

УДК 591.3.39:577.17.049:578.6.68

ГИПОКСИЯ В УСЛОВИЯХ ДОИМПЛАНТАЦИОННОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА МЛЕКОПИТАЮЩИХ: ЭКСТРЕМАЛЬНАЯ СИТУАЦИЯ ИЛИ НОРМА

© 2016 г. А. Г. Погорелов*, А. А. Смирнов, В. Н. Погорелова

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

E-mail: agpogorelov@rambler.ru

Поступила в редакцию 20.03.2015 г.

Окончательный вариант получен 04.05.2015 г.

В работе анализируются результаты исследований по культивированию раннего эмбриона млекопитающих в среде, содержащей низкую концентрацию кислорода. Систематизирован материал по методам экспериментального моделирования гипоксии для доимплантационного развития *in vitro*. Для самок различных видов млекопитающих приведены данные измерения содержания кислорода в половых путях, в которых показано наличие гипоксических условий. Сравнительная оценка качества ранних эмбрионов, культивируемых *in vitro*, свидетельствует об их более успешном развитии в условиях с низким уровнем кислорода.

Ключевые слова: доимплантационный эмбриогенез, гипоксия, эмбрион млекопитающих.

DOI: 10.7868/S0475145016020087

Возможность функционирования клетки в гипоксических условиях предполагает ее переход в иное состояние, которое характеризуется, например, активизацией анаэробного гликолиза (Kubler, Spieckermann, 1970; Reimer et al., 1983), модификацией окислительного фосфорилирования (Tomitaka et al., 2010) или активацией специфичных механизмов трансмембранного транспорта ионов (Погорелов и др., 2002, 2004). Для такой трансформации есть основания, если учесть, что жизнь появилась и длительное время развивалась в среде с низким содержанием кислорода. В начальный период эволюции возникли и генетически закрепились механизмы адаптации клетки к гипоксии.

В какой степени эволюционно обусловленные системы компенсации гипоксии реализуются в течение раннего эмбриогенеза млекопитающих является одним из интригующих вопросов эмбриологии. У соматической клетки адаптивная реакция на продолжающуюся гипоксию по длительности ограничена интоксикацией клетки продуктами анаэробного гликолиза и/или нарастающей деэнергизацией (Погорелов и др., 2006, 2010). Отметим, что в ткани низкий уровень кислорода обусловлен, как правило, патологическим состоянием или экстремальными обстоятельствами.

Природным фоном предимплантационного развития млекопитающих наоборот служат гипоксические условия. Морфологическая автономность раннего эмбриона, который, развиваясь в оболочке (*zona pellucida*), непрерывно перемеща-

ется вдоль слизистой просвета яйцевода, препятствует эффективному обмену веществ между зародышем и кровотоком материнского организма. Ситуацию также усугубляет относительно низкое содержание кислорода в полости яйцевода (Chason et al., 2011) и, тем не менее, такие условия являются естественной средой для раннего эмбриогенеза.

Следует ли моделировать гипоксию как свойство инкубационной среды в эмбриональных технологиях и в экспериментах *in vitro* с эмбрионами млекопитающих? Данному аспекту посвящен настоящий обзор литературы. Наиболее актуальными с практической точки зрения представляются такие направления как: сохранение исчезающих/исчезнувших видов млекопитающих, повышение продуктивности воспроизводства сельскохозяйственных животных, повышение эффективности вспомогательных репродуктивных технологий. Для решения обозначенных проблем одной из первоочередных задач было изучение в просвете яйцевода и полости матки физико-химических параметров: pH, температуры, состава и парциального давления газов, электролитов или субстратов для биоэнергетики (Leese, 1995). В данном контексте значительный интерес вызывает исследование в репродуктивном тракте самки содержания кислорода, как одного из ключевых факторов окислительного фосфорилирования и производства активных форм кислорода (Gilbert, Colton, 1999; Harvey et al., 2002; Sturme, Leese, 2003; Takahashi, 2012).

ОБЕСПЕЧЕНИЕ ЭНЕРГИЕЙ РАННЕГО ЭМБРИОНА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

В среде культивирования, как правило, поддерживается высокое содержание глюкозы (~5 мМ) и кислорода. Такие условия обеспечивают достаточный уровень окислительного фосфорилирования, а вклад гликолиза составляет около 10% от общего производства АТФ (Machaty et al., 2001; Sturmeу, Leese, 2003). Однако интактная среда раннего эмбриогенеза качественно отличается от физиологического раствора, используемого для культивирования дифференцированной клетки (Khandoker 1997; Nichol et al., 1998). Известно, что в просвете яйцевода концентрация кислорода ниже, чем регистрируется при нормоксии (Fischer, Bavister, 1993; Leese, 1995). В таких условиях отсутствие у раннего эмбриона млекопитающих механизма депонирования кислорода с помощью гемоглобина или миоглобина создает гипоксию, на фоне которой протекает предимплантационное развитие.

Косвенно наличие анаэробных условий *in vivo* подтверждается высоким уровнем потребления глюкозы (Pantaleon, Кауе, 1998), активностью гликолитических ферментов (Houghton et al., 1996) и выходом лактата из эмбриональной клетки (Bavister, 1995; Swain et al., 2002). С этими наблюдениями согласуются данные экспериментов, в которых снижение содержания кислорода в среде инкубации до уровня, регистрируемого в яйцеводе, действовало благоприятно на развитие эмбриона *in vitro* (Dumoulin et al., 1999; Gao et al., 2003). Показано, что количество эмбрионов, достигших стадии бластоцисты, увеличивалось, если в среде инкубации концентрация кислорода составляла 5–7% (Hooper et al., 2001).

При культивировании в условия нормоксии в эмбриональной клетке образуются активные формы кислорода (АФК): перекись водорода, гидроксил, супероксид (Guerin et al., 2001). Присутствие АФК модифицирует развитие раннего эмбриона (Harvey et al., 2002). Например, изменение концентрации АФК активирует гены протеинкиназы (Burdon, 1996), а также тирозинкиназы и фактора роста (Nose, 2000). Компенсация токсического действия АФК обусловлена рядом причин, которые способны ослаблять или нейтрализовать окислительный стресс (Burdon, 1996; Gilbert, Colton, 1999). От уровня гипоксии, например, зависит активность гликолиза, который регулируется через HIF-1 фактор (Harvey et al., 2002). Другим примером регуляции функции клетки раннего эмбриона посредством АФК является контроль клеточного цикла через ядерный транскрипционный фактор карраВ NFκВ (Harvey et al., 2002). Отметим то, что данные по влиянию АФК на качество развития ранних эмбрионов противоречивы (Guerin et al., 2001; Orsi, Leese, 2001).

Предполагается, что контроль состояния эмбриональной клетки при гипоксии осуществляется через транскрипционный фактор (HIF-1), который при нормоксии не устойчив и быстро деградирует. Известно, что HIF-1 инициирует экспрессию нескольких генов, формирующих механизмы адаптации клетки к гипоксии (Semenza, 2000; Wenger, 2000). Мишенью действия HIF-1 могут быть разные уровни организации: экспрессия мРНК, транскрипция ДНК, стабильность белка. В связи с этой проблемой изучается природа сенсора, который реагирует на изменение концентрации кислорода в клетке (Semenza, 1999; Wenger, Gassman, 1999; Jaakola et al., 2001).

Детальное изучение потребления кислорода и синтеза АТФ было проведено *in vitro* для эмбрионов свиньи (Sturmeу, Leese, 2003). В данном исследовании показано, что низкая скорость потребления кислорода сохраняется вплоть до стадии морулы. Уровень потребления кислорода эмбрионом не превышает величины, которая характеризует ткани с относительно низким метаболизмом, например, костная (Newsholme, Leech, 1989). Значимое увеличение регистрируется только для ранней бластоцисты, что свидетельствует об увеличении окислительного фосфорилирования на этой стадии эмбриогенеза. Возможно, увеличение потребления кислорода обусловлено усилением активного транспорта, специализированные белки которого синтезируются *de novo* (Macphee et al., 1994). При этом на обеспечение активизации Na⁺/K⁺-АТФазы и/или Na⁺-насоса уходит почти 50% O₂ (Donnay, Leese, 1999), что составляет большую часть приращения потребления кислорода.

В современных технологиях, например “Go system”, гипоксические условия реализуются при культивировании зиготы в стеклянном капилляре (Thouas et al., 2003). Даже при низких концентрациях кислорода методами математического моделирования предсказывается возможность поддержания окислительного фосфорилирования для эмбрионов малых размеров, например, мышцы (Byatt-Smith et al., 1991). Однако у более крупных зародышей возникает значительный градиент O₂, что может провоцировать аноксию во внутренней части (Hewitson, Leese, 1993).

Завершая обсуждение раздела, следует отметить, что клетка раннего эмбриона и соматическая клетка млекопитающих отличаются по обеспечению энергией. Например, в эмбриональной клетке редуцировано окислительное фосфорилирование – наиболее эффективный способ синтеза АТФ. Далее, отсутствует в полном объеме комплекс ферментов, обеспечивающий гликолиз и транспорт пирувата к митохондриям.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ГИПОКСИИ ДЛЯ РАЗВИТИЯ РАННИХ ЭМБРИОНОВ *IN VITRO*

Исследования, направленные на измерение концентрации кислорода в половых путях самки млекопитающего, выполняли с использованием электрода Кларка (Mastroianni, Jones, 1965). Для ряда видов показан градиент концентрации кислорода, который уменьшается по направлению к матке (Fischer, Bavister, 1993). Эксперименты проводили на различных видах млекопитающих с учетом наличия или отсутствия у самки овуляции, беременности, а также псевдобеременности (Fischer, Bavister, 1993; Kaufman, Mitchell, 1994).

Показано, что содержание кислорода в репродуктивном тракте соответствует условиям гипоксии и составляет 40% или даже ниже уровня, который регистрируют в водном растворе при атмосферном давлении (Mitchell, Yochim, 1968; Maas et al., 1976; Chason et al., 2011). Таким образом, доимплантационные эмбрионы исследуемых видов млекопитающих развиваются *in vivo* в условиях гипоксии.

Отметим, что сравнение уровня кислорода *in vitro*, получаемого разными авторами, затруднено рядом причин. Среди них различие протоколов проведения эксперимента. Например, концентрация кислорода при культивировании эмбриона меняется посредством модификации газовой смеси над поверхностью среды инкубации. В этом случае предполагается относительно быстрое установление равновесия между газовой и жидкой фазой. Также для создания гипоксии используют продувание физиологического раствора инертным газом. Полярографические измерения показали, что при этом содержание кислорода в водном растворе не опускается ниже 18% от исходного уровня (Dart, Standen, 1995; Tanonaka et al., 1996).

Экспериментально показано, что одним из значимых факторов, обуславливающих качество доимплантационного развития *in vitro*, является процентное содержание кислорода в среде культивирования (Auerbach, Brinster, 1968; Bain et al., 2011). Данные работы были направлены на моделирование глубокой гипоксии при культивировании *in vitro*. В качестве объекта исследования использовали ранние эмбрионы различных видов млекопитающих. Критерием оценки обязательно служил процент развития эмбрионов до стадии бластоцисты, а также его морфология, которую изучали посредством световой микроскопии.

Во многих исследованиях обнаружено положительное действие гипоксии на развитие раннего эмбриона. Сравнительный анализ развития эмбрионов мыши (Itoi et al., 2012), крысы (Porova, 2011), коровы (Wright et al., 1976; Bain et al., 2011), яка (Xiong et al., 2013) и человека (Kaster-

stein et al., 2013; Kirkegaard et al., 2013) показал, что при 5% кислорода в газовой смеси процент развившихся бластоцист выше, чем при 20%. Напротив, при аналогичных условиях не установлено различий в развитии эмбрионов собаки (Rodrigues et al., 2013) и мыши (Porova, 2011). В другой работе при объемной концентрации кислорода в газовой фазе в пределах от 1 до 1.7% регистрируется наибольший процент развития эмбрионов мыши до стадии бластоцисты, значительное снижение развития при 0.5% и отсутствие развития в среде без кислорода (Auerbach, Brinster, 1968). Другими словами, подтверждается факт того, что более благоприятные условия развития эмбрионов млекопитающих *in vitro* соответствуют состоянию гипоксии.

Критерием качества развития служит процент эмбрионов, достигших стадии бластоцисты, что оценивали исходя из морфологических признаков (Porova et al., 2011; Rodrigues et al., 2013). Для ряда видов млекопитающих, по-видимому, достаточно световой микроскопии, чтобы показать травматичность нормоксии на развитие ранних эмбрионов. Однако для обнаружения более тонких эффектов необходимо использовать дополнительные критерии оценки. Действительно, в некоторых работах наряду с морфологическими критериями применяли такие методы, как подсчет количества клеток на стадии бластоцисты и определение процента особей, родившихся после трансплантации эмбрионов псевдобеременным самкам-реципиентам (Itoi et al., 2012). В данной работе также анализировали уровень экспрессии генов *Oct3/4* и *Cdx2*, участвующих в дифференцировке трофобласта. По данным критериям в условиях 5% кислорода качество бластоцист оказалось выше, как и процент полученного потомства.

Показано, что относительно высокий процент образования бластоцист яка в условиях 5% кислорода, по сравнению с развитием при 20%, соответствует увеличению количества клеток в бластоцисте (Xiong et al., 2013). В цитируемой работе приводятся данные о том, что 5% гипоксии способствуют снижению частоты апоптоза, повышению толерантности эмбрионов к криоконсервированию, более высокой скорости развития. Кроме того, культивирование в условиях 20% кислорода повышает экспрессию генов *GPX-1*, *SOD-1*, *KAT* и *GSS*, связанных с окислительным стрессом. Сходные результаты получены на эмбрионах человека (Kasterstein et al., 2013; Kirkegaard et al., 2013; Santos et al., 2013; Guo et al., 2014). Таким образом, гипоксия является природным фоном раннего эмбриогенеза млекопитающих и фактором, который *in vitro* улучшает качество развития эмбриона.

Завершая обсуждение, отметим, что функционирование в условиях гипоксии характерно для эволюционно относительно примитивных анаэробных форм жизни. Прежде всего, это относит-

ся к прокариотам (бактерии, синезеленые водоросли) и частично к археям. Среди низших эукариот жизнедеятельность в условиях гипоксии характерна для некоторых групп простейших, грибов, растений, большинства гельминтов. Для высших эукариот условия гипоксии представляются явлением исключительным и выражены не на уровне организма, а на уровне отдельных клеток или тканей. Например, в норме гипоксия развивается в мышцах при физических нагрузках (Kleber, 1984). В данном контексте, доимплантационный эмбрион млекопитающего представляет собой пример функционирования высокоорганизованной формы жизни в условиях гипоксии.

Работа поддержана грантом РФФИ 14-08-00295.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Погорелов А.Г., Погорелова В.Н., Дубровкин М.И., Хренова Е.В., Демин И.П. // *Биофизика*. 2002. Т. 47. № 2. С. 744–752.
- Погорелов А.Г., Погорелова В.Н., Хренова Е.В., Дубровкин М.И., Демин И.А. // *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2004. Т. 40. № 4. С. 353–358.
- Погорелов А.Г., Русаков А.В., Погорелова В.Н. // *Биофизика*. 2006. Т. 51. № 5. С. 852–858.
- Погорелов А.Г., Погорелова В.Н., Погорелова М.А. // *Биофизика*. 2010. Т. 55. № 5. С. 875–879.
- Auerbach S., Brinster R.L. // *Nature*. 1968. V. 217. P. 465–466.
- Bain N.T., Madan P., Betts D.H. // *Reproduction, Fertility and Development*. 2011. V. 23. P. 561–575.
- Bavister B.D. // *Human Reproduction Update*. 1995. V. 1. P. 91–148.
- Burdon R.H. // *Biochemical Society Transactions*. 1996. V. 24. P. 1028–1032.
- Byatt-Smith J.G., Leese H.J., Gosden R.G. // *Human Reproduction*. 1991. V. 6. P. 52–57.
- Chason R.J., Csokmay J., Segars J.H., De Cherney A.H., Armand D.R. // *Trends Endocrinol. Metab.* 2011. V. 22. № 10. P. 412–420.
- Dart C., Standen N.B. // *J. Physiol.* 1995. V. 483. P. 29–39.
- Donnay I., Leese H.J. // *Molecular Reproduction and Development*. 1999. V. 53. P. 171–178.
- Dumoulin J.C.M., Meijers C.J., Bras M., Coonen E., Geraedts J.P., Evers J.L. // *Human Reproduction*. 1999. V. 14. P. 465–469.
- Fischer B.L., Bavister B.D. // *J. Reprod. Fertil.* 1993. V. 99. № 2. P. 673–679.
- Gao S., McGarry M., Priddle H., Ferrier T., Gasparrini B., Fletcher J., Harkness L., De Sousa P., McWhir J., Wilmut I. // *Develop.* 2003. V. 66. P. 126–133.
- Gilbert D.L., Colton C.A., *An Interdisciplinary Approach* (Eds. D.L. Gilbert, C.A. Colton). Kluwer Academic–Plenum Publishers, N.Y. 1999. P. 679–695.
- Guerin P., Mouatassim S., Menezo Y. // *Human Reproduction Update*. 2001. V. 7. P. 175–189.
- Guo N., Li Yu., Ai J., Gu L., Chen W., Liu Q. // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2014. V. 7. № 9. P. 6191–6198.
- Harvey A.J., Karen L., Thompson K., Thompson J.G. // *Reproduction*. 2002. V. 123. P. 479–486.
- Hewitson L.C., Leese H.J. // *J. Exp. Zoology*. 1993. V. 267. P. 337–343.
- Hooper K., Lane M., Gardner D.K. // *Theriogenology*. 2001. V. 55. P. 334.
- Houghton F.D., Thompson J.G., Kennedy C.J., Leese H.J. // *Mol. Reprod. Dev.* 1996. V. 44. P. 476–485.
- Itoi F., Tokoro M., Terashita Yu., Yamagata K., Fukunaga N., Asada Yo., Wakayama T. // *PLoS*. 2012. V. 7. № 10. e47512.
- Jaakola P., Mole D.R., Tian Y.M. // *Science*. 2001. V. 292. P. 468–472.
- Kasterstein E., Strassburger D., Komarovsky D., Bern O., Komsky A., Raziell A., Friedler S., Ron-El R. // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2013. V. 30. P. 1073–1079.
- Kaufman D.L., Mitchell J.A. // *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol.* 1994. V. 107. № 4. P. 673–678.
- Khandoker M., Tsujii H., Karasawa D. // *Asian-Australian Journal of Animal Science*. 1997. V. 10. P. 523–527.
- Kirkegaard K., Hindkjaer J.J., Ingerslev H.J. // *Fertil. Steril.* 2013. V. 99. № 3. P. 738–744.
- Kleber A.G. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1984. V. 16. P. 389–394.
- Kubler W., Spieckermann P.G. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1970. V. 1. P. 351–377.
- Leese H.J. // *Human Reproduction Update*. 1995. V. 1. P. 63–72.
- Maas D.H., Storey B.T., Mastroianni L.Jr. // *Fertil. Steril.* 1976. V. 27. № 11. P. 1312–1317.
- Machaty Z., Thompson J.G., Abeydeera L.R., Day B.N., Prather R.S. // *Molecular Reproduction and Development*. 2001. V. 58. P. 39–44.
- Macphee D.J., Barr K.J., De Sousa P.A., Todd S.D., Kidder G.M. // *Developmental Biology*. 1994. V. 162. P. 259–266.
- Mastroianni L.Jr., Jones R. // *J. Reprod. Fertil.* 1965. V. 9. P. 99–102.
- Mitchell J.A., Yochim J.M. // *Endocrinology*. 1968. V. 83. № 4. P. 701–705.
- Newsholme E.A., Leech A.R. In: *Biochemistry for the Medical Sciences*. John Wiley and Sons, Chichester. 1989. P. 93–166.
- Nichol R., Hunter R.H., Gardner D.K., Partridge R., Leese H.J., Cooke G.M. // *Research in Veterinary Science*. 1998. V. 65. P. 263–264.
- Nose K. // *Biological Pharmacology Bulletin*. 2000. V. 23. P. 897–903.
- Orsi N., Leese H.J. // *Molecular Reproduction and Development*. 2001. V. 59. P. 44–53.
- Pantaleon M., Kaye P.L. // *Reviews of Reproduction*. 1998. V. 3. P. 77–81.
- Popova E., Bader M., Krivokharchenko A. // *Genes*. 2011. V. 2. P. 332–344.
- Reimer K.A., Jennings R.B., Tatum A.H. // *Am. J. Cardiol.* 1983. V. 52. P. 72A–81A.
- Rodrigues B.A., Rodrigues C.A., Salviano M.B., Willhelm B.R., Collares F.G.F., Rodrigues J.L. // *Theriogenology*. 2013. V. 79. P. 1224–1228.

- Santos de los M.J., Gamiz P., Albert C., Galan A., Vitoria T., Perez S., Romero J.L., Remohi J.* // Fertil. Steril. 2013. V. 100. № 2. P. 402–407.
- Semenza G.L.* // Cell and Developmental Biology. 1999. V. 15. P. 551–578.
- Semenza G.L.* // J. Appl. Physiol. 2000. V. 88. P. 1474–1480.
- Sturmei R.G., Leese H.J.* // Reproduction. 2003. V. 126. P. 197–204.
- Swain J.E., Bormann C.L., Clark S.G., Walters E.M., Wheeler M.B., Krisher R.L.* // Reproduction. 2002. V. 123. P. 253–260.
- Takahashi M.* // J. Reprod. Develop. 2012. V. 58. P. 1–9.
- Tanonaka K., Niwa T., Takeo S.* // Jpn. Heart J. 1996. V. 37. P. 105–117.
- Thouas G.A., Jones G.M., Trounson A.O.* // Reproduction. 2003. V. 126. P. 161–169.
- Tomitsuka E., Kita K., Esumi H.* // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2010. V. 1201. P. 44–49.
- Wenger R.H.* // J. Exp. Biology. 2000. V. 203. P. 1253–1263.
- Wenger R.H., Gassman M.* // In: Environmental Stress and Gene Regulation (Ed. Storey K.B.). BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford. 1999. P. 25–45.
- Wright R.W., Anderson G.B., Cupps P.T., Drost M.* // Biol. Reprod. 1976. V. 14. P. 157–162.
- Xiong X., Li J., Wang L., Zhong J., Zi X., Wang Y.* // Reprod. Dom. Anim. 2013. V. 49. P. 126–133.

Hypoxia during Mamalian Preimplantation Development: Extreme Circumstance vs. Typical Environment

A. G. Pogorelov, A. A. Smirnov, and V. N. Pogorelova

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS, Russian Federation,
142290, Moscow province, Pushchino, Institutskaya 3*

e-mail: agpogorelov@rambler.ru

Received March 20, 2015; in final form, May 4, 2015

The given paper summarizes the data on the early mammalian embryo development in culture media containing low oxygen concentration. Experimental results on *in vitro* modeling the hypoxia for preimplantation development are reviewed. Hypoxic conditions were shown to be available in the female reproductive tract of different mammalian species. The estimation of the embryo developing *in vitro* exhibits that lower oxygen level in culture media improves embryonic quality.

Keywords: preimplantation development, hypoxia, mammalian embryo