

Шестакова М.А.¹, Киселёва М.В.², Проскурнина Е.В.³

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В Фолликуле и ЕГО ВЛИЯНИЕ НА ИСХОД ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ: СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ

¹ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1;

²Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба, филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр», Минздрава России, 249036, г. Обнинск, ул. Королева, д. 4;

³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», факультет фундаментальной медицины, 119991, г. Москва, Ломоносовский проспект, 27-1

Для корреспонденции: Проскурнина Елена Васильевна, канд. хим. наук, доц. каф. медицинской биофизики факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», e-mail: proskurnina@gmail.com

Свободнорадикальные реакции являются неотъемлемым звеном гомеостаза любой системы, в том числе репродуктивной. Дисбаланс систем, продуцирующих свободные радикалы, и антиоксидантов приводит к патологическим последствиям, известным как окислительный стресс. В последние годы активно проводятся успешные исследования, в которых предпринимаются попытки выявить влияние локального окислительного стресса в фолликуле на качество эмбриона и исход экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Несмотря на недостаточность данных и трудности их сопоставления, доказано, что свободные радикалы и состояние антиоксидантной системы фолликулярной жидкости оказывают значительное влияние на развитие ооцита и эмбриона при последующем ЭКО.

Ключевые слова: окислительный стресс в фолликуле; экстракорпоральное оплодотворение.

Для цитирования: Шестакова М.А., Киселёва М.В., Проскурнина Е.В. Окислительный стресс в фолликуле и его влияние на исход экстракорпорального оплодотворения: состояние проблемы. *Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирёва*. 2017; 4 (3): 137—144. DOI <http://dx.doi.org/10.18821/2313-8726-2017-4-3-137-144>

Shestakova M.A.¹, Kiseleva M.V.², Proskurnina E.V.³

OXIDATIVE STRESS IN THE FOLLICULA AND ITS INFLUENCE ON THE EXTRACORPORAL FERTILIZATION: THE STATE OF THE PROBLEM

¹N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997, Russian Federation;

²A.F. Tsyba Medical Radiological Research Center affiliated to P.A. Gertsen Moscow Cancer Research, Obninsk, 249036, Russian Federation;

³M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Russian Federation

Free radical reactions are a concurrent part of the homeostasis of any system, including reproductive one. The imbalance of free radical production systems and antioxidants leads to pathological consequences, known as oxidative stress. In recent years, there have been actively executed successful studies, in which attempts are made to identify the impact of local oxidative stress in the follicle on the quality of the embryo and the outcome of «in vitro fertilization» (IVF). Despite both the inadequacy of data and the difficulty of comparing them, free radicals and the state of the antioxidant system of the follicular fluid have been proven to have a significant effect on oocyte and embryo development in subsequent IVF.

Keywords: oxidative stress in the follicle; «in vitro» fertilization.

For citation: Shestakova M.A., Kiseleva M.V., Proskurnina E.V. Oxidative stress in the follicula and its influence on the extracorporal fertilization: the state of the problem. *V.F. Snegirev Archives of Obstetrics and Gynecology, Russian journal*. 2017; 4(3): 137—144. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/2313-8726-2017-4-3-137-144>

For correspondence: Elena V. Proskurnina, MD, PhD, Associate Professor of the Department of Medical Biophysics of the M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Russian Federation; e-mail: proskurnina@gmail.com

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 14.06.2017

Accepted 03.07.2017

Введение

Фолликулярная жидкость (ФЖ) заполняет полость преовуляторного фолликула и представляет собой транссудат плазмы с содержащимися в нем секретами фолликулярных клеток. По данным различных авторов, в состав ФЖ входят стероидные гормоны, цитокины, ферменты, антикоагулянты, электролиты, метаболиты (аминокислоты, жирные кислоты, липиды), факторы роста, источники активных форм кислорода

(АФК), ферментные и неферментные антиоксиданты [1]. В ней также обнаруживают клетки гранулёзы (фолликулярные клетки) и лейкоциты, которые начинают мигрировать в фолликул в перивариальной фазе и частично попадают в образец в ходе пункции фолликула [2].

Сравнение данных о протеоме плазмы и ФЖ позволило J. Gonzales и соавт. предположить наличие не только пассивной фильтрации крови внутрь фол-

ликула, но и синтеза отдельных характерных белков и пептидов клетками гранулёзы. Ранее на мышах было показано, что барьер между кровью и фолликулом чувствителен к молекулярной массе (только менее 850 кДа) и заряду белков [3, 4]. Кроме того, переход молекул напрямую связан со зрелостью фолликула и облегчается по мере развития васкуляризации в преовуляторных фолликулах [4]. Из этого следуют некоторые количественные и качественные различия в составе плазме и ФЖ, которые могут иметь функциональное значение.

Соотношение прооксидантов и антиоксидантов в ФЖ предположительно оказывает влияние на созревание яйцеклетки, качество эмбриона и наступление беременности [5, 6].

До сих пор немного известно о прооксидантно-антиоксидантном балансе в фолликулах человека во время естественного овариального цикла *in vivo*. Гормональная стимуляция экзогенными гонадотропинами при конвенциональном экстракорпоральном оплодотворении (ЭКО) влияет на метаболизм фолликула (меняется экспрессия 17, по другим данным — 13 белков различной функциональной принадлежности) [7, 8] и предположительно усиливает окислительный стресс [9], что также зависит от протокола стимуляции [10].

Известны единичные работы, в которых сравнивают биологический материал при ЭКО в естественном и стимулированном цикле. В одной из таких работ обнаружено усиление апоптоза клеток гранулёзы в группе пациенток после овариальной стимуляции [11]. Авторы не нашли значимых различий между группами по уровню синтеза АФК клетками гранулёзы, однако другие параметры окислительного стресса, имеющие отношение к ФЖ, в этой работе не рассматривались.

Таким образом, основным материалом для большинства исследований в этой области помимо животных моделей, служит ФЖ пациенток, проходящих процедуру ЭКО. У таких пациенток после гормональной стимуляции яичников (стимуляция суперовуляции) созревает не один фолликул, как в естественном овариальном цикле, а несколько (обычно 3—20). Далее врач под контролем УЗИ с помощью тонкой иглы осуществляет пункцию зрелых фолликулов и извлекает яйцеклетки вместе с жидкостью. После оценки качества ооцитов их переносят в среду для инкубации и последующего оплодотворения [12].

В медицинской практике используют классификацию ооцитов по степени их зрелости (соответственно стадиям клеточного цикла — профазы I, метафаза I, метафаза II). В основе такого деления лежат морфологические характеристики (размер клетки, наличие/отсутствие зародышевого пузырька и первого полярного тельца, гомогенность цитоплазмы, выраженность кумулюса и лучистого венца). В свою очередь, параметрами для оценки качества эмбриона служат количество и размер blastomeres, а также наличие и степень их фрагментации [13].

Источники АФК и антиоксиданты в фолликулярной жидкости

Источники АФК в фолликулярной жидкости

Широко известно, что АФК и активные формы азота (АФА) обладают повреждающим действием и могут нарушить развитие ооцита и яйцеклетки. Вместе с тем в небольших количествах эти молекулы являются участниками внутриклеточных сигнальных каскадов. Так, по мнению ряда авторов, выработка АФК в физиологических концентрациях необходима для нормального протекания овариального цикла [5, 14].

В частности, L. Sabatini и соавт. показали, что высокая активность супероксиддисмутазы — фермента, инактивирующего супероксиданионный радикал, — препятствует разрыву фолликула при овуляции, поскольку в протекании этого процесса участвуют АФК [15].

В числе возможных источников АФК в фолликулярной жидкости рассматривают гранулёзу, нейтрофилы, макрофаги, эндотелиоциты [11].

Главными источниками АФК в клетках гранулёзы считаются митохондриальная электронтранспортная цепь и сигнальный каскад сквенджер-рецептора LOX-1 для окисленных липопротеинов низкой плотности [16]. Недавно было показано наличие НАДФН-оксидаз типа NOX4 и NOX5 в клетках гранулёзы [17]. Кроме того, в них обнаружены NO-синтазы эндотелиального типа [18].

Стероидпродуцирующие клетки фолликулов содержат ферменты семейства цитохрома P450, побочными продуктами активности которых являются АФК [19].

Катехоламины норадреналин и дофамин, присутствующие в высоких концентрациях в ФЖ, метаболизируются моноаминоксидазой А клеток гранулёзы, в ходе чего вырабатывается пероксид водорода. Значимый вклад норадреналина и дофамина в окислительный стресс ФЖ показан для пациенток с поликистозным синдромом яичников, проходящих процедуру ЭКО [20, 21].

Содержание АФК в ФЖ связано с уровнем метаболизма внутри фолликула. Так, S.E. Elizur и соавт. сравнивали ФЖ из двух доминантных фолликулов, один из которых не содержал яйцеклетки, и установили, что по мере развития атрезии (дегенерации) фолликула содержание пероксида водорода в ФЖ снижается [22].

Антиоксиданты в фолликулярной жидкости

ФЖ образуется главным образом из плазмы и содержит похожий набор антиоксидантов: супероксиддисмутазу (СОД), каталазу, селензависимую глутатионпероксидазу и глутатионредуктазу, а также жирорастворимые антиоксиданты, такие как витамины А, С, Е и глутатион [23—26].

Стероидпродуцирующие клетки фолликула с преантральной стадии начинают синтезировать марганецсодержащую митохондриальную супероксиддисмутазу (MnСОД), а в доминантных фолликулах основной изоформой является Cu,Zn-СОД. В преовуляторных фолликулах Cu,Zn-СОД экспрессируется главным об-

разом в клетках внутренней теки, где, по-видимому, создаёт антиоксидантный барьер на границе с кровяным руслом [27, 28]. В ФЖ человека обнаружена внеклеточная форма Cu,Zn-СОД (СОД3) [24].

Как показали М.С. Carbone и соавт., активность СОД в ФЖ значительно выше таковой в плазме крови. Интересно, что активность СОД в фолликулах повышается у пациенток старшего возраста, несмотря на то что уровень экспрессии этого фермента остаётся неизменным [24]. Существенно, что профиль экспрессии гена СОД меняется под действием гормонов. MnСОД и СОД3 синтезируются в клетках внутренней теки и гранулёзы крпы под действием экзогенных гонадотропинов [29, 30].

Существуют экспериментальные данные, позволяющие связать СОД в ФЖ с репродукцией. Гомозиготный дефицит гена СОД у мышей вызывает снижение плодовитости [31]. У людей при бесплодии на фоне эндометриоза уровень СОД в ФЖ снижается [32, 33].

Глутатион (GSH) является важным внутриклеточным антиоксидантом сам по себе и как кофермент антиоксидантного фермента глутатионпероксидазы. В основном изучена его роль в ооцитах и эмбрионах на преимплантационном этапе. GSH также присутствует в ФЖ фолликулов, где, как считается, он способствует защите ооцитов во время их роста и созревания. Однако не было найдено корреляции между уровнем GSH в ФЖ и параметрами успешности ЭКО: качеством эмбриона, оплодотворением, имплантацией. Возможно, что внеклеточная концентрация глутатиона по сравнению с внутриклеточной слишком незначительна для оказания заметного эффекта [34].

Селеновая глутатионпероксидаза — фермент, катализирующий восстановление пероксида водорода, является главной антиоксидантной системой эмбриона. Она также обнаружена в ФЖ, где ее активность составляет 70% от плазматической [35].

Помимо своей антиоксидантной роли, глутатион в качестве кофермента глутатионтрансферазы участвует в реакциях детоксикации, в том числе продуктов окисления АФК. Как у здоровых доноров, так и у пациенток после овариальной стимуляции уровень глутатионтрансферазы в ФЖ значительно снижается по мере созревания фолликула, из чего можно сделать вывод о её роли в развитии ооцитов [36].

Витамин С — сильный антиоксидант, способный в присутствии переходных металлов проявлять прооксидантные свойства [37].

Поскольку в организме человека в отличие от большинства млекопитающих аскорбат не синтезируется, его общее содержание зависит от рациона. Тем не менее у пациенток, проходящих процедуру ЭКО, обнаружено значительное накопление аскорбата в ФЖ по сравнению с плазмой; соотношение концентраций составляет 1,68 [26, 38]. Такое соотношение предполагает, что витамин С переходит в ФЖ против концентрационного градиента. Имеются данные, что главным пере-

носчиком и источником аскорбата в ФЖ являются лейкоциты, которые активно инфильтрируют фолликул в перивуляторную фазу. Уровень его в ходе созревания фолликула значимо не меняется [26]. Есть данные о дополнительной физиологической функции фолликулярного витамина С — он потенцирует высвобождение антиоксидантов таурина и гипотаурина эпителием маточных труб при овуляции [39].

Дефицит аскорбата у людей, как и у других млекопитающих, приводит к атрофии яичников и атрезии фолликулов [32, 40]. Нужно отметить, что, помимо участия в антиоксидантной защите, витамин С вовлечён в другие процессы в растущем фолликуле, такие как синтез коллагена [40].

При бесплодии на фоне эндометриоза концентрация витамина С в ФЖ значительно снижается [32].

В отличие от витамина С концентрация жирорастворимых витаминов в ФЖ снижена по сравнению с плазматическими. Этот факт связывают с особенностями транспорта их главных переносчиков липопротеинов (в норме гематофолликулярный барьер преовуляторного фолликула пропускает только липопротеины высокой плотности) [25].

В ФЖ зрелых фолликулов человека обнаружены каротиноиды, ретинол и переносчики ретинола — ретинолсвязывающий белок и транстиретин, причём ретинолсвязывающий белок дополнительно синтезируется клетками фолликула [25]. Гранулёза, ооциты, тека-клетки накапливают и высвобождают витамин А гормонально-зависимым образом. Показано, что у крыс витамин А накапливается в ФЖ после гормональной стимуляции [41]. Недостаточность во взрослом возрасте у крыс препятствует завершению мейоза II в ооцитах и бластогенезу, а в пренатальном периоде препятствует совершению мейоза I [42].

Из экспериментов на животных моделях известно, что витамин А улучшает рост фолликулов, качество эмбрионов и продукцию стероидов в фолликуле. Полностью транс-ретиноевая кислота (метаболит ретинола) стимулирует развитие бластоцистов. Созревание ооцитов у коров и морских свинок в присутствии ретиноидов *in vitro* приводит к образованию эмбрионов лучшего качества [43].

Известно, что дефицит витамина Е приводит к бесплодию, связанному в том числе с яичниками, так как через почти полное прекращение синтеза лютеотропина вызывает аномалии развития фолликулов [44].

У женщин, проходящих процедуру ЭКО, концентрация альфа-токоферола ни в плазме, ни в ФЖ с репродуктивным успехом не коррелирует. Однако при бесплодии, связанном с эндометриозом, уровень витамина Е, как и других антиоксидантов, маркеров окислительного стресса (ОС) и антиоксидантной активности, оказывается ниже, чем при трубной непроходимости или мужском факторе бесплодия [56]. Другие авторы, напротив, обнаружили повышение уровня витамина Е в ФЖ пациенток с эндометриозом [32].

Уровень всех антиоксидантных витаминов в ФЖ оказался значительно ниже у пациенток с бесплодием неясного генеза или на фоне женского фактора, чем при мужском факторе или у здоровых доноров [32].

Надо отметить, что результаты работ, посвящённых роли витаминов в исходе процедуры ЭКО, сложно сравнивать, поскольку концентрация этих веществ в ФЖ напрямую зависит от приёма. Однако многие авторы не контролируют рацион пациенток по этому параметру [32].

Е. Cassano и соавт. предположили, что показателем ОС может служить соотношение ретинола и альфа-токоферола в ФЖ. Согласно их гипотезе, в отсутствие ОС ретинол находится в ФЖ в неокисленном состоянии, тогда как альфа-токоферол захватывается клетками гранулёзы. При наличии ОС ретинол окисляется, тогда как альфа-токоферол поддерживается в восстановленной форме витамином С [45].

Мочевая кислота принадлежит к антиоксидантам, обрывающим цепи, и является хелатором металлов, защищающим от окисления витамин Е. Мочевая кислота вносит наибольший относительный вклад в антиоксидантную способность плазмы [46].

Мочевая кислота присутствует и в ФЖ в концентрациях, превышающих плазматические, предположительно её дополнительно секретируют клетки гранулёзы как продукт пуринового метаболизма. Е. Cassano и соавт. выдвинули гипотезу, согласно которой уровень мочевой кислоты в ФЖ повышается при окислительном стрессе в результате разрушения ДНК клеток гранулёзы. По их мнению, повышенный уровень мочевой кислоты в ФЖ следует рассматривать скорее как маркер атрезии фолликула, чем как его защитный антиоксидантный механизм [45]. Тем не менее вклад мочевой кислоты в антиоксидантную защиту фолликула и влияние её на параметры успешности ЭКО специально не изучались.

Известно, что мочевая кислота в плазме в овариальном цикле претерпевает гормонально-зависимые изменения: имеется обратная корреляция между её концентрацией и содержанием эстрадиола и прогестерона. Содержание мочевой кислоты в плазме максимально в фолликулярной фазе и снижается после овуляции [47]. У пациенток при прохождении цикла ЭКО уровень мочевой кислоты в плазме, как и уровни других плазменных неферментных антиоксидантов (альбумина, витамина Е), снижается [48].

Важная роль в плазме отводится антиоксидантным белкам (альбумин, церулоплазмин, гаптоглобин), среди которых преобладает альбумин. Как считается, антиоксидантные свойства альбумина обусловлены наличием у него свободной SH-группы [49]. Белки плазмы обнаружены в ФЖ, хотя и в меньшем количестве. Известно, что их концентрация в ФЖ повышается во время ОС (как следствие нарушения гематофолликулярного барьера) [45], но корреляции между содержанием этих белков, созреванием ооцита и вероятностью оплодотворения найти не удалось [50].

С другой стороны, в работе, посвящённой роли альбумина в ФЖ, сообщается, что нахождение фолликулярного альбумина в восстановленной форме способствует нормальному развитию ооцита, а преобладание окисленной формы характерно для фолликулов с дегенерировавшими ооцитами. При этом преобладание окисленных форм альбумина в плазме у тех же пациентов не являлось маркером, способным предсказать качество ооцита, поскольку на окислительно-восстановительный статус плазмы влияли такие параметры, как возраст и наличие эндометриоза у некоторых пациенток [51].

По данным М. Jozwik и соавт., содержание продуктов перекисного окисления липидов (сопряженных диенов, липидных гидропероксидов, малонового диальдегида) в ФЖ ниже, чем в плазме, что, по-видимому, указывает на эффективную работу внутрифолликулярных антиоксидантных систем [52].

Влияние окислительного стресса в фолликуле на исход ЭКО

Данные, имеющиеся в литературе, касаются роли прооксидантного статуса ФЖ в исходе ЭКО и представляют трудность для сопоставления и осмысления. Это связано с тем, что на результат процедуры, как и на состав ФЖ, влияют такие параметры, как возраст пациенток [24, 53, 54], причина бесплодия [32, 33], наличие или отсутствие гормонального вмешательства (ЭКО в стимулированном или естественном цикле) [7, 10, 11], а также образ жизни пациенток [53]. Кроме того, имеют значение параметры, выбираемые исследователями (например, оценка общего статуса или содержания отдельных антиоксидантов и др.) [55]. Некоторые исследователи пришли к выводу, что роль окислителей может отличаться на разных этапах репродуктивного цикла и развития эмбриона [55].

Трудно сравнивать результаты исследований, в которых изучалась ФЖ отдельных фолликулов и прослеживалась судьба соответствующих им ооцитов, с теми, в которых анализировали всю ФЖ, полученную от одной пациентки. В некоторых исследованиях авторы заранее исключают ФЖ пустых фолликулов или таких, в которых находилось несколько ооцитов [22].

Во многих работах по оценке общей антиоксидантной способности ФЖ используется метод FRAP (*ferric reducing ability of plasma*), который не позволяет оценить вклад антиоксидантов с тиоловыми группами [56], содержащихся в ФЖ. Вышеуказанные причины объясняют (по крайней мере отчасти) противоречия, имеющиеся в литературе по изучаемому вопросу.

Влияние окислительного стресса на качество ооцита

У качественных ооцитов уровень АФК и перекисного окисления липидов ниже, а общая антиоксидантная ёмкость выше, чем у ооцитов низкого качества [14].

По данным R. Jančar и соавт., продукция большого количества АФК клетками гранулёзы, которые счита-

ются одними из главных источников свободных радикалов в ФЖ, коррелирует с повышенным развитием пустых фолликулов без ооцита, но значимо не влияет на оплодотворение и дробление. Также антиоксидантная ёмкость не отличалась в ФЖ фолликулов, содержащих или не содержащих ооцит [57].

Тем не менее, как показали S. Meijde и соавт., антиоксидантный фермент глутатионтрансфераза оказывает существенное влияние на созревание фолликула [36]. Также при слабом ответе яичников на стимуляцию в ФЖ наблюдалось пониженное содержание глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и глутатионтрансферазы по сравнению с группой с хорошим ответом [10].

Влияние окислительного стресса на оплодотворение и дробление

М. Attaran и соавт. сообщили о положительном влиянии малых концентраций АФК на оплодотворение [5]. В то же время в одной их работе у успешно оплодотворённых ооцитов уровень АФК оказался ниже. Низкое содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) положительно коррелировало с вероятностью оплодотворения. Эти последние результаты противоречат данным ряда исследований, в которых концентрация продуктов ПОЛ не коррелировала с оплодотворением, дроблением и качеством эмбриона [5, 52, 58]. Отсутствие зависимости может быть связано с тем, что продукты свободнорадикального окисления эффективно удаляются ферментными системами ФЖ, такими как глутатион, глутатионтрансфераза, глутатионредуктаза [24]. При этом сообщается, что содержание продуктов ПОЛ выше у пациенток со сниженным овариальным резервом по сравнению со здоровыми донорами яйцеклеток [10].

Отмечено снижение числа оплодотворений и большее число (в процентах) случаев аномального дробления в группе с более активной продукцией АФК клетками гранулёзы. Интересно, что в группе, проходившей ЭКО в естественном цикле, т. е. без овариальной стимуляции, такой закономерности выявлено не было, хотя средний уровень продукции АФК клетками гранулёзы не отличался. К сожалению, ничего не известно о различиях в антиоксидантном статусе фолликулов для двух протоколов ЭКО [11].

Сниженный уровень антиоксидантной защиты — предиктор низкого потенциала оплодотворения ооцита [59]. Аналогично более высокий уровень антиоксидантов наблюдается в ФЖ фолликулов, ооциты из которых успешно оплодотворяются [14, 59].

T. Paszkowski и соавт. обнаружили, что уровень глутатионпероксидазы был выше в фолликулах, содержащих ооциты, которые были успешно оплодотворены, по сравнению с теми фолликулами, чьи ооциты не оплодотворились [35]. В одной из работ также уровни СОД и каталазы в ФЖ коррелировали с оплодотворением и дроблением [6]. Напротив, L. Sabatini и соавт. обнаружили более высокий уровень СОД в тех фолликулах,

ооциты из которых не оплодотворились [15]. Бóльшая вероятность успешного оплодотворения была замечена для тех ооцитов, которым соответствовала ФЖ с бóльшим содержанием глутатионпероксидазы [10].

Влияние окислительного стресса на качество эмбриона

По мнению многих авторов, существует негативная корреляция между уровнем АФК и качеством эмбриона [14, 55, 58]. Также H. Yang и соавт. (1998 г.) обнаружили более высокий уровень пероксида водорода во фрагментированных эмбрионах по сравнению с нефрагментированными [60].

В уже упомянутой работе S.E. Elizur повышенный уровень H_2O_2 наблюдался в тех фолликулах, из ооцитов которых развивались эмбрионы низкого качества [22].

Поскольку в малых концентрациях АФК положительно влияют на развитие эмбриона [5], было высказано предположение о существовании некоторого порогового уровня. Так, содержание АФК ниже определённого порогового уровня способствует образованию эмбрионов лучшего качества, а при их большем количестве качество эмбриона и вероятность имплантации снижаются [14, 58].

У эмбрионов низкого качества антиоксидантная активность ФЖ оказывалась ниже, чем у эмбрионов высокого качества [14, 26]. По данным нескольких публикаций, эмбрионы, сохранившие жизнеспособность до переноса в полость матки, соответствовали ФЖ с более низким уровнем антиоксидантной защиты [6, 56].

T. Paszkowski, R.N. Clarke (1996 г.) сообщали о повышенном потреблении антиоксидантов (указывающем на более высокий уровень АФК) из инкубационной среды при культивировании эмбрионов плохого качества [26].

Исследования ФЖ пациенток, проходящих процедуру интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в яйцеклетку, показали, что концентрация СОД выше в эмбрионах хорошего качества на ранних этапах развития, тогда как корреляции с содержанием каталазы обнаружено не было [60]. Уровень глутатиона коррелирует с количеством высококачественных эмбрионов при ЭКО у пациенток с эндометриозом [61].

Влияние окислительного стресса на имплантацию

Не всегда есть возможность проследить связь ОС с наступлением беременности, поскольку при ЭКО, как правило, в полость матки переносят нескольких эмбрионов. Тем не менее несколько авторов сообщают о наличии зависимости между общей антиоксидантной ёмкостью ФЖ и имплантацией.

A.K. Singh и соавт., которые изучали общую антиоксидантную ёмкость всей ФЖ, полученной от отдельных пациенток, показали, что повышенные уровни АФК и ПОЛ наблюдались у незабеременевших женщин в отличие от тех, которые забеременели в результате

ЭКО независимо от диагноза (эндометриоз или трубное бесплодие) [33].

В другом исследовании повышенная продукция АФК клетками гранулёзы снижала вероятность имплантации [14, 59], но вместе с тем содержание продуктов ПОЛ положительно коррелировало с частотой наступления беременности [59].

Что касается антиоксидантной защиты, то повышенная общая антиоксидантная ёмкость коррелировала с частотой наступления беременности, в частности у пациенток с эндометриозом [32]. При этом зависимости для отдельных ферментов (СОД и каталазы) обнаружено не было [62].

Не найдено прямой зависимости между параметрами ОС в фолликуле и исходом беременности при ЭКО. Это неудивительно, так как существует множество других факторов, способных повлиять на исход беременности [63].

Влияние NO

NO участвует в фолликулогенезе, но в избыточных количествах может приводить к апоптозу внутри фолликула, что негативно отражается на развитии ооцита, а также последующем оплодотворении, дроблении и имплантации [64]. Есть сообщения об отрицательной корреляции между уровнем NO и качеством эмбриона [65]. В то же время, по данным E. Yalçınkaya и соавт., во время ЭКО повышенный уровень NO коррелирует только с ненаступлением беременности [34]. Точный механизм действия NO, приводящий к таким результатам, неизвестен. С другой стороны, в работе D. Manau и соавт. показано, что содержание в ФЖ нитратов и нитритов — продуктов нитрозивного стресса — не имело предиктивного значения для исхода ЭКО [66].

Влияние приёма витаминов-антиоксидантов на исход ЭКО

Ежедневный приём 500 мг аскорбата приводил к увеличению размеров фолликулов; увеличивался также и процент беременностей [55]. Найдена положительная корреляция между приёмом витамина С, количеством созревших ооцитов, процентом оплодотворений и качеством эмбриона. При этом витамин С увеличивает общую антиоксидантную ёмкость ФЖ, но, как предполагают авторы того же исследования, он реализует свое положительное действие сразу по нескольким механизмам [67].

В одной из работ уровень альфа-токоферола оказался выше у женщин, которые забеременели в результате ЭКО [38]. При этом другие исследователи не нашли корреляции между приёмом витамина Е и качеством эмбриона [67].

Содержание бета-каротина (провитамина А) оказывается выше, а ретинола — ниже в ФЖ и плазме беременных пациенток [38]. Формирование эмбрионов хорошего качества коррелирует с приёмом витамина А, при том что заметного вклада в общую антиоксидант-

ную ёмкость ФЖ витамин А, по-видимому, не вносит. Этот факт указывает на наличие у этого витамина других функций, кроме обеспечения антиоксидантной активности [67].

По некоторым наблюдениям, соотношение концентраций витамина А в плазме и в ФЖ существенно увеличено в тех случаях, когда ооцит обладает низкой оплодотворяющей способностью. Однако авторы объясняют это тем, что в дефектных фолликулах сильно повышается проницаемость гематофолликулярного барьера, в результате чего он начинает пропускать липопротеины низкой плотности, транспортирующие витамин А в ФЖ [25].

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

(остальные источники см. REFERENCES)

12. Корсак В., Исакова С. Подготовка пациентов и порядок проведения экстракорпорального оплодотворения. Ведение ранних сроков беременности после ЭКО (методические рекомендации). СПб.: Н-Л; 2001.

REFERENCES

1. Basuino L., Silveira C.F. Human follicular fluid and effects on reproduction. *JBRA Assist. Reprod.* 2016; 20: 38—40. doi: 10.5935/1518-0557.20160009.
2. Neubourg D.D., Robins A., Fishel S., Gibbon L. Flow cytometric analysis of granulosa cells from follicular fluid after follicular stimulation. *Human Reprod.* 1996; 11: 2211—4.
3. Hess K.A., Chen L., Larsen W.J. The ovarian blood follicle barrier is both charge- and size-selective in mice. *Biol. Reprod.* 1998; 58: 705—11.
4. Gonzalès J., Lesourd S., Van Dreden P., Richard P., Lefèbvre G., Vauthier Brouzes D. Protein composition of follicular fluid and oocyte cleavage occurrence in in vitro fertilization (IVF). *J. Assist. Reprod. Genet.* 1992; 9: 211—6.
5. Attaran M., Pasqualotto E., Falcone T., Goldberg J.M., Miller K.F., Agarwal A., Sharma R.K. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. *Int. J. Fertil. Womens Med.* 2000; 45: 314—20.
6. Pasqualotto E.B., Agarwal A., Sharma R.K., Izzo V.M., Pinotti J.A., Joshi N.J., Rose B.I. Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. *Fertil. and Steril.* 2004; 81: 973—6. doi: 10.1016/j.fertnstert.2003.11.021.
7. Zamah A.M., Hassis M.E., Albertolle M.E., Williams K.E. Proteomic analysis of human follicular fluid from fertile women. *Clin. Proteomics.* 2015; 12: 5. doi: 10.1186/s12014-015-9077-6.
8. Wu Y.T., Wu Y., Zhang J.Y., Hou N.N., Liu A.X., Pan J.X. et al. Preliminary proteomic analysis on the alterations in follicular fluid proteins from women undergoing natural cycles or controlled ovarian hyperstimulation. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2015; 32: 417—27. doi: 10.1007/s10815-014-0419-5.
9. Agarwal A., Aponte-Mellado A., Premkumar B.J., Shaman A., Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2012; 10: 49. doi: 10.1186/1477-7827-10-49.
10. Nuñez-Calonge R., Cortés S., Gutierrez Gonzalez L.M., Kireev R., Vara E., Ortega L. et al. Oxidative stress in follicular fluid of young women with low response compared with fertile oocyte donors. *Reprod. Biomed. Online.* 2016; 32: 446—56. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.12.010.
11. Jancar N., Virant-Klun I., Osredkar J., Vrtacnik Bokal E. Apoptosis, reactive oxygen species and follicular anti-Müllerian hormone in natural versus stimulated cycles. *Reprod. Biomed. Online.* 2008; 16: 640—8.
12. Korsak V., Isakova S. Preparation of Patients and Procedure for in vitro Fertilization. Maintenance of Early Pregnancy after IVF (Methodical Recommendations). [Подготовка пациентов и порядок проведения экстракорпорального оплодотворения. Ведение ранних сроков беременности после ЭКО (методические рекомендации)]. St. Petersburg: N-L; 2001. (in Russian)

13. Veeck L.L. (Ed.). *An Atlas of Human Gametes and Conceptuses: an Illustrated Reference for Assisted Reproductive Technology*. Taylor & Francis; 1999.
14. Jana S.K., Chattopadhyay R., Chakravarty B., Chaudhury K. Upper control limit of reactive oxygen species in follicular fluid beyond which viable embryo formation is not favorable. *Reprod. Toxicol.* 2010; 29: 447—51. doi: 10.1016/j.reprotox.2010.04.002.
15. Sabatini L., Wilson C., Lower A., Al-Shawaf T., Grudzinskas J.G. Superoxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil. and Steril.* 1999; 72: 1027—34.
16. Karuputhula N.B., Chattopadhyay R., Chakravarty B., Chaudhury K. Oxidative status in granulosa cells of infertile women undergoing IVF. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 2013; 59: 91—8. doi: 10.3109/19396368.2012.743197.
17. Hunter R.H.F. *Physiology of the Graafian Follicle and Ovulation*. Cambridge: University Press; 2003.
18. Hanukoglu I. Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells. *Drug Metab. Rev.* 2006; 38: 171—96. doi: 10.1080/03602530600570040.
19. Kampfer C., Saller S., Windschüttl S., Berg D., Berg U., Mayerhofer A. Pigment-Epithelium Derived Factor (PEDF) and the human ovary: a role in the generation of ROS in granulosa cells. *Life Sci.* 2014; 97: 129—36. doi: 10.1016/j.lfs.2013.12.007.
20. Saller S., Merz-Lange J., Raffael S., Hecht S., Pavlik R., Thaler C. et al. Norepinephrine, active norepinephrine transporter, and norepinephrine-metabolism are involved in the generation of reactive oxygen species in human ovarian granulosa cells. *Endocrinology.* 2012; 153: 1472—83. doi: 10.1210/en.2011-1769.
21. Saller S., Kunz L., Berg D., Berg U., Lara H., Urria J. et al. Dopamine in human follicular fluid is associated with cellular uptake and metabolism-dependent generation of reactive oxygen species in granulosa cells: implications for physiology and pathology. *Hum. Reprod.* 2014; 29: 555—67. doi: 10.1093/humrep/det422.
22. Elizur S.E., Lebovitz O., Orvieto R., Dor J., Zan-Bar T. Reactive oxygen species in follicular fluid may serve as biochemical markers to determine ovarian aging and follicular metabolic age. *Gynecol. Endocrinol.* 2014; 30: 705—7. doi: 10.3109/09513590.2014.924100.
23. Angelucci S., Ciavardelli D., Di Giuseppe F., Eleuterio E., Sulpizio M., Tiboni G.M. et al. Proteome analysis of human follicular fluid. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006; 1764: 1775—85. doi: 10.1016/j.bbapap.2006.09.001.
24. Carbone M.C., Tatone C., Delle Monache S., Marci R., Caserta D., Colonna R., Amicarelli F. Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. *Mol. Hum. Reprod.* 2003; 9: 639—43.
25. Schweigert F.J., Steinhagen B., Raila J., Siemann A., Peet D., Buscher U. Concentrations of carotenoids, retinol and alpha-tocopherol in plasma and follicular fluid of women undergoing IVF. *Hum. Reprod.* 2003; 18: 1259—64.
26. Paszkowski T., Clarke R.N. The Graafian follicle is a site of L-ascorbate accumulation. *J. Assist. Reprod. Genet.* 1999; 16: 41—5.
27. Matos L., Stevenson D., Gomes F., Silva-Carvalho J.L., Almeida H. Superoxide dismutase expression in human cumulus oophorus cells. *Mol. Hum. Reprod.* 2009; 15: 411—9. doi: 10.1093/molehr/gap034.
28. Suzuki T., Sugino N., Fukaya T., Sugiyama S., Uda T., Takaya R. et al. Superoxide dismutase in normal cycling human ovaries: immunohistochemical localization and characterization. *Fertil. and Steril.* 1999; 72: 720—6.
29. Tilly J.L., Tilly K.I. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology.* 1995; 136: 242—52. doi: 10.1210/endo.136.1.7828537.
30. Sasaki J., Sato E.F., Nomura T., Mori H., Watanabe S., Kanda S. et al. Detection of manganese superoxide dismutase mRNA in the theca interna cells of rat ovary during the ovulatory process by in situ hybridization. *Histochemistry.* 1994; 102: 173—6.
31. Baka S., Malamitsi-Puchner A. (2006) Novel follicular fluid factors influencing oocyte developmental potential in IVF: a review. *Reprod. Biomed. Online.* 1994; 12: 500—6.
32. Prieto L., Quesada J.F., Cambero O., Pacheco A., Pellicer A., Codoceo R., Garcia-Velasco J.A. Analysis of follicular fluid and serum markers of oxidative stress in women with infertility related to endometriosis. *Fertil. and Steril.* 2012; 98: 126—30. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.03.052.
33. Singh A.K., Chattopadhyay R., Chakravarty B., Chaudhury K. Markers of oxidative stress in follicular fluid of women with endometriosis and tubal infertility undergoing IVF. *Reprod. Toxicol.* 2013; 42: 116—24. doi: 10.1016/j.reprotox.2013.08.005.
34. Yalçinkaya E., Cakiroğlu Y., Doğer E., Budak O., Cekmen M., Calışkan E. Effect of follicular fluid NO, MDA and GSH levels on in vitro fertilization outcomes. *J. Turk. Ger. Gynecol. Assoc.* 2013; 14: 136—41. doi: 10.5152/jtgga.2013.53323.
35. Paszkowski T., Traub A.I., Robinson S.Y., McMaster D. Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clin. Chim. Acta.* 1995; 236: 173—80.
36. Meijide S., Hernández M.L., Navarro R., Larreategui Z., Ferrando M., Ruiz-Sanz J.I., Ruiz-Larrea M.B. Glutathione S-transferase activity in follicular fluid from women undergoing ovarian stimulation: role in maturation. *Free Radic. Biol. Med.* 2014; 75(Suppl. 1): S41. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.792.
37. Buettner G.R., Jurkiewicz B.A. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiat. Res.* 1996; 145: 532—41.
38. Palini S., Benedetti S., Tagliamonte M.C., De Stefani S., Primiterra M., Polli V., et al. Influence of ovarian stimulation for IVF/ICSI on the antioxidant defence system and relationship to outcome. *Reprod. Biomed. Online.* 2014; 29: 65—71. doi: 10.1016/j.rbmo.2014.03.010.
39. Guérin P., Mouatassim S., Ménéz Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod. Update.* 2001; 7: 175—89.
40. Luck M.R., Jeyaseelan I., Scholes R.A. Ascorbic acid and fertility. *Biol. Reprod.* 1995; 52: 262—6.
41. Aten R.F., Duarte K.M., Behrman H.R. Regulation of ovarian antioxidant vitamins, reduced glutathione, and lipid peroxidation by luteinizing hormone and prostaglandin F2 alpha. *Biol. Reprod.* 1992; 46: 401—7.
42. Luderer U. Ovarian toxicity from reactive oxygen species. *Vitam. Horm.* 2014; 94: 99—127. doi: 10.1016/B978-0-12-800095-3.00004-3.
43. Pauli S.A., Session D.R., Shang W., Easley K., Wieser F., Taylor R.N. et al. Analysis of follicular fluid retinoids in women undergoing in vitro fertilization: retinoic acid influences embryo quality and is reduced in women with endometriosis. *Reprod. Sci.* 2013; 20: 1116—24. doi: 10.1177/1933719113477487.
44. Das P., Chowdhury M. Vitamin E-deficiency induced changes in ovary and uterus. *Mol. Cell Biochem.* 1999; 198: 151—6.
45. Cassano E., Tosto L., Balestrieri M., Zicarelli L., Abrescia P. Antioxidant defense in the follicular fluid of water buffalo. *Cell Physiol. Biochem.* 1999; 9: 106—16. doi: 10.1007/s00016-000-0004-3.
46. Wayner D.D., Burton G.W., Ingold K.U., Barclay L.R., Locke S.J. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim. Biophys. Acta.* 1987; 924: 408—19.
47. Mumford S.L., Dasharathy S.S., Pollack A.Z., Perkins N.J., Mattison D.R., Cole S.R. et al. Serum uric acid in relation to endogenous reproductive hormones during the menstrual cycle: findings from the BioCycle study. *Hum. Reprod.* 2013; 28: 1853—62. doi: 10.1093/humrep/det085.
48. Aurrekoetxea I., Ruiz-Sanz J.I., del Agua A.R., Navarro R., Hernández M.L., Matorras R. et al. Serum oxidizability and antioxidant status in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil. and Steril.* 2010; 94: 1279—86. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.05.028.
49. Schauenstein E., Dachs F. Quantification and localisation of SH-groups in human blood serum proteins. *Z. Naturforsch. C.* 1978; 33(9—10): 803.
50. Nagy B., Pulay T., Szarka G., Csömör S. The serum protein content of human follicular fluid and its correlation with the maturity of oocytes. *Acta Physiol. Hung.* 1989; 73: 71—5.
51. Otsuki J., Nagai Y., Matsuyama Y., Terada T., Era S. The influence of the redox state of follicular fluid albumin on the viability of aspirated human oocytes. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 2012; 58: 149—53. doi: 10.3109/19396368.2012.675004.
52. Jozwik M., Wolczynski S., Szamatowicz M. Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Mol. Hum. Reprod.* 1999; 5: 409—13.
53. Crha I., Hrubá D., Ventruba P., Fiala J., Totusek J., Visnová H. Ascorbic acid and infertility treatment. *Cent. Eur. J. Public Hlth.* 2003; 11: 63—7.
54. Tatone C., Carbone M.C., Falone S., Aimola P., Giardinelli A., Caserta D. et al. Age-dependent changes in the expression of superoxide dismutases and catalase are associated with ultrastructural modifications in human granulosa cells. *Mol. Hum. Reprod.* 2006; 12: 655—60. doi: 10.1093/molehr/gal080.
55. Oyawoye O., Abdel Gadir A., Garner A., Constantinovici N., Perrett C., Hardiman P. Antioxidants and reactive oxygen species in follicu-

- lar fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. *Hum. Reprod.* 2003; 18: 2270—4.
56. Cao G., Prior R.L. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin. Chem.* 1998; 44: 1309—15.
 57. Jancar N., Kopitar A.N., Ihan A., Virant Klun I., Bokal E.V. Effect of apoptosis and reactive oxygen species production in human granulosa cells on oocyte fertilization and blastocyst development. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2007; 24: 91—7. doi: 10.1007/s10815-006-9103-8.
 58. Das S., Chattopadhyay R., Ghosh S., Goswami S.K., Chakravarty B.N., Chaudhury K. Reactive oxygen species level in follicular fluid—embryo quality marker in IVF? *Hum. Reprod.* 2006; 21: 2403—7. doi: 10.1093/humrep/del156.
 59. Yang H.W., Hwang K.J., Kwon H.C., Kim H.S., Choi K.W., Oh K.S. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum. Reprod.* 1998; 13: 998—1002.
 60. Wdowiak A. Comparing antioxidant enzyme levels in follicular fluid in ICSI-treated patients. *Gynecol. Obstet. Fertil.* 2015; 43: 515—21. doi: 10.1016/j.gyobfe.2015.06.004.
 61. Choi Y.S., Cho S., Seo S.K., Park J.H., Kim S.H., Lee B.S. Alteration in the intrafollicular thiol-redox system in infertile women with endometriosis. *Reproduction.* 2015; 149: 155—62. doi: 10.1530/REP-14-0438.
 62. Pasqualotto E.B., Lara L.V., Salvador M., Sobreiro B.P., Borges E., Pasqualotto F.F. The role of enzymatic antioxidants detected in the follicular fluid and semen of infertile couples undergoing assisted reproduction. *Hum. Fertil. (Camb).* 2009; 12: 166—71. doi: 10.1080/14647270903207941.
 63. Agarwal A., Allamaneni S.S. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reprod. Biomed. Online.* 2004; 9: 338—47.
 64. Revelli A., Delle Piane L., Casano S., Molinari E., Massobrio M., Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2009; 7: 40. doi: 10.1186/1477-7827-7-40.
 65. Lee T.H., Wu M.Y., Chen M.J., Chao K.H., Ho H.N., Yang Y.S. Nitric oxide is associated with poor embryo quality and pregnancy outcome in in vitro fertilization cycles. *Fertil. and Steril.* 2004; 82: 126—31. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.02.097.
 66. Manau D., Balasch J., Jiménez W., Fábregues F., Civico S., Casamitjana R. et al. Follicular fluid concentrations of adrenomedullin, vascular endothelial growth factor and nitric oxide in IVF cycles: relationship to ovarian response. *Hum. Reprod.* 2000; 15: 1295—9.
 67. Kazemi A., Ramezanzadeh F., Nasr-Esfahani M.H. The relations between dietary antioxidant vitamins intake and oxidative stress in follicular fluid and ART outcomes. *Iran. J. Reprod. Med.* 2015; 13: 533—40.

Поступила 14.06.2017

Принята к печати 03.07.2017