

Громенко Ю.Ю., Галимова Э.Ф., Громенко Д.Д., Галимов Ш.Н.

Медицинский центр «Семья», г. Уфа

ФГБОУ ВО Башкирский ГМУ Минздрава России, г. Уфа

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ АКТИВАЦИИ ООЦИТОВ

Цель исследования. Проанализировать эффективность использования вспомогательных репродуктивных технологий совместно с активацией ооцитов в случаях отсутствия оплодотворения, образования бластоцист и при тяжелых нарушениях сперматогенеза.

Материалы и методы. В исследование включено 12 супружеских пар с неудачными исходами экстракорпорального оплодотворения. Ооциты получали в стандартных протоколах гиперстимуляции яичников и активировали путем культивирования с кальциевым ионофором A23187 (иономицином). Оплодотворение проводилось с помощью интрацитоплазматической инъекции сперматозоида.

Результаты. У всех женщин, включенных в исследование, было получено оплодотворение, на пятые сутки после интрацитоплазматической инъекции сперматозоида выполнен перенос эмбриона и констатировано развитие клинической беременности.

Заключение. Использование вспомогательных репродуктивных технологий совместно с химической активацией ооцитов позволяет повысить вероятность зачатия у пациенток, чьи партнеры имеют низкое количество жизнеспособной спермы, нарушения сперматогенеза или очень низкую вероятность достижения оплодотворения *in vitro*.

Ключевые слова: бесплодие, ооциты, интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида, фосфолипаза C дзета, Ca^{2+} -ионофор.

Введение. Бесплодие представляет собой сложное многофакторное состояние, затрагивающее как мужчин, так и женщин, которое определяется как неспособность к зачатию в течение одного года; в мире более 186 миллионов человек страдают от этого недуга [9]. Неоднородность бесплодия, обусловленная как мужскими, так и женскими факторами, предопределяет широкое использование вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), облегчая тем самым лечение пациентов. В настоящее время ЭКО/ИКСИ (экстракорпоральное оплодотворение/интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида) является наиболее эффективной процедурой среди всех вспомогательных репродуктивных методов. Вместе с тем, по данным последнего Кокрейновского обзора совокупный коэффициент рождаемости при использовании традиционной стратегии ЭКО/ИКСИ составляет в среднем 58%, а полный или практически полный сбой оплодотворения по-прежнему происходит в 1-5% циклов ИКСИ [11].

Подобное явление может наблюдаться неоднократно у отдельных супружеских пар. В большинстве случаев отсутствие оплодотворения после ИКСИ происходит из-за торможения активации ооцита (АО) [3]. Причинами этого могут быть недостаточное количество зрелых или морфологически нормальных ооцитов, отсутствие подвижных сперматозоидов и тяжелые формы тератозооспермии (глобозооспермия). Научные и клинические данные в настоящее время связывают глобозооспермию и дефицит активации ооцитов с аномальной экспрессией, локализацией и структурой фосфолипазы C дзета (PLC ζ), специфичным для спермы белком, природным индуктором осцилляций ионов кальция, ответственным за АО по-

сле оплодотворения. В таких случаях может помочь искусственная электрическая или химическая активация ооцитов с использованием Ca^{2+} -ионофора A23187 (иономицина) [5]. В частности, было установлено, что ионофор кальция значительно повышает вероятность оплодотворения и наступления беременности у женщин с низкими показателями в предыдущих циклах ЭКО/ИКСИ.

Цель. Проанализировать эффективность использования вспомогательных репродуктивных технологий совместно с активацией ооцитов в случаях отсутствия оплодотворения, образования бластоцист и при тяжелых нарушениях сперматогенеза.

Материалы и методы исследования. Была сформирована группа пациентов, проходивших лечение в медицинском центре «Семья», г. Уфа. Для получения ооцитов выполнялись стандартные контролируемые протоколы гиперстимуляции яичников [10]. Использовались инкубаторы MCO-5M mini Sanyo/Panasonic с постоянным составом газовой среды 5% CO $_2$, среда культивирования Sage medium, дополненная 10% синтетической белковой добавкой под маслом.

Все извлеченные ооциты оценивались на зрелость, интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида выполнялась через 2-4 часа после извлечения яйцеклетки. Через 40 мин после осуществления ИКСИ производилась активация кальциевым ионофором A23187 (Sigma-Aldrich, Germany) в конечной концентрации 10 мкмоль/л в течение 7 минут. Эмбрионы первоначально оценивались в течение 14-18 часов после инсеминации. Все эмбрионы с нормальным оплодотворением (2 пронуклеуса, PN) и неудачным оплодотворением (0 PN) были культивированы дополнительно 48 часов.

Gromenko Yu. Yu., Galimova E. F., Gromenko D. D., Galimov Sh. N.

MOLECULAR ASPECTS OF ACTIVATION OF OOCYTES

Aim. To analyze the effectiveness of using assisted reproductive technologies together with the activation of oocytes in cases of lack of fertilization, of the formation of blastocysts and in severe violations of spermatogenesis.

Materials and methods. The study included 12 couples with unsuccessful in vitro fertilization outcomes. Oocytes were obtained in standard ovarian hyperstimulation protocols and activated by cultivation with calcium ionophore A23187 (ionomycin). Fertilization was performed using intracytoplasmic sperm injection.

Results. In all women included in the study, fertilization was obtained; on the fifth day after intracytoplasmic sperm injection, embryo transfer was performed and clinical pregnancy was observed.

Conclusions. The use of assisted reproductive technologies in conjunction with the chemical activation of oocytes can increase the possibility of conception in patients whose partners have a low amount of viable sperm, impaired spermatogenesis, or a very low probability of in vitro fertilization.

Keywords: infertility, oocytes, intracytoplasmic sperm injection, phospholipase C zeta, Ca^{2+} ionophore.

На 3-й день, через 72 часа после извлечения яйцеклетки, эмбрионы оценивались на развитие и качество дробления. Через 120 часов после извлечения яйцеклетки, или на 5-й день, все эмбрионы оценивались на развитие бластоцисты и качество с использованием системы Гарднера и Скулкафта [1].

Все обследованные лица оформили информированное согласие на участие в исследовании. Работа одобрена локальным этическим комитетом Башкирского государственного медицинского университета.

Результаты и обсуждение. В клинике медицинского центра «Семья» имеется опыт применения кальциевого ионофора A23187 после неудовлетворительных результатов процедур ЭКО/ИКСИ. Приводим примеры клинических наблюдений.

1 случай. Пациентка 35 лет, первичное бесплодие, Пациент 35 лет, олигозооспермия. Была неудачная попытка ИКСИ. В ходе второй попытки было получено 10 ооцитов: 9 ооцитов на стадии метафазы 2 (MII), 1 на стадии GV. Клетки подверглись химической активации, после которой было получено 6 зигот на стадии 2PN, 3 зиготы на стадии OPN. Произвели перенос 2 эмбрионов на стадии ранних бластоцист (eBL). По данным УЗИ подтвердилось наличие беременности.

2 случай. Пациентка 39 лет, Пациент 41 год. 6 попыток ЭКО, заканчивающихся неудачно из-за плохого дробления эмбрионов. При 7-й попытке была получена 2 клетки, которые в последующем культивировали в среде с добавлением Ca^{2+} -ионофора. Был осуществлен перенос морулы. По данным УЗИ подтвердилось наличие беременности.

Вопросы исследования биохимического профиля и патогенеза активации яйцеклетки при ее оплодотворении остаются в фокусе внимания специалистов в области эмбриологии. Важным элементом молекулярного механизма активации ооцита служит изменение концентрации внутриклеточного свободного кальция Ca^{2+} , запускающего сложный каскад сигналов, регулирующих функции яйцеклетки вплоть до транскрипции генов. Обе гаметы, сперма и яйцеклетка, играют ключевую роль в процессе активации ооцитов, которая необходима для успешного оплодотворения.

В процессе взаимодействия гамет сперматозоид активирует яйцеклетку, остановившуюся в своем развитии на стадии MII, посредством серии морфологических (прохождение кумулюса и зоны пеллюцида) и биохимических изменений (взаимодействия с рецептором на поверхности ооцита с последующей активацией инозитолтрифосфатной системы, внедрения фосфолипазы Cz сперматозоидов) [6].

После слияния клеток пусковым фактором является увеличение внутриклеточного кальция, выделяемого из внутренних депо, которое инициируется рецепторно-опосредованным взаимодействием между сперматозоидом и плазматической мембраной ооцитов. «Первой волной» ионов Ca^{2+} недостаточно для полной активации ооцитов, и через 30 минут за ней следует «вторая волна» кальция. Достижение необходимого порога содержания кальция в свою очередь ведет к каскаду реакций, благодаря которым происходит дальнейшее развитие яйцеклетки и сперматозоида: удаление второго полярного тела, рост до стадии 2PN; синтез ДНК и последующее деление бластомеров. Кальций непосредственно не участвует в реакциях, однако в ходе нескольких часов после оплодотворения является одним из инициаторов митотического деления клеток, а также участвует в регуляции данных процессов [7]. Недостаточное количество кальция ведет к остановке развития эмбриона. Ионы кальция необходимы также и для активации самих сперматозоидов [2].

Фосфолипаза Cz сперматозоидов, запускающая процесс высвобождения ионизированного Ca^{2+} в оолеме, практически отсутствует у бесплодных пациентов. Доказано, что в нормальных сперматозоидах белок PLCz концентрируется в экваториальной области головки. Этот фермент гидролизует связанный с мембраной липид фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат на два продукта: диацилглицерол, инициирующий сигнальный путь через протеинкиназу C и инозитолтрифосфат, которые обеспечивают необходимый уровень колебаний концентрации ионов кальция для АО.

Исходя из представленных сведений, преодоление дефицита спермальной фосфолипазы Cz является од-

ним из актуальных специализированных методов ВРТ, получивших распространение в последнее десятилетие [4]. Единственным доступным методом лечения дефектов активации ооцита в настоящее время является использование искусственных активаторов, т. е. кальциевых ионофоров. Однако такие агенты могут потенциально оказывать побочное эпигенетическое воздействие на ооциты и эмбрионы. Это связано с тем, что ионофоры вызывают однофазный выброс Ca^{2+} вместо серии собственных осцилляций в случае PLCz [8]. Последнее обстоятельство предопределяет необходимость продолжения исследований в этой области, в частности, по поиску переносчиков кальция – миметиков фосфолипазы Cz или, что более сложно, по разработке и созданию человеческого рекомбинантного белка PLCz (hrPLCz).

Выводы. Большинство неудач оплодотворения после ЭКО/ИКСИ проявляется в виде отсутствия активации яйцеклеток. Искусственная активация ооцитов может быть вызвана электрической стимуляцией или различными химическими веществами. Эффективность кальциевого ионофора A23187 была продемонстрирована в настоящем исследовании на парах, имевших низкие показатели оплодотворения в предыдущих циклах ИКСИ.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Громенко Ю. Ю., Исхаков И. Р. Влияние факторов оценки качества перенесенных эмбрионов на прогнозирование частоты наступления беременности в программах экстракорпорального оплодотворения // Медицинский вестник Башкортостана. 2012. Т. 7, № 2. С. 27-30.
2. Павлов В. Н., Галимова Э. Ф., Тергулов Б. Ф., Кайбышев В. Т. и др. Молекулярные и метаболические аспекты мужского бесплодия // Вестник урологии. 2016. № 2. С. 40-59.
3. Amdani S., Yeste M., Jones C., Coward K. Phospholipase C zeta (PLCz) and male infertility: Clinical update and topical developments // Adv. Biol. Regul. 2016. Vol. 61. P. 58-67.
4. Anifandis G., Michopoulos A., Daponte A., Chatzimeletiou K. et al. Artificial oocyte activation: physiological, pathophysiological and ethical aspects // Syst. Biol. Reprod. Med. 2019. Vol. 65, № 1. P. 3-11.
5. Darwish E., Magdi Y. A preliminary report of successful cleavage after calcium ionophore activation at ICSI in cases with previous arrest at the pronuclear stage // Reproductive BioMedicine Online. 2016. Vol. 31, № 6. P. 799-804.
6. Nazarian H., Azad N., Nazari L., Piryaee A. et al. Effect of Artificial Oocyte Activation on Intra-Cytoplasmic Sperm Injection Outcomes in Patients with Lower Percentage of Sperm Containing Phospholipase C ζ : A Randomized Clinical Trial // J. Reprod. Infertil. 2019. Vol. 20, № 1. P. 3-9.
7. Prochazka R., Nemcova L. Mechanisms of FSH- and Amphiregulin-Induced MAP Kinase 3/1 Activation in Pig Cumulus-Oocyte Complexes During Maturation In Vitro // Int. J. Mol. Sci. 2019. Vol. 20, № 5. P. 1179.
8. Santella L., Dale B. Assisted yes, but where do we draw the line? // Reprod. Biomed. Online. 2015. Vol. 31. P. 476e478.
9. Vander Borgh M., Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology // Clin. Biochem. 2018. Vol. 62. P. 2-10.
10. Whitney J., Balloch K., Anderson R., Nugent N. et al. Day 7 blastocyst euploidy supports routine implementation for cycles using preimplantation genetic testing // JBRA Assist. Reprod. 2019. Vol. 23, № 1. P. 45-50.
11. Wong K., van Wely M., Mol F., Repping S. et al. Fresh versus frozen embryo transfers in assisted reproduction // Cochrane Database of Systematic Reviews. 2017. Issue 3. Art. No.: CD011184.

Контактная информация

Галимов Шамиль Нариманович, e-mail: sngalim@mail.ru.

Сведения об авторах

Громенко Юлия Юрьевна, к. м. н., главный врач Медицинского центра «Семья», г. Уфа.

Галимова Эльмира Фанисовна, д. м. н., ведущий научный сотрудник ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, г. Уфа.

Громенко Дарья Дмитриевна, студент ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, г. Уфа.

Галимов Шамиль Нариманович, д. м. н., профессор, зав. кафедрой биохимии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, г. Уфа.