

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН)
Лаборатория геномных медицинских технологий

Научно-квалификационная работа
**Влияние гормональных компонентов в составе культуральных сред
на развитие эмбрионов человека *in vitro* в клинической практике**

Выполнил: аспирант очной формы обучения по специальности
03.03.04 Клеточная биология, цитология, гистология
Казаринов Вениамин Игоревич

Научный руководитель:
Заведующий лабораторией технологий управления здоровьем
доктор медицинских наук, профессор
Морозов Виталий Валерьевич

Новосибирск - 2020

Оглавление

Введение	2
Обзор научной литературы.....	4
Общие принципы современного ЭКО	4
История разработки сред культивирования	6
Проблематика современного культивирования	13
Факторы роста и гормоны	13
Фактор ингибирования лейкозных клеток (LIF)	17
Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF).....	21
GM-CSF и регуляция предимплантационного развития эмбрионов.....	25
Методика эксперимента.....	27
Принципы включения в исследование	27
Материалы и методы.....	27
Статистическая оценка.....	29
Полученные результаты.....	29
Заключение и выводы	30
Список литературы:.....	31

Введение

Бесплодие — одна из актуальных проблем здравоохранения во всем мире. Одно из существующих решений на сегодняшний день — это экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) и культивирование эмбрионов *in vitro*. (Raheem, 2018; Крылова и др., 2013). Согласно данным Европейского общества репродукции человека и эмбриологии (ESHRE) во всем мире каждая шестая пара имеет нарушения репродуктивной функции (ESHRE, 2014). Причем, 56% пар обращаются по поводу лечения бесплодия. (J. Voivin, 2007)

ЭКО — достаточно молодая ветвь науки, первый ЭКО-ребенок — Луиза Браун появилась на свет 5 июля 1978 года в Великобритании, при этом уже использовалось культивирование *in vitro* до стадии 8-клеточного эмбриона. Ранее, в другом случае, была получена бластоциста и произведен лапароскопический перенос в матку, однако беременность прекратила развитие, в этих попытках использовалась среда Хэма F10 с добавлением инактивированной сыворотки крови (Stephoe, Edwards, 1976; 1978). То, были первые успешные попытки культивирования человеческих эмбрионов с последующим переносом в матку, которые дали старт современной клинической эмбриологии.

С момента рождения первого ребенка, зачатого методом экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) быстро развивались. Более 5 миллионов детей рождены после применения ЭКО (Adamson et al., 2012). Новые методы ВРТ появляются и стремительно развиваются, включаются в клиническую практику, иногда, даже без твердых доказательств полезности и безопасности (Harper et al., 2012). Например, не существует единого мнения касательно лучшего состава для культивирования человеческих эмбрионов: количество белка, аминокислот, витаминов, наличие и качественный состав цитокинов и гормональных компонентов – подбираются в клинической практике относительно свободно (Niakan, 2012; Meintjes, 2012). Значительный прогресс в создании универсальных коммерчески доступных культуральных сред является важной частью успеха ВРТ. (Karamalegos and Bolton, 1999; Quinn, 2004). В настоящее время существует множество коммерчески доступных решений для оснащения лаборатории ЭКО, и множество видов культуральных сред, однако, по-прежнему продолжается поиск идеальных условий культивирования и лучшего состава питательных сред для повышения эффективности методов. Показатели успеха циклов ЭКО растут, а в научном сообществе обсуждаются возможности улучшения эффективности ВРТ, до уровня, превосходящего естественные репродуктивные циклы (Vajta et al., 2010).

Существующие данные говорят, что условия культивирования оказывают влияние на развитие эмбрионов до и после имплантации и, возможно, даже на здоровье будущих новорожденных. (Dumoulin et al., 2010; Nelissen et al., 2012, 2013; El Hajj and Naaf, 2013; Mantikou et al., 2013) Тем не менее, данные о роли состава культуральных применяемых в ЭКО часто недостаточны или противоречивы. (Harper et al., 2012). В клинической практике используются коммерчески доступные культуральные среды, но их точный состав скрыт коммерческой тайной, а единственными хорошо изученными, обладающими гормональной активностью, добавками к средам являются GM-CSF и гиалуроновая кислота, однако преимущество их использования в клинической практике эмбриологической лаборатории всё ещё не доказано. Более того есть исследования показывающие, что компоненты питательных сред могут вызывать эпигенетические изменения затрагивающие эмбриональное развитие и формирующие склонность к некоторым заболеваниям у рожденных детей. (Chronopoulou and Harper, 2014).

Таким образом, питательные среды доступные для эмбриологических лабораторий, а также компоненты этих сред и коммерчески доступные гормональные добавки к средам требуют дополнительного изучения. Цель текущего исследования – рассмотреть, могут ли ростовые факторы способствовать раннему развитию и имплантации эмбрионов при лечении методами ЭКО?

В настоящее время известно, что многие цитокины, аутокринной и паракринной регуляции, влияют на развитие предимплантационных эмбрионов. Предыдущие исследования на моделях животных показали лучшее развитие и жизнеспособность эмбрионов при добавлении одного из следующих факторов роста: инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-I), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), эпидермальный фактор роста (EGF) (Puri, 2012; Kawamura et al., 2012). Поддержка в культуральной среде ключевыми аутокринными и паракринными ростовыми факторами увеличивает частоту формирования бластоцист из трёхпронуклеарных зигот, и также пропорцию бластоцист высшего качества из размороженных на 3 сутки эмбрионов. Кроме того, было показано, способствование ростовых факторов в самостоятельном хетчинге у нормально оплодотворенных бластоцист в условиях *in vitro* (Chrelas et al., 2013). Некоторые цитокины, такие как инсулиноподобные факторы роста, стимулируют рост эмбриона, другие, такие как эпидермальный фактор роста важны для дифференцировки, а некоторые вовлечены в процессы имплантации. Но, насколько все эти компоненты необходимы для раннего развития эмбриона? Какой вклад вносит каждый фактор роста, гормон или цитокин? Какие компоненты необходимы, а какими можно пренебречь

в условиях культивирования *in vitro*? Нет жестко принятых правил, универсальных условий для культивирования эмбрионов человека, существуют разнообразные среды культивирования и различные методы ведения программ ВРТ по всему миру. Большая часть исследований о влиянии культивирования на онтогенез, проводятся на эмбрионах мыши или кролика, при этом результаты используются для интерпретации процесса развития человеческих эмбрионов *in vitro*. (Heyner et al., 1989; Harvey and Kaye, 1991; Rappolee et al., 1992; Vaughn et al., 1992; Adamson, 1993; Dvorak and Hampl, 2005, Loutradis, 2006; Yao and Asayama, 2016)

Для более подробного понимания механизмов действия ростовых факторов и их эффективности в сфере ВРТ требуется дальнейшее проведение исследований, в том числе на эмбрионах человека, с рассмотрением результативности ВРТ циклов в клинической практике. В данной работе рассматриваются добавки с цитокинами, которые потенциально могут применяться в медицинской сфере ЭКО.

Обзор научной литературы

Общие принципы современного ЭКО

Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) — методы преодоления бесплодия, когда с помощью медицинских средств в обход патологических препятствий проводится оплодотворение и, в случае экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), культивирование эмбрионов в контролируемой лабораторной среде. Культивирование производится в питательных средах с поддержкой необходимого уровня pH, газового состава (O₂/CO₂) и температуры внутри инкубатора. (Salleh and Giribabu, 2014)

После оплодотворения, на первые сутки, эмбрион начинает дробление: формируется 2-4 бластомера, на 3 день состоит из 8 бластомеров, на 4 день образует морулу (12-32 плотно объединенных бластомеров), которая затем развивается в бластоцисту (шар с двумя линиями бластомеров, внутренней клеточной массой, и трофэктодермой) (Niakan et al., 2012). Во время развития бластоцисты клетки внутренней клеточной массы готовятся к дифференцировке, а наружные клетки трофэктодермы готовятся к инвазии в эндометрий матки и формированию трофобласта (Рис. 1) (Xenopoulos et al., 2012)

На пятый день в стадии бластоцисты, эмбрион переносят в матку биологической или суррогатной матери. Оставшиеся бластоцисты возможно криоконсервировать (наиболее используемый метод - витрификация) и хранить в жидком азоте для последующих переносов. Так как не каждая бластоциста может дать начало беременности, используется стратегия получения большого количества ооцитов от одной женщины, при гормональной стимуляции суперовуляции. Таким образом повышается шанс получения нескольких

жизнеспособных бластоцист из многих ооцитов. Стандартом считается получение не менее 80-90% зигот, от всех полученных ооцитов, и 45-80% качественных бластоцист от количества зигот (ESHRE, 2017).

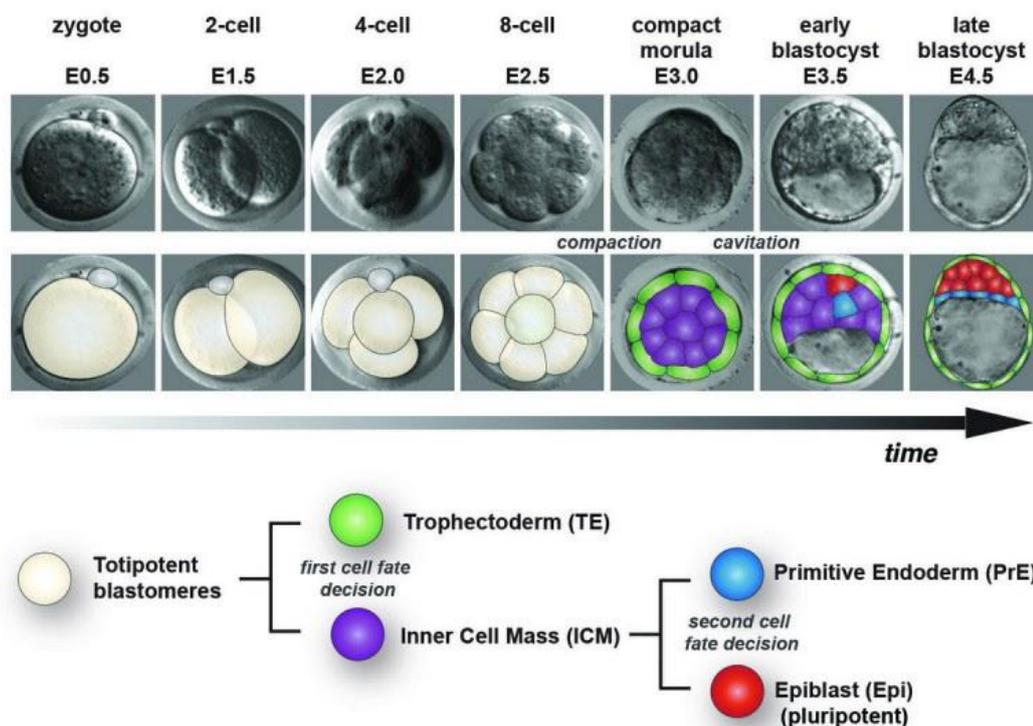


Рисунок 1. Развитие и дифференцировка бластомеров эмбриона, разделение тотипотентных бластомеров (Totipotent blastomeres) на две линии: трофэктодерму (TE) и внутреннюю клеточную массу (ICM). Внутренняя клеточная масса затем формирует две линии плюрипотентных клеток — эпибласт (Epi) и первичную эндодерму (PrE). (Schrode et al., 2013)

Но в случаях, когда стимуляция овуляции противопоказана, и получена лишь одна яйцеклетка, очень важно вырастить пригодную для дальнейшей работы бластоцисту, в такой ситуации критическое значение имеют возможности лаборатории и качество культуральных сред. Из-за влияния многочисленных факторов в условиях ЭКО лаборатории, рост и развитие полученных эмбрионов не всегда приводит к успешной имплантации, клинической беременности и родам. По этой причине с начала 80-х годов разрабатываются различные по составу питательные среды направленные на улучшение качества развития эмбрионов и повышение эффективности программ ЭКО (Menezo et al., 1984, Siristatidis et al., 2012).

История разработки сред культивирования

В 1882 году Сидней Рингер разработал раствор Рингера, солевой раствор, состав которого близок к составу биологических жидкостей, раствор успешно использовался для поддержания жизнеспособности сердца и мышечных тканей лягушки — это было первое описанное в научной литературе культивирование. Подобные солевые растворы после доклада Рингера разрабатывались один за другим: раствор Локка, раствор Тирода, раствор Кребса – Рингера, раствор Гэя, раствор Эрла и раствор Хенкса (Harrison, et al 1907; Gey, 1936; Earle et al., 1943; Hanks and Wallace, 1949). Состав был прост, включал только неорганические соли, иногда глюкозу, в качестве питательного вещества. Осмотическое давление, pH, и концентрации неорганических солей подбирались по требуемым физиологическим показателям, растворы успешно использовались для поддержания жизнеспособности некоторых тканей и клеток на короткий период, иногда до нескольких дней. (Dulbecco and Vogt, 1954)

С 1907 года начались попытки создать специализированные культуральные среды для работы с клетками и тканями животных. В сфере работы с эмбрионами первым успехом была разработка Хаммонда, в 1949 году в простом растворе неорганических солей (NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂) с добавлением глюкозы и яичного белка и желтка, ему удалось вырастить бластоцисты из 8-клеточных эмбрионов мыши (Рис. 2). Эмбрионы при этом были получены с помощью естественного зачатия, после промывки полового тракта мыши. (Hammond, 1949) Виттен позже исследовал pH сред, и обнаружил, что в среде Хаммонда происходят резкие изменения pH с 7.0 до 7.8, а формирование бластоцист выше значений pH 7.7 останавливается. Кроме того, ему удалось заменить яичный белок альбумином из бычьей крови и на основе раствора Рингера-Кребса “Krebs–Ringer–bicarbonate” (KRB), добавив глюкозу и антибиотики в состав, создать среду “M16” с буферной емкостью, которая отлично подходила для культивирования эмбрионов мышей, более того, они удачно приживались после культивирования и рождалось потомство.

В 1957 году Виттен выяснил, что при добавлении лактата в среду можно получать бластоцисты даже из 2х-клеточных эмбрионов, но не из зигот. Это явление было названо “Блоком дробления” — остановка развития эмбриона на какой-либо стадии дробления (Whitten, 1957). В свою очередь Бринстер попытался решить проблему блока дробления совместным культивированием эмбрионов с частями маточных труб и матки, но методика была сложна в исполнении и не давала стабильного результата, хотя позволила, в некоторых случаях, получить бластоцисты из зигот. В конце концов выявив оптимальные значения pH, осмотического давления и изучив влияние энергетических субстратов

и аминокислот на эмбрионы, ему удалось создать среду “Brinster’s medium for ovum culture 2” (ВМОС2) с пируватом и лактатом в составе, она улучшила формирование бластоцист, качественно и количественно, но не решала остановку дробления на стадии двух клеток (Brinster, 1965). В 1968 Биггерс совместно с Виттеном и Виттингэмом, смогли получить среду “Biggers–Whitten–Whittingham” (BWW), в которой эмбрионы определенной линии мышей развивались со стадии зиготы, но у потомства вновь наблюдался блок на этапе двух клеток, в той же среде (Whitten and Biggers, 1968).

Вдохновившись успехами Виттена, первые попытки культивирования человеческих эмбрионов начали Роберт Эдвардс и Патрик Стептоу. С 1969 года для экстракорпорального оплодотворения они использовали модифицированный раствор Тирода “Т6”, так как прежде в данном растворе успешно производилось ЭКО с яйцеклетками хомяков. (Edwards et al., 1969; 1971) Но при работе с человеческими половыми клетками и эмбрионами, результаты оказались неудовлетворительными. Для следующих шагов, Эдвардс протестировал 5 различных сред, лучшей показал себя раствор Хэма с добавлением 20% телячьей сыворотки “Ham’s F-10”, именно эта среда позволила получить первые бластоцисты и затем первую беременность и рожденную здоровую девочку. Данная среда широко применялась, для работы с животными клетками, в том числе половыми, но результативность с человеческими и мышинными эмбрионами была низкая. Часто наблюдалась остановка дробления эмбрионов на стадии до 4-8 клеток, а бластоцисты получали крайне редко.

Ещё долгое время перенос дробящихся эмбрионов (2-4 день развития) был основным в практике ВРТ (Edwards et al., 1981). К тому же, было показано что среда Хэма может негативно сказываться на развитии эмбрионов, в частности из-за высокого уровня свободных радикалов кислорода. Постепенно от данного варианта культивирования пришлось отходить, пробовались новые варианты сред и способы культивирования. (Quinn et al., 1982; Bongso et al., 1989; Loutradis et al., 1993; Goto et al., 1993).

С 1970 года разрабатывался новый подход к созданию сред для человеческих эмбрионов, близких к условиям *in vivo* (“Back to nature”), активно исследуется состав жидкости в фаллопиевых трубах и матке. Появляются различные среды, за основу которых взят состав жидкости из маточных труб животных (“Synthetic oviduct fluid medium”, “B2 medium”) и человека (“HTF” - human tubal fluid medium). Среду “B2” даже называли “Французская”, так как она активно использовалась именно во Франции в ранних попытках ВРТ у человека (Cohen et al., 2005). Состав среды “HTF” прост, он включает только неорганические соли, глюкозу, пируват, лактат, человеческий сывороточный альбумин

и антибиотики. Данная среда широко использовалась в ВРТ из-за простоты приготовления. Состав изначально предложен Квином, на основании ранее полученных данных о содержании солей и глюкозы в жидкости маточных труб у человека (Lippes et al., 1972; Borland et al., 1980). Уже после начала использования НТФ было показано, что глюкоза и фосфаты обладают некоторым токсическим эффектом для эмбрионов раннего этапа дробления, как у животных так и у людей. Так появляется среда “Basal XI НТФ” - бывшая “НТФ” где глюкозу заменили глютамином, убрали фосфаты и добавили ЭДТА. Позже была представлена среда “Preimplantation stage-1 (P1)” на основе “Basal XI НТФ”, где заменены ЭДТА и глютамин уже на цитрат и таурин, соответственно. (Quinn et al., 1985)

Только в 1977, команда исследователей (Abramczuk et al., 1977) смогли преодолеть остановку дробления у мышей, при этом использовалась сокультивирование с соматическими клетками и добавление ЭДТА. И через 10 лет, в 1988 году, Шайни и Бавистер окончательно доказали, что у эмбрионов блок на стадии двух клеток происходит из-за наличия глюкозы и фосфатов. Основываясь на этих результатах, Шатот с коллегами разработали среду “Chatot– Ziomek–Bavister” (CZB), на основе среды “ВМОС2”, при этом заменили глюкозу на глютамин и полностью убрали фосфаты. Данная среда позволила преодолеть остановку дробления, в том числе и у человека, но теперь остановка в развитии происходила при переходе от морулы к бластоцисте, на данном этапе потребовалось вновь добавить глюкозу в среду (Schini and Bavister, 1988; Chatot et al., 1989).

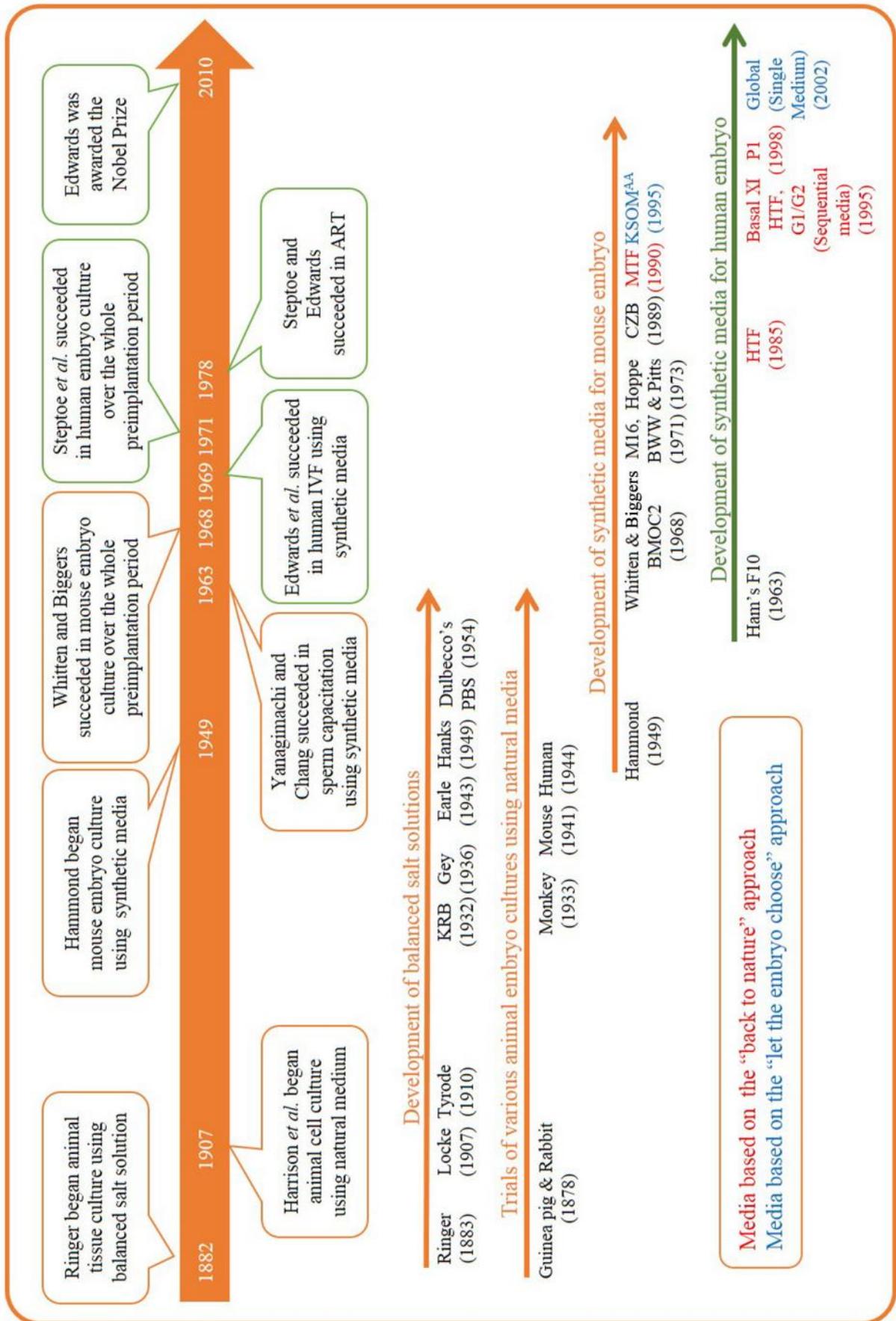


Рисунок 2. Хронология развития культуральных сред, от первых растворов, до современных культуральных сред предназначенных для ВРТ. (Yao and Asayama, 2016)

Основываясь на этом опыте, ученые группы Гарднера проанализировали концентрации глюкозы, пирувата и лактата в жидкостях труб и матки у человека и обнаружили, что концентрации энергетических компонентов различаются, в соответствии с изменениями потребностей эмбрионов в зависимости от стадии развития. Позже, исследовали раствор заменимых и незаменимых аминокислот “Eagle’s minimum essential medium” (MEM) и сообщили, что добавление “MEM” при культивировании эмбрионов имеет положительный эффект. В последующих исследованиях обнаружено, что добавление аминокислот, витаминов и ЭДТА снижает токсичность глюкозы для эмбрионов на стадии дробления, и полностью элиминируется токсический эффект, если концентрации компонентов и глюкозы подобраны соответственно потребностям эмбрионов на каждом отдельном этапе (Gardner et al., 1996; Lane and Gardner, 1997).

Основываясь на полученных данных, группа Гарднера разработала в 1995 году собственные последовательные среды “G1” и “G2”, в которых энергетические субстраты, аминокислоты и количество EDTA были подобраны для отдельных стадий развития эмбриона — G1 (дни 1-3) и G2 для культивирования до бластоцисты (дни 3-5). Эти среды улучшили показатели формирования бластоцист и сделали перенос бластоцист более популярным методом. (Lane and Gardner, 1998; Gardner and Lane., 2000)

Подход “Back to nature”, позволил получить среды типа HTF, улучшить ситуацию в ВРТ и теоретически, был очень хорош. Тем не менее, полную картину условий *in vivo* скопировать было невозможно, лишь часть компонентов естественных жидкостей труб и матки были тщательно проанализированы, кроме того, обнаружилось значительное различие состава жидкостей репродуктивного тракта у разных женщин. Помимо прочего, эмбрион в культуре испытывает стрессы, специфические для *in vitro* условий, которые отсутствуют в естественных условиях роста (воздействие света, высокие концентрации кислорода, резкие изменения pH и температуры, накопление отходов в окружающей питательной среде). Таким образом, невозможно утверждать, что имитирование в средах состава близкого к условиям *in vivo* является оптимальным подходом. (Summers and Biggers, 2003)

Параллельно с группой Гарднера проходила разработка сред с использованием статистической оптимизации (подход «Let the embryo choose») в рамках национальной программы “NonHuman In Vitro Fertilization and Preimplantation Development” (названной в обиходе “Culture Club”), в Соединенных Штатах, группа Джона Биггера начала работу

по оптимизации культуральной среды с помощью статистического подхода, называемого симплекс-методом. Данный метод использует компьютерный алгоритм для поиска самой чувствительной точки в системе “концентрация вещества-ответ”. Исследователи смогли оптимизировать концентрации 10 компонентов (NaCl, KCl, K_2HPO_4 , MgSO_4 , лактат, пируват, глюкоза, сывороточный альбумин, ЭДТА и глютамин) в среде “CZB”, ориентируясь на количество сформированных бластоцист *in vitro*, эксперименты ставились в основном на мышах. В 1992 году они объявили о получении симплекс-оптимизированной среды (“SOM”) с пониженной относительно прошлого варианта “CZB” концентрацией NaCl, K_2HPO_4 , пирувата и глюкозы (Lawitts and Biggers, 1992), а в 1993 году создали среду KSOM, где повысили концентрацию калия. Позже, (Ho et al., 1995) доработал среду, назвав “KSOMAA”, добавил незаменимые и заменимые аминокислоты (использовав 0,5×“MEM”), и сообщил об улучшении формирования бластоцист.

В итоге KSOM и KSOMAA оказались эффективны не только для эмбрионов мыши, но и для культивирования эмбрионов коров, кроликов, свиней, обезьян и человека (Liu et al., 1996; Weston and Wolf, 1996; Deng and Yang, 2001). Сейчас, KSOMAA широко используется под торговой маркой “Global” в ВРТ человека, кроме того, среды подобные Global, тоже коммерчески доступны (Biggers and Racowsky, 2002; Macháty et al., 1998; Morbeck et al., 2014).

В последовательных культуральных средах (шаговых средах типа “G1” и “G2”) незаменимые аминокислоты не добавлялись в среду дробления (дни 1-3), считалось, что они оказывают вредное воздействие на эмбрионы (Lane and Gardner, 1997). Однако при исследовании со средой KSOM подобных негативных эффектов не наблюдалось. Кроме того, незаменимые аминокислоты есть и в репродуктивном тракте, как полагают, они участвуют в импринтинге и других важных реакциях, например, синтезе глутатиона; в настоящее время, незаменимые аминокислоты добавляются в некоторые используемые среды дробления. (Miller and Schultz, 1987; Dumoulin et al., 1992; Ménézo et al., 2013). ЭДТА, которая, как считалось, оказывала вредное воздействие на развитие и была убрана из последовательных сред, используемых для роста бластоцисты (дни 3-5), в итоге, при использовании в строго необходимых для эмбрионов концентрациях, не проявляла токсического эффекта (Biggers et al., 2006).

Многочисленные сравнения последовательных сред с одношаговыми средами до настоящего времени не показали, что какая-либо из двух систем лучше (Biggers and Summers, 2008). В итоге, оптимальным подходом при выборе среды для культивирования эмбрионов, считается понимание характеристик обоих типов и подбор наиболее подходящих сред/вариантов культивирования для каждой отдельной лаборатории. Преимущество одношаговой среды состоит в том, что нет необходимости менять среду во время культивирования при переходе эмбрионов от стадии дробления к бластоцисте, для последовательных сред это обязательно. Следить за условиями культивирования в одношаговых средах типа “KSOM” проще, исключается возможное стрессирование эмбрионов, при замене чашек во время переноса из одной среды в следующую. Также одношаговая среда позволяет избежать изменений pH, температуры, состава газового окружения и воздействия света, которые происходят во время замены сред, при этом, эмбрион не теряет аутокринных факторов, которые производит. (Mantikou et al., 2013)

Использование серийно выпускаемых инкубаторов с возможностью time-lapse съемки (регулярная фотосъемка состояния эмбрионов с определенной периодичностью, в итоге формирующая видеофильм подробного развития) в последние годы позволило проводить непрерывные наблюдения от начала дробления до бластоцисты, не нарушая условий культивирования. Таким образом, до момента пока количество накопленных отходов эмбриона и продуктов распада в среде не критично по токсичности, есть существенные плюсы в использовании одношаговой среды, не требующей замены. И напротив, если задаться целью изменения условий культивирования для разных стадий развития эмбриона (как это происходит при перемещении эмбриона в половом тракте), многошаговые среды имеют свои преимущества, например, возможно изменять pH среды для разных стадий роста эмбрионов (Miller, 2014). При использовании одношаговых сред для изменения pH необходимо изменение концентрации CO₂ в инкубаторе или перемещение чашки в отдельный инкубатор с другими показателями CO₂. При использовании последовательных сред, производитель готовит среду так, чтобы одинаковая концентрация бикарбоната обеспечивала оптимальные значения pH для каждой стадии роста, то есть необходимость менять концентрацию CO₂ в инкубаторе отпадает. (Yao et al., 2016)

Проблематика современного культивирования

В отличие от соматических клеток, эмбрионы мыши и человека могут развиваться от зиготы до бластоцисты в относительно простых средах, состоящей из лишь из неорганических солей и энергетических компонентов. В ранний период развития ВРТ эмбрионы успешно культивировали в средах без аминокислот и витаминов (например, M16, BWW и HTF). Когда была показана важность аминокислот и витаминов для качественного роста эмбрионов, появились среды с этими компонентами в составе, ещё позже, начали добавлять факторы роста и гормоны в среды для культивирования. Но, по сей день имеются лишь отрывочные знания о концентрациях и комбинациях цитокинов оптимальных для применения. (Yao and Asayama, 2017)

Факторы роста и гормоны

В случае соматических клеток факторы роста и гормоны чрезвычайно важны для деления, роста и дифференцировки клеток, основой успешного культивирования является соблюдение оптимальных сочетаний и концентраций факторов роста и гормонов (Barnes and Sato, 1980). Большинство же питательных сред для эмбрионов вообще не содержат эти вещества, потому что даже без факторов роста или гормонов, эмбрионы могут развиваться до стадии бластоцисты *in vitro* (Robertson et al., 2015).

Хотя не ясно в какой степени отсутствие факторов роста и гормонов влияет на культивируемые эмбрионы, было отмечено несколько отличий по сравнению с эмбрионами, полученными *in vivo* — это более медленный рост и темп развития (эмбрионы коров и хомяков), меньшее число клеток у бластоцист (мышь, свинья и крыса), более высокий оксидативный стресс (мышь), некоторые метаболические изменения (мышь, кролик), изменения в экспрессии генов и белков (мышь, бык и овца), изменения внутриклеточной структуры и увеличение липидных капель (крупный рогатый скот), снижение вероятности имплантации и наступления беременности (крыса) (Crosie et al., 2000; 2001; Kito et al., 2008; Schwarzer et al., 2012), а также меньший вес новорожденных у человека (Zandstra et al., 2015). Отсутствие факторов роста и гормонов может объяснять некоторые из этих различий.

В женском репродуктивном тракте эмбрион развивается при взаимодействии с внутренней “материнской” средой. В “диалоге эмбриона с матерью” включены рецепторы и факторы роста (Рис. 3). Например, в репродуктивном тракте человека, включая фаллопиевы трубы и матку, экспрессируются различные факторы роста (Таблица 1), такие как эпидермальный фактор роста (EGF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), гепарин-связывающий эпидермальный фактор

роста (HB-EGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF-1) и фактор ингибирования лейкозных клеток (LIF). Ооциты и эмбрионы человека имеют рецепторы к этим цитокинам на клеточных поверхностях (Sjöblom et al., 2002; Wånggren et al., 2007; Hegde and Behr, 2012). Сообщалось о различных положительных эффектах, возникающих в результате добавления таких факторов роста в среду культивирования эмбрионов человека: ускорение развития, увеличение количества бластоцист к пятому дню и увеличение числа клеток у бластоцист (Hsieh et al., 2000; Spanos et al., 2000).

Относительно недавно в клиниках экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) стали активно использовать инсулин или GM-CSF с целью увеличения вероятности имплантации и снижения числа спонтанных аборт (Ziebe et al., 2013). Например, в настоящее время коммерчески доступна среда “EmbryoGen”, содержащая GM-CSF в дозе 2 нг/мл, которая применяется в клиниках ЭКО по всему миру. Ранее было показано, что добавление в культуральную среду этого фактора существенно ускоряет развитие эмбрионов и у некоторых видов грызунов, в частности у мышей и хомячков Кэмпбелла. Ниже мы рассмотрим изученные эффекты GM-CSF и LIF в раннем развитии эмбриона, так как это наиболее используемые цитокины в практике ВРТ, на текущий момент. (Robertson et al., 2001; Sjöblom et al., 2005; Robertson et al., 2015; Брусенцев и др., 2015)

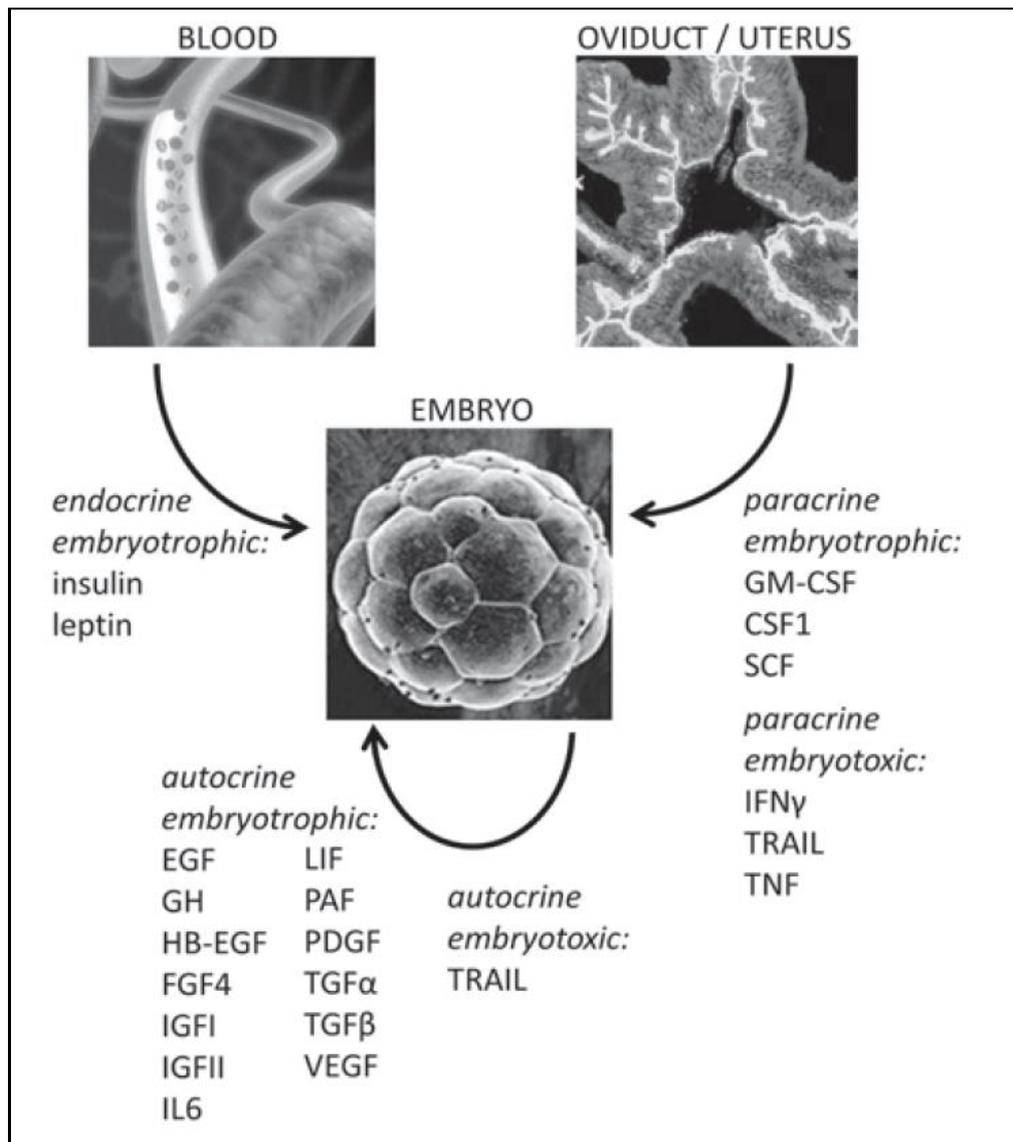


Рисунок 3. Цитокины влияющие на предимплантационный эмбрион репродуктивном тракте можно поделить на эмбрио-трофические (анти-апоптотические), эмбриотоксичные (апоптотические) и по происхождению аутокринные, паракринные и эндокринные. Практически все цитокины, которые синтезируются эмбрионом самостоятельно, также секретируются у женщин в репродуктивном тракте, поэтому возможно как аутокринное так и паракринное воздействие. Но часть цитокинов имеет только материнское происхождение, например GM-CSF и CSF1, не производятся эмбрионом. Некоторые эмбриотоксичные факторы IFN γ , TRAIL и TNF, синтез которых зависит от событий в окружающей среде могут оказывать эффекты, приводящие к гибели эмбриона. (Robertson et al., 2015)

Таблица 1. Сигнальные пути ключевых цитокинов влияющих на клеточный рост и гибель у преимплантационного эмбриона. Столбцы “Эмб.” и “РТ” указывают на источник синтеза цитокина - эмбриональные клетки и ткани женского репродуктивного тракта, соответственно.

Лиганд	Рецептор	Эмб.	РТ	Сигнальный путь
Эмбриотрофические факторы				
GM-CSF	GMR α	-	+	JAK/STAT5, PI3K-AKT, MAPK
SCF	c-kit	-	+	ERK, JAK/STAT1, PI3K-AKT
CSF1 (M-CSF)	c-fms	-	+	ERK, JAK/STAT1, PI3K-AKT
Insulin	IRS	-	a*	PI3K-AKT
Leptin		-	a*	
EGF	EGFR	+	+	JAK/STAT1/STAT3, PI3K-AKT, MAPK
HB-EGF	EGFR	+	+	JAK/STAT1/STAT3, PI3K-AKT, MAPK
GH	GHR	+	+	JAK/STAT5, PI3K-Akt, MAPK
IGF-I	IGF-IR	+	+	PI3K-AKT
IGF-II	IGF-IIR	+	+	PI3K-AKT
IL6	IL6R, gp130	+	+	JAK/STAT3, PI3K-AKT, MAPK
LIF	LIFR, gp130	+	+	JAK/STAT3, PI3K-AKT, MAPK
PAF	PAFR	+	+	PI3K-Akt
TGF α	EGFR	+	+	JAK/STAT1/STAT3, PI3K-AKT
TGF β	TGFBR1, TGFBR2	+	+	SMAD2/3, MAPK
Эмбриотоксичные факторы				
IFN γ	IFNGR1, IFNGR2	-	+	JAK/STAT, SMAD6/7, apoptosis
TNF	TNFR1	-	+	MAPK, NF κ B, apoptosis
TRAIL	TRAILR (DR4, DR5)	-	+	Apoptosis

a* Инсулин и лептин транспортируется в просвет маточных труб и матку из крови, в то время как остальные указанные факторы синтезируются локально эпителием труб и эндометрия. Источник данных по сигнальным путям Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes (KEGG; <http://www.genome.jp/kegg/>) (Robertson et al., 2015)

Фактор ингибирования лейкозных клеток (LIF)

Фактор ингибирования лейкозных клеток (Leukemia inhibitory factor или LIF), плейотропный цитокин из семейства интерлейкинов-6 (IL-6), регулирует различные клеточные функции посредством связывания с мембранными рецепторами LIFR и gp130. В настоящее время идентифицированы три варианта LIF, которые включают мембранно-ассоциированные, диффузные и растворимые формы, выступающие в качестве паракринных факторов при имплантации эмбрионов (Aghajanova, 2004; Mathieu et al., 2012). Фактор ингибирования лейкозных клеток получил свое название благодаря своей способности индуцировать терминальную дифференцировку миелоидных лейкозных клеток, предотвращая тем самым их дальнейший рост. Другие свойства, приписываемые цитокину, включают: стимулирование роста и дифференцировки различных типов клеток-мишеней, влияние на метаболизм в костных тканях, кахексию, развитие нервной системы, участие в эмбриогенезе и воспалении. Было показано, что LIF облегчает имплантацию в исследованиях на мышах и, возможно, этот эффект существует и у людей. Есть предположение, что рекомбинантный человеческий LIF может улучшать вероятность имплантации эмбриона при бесплодии неясного генеза. (Takahashi et al., 2008)

Связывание LIF с LIFR (Рис. 4) приводит к образованию высокоаффинного функционального рецепторного комплекса совместно с интегральным белком гликопротеином 130 (glycoprotein 130, gp130), который при активации передает сигнал, трансдуктору и активатору транскрипции (STAT). В дополнение к мембраносвязанному рецептору были найдены растворимые формы рецептора LIF, которые могут либо увеличивать, либо снижать активность LIF. Растворимые формы LIFR и gp130 могут работать как антагонисты, конкурирующие с мембраносвязанным рецептором. Между тем, супрессор сигнализации цитокинов 1 (Suppressors of cytokine signaling 1, SOCS1) также может ингибировать передачу сигналов LIF и действовать как отрицательный регулятор LIF (Takahashi et al., 2003; Metz et al., 2008; Sun et al., 2013). Когда LIF с LIFR связываются SOCS1 может ингибировать последующее действие LIF через сигнальный путь JAK1-STAT. SOCS1 также может ослаблять другие сигнальные каскады, индуцированные комплексом LIF-LIFR-gp130, например, сигнальный путь ERK-MAPK.

Некоторые исследования показали, что LIF, gp130 и STAT имеют решающее значение для имплантации эмбрионов. Есть данные, о нарушении имплантации бластоцист у мышей, нокаутированных по гену LIF. В то же время, мыши с мутацией gp130 и делецией по сайту связывания STAT бесплодны, что указывает на то, что gp130 и STAT ключевые

в регуляции действия LIF. У мышей, LIF матки демонстрирует двухфазную картину экспрессии с первым пиком, при подготовке к окну имплантации матки, второй пик наблюдается в эндометрии, вблизи места имплантации бластоцисты. Параллельно LIFR и gp130 экспрессируются в эпителии фаллопиевых труб и матке в течение раннего периода имплантации, что говорит о чрезвычайной важности LIF в имплантации эмбрионов.

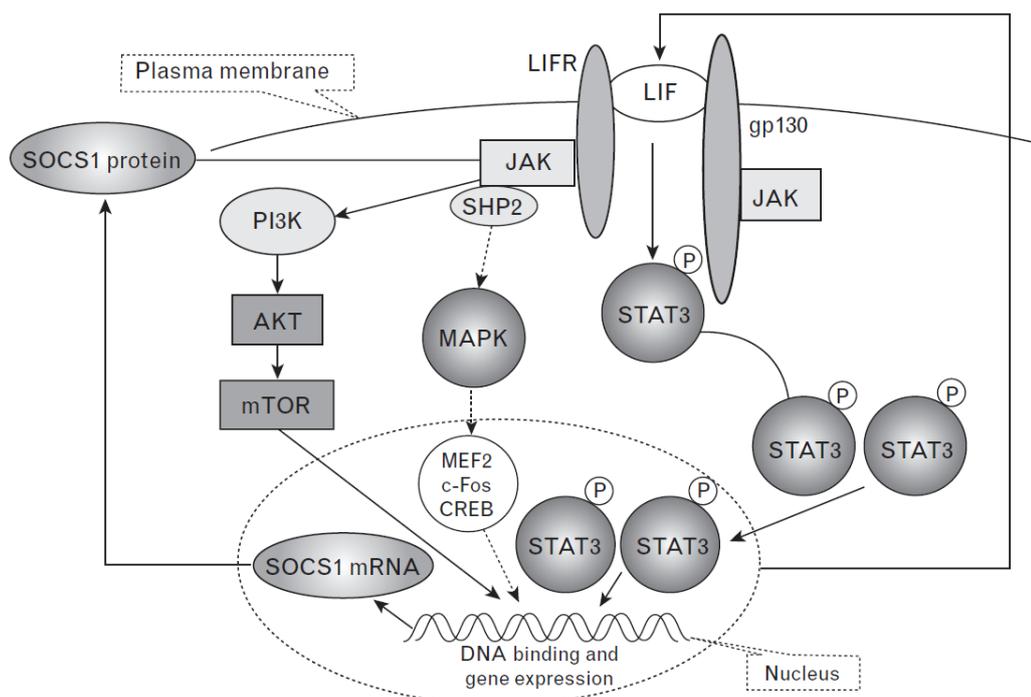


Рисунок 4. Сигнальный путь LIF с положительной и отрицательной обратной связью. LIFR, β рецептор фактора ингибирования лейкозных клеток ; JAK, Янус-киназа; STAT3, трансдуктор и активатор транскрипции 3; SHP2, Src тирозин-фосфатаза с доменом гомологии Src2; PI3K, фосфатидилинозитол-3-киназа; AKT, серин/треонин-протеинкиназа, протеин-киназа β ; MAPK, митоген-активируемая протеинкиназа; mTOR, мишень рапамицина млекопитающих; SOCS1, супрессор сигнализации цитокинов 1; MEF2, миоцит-специфический энхансерный фактор-2; c-Fos, прото-онкоген, гомолог вирусного онкогена (FBJ) остеосаркомы мыши; CREB, цАМФ-зависимый транскрипционный фактор; P, фосфорилированная молекула. Сплошная линия обозначает прямую активацию, а пунктирная линия побочную активацию.

Nucleus - ядро; **Plasma membrane** - плазматическая мембрана; **DNA binding and gene expression** - связывание с ДНК и экспрессия гена. (Aghajanova, 2010)

Кроме описанного, отмечено что стероидные половые гормоны тоже способны регулировать экспрессию LIF, LIFR и gp130 в матке. (Stewart, 1994; Song and Lim, 2006; Boyle and Robb, 2008; Takahashi et al., 2008) LIF в норме экспрессируется в трофэктодерме эмбриона, а его рецептор LIFR экспрессируется во внутренней клеточной массе. Поскольку эмбриональные стволовые клетки получают из внутренней клеточной массы (ВКМ) на стадии бластоцисты, соответственно после отбора ВКМ клетки больше не получают естественный LIF, секретируемый трофэктодермой. Сейчас разработан один из способов получения рекомбинантного человеческого LIF лабораторией “InVitria”, с использованием растительных клеток. (Youngblood et al., 2014)

В настоящее время имеется ограниченная информация относительно регуляции экспрессии LIF, LIFR и gp130 у людей. Исследование *in vitro* с использованием линии стромальных клеток эндометрия человека показало, что эстроген и прогестерон способны усиливать экспрессию мРНК рецептора LIF. Существуют данные что у человека хорионические гонадотропины (ХГЧ) повышают экспрессию LIF. ХГЧ и трансформирующий фактор роста β (TGF- β) *in vitro* увеличивают секрецию LIF эпителиальных клеток эндометрия, полученных во время фолликулярной или секреторной фаз менструального цикла. Между тем, было также обнаружено, что у людей семенная жидкость стимулирует секрецию LIF эпителиальными клетками эндометрия *in vitro*. (Gutsche et al., 2003; d’Hauterive et al., 2004; Shuya et al., 2011)

Существует несколько клинических подтверждений указывающих на важную роль LIF у человека при имплантации эмбрионов. Так у фертильных женщин экспрессия LIF протекает на умеренном уровне или повышена в пролиферативной и секреторной фазах менструального цикла, а у женщин с бесплодием или ранними выкидышами в анамнезе наблюдался сниженный уровень экспрессии LIF. Тем не менее, не было отмечено различий в экспрессии gp130 в эндометрии между фертильными и бесплодными женщинами. Дальнейшая оценка маточной жидкости показала, что в эндометрии бесплодных женщин секретируется значительно меньшее количество LIF и gp130, чем у фертильных женщин лютеиновую фазу цикла, то есть в период окна имплантации. (Sherwin et al., 2002; Tawfeek et al., 2012; Wu et al., 2013).

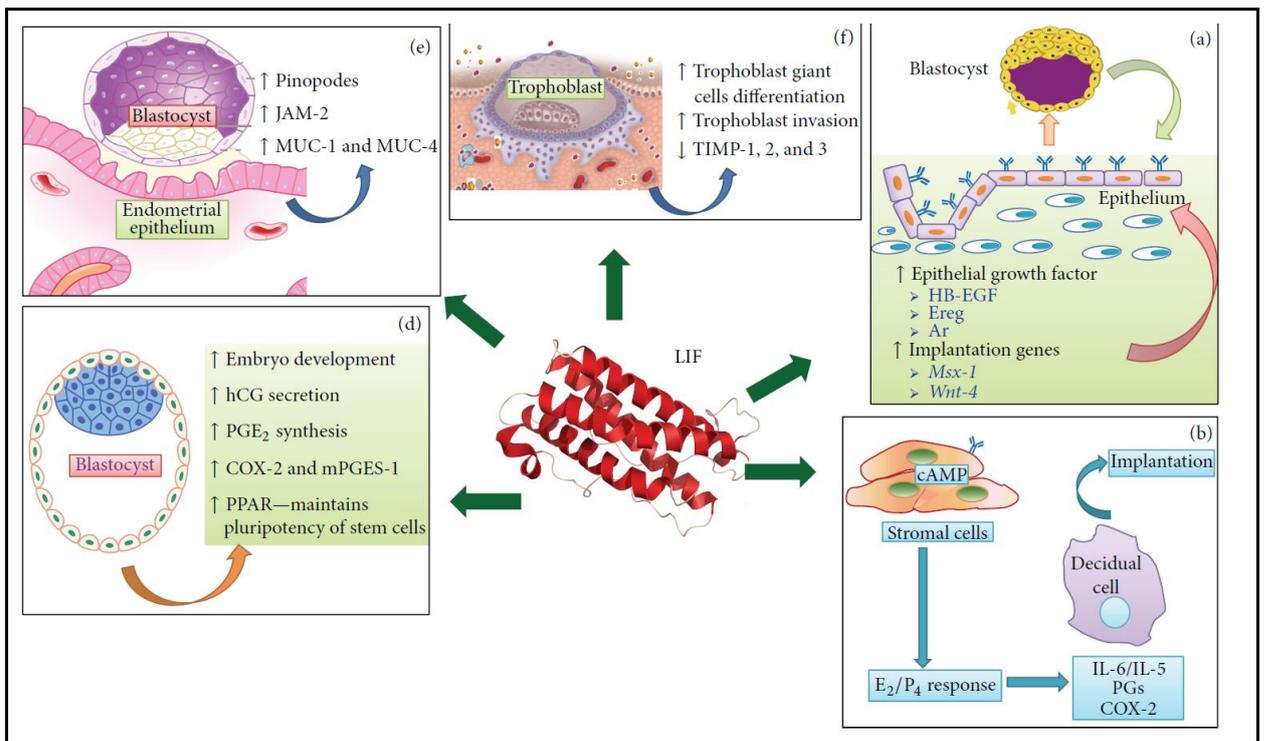


Рисунок 5. Роль LIF в развитии и во время имплантации эмбриона.

Известные эффекты LIF в имплантации эмбрионов. LIF увеличивает экспрессию генов EGF и рецептивность эндометрия. LIF, продуцируемый эндометрием и бластоцистой, регулирует рост и развитие эмбриона. Между тем, LIF стимулирует децидуализацию эндометрия, через стимуляцию выработки цитокинов и простагландинов. LIF также участвует в усилении эмбрио-эндометриального взаимодействия влияя на пиноподии. LIF стимулирует дифференцировку клеток трофобласта и увеличивает способность трофобласта проникать в строму матки. **LIF**: Фактор ингибирования лейкозных клеток, **HB-EGF**: гепарин-связывающий эпидермальный фактор роста, **Ereg**: эпирегулин, **Ar**: амфирегулин, **E2**: 17 β -эстрадиол, **P4**: прогестерон, **IL**: интерлейкины, **PGs**: простагландины, **COX**: циклооксигеназы, **NK**: естественные киллеры, NK-клетки, **PPAR**: Рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами, **PGE2**: простагландины E2, **hCG**: хорионический гонадотропин человека, **MUC**: муцин, **JAM**: адгезивные молекулы (junctional adhesion molecules). (Salleh and Giribabu, 2014)

In vitro показано, что добавление смеси инсулиноподобного фактора роста IGF-I, фактора роста β -фибробластов (FGF), трансформирующего фактора роста TGF- β 1, гранулоцитарно-моноцитарного колониестимулирующего фактора GM-CSF и LIF, ускоряет развитие бластоцист, особенно сокращается срок экспансии и хетчинга. (Neira et al., 2010; Movaghar and Askarian, 2012; Hambiliki et al., 2013)

Лептин совместно с LIF, вызывал увеличение доли бластоцист с хетчингом, и в то же время снижал уровень апоптоза *in vitro* среди бластомеров через сигнальные пути STAT3. Было обнаружено, что LIF влияет на секрецию ХГЧ клетками трофобласта *in vitro*. (Leduc et al., 2012)

Сообщалось также, что LIF индуцирует синтез простагландина E (PGE₂), важного медиатора имплантации и децидуализации, клеточной линией трофобластов человека через стимуляцию экспрессии ферментов COX-2 и митохондриальной PGE синтазы-1 (mPGES-1). Также, LIF поддерживает плюрипотентность эмбриональных стволовых клеток мыши в культуре за счет стимуляции рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом (PPAR), транскрипционных факторов ядерного рецептора, которые регулируют LIF-индуцированный рост и самообновление посредством сигнального пути тирозинкиназы 2-STAT3 (Mo et al., 2010).

Всё это демонстрирует, что LIF — важный участник в следующих событиях при имплантации (Рис. 5):

- трансформация эндометрия в изменение рецептивности
- эмбрио-эндометриальное взаимодействие
- децидуализации эндометрия
- инвазия трофобласта
- рост и развитие бластоцисты
- инфильтрация лейкоцитов в матку

Обнаружено также, что LIF играет важную роль в регуляции синтеза простагландинов (PG). В этой главе обобщены современные знания о роли LIF в имплантации эмбрионов, которые могут быть полезными для развития новых методик в ВРТ. (Staun-Ram and Shalev, 2005; Horita et al., 2007; Shuya et al., 2011; Wang et al., 2012, Mathieu et al., 2012)

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF)

GM-CSF является гематопоетическим цитокином, основное влияние которого направлено на сохранение жизнеспособности, пролиферацию и дифференцировку миелоидных лейкоцитов и их предшественников. Состояние активации и функциональное поведение зрелых моноцитов/макрофагов, гранулоцитов и дендритных клеток также контролируются GM-CSF, который может стимулировать хемотаксис и адгезию, фагоцитоз и цитотоксичность, процессинг и презентацию антигена, а также индукцию анти-опухолевого иммунитета (Gasson, 1991). Эти свойства ставят GM-CSF в качестве ключевого регулятора защиты хозяина и реакции на вмешательства извне и травмы (Hamilton and Anderson, 2004). В гематопоетических клетках GM-CSF оказывает свое влияние на клеточную поверхность-мишень путем связывания с высокоаффинным

гетеродимерным рецепторным комплексом (GM-CSF-R α , GMR α), содержащим компоненты α - и β -субъединиц из надсемейства рецепторов гематопоетина (Рис. 7).

В репродуктивной системе GM-CSF вырабатывается эпителиальными клетками под влиянием эстрогенов в матке и фаллопиевых трубах человека, локально регулирует пролиферацию и дифференцировку моноцитов и гранулоцитов. (Robertson and Seamark, 1992; Sjoblom et al., 1999) Многие клетки, включая эндотелиальные клетки, олигодендроциты, некоторые опухолевые клетки и клетки эмбрионов и трофобласта, также экспрессируют рецепторы GM-CSF и обладают чувствительностью к этому цитокину (Robertson, 2007). Когда было обнаружено, что GM-CSF и мРНК его рецептора экспрессируются и секретируются в яичнике, появилось предположение, что GM-CSF может участвовать в локальной регуляции активности яичников (Jasper et al., 1996; Siristatidis et al., 2012). Ткани матки и плаценты также считаются источником гематопоетических клеток, а GM-CSF важный компонент регуляции активности в этих тканях. В матке небеременных мышей GM-CSF синтезируется главным образом на слизистой поверхности эпителиальных клеток маточных труб и желез эндометрия, при этом стероидными гормонами яичников регулируется экспрессия в течение эстрального цикла (Robertson et al., 2005).

В случае спаривания, и попадания в матку мужской семенной жидкости, экспрессия GM-CSF увеличивается, особенно при овуляции. Дело в том, что специфические факторы из семенной плазмы, например, трансформирующий ростовой фактор- β (TGF β), взаимодействуют с рецепторами на эпителиальных клетках матки, стимулируя выработку GM-CSF вместе с другими про-воспалительными цитокинами и хемокинами (Robertson, 2007). Позже, многочисленные клинические исследования показали эмбрио-трофические свойства, т.е. стимулирующее воздействие на развитие внутренней клеточной массы эмбрионов, *in vitro* и *in vivo*, у предимплантационных эмбрионов. GM-CSF активно участвует в процессе развития эмбрионов, повышает жизнеспособность эмбрионов, оказывая положительные эффекты на процессы: дробления клеток, развития бластоцисты, хетчинга и при имплантации эмбрионов в эндометрий — что наблюдается и у людей, и у животных (Рис. 6). (Robertson et al., 1999; Siristatidis et al., 2012)

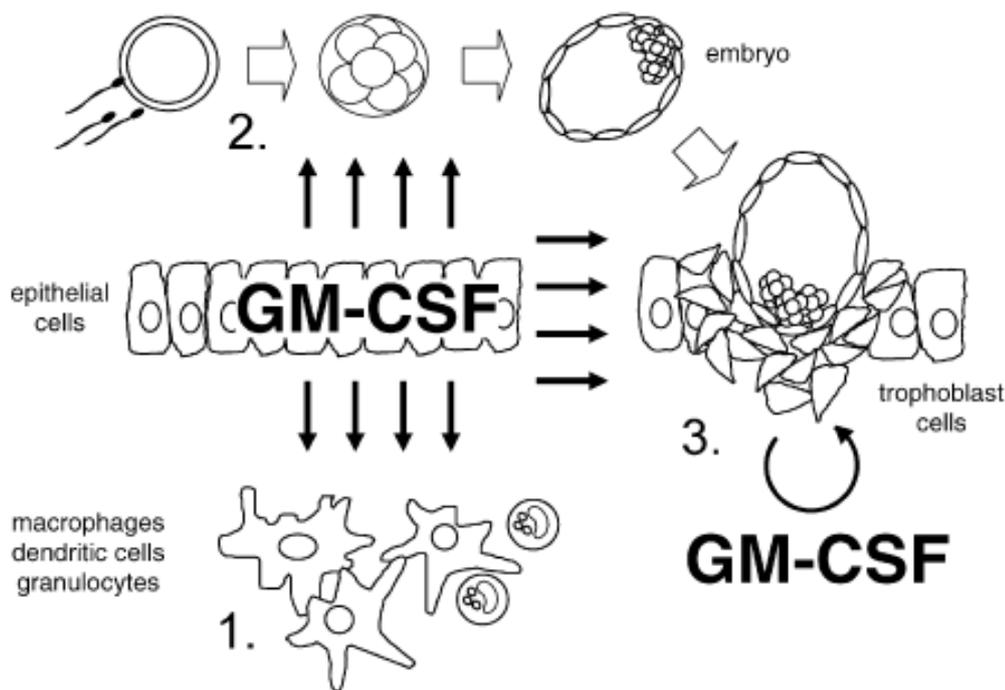


Рисунок 6. GM-CSF синтезируется эпителием эндометрия матки и клетками плаценты. Работает в регуляции: (1) активности лейкоцитов в матке при иммунном ответе матери и децидуальной трансформации; (2) развития предимплантационного эмбриона; (3) дифференцировке трофобласта и формировании плаценты. (Robertson, 2007)

Экспрессия GM-CSF в эпителиальных клетках матки остается высокой в течение первых нескольких дней после зачатия, а затем, во время имплантации, снижается под влиянием прогестерона. Синтез сохраняется в течение всей беременности в матке вблизи места имплантации (децидуальной ткани) и в плаценте, где обнаруживаются транскрипты мРНК GM-CSF (Blois et al., 2004). В репродуктивном тракте человека синтез GM-CSF наиболее высок в течение периода, соответствующего зачатию и имплантации эмбрионов. В менструальном цикле экспрессия локализуется в железистых эпителиальных клетках маточного эндометрия с максимальной экспрессией в секреторной фазе. Эпителиальные клетки, выстилающие маточную трубу, также экспрессируют GM-CSF циклически зависимым образом, с максимальными уровнями в поздней пролиферативной и ранне-средней секреторной фазе (Hardy and Spanos, 2002; Rieger et al., 2004).

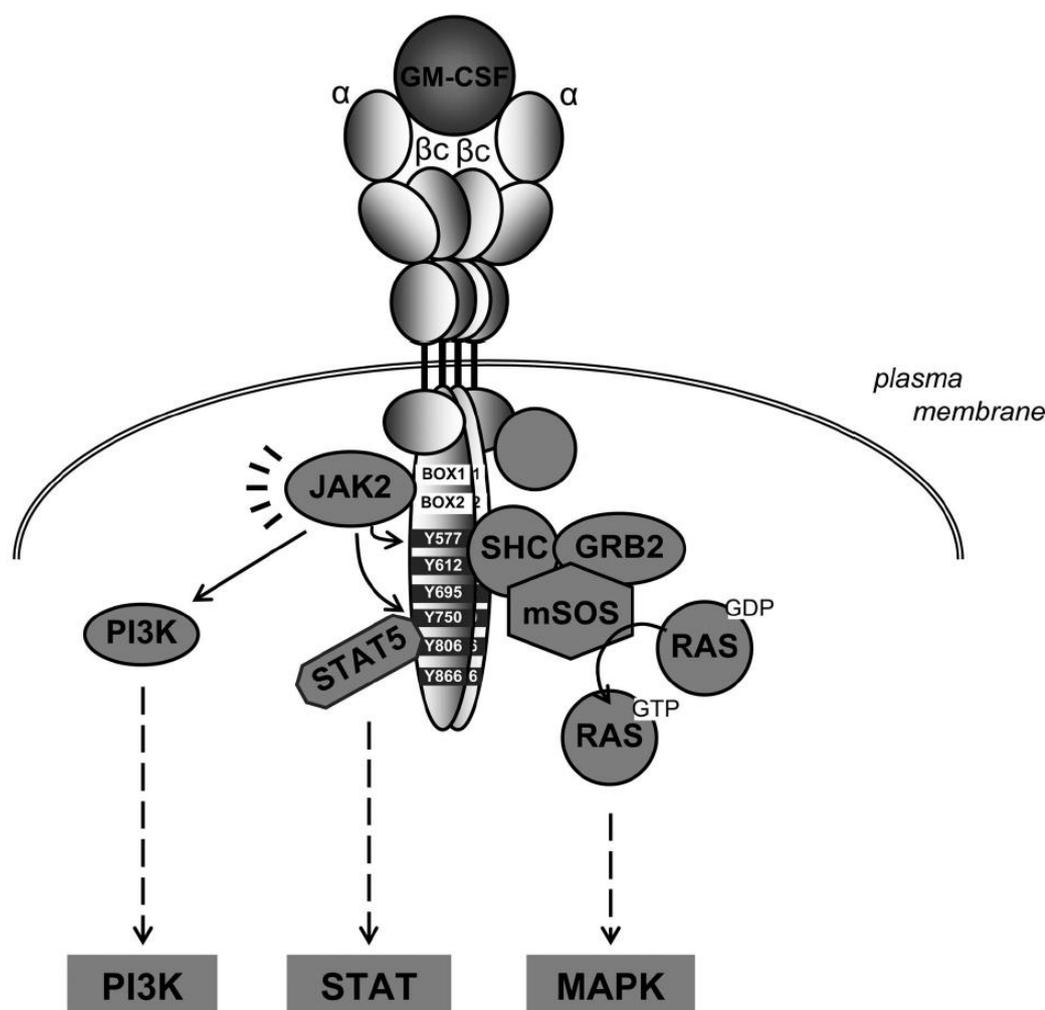


Рисунок 7. Рецептор GM-CSF (GM-CSF-R α , GMR α): инициация трансдукции. На плазматической мембране находятся разобщенные β c-димеры и цепи GM-CSF-R α - части будущего рецептора. При появлении GM-CSF формируется низкоаффинная связь между GM-CSF и GM-CSF-R α , и этот комплекс соединяется с β c-димером. После чего пары комплексов (2 молекулы GM-CSF, 2 цепи GM-CSF-R α и 2 β c-димера) объединяются с высоким сродством, формируя гексамер. При этом подмембранные части интегральных β c-димеров сходятся достаточно близко для активации JAK2, которая запускает дальнейшую передачу сигналов. Активированный JAK2 фосфорилирует несколько тирозиновых доменов (Y577, Y612, Y695, Y750, Y806 и Y866), которые впоследствии служат сайтами связывания белков. Фосфорилирование STAT запускает STAT-путь передачи сигналов. Активация пути MAPK инициируется фосфорилированием SHC через Y577, что включает взаимодействие с GRB2 и mSOS, и активирует RAS. Предполагается, что активация PI3K зависит от фосфорилирования остатка β c-димера, и связана с работой JAK2. (Van de Laar et al., 2012)

Как только начинается имплантация, зачатки ворсинок хориона, развивающейся плаценты вырабатывают GM-CSF, в синтезе участвуют: клетки цитотрофобласта, клетки Хофбауэра (плацентарные макрофаги) и фибробласты ворсинок — их активность регулируется факторами, происходящими из трофобласта, это фактор некроза опухоли- α (TNF α) и интерлейкином-1 (IL-1). Клетки трофобласта, отобранные из плаценты первого триместра беременности, а также клеточные линии трофобласта синтезируют мРНК и белок GM-CSF. мРНК GM-CSF также присутствует в материнской децидуальной ткани, при этом основной источник синтеза это натуральные киллеры специфичные для матки (Behr et al., 2005; Robertson 2010; Teklenburg et al. 2010).

GM-CSF и регуляция предимплантационного развития эмбрионов

Хотя зародыши могут развиваться в простых культуральных средах *in vitro*, в отсутствие экзогенных факторов роста, появляется все больше доказательств аутокринного и паракринного действия цитокинов в регуляции жизнеспособности и дифференцировки бластомеров ранних эмбрионов (Hardy and Spanos, 2002; O'Leary et al., 2004). GM-CSF, секретируемый в фаллопиевой трубе и матке в течение периода после зачатия, является важным регулятором роста и развития предимплантационного эмбриона. Эмбрионы мыши и человека синтезируют рецептор GM-R α с момента оплодотворения. Экспрессия происходит как в трофэктодерме, так и в ВКМ, при этом собранные рецепторные комплексы удалось выявить на клеточной мембране клеток трофэктодермы (Sjoblom et al., 2002). Если эмбрионы мыши удаляются из репродуктивного тракта сразу после оплодотворения и культивируются до стадии бластоцисты с использованием GM-CSF в культуральной среде, развитие идёт быстрее, при этом отмечается большее количество жизнеспособных бластомеров и более частая имплантация, в тестах *in vitro*, по сравнению с культивированием без GM-CSF. Кроме того, наблюдается повышенное поглощение глюкозы, снижается уровень апоптоза, так как снижается экспрессия регулятора апоптоза Bcl-2. Физиологическая роль GM-CSF в развитии бластоцисты подтверждена у мышей с нокаутом по GM-CSF, у них бластоцисты имеют меньшее количество клеток на момент имплантации (Behr et al., 2005; Karagenc et al., 2005; Robertson, 2007).

Эмбрио-трофические эффекты GM-CSF наиболее выражены у человеческих эмбрионов, где тяжело достичь высоких показателей развития бластоцист *in vitro*. Добавление цитокина к культуральной среде может увеличить в два раза долю бластоцист. Эмбрионы, при использовании в культуре GM-CSF, достигают стадии бластоцисты в среднем на 14 ч быстрее и содержат примерно на 35% больше клеток. Это связано, прежде

всего, с увеличением размера ВКМ, из-за уменьшения апоптотических процессов в бластомерах. У эмбрионов человека, при совместном культивировании с аутологичными клетками эндометрия, количество GM-CSF, выделяемого в культуральную среду, коррелирует с вероятностью успешной беременности после переноса эмбрионов. (Sjoblom et al., 2002; Robertson, 2007)

Влияние GM-CSF на развитие бластоцист *in vitro* также обнаружено для эмбрионов крупного рогатого скота и свиньи. У эмбрионов овец и в клетках трофэктодермы у крупного рогатого скота GM-CSF способствовал секреции интерферона- γ (IFN γ), молекулы распознавания беременности, важной для активации материнской поддержки развития эмбрионов. Похоже, что GM-CSF у ранних эмбрионов влияет не только на выживаемость на ранних этапах, но и на последующее развитие. В большом исследовании на эмбрионах мышей, сравнивались эффекты GM-CSF при культивировании эмбрионов *in vitro*, рост плода и постнатальный период, а также вероятность ожирения у взрослого потомства. Известно, что у мышей культивирование эмбрионов оказывает неблагоприятное воздействие на плод, что показывает слабая динамика роста в утробе матери, быстрый компенсаторный рост после рождения и увеличение жировых отложений у взрослых. Но добавление GM-CSF к эмбрионам до переноса в матку улучшает имплантацию эмбрионов и выравнивает динамику роста плода, а также частично смягчает неблагоприятные воздействия культивирования на постнатальный рост.

Это демонстрирует, что GM-CSF важный эмбрио-трофический фактор, необходимый для программирования оптимального развития плода и до, и после имплантации. Считается, что репродуктивный фенотип, наблюдаемый у мышей с нокаутом по GM-CSF, является следствием отсутствия GM-CSF именно в предимплантационном периоде. (Cui et al., 2004; Karagenc et al., 2005; Sjoblom et al., 2005; Michael et al., 2006)

Методика эксперимента

Принципы включения в исследование

Практическая часть исследования проводилась с октября 2016 по декабрь 2019 года: Пациенты проходящие лечение методом ЭКО, всего 356 пар, в лаборатории клиники ЦНМТ, в рамках исследования, были случайным образом поделены на группы:

- Группа 1, n=161, возраст 34.2±4.4 года
- Группа 2, n=193, возраст 34.1±4.0 года

В процессе работы получено 4396 эмбрионов, из которых 481 имели нарушения оплодотворения (0,1,3 или более пронуклеусов), эмбрионы, получаемые из подобных зигот, не рекомендуются к переносу, но способны формировать бластоцисты. С большой вероятностью не двухпронуклеарные зиготы несут хромосомные aberrации и иные генетические нарушения, подлежат утилизации, именно они включены в данное исследование без последующего переноса в полость матки.

Материалы и методы

Получение ооцитов осуществлялось под контролем УЗИ-аппаратуры врачом репродуктологом, методом пункции яичника после стимуляции суперовуляции. Полученные ооцит-кумулюсные комплексы осматривались эмбриологом под стереомикроскопом (Carl Zeiss Microscopy LLC, «Stemi» United States), и помещались в инкубатор до момента оплодотворения. Сперматозоиды, получаемые из эякулята пациентов, независимо от метода оплодотворения обязательно обрабатывались в градиентных средах (FertiPro, «Sil-Select» Belgium), затем происходил отбор по методике Swim-up, и отмывка в буферной среде (FertiPro, «Flushing medium» Belgium).

Необходимый метод оплодотворения ооцитов подбирался исходя из анамнеза бесплодной пары – ЭКО или ИКСИ (Интрацитоплазматическое введение сперматозоида в цитоплазму ооцита, применялось в случае тяжелого мужского фактора бесплодия). Для проведения ИКСИ использовалась манипуляторная система (NARISHIGE CO., LTD, «Narishige» Japan) с микроинструментами (CooperSurgical Medical Devices, «TPC» USA) для подготовки ооцитов к процедуре предварительно удалялись кумулюсные клетки методом денудации в среде, содержащей гиалуронидазу (FertiPro, «Hyaluronidase solution in Flushing Medium» Belgium)

Оплодотворение, оценка оплодотворения, контроль роста и развития осуществлялся на базе инвертированного светового микроскопа (Carl Zeiss Microscopy LLC, «Axio Observer» United States)

После оценки, зиготы с правильным оплодотворением (2 пронуклеуса) культивировались для клинических целей и лечения пациентов, не использовались в данном исследовании. Зиготы с нарушениями оплодотворения, культивировались до стадии бластоцисты при стандартных условиях (37°C, 6.5% CO₂, pH 7.2-7.25) в микрокаплях по 30 мкл до пятого дня, без смены одношаговой среды (Global total, «LifeGlobal» USA), без добавления факторов роста (Группа 1, 220 эмбрионов), либо в присутствии (Смесь рекомбинантных факторов роста, «Протеинсинтез» Россия) факторов роста, (Группа 2, 261 эмбрион). Итоговые концентрации ростовых факторов в среде составляли 5 нг/мл для GM-CSF и LIF, исходя из расчета разведения по рекомендации производителя.

На третий день развития производилась оценка качества бластоцист по критериям, основанных на буквенно-цифровой шкале Гарднера (Gardner and Lane, 2000):

- A8 – эмбрионы без замечаний, 8 бластомеров – 6 баллов
- B8 – эмбрионы, 8 бластомеров, с одним незначительным замечанием – 5 баллов
- C8-C10 – эмбрионы от 8 до 10 бластомеров, с несколькими замечаниями – 4 балла
- C6-C7 и C9-C10 – эмбрионы от 6 до 14 бластомеров, с замечаниями – 3 балла
- D5-D16 – эмбрионы от 5 до 16 бластомеров, с признаками деградации – 2 балла
- C1-C6 и D1-D6 – эмбрионы до 6 бластомеров, с признаками деградации – 1 балл
- A1-4, B1-4, C1-4 – эмбрионы, не достигшие 4 бластомеров – 0 баллов

На пятый день развития производилась оценка качества бластоцист по шкале, основанной на критериях Гарднера (Gardner and Lane, 2000):

- Бластоцисты AA - оценка 8 баллов
- Бластоцисты AB, BA – 7 баллов
- Бластоцисты BB - 6 баллов
- Бластоцисты CB, BC, CC - 5 баллов
- Остановившиеся в развитии при размере бластоцели менее 50% объема – 4 балла
- Морулы и ранние бластоцисты с размером бластоцели не более 20% - 3 балла
- Эмбрионы, не начавшие формирование морулы - 2 балла
- Остановка в развитии на стадии от 8 до 16 бластомеров – 1 балл
- Остановка в развитии на стадии до 8 бластомеров – 0 баллов

Далее для оценки способности к имплантации, полученные после пятого дня эмбрионы, достигшие стадии бластоцисты, помещались в обработанные субстратом чашки

(ibiTreat m-plates, «Ibidi» Germany) наблюдения велись вплоть до десятого дня развития, с ростовыми факторами или без их добавления в соответствии с условиями исследования. Оценка имплантации эмбрионов производилась под инвертированным микроскопом, и считалась успешной если эмбрион совершал самостоятельный хетчинг (высвобождение из блестящей оболочки) и плотно прилегал к субстрату с потерей шарообразной формы и приобретением признаков эпителиальной ткани (уплощение клеток, разрастание по плоскости субстрата) к десятому дню культивирования.

Статистическая оценка

Все статистические результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (Mean \pm SD), для сравнения между группами использован Т-критерий для независимых выборок. Расчет производился при помощи программного обеспечения Statistica 8.0 (Statsoft) и пакета MS Office (Microsoft).

Полученные результаты

В итоге исследования получено 481 эмбрионов, из зигот с нарушениями оплодотворения. Выполнена морфологическая оценка эмбрионов на третий и пятый день развития, а также оценка потенциала имплантации (прикрепление на искусственный субстрат в условиях *in vitro*).

В результате исследования обнаружилось достоверные различия между группами по количеству сформированных бластоцист с морфологически удовлетворительными качествами – оценка выше 5 баллов из 8 (Группа 1, n=117 53 \pm 0,5% и группа 2, n=163 62 \pm 0,5% от количества полученных зигот, p=0.04). А также обнаружилось достоверные различия по качественным характеристикам эмбрионов третьего дня развития (средняя оценка морфологии 3.2 \pm 1,4 в группе 1, и 3,6 \pm 1,5 в группе 2, p=0.004) и достоверное различие по качественным характеристикам бластоцист пятого дня между группами (средняя оценка морфологии 5,4 \pm 1,4 в группе 1, и 5,8 \pm 1,6 в группе 2, p=0.013).

В результате исследования способности эмбрионов к имплантации (смоделированной *in vitro* на обработанных субстратом чашках) прослеживался тренд, но не была обнаружена статистически значимая разница между двумя группами (14 \pm 5% и 22 \pm 5% имплантаций от количества перенесенных на субстрат бластоцист, группа 1 и 2 соответственно, p=0.20)

Заключение и выводы

Использование ростовых факторов, в частности фактора ингибирования лейкозных клеток (Leukemia inhibitory factor или LIF) и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), для систем культивирования эмбрионов в клинической практике может быть эффективно. Полученные данные демонстрируют повышение выхода бластоцист и улучшение морфологических качеств эмбрионов во время культивирования. В рамках исследования ожидалось получить большее количество эмбрионов, начавших бластуляцию к пятому дню развития в группе с использованием гормональных компонентов, однако достоверных различий не зафиксировано. Вероятно, исследуемые факторы роста не вносят значительного вклада в механизм начала бластуляции, однако позволяют большему количеству эмбрионов достигнуть более продвинутой стадии в росте. Обнаружено, что нет статистически достоверных различий на этапе имплантации при использовании ростовых факторов, что может говорить о слабом влиянии цитокинов на этом этапе или недостаточной для различимого эффекта концентрации.

Показано достоверное влияние ростовых факторов на улучшение критически важных параметров эмбрионов при оценке в ЭКО лаборатории:

1. Качество эмбрионов на третий день развития
2. Количество бластоцист соответствующих критериям допуска к переносу
3. Качественные характеристики получаемых бластоцист

Полученные результаты демонстрируют что, в дальнейшем имеет смысл развернуть клиническое исследование на эмбрионах в клинике ВРТ с последующим переносом в матку и оценкой эффективности наступления беременности. В лаборатории планируется оценка влияния ростовых факторов на эмбриональный период развития и постнатальный онтогенез у детей, так как необходимы продолжительные исследования для понимания возможных эффектов в формировании анеуплоидии, влияние на геном, протеомику эмбрионов и эпигенетические факторы для начала широкого использования цитокинов в клинической практике. Направление изучения ростовых факторов на человеческих эмбрионах перспективно и имеет практическую ценность применительно к медицинской сфере и в области фундаментальных знаний, так как позволит отойти от использования моделей животных для интерпретации онтогенеза человека и изучать влияние цитокинов на человеческий организм с минимальными этическими и клиническими рисками.

Список литературы:

1. Abramczuk, J., Solter, D. and Koprowski, H. (1977): The beneficial effect EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. *Dev. Biol.*, 61, 378–383.
2. Aghajanova L., “Leukemia inhibitory factor and human embryo implantation,” *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1034, no. 1, pp. 176–183, 2004.
3. Aghajanova L. Update on the role of leukemia inhibitory factor in assisted reproduction *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 22:213–219, 2010
4. Barnes, D., and Sato, G. (1980): Serum-free cell culture: a unifying approach. *Cell*, 22, 649–655.
5. Bastias, M.C., McGee-Belser, S.T., Bryan, S.H. and Vasquez, J.M. (1993): In vitro deleterious effect of hypoxanthine in Ham’s Nutrient Mixture F-10 culture medium on human oocyte fertilization and early embryonic development. *Fertil. Steril.*, 60, 876–880. [Medline]
6. Behr B, Mooney S, Wen Y, Polan ML, Wang H. Preliminary experience with low concentration of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: a potential regulator in preimplantation mouse embryo development and apoptosis. *J Assist Reprod Genet* 2005;22:25–32.
7. Biggers, J.D., and Racowsky, C. (2002): The development of fertilized human ova to the blastocyst stage in KSOM(AA) medium: is a two-step protocol necessary? *Reprod. Biomed. Online*, 5, 133–140.
8. Biggers, J.D., and Summers, M.C. (2008): Choosing a culture medium: making informed choices. *Fertil. Steril.*, 90, 473–483.
9. Biggers, J.D., McGinnis, L. and Summers, M.C. (2006): Reply: One-step versus two-step culture of mouse preimplantation embryos. *Hum. Reprod.*, 21, 1936–1939.
10. Blois SM, Alba Soto CD, Tometten M, Klapp BF, Margni RA, Arck PC. Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy. *Biol Reprod* 2004;70:1018–23.
11. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod* 2007;22(6):1506–12.
12. Bongso, A., Soon-Chye, N., Sathananthan, H., Lian, N.P., Rauff, M. and Ratnam, S. (1989): Improved quality of human embryos when co-cultured with human ampullary cells. *Hum. Reprod.*, 4, 706–713.
13. Borland, R.M., Biggers, J.D., Lechene, C.P. and Taymor, M.L. (1980): Elemental composition of fluid in the human Fallopian tube. *J. Reprod. Fertil.*, 58, 479–482.
14. Boyle K. and L. Robb, “The role of SOCS3 in modulating leukaemia inhibitory factor signalling during murine placental development,” *Journal of Reproductive Immunology*, vol. 77, no. 1, pp. 1–6, 2008.
15. Brinster, R.L. (1965): Studies on the development of mouse embryos in vitro. II. The effect of energy source. *J. Exp. Zool.*, 158, 59–68.

16. Chatot, C.L., Ziomek, C.A., Bavister, B.D., Lewis, J.L. and Torres, I. (1989): An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 86, 679–688.
17. Chrelias C., et al: GM-CSF Supplementation in Culture Media for Subfertile Women Undergoing ART: A Systematic Review - *International Journal of Endocrinology*, Volume 2013
18. Chronopoulou, E., and Harper, J.C. (2015): IVF culture media: past, present and future. *Hum. Reprod. Update*, 21, 39–55.
19. Cohen, J., Trounson, A., Dawson, K., Jones, H., Hazekamp, J., Nygren, K.G. and Hamberger, L. (2005): The early days of IVF outside the UK. *Hum. Reprod. Update*, 11, 439–459.
20. Crosier, A.E., Farin, P.W., Dykstra, M.J., Alexander, J.E. and Farin, C.E. (2000): Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced in vivo or in vitro. *Biol. Reprod.*, 62, 1459–1465.
21. Crosier, A.E., Farin, P.W., Dykstra, M.J., Alexander, J.E. and Farin, C.E. (2001): Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. *Biol. Reprod.*, 64, 1375–1385.
22. Cui XS, Lee JY, Choi SH, Kwon MS, Kim T, Kim NH. Mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances viability of porcine embryos in defined culture conditions. *Anim Reprod Sci* 2004;84:169–77.
23. d’Hauterive, S. P., C. Charlet-Renard, S. Berndt et al., “Human chorionic gonadotropin and growth factors at the embryonic-endometrial interface control leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin 6 (IL-6) secretion by human endometrial epithelium,” *Human Reproduction*, vol. 19, no. 11, pp. 2633–2643, 2004.
24. Daniel, J.C. Jr., and Olson, J.D. (1968): Amino acid requirements for cleavage of the rabbit ovum. *J. Reprod. Fertil.*, 15, 453–455.
25. Dar, S., Lazer, T., Shah, P.S. and Librach, C.L. (2014): Neonatal outcomes among singleton births after blastocyst versus cleavage stage embryo transfer: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update*, 20, 439–448.
26. Deng, M., and Yang, X.J. (2001): Full term development of rabbit oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Mol. Reprod. Dev.*, 59, 38–43.
27. Dulbecco, R., and Vogt, M. (1954): Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.*, 99, 167–182.
28. Dumoulin, J.C.M., Evers, J.L.H., Bras, M., Pieters, M.H.E.C. and Geraedts, J.P.M. (1992): Positive effect of taurine on preimplantation development of mouse embryos in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 94, 373–380.
29. Eagle, H. (1955): Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*, 122, 501–514.
30. Earle, W., Schilling, E., Stark, T., Straus, N., Brown, M. and Shelton, E. (1943): Production of malignancy in vitro; IV: The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 4, 165–212.

31. Edwards, R.G. (1981): Test-tube babies, 1981. *Nature*, 293, 253–256.
32. Edwards, R.G., Bavister, B.D. and Steptoe, P.C. (1969): Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. *Nature*, 221, 632–635.
33. Eileen D. Adamson Activities of Growth Factors in Preimplantation Embryos *Journal of Cellular Biochemistry* 53:280-287 (1993)
34. ESHRE Special Interest Group of Embryology, and Alpha Scientists in Reproductive Medicine, The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of art laboratory performance indicators, *Human Reproduction Open*, pp. 1–17, 2017, doi:10.1093/hropen/hox011
35. Gardner DK, Lane M. Embryo culture systems. In: Trounson AO, Gardner DK, eds. *Handbook of In Vitro Fertilization*. New York: CRC Press; 2000:205–264.
36. Gardner, D.K., and Lane, M. (1996): Alleviation of the ‘2-cell block’ and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters. *Hum. Reprod.*, 11, 2703–2712.
37. Gardner, D.K., Lane, M., Calderon, I. and Leeton, J. (1996): Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil. Steril.*, 65, 349–353.
38. Gary D., Media Composition: Macromolecules and Embryo Growth Marius Meintjes, Smith et al. (eds.), *Embryo Culture: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, vol. 912, Springer Science+Business Media, LLC 2012
39. Gasson JC. Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1991;77:1131–45.
40. Gey, G.O., and Gey, M.K. (1936): The maintenance of human normal cells and tumor cells in continuous culture: I.Preliminary report: Cultivation of mesoblastic tumors and normal tissue and notes on methods of cultivation. *Am. J. Cancer*, 27, 45–76.
41. Gutsche S., M. von Wolff, T. Strowitzki, and C. J. Thaler, “Seminal plasma induces mRNA expression of IL-1 β , IL-6 and LIF in endometrial epithelial cells in vitro,” *Molecular Human Reproduction*, vol. 9, no. 12, pp. 785–791, 2003.
42. Hagen, S., Muneta, P., Augustin, J. and LeTourneau, D. (1991): Stability and utilization of picloram, vitamins, and sucrose in a tissue culture medium. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 25, 45–48.
43. Hambiliki F., J. Hanrieder, J. Bergquist, J. Hreinsson, A. Stvreus-Evers, and K. Wanggren, “Glycoprotein 130 promotes human blastocyst development in vitro,” *Fertility and Sterility*, vol. 99, no. 6, pp. 1592–1599.e3, 2013.
44. Hamilton JA. Anderson GP. GM-CSF Biology. *Growth Factors* 2004;22:225–31.
45. Hammond, J. Jr. (1949): Recovery and culture of tubal mouse ova. *Nature*, 163, 28–29.
46. Hanks, J.H., and Wallace, R.E. (1949): Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 71, 196–200.
47. Hardy K, Spanos S. Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. *J Endocrinol* 2002;172: 221–36.

48. Harrison, R.G., Greenman, M.J., Mall, F.P. and Jackson, C.M. (1907): Observations of the living developing nerve fiber. *Anat. Rec.*, 1, 116–128.
49. Hegde, A., and Behr, B.(2012): Media composition: Growth factors. In:Embryo culture: Methods and protocols (Smith, G.D.Swain, JE and Pool, TB. eds), 912, pp.177–198, Humana Press, New York.
50. Heyner, S., Smith, R.M. and Schultz, G.A. (1989) Temporally regulated expression of insulin and insulin-like growth factors and their receptors in early mammalian development. *Bioessays*, 11, 171–176.
51. Hill, J.L., Wade, M.G., Nancarrow, C.D., Kelleher, D.L.and Boland, M.P. (1997): Influence of ovine oviducal amino acid concentrations and an ovine oestrus-associated glycoprotein on development and viability of bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 47, 164–169.
52. Ho, Y., Wigglesworth, K., Eppig, J.J. and Schultz, R.M. (1995): Preimplantation development of mouse embryos in KSOM: augmentation by amino acids and analysis of gene expression. *Mol. Reprod. Dev.*, 41, 232–238.
53. Horita H., E. Kuroda, T. Hachisuga, M. Kashimura, and U. Yamashita, “Induction of prostaglandin E2 production by leukemia inhibitory factor promotes migration of first trimester extravillous trophoblast cell line, HTR-8/SVneo,” *Human Reproduction*, vol. 22, no. 7, pp. 1801–1809, 2007.
54. Hsieh, Y.Y., Tsai, H.D., Chang, C.C., Hsu, L.W., Chang, S.C. and Lo, H.Y. (2000): Prolonged culture of human cryopreserved embryos with recombinant human leukemia inhibitory factor. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 17, 131–134.
55. Jasper M. J., M. Brannstrom, J. I. Olofsson et al., “Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: presence in human follicular fluid, protein secretion and mRNA expression by ovarian cells,” *Molecular Human Reproduction*, vol. 2, no. 8, pp. 555–562, 1996.
56. Kane, M.T. (1988): The effects of water-soluble vitamins on the expansion of rabbit blastocysts in vitro. *J. Exp.Zool.*, 245, 220–223.
57. Karagenc L, Lane M, Gardner DK. Granulocyte-macrophage colonystimulating factor stimulates mouse blastocyst inner cell mass development only when media lack human serum albumin. *Reprod Biomed Online* 2005;10:511–8.
58. Kawamura K., et al: Promotion of Human Early Embryonic Development and Blastocyst Outgrowth In Vitro Using Autocrine/Paracrine Growth Factors - *PLOS ONE*, November 2012, Volume 7
59. Kito, S., Kaneko, Y., Yano, H., Tateno, S. and Ohta, Y. (2008): Developmental responses of 2-cell embryos to oxygen tension and bovine serum albumin in Wistar rats. *Exp. Anim.*, 57, 123–128.
60. Lane, M., and Gardner, D.K. (1997): Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *J. Reprod. Fertil.*, 109, 153–164.
61. Lane, M., and Gardner, D.K. (1998): Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. *Hum. Reprod.*, 13, 991–997.

62. Lawitts, J.A., and Biggers, J.D. (1992): Joint effects of sodium chloride, glutamine, and glucose in mouse preimplantation embryo culture media. *Mol. Reprod. Dev.*, 31, 189–194.
63. Leduc, K., V. Bourassa, E. Asselin, P. Leclerc, J. Lafond, and C. Reyes-Moreno, “Leukemia inhibitory factor regulates differentiation of trophoblastlike BeWo cells through the activation of JAK/STAT and MAPK3/1 MAP kinase-signaling pathways,” *Biology of Reproduction*, vol. 86, no. 2, article 54, 2012.
64. Li, R., Wen, L., Wang, S. and Bou, S. (2006): Development, freezability and amino acid consumption of bovine embryos cultured in synthetic oviductal fluid (SOF) medium containing amino acids at oviductal or uterine-fluid concentrations. *Theriogenology*, 66, 404–414.
65. Lippes, J., Enders, R.G., Pragay, D.A. and Bartholomew, W.R. (1972): The collection and analysis of human fallopian tubal fluid. *Contraception*, 5, 85–103.
66. Liu, Z., Foote, R.H. and Simkin, M.E. (1996): Effect of amino acids and α -amanitin on the development of rabbit embryos in modified protein-free KSOM with HEPES. *Mol. Reprod. Dev.*, 45, 157–162. 94)
67. Loutradis D. et al., *Biological Factors in Culture Media Affecting in Vitro Fertilization, Preimplantation Embryo Development, and Implantation*, ANNALS NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, 2006;
68. Loutradis, D.C., Kiessling, A.A., Kallianidis, K., Siskos, K., Creatsas, G., Michalas, S. and Aravantinos, D. (1993): A preliminary trial of human zygote culture in Ham’s F-10 without hypoxanthine. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 10, 271–275. 56) Goto, Y., Noda, Y., Mori, T. and Nakano, M. (1993): Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. *Free Radic. Biol. Med.*, 15, 69–75.
69. Macháty, Z., Day, B.N. and Prather, R.S. (1998): Development of early porcine embryos in vitro and in vivo. *Biol.Reprod.*, 59, 451–455.
70. Mansour, R., Ishihara, O., Adamson, G.D., Dyer, S., de Mouzon, J., Nygren, K.G., Sullivan, E. and Zegers-Hochschild, F. (): International committee for monitoring assisted reproductive technologies world report: Assisted reproductive technology 2006. *Hum. Reprod.*, 29, 1536–1551, 2014
71. Mantikou, E., Youssef, M.A.F.M., van Wely, M., van der Veen, F., Al-Inany, H.G., Repping, S. and Mastenbroek, S. (2013): Embryo culture media and IVF/ICSI success rates: a systematic review. *Hum. Reprod. Update*, 19, 210–220.
72. Mathieu, M.-E., C. Saucourt, V. Mournetas et al., “LIF-dependent signaling: new pieces in the lego,” *Stem Cell Reviews and Reports*, vol. 8, no. 1, pp. 1–15, 2012.
73. Menezo Y., J. Testart, and D. Perrone, “Serum is not necessary in human in vitro fertilization, early embryo culture, and transfer,” *Fertility and Sterility*, vol. 42, no. 5, pp. 750–755, 1984.
74. Ménézo, Y., Lichtblau, I. and Elder, K. (2013): New insights into human pre-implantation metabolism in vivo and in vitro. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 30, 293–303.
75. Metz S., G. Naeth, P. C. Heinrich, and G. Muller-Newen, “Novel inhibitors for murine and human leukemia inhibitory factor based on fused soluble receptors,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 10, pp. 5985–5995, 2008.

76. Michael DD, Wagner SK, Ocon OM, Talbot NC, Rooke JA, Ealy AD. Granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor increases interferon-tau protein secretion in bovine trophectoderm cells. *Am J Reprod Immunol* 2006;56:63–7.
77. Miller, J.G., and Schultz, G.A. (1987): Amino acid content of preimplantation rabbit embryos and fluids of the reproductive tract. *Biol. Reprod.*, 36, 125–129.
78. Miller, K.A.(2014): Optimizing culture conditions. In:Culture media, solutions, and systems in human ART (Quinn, P. ed), pp.235–244, Cambridge University Press.
79. Mo C., W. Chearwae, and J. J. Bright, “PPAR γ regulates LIF-induced growth and self-renewal of mouse ES cells through Tyk2-Stat3 pathway,” *Cellular Signalling*, vol. 22, no. 3, pp. 495–500, 2010.
80. Morbeck, D.E., Krisher, R.L., Herrick, J.R., Baumann, N.A., Matern, D. and Moyer, T. (2014): Composition of commercial media used for human embryo culture. *Fertil. Steril.*, 102, 759–766.e9.
81. Movaghar B. and S. Askarian, “Expression of e-cadherin, leukemia inhibitory factor and progesterone receptor in mouse blastocysts after ovarian stimulation,” *Cell Journal*, vol. 14, no. 3, pp. 225–230, 2012.
82. Nadine Schrode, Panagiotis Xenopoulos, Anna Piliszek, Stephen Frankenberg, Berenika Plusa, and Anna-Katerina Hadjantonakis., *Anatomy of a Blastocyst: Cell Behaviors Driving Cell Fate Choice and Morphogenesis in the Early Mouse Embryo*, *genesis* 51:219–233, 2013
83. Naguib Salleh and Nelli Giribabu, *Leukemia Inhibitory Factor: Roles in Embryo Implantation and in Nonhormonal Contraception*, Hindawi Publishing Corporation, *Scientific World Journal* Volume 2014, Article ID 201514, 2014
84. Neira, J. A. D. Tainturier, M. A. Pena, and J. Martal, “Effect of the association of IGF-I, IGF-II, bFGF, TGF- β 1, GM-CSF, and LIF on the development of bovine embryos produced in vitro,” *Theriogenology*, vol. 73, no. 5, pp. 595–604, 2010.
85. Niakan K. K., J. Han, R. A. Pedersen, C. Simon, and R. A. R. Pera, “Human pre-implantation embryo development,” *Development*, vol. 139, no. 5, pp. 829–841, 2012.
86. Noda, Y. (1992): [Evaluation of environmental factors affecting embryo development in vitro]. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 44, 960–970.
87. O’Leary S, Jasper MJ, Warnes GM, Armstrong DT, Robertson SA. Seminal plasma regulates endometrial cytokine expression, leukocyte recruitment and embryo development in the pig. *Reproduction* 2004;128:237–47.
88. O’Neill, C. (1998): Endogenous folic acid is essential for normal development of preimplantation embryos. *Hum. Reprod.*, 13, 1312–1316.
89. Olson, S.E., and Seidel, G.E. Jr. (2000): Culture of in vitro-produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. *Biol. Reprod.*, 62, 248–252.
90. Petr Dvorak and Ales Hampl, Basic fibroblast growth factor and its receptors in human embryonic stem cells, *FOLIA HISTOCHEMICA ET CYTOBIOLOGICA* Vol. 43, No. 4, 2005 pp. 203-208

91. Puri G., et al: Effects of Growth Factors on ES Cell Derivation in Buffalo - International Journal of Stem Cells 2012;5:96-103
92. Quinn, P. (1995): Enhanced results in mouse and human embryo culture using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 12, 97–105.
93. Quinn, P., Barros, C. and Whittingham, D.G. (1982): Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 66, 161–168.
94. Quinn, P., Kerin, J.F. and Warnes, G.M. (1985): Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil. Steril.*, 44, 493–498.
95. Raheem Kabir A., Cytokines, growth factors and macromolecules as mediators of implantation in mammalian species International Journal of Veterinary Science and Medicine 6 (2018) S6–S14
96. Rappolee, D.A., Sturm, K.S., Behrendtsen, O. et al. (1992) Insulin-like growth factor-II acts through an endogenous growth pathway regulated by imprinting in early mouse embryos. *Gene Dev.*, 6, 939–952.
97. Rappolee, D.A., Sturm, K.S., Schultz, G.A. et al. (1990) The expression of growth factor ligands and receptors in preimplantation embryos. In Heyner, S. and Wiley, L.M. (eds), *Early Embryo Development and Paracrine Relationships*. Alan R. Liss, New York, pp. 11–25.
98. Rieger L, Honig A, Sutterlin M, Kapp M, Dietl J, Ruck P, et al. Antigen-presenting cells in human endometrium during the menstrual cycle compared to early pregnancy. *J Soc Gynecol Investig* 2004;11:488–93.
99. Robertson S. A. and R. F. Seamark, “Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF): one of a family of epithelial cell-derived cytokines in the preimplantation uterus,” *Reproduction, Fertility, and Development*, vol. 4, no. 4, pp. 435–448, 1992.
100. Robertson S. A., C. T. Roberts, K. L. Farr, A. R. Dunn, and R. F. Seamark, “Fertility impairment in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice,” *Biology of Reproduction*, vol. 60, no. 2, pp. 251–261, 1999.
101. Robertson SA. Immune regulation of conception and embryo implantation-all about quality control? *J Reprod Immunol*. 2010;85:51–57.
102. Robertson SA. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell Tissue Res* 2005;322:43–52.
103. Robertson Sarah A., GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy, *Cytokine & Growth Factor Reviews* 18 (2007) 287–298
104. Robertson Sarah A., Peck-Yin Chin, John E. Schjenken and Jeremy G.Thompson *Female Tract Cytokines and Developmental Programming in Embryos*, H. J. Leese, D. R. Brison (eds.), *Cell Signaling During Mammalian Early Embryo Development*, *Advances in Experimental Medicine and Biology* 843, © Springer Science+Business Media New York 2015
105. Schenk, S.L. (1878): Das säugethierei künstlich befruchtet ausserhalb des mutterthieres. *Mitt Embryol Inst K K Univ Wien.*, 1, 107–118.

106. Schini, S.A., and Bavister, B.D. (1988): Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biol. Reprod.*, 39, 1183–1192.
107. Schwarzer, C., Esteves, T.C., Araúzo-Bravo, M.J., Le Gac, S., Nordhoff, V., Schlatt, S. and Boiani, M. (2012): ART culture conditions change the probability of mouse embryo gestation through defined cellular and molecular responses. *Hum. Reprod.*, 27, 2627–2640.
108. Sherwin, J. R. A., S. K. Smith, A. Wilson, and A. M. Sharkey, “Soluble gp130 is up-regulated in the implantation window and shows altered secretion in patients with primary unexplained infertility,” *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 87, no. 8, pp. 3953–3960, 2002.
109. Shuya L. L., E. M. Menkhorst, J. Yap, P. Li, N. Lane, and E. Dimitriadis, “Leukemia inhibitory factor enhances endometrial stromal cell decidualization in humans and mice,” *PLoS ONE*, vol. 6, no. 9, Article ID e25288, 2011.
110. Siristatidis Charalampos, Paraskevi Vogiatzi, George Salamalekis, "Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor Supplementation in Culture Media for Subfertile Women Undergoing Assisted Reproduction Technologies: A Systematic Review", Hindawi Publishing Corporation, *International Journal of Endocrinology*, Volume 2013, Article ID 704967, 2012
111. Sjoblom C, Roberts CT, Wikland M, Robertson SA. Granulocytemacrophage colony-stimulating factor alleviates adverse consequences of embryo culture on fetal growth trajectory and placental morphogenesis. *Endocrinol* 2005;146:2142–53.
112. Sjoblom C, Wikland M, Robertson SA. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) acts independently of the beta common subunit of the GM-CSF receptor to prevent inner cell mass apoptosis in human embryos. *Biol Reprod* 2002;67:1817–23.
113. Sjoblom C., M. Wikland, and S. A. Robertson, “Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes human blastocyst development in vitro,” *Human Reproduction*, vol. 14, no. 12, pp. 3069–3076, 1999.
114. Sjöblom, C., Wikland, M. and Robertson, S.A. (2002): Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) acts independently of the beta common subunit of the GM-CSF receptor to prevent inner cell mass apoptosis in human embryos. *Biol. Reprod.*, 67, 1817–1823.
115. Song H. and H. Lim, “Evidence for heterodimeric association of leukemia inhibitory factor (LIF) receptor and gp130 in the mouse uterus for LIF signaling during blastocyst implantation,” *Reproduction*, vol. 131, no. 2, pp. 341–349, 2006.
116. Spanos, S., Becker, D.L., Winston, R.M.L. and Hardy, K. (2000): Anti-apoptotic action of insulin-like growth factor-I during human preimplantation embryo development. *Biol. Reprod.*, 63, 1413–1420.
117. Staun-Ram E. and E. Shalev, “Human trophoblast function during the implantation process,” *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 3, no. 1, article 56, 2005.
118. Steptoe PC, Edwards RG, *Lancet*. Apr 24;1(7965):880-2. Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy. 1976
119. Steptoe PC, Edwards RG, *Lancet*. Aug 12;2(8085):366. Birth after the reimplantation of a human embryo, 1978

120. Steptoe PC, Edwards RG, Purdy JM (1971) Human blastocysts grown in culture. *Nature* 229(5280):132–133
121. Stewart C. L., “Leukaemia inhibitory factor and the regulation of pre-implantation development of the mammalian embryo,” *Molecular Reproduction and Development*, vol. 39, no. 2, pp. 233–238, 1994.
122. Summers, M.C., and Biggers, J.D. (2003): Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Hum. Reprod. Update*, 9, 557–582.
123. Sun, X., A. Bartos, J. A. Whitsett, and S. K. Dey, “Uterine deletion of Gp130 or Stat3 shows implantation failure with increased estrogenic responses,” *Molecular Endocrinology*, vol. 27, no. 9, pp. 1492–1501, 2013.
124. Takahashi Y., N. Carpino, J. C. Cross, M. Torres, E. Parganas, and J. N. Ihle, “SOCS3: an essential regulator of LIF receptor signaling in trophoblast giant cell differentiation,” *EMBO Journal*, vol. 22, no. 3, pp. 372–384, 2003.
125. Takahashi, Y., M. Takahashi, N. Carpino et al., “Leukemia inhibitory factor regulates trophoblast giant cell differentiation via janus kinase 1-signal transducer and activator of transcription 3-suppressor of cytokine signaling 3 pathway,” *Molecular Endocrinology*, vol. 22, no. 7, pp. 1673–1681, 2008.
126. Tawfeek, M. A., M. A. Eid, A. M. Hasan, M. Mostafa, and H. A. El-Serogy, “Assessment of leukemia inhibitory factor and glycoprotein 130 expression in endometrium and uterine flushing: a possible diagnostic tool for impaired fertility,” *BMC Women's Health*, vol. 12, article 10, 2012.
127. Teklenburg G, Salker M, Heijnen C, Macklon NS, Brosens JJ. The molecular basis of recurrent pregnancy loss: impaired natural embryo selection. *Mol Hum Reprod.* 2010;16:886–95.
128. Toner, J.P. (2002): Progress we can be proud of: U.S. trends in assisted reproduction over the first 20 years. *Fertil. Steril.*, 78, 943–950.
129. Tucker KE, Hurst BS, Guadagnoli S et al (1996) Evaluation of synthetic serum substitute versus serum as protein supplementation for mouse and human embryo culture. *J Assist Reprod Genet* 13(1):32–37
130. Vaughn Brian E., Joan Stevenson-Hinde, Everett Waters, Jay Belsky, Attachment Security and Temperament in Infancy and Early Childhood: Some Conceptual Clarifications, *Developmental Psychology* 28(3), 1992
131. W. Wang, R. N. Taylor, I. C. Bagchi, and M. K. Bagchi, “Regulation of human endometrial stromal proliferation and differentiation by C/EBP β involves cyclin E-cdk2 and STAT3,” *Molecular Endocrinology*, vol. 26, no. 12, pp. 2016–2030, 2012.
132. Wångren, K., Lalitkumar, P.G., Hambiliki, F., Ståbi, B., Gemzell-Danielsson, K. and Stavreus-Evers, A. (2007): Leukaemia inhibitory factor receptor and gp130 in the human Fallopian tube and endometrium before and after mifepristone treatment and in the human preimplantation embryo. *Mol. Hum. Reprod.*, 13, 391–397.
133. Weston, A.M., and Wolf, D.P. (1996): Differential preimplantation development of rhesus monkey embryos in serum-supplemented media. *Mol. Reprod. Dev.*, 44, 88–92.

134. Whitten, W.K. (1957): Culture of tubal ova. *Nature*, 179, 1081–1082.
135. Whitten, W.K., and Biggers, J.D. (1968): Complete development in vitro of the pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. *J. Reprod. Fertil.*, 17, 399–401.
136. Wiemer, K.E., Cohen, J., Amborski, G.F., Wright, G., Wiker, S., Munyakazi, L. and Godke, R.A. (1989): In-vitro development and implantation of human embryos following culture on fetal bovine uterine fibroblast cells. *Hum.Reprod.*, 4, 595–600.
137. Wiemer, K.E., Cohen, J., Wiker, S.R., Malter, H.E., Wright, G. and Godke, R.A. (1989): Coculture of human zygotes on fetal bovine uterine fibroblasts: embryonic morphology and implantation. *Fertil. Steril.*, 52, 503–508.
138. Wu M., Y. Yin, M. Zhao, L. Hu, and Q. Chen, “The low expression of leukemia inhibitory factor in endometrium: possible relevant to unexplained infertility with multiple implantation failures,” *Cytokine*, vol. 62, no. 2, pp. 334–339, 2013.
139. Xenopoulos P., M. Kang, and A.-K. Hadjantonakis, “Cell lineage allocation within the inner cell mass of the mouse blastocyst,” in *Mouse Development*, J. Z. Kubiak, Ed., pp. 185–202, Springer, Berlin, Germany, 2012.
140. Yamagata, K., Suetsugu, R. and Wakayama, T. : Assessment of chromosomal integrity using a novel live-cell imaging technique in mouse embryos produced by intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 24, 2490–2499, 2009
141. Yao T, Asayama Y. “Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues.” *Reprod Med Biol.* 2017;16:99–117.
142. Yao T, Asayama Y. “Human preimplantation embryo culture media: past, present, and future” *J. Mamm. Ova Res.* Vol. 33 (1), 17–34, 2016
143. Youngblood Bradford A., Randall Alfano, Steve C.Pettit, Deshui Zhang, H. Garry Dallmann, Ning Huang, Clinton C. MacDonald, Application of recombinant human leukemia inhibitory factor (LIF) produced in rice (*Oryza sativa* L.) for maintenance of mouse embryonic stem cells *Journal of Biotechnology* Volume 172, 20 February 2014, Pages 67-72
144. Zandstra, H., Van Montfoort, A.P.A. and Dumoulin, J.C.M. (2015): Does the type of culture medium used influence birthweight of children born after IVF? *Hum. Reprod.*, 30, 530–542.
145. Брусенцев Е.Ю., Игони́на Т.Н., Рожкова И.Н., Рагаева Д.С., Амстиславский С.Я. Эффекты воздействия факторов роста при культивировании *in vitro* эмбрионов мышей и крыс. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2015;19(4):372-377.
146. Крылова, Ю.С., И.М. Кветной, Э.К. Айламазян, Рецептивность эндометрия: молекулярные механизмы регуляции имплантации, *Журнал акушерства и женских болезней*, ТОМ LXII ВЫПУСК 2/2013

Отчет о проверке на заимствования №1



Автор: Казаринов Вениамин Игоревич

Проверяющий: Новопашина Дарья Сергеевна (danov@niboch.nsc.ru / ID: 7007712)

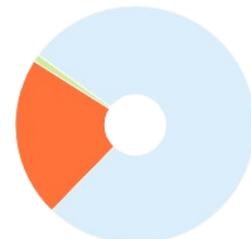
Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <https://users.antiplagiat.ru>

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 9
 Начало загрузки: 10.09.2020 07:02:45
 Длительность загрузки: 00:00:12
 Имя исходного файла: Казаринов В.И.
 Научно-квалификационная работа, 2020.pdf
 Название документа: Казаринов В.И.
 Научно-квалификационная работа, 2020
 Размер текста: 1 кБ
 Символов в тексте: 88593
 Слов в тексте: 11235
 Число предложений: 1272

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Последний готовый отчет (ред.)
 Начало проверки: 10.09.2020 07:02:57
 Длительность проверки: 00:00:12
 Комментарии: не указано
 Модули поиска: Цитирование, Модуль поиска Интернет



ЗАИМСТВОВАНИЯ

21,75%

САМОЦИТИРОВАНИЯ

0%

ЦИТИРОВАНИЯ

0,15%

ОРИГИНАЛЬНОСТЬ

78,1%

Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа.
 Самоцитирования — доля фрагментов текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа, по отношению к общему объему документа.
 Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты; общеупотребительные выражения; фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативно-правовой документации.
 Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.
 Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.
 Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа.
 Заимствования, самоцитирования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа.
 Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в отчете	Источник	Ссылка	Актуален на	Модуль поиска
[01]	5,75%	Leukemia Inhibitory Factor: Roles in Embryo Implantation and in Nonhormonal Contra...	https://hindawi.com	27 Авг 2017	Модуль поиска Интернет
[02]	0,87%	[Methods in Molecular Biology] Embryo Culture Volume 912 (2/3)	https://doi.org	06 Сен 2018	Модуль поиска Интернет
[03]	1,69%	Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: his...	https://doi.org	24 Июнь 2019	Модуль поиска Интернет
[04]	1,03%	[Advances in Experimental Medicine and Biology] Cell Signaling During Mammalian Earl...	https://doi.org	22 Окт 2019	Модуль поиска Интернет
[05]	1,38%	[Methods in Molecular Biology] Embryo Culture Volume 912 (1/3)	https://doi.org	06 Сен 2018	Модуль поиска Интернет
[06]	2,42%	GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy	https://doi.org	27 Июль 2018	Модуль поиска Интернет
[07]	2,02%	Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF?	https://doi.org	31 Авг 2018	Модуль поиска Интернет
[08]	0,24%	Диссертация на тему «Развитие клонированных эмбрионов крупного рогатого ск...	http://dissercat.com	18 Мая 2020	Модуль поиска Интернет
[09]	1,41%	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor Supplementation in Culture Media...	https://hindawi.com	02 Сен 2017	Модуль поиска Интернет
[10]	0,33%	Textbook of Assisted Reproductive Techniques, Volume Two: Clinical Perspectives	https://doi.org	22 Окт 2019	Модуль поиска Интернет
[11]	0,73%	Peptide growth factors and preimplantation development	https://doi.org	21 Окт 2019	Модуль поиска Интернет
[12]	0,7%	PDF	http://dev.biologists.org	03 Янв 2020	Модуль поиска Интернет
[13]	0,48%	Cyclic AMP reversal of hypoxanthine-arrested preimplantation mouse embryos is EDTA...	https://doi.org	23 Авг 2019	Модуль поиска Интернет
[14]	0,24%	Untersuchung der Invasion des Trophoblasten anhand eines Ko-Kultur-Modells mit en...	https://d-nb.info	15 Авг 2019	Модуль поиска Интернет
[15]	0,64%	Эффекты воздействия факторов роста при культивировании in vitro эмбрионов м...	http://docplayer.ru	30 Окт 2017	Модуль поиска Интернет
[16]	0,57%	Culture systems for bovine embryos	https://doi.org	03 Дек 2018	Модуль поиска Интернет
[17]	0,31%	Development, freezability and amino acid consumption of bovine embryos cultured in ...	https://doi.org	03 Дек 2018	Модуль поиска Интернет
[18]	0,31%	The Mammalian Preimplantation Embryo (1/3)	https://doi.org	05 Сен 2018	Модуль поиска Интернет

[19]	0,24%	Unexplained Infertility	https://doi.org	12 Июл 2019	Модуль поиска Интернет
[20]	0,38%	Numerical calculations for diffusion effects in the well-of-the-well culture system for ma...	https://doi.org	01 Сен 2018	Модуль поиска Интернет
[21]	0,15%	не указано	не указано	раньше 2011	Цитирование

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Отчет о проверке текста научно-квалификационной работы на
объем заимствования

Казаринов Вениамин Игоревич

«Влияние гормональных компонентов в составе культуральных сред на
развитие эмбрионов человека *in vitro* в клинической практике»

Оригинальность работы составляет ___78.1___ %, что соответствует
требованиям порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к
защите на итоговом заседании Государственной итоговой аттестации в
аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Проверку выполнила секретарь ГЭК - к.х.н. Д.С. Новопашина