № 3, 155 (2011).
4. М. А. Погорелова, В. А. Голиченков, А. В. Тарасов и др., *Онтогенез* **43** (2), 94 (2012).
5. М. А. Погорелова, В. А. Голиченков и А. Г. Погорелов, *Биологич. мембраны*, **31** (1), 50 (2014).
6. E. K. Hoffmann, I. H. Lambert, and S. F. Pederson, *Physiol. Rev.*, **89**, 193 (2009).
7. F. Lang, G. L. Busch, M. Ritter, et al., *Physiol. Rev.* **78**, 247 (1998).
8. A. P. Tartia, N. Rudraraju, T. Richards, et al., *Development* **136**, 2247 (2009).
9. J. M. Baltz and A. P. Tartia, *Human Repr. Update* **16**, 166 (2010).
10. Y. Okada, *Am. J. Physiol.* **273**, C755 (1997).
11. Y. Okada, T. Shimizu, E. Maeno, et al., *J. Membr. Biol.* **209**, 21 (2006).
12. B. Buckhold, R. B. Adams, and E. C. Gregg, *Biochim. Biophys. Acta* **102**, 600 (1965).
13. B. Buckhold-Shank, H. M. Rosenberg, and C. Horowitz, *J. Cel. Physiol.* **82**, 257 (1973).
14. K. M. Dawson, J. L. Collins, and J. M. Baltz, *Biol. Reprod.* **59**, 225 (1998).
15. J. L. Collins and J. M. Baltz, *Biol. Reprod.* **60**, 1188 (1999).
16. M. Kolajova and J. M. Baltz, *Biol. Reprod.* **60**, 964 (1999).
17. М. А. Погорелова, В. А. Яшин, А. Г. Погорелов и В. А. Голиченков, *Доклады АН*, **418** (5), 712 (2008).
18. А. Г. Погорелов и В. Н. Погорелова, *Биофизика* **54** (3), 482 (2009).
19. М. А. Погорелова, Д. В. Гольдштейн, А. Г. Погорелов и В. А. Голиченков, *Клеточные технологии в биологии и медицине*, № 3, 169 (2009).
20. A. G. Pogorelov, I. I. Katkov, and V. N. Pogorelova, *CryoLetters* **28**, 403 (2007).
21. А. Г. Погорелов, Г. М. Кантор, Н. Ю. Сахарова и др., *Цитология* **47** (8), 686 (2005).
22. J. R. Trimarchi, L. Liu, P. J. S. Smith, and D. L. Keefe, *Am. J. Physiol.* **282**, C588 (2002).
23. E. Maeno, Y. Ishizaki, T. Kanaseki, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 9487 (2000).
24. A. Inoue, T. Akiyama, M. Nagata, and F. Aoki, *J. Reprod. Develop.* **53**, 1043 (2007).
25. D. G. Seguin and J. M. Baltz, *Am. J. Physiol.* **272**, C1854 (1997).
26. A. Brunelle, D. Touboul, and O. Laprevote, *J. Mass Spectrom.* **40**, 985 (2005).
27. A. G. Pogorelov and B. L. Allachverdov, *Micron and Microsc. Acta* **15**, 177 (1984).

Laser Scanning Microscopy as Applied to Early Mouse Embryo: Cytometry and Cell Morphology Analysis

M.A. Pogorelova, A.I. Panait, and A.G. Pogorelov

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

This paper updates our knowledge on quantitative laser scanning microscopy and summarizes the capabilities of this method as applied to cytometry and cell structure analysis of early mouse embryo and oocyte. This method requires a stack of optical sections obtained as a Z-series with subsequent 3D reconstruction. This approach was used for visualization of 3D cell model, for the measurement of the volume and surface area of the cell as well as for the study of cell interior on optical sections. To maintain the dimensional characteristics of embryo or oocyte, the sample preparation scenario involves following events consecutively: fast cryofixation, low-temperature dehydration, infiltration by optically transparent embedding media, laser scanning microscopy. The given strategy enables the measurement of the volume even for a single cell inside multicellular system of early mouse embryo.

Key words: quantitative laser microtomography, 3D reconstruction, optical section, differential axial contrast, cell volume, early mouse embryo and mature oocyte, apoptosis