

© Э. К. Айламазян, А. О. Дурнова,  
В. О. Полякова, М. Н. Судалина,  
И. М. Кветной

## КО-КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЭМБРИОНА ЧЕЛОВЕКА С ЭНДОМЕТРИЕМ: ОПТИМИЗАЦИЯ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ

ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН,  
Санкт-Петербург

УДК: 618.177-089.888.111

■ Представлен обзор современных взглядов на ко-культивирование эмбрионов человека с эндометриальными клетками. Обсуждается роль ключевых сигнальных молекул, регулирующих имплантацию бластоцисты и развитие эмбриона. Анализируются методы ко-культивирования эмбриона с эндометрием, оптимизирующие результаты экстракорпорального оплодотворения. Приводится модифицированный протокол выделения стромальных и железистых клеток из биопсий эндометрия.

■ **Ключевые слова:** эндометрий; эмбрион; ко-культивирование; экстракорпоральное оплодотворение.

В 1978 г. впервые появилось сообщение о рождении ребенка в результате экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) [29], что явилось своеобразной точкой прорыва в репродуктивной медицине и лечении бесплодия. В течение последующих 50 лет проведены множественные усовершенствования и модификации ЭКО, включающие оптимизацию стимуляции яичников, интрацитоплазматическую инъекцию сперматозоида в яйцеклетку, улучшение среды для культивирования эмбрионов, что является важным фактором развития и роста эмбриона. Однако несмотря на все усилия, только 35–50% ЭКО приводят к положительным результатам. В 1965 г. Cole и Paul, пытаясь максимально имитировать эмбриональное микроокружение, зарегистрировали улучшение скорости бластуляции мышинных эмбрионов, впервые культивируемых с иммортализованной линией клеток-фидеров линия Hela (линия клеток рака шейки матки) [23], что позволило успешно продолжить эти исследования и в 1989 адаптировать использование клеток-фидеров для ЭКО человека [3]. Имеются данные литературы, что криосохранение эмбрионов повышает их выживаемость и сопровождается более высокой частотой имплантации. В различных исследованиях с ко-культурой клеток матки крупного рогатого скота были отмечены улучшение морфологической характеристики, скорости дробления и имплантации эмбрионов под действием сигнальных молекул, экспрессируемых эндометриальными клетками [22].

Еще в 1945 году Viganò и соавторы высказали мнение, ставшее афоризмом: «Бластоциста может виртуально имплантироваться в любом месте человеческого организма, кроме нерецептивного эндометрия» [12]. Действительно следует подчеркнуть, что имплантация может наступить в любой ткани человеческого организма (при спонтанной или экспериментальной внематочной беременности) чаще всего без всякой предварительной подготовки этой ткани, тогда как эндометрий относится к числу тех редких тканей, где имплантация невозможна, за исключением срока 4–6 дней после овуляции в период так называемого «окна имплантации». Кроме того, даже в период «окна имплантации» перенос эмбрионов окажется безуспешным, если отсутствует синхронизация между стадией развития эмбриона и эндометрия [18].

Неудачные попытки ЭКО чаще всего объясняются качеством эмбрионов. Качество ооцита — главный фактор, определяющий успех развития эмбриона, так как именно в ооците происходят сложные трансформации, приводящие к появлению эмбриона. Ооцит готовится к этому процессу в результате взаимодействия с соматическими клетками гранулезы фолликула. В то же время извлечение ооцита путем пункции фолликула в процессе ЭКО прекращает влия-

ние на него клеток микроокружения и изменяет развитие эмбриона *in vitro* [2].

Была выдвинута идея повышения зрелости, то есть стадии развития эмбриона посредством ко-культивирования его с клетками другого типа (фидерами), что привело к созданию ко-культуральных систем. Для этого использовались много типов клеток — эпителия фаллопиевых труб, эндометрия, переходного эндометриально-трубного эпителия, гранулы человека и даже клеток карциномы матки. Предполагается, что положительный эффект фидерных клеток на развитие эмбриона достигается за счет выделения ими сигнальных молекул — эмбриотропных факторов, цитокинов, факторов роста и других, в том числе металлотионеинов, элиминирующих потенциально вредоносные факторы, такие как тяжелые металлы, аммиак, свободные радикалы и другие [10].

При отборе клеток для ко-культивирования необходимо учитывать не только количество бластомеров на определенный день развития, но и проведение манипуляций с минимальной травматичностью для донора. Например, ко-культивирование с переходным эндометриально-трубным эпителием оказалось эффективным, однако доступность трубного эпителиа ограничена, поэтому этот метод не нашел широкого применения [26]. Использование в качестве донорных клеток других животных сомнительно из-за возможного присутствия в ткани неизвестных патогенов (вирусов, прионов) и требует дальнейших исследований. Только использование материнской аутологичной культуры эндометрия исключает риск какого-либо экзогенного заражения, и, кроме того, если при последующем переносе эмбриона в полость матки попадут клетки эндометрия, служившие фидерными, иммунной реакции в этом случае не последует [23]. Показано, что использование аутологичных эпителиальных клеток эндометрия (АЭЭК) полученных из образцов эндометрия предыдущих менструальных циклов полностью устраняет риск внешних бактериальных или вирусных инфекций, решая множество медицинских, технических и этических проблем.

В последние годы усилия исследователей сосредоточены на попытках улучшения (оптимизации) культуральной системы *in vitro* посредством максимального приближения условий культивирования к естественным [22]. Главная проблема искусственной культуральной среды заключается в том, что развитие эмбриона в ней замедляется из-за недостатка ростовых факторов. Следует учесть, что ко-культивирование с клетками первичной культуры — является трудоемким и требует взятия биопсии, ферментативного воздей-

ствия на клетки и типирования клеток-фидеров. Альтернативный способ — использовать коммерческую линию клеток. Достаточно широко используется при лечении бесплодия линия клеток из почки африканской зеленой марьши Vero, однако она ненадежна для ЭКО. Более перспективным является использование иммортализованной линии клеток человека. Показано, что у бластоцисты, выращенной в ко-культуре с эндометриальными клетками, развивается большее число бластомеров даже по сравнению с эмбрионами, выращенными в коммерчески доступных искусственных средах типа G2.3 [4]. При проведении исследований эндометриальной линии с клетками фаллопиевых труб и линии Vero установлено, что эндометриальные клетки обладают лучшим эмбриотропным потенциалом.

При анализе данных по ко-культивированию бластоцисты со стромальными клетками эндометрия установлено, что после проведения 90 циклов развития бластоцист на стромально-эпителиальном монослое, полученном после 1 месяца культивирования, и перенесения в матку на стадии морулы (4 день), отмечается повышение частоты наступления беременности до 21 % по сравнению с 8 % в предыдущих циклах [2].

### Восприимчивость эндометрия: действие гормонов, цитокинов и факторов роста

Общеизвестно, что успешная имплантация зависит от качества бластоцисты, рецептивности эндометрия и синхронизации его со стадией развития эмбриона. Этот динамический процесс требует координации действия аутокринных, паракринных и эндокринных факторов. Взаимодействие между трофобластом и эндометрием на стадии адгезии бластоцисты до сих пор исследовано недостаточно. Изучить процесс имплантации на женщинах в естественных условиях невозможно в силу этических и технических проблем, поэтому большинство существующих данных по этому вопросу получено при экспериментальных исследованиях.

Учитывая большое число сигнальных молекул, вовлеченных в процесс имплантации и широкий спектр их действия, особое внимание в данной статье уделено только тем основным факторам, которые присутствуют в эндометрии и обеспечивают паракринную регуляцию имплантации [20].

**Стероидные гормоны.** Прогестерон и эстрогены играют ключевую роль в регуляции многих сигнальных молекулярных механизмов, обеспечивающих имплантацию эмбриона. В период имплантации эндометрий под влиянием стероидов, приобретает соответствующую морфоло-

гическую и функциональную структуру, облегчающую адгезию бластоцисты. Экспрессия гликопротеинов — интегринов, необходимых для прикрепления бластоцисты к эпителию матки, также во-многом регулируется изменением соотношения эстрогенов к прогестерону, в сторону преобладания эстрогенов [14].

**Простагландины (PGs).** Игрывают важную роль в различных репродуктивных процессах, включая овуляцию, имплантацию и менструацию. Циклооксигеназы (COX-1 and COX-2) являются ключевыми ферментами, ответственными за синтез различных PGs. Показано, что простагландин-D-синтаза (PGDS) и простагландин-синтаза (PGIS) присутствуют в матке крысы во время беременности, при этом особенно высокий уровень отмечаются на ранней стадии беременности. Блокада синтеза PGs до и во время имплантации вызывает полное прекращение, задержку или сокращение числа мест имплантации из-за истончения децидуальной ткани [16].

**Цитокины.** Являются многофункциональными гликопротеинами, обеспечивающими мощные межклеточные сигналы, регулирующие функции эндометриальных клеток и взаимодействия между эндометрием и эмбрионом. Для проникновения бластоцисты в маточный эпителий важен адекватный синтез цитокинов трофобластами и эпителием матки, обеспечивающий регуляцию экспрессии молекул адгезии [24]. Наиболее важными цитокинами, влияющими на прикрепление и проникновение бластоцисты являются LIF (фактор ингибирования лейкемии), IL-6, IL-11.

**Ростовые факторы.** Семейство сигнальных молекул, способных стимулировать деление и дифференцировку клеток млекопитающих.

**Трансформирующий фактор роста (TGF)** существует в трех изоформах: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 и TGF- $\beta$ 3. Члены этого суперсемейства присутствуют в эндометрии и участвуют в регуляции клеточных изменений, связанных с пролиферацией, децидуализацией и процессом имплантации. У человека во время менструального цикла, заметно меняется концентрация только TGF- $\beta$ 3, особенно интенсивная секреция этого фактора наблюдается в железистом эпителии во время поздней секреторной фазы, что отражает его участие в подготовке матки к имплантации. Кроме того у человека TGF- $\beta$  способствует имплантации, стимулируя экспрессию фибронектина или фактора роста сосудов, способствуя прилипанию трофобластов к внеклеточному матриксу [21].

Присутствие *эпидермальных ростовых факторов (EGF)* в стромальных клетках эндометрия во время пролиферативной фазы и в трофобла-

сте во время секреторной фазы свидетельствует об их взаимном участии в процессе имплантации. Представляет интерес тот факт, что блокада рецепторов к EGF у мышей приводило к смерти эмбрионов еще до внедрения их в слизистую оболочку матки [9].

*Гепарин-связывающий ростовой фактор (HB-EGF)* присутствует в эндометриальных стромальных и эпителиальных клетках и регулирует пролиферацию эндометрия, секрецию железистым эпителием и децидуальную трансформацию [25]. Электронная иммуногистохимия показала наиболее высокий уровень экспрессии HB-EGF в железистом эпителии, когда пиноподии полностью развиты, что подчеркивает роль HB-EGF в процессе прикрепления и имплантации бластоцисты.

*Инсулиноподобные ростовые факторы (IGF):* IGF I и IGF II — ключевые факторы, влияющие на деление и дифференцировку клеток. В исследованиях, проводившихся на самках песчанок введение IGF-I ускорило развитие эмбриона и улучшило его качество, повысив число клеток трофоэктодермы и внутренней клеточной массы. Присутствие IGF-II в культуральной среде также стимулировало формирование бластоцисты из двухклеточного эмбриона. Добавление в среду физиологической концентрации IGF-I в ходе ЭКО значительно повышало образование blastомеров [28].

Таким образом, очевидно, что ко-культивирование эмбриона с эндометрием позволяет создать в клеточном окружении эмбриона уровень факторов роста, цитокинов и других сигнальных молекул близкий к физиологическому, что практически невозможно обеспечить ни в одной искусственной культуральной среде.

### Методологические аспекты ко-культивирования

Наиболее оптимальным периодом для взятия биопсии эндометрия является срок через  $7 \pm 2$  дня после овуляции [19]. Spandorfer et al. показали, что ко-культивирование с клетками полученными в этот период значительно эффективнее, чем со взятymi как в более ранние, так и в более поздние сроки [19].

Взятие биопсии определяется пиком секреции лютеинизирующего гормона (ЛГ), наиболее позитивные результаты ко-культивирования были получены с эндометриальными клетками, при взятии ткани в период средней или поздней стадии секреции. Spandorfer et al. [19] установили, что взятие биопсии не позднее чем через 5 дней после пика ЛГ, позволяет значительно повысить успех ко-культивирования, а значит и ЭКО.

Следует обратить внимание на возможность криоконсервации клеток эндометрия [13]. Таким образом, после взятия биопсии клетки могут храниться в течение длительного времени, что позволяет снизить риск инфицирования, а также препятствует развитию воспалительного процесса, т. к. клетки взяты из предыдущих менструальных циклов.

Успешное кокультивирование требует присутствия в монослое как стромальных, так и железистых клеток. Стромальные клетки оказывают сигнальное паракринное влияние на железистые клетки, что стимулирует пролиферацию последних и экспрессию ростовых факторов, способствующих успешному развитию эмбриона [28]. Для выяснения роли стромальных клеток в регуляции роста и дифференцировки железистого эпителия, были проведены измерения интенсивности выделения белка гликоделина, как биомаркера дифференцировки железистых клеток. Гликоделин также известен как плацентарный белок-14 или 2-PEG, он является продуктом железистых клеток в позднюю секреторную фазу и децидуализованного эндометрия в течение ранней стадии беременности. Уровень гликоделина был измерен в среде монокультуры железистых клеток и ко-культуры со стромальными клетками, было установлено, что в ко-культуре стромальных и железистых клеток уровень исследованного биомаркера был достоверно выше [15].

Предложен метод оценки качества бластоцисты с помощью анализа белкового состава культуральной среды на различных этапах развития эмбриона [8]. Показано, что в среде, где культивировались эпителиальные клетки эндометрия, уровень IL-6, PLGF, Vcl, CXCL13 выше, чем в традиционных средах, тогда как уровень FGF-4, VEGF и PAR был значительно ниже. Также установлено, что в среде, где развивались жизнеспособные эмбрионы, уровень IL-6 был значительно снижен, что свидетельствует о необходимости присутствия этого фактора на заключительных этапах формирования бластоцисты и при имплантации. Оценка уровня IL-6 может явиться эффективным способом оценки качества эмбриона для снижения количества имплантируемых эмбрионов и, в конечном итоге, предотвращения множественных беременностей. Добавление LIF в бессывороточную культуральную среду эффективно повышает не только скорость развития, но и качество эмбриона [10].

В настоящее время не существует унифицированной методики выделения железистых и стромальных клеток эндометрия. Для этого применяются ферментативное расщепление

ткани питательной средой с добавлением смеси трипсина и ЭДТА и механическая диссоциация. В последнее десятилетие в клиническую практику вошло более мягкое расщепление средой с добавлением коллагеназы (время диссоциации варьирует от 5 до 30 мин) [19]. Для выделения чистой культуры часто применяется осаждение в градиенте плотности [11], либо более быстрый способ с использованием набора фильтров с порами разного диаметра [10, 11].

По поводу выбора питательной среды также не сложилось единого мнения. В более ранних исследованиях, как правило, применяли такие простые среды как трубная жидкость человека, сбалансированный солевой раствор Эрла или Хенкса с постепенным переходом к использованию комбинированных сред с добавлением сыворотки плодов телят (FBS) или сыворотки пациентки (5–15%). К сожалению, трудно определить, оказывает ли неоднородность питательных сред, используемых в различных исследованиях, значимое клиническое воздействие [4, 22].

Дискуссионным является вопрос о дне переноса эмбриона в матку. Как правило, эмбрионы переносят в матку по достижении 2- или 8-клеточной стадии (после 72 часов кокультивирования), в то время, когда они еще должны быть в фаллопиевых трубах, однако на этих сроках более 90% несомненно здоровых эмбрионов гибнет [23].

Перенесение эмбриона на стадии бластоцисты является более физиологичным и повышает шанс на имплантацию и беременность (человеческий эмбрион подходит к эндометрию только на 5-й день, когда достигает стадии морулы) [23]. Показано, что шанс успешной имплантации после перенесения эмбриона на 5-й день практически в 2 раза выше, чем на 6-й, и тем более при имплантации менее развитых бластоцист [1, 6].

За 2–3 дня перед переносом эмбриона в культуру размораживается приблизительно равное количество железистых и стромальных клеток. Эмбрионы помещаются прямо на культуру по достижении ею 75%-го монослоя, либо на специальные транслучные вставки, которые позволяют проходить жидкости и молекулам, но препятствуют непосредственному контакту эмбриона с эндометрием, что значительно упрощает смену среды и снижают риск повреждения эмбриона [23].

Установлено, что зиготы, ко-культивируемые группой, также развивались лучше, чем поодиночке, предположительно, за счет ростовых факторов, выделяемых другими эмбрионами [17].

При изучении ряда протоколов нами была составлена и отработана методика, позволяющая выделить из биопсийного эндометрия стромальную и железистую фракцию высокой степени чистоты.

Для оценки степени чистоты культуры железистых и стромальных клеток традиционно применяется иммуноцитохимическое окрашивание. Для верификации железистых клеток используются маркеры Е-кадгерин и цитокератин-8, для стромальных клеток — виментин (табл. 1) [7].

Таблица 1

## Иммуноцитохимические маркеры эндометриальных клеток

Маркер	железы	строма
CD9	+	-
CD13	+	+
Е-кадгерин	+	-
Виментин	-	+
Цитокератин-8	+	-

**Методика культивирования.** Растворение ткани ферментативным путем и осаждение с последующим разделением клеток на стромальные и эпителиальные проводится следующим образом. Ткань нарезается на мелкие кусочки (1–2 мм<sup>3</sup>), промывается раствором Дульбекко без ионов Са и Mg (DPBS) с антибиотиками (пенициллин — стрептомицин) для удаления остатков крови и секрета. Далее следует инкубация ткани в течение 5 мин при 37° в 10 мл раствора Дульбекко с добавлением 0,2 % коллагеназы II типа (приготовление раствора проводилось с учетом единиц активности фермента, указанной производителем, до конечной концентрации 150–200 ед/мл). Полученные клеточные агрегаты диспергируются пропусканием через пипетку (пипетирование). После 1-минутного осаждения 8 мл супернатанта, содержащего небольшие целые железы и стромальные клетки, центрифугируются 5 мин при 400g, для избавления от фермента, осадок после центрифугирования растворяется в 2 мл среды DMEM + 15 % FBS и антибиотики (далее DMEM+15 %). Цикл выделения повторяется 4–5 раз, при этом клетки, очищенные от фермента, растворяются в 2 мл среды и переносятся в 1 центрифужную пробирку. Таким образом, после 5 выделений в пробирке находятся 10 мл раствора клеток с питательной средой, которые затем подвергаются седиментации в течение 45 минут. Супернатант, содержащий преимущественно стромальные клетки, переносится в лунки в концентрации  $1 \times 10^3$  клеток в мл (рекоменду-

ется оценить количество и жизнеспособность клеток при помощи трипанового синего в камере Горяева).

Кусочки ткани, оставшиеся после 5 выделений, содержащие преимущественно целые железы, нерастворенную соединительную ткань и сгустки стромальных клеток, ресуспендируются в 10 мл DMEM+15 % FBS и осаждаются в течение 1 минуты, затем весь супернатант (около 8 мл) переносится в отдельную центрифужную пробирку и подвергается седиментации в течение 30 минут. Супернатант после осаждения удаляется, а осадок, обогащенный железистыми клетками и интактными железами высаживается в лунки с учетом концентрации клеток  $1 \times 10^3$  клеток в мл.

Культура поддерживается при 37 °С, в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Культуральная среда меняется каждые 2 дня. По достижении монослоя, клетки открепляются с помощью смеси трипсина-ЭДТА (через 5–7 дней).

Криоконсервация осуществляется в 10 % DMSO на сыворотке, заморозка до –70° за 12 часов, хранение в жидком азоте.

Данная методика позволяет получить культуру эндометриальных клеток стромального и железистого происхождения для широкого спектра дальнейших исследований. Однако для использования ее при ко-культивировании необходимо заменить FBS на сыворотку крови человека и использовать культуральную среду, принятую для культивирования эмбриона.

### Ко-культивирование эмбриона с монослоем эпителиальных и стромальных клеток

Ниже приведена одна из общепринятых в зарубежных лабораториях методик ко-культивирования. Размораживается приблизительно равное количество железистых и стромальных клеток за день до введения человеческого хориогонадотропина (ХГЧ) пациентке согласно программе ЭКО. Устанавливается количество и жизнеспособность клеток и приблизительно  $3 \times 10^5$  клеток высаживается в 4-луночный планшет, содержащий по 1 мл среды Ham's F-10 с 15 % сыворотки пациентки. По достижении приблизительно 75 % клеток до монослоя оплодотворенные яйцеклетки высаживаются по 1–2 на лунку. Первые 2 дня культуральная среда не заменяется [17, 19].

Альтернативой культивирования на монослое является метод ко-культивирования на вставках, содержащих мембранные поры диаметром 0,4 мкм

Эндометриальные клетки высаживаются во внутреннюю лунку Costar Transwell dish в концентрации  $15\text{--}30 \times 10^3$  клеток на каждую.

Приблизительно по достижении 50% монослоя, эмбрион помещается на вставку. Перед подсаживанием вставка дважды промывается культурной средой. Среда Global Blastocyst Medium + 10% синтетический сывороточный заменитель. Среда обновляется ежедневно. Культура поддерживается при 37 °С в 5,5 атмосфере CO<sub>2</sub>. Ежедневная полузамена среды эффективна для поддержания рН на уровне 7,2–7,4 и позволяет избежать изменений осмотической концентрации раствора без покрытия маслом [23].

### Заключение

Анализ данных литературы свидетельствует о том, что биопсия у пациентки эндометрия для культивирования при ЭКО является безопасной процедурой и повышает уровень удачных исходов имплантации [5, 8, 23].

Результаты 5-летнего исследования Mercader et al. подтвердили, что ко-культивирование эмбрионов с эндометриальными эпителиальными клетками повышает шанс формирования бластоцисты и уровень имплантации от 50,8 до 58,2%. Эта техника сокращает среднее количество эмбрионов, подсаживаемых каждой пациентке. При этом риск врожденных дефектов аналогичен результатам ранних программ ЭКО [7].

Существует большое количество рандомизированных исследований, подтверждающих высокий эмбриотропный эффект ко-культивирования. Установлено, что ко-культивирование способствует улучшению качества эмбрионов, скорости имплантации и повышает частоту наступления беременности [22].

Резюмируя изложенный материал, можно полагать, что ко-культивирование эмбрионов должно широко использоваться в центрах вспомогательных репродуктивных технологий, так как в последние десятилетия получены достоверные данные об эффективности и безопасности обсуждаемого метода.

### Литература

1. A comparison of day 5 and day 6 blastocyst transfers / Shapiro B.S. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 2001. — Vol. 75, № 6. — P. 1126–1130.
2. Antczak M., Van Blerkom J. Oocyte influences on early development: the regulatory proteins leptin and STAT3 are polarized in mouse and human oocytes and differentially distributed within the cells of the preimplantation stage embryo // *Molecular Human Reproduction.* — 1997. — Vol. 3. — P. 1067–1086.
3. Bavister B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts // *Hum. Reprod. Update.* — 1995. — Vol. 1. — P. 91–148.
4. Behr B., Wang H. Effects of culture conditions on IVF outcome // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* — 2004. — Vol. 115. — P. 72–76.
5. Beneficial effect of autologous endometrial cell coculture in patients with repeated implantation failure / Eyheremendy V. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 2010. — Vol. 93, № 3. — P. 769–773.
6. Blastocyst culture after repeated failure of cleavage-stage embryo transfers: a comparison of day 5 and day 6 transfers / Barrenetxea G. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 2005. — Vol. 83, № 1. — P. 49–53.
7. Clinical experience and perinatal outcome of blastocyst transfer after coculture of human embryos with human endometrial epithelial cells: a 5-year follow-up study / Mercader A. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 2003. — Vol. 80, № 5. — P. 1162–1168.
8. Coculture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure / Simón C. [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 1999. — Vol. 84, № 8. — P. 2638–2646.
9. EGF increases expression and activity of PAs in preimplantation rat embryos and their implantation rate / Aflalo E.D. [et al.] // *Reprod. Biol. Endocrinol.* — 2007. — Vol. 5. — P. 4–9.
10. Embryologic outcome and secretome profile of implanted blastocysts obtained after coculture in human endometrial epithelial cells versus the sequential system / Dominguez F. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 2010. — Vol. 93, № 3. — P. 774–782.
11. Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model / Arnold J.T. [et al.] // *Hum. Reprod.* — 2001. — Vol. 16, № 5. — P. 836–845.
12. Endometriosis: epidemiology and etiological factors / Vigan P. [et al.] // *Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* — 2004. — Vol. 18, № 2. — P. 177–200.
13. ESHRE's European IVF Monitoring. On the benefit of assisted reproduction techniques, a comparison of the USA and Europe / Nygren K. [et al.] // *Hum. Reprod.* — 2006. — Vol. 21. — P. 21–94.
14. Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation / Ma W.G. [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2003. — Vol. 100. — P. 2963–2968.
15. Evron A, Goldman S, Shalev E. Effect of primary human endometrial stromal cells on epithelial cell receptivity and protein expression is dependent on menstrual cycle stage // *Hum. Reprod.* — 2011. — Vol. 26, № 1. — P. 176–190.
16. Expression of human prostaglandin transporter in the human endometrium across the menstrual cycle / Kang J. [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2005. — Vol. 90. — P. 2308–2313.
17. Human preembryo development on autologous endometrial coculture versus conventional medium / Barmat L. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 1998. — Vol. 70, № 6. — P. 1109–1113.
18. Imbar T., Hurwitz A. Synchronization between endometrial and embryonic age is not absolutely crucial for implantation // *Fertil. Steril.* — 2004. — Vol. 82, № 2. — P. 472–474.
19. Importance of the biopsy date in autologous endometrial cocultures for patients with multiple implantation failures / Spandorfer S.D. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 2002. — Vol. 77, № 6. — P. 1209–1213.

20. Invasiveness of human endometrial stromal cells is promoted by decidualization and by trophoblast-derived signals / Gellersen B. [et al.] // *Hum. Reprod.* — 2010. — Vol. 25, № 4. — P. 862–873.
21. Irving J.A., Lala P. K. Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGF-beta, IGF-II, and IGFBP-1 // *Exp. Cell Res.* — 1995. — Vol. 217. — P. 419–427.
22. Kattal N., Cohen J., Barmat L.I. Role of coculture in human in vitro fertilization: a meta-analysis // *Fertil. Steril.* — 2008. — Vol. 90, № 4. — P. 1069–1076.
23. Live births in poor prognosis IVF patients using a novel non-contact human endometrial co-culture system / Desai N. [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* — 2008. — Vol. 16, № 6. — P. 869–874.
24. Local injury to the endometrium in controlled ovarian hyperstimulation cycles improves implantation rates / Zhou L. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 2008. — Vol. 89, № 5. — P. 1166–1176.
25. Marker molecules of human endometrial differentiation can be hormonally regulated under in-vitro conditions as in-vivo / Classen-Linke I. [et al.] // *Hum. Reprod.* — 1998. — Vol. 4, № 5. — P. 539–549.
26. Natural selection of human embryos: decidualizing endometrial stromal cells serve as sensors of embryo quality upon implantation / Teklenburg G. [et al.] // *PLoS One.* — 2010. — Vol. 21, № 4. — P. e10258
27. Routine addition of human insulin-like growth factor-I ligand could benefit clinical in-vitro fertilization culture / Lighten A.D. [et al.] // *Hum. Reprod.* — 1998. — Vol. 13, № 11. — P. 3144–3150.
28. Singh M., Chaudhry P., Asselin E. Bridging endometrial receptivity and implantation: Network of hormones, cytokines, and growth factors // *Endocrinol.* — 2011. — Vol. 210, № 1. — P. 5–14.
29. Steptoe P. C., McCaffery M. A second Darwin-or Franckenstein? // *Can. Fam. Physician.* — 1979. — Vol. 25. — P. 602–607.

Статья представлена И. Ю. Коганом,  
ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН,  
Санкт-Петербург

#### CO-CULTIVATION OF EMBRYOS WITH HUMAN ENDOMETRIUM: OPTIMIZATION OF IN VITRO FERTILIZATION

Ailamazyan E. K., Durnova A. O., Polyakova V. O., Sudalina M. N., Kvetnoy I. M.

■ **Summary:** The review is devoted to analysis of current knowledge about co-cultivation of human embryos with endometrial cells. The role of signaling molecules for regulation of implantation as well as embryo development is discussed. The special attention takes to the methodological aspects of cocultivation, which are promising for *in vitro* fertilization.

■ **Key words:** endometrium; embryo; signaling molecules; co-cultivation; *in vitro* fertilization.

#### ■ Адреса авторов для переписки

*Айламазян Эдуард Карпович* — заслуженный деятель науки РФ, академик РАМН, профессор, директор.

ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН.

199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3.

**E-mail:** iagmail@ott.ru

*Дурнова Анна Олеговна* — к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной биологии отдела патоморфологии. ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д.3. **E-mail:** anna.durnova@gmail.com

*Полякова Виктория Олеговна* — д. б. н., руководитель лаборатории клеточной биологии отдела патоморфологии. ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д.3. **E-mail:** vopol@yandex.ru

*Судалина Мария Николаевна* — студентка 3 курса биолого-почвенного факультета. Санкт-Петербургский государственного университета. 199034, Россия, Санкт-Петербург, Университетская наб. д. 7–9. **E-mail:** rumpleteaze@list.ru

*Кветной Игорь Моисеевич* — заслуженный деятель науки РФ, профессор, д. м. н., руководитель отдела патоморфологии. ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д.3. **E-mail:** igor.kvetnoy@yandex.ru

*Ailamazyan Eduard Karpovich* — the RAMS academician, professor, director. D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, RAMS 199034 Russia, St. Petersburg, Mendeleevskaya Line, 3.

**E-mail:** iagmail@ott.ru

*Durnova Anna Olegovna* — PhD, senior researcher of the Laboratory of Cell Biology, the Department of Pathomorphology. D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, RAMS. 199034 Russia, St. Petersburg, Mendeleevskaya Line, 3. **E-mail:** anna.durnova@gmail.com

*Polyakova Viktoriya Olegovna* — MD, the Head of the Laboratory of Cell Biology, the Department of Pathomorphology. D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, RAMS. 199034 Russia, St. Petersburg, Mendeleevskaya Line, 3. **E-mail:** vopol@yandex.ru

*Sudalina Mariya Nikolaevna* — The third grade student of The Faculty of Biology and Soil Sciences.

Saint Petersburg State University. 199034, Russia, St. Petersburg, Universitetskaya nab 7–9. **E-mail:** rumpleteaze@list.ru

*Kvetnoy Igor Moiseevich* — MD, professor. the Head of the Department of Pathomorphology. D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, RAMS. 199034 Russia, St. Petersburg, Mendeleevskaya Line, 3. **E-mail:** igor.kvetnoy@yandex.ru