

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ КИСЛОРОДА НА РАЗВИТИЕ ЭМБРИОНОВ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Е.А. Жиряева^{1,2}, А.П. Киясов², А.А. Ризванов²

¹ ООО «Клиника семейной медицины», Казань, Россия

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

THE EFFECT OF OXYGEN CONCENTRATION ON EMBRYO DEVELOPMENT AND ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES EFFICIENCY

E.A. Zhiryaeva^{1,2}, A.P. Kiasov², A.A. Rizvanov²

¹ "Klinika semejnoy mediciny" LLC, Kazan, Russia

² Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

e-mail: Albert.Rizvanov@kpfu.ru

На преимплантационное развитие эмбрионов в условиях *in vitro* оказывают влияние множество различных факторов. Одним из таких факторов является концентрация кислорода в среде культивирования. В настоящее время лаборатории ЭКО имеют возможность культивировать эмбрионы как в условиях атмосферного содержания кислорода, так и при пониженных концентрациях кислорода (гипоксии).

Настоящий обзор посвящен анализу проведенных исследований по выявлению «оптимальной» концентрации газовой смеси в инкубаторе с целью получения более жизнеспособных эмбрионов и увеличению результативности программ вспомогательных репродуктивных технологий.

Ключевые слова: бластоциста, концентрация кислорода, гипоксия, среда культивирования, преимплантационное развитие, ЭКО, вспомогательные репродуктивные технологии.

Введение

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в сфере вспомогательных репродуктивных технологий (BPT), результативность циклов BPT, по данным Европейского общества по вопросам репродукции человека и эмбриологии (ESHRE), опубликованным в 2016 г., невелика и составляет 30–40% [1]. Основной целью клиник экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) является достижение и поддержание максимально высокого процента наступления беременностей и живорождения.

Один из этапов, необходимых для выполнения данной задачи, — это создание оптимальных условий культивирования эмбрионов, наиболее приближенных к условиям *in vivo*. Важным фактором, оказывающим влияние на процесс развития эмбриона в рамках протокола ЭКО, является концентрация кислорода в среде культивирования. В естественных условиях эмбрион находится в гипоксической среде, где также поддерживается баланс между уровнем образования активных форм кислорода и антиоксидантных ферментов [2]. Редокс-система гарантирует идеальную среду для эмбрионального развития в физиологических условиях, но не в условиях ЭКО [3, 4]. В некоторых исследованиях показано, что культуральные среды сами могут быть источником активных форм кислорода [5], которые, в свою очередь, могут вызывать повреждение ДНК, липидов, клеточных мембран, митохондрий, эндоплазматического ретикулума [6–9].

Однако создания только оптимального газового окружения не достаточно. Без объективной оценки морфологического, генетического, эпигенетического, метаболического статусов эмбрионов в программах ЭКО с использованием современных технологий увеличение результативности программ BPT невозможно [10].

Целью данной работы стал анализ имеющихся данных о влиянии различных концентраций O_2 на качество эмбрионов и исход протоколов ЭКО.

Many different factors have an effect on the preimplantation development of embryos under conditions *in vitro*. One of these factors is the oxygen concentration in the culture medium. Currently, IVF labs have ability to cultivate embryos either under conditions of atmospheric oxygen concentration or at low oxygen concentration (hypoxia). This review is focused on the analysis of up to date research and clinical results which are trying to establish an "optimal" composition of the gas mixture in the incubator to generate more viable embryos and increase the effectiveness of assisted reproductive technologies programs.

Keywords: blastocyst, oxygen concentration, hypoxia, environment, cultivation, preimplantation development, IVF, assisted reproductive technologies.

Концентрация кислорода в различных органах и тканях. Физиологическая роль концентрации кислорода *in vivo*

Абсолютным условием существования аэробных организмов является снабжение их кислородом. Для нормального роста, функционирования клеток и производства энергии необходим молекулярный кислород. Кислород — основной окислитель в процессе гликолиза. Хотя процесс гликолиза может происходить и в анаэробных условиях, этот путь является энергетически менее выгодным. То есть недостаток кислорода приводит к снижению синтеза АТФ митохондриями и, как следствие, возникает «энергетический голод» [11].

Кислород является конечным акцептором электронов в процессе окислительного фосфорилирования, что, в свою очередь, несет риск образования свободных радикалов, приводящих к нарушению функционирования клеток и их гибели. В результате этого эволюционно возникли метаболические и физиологические системы, поддерживающие гомеостаз кислорода в организме [12].

Парциальное давление кислорода определяет процесс газообмена в организме. Скорость диффузии газов через физиологическую мембрану зависит от парциального давления газа по обе стороны мембраны. Чем больше разница между парциальными давлениями газа по обе стороны мембраны, тем быстрее происходит диффузия [13].

Парциальное давление кислорода в атмосферном воздухе составляет 150 мм рт. ст.; в артериальной крови около 90 мм рт. ст.; в тканях — 20 мм рт. ст., в венозной крови — 40 мм рт. ст. [13].

В условиях гипоксии транскрипция большинства генов в клетках подавляется. Однако существует группа генов, транскрипция которых усиливается при недостатке кислорода. Эти гены кодируют

гипоксия-индуцибельные факторы, которые улучшают доставку кислорода (фактор роста эндотелия сосудов-А, эритропоэтин 4), и контролируют метаболические пути (пируват дегидрогеназа и др.) [14]. Кроме того, гипоксия-индуцибельные факторы участвуют в канцерогенезе, вызывают повышенную пролиферацию злокачественных клеток и метастазирование [15].

Влияние концентрации кислорода на эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) *in vitro*

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), как правило, выделяют из клеток эпибласта бластоцист, полученных в программе ЭКО. Благодаря своей плюрипотентности, ЭСК имеют значительный потенциал для использования в регенеративной медицине. Однако одним из их недостатков является тенденция к спонтанной дифференцировке в культуре [16]. Следовательно, их рост в культуре требует определенных условий для поддержания их плюрипотентного потенциала и стабильности генома.

Экспериментально было доказано, что колонии ЭСК, культивируемые в условиях гипоксии (3–5%), имеют меньше признаков морфологической дифференцировки, чем колонии, культивируемые при атмосферной концентрации кислорода (21%). Уровень экспрессии гена *oct-4* (белок OCT4 участвует в самообновлении и поддержании недифференцированных стволовых клеток) выше у ЭСК в условиях пониженной концентрации кислорода [17]. Условия гипоксии увеличивают клональную выживаемость ЭСК мыши [18].

Y. Yoshida с соавт. (2009) показали, что репрограммирование соматических клеток в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) значительно эффективнее в гипоксических условиях, чем при нормоксии, как у мышей, так и у человека [19].

M.A. Ramirez с соавт. (2011) установили, что после 3 сут. культивирования мышиных ЭСК в условиях гипоксии, уровень апоптоза ЭСК был выше 6%. Однако при непрерывном выращивании ЭСК в течение месяца в тех же условиях, уровень апоптоза был менее 4% [20].

Культивирование ЭСК или ИПСК в условиях гипоксии перед трансплантацией (регенеративная терапия при инфаркте миокарда) повышает их терапевтический потенциал [21].

В ряде исследований было обнаружено, что пониженная концентрация кислорода способствует направленной дифференцировке ЭСК (под действием внешних факторов).

J.M. Shin с соавт. (2011) выявили, что в условиях гипоксии эффективность дифференцировки ЭСК в эндотелиальные клетки достоверно выше. Уровень маркеров сосудистых клеток (PECAM, KDR, CD144, Tie-2) был в 1,5–2 раза выше у клеток, культивировавшихся в условиях гипоксии [22]. Также было установлено увеличение экспрессии генов *VEGF* (вазо-эндотелиальный фактор роста), *bFGF* (основной фактор роста фибробластов), *ANGPT1* (фактор роста, стимулирующий ангиогенез), *PDGF* (фактор роста тромбоцитов) и др. при низких концентрациях кислорода.

Эти данные были подтверждены в работе K.M. Tsang с соавт. (2017): авторы отмечают, что ЭСК наиболее чувствительны к гипоксии в первые 2 сут. дифференцировки [23].

Таким образом, концентрация кислорода в среде культивирования оказывает значительное влияние на пролиферацию и дифференцировку ЭСК. Учитывая тот факт, что ЭСК получают из бластоцист, можно предположить, что влияние концентрации кислорода играет важную роль в развитии эмбрионов.

Влияние концентрации кислорода при культивировании эмбрионов на эффективность ВРТ

Существуют две стратегии культивирования эмбрионов: в условиях атмосферной концентрации кислорода (~20%) и при пониженном содержании кислорода (~5%). Установлено, что в естественных условиях эмбрионы подвергаются воздействию O_2 в концентрации 2–8% [24], причем наблюдается уменьшение концентрации O_2 по мере «перехода» эмбриона из маточных труб в полость матки [25].

За последние годы было выполнено большое количество экспериментов, направленных на изучение влияния концентрации кислорода на процесс доимплантационного развития эмбрионов.

Одно из первых исследований по данной теме осуществили J.C. Dumoulin с соавт. (1999) [26]. Они провели 1380 циклов ЭКО и проанализировали результаты культивирования ооцитов и эмбрионов в течение первых 2–3 сут. развития либо в условиях атмосферной концентрации кислорода (690 циклов), либо при пониженной концентрации O_2 (690 циклов). Процент оплодотворения, имплантации и наступления беременности оказался сопоставим в обеих группах. Эмбрионы, оставшиеся после переноса на 2–3 сут., продолжали культивировать до 5 сут. В результате процент формирования бластоцист был статистически выше в группе с 5% O_2 по сравнению с группой 20% O_2 (25,8 против 20,4% соответственно). Авторы отметили незначительное увеличение жизнеспособности эмбрионов при культивировании в условиях низкой концентрации кислорода. Возможно, концентрация O_2 оказывает влияние на более поздних этапах преимплантационного развития.

M. Bahceci с соавт. (2005) предположили, что результаты ИКСИ (ICSI — IntraCytoplasmic Sperm Injection, введение сперматозоида в цитоплазму, интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида) можно улучшить, используя культивирование эмбрионов в условиях 5% O_2 [27]. В данной работе было проанализировано 712 ооцитов. Культивирование осуществлялось при 5 и 20% O_2 . Эмбриотрансфер производили на 2–3 сут. культивирования. Статистически значимых различий между группами эмбрионов, культивировавшихся в условиях различной концентрации кислорода, в клинических исходах циклов не наблюдалось. Авторы сделали вывод об отсутствии влияния концентрации O_2 на результативность циклов ИКСИ.

В своем обзоре A. Petersen с соавт. (2005) сравнили культивирование размороженных эмбрионов человека в двух различных системах (атмосферная и пониженная концентрация кислорода) [28]. На 4 сут. культивирования процент эмбрионов, развившихся до стадии морулы, составил 43%/68% в группах нормоксия/гипоксия соответственно.

P. Rinaudo с соавт. (2006) изучали влияние концентрации кислорода на экспрессию генов в преимплантационных мышиных эмбрионах и отметили, что 5% концентрация кислорода способствует лучшему развитию эмбрионов в условиях *in vitro* [29]. Они также выявили, что эмбрионы, развивающиеся в условиях пониженной концентрации кислорода, содержали большее количество клеток, в том числе входящих в состав ВКМ (внутриклеточной массы), чем эмбрионы, культивировавшиеся при 20% O_2 . Кроме того, было обнаружено, что в условиях атмосферной концентрации кислорода значительно увеличивается экспрессия гена *ccng1* (кодирует белок, отвечающий за правильное течение клеточного цикла; избыточная экспрессия этого гена ускоряет

прогрессию клеточного цикла и может способствовать онкогенезу) и снижается экспрессия гена *ube2a* (кодирует белок, необходимый для пострепликативного восстановления поврежденной ДНК, участвует в транскрипционной регуляции) [29].

В. Кеа с соавт. (2006) оценивали влияние пониженной концентрации кислорода на процент оплодотворения, развитие эмбрионов и процент наступления беременностей [30]. Число, возраст пациентов, причина бесплодия, среднее число полученных ооцитов, процент оплодотворения и наступления беременностей были сопоставимы в группах с пониженным и атмосферным содержанием кислорода. Перенос эмбрионов осуществлялся на 3 сут. Хотя авторы не наблюдали статистически значимой разницы по ранее перечисленным параметрам в обеих группах, они отметили улучшение качества эмбрионов к 3 сут. культивирования в группе с 5% O_2 .

J.M. Cieslak Janzen с соавт. (2007–2008) исследовали развитие сиблинговых эмбрионов после ЭКО/ИКСИ в зависимости от концентрации кислорода [31]. Хотя авторы отметили улучшение «качества» эмбрионов и увеличение количества пролонгирующих беременностей в группе, культивировавшейся в условиях гипоксии, эти различия не были статистически значимыми.

Влияние концентрации кислорода на развитие эмбрионов при длительном культивировании (до 5 сут.) изучали В. Kovacic с соавт. (2008) [32]. Оценивались следующие параметры: частота оплодотворения, процент морфологически «нормальных» эмбрионов, частота формирования бластоцист. Учитывался также способ оплодотворения: ЭКО (988 ооцитов) или ИКСИ (928 ооцитов). Было установлено, что концентрация кислорода не оказывает влияния на частоту оплодотворения. Но доля эмбрионов с «хорошей» морфологией на 3 сут. была выше в группе культивирования при 5% O_2 по сравнению с 20% O_2 : для циклов ИКСИ 51% против 28%; для циклов ЭКО 59% против 43%. Важно отметить, что для обоих способов оплодотворения наблюдалось увеличение доли бластоцист на 5 сут. развития в группах культивирования с пониженным содержанием кислорода.

U. Waldenstrom с соавт. (2009) опубликовали данные о влиянии газовой смеси, в которой культивировались эмбрионы, на исход программы ВРТ [33]. Было рассмотрено развитие ооцитов, полученных от 396 пациенток. Эмбрионы 199 пациенток культивировались в двухгазовой смеси (6% CO_2 и 19% O_2), а эмбрионы 197 пациенток — в условиях трехгазовой смеси (6% CO_2 , 5% O_2 , 90% N_2). Полученные результаты были схожи с результатами предыдущих исследований. Процент формирования бластоцист (47,8 против 42,1%), так же, как и процент наступления беременности (56,9 против 38,7%) был выше в группе с пониженным содержанием кислорода. Авторы сделали вывод, что культивирование в системе трех газов увеличивает уровень рождаемости на 10%.

Н. Ciray с соавт. (2009) провели эксперимент, направленный на подтверждение гипотезы о положительном влиянии пониженной концентрации кислорода на качество эмбрионов человека, полученных в программе ЭКО [34]. Были проанализированы 75 ооцитов, разделенных на 2 группы: первая группа ооцитов культивировалась в условиях 5% O_2 с момента оплодотворения до дня переноса (на 5 сут.); вторая группа — в условиях атмосферного содержания кислорода с момента оплодотворения до 3 сут., а затем в условиях пониженного содержания O_2 . Различий между группами в морфологических характеристиках эмбрионов на 3 сут. не наблюдалось. Однако, данные о развитии эмбрионов, начиная

с 3 сут., свидетельствуют об увеличении процента формирования бластоцист и улучшении качества эмбрионов при культивировании в условиях низкой концентрации кислорода с момента оплодотворения до дня переноса (1 группа).

М. Meintjes с соавт. (2009) проверили обоснованность культивирования эмбрионов при низкой концентрации O_2 [35]. В исследовании было изучено 230 циклов ЭКО/ИКСИ (первая программа ВРТ у всех пациентов). Оценивались следующие параметры: процент имплантации и живорождения. У эмбрионов, культивировавшихся при 5% O_2 , уровень имплантации был выше на 12,2%, а показатель живорождения вырос на 14,8%. Авторы пришли к заключению, что при культивировании эмбрионов в условиях пониженной концентрации кислорода результативность программ ЭКО/ИКСИ увеличивается.

J. Graham с соавт. (2010) наблюдали за развитием эмбрионов в условиях различных концентраций кислорода у 84 пар, проходивших лечение бесплодия методом ЭКО, и обнаружили явные и существенные клинические преимущества при культивировании эмбрионов в условиях гипоксии: увеличение числа переносимых и криоконсервированных эмбрионов, а также увеличение их имплантационного потенциала [36].

Цель работы В. Kovacic с соавт. (2010) заключалась в том, чтобы установить, влияет ли низкая концентрация O_2 при культивировании эмбрионов на результативность программы ЭКО, если в качестве метода оплодотворения применяется технология ИКСИ [37]. В эксперименте приняли участие 647 пациенток:

1 подгруппа (348 женщин): пациентки моложе 40 лет, у которых получено 5 и более ооцитов в стадии метафазы второго деления мейоза;

2 подгруппа (169 женщин): пациентки моложе 40 лет, у которых получено менее 5 ооцитов в стадии метафазы второго деления мейоза;

3 подгруппа (130 женщин): пациентки старше 40 лет, у которых получена хотя бы одна яйцеклетка в стадии метафазы второго деления мейоза.

Все пациентки были разделены на 2 группы (ооциты 326 пациенток культивировались при 5% O_2 , а 321 — при атмосферном содержании кислорода). Авторы отметили, что, несмотря на улучшение качества эмбрионов на 2 сут. развития в группе с пониженным содержанием кислорода, процент имплантации и процент развивающихся беременностей был сопоставим в обеих группах. Однако в группе, где ооциты культивировали в условиях 5% O_2 , частота наступления беременностей была выше по сравнению с группой культивирования в условиях атмосферной концентрации кислорода (суммарно, без разделения на подгруппы; 38 против 28,3%). Также и у пациенток с «бедным ответом» яичников процент наступления беременностей был достоверно выше при культивировании в условиях 5% O_2 (2 подгруппа; 23 против 9,8%) при переносе эмбрионов на 3 сут. развития.

Ученые сделали вывод, что использование пониженной концентрации кислорода при культивировании эмбрионов в программах ЭКО является обоснованным независимо от продолжительности культивирования.

А. Mitsoli с соавт. (2011) также изучали развитие эмбрионов, культивируемых в условиях нормоксии/гипоксии [38] и наблюдали улучшение морфологического «качества» эмбрионов 3 сут. развития в группе гипоксии [38].

Однако D.G. Sobrinho с соавт. (2011) пришли к заключению, что, несмотря на положительную тенденцию в исходах программ ЭКО при культивировании эмбрионов в условиях гипоксии, рекомендовать культивирование

ооцитов и эмбрионов в таких условиях преждевременно, т.к. в некоторых проанализированных ими исследованиях (4 из 7) обнаружены сходные показатели оплодотворения, имплантации и числа прогрессирующих беременностей при гипоксии и при нормоксии [39].

Тем не менее, в более позднем обзоре, опубликованном в Кокрейновской базе в 2012 г. [40], S. Bontekoe с соавт. дали положительные рекомендации по культивированию эмбрионов в условиях пониженной концентрации кислорода (в сравнении с культивированием при атмосферной концентрации). Авторы считают, что гипоксия достоверно способствует возрастанию темпов деления, морфологического «качества» и жизнеспособности эмбрионов, что в свою очередь поможет увеличить результативность программ экстракорпорального оплодотворения.

P. Vale с соавт. (2012) изучали влияние концентрации кислорода на метаболизм аминокислот и углеводный обмен на мышечных эмбрионах [41]. Было отмечено, что эмбрионы, культивировавшиеся при более физиологической концентрации кислорода (5%), характеризуются более низкими показателями поглощения пирувата и некоторых аминокислот (серин, глутамин, аспартат) до стадии компактизации, чем эмбрионы, культивировавшиеся при 20% O₂. И наоборот, начиная со стадии морулы, эмбрионы в условиях 5% O₂ демонстрировали более высокие показатели поглощения глюкозы и усвоения аминокислот (аспарагин, глутамат, триптофан, лизин, треонин, тирозин, метионин, валин, изолейцин, лейцин, фенилаланин). F. Houghton с соавт. (2002) обнаружили, что значительная часть эмбрионов с повышенным уровнем потребления аминокислот на стадии дробления не достигает стадии бластоцисты [42]. Уровень гликолиза был ниже у бластоцист, культивировавшихся при сниженной концентрации кислорода. Эти результаты согласуются с данными о том, что повышение поглощения глюкозы эмбрионами на 4–5 сут. развития связано с увеличением успешности имплантации [43]. Сниженные показатели поглощения глюкозы могут свидетельствовать о низкой жизнеспособности данных эмбрионов [44].

Научная работа E. Kasterstein с соавт. (2013) была направлена на изучение влияния различных концентраций кислорода на развитие сиблинговых ооцитов и клинические исходы после инкубации в среде с двумя различными концентрациями кислорода [45]. Было проанализировано 258 циклов ЭКО, получено 3638 ооцитов III, 1833 из них культивировались при 5% O₂, 1805 — при 20% O₂. Процент оплодотворения и деления был сопоставим в обеих группах культивирования, что согласуется с результатами других исследований [26, 27, 30, 32]. Однако количество blastomeres в эмбрионах на 3 сут. развития, количество эмбрионов на перенос и криоконсервацию было больше в группе с пониженным содержанием кислорода.

Для того чтобы определить, влияет ли концентрация кислорода на клинические исходы программ ЭКО, были отдельно проанализированы циклы, в которых эмбрионы переносили из групп с одинаковой концентрацией O₂. Из 258 циклов в 76 случаях эмбрионы переносили из группы с 5% O₂, а в 38 — из группы с 20% O₂. Уровень имплантации, наступления беременности и частота родов живым плодом были значительно выше в группе с низкой концентрацией O₂ по сравнению с группой с атмосферной концентрацией.

E. Bontekoe с соавт. (2013) на основании анализа опубликованных данных в своем обзоре также считают, что культивирование эмбрионов при низких концентрациях кислорода увеличивает результативность программ ЭКО/ИКСИ, а, следовательно, и рождаемость [46].

Однако G. Paternot с соавт. (2013) пришли к выводу об отсутствии улучшений в качестве эмбрионов на 2 и 3 сут. развития при использовании низкой концентрации кислорода [47].

Исследование N. Guo с соавт. (2014) состояло в изучении влияния кислорода на различных стадиях развития эмбриона [48]. Наблюдала за развитием 1254 ооцитов, полученных от 92 пациенток. Как и в предыдущих работах, ооциты были разделены на две группы в зависимости от концентрации кислорода. Статистически значимой разницы в частоте оплодотворения между двумя группами обнаружено не было. Однако в группе с 5% O₂ количество «оптимальных» эмбрионов на 3 сут. развития было выше (72,4 против 64,2%). Также был выше процент формирования бластоцист в группе с пониженным содержанием кислорода (64,5 против 52,9%). Авторы пришли к заключению, что низкая концентрация кислорода может существенно повысить потенциал развития эмбриона, что положительно повлияет на результативность цикла ЭКО.

Z. Peng с соавт. (2015) проанализировали 3484 цикла ЭКО/ИКСИ, разделенные на 3 группы, отличающиеся условиями инкубации с момента трансвагинальной пункции фолликулов до переноса эмбрионов (на 3 сут. развития):

I группа: 5% CO₂, 20% O₂ — 1131 цикл;

II группа: 1 сут. культивирования: 5% CO₂, 20% O₂; 2 сут.

культивирования: 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ — 1258 циклов;

III группа: 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ — 1095 циклов [49].

Эмбрионы из III группы показали более высокий процент оплодотворения и имплантации, чем эмбрионы из других групп. Данные показатели оказались самыми низкими во II группе. Не наблюдалось различий между тремя группами по уровню многоплодных беременностей и замерших беременностей.

C.O. Natri с соавт. (2016) провели анализ более 20 обзоров, в которых опубликованы данные о влиянии концентрации кислорода на развитие эмбрионов и исход программ ВРТ и считают, что на сегодняшний день нельзя сделать однозначный вывод о целесообразности культивирования эмбрионов в условиях гипоксии [50].

Ниже представлена таблица, обобщающая и дополняющая вышеперечисленные исследования (включает работы, объектом изучения которых стали ооциты и эмбрионы человека).

В целом, различия в эффективности процедур ЭКО при гипоксии и нормоксии, описанные выше, возможно связать с разными подходами к формированию низкокислородной среды и манипуляциями с эмбрионами (групповое или раздельное культивирование, одноступенчатые или многоступенчатые среды). Рассмотрим некоторые технические аспекты.

Технические решения для достижения гипоксии для ВРТ

Для культивирования культур клеток, требующих пониженного парциального давления кислорода в атмосфере, используются мультигазовые инкубаторы, обеспечивающие контроль уровня и CO₂ и O₂, используя азот для вытеснения окружающего воздуха. Азот снижает уровень кислорода ниже атмосферного для создания микроаэрофильных (гипоксических) условий клеток в диапазоне от 0,2 до 20% кислорода. Также возможно использование уже готовой высокоочищенной газовой смеси с заданными концентрациями входящих в состав газов.

В последнее время все большее применение находят планшетные инкубаторы. Они могут работать в двух режимах: мультигазовом или моногазовом. Планшетный

Таблица. Сводный анализ научных работ, посвященных оценке влияния гипоксических условий культивирования на эмбриональное развитие и результативность ЭКО

Исследование	Число участников	Продолжительность культивирования	Инкубатор	Среда культивирования	Результаты исследований
J.C. Dumoulin и соавт., 1999 [26]	1380 циклов	3 сут.	—	—	Нет статистически значимых различий
M. Bahceci, 2005 [27]	712 ооцитов	3 сут.	—	—	Нет статистически значимых различий
A. Petersen и соавт., 2005 [28]	126 криоконсервированных эмбрионов	6 сут.	Анаэробная рабочая станция, Thermo Forma	Medicult	Увеличение процента образования морул/бластоцист в группе с гипоксией
B. Kea и соавт., 2006 [30]	1045 ооцитов	3 сут.	—	—	Нет статистически значимых различий
J.M. Cieslak Janzen и соавт., 2008 [31]	1379 ооцитов	3 сут., 5 сут.	—	Global medium	Нет статистически значимых различий
B. Kovacic и соавт., 2008 [32]	1916 ооцитов	5 сут.	—	—	Увеличение процента формирования бластоцист в группе с гипоксией
U. Waldenstrom и соавт., 2009 [33]	396 циклов	5 сут.	Labrum Klimat	BlastAssist System	Увеличение процента формирования бластоцист и процента наступления беременностей в группе с гипоксией
H. Ciray и соавт., 2009 [34]	75 ооцитов	3 сут., 5 сут.	Thermo Forma 3141 Forma Scientific	Quinn's Advantage Plus Cleavage Medium, Quinn's Advantage Plus Blastosyst Medium	Увеличение процента формирования бластоцист в группе с гипоксией
M. Meinties и соавт., 2009 [35]	230 циклов	3 сут., 5 сут.	Forma 3120	G-1 medium, G-2 medium, HSA-supplemented (Vitrolife)	Увеличение процента рождаемости в группе с гипоксией
J. Graham и соавт., 2010 [36]	84 цикла	3 сут., 5 сут.	—	—	Увеличение процента формирования бластоцист и процента наступления беременностей в группе с гипоксией
C. Kovacic и соавт., 2010 [37]	647 циклов	3 сут.	CB 150 Binder	BlastAssist (Medicult)	Увеличение процента наступления беременностей в группе с гипоксией
A. Mitsoli и соавт., 2011 [38]	464 циклов	3 сут.	—	COOK	Улучшение морфологии эмбрионов на 3 сут. развития в группе с гипоксией
E. Kasterstein и соавт., 2013 [45]	3638 ооцитов	3 сут., 5 сут.	NuAire	Vitrolife	Увеличение процента формирования бластоцист, процента имплантации и процента наступления беременностей в группе с гипоксией
G. Paternot и соавт., 2013 [47]	790 эмбрионов	3 сут.	Мини-инкубатор, стандартный инкубатор	—	Нет статистически значимых различий

Исследование	Число участников	Продолжительность культивирования	Инкубатор	Среда культивирования	Результаты исследований
N. Guo и соавт., 2014 [48]	1254 ооцитов	3 сут., 5 сут.	K-MINC 1000, Labotect C200	Vitrolife	Увеличение процента формирования бластоцист в группе с гипоксией
Z. Peng и соавт., 2015 [49]	3484 циклов	3 сут.	K-MINC 1000, SANYO MCO-5AC	Vitrolife	Увеличение процента имплантации в группе с гипоксией
Y. Yang и соавт., 2016 [51]	122 эмбриона после криоконсервации	с 3 по 5 сут.	APC-30D, SMA30DR (ASTEC)	SAGE	Более высокая скорость деления, низкий уровень апоптоза в группе с гипоксией

инкубатор состоит из нескольких отдельных камер с крышками. Эмбрионы каждой пациентки находятся в отдельной ячейке. Открытие камеры и осмотр эмбрионов одной пациентки не оказывает отрицательного воздействия на другие эмбрионы, находящиеся в инкубаторе, так как условия их культивирования остаются неизменными. Культивирование в отдельных камерах, не зависящих друг от друга, позволяет свести к минимуму метаболический стресс для эмбрионов при открывании, что невозможно в обычных мультигазовых инкубаторах. В некоторых планшетных инкубаторах предусмотрен встроенный смеситель газов, то есть готовая газовая смесь не требуется, а заданные соотношения CO_2 и N_2 смешиваются автоматически.

Важно отметить, что в настоящее время у лабораторий ЭКО нет технической возможности обеспечить постоянную гипоксическую (физиологическую) концентрацию кислорода при культивировании эмбрионов со дня оплодотворения и до момента переноса, так как оценка морфологических характеристик эмбриона и смена культуральных сред (при использовании последовательной системы культивирования) сопряжены с извлечением их из инкубатора в условиях атмосферной концентрации O_2 . Таким образом, даже при использовании мультигазовых инкубаторов, эмбрионы подвергаются периодическому воздействию высоких концентраций O_2 , что может привести к неисследованным на данный момент изменениям в экспрессии генов, биохимических процессов и повлиять на развитие эмбрионов. Возможно, именно различия в кратности и продолжительности воздействия атмосферного кислорода во время манипуляций с эмбрионами в экспериментах по культивированию их в гипоксических условиях объясняют различия в эффективности описанных выше исследований.

С появлением технологии Timelapse (метод покадровой съемки) появилась возможность непрерывно наблюдать за развитием эмбрионов в условиях реального времени, не вынимая их из инкубатора. На основании скорости деления и морфологических характеристик эмбрионов в определенные промежутки времени программа помогает выявить наиболее перспективные эмбрионы для наступления беременности. Однако даже при использовании данной технологии воздействие атмосферной концентрации кислорода на ооциты во время удаления клеток кумулюса перед ИКСИ и самой процедурой оплодотворения, мы избежать не можем.

Решить данную проблему можно с помощью гипоксической (анаэробной) станции. Гипоксическая станция — это закрытая система, позволяющая провести весь эмбриологический этап протокола ЭКО в необходимом атмосферном окружении: имеется возможность

комплектации станции, как бинокулярной лупой, так и инвертированным микроскопом с системой микроманипуляторов и видеорегистрацией (рис.). Применение подобной станции позволяет проводить все манипуляции с эмбрионами при постоянной (гипоксической) концентрации кислорода, как во время манипуляций, так и во время смены среды и морфологического анализа.



Рис. Гипоксическая (анаэробная) станция для культивирования эукариотических клеток, выполненная на основе двух камер Bactrox со шлюзовыми камерами, встроенным инвертированным флуоресцентным и бинокулярным микроскопами (Институт фундаментальной биологии и медицины, Казанский (Приволжский) федеральный университет)

Заключение

Кислород играет важную роль в метаболизме эмбриона. Он используется при окислительном фосфорилировании. В процессе переноса электронов по транспортной цепи возможно образование активных форм кислорода [52, 53]. Среди них ионы кислорода, свободные радикалы и перекиси. Свободные радикалы повреждают митохондрии и митохондриальную ДНК. Количество митохондриальной ДНК в эмбриональных клетках млекопитающих невелико [54]. Некоторые ключевые ферменты окислительного фосфорилирования закодированы в ДНК митохондрий. Следовательно, при повреждении ДНК их синтез нарушается. С точки зрения клинической эмбриологии, эмбрионы, пострадавшие от окислительных нарушений, выявляются не сразу, а на более поздних этапах развития. Активные формы кислорода вызывают повреждение клеточной мембраны, приводят к ДНК-фрагментации, а также участвуют в процессах апоптоза. Кроме того,

уровень кислорода играет важную роль в регуляции экспрессии многих генов.

В отличие от ранее опубликованных обзоров по данной теме, в этот обзор включены работы по изучению влияния гипоксии не только на «свежие» эмбрионы, но и на эмбрионы после криоконсервации.

В некоторых из рассмотренных нами исследований сделан вывод о недоказанной эффективности культивирования эмбрионов до 3 сут. в условиях пониженной концентрации кислорода [26, 27, 30, 31]. Однако при использовании методики длительного культивирования (5 сут.) в условиях гипоксии большинство авторов отмечают положительный эффект (увеличение процента формирования бластоцист, процента имплантации и/или процента наступления беременностей) [28, 29, 32–38, 41, 45, 48, 49].

Важным событием преимплантационного развития является переход управления развитием эмбриона от материнского генома (генома ооцита) к геному зародыша. Активация эмбриогенома человека инициируется на 4–8-клеточной стадии (2–3 сут. развития) [55]. Это может быть возможным объяснением благоприятного влияния пониженной концентрации кислорода на эмбриональное развитие, начиная с 3 сут.

Положительное влияние гипоксических условий культивирования, вероятно, связано с активацией гипоксия-индуцибельных факторов (HIFs) [56]. Эффекты HIFs выражаются в активации экспрессии большого количества генов, участвующих в гликолизе, ангиогенезе, пролиферации и эритропоэзе [29, 57, 58].

ЛИТЕРАТУРА:

1. Assisted reproductive technology in Europe, 2012: results generated from European registers by ESHRE. Human Reproduction 2016; 31(8): 1638–52.
2. Leite R.F., Annes K., Ispada J. et al. Oxidative stress alters the profile of transcription factors related to early development on *in vitro* produced embryos. Oxid. Med. Cell. Longev. 2017; 2017: 1502489.
3. Guerin P., Mouatassim S., Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Human Reproduction Update 2001; 7: 175–89.
4. Gupta S., Sekhon L., Agarwal A. The role of oxidative stress and antioxidants in assisted reproduction. Current Women's Health Reviews 2010; 6: 227–38.
5. Martin-Romero F.J., Miguel-Lasobras E.M., Dominguez-Arroyo J.A. et al. Contribution of culture media to oxidative stress and its effect on human oocytes. Reproductive BioMedicine Online 2008; 17: 652–61.
6. Fujitani Y., Kasai K., Ohtani S. et al. Effect of oxygen concentration and free radicals on *in vitro* development of *in vitro*-produced bovine embryos. Journal of Animal Science 1997; 75: 483–9.
7. Karja N.W., Wongsrikeao P., Murakami M. et al. Effects of oxygen tension on the development and quality of porcine *in vitro* fertilized embryos. Theriogenology. 2004; 62: 1585–95. 10.1016/j.theriogenology.2004.03.012.
8. Agarwal A., Said T.M., Bedaiwy M.A. et al. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. Fertility and Sterility 2006; 86: 503–12.
9. Burroughs C.A., Williamson G.L., Golding M.C. et al. Oxidative stress induced changes in epigenetic modifying gene mRNA in pre-implantation *in vitro* bovine embryos. Reproduction, Fertility and Development 2012; 25: 149.
10. Жиряева Е.А., Киясова Е.В., Ризванов А.А. Омиксные технологии в репродуктивной медицине: оценка качества ооцитов и эмбрионов. Гены и клетки. 2018; 13(1): 35–41.
11. Thannickal V.J., Fanburg B.L. Reactive oxygen species in cell signaling. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 2000; 279(6): 1005–28.
12. Johnson M.H., Nasr-Esfahani M.H. Radical solutions and cultural problems: could free radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*? Bioessays 1994; 16: 31–8.
13. Хиггинс К. Расшифровка клинических лабораторных анализов. пер. с англ., Эмануэль В.Л., редактор. 5 изд. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний; 2011.
14. Abe H., Semba H., Takeda N. The roles of hypoxia signaling in the pathogenesis of cardiovascular diseases. J. Atheroscler. Thromb. 2017; 24(9): 884–94.
15. Hu C.J., Wang L.Y., Chodosh L.A. et al. Differential roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α in hypoxic gene regulation. Mol. Cell. Biol. 2003; 23: 9361–74.
16. Thomson J., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998; 282(5391): 1145–7.
17. Ezashi T., Das P., Roberts R. Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. PNAS USA 2005; 102(13): 4783–8.
18. Ying Q.L., Wray J., Nichols J. et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. Nature 2008; 453: 519–23.
19. Yoshida Y., Takahashi K., Okita K. et al. Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell 2009; 5: 237–41.
20. Ramirez M.A., Pericuesta E., Yanez-Mo M. et al. Effect of long-term culture of mouse embryonic stem cells under low oxygen concentration as well as on glycosaminoglycan hyaluronan on cell proliferation and differentiation. Cell Prolif. 2011; 44(1): 75–85.
21. Lee W.H., Chen W., Shao N.Y. et al. Comparison of Non-Coding RNAs in Exosomes and Functional Efficacy of Human Embryonic Stem Cell-versus Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. Stem Cells 2017; 35(10): 2138–49.
22. Shin J.M., Kim J., Kim H.E. et al. Enhancement of differentiation efficiency of hESCs into vascular lineage cells in hypoxia via a paracrine mechanism. Stem Cell Research 2011; 7: 173–85.
23. Tsang K.M., Hyun J.S., Cheng K.T. et al. Embryonic Stem Cell Differentiation to Functional Arterial Endothelial Cells through Sequential Activation of ETv2 and NOTCH1 Signaling by HIF1. Stem Cell Reports 2017; 9(3): 796–806.
24. Fischer B., Bavister B. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. J. Reprod. Fertil. 1993; 99: 673–9.
25. Kovacic B. Culture systems: low-oxygen culture. Methods Molecular Biology 2012; 912: 249–72.
26. Dumoulin J.C., Meijers C.J., Bras M. et al. Effect of oxygen concentration on human *in vitro* fertilization and embryo culture. Human Reproduction 1999; 14: 465–9.
27. Bahceci M., Ciray H., Karagenc L. et al. Effect of oxygen concentration during the incubation of embryos of women undergoing ICSI and embryo transfer: a prospective randomized study. Reproductive BioMedicine Online 2005; 11: 438–43.
28. Petersen A., Mikkelsen A.L., Lindenberg S. The impact of oxygen tension on developmental competence of post-thaw human embryos. Acta Obstetrica Et Gynecologica Scand. 2005; 84: 1181–4.
29. Rinaudo P., Giritharan G., Talbi S. et al. Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos. Fertility and Sterility 2006; 86 Suppl 3: 1252–65.
30. Kea B., Gebhardt J., Watt J. et al. Effect of reduced oxygen concentrations on the outcome of *in vitro* fertilization. Fertility and Sterility 2007; 87: 213–6.
31. Cieslak Janzen J.M., Graff D., Anderson S. et al. Comparison of atmospheric oxygen versus low oxygen on human sibling embryo development. Fertil. Steril. 2008; 90: 431.

На основании рассмотренных работ и, исходя из собственного опыта, для рутинного применения в клинической практике мы можем рекомендовать планшетный мультигазовый инкубатор со следующими концентрациями газов: 6% CO₂, 5% O₂.

Эксперименты, включенные в данный обзор, имеют некоторые недостатки. Основным из них, на наш взгляд, является использование инкубаторов различного типа в каждой из изучаемых групп (отличались объем инкубаторов, система нагрева и поддержания температуры). То есть, сравнивались не только концентрация кислорода, но и условия культивирования. Это могло повлиять на результат анализа [59].

Необходимы дальнейшие исследования с применением инкубаторов одного типа для всех рассматриваемых групп, а также оценка влияния культивирования эмбрионов при пониженной концентрации кислорода на исход беременностей и здоровье рожденных детей.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Благодарности

Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета и субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности (20.5175.2017/6.7).

32. Kovacic B., Vlaisavljevic V. Influence of atmospheric versus reduced oxygen concentration on development of human blastocysts in vitro: a prospective study on sibling oocytes. *Reproductive Biomedicine Online* 2008; 17: 229–36.
33. Waldenstrom U., Engstrom A., Hellberg D. et al. Low-oxygen compared with high-oxygen atmosphere in blastocyst culture, a prospective randomized study. *Fertility and Sterility* 2009; 91: 2461–5.
34. Ciray H., Aksoy T., Yaramanci K. et al. In vitro culture under physiologic oxygen concentration improves blastocyst yield and quality: a prospective randomized survey on sibling oocytes. *Fertility and Sterility* 2009; 91: 1459–61.
35. Meintjes M., Chantilis S., Douglas J. et al. A controlled randomized trial evaluating the effect of lowered incubator oxygen tension on live births in a predominantly blastocyst transfer program. *Human Reproduction* 2009; 24: 300–7.
36. Graham J., Richter K., Siques J. et al. Improved preimplantation development and higher pregnancy rates associated with 6% versus ambient oxygen concentration during in vitro embryo culture. *Hum. Reprod.* 2010; 25: i59.
37. Kovacic B., Sajko M., Vlaisavljevic V. A prospective, randomized trial on the effect of atmospheric versus reduced oxygen concentration on the outcome of intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertility and Sterility* 2010; 94: 511–9.
38. Mitsoli A., Kolibianakis E.M., Loutradi K. et al. Low oxygen embryo culture is associated with improved day 3 embryo quality: a prospective randomized controlled trial. *Hum. Reprod.* 2011; 26: i2.
39. Sobrinho D.G., Oliveira J.B., Petersen C.G. et al. IVF/ICSI outcomes after culture of human embryos at low oxygen tension: a meta-analysis. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2011; 9: 143–54.
40. Bontekoe S., Mantikou E., van Wely M. et al. Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2012; 7. doi:10.1002/14651858.CD008950.pub2.
41. Wale P., Gardner D. Oxygen regulates amino acid turnover and carbohydrate uptake during the preimplantation period of mouse embryo development. *Biology of Reproduction* 2012; 87(1): 1–8.
42. Houghton F., Hawkhead J., Humpherson P. et al. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Human Reproduction* 2002; 17: 999–1005.
43. Gardner D., Wale P., Collins R. et al. Glucose consumption of single post-compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome. *Human Reproduction* 2011; 26: 1981–6.
44. Harlow G.M., Quinn P. Foetal and placenta growth in the mouse after preimplantation development in vitro under oxygen concentrations of 5 and 20%. *Australian journal of biological sciences* 1979; 32: 363–9.
45. Kasterstein E., Strassburger D., Komarovskiy D. et al. The effect of two distinct levels of oxygen concentration on embryo development in a sibling oocyte study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2013; 30: 1073–9.
46. Mantikou E., Bontekoe S., Wely V. et al. Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies. *Human Reproduction Update* 2013; 19(3): 209.
47. Paternot G., Debrock S., D'Hooghe T.M. et al. Can embryo quality be improved by in vitro exposure to low oxygen concentration or by using a mini-incubator? Two randomized controlled trials. *Fertil. Steril.* 2013; 100: 247–8.
48. Guo N., Li Y., Ai J. et al. Two different concentrations of oxygen for culturing precompaction stage embryos on human embryo development competence: a prospective randomized sibling-oocyte study. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2014; 7(9): 6191–8.
49. Peng Z., Shi S., Jin H. et al. Impact of oxygen concentrations on fertilization, cleavage, implantation, and pregnancy rates of in vitro generated human embryos. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 2015; 8(4): 6179–85.
50. Nastri C.O., Nobrega B.N., Teixeira D.M. et al. Low versus atmospheric oxygen tension for embryo culture in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *Fertil. Steril.* 2016; 106(1): 95–104.
51. Yang Y., Xu Y., Ding C. et al. Comparison of 2, 5, and 20% O₂ on the development of post-thaw human embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2016; 33: 919–27.
52. Ali I., Shah S.Z., Jin Y. et al. Reactive oxygen species-mediated unfolded protein response pathways in preimplantation embryos. *Journal of Veterinary Science* 2017; 18(1): 1–9.
53. Garcia-Martinez S., Sanchez-Hurtado M.A., Gutierrez H. et al. Mimicking physiological O₂ tension in the female reproductive tract improves Assisted Reproduction outcomes in pig. *Mol. Hum. Reprod.* 2018. doi: 10.1093/molehr/gay008.
54. Piko L., Taylor K. Amounts of mitochondrial DNA and abundance of some mitochondrial gene transcripts in early mouse embryos. *Developmental Biology* 1987; 123: 354–74.
55. Galan A., Montaner D., Poo M.E. et al. Functional genomics of 5- to 8-cell stage human embryos by blastomere single-cell cDNA analysis. *PLoS One* 2010; 5: e13615.
56. Ma Y.Y., Chen H.W., Chii-Ruey Tzeng C.R. Low oxygen tension increases mitochondrial membrane potential and enhances expression of antioxidant genes and implantation protein of mouse blastocyst cultured in vitro. *J. Ovarian Res.* 2017; 10: 47.
57. Greijer A.E., van der Groep P., Kemming D. et al. Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). *J. Pathol.* 2005; 206(3): 291–304.
58. Maxwell P.H., Pugh C.W., Ratcliffe P.J. The pVHL-hIF-1 system. A key mediator of oxygen homeostasis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2001; 502: 365–76.
59. Fujiwara M., Takahashi K., Izuno M. et al. Effect of micro-environment maintenance on embryo culture after in-vitro fertilization: comparison of top-load mini incubator and conventional front-load incubator. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2007; 24(1): 5–9.

Поступила: 25.12.2017