

ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГРАНУЛЕЗНЫХ КЛЕТОК Фолликулярной жидкости ПРИ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОМ ОПЛОДОТВОРЕНИИ

П. М. Мотолянец, О. А. Юдина, А. З. Смоленский

Республиканский клинический медицинский центр Управления делами Президента Республики Беларусь, Минск, Беларусь



Цель исследования. Изучение цитоморфологических характеристик гранулезных клеток фолликулярной жидкости для определения потенциальных предикторов успешной имплантации эмбриона при экстракорпоральном оплодотворении.

Материал и методы. В исследование включены 170 образцов фолликулярной жидкости, полученной при аспирации ооцит-кумулюсных комплексов для проведения экстракорпорального оплодотворения в связи с бесплодием. С учетом критериев исключения сформированы две исследуемые группы (ИГ): ИГ1 – имплантация эмбриона не наступила ($n=61$), ИГ2 – имплантация эмбриона наступила ($n=54$). Проведена сравнительная оценка групп по возрасту, длительности бесплодия, индексу массы тела, объему исследованной фолликулярной жидкости, количеству пунктированных фолликулов и количеству полученных ооцитов. Исследуемые группы также сравнивали по количеству гранулезных клеток в препаратах и среднему размеру их ядер. Оценивали гетерогенность размеров ядер гранулезных клеток.

Результаты. Установлены статистически значимые различия между ИГ1 и ИГ2 по числу полученных ооцитов ($p=0,043$), количеству и средним размерам ядер гранулезных клеток в препаратах ($p=0,005$ и $p=0,0001$ соответственно). Большая гетерогенность размеров ядер гранулезных клеток выявлена в ИГ1 по сравнению с ИГ2.

Выводы. Установлено, что фолликулярная жидкость при успешной имплантации эмбриона (ИГ2) характеризуется большей клеточностью препаратов, связанной с большим количеством париетальных клеток и их слоев в фолликуле, а также большим средним размером ядер гранулезных клеток, что обусловлено преобладанием в фолликулах зрелых (внутренних париетальных) клеток. Выраженная гетерогенность размеров ядер гранулезных клеток выявлена при отсутствии имплантации эмбриона (ИГ1) и указывает на присутствие в фолликуле значимого количества незрелых (наружных париетальных) гранулезных клеток.

Ключевые слова: фолликулярная жидкость, гранулезные клетки, клеточный блок

Для цитирования: Мотолянец, П. М. Цитоморфологические особенности гранулезных клеток фолликулярной жидкости при экстракорпоральном оплодотворении / П. М. Мотолянец, О. А. Юдина, А. З. Смоленский // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2025. Т. 23, № 3. С. 247-253. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2025-23-3-247-253>

Введение

Решение проблемы бесплодия является одной из приоритетных задач здравоохранения и медицинской науки. Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) позволяют достичь беременности только в 25–40% случаев. Продолжается поиск новых диагностических инструментов и методов прогнозирования эффективности экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), в том числе морфологических, которые практически не используются при сопровождении ВРТ и ЭКО.

Фолликулярная жидкость (ФЖ) и гранулезные клетки (ГК) являются перспективными объектами для исследования, так как структурно и функционально связаны с яйцеклеткой, обеспечивая транспорт всех критически необходимых веществ для роста и созревания ооцитов [1]. С другой стороны, ооцит влияет на дифференцировку ГК на кумулюсные и париетальные [2]. Ооцит и ГК формируют микросреду со сложной паракринной и аутокринной сигнализацией, дополненной влиянием гонадотропинов [3, 4]. Доказано, что патология роста и развития фолликулов при первичной недостаточности яичников (ПНЯ) обусловлена нарушением комму-

никации между ГК, индуцированной ооцитами. Замена поврежденных ГК на структурно и функционально состоятельные в эксперименте инициировала развитие и созревание фолликулов [5]. Кроме того, ГК и клетки теки осуществляют синтез стероидных гормонов. Состоятельный стероидогенез является фоном для успешной имплантации эмбриона.

Проводилась оценка морфологических характеристик ГК у животных. Опыт морфологической оценки ГК при проведении ЭКО у человека не представлен в доступных публикациях.

Нами визуализированы ГК с помощью методов клеточных блоков и жидкостной цитологии. ГК в препаратах из клеточных блоков определяются в виде пластов, которые являются выстилкой антрального фолликула. Качество визуализации позволяет проводить оценку клеточности и цитоморфологических особенностей клеток фолликула.

Цель исследования – изучение цитоморфологических характеристик гранулезных клеток фолликулярной жидкости для определения потенциальных предикторов успешной имплантации эмбриона при экстракорпоральном оплодотворении.

Материал и методы

В исследование включены 170 образцов ФЖ, полученной при аспирации ооцит-кумулюсных комплексов для проведения ЭКО в связи с бесплодием. Забор ФЖ выполнен врачами акушерами-гинекологами на базе отделения вспомогательных репродуктивных технологий ГУ РНПЦ «Мать и дитя» после получения информированного согласия, обследования пациентов в общепринятом объеме и контролируемой овариальной стимуляции (КОС) в соответствии с клиническими протоколами, утвержденными Министерством здравоохранения Республики Беларусь в области ВРТ.

Критерии включения в исследование: соответствие критериям включения в программу ЭКО; возраст до 45 лет; отсутствие патологии матки.

Критерии исключения из исследования: объем образца менее 3 мл; массивная примесь крови в образце, определяемая при визуальной оценке; мутный (непрозрачный) образец при визуальной оценке; наличие 10 и менее гранулезных клеток в поле зрения большого увеличения ($\times 400$) при микроскопической оценке; отсутствие пластов гранулезных клеток, определяемое при микроскопической оценке; обильная примесь слизи, гематогенных элементов, флоры и прочее, определяемые при микроскопической оценке; наличие в препаратах 91% и более гранулезных клеток с разрушенными или пикнотичными ядрами; наличие в препаратах 91% и более гранулезных клеток с фрагментацией цитоплазмы.

По макроскопическим признакам (объем жидкости менее 3 мл, непрозрачный (мутный) образец и массивное загрязнение кровью) исключено 10 образцов. По микроскопическим признакам исключено 36 образцов.

Для последующего анализа полученных морфологических данных сформированы следующие исследуемые группы (ИГ):

ИГ1 – беременность не наступила вследствие ЭКО ($n=61$);

ИГ2 – беременность наступила вследствие ЭКО ($n=54$);

Пробоподготовку выполняли методом клеточных блоков (КБ). Изготовление КБ проводили с применением агар-агара (П-900, Е406). Рабочий раствор готовили путем нагрева смеси 10 г агар-агара с 1 л дистиллированной воды до 95°C до полного растворения.

ФЖ после выделения ооцит-кумулюсных комплексов собирали в стерильную тару и помещали в условия температуры 8°C на 24 часа. После отстаивания удаляли надосадочную жидкость пипеткой. В осадок добавляли 10-процентный нейтральный забуференный формалин. Фиксацию проводили 24 часа. Центрифугировали фиксированный осадок (режим 1500 г в течение 10 минут). Центрифугат смешивали с охлажденным до комнатной температуры рабочим раствором агар-агара из расчета 0,5–1 мл на один образец. Полученную смесь помещали в морозильную камеру (-18°C , 7 мин).

Охлажденный блок рассекали на диски толщиной 2–3 мм и помещали их в гистологические

кассеты. Выполняли гистологическую проводку клеточных блоков по стандартной методике. Обезвоженные образцы заливали в парафин. Готовили срезы толщиной 3 мкм.

Окраску препаратов гематоксилином и эозином производили в автоматизированном аппарате окраски Leica ST5010 (Leica, Германия). Окрашенные срезы заключали под покровное стекло в монтирующей среде.

Микроскопическая оценка препаратов проведена с помощью микроскопа Leica DM2500, оснащенного камерой Leica DMC5400. Выполнено сканирование препаратов с использованием цифрового слайд-сканера Motic EasyScan для морфометрического анализа. Сканы импортированы в среду компьютерной программы MoticVM 3.0 для подсчета количества ГК в препаратах.

Микрофотографии (репрезентативных полей зрения) образцов ФЖ импортированы в среду компьютерной программы Leica Application Suite (LAS Version 4.13.0) для измерения диаметра ядер ГК. Результаты экспортированы в базу данных Microsoft Excel, совместимую с клиническим и морфологическим блоком; рассчитаны средние значения диаметра ядер.

Обработку полученных данных проводили методами статистического анализа с использованием статистических пакетов Excel (Microsoft inc., США), Statistica 13.0 (StatSoft inc., США), SPSS Statistics 22.

При нормальном распределении признака использовали методы параметрической статистики. Оценку значимости различий сравниваемых величин проводили на основании критерия Стьюдента (t-критерий), а также критерия Фишера (F-критерий при сравнении двух независимых групп). С этой целью рассчитывали частоту встречаемости признака, средние значения, ошибки репрезентативности, а также дисперсии групп.

Если гипотезу о нормальности распределения признака в совокупности отвергали, для обработки данных использовали методы непараметрической статистики. Сравнение двух независимых выборок осуществлялось с помощью критерия Манна-Уитни (U).

Для анализа выбранных переменных использовали методы описательной статистики (средняя, медиана, квартильные характеристики ($Q1Q3$ – первая и третья квартили)), а также «ящик с усами»/boxplot, особый вид диаграмм, компактно показывающий распределение элементов, который дает возможность наглядно оценить дисперсию, асимметрию и определить выбросы. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Установлено, что успешная имплантация эмбрионов не наступила (ИГ1) в 61 случае (53,04%) и наступила (ИГ2) в 54 (46,96%) случаях.

Возраст пациенток в ИГ1 составил 22–41 год, а в ИГ2 – 25–40 лет. Длительность бесплодия в ИГ1 варьировала от 1 до 20 лет, а в ИГ2 – от 1 до 17 лет. Индекс массы тела в ИГ1 составлял от 17,63 до 33,91 кг/м², а в ИГ2 – от 17,92

до 41,64 кг/м². Объем полученных образцов ФЖ в ИГ1 варьировал от 3 до 70 мл, в ИГ2 – в пределах 7–60 мл. Сравнительная характеристика групп по данным параметрам представлена в таблице 1.

Также была проведена сравнительная оценка групп по количеству пунктированных фолликулов и количеству полученных ооцитов (табл. 2).

Полученные препараты отличались по клеточности: от малоклеточного образца до высококлеточного. Оптимальными для оценки были препараты, содержащие клеточные пласты и группы ГК. Ядра, их контуры и ядрышки визуализированы контрастно. Цитоплазма клеток зернистая с размытыми контурами. Большинство ГК сгруппировано в виде пластов и гнезд. В цитологических препаратах определяется два типа ГК по характеристикам ядер: 1 – ядра части клеток мелкие округлые и гиперхромные; 2 – большинство определяемых ГК имеют крупные ядра с рыхлым хроматином и визуализируемыми ядрышками. Данные подтипы клеток распределены в препаратах неравномерно: в одних полях зрения они смешаны в равных пропорциях, в других полях зрения преобладают клетки с мелкими ядрами или наоборот – ядерная гетерогенность (рис. 1). Образцы отличались по соотношению описанных двух типов клеток.

Произведен подсчет количества ядер ГК в каждом препарате. Их количество варьировало от 138 до 1326. Сравнительная количественная характеристика ядер ГК представлена в таблице 3.

В исследуемых группах оценены средние размеры ядер гранулезных клеток ФЖ. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 1 – Сравнительная характеристика исследуемых групп по возрасту, длительности бесплодия, индексу массы тела и объему исследованной фолликулярной жидкости

Table 1 – Comparative characteristics of the study groups by age, infertility duration, body mass index, and volume of the studied follicular fluid

Параметр	Группа	Среднее значение	Стандартное отклонение (+/-)	U Манна-Уитни	p
Возраст, лет	ИГ1 (n=61)	33,56	4,33	1608,0	0,826
	ИГ2 (n=54)	33,44	3,79		
Длительность бесплодия, лет	ИГ1 (n=61)	6,48	4,69	1484,5	0,360
	ИГ2 (n=54)	6,72	3,64		
Индекс массы тела, кг/м ²	ИГ1 (n=61)	24	4,2	1540,5	0,551
	ИГ2 (n=54)	23,95	5,05		
Объем образца, мл	ИГ1 (n=61)	34,33	14,94	1640,0	0,968
	ИГ2 (n=54)	34,39	13,76		

Примечание – использовали U-критерий Манна-Уитни для сравнения двух независимых групп при $p < 0,05$.

Таблица 2 – Сравнительная характеристика исследуемых групп по количеству пунктированных фолликулов и полученных ооцитов

Table 2 – Comparative characteristics of the study groups according to the number of punctured follicles and oocytes retrieved

Параметр	Группа	Среднее значение	Min–Max	U Манна-Уитни	p
Количество пунктированных фолликулов	ИГ1 (n=61)	12,07	2–28	1640,0	0,057
	ИГ2 (n=54)	13,02	4–40		
Количество полученных ооцитов	ИГ1 (n=61)	10,07	2–28	1348,5	0,043
	ИГ2 (n=54)	12,20	4–40		

Примечание – использовали U-критерий Манна-Уитни для сравнения двух независимых групп при $p < 0,05$.

Для объективной оценки гетерогенности размеров ядер в каждом случае произведен подсчет количества ядер в диапазонах диаметра:

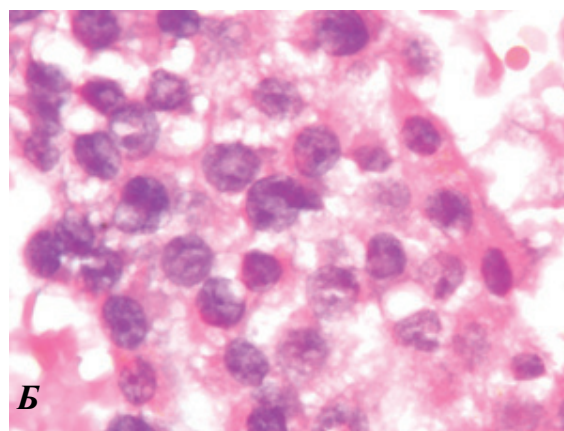
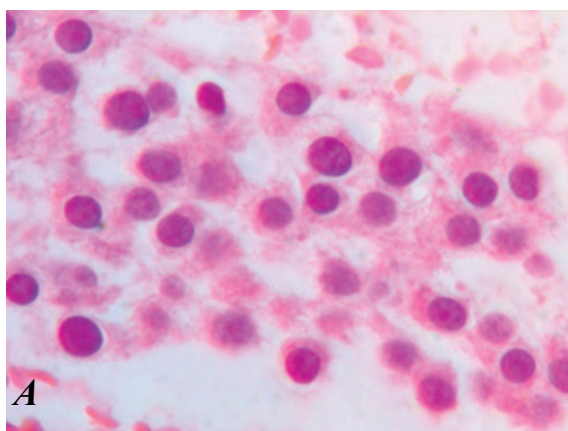


Рисунок 1 – Гетерогенность гранулезных клеток фолликулярной жидкости. А – высокая гетерогенность размеров ядер; Б – низкая гетерогенность размеров ядер с преобладанием крупных. Окраска гематоксилином и эозином, объектив $\times 126$.

Figure 1 – Heterogeneity of granulosa cells in follicular fluid. А – high heterogeneity of nuclear sizes; В – low heterogeneity of nuclear sizes with a predominance of large nuclei. Hematoxylin and eosin staining, objective $\times 126$

Таблица 3 – Сравнительная характеристика исследуемых групп по количеству гранулезных клеток в препаратах

Table 3 – Comparative characteristics of the study groups based on the number of granulosa cells in the preparations

Группа	Медиана [Q1:Q3]	Min-max	U Манна-Уитни	p
ИГ1 (n=61)	518 [351:671]	138–1220	1141,0	0,005
ИГ2 (n=54)	657 [498:845]	271–1326		

Примечание – использовали U-критерий Манна-Уитни для сравнения двух независимых групп при $p < 0,05$.

Таблица 4 – Сравнительная характеристика исследуемых групп по размеру ядра гранулезных клеток фолликулярной жидкости

Table 4 – Comparative characteristics of study groups by granulosa cell nucleus size in the follicular fluid

Группа	Медиана [Q1:Q3]	Min-max	U Манна-Уитни	p
Средний размер ядра, мкм				
ИГ1 (n=61)	8,12 [7,84:8,25]	6,84–8,59	U=87,500	0,0001
ИГ2 (n=54)	8,60 [8,50:8,77]	8,14–9,77		

Примечание – использовали U-критерий Манна-Уитни для сравнения двух независимых групп при $p < 0,05$.

до 6 мкм, от 6 до 9 мкм, 9 мкм и более. Рассчитано процентное соотношение ядер в выбранных диапазонах (табл. 5). В диапазоне размеров ядер от 6 до 9 мкм различия между исследуемыми группами не выявлены ($T=0,527$; $p=0,601$), поэтому данный диапазон был дополнительно разделен для анализа (табл. 5).

При корреляционном анализе выявлена слабая статистически значимая связь между возрастом и длительностью бесплодия ($r=0,38$; $p=0,001$) и обратная слабая связь между длительностью бесплодия с количеством пункти-

Таблица 5 – Распределение ядер гранулезных клеток в исследуемых группах по размеру

Table 5 – Distribution of granulosa cell nuclei in the study groups by size

Диаметр ядер, мкм	ИГ1, %	ИГ2, %	T-критерий для независимых выборок	p
менее 6	21,31	1,53	-4,892	0,001
6 – менее 9	73,56	60,98	0,527	0,601
Из них:				
6 – менее 7	36,38	10,03	-4,516	0,001
7 – менее 8	40,40	36,94	-0,849	0,4
8 – менее 9	23,22	53,03	4,547	0,001
9 и более	5,13	37,49	8,048	0,001

Примечание – использовали T-критерий для независимых выборок при $p < 0,05$.

рованных фолликулов и полученных ооцитов ($r=-0,31$; $p=0,01$ и $r=-0,29$; $p=0,01$ соответственно), а также обратная слабая связь между ИМТ с количеством пунктированных фолликулов и полученных ооцитов ($r=-0,21$; $p=0,023$ и $r=-0,19$; $p=0,045$ соответственно).

Обсуждение

Установлено, что ИГ не отличались по возрасту ($U=1608,0$; $p=0,826$), длительности бесплодия ($U=1484,5$; $p=0,360$), индексу массы тела ($U=1540,5$; $p=0,551$), объему образцов ФЖ ($U=1640,0$; $p=0,968$) и количеству пунктированных фолликулов ($U=1640,0$; $p=0,057$). Однако ИГ1 и ИГ2 имеют статистически значимые различия по количеству полученных ооцитов ($U=1348,5$; $p=0,043$). ИГ2 (с успешной имплантацией) характеризовалась статистически значимым большим количеством ооцитов при сравнимо одинаковом количестве пунктированных фолликулов по сравнению с ИГ1, что, вероятно, связано с наличием кистозных атретичных фолликулов в ИГ1.

Установлены статистически значимые различия между ИГ1 и ИГ2 по количеству ГК в препаратах ($U=1141,0$; $p=0,005$). В ИГ2 по сравнению с ИГ1 имеет место большее количество ядер ГК (Me [Q1:Q3]: 657 [498:845] и 518 [351:671] соответственно) (рис. 2). Полученные результаты согласуются с литературными данными. Количество и качество антральных фолликулов определяют вероятность имплантации эмбриона при ЭКО [6]. По мере роста фолликула как в физиологических условиях, так и при КОС происходит увеличение количества ГК [7]. При формировании полостного фолликула отмечается наиболее интенсивное увеличение количества ГК, когда удвоение популяции клеток происходит за 24 часа; при переходе фолликула в предовуляторную стадию пролиферация ГК резко замедляется и останавливается [8]. Антральный фолликул содержит более 1000 ГК [9]. Париеальные ГК формируют 5–10 слоев в полостном фолликуле [10]. Увеличение клеточности отражает адекватный ответ клеток фолликула на стимулирующее действие фолликулостимулирующего гормона [11].

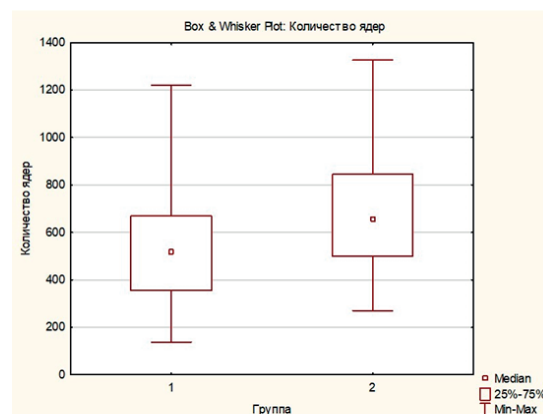


Рисунок 2 – Дисперсионный анализ количества ядер гранулезных клеток в препаратах

Figure 2 – Dispersion analysis of the number of granulosa cell nuclei in the preparations

ИГ1 и ИГ2 имеют статистически значимые различия на высоком уровне значимости по средним размерам ядер ГК ФЖ ($U=87,5$; $p=0,0001$). В ИГ2 (с успешной имплантацией эмбриона) ядра гранулезных клеток ФЖ имеют значимо больший размер (рис. 3). Полученные результаты согласуются с данными о влиянии функциональной активности клетки на организацию хроматина, что в свою очередь определяет форму и величину ядра [12, 13]. Так как ядро представляет собой сложную высокогетерогенную и динамичную среду с разнообразной функциональностью, на его величину с одной стороны влияет организация его составляющих (ядерной мембраны, хроматиновой сети и нуклеоплазматической жидкости), с другой стороны – механическое воздействие компонентов цитоплазмы (в большей степени цитоскелетных филаментов) [14, 15, 16]. Размер клеточного ядра увеличивается при реорганизации хроматина и транскрипции генов [17].

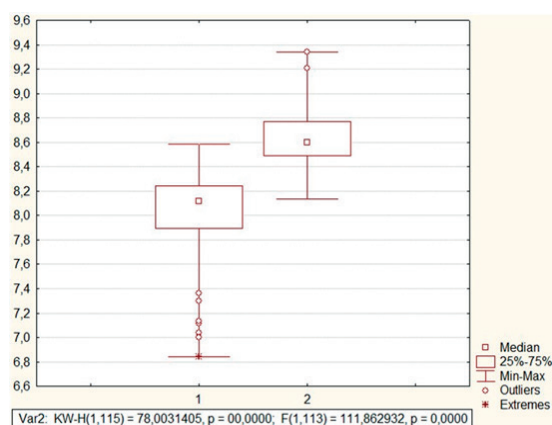


Рисунок 3 – Дисперсионный анализ среднего размера ядер гранулезных клеток фолликулярной жидкости
Figure 3 – Dispersion analysis of the mean size of granulosa cell nuclei in the follicular fluid

Выявленные статистически значимые различия на высоком уровне значимости по доле ядер с диаметром до 6 мкм ($T=-4,892$; $p=0,001$) и более 9 мкм ($T=8,048$; $p=0,001$) между ИГ1 и ИГ2 основаны на гетерогенности ГК, которые разделяются на кумулюсные, внутренние париетальные и наружные париетальные. Между этими группами ГК имеются как структурные, так и функциональные различия [9]. Внутренние париетальные ГК имеют значительно большее количество цитоплазматических выростов и более крупные ядра. Также установлено, что ГК гетерогенны по транскриптному профилю: в кумулюсных и внутренних париетальных ГК активировано большее количество генов [18, 19]. Однако в диапазоне 6–9 мкм исследуемые группы не имели статистически значимых различий ($T=0,527$; $p=0,601$). Выявленное распределение указывает на то, что в ФЖ женщин ИГ2 преобладают внутренние париетальные ГК (клетки с крупными ядрами), а в ФЖ женщин ИГ1 – наружные париетальные ГК (клетки с ядрами мелкого и среднего размеров) (рис. 4).

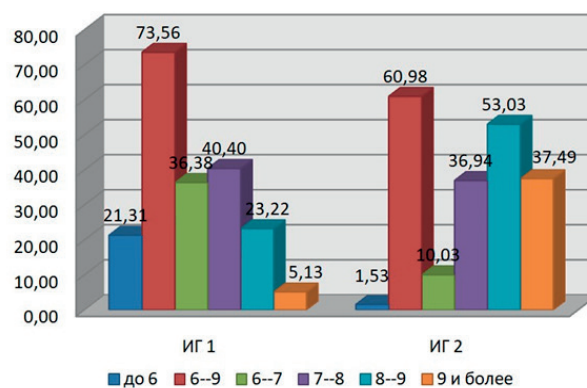


Рисунок 4 – Распределение ядер гранулезных клеток ФЖ в исследуемых группах по размеру (мкм), %
Figure 4 – Distribution of granulosa cell nuclei in the study groups by size (μm), %

Дополнительное разделение диапазона 6 – менее 9 мкм дало возможность выявить различия между исследуемыми группами: ИГ1 и ИГ2 имеют статистически значимые различия на высоком уровне значимости по доле ядер с диаметром 6 – менее 7 мкм ($T=-4,516$; $p=0,001$) и 8 – менее 9 мкм ($T=4,547$; $p=0,001$). В диапазоне 7 – менее 8 мкм исследуемые группы не имели статистически значимых различий ($T=-0,849$; $p=0,4$). Распределение в дополнительных диапазонах согласуется с характером распределения ядер по размерам в исследуемых группах при начальном анализе. Кроме того, исключение крайних диапазонов, содержащих самые мелкие и самые крупные ядра, среди которых имеется наибольшее количество артефактов (пикноз, набухание, распад ядер и др.), позволяет провести более объективную оценку (рис. 4).

В ИГ1 определяется большая гетерогенность размеров ядер, что выражается в относительно равномерном распределении ядер в диапазоне от 6 до 9 мкм (6 – менее 7 мкм (36,38%), 7 – менее 8 мкм (40,40%), 8 – менее 9 мкм (23,22%)). В ИГ2 в диапазоне от 6 до 9 мкм определяется явное преобладание ядер крупного размера и неравномерное распределение ядер по размеру (6 – менее 7 мкм (10,03%), 7 – менее 8 мкм (36,94%), 8 – менее 9 мкм (53,03%)), что указывает на меньшую гетерогенность размеров.

Выявленное распределение позволяет сделать вывод о том, что в ФЖ ИГ2 преобладают внутренние париетальные ГК и их значительно больше, чем наружных париетальных (низкая гетерогенность с преобладанием зрелых ГК), а в ФЖ ИГ1 имеет место высокая гетерогенность размеров (доли внутренних и наружных париетальных ГК сопоставимы).

Заключение

Имеются потенциальные возможности для улучшения результатов ЭКО, связанные с прогнозированием имплантации эмбриона и основанные на исследовании ГК ФЖ морфологическими методами. Несмотря на отсутствие различий между исследуемыми группами по возрасту, длительности бесплодия, индексу массы тела, объему ФЖ, количеству пунктиро-

ванных фолликулов установлено, что успешная имплантация эмбриона при ЭКО ассоциирована с большим количеством ооцитов при сравнимо одинаковом количестве пунктированных фолликулов, большим количеством ГК в препаратах, большим средним размером и меньшей гетерогенностью размеров ядер ГК, что указывает на

преобладание в фолликулах зрелых (внутренних париетальных) ГК. Выявленные цитоморфологические особенности ГК в группе с успешной имплантацией эмбриона отражают лучший ответ на овариальную стимуляцию и могут применяться в качестве дополнительных критериев прогнозирования эффективности ЭКО.

Литература

- Komatsu, K. Mouse oocytes connect with granulosa cells by fusing with cell membranes and form a large complex during follicle development / K. Komatsu, S. Masubuchi // *Biol Reprod.* – 2018. – Vol. 99, № 3. – P. 527-535. – doi: 10.1093/biolre/iy072.
- Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells / R. Li, R. J. Norman, D. T. Armstrong, R. B. Gilchrist // *Biol Reprod.* – 2000. – Vol. 63, № 3. – P. 839-845. – doi: 10.1095/biolreprod63.3.839.
- Jones, A. S. K. Follicle development as an orchestrated signaling network in a 3D organoid / A. S. K. Jones, A. Shikanov // *J Biol Eng.* – 2019. – Vol. 13. – P. 2. – doi: 10.1186/s13036-018-0134-3.
- Clarke, H. J. Regulation of germ cell development by intercellular signaling in the mammalian ovarian follicle / H. J. Clarke // *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* – 2018. – Vol. 7, № 1. – P. e294. – doi: 10.1002/wdev.294.
- Rescue of follicle development after oocyte-induced ovary dysfunction and infertility in a model of POI / S. Sheikh, B. K. M. Lo, H. Kaune [et al.] // *Front Cell Dev Biol.* – 2023. – Vol. 11. – P. 1202411. – doi: 10.3389/fcell.2023.1202411.
- Histological analysis of (antral) follicle density in ovarian cortex tissue attached to stripped endometriomas / R. de Koning, M. D. Blikkendaal, S. M. C. de Sousa Lopes [et al.] // *J Assist Reprod Genet.* – 2024. – Vol. 41, № 4. – P. 1067-1076. – doi: 10.1007/s10815-024-03058-0.
- Making a good egg: human oocyte health, aging, and in vitro development / E. E. Telfer, J. Grosbois, Y. L. Odey [et al.] // *Physiol Rev.* – 2023. – Vol. 103, № 4. – P. 2623-2677. – doi: 10.1152/physrev.00032.2022.
- Hirshfield, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary / A. N. Hirshfield // *Int Rev Cytol.* – 1991. – Vol. 124. – P. 43-101. – doi: 10.1016/s0074-7696(08)61524-7.
- Baena, V. Three-dimensional organization of transzonal projections and other cytoplasmic extensions in the mouse ovarian follicle / V. Baena, M. Terasaki // *Sci Rep.* – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 1262. – doi: 10.1038/s41598-018-37766-2.
- Advances in Oocyte Maturation In Vivo and In Vitro in Mammals / Y. Jiang, Y. He, X. Pan [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2023. – Vol. 24, № 10. – P. 9059. – doi: 10.3390/ijms24109059.
- Granulosa cell genes that regulate ovarian follicle development beyond the antral stage: The role of estrogen receptor β / V. P. Chakravarthi, A. Ratri, S. Masumi [et al.] // *Mol Cell Endocrinol.* – 2021. – Vol. 528. – P. 111212. – doi: 10.1016/j.mce.2021.111212.
- Srivastava, L. K. Sensing the squeeze: nuclear mechanotransduction in health and disease / L. K. Srivastava, A. J. Ehrlicher // *Nucleus.* – 2024. – Vol. 15, № 1. – P. 2374854. – doi: 10.1080/19491034.2024.2374854.
- Webster, M. Sizing up the nucleus: nuclear shape, size and nuclear-envelope assembly / M. Webster, K. L. Witkin, O. Cohen-Fix // *J Cell Sci.* – 2009. – Vol. 122, № 10. – P. 1477-1486. – doi: 10.1242/jcs.037333.
- Zidovska, A. The rich inner life of the cell nucleus: dynamic organization, active flows, and emergent rheology / A. Zidovska // *Biophysical reviews.* – 2020. – Vol. 12, № 5. – P. 1093-1106. – doi: 10.1007/s12551-020-00761-x.
- Hertzog, M. The Material Properties of the Cell Nucleus: A Matter of Scale / M. Hertzog, F. Erdel // *Cells.* – 2023. – Vol. 12, № 15. – P. 1958. – doi: 10.3390/cells12151958.
- Mechanics and functional consequences of nuclear deformations / Y. Kalukula, A. D. Stephens, J. Lammerding, S. Gabriele // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2022. – Vol. 23, № 9. – P. 583-602. – doi: 10.1038/s41580-022-00480-z.
- Efremov, A. K. Nucleus size and its effect on nucleosome stability in living cells / A. K. Efremov, L. Hovan, J. Yan // *Biophys J.* – 2022. – Vol. 121, № 21. – P. 4189-4204. – doi: 10.1016/j.bpj.2022.09.019.
- High-quality single-cell transcriptomics from ovarian histological sections during folliculogenesis / H. Ikeda, S. Miyao, S. Nagaoka [et al.] // *Life Sci Alliance.* – 2023. – Vol. 6, № 11. – P. e202301929. – doi: 10.26508/lsa.202301929.
- Single-Cell Transcriptomics Analysis of Human Small Antral Follicles / X. Fan, I. Moustakas, M. Bialecka [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22, № 21. – P. 11955. – doi: 10.3390/ijms222111955.

References

- Komatsu K, Masubuchi S. Mouse oocytes connect with granulosa cells by fusing with cell membranes and form a large complex during follicle development. *Biol Reprod.* 2018;99(3):527-535. doi: 10.1093/biolre/iy072.
- Li R, Norman RJ, Armstrong DT, Gilchrist RB. Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. *Biology of Reproduction.* 2000;63(3):839-845. doi: 10.1095/biolreprod63.3.839.
- Jones ASK, Shikanov A. Follicle development as an orchestrated signaling network in a 3D organoid. *J Biol Eng.* 2019;13:2. doi: 10.1186/s13036-018-0134-3.
- Clarke HJ. Regulation of germ cell development by intercellular signaling in the mammalian ovarian follicle. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2018;7(1):e294. doi: 10.1002/wdev.294.
- Sheikh S, Lo BKM, Kaune H, Bansal J, Deleva A, Williams SA. Rescue of follicle development after oocyte-induced ovary dysfunction and infertility in a model of POI. *Front Cell Dev Biol.* 2023;11(1):1202411. doi: 10.3389/fcell.2023.1202411.
- de Koning R, Blikkendaal MD, de Sousa Lopes SMC, van der Meeren LE, Cheng H, Jansen FW, Lashley EEO. Histological analysis of (antral) follicle density in ovarian cortex tissue attached to stripped endometriomas. *J Assist Reprod Genet.* 2024;41(4):1067-1076. doi: 10.1007/s10815-024-03058-0.
- Telfer EE, Grosbois J, Odey YL, Rosario R, Anderson RA. Making a good egg: human oocyte health, aging, and in vitro development. *Physiol Rev.* 2023;103(4):2623-2677. doi: 10.1152/physrev.00032.2022.
- Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol.* 1991;124:43-101. doi: 10.1016/s0074-7696(08)61524-7.
- Baena V, Terasaki M. Three-dimensional organization of transzonal projections and other cytoplasmic extensions in

- the mouse ovarian follicle. *Sci Rep.* 2019;9(1):1262. doi: 10.1038/s41598-018-37766-2.
10. Jiang Y, He Y, Pan X, Wang P, Yuan X, Ma B. Advances in Oocyte Maturation In Vivo and In Vitro in Mammals. *Int J Mol Sci.* 2023;24(10):9059. doi: 10.3390/ijms24109059.
 11. Chakravarthi VP, Ratri A, Masumi S, Borosha S, Ghosh S, Christenson LK, Roby KF, Wolfe MW, Rumi MAK. Granulosa cell genes that regulate ovarian follicle development beyond the antral stage: The role of estrogen receptor β . *Mol Cell Endocrinol.* 2021;528:111212. doi: 10.1016/j.mce.2021.111212.
 12. Srivastava LK, Ehrlicher AJ. Sensing the squeeze: nuclear mechanotransduction in health and disease. *Nucleus.* 2024;15(1):2374854. doi: 10.1080/19491034.2024.2374854.
 13. Webster M, Witkin KL, Cohen-Fix O. Sizing up the nucleus: nuclear shape, size and nuclear-envelope assembly. *J Cell Sci.* 2009;122(10):1477-1486. doi: 10.1242/jcs.037333.
 14. Zidovska A. The rich inner life of the cell nucleus: dynamic organization, active flows, and emergent rheology. *Biophysical reviews.* 2020;12(5):1093-1106. doi: 10.1007/s12551-020-00761-x.
 15. Hertzog M, Erdel F. The Material Properties of the Cell Nucleus: A Matter of Scale. *Cells.* 2023;12(15):1958. doi: 10.3390/cells12151958.
 16. Kalukula Y, Stephens AD, Lammerding J, Gabriele S. Mechanics and functional consequences of nuclear deformations. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;23(9):583-602. doi: 10.1038/s41580-022-00480-z.
 17. Efremov AK, Hovan L, Yan J. Nucleus size and its effect on nucleosome stability in living cells. *Biophys J.* 2022;121(21):4189-4204. doi: 10.1016/j.bpj.2022.09.019.
 18. Ikeda H, Miyao S, Nagaoka S, Takashima T, Law SM, Yamamoto T, Kurimoto K. High-quality single-cell transcriptomics from ovarian histological sections during folliculogenesis. *Life Sci Alliance.* 2023;6(11):e202301929. doi: 10.26508/lsa.202301929.
 19. Fan X, Moustakas I, Bialecka M, Del Valle JS, Overeem AW, Louwe LA, Pilgram GSK, van der Westerlaken LAJ, Mei H, Chuva de Sousa Lopes SM. Single-Cell Transcriptomics Analysis of Human Small Antral Follicles. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21):11955. doi: 10.3390/ijms222111955.

CYTOMORPHOLOGICAL FEATURES OF GRANULOSA CELLS IN FOLLICULAR FLUID DURING IN VITRO FERTILIZATION

P. M. Motolyanets, O. A. Yudina, A. Z. Smolensky

*Republican Clinical Medical Center of the Administration of the President
of the Republic of Belarus, Minsk, Belarus*

Objective: to analyse the cytomorphological characteristics of follicular fluid granulosa cells to identify potential predictors of successful embryo implantation during in vitro fertilization.

Material and methods. The study included 170 follicular fluid samples obtained during oocyte-cumulus complex aspiration for in vitro fertilization due to infertility. Based on exclusion criteria, two study groups (SG) were formed: SG1 – embryo implantation failure ($n=61$), SG2 – successful embryo implantation ($n=54$). A comparative assessment of the groups was performed based on age, duration of infertility, body mass index, volume of follicular fluid examined, number of punctured follicles and number of oocytes retrieved. The study groups were also compared by the number of granulosa cells in the samples and the average size of their nuclei. The heterogeneity of granulosa cell nuclei size was evaluated.

Results. Statistically significant differences were found between SG1 and SG2 in the number of oocytes retrieved ($p=0.043$), the number and average size of granulosa cell nuclei in the samples ($p=0.005$ and $p=0.0001$, respectively). Greater heterogeneity of granulosa cell nuclei size was observed in SG1 compared to SG2.

Conclusions. Follicular fluid in successful embryo implantation (SG2) is characterized by a higher cellularity of the samples, associated with a greater number of parietal cells and their layers in the follicle, as well as a larger average size of granulosa cell nuclei which is due to the predominance of mature (inner parietal) cells in the follicles. Pronounced heterogeneity of granulosa cell nuclei size was observed in the absence of embryo implantation (SG1) and indicates the presence of a significant number of immature (outer parietal) granulosa cells in the follicle.

Keywords: follicular fluid, granulosa cells, cell block.

For citation: Motolyanets PM, Yudina OA, Smolensky AZ. Cytomorphological features of granulosa cells in follicular fluid during in vitro fertilization. *Journal of the Grodno State Medical University.* 2025;23(3):247-253. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2025-23-3-247-253>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was performed without external funding.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом.
Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee.

Об авторах / About the authors

*Мотоланец Павел Михайлович / Motolyanets Pavel, e-mail: motolyan@mail.ru

Юдина Ольга Анатольевна / Yudina Olga

Смоленский Андрей Зенонович / Smolensky Andrey

* – автор, ответственный за переписку / corresponding author

Поступила / Received: 31.01.2025

Принята к публикации / Accepted for publication: 23.05.2025