

# ЭмбриоГен

Первая культуральная  
среда, содержащая  
фактор роста

естественное  
развитие эмбриона

GM-CSF

успешная  
имплантация

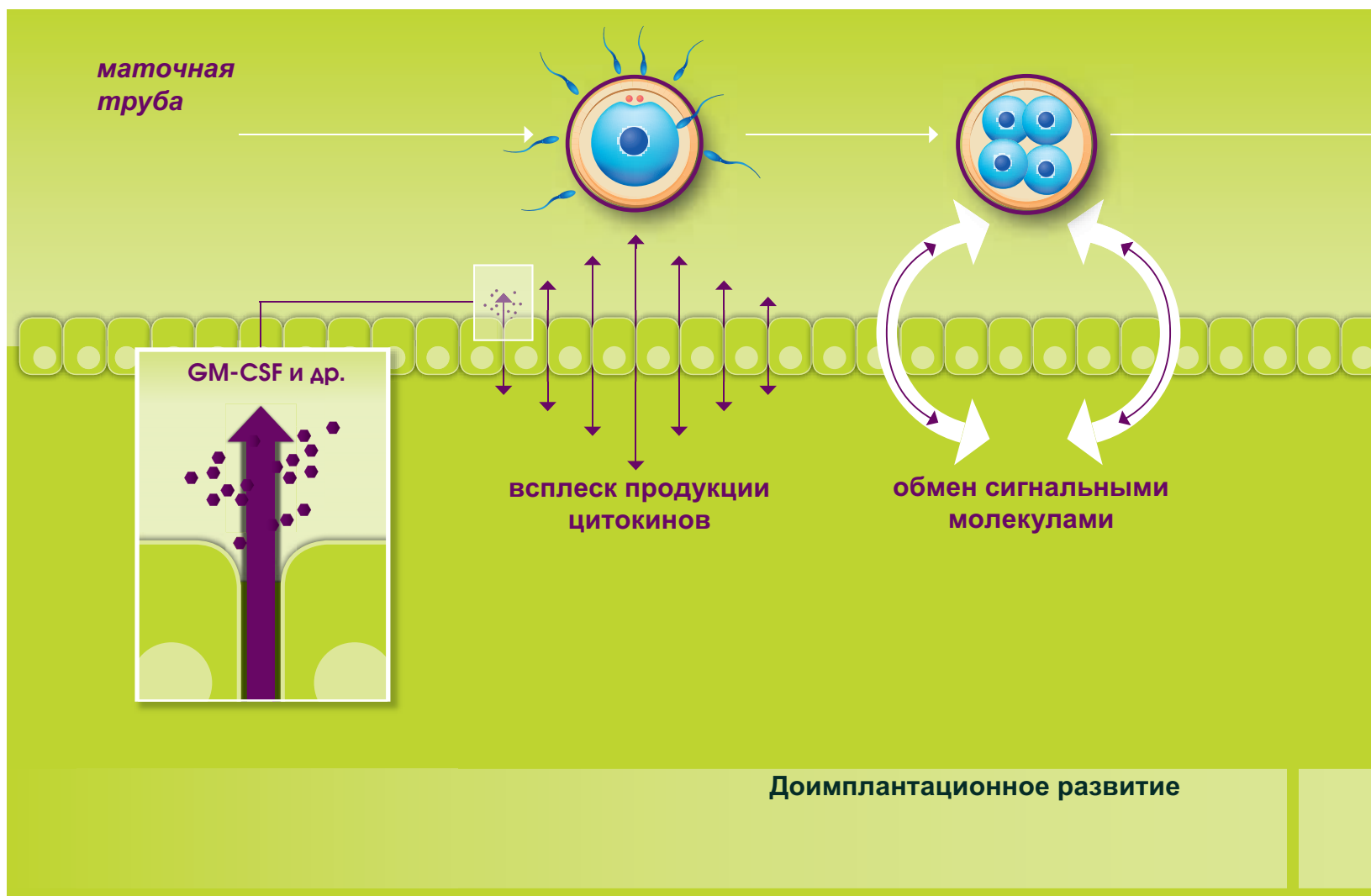


origio  
for life

# Цитокины, факторы

При естественном зачатии от момента оплодотворения до имплантации эмбрион развивается в среде, богатой цитокинами и факторами роста<sup>1</sup>. Данные вещества - сигнальные молекулы, регулирующие пролиферацию, дифференцировку и метаболизм клеток; синтезируются клетками тканей женской репродуктивной системы и самим развивающимся эмбрионом<sup>2</sup>. Пролиферация и дифференцировка эмбриональных клеток, взаимодействие бластоцисты с эндометрием в момент имплантации, сам процесс имплантации, иммунная толерантность материнского организма по отношению к эмбриону, инвазия трофобласта, формирования плаценты и последующее прогрессирование беременности зависят от адекватного баланса ростовых факторов и цитокинов<sup>3</sup>.

При культивировании *in vitro* эмбрион развивается в среде, полностью лишённой ростовых факторов и цитокинов, что может быть причиной снижения его жизнеспособности и имплантационного потенциала. Поэтому добавление цитокинов и ростовых факторов в среды для культивирования эмбрионов *in vitro* стало логичным и очевидным этапом развития культуральных сред.



<sup>1</sup> Lédée et al., Cytokines in follicular fluids, implantation and miscarriage. J Reprod Immunol, 2011;90:133-134.

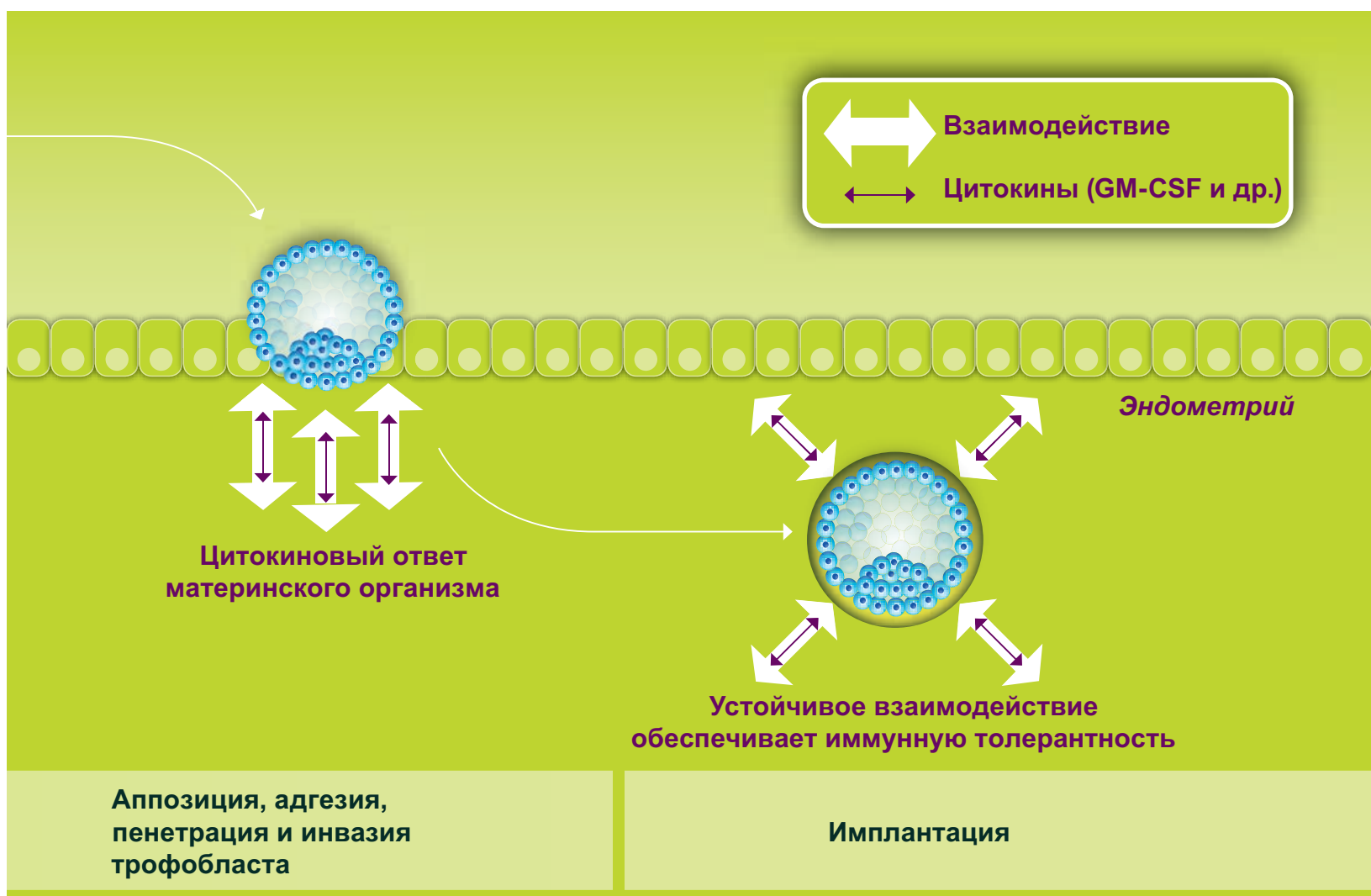
<sup>2</sup> Segerer et al., Upregulation of chemokine and cytokine production during pregnancy, Gynecol. Obstet. Invest, 2009; 67:145-150

<sup>3</sup> Laird et al., Cytokine expression in the endometrium of women with implantation failure and recurrent miscarriage, Reprod. Biomed Online, 2006; 13(1):13-23

# роста и беременности

Одним из основных кандидатов на добавление в культуральные среды стал GM-CSF – гранулоцитарно - макрофагальный колониестимулирующий фактор. Исследования на модельных объектах показали, что GM-CSF, первоначально известный как стимулятор пролиферации и дифференцировки гранулоцитов и моноцитов, играет огромную роль в реализации репродуктивной функции<sup>4</sup>. Рецепторы к GM-CSF обнаруживаются на мембране эмбриональных клеток уже на стадии двух бластомеров<sup>5</sup>.

GM-CSF синтезируется клетками фолликулов, эпителия фаллопиевых труб и эндометрия. Показано, что концентрация GM-CSF в фолликулярной жидкости, из которой был аспирирован ооцит, достоверно коррелирует со способностью к имплантации эмбриона, полученного из данного ооцита<sup>6</sup>. Во время беременности GM-CSF вырабатывается клетками трофобласта, а впоследствии – плаценты. При естественном зачатии всплески секреции GM-CSF наблюдаются после попадания спермы в репродуктивный тракт, во время оплодотворения и имплантации<sup>7</sup>.



<sup>4</sup>Robertson, Basic science to clinical application, the utility of GM-CSF in reproductive medicine, J Reprod Immunol, 2001;90(2):132-133

<sup>5</sup>Robertson GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy. Cytokine & Growth Factor Rev 2007;18:287-298

<sup>6</sup>Lédée et al., Levels of follicular G-CSF and interleukin-15 appear as noninvasive biomarkers of subsequent successful birth in modified natural in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles. Fert Ster.2011;95(1):94-98

<sup>7</sup>Sharkey et al., Sperm and seminal plasma differentially regulate cytokine and chemokine protein expression by human cervical epithelial cells J Reprod Immunol.2010; 86(1):68

# Роль GM-CSF в репродукции

Изучение роли GM-CSF в репродукции млекопитающих активно началось в 90-х годах прошлого столетия. Эксперименты по совместному культивированию эмбрионов с клетками эндометрия показали, что эффективность такой системы связана с секрецией GM-CSF клетками эндометрия<sup>1</sup>. Исследования, проведенные на мышах, нокаутных по гену GM-CSF, продемонстрировали значительное снижение показателей фертильности у таких животных. Мутация по гену GM-CSF вызывает нарушение формирования лабиринтной зоны плаценты, ответственной за транспортировку питательных веществ к плоду. Вследствие этого значительно возрастает частота потерь беременностей и постнатальной гибели детёнышей. Наиболее тяжелые нарушения развиваются в случае, когда и мать, и плод являются нокаутами по GM-CSF<sup>2</sup>.

Добавление GM-CSF в среду для культивирования эмбрионов мыши способствует ускорению темпов дробления и позволяет получить большее количество жизнеспособных эмбрионов. При этом увеличивается частота формирования бластоцист, сами бластоцисты имеют более развитую внутреннюю клеточную массу; возрастает частота хэтчинга и имплантации. Присутствие GM-CSF в культуральной среде увеличивает потребление эмбрионом глюкозы, снижает уровень апоптоза и способствует увеличению экспрессии антиапоптотических генов<sup>3</sup>.

Более того, присутствие GM-CSF в культуральной среде влияет на постнатальное развитие детёнышей. В отличие от контрольной группы, для которой характерно замедление темпов внутриутробного развития плодов, рождение детёнышей со сниженной массой тела, быстрый компенсаторный рост после рождения и развитие взрослых особей, склонных к нарушению метаболизма и ожирению, культивирование эмбрионов в среде с GM-CSF способствует как нормальному внутриутробному, так и нормальному постнатальному развитию и не сопровождается метаболическими отклонениями. Интересно, что эффект присутствия GM-CSF наиболее ярко проявляется в средах более бедного состава; возможно, наличие GM-CSF позволяет смягчить стрессовое воздействие неоптимальных условий культивирования на эмбрион<sup>4</sup>.

Положительное влияние присутствия GM-CSF в культуральной среде на развитие и имплантацию эмбриона было подтверждено экспериментами на эмбрионах коров, свиней и овец<sup>1</sup>. Результаты исследований на эмбрионах млекопитающих, а также положительный опыт доклинических испытаний<sup>5</sup> способствовали созданию среды ЭмбриоГен. Эта среда содержит 2 нг/мл GM-CSF и предназначена для оплодотворения, культивирования до 3 суток и переноса эмбрионов человека в полость матки.

Безопасность и результативность применения ЭмбриоГена были подтверждены самым масштабным в истории культуральных сред проспективным рандомизированным двойным слепым плацебо-контролируемым исследованием<sup>6</sup>.

<sup>1</sup> Spandorfer et al., Granulocyte macrophage-colony stimulating factor production by autologous endometrial co-culture is associated with outcome for in vitro fertilization patients with a history of multiple implantation failures. J Reprod Immunol, 1998; 40(5):377-81.

<sup>2</sup> Robertson, GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy. Cytokine & Growth Factor Rev 2007; 18:287-298

<sup>3</sup> Robertson et al., Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes glucose transport and blastomere viability in murine preimplantation embryos. Biol Reprod. 2001; 64(4):1206-15.

<sup>4</sup> Sjoblom et al., Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor alleviates adverse consequences of embryo culture on fetal growth trajectory and placental morphogenesis. Endocrinology. 2005; 146(5):2142-53.

<sup>5</sup> Sjoblom et al., Granulocyte-macrophage colony stimulating factor promotes human blastocyst development in vitro. Hum. Reprod. 1999; 14:3069-76.

<sup>6</sup> Ziebe et al., A randomized clinical trial to evaluate the effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in embryo culture medium for in vitro fertilization. Fert. & Stert. 2013; Vol 99, Issue 6: 1600-1609.e2



# ЭмбриоГен – культуральная среда, содержащая GM-CSF



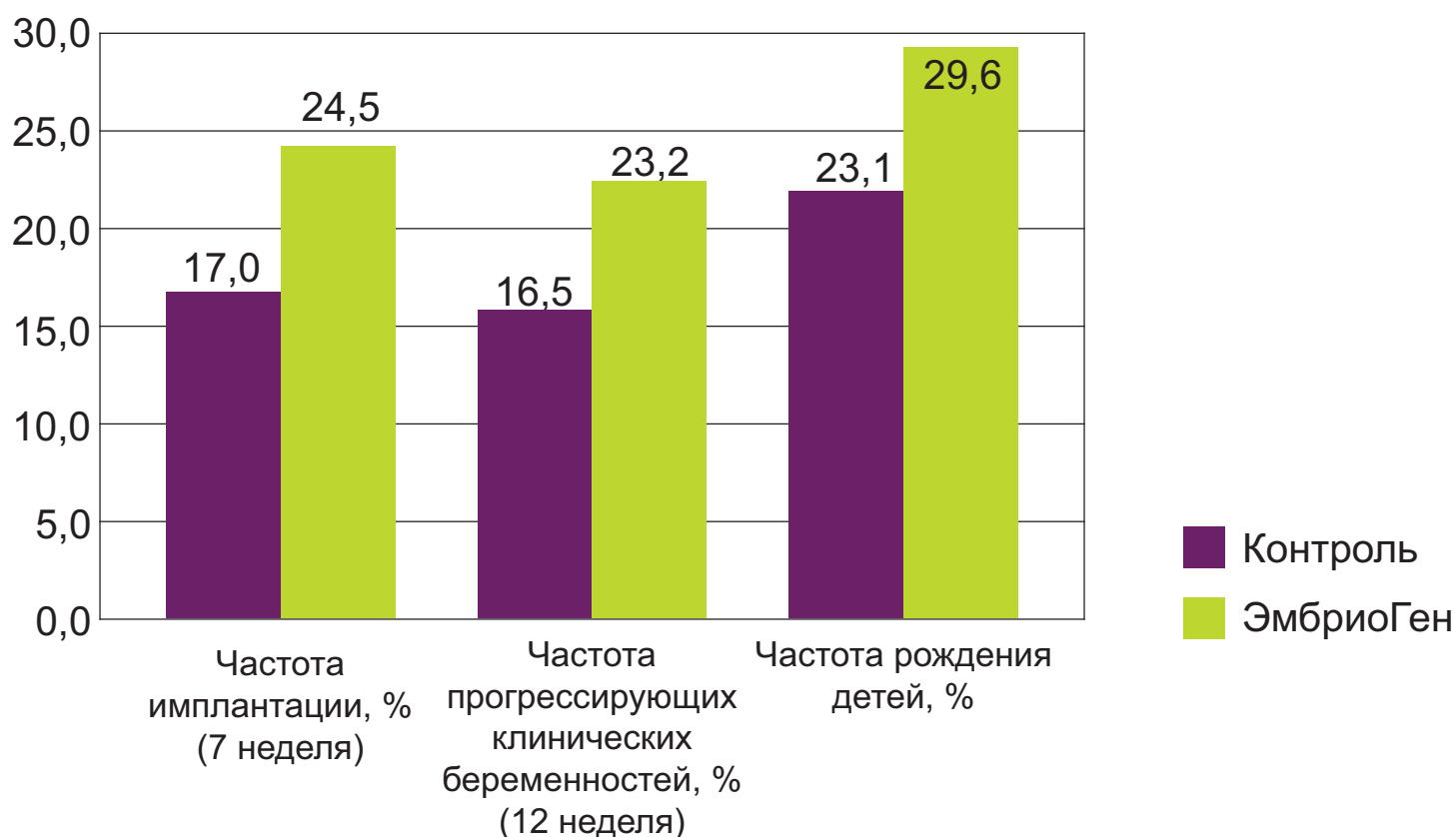
## Эффективность подтверждена самым масштабным исследованием культуральных сред в истории ВРТ <sup>6</sup>

- Среда для проведения оплодотворения, культивирования и переноса эмбрионов с добавлением 2нг/мл рекомбинантного GM-CSF
- Проспективное, многоцентровое, рандомизированное, плацебо-контролируемое, двойное слепое исследование
- 11 датских и 3 шведских клиники
- 1332 женщины
- 1151 перенос эмбрионов
- 358 рождённых детей

**Доказано повышение частоты имплантации на 44% и увеличение частоты рождения детей на 28% в подгруппе пациенток со спонтанным прерыванием беременности в анамнезе**

# ЭмбриоГен – достоверное увеличение

Подгруппа пациенток со спонтанным



Результативность цикла ЭКО/ИКСИ

Исследование показало, что культивирование эмбрионов в среде ЭмбриоГен, содержащей 2нг/мл GM-CSF, достоверно:

- повышает частоту прогрессирующих клинических беременностей (29,3% против 24,8%,  $P=0,04$ )
  - повышает частоту рождения детей (28,9% против 24,1%,  $P=0,03$ )
  - снижает частоту потерь беременностей до 12 недель (22,9% против 33,5%,  $P=0,02$ )
- по сравнению со стандартной системой культивирования.

## Определения

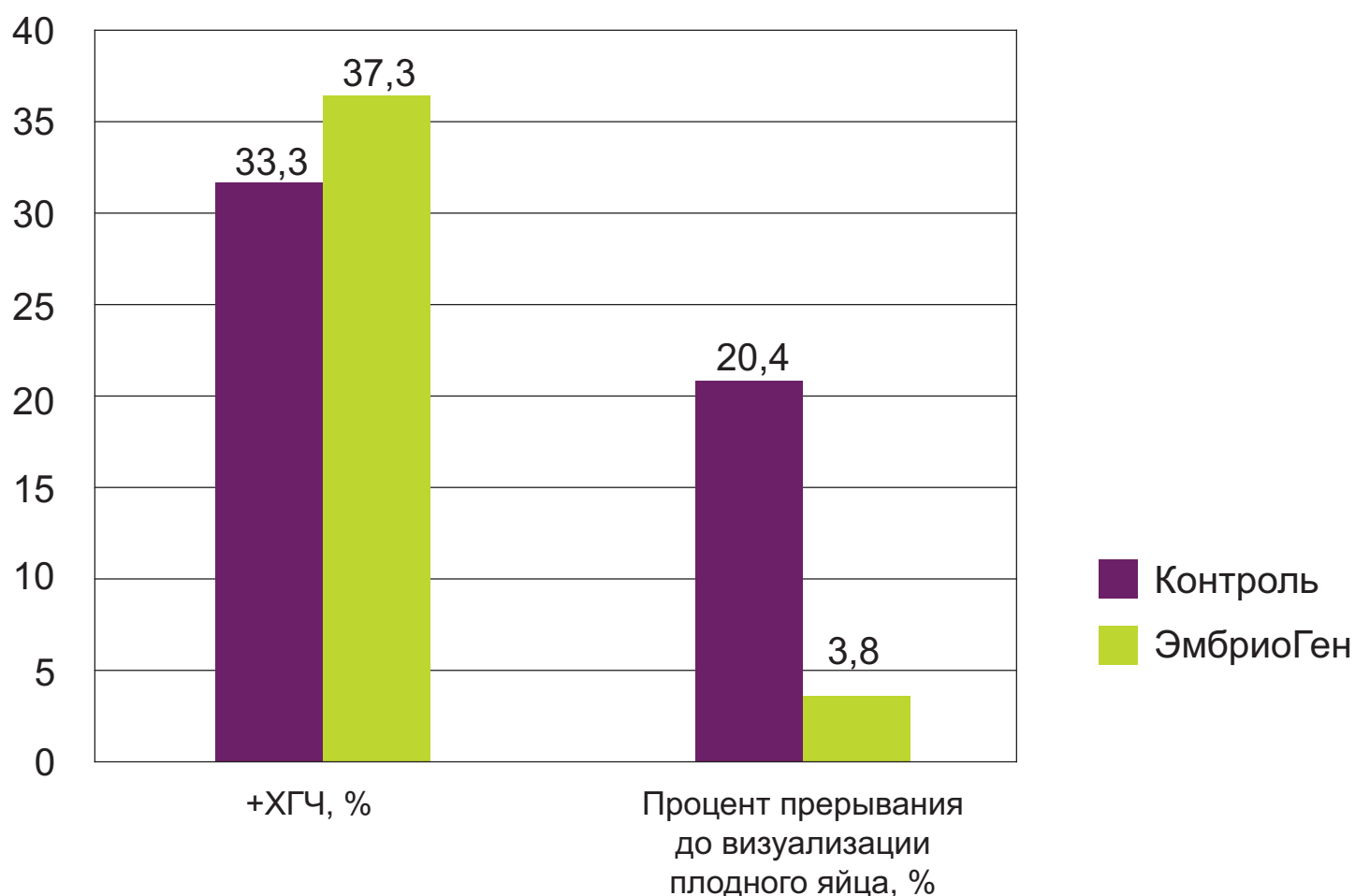
**Частота имплантации** | отношение количества жизнеспособных плодов (определяется по наличию сердцебиения) к количеству перенесённых эмбрионов.

**Частота прогрессирующих клинических беременностей** | отношение количества женщин с хотя бы одним жизнеспособным плодом к количеству женщин, которым был выполнен перенос эмбрионов.

**Частота рождения детей** – доля циклов с переносом эмбриона, завершившихся рождением живого ребёнка/детей

# частоты клинической беременности<sup>1</sup>

прерыванием беременности в анамнезе



Частота ранних доклинических потерь беременности

При этом положительный эффект использования среды ЭмбриоГен оказался наиболее выраженным в подгруппе пациенток со спонтанным прерыванием беременности в анамнезе. В данной подгруппе (289 циклов с переносом эмбриона) было показано:

- увеличение частоты имплантации - на 44% (24,5% против 17%,  $P=0,001$ ),
  - увеличение частоты прогрессирующих клинических беременностей - на 40% (23,2% против 16,5%,  $P=0,003$ ),
  - увеличение частоты рождения детей - на 28% (26,9% против 23,1%,  $P=0,02$ )
- в группе GM-CSF по сравнению со стандартной системой культивирования.

Также в подгруппе пациенток со спонтанным прерыванием беременности в анамнезе при культивировании в среде ЭмбриоГен было отмечено снижение частоты ранних доклинических потерь беременности (отсутствие плодного яйца на УЗИ после положительного теста на ХГЧ): 3,8% против 20,4% ( $P=0,03$ ) по сравнению с контрольной группой.

<sup>1</sup> Ziebe, et al., A randomized clinical trial to evaluate the effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in embryo culture medium for in vitro fertilization. Fert. & Stert. 2013; Vol 99, Issue 6: 1600-1609.e2

Исследование показало, что положительный эффект применения среды ЭмбриоГен оказался наиболее выражен в подгруппе пациенток со спонтанными прерываниями беременностей в анамнезе<sup>1</sup>. Такой результат может быть объяснён, помимо качества самого эмбриона, участием GM-CSF в цитокиновой регуляции иммунологических процессов, сопровождающих имплантацию бластоцисты и развитие беременности.

Показано, что GM-CSF является одним из регуляторов взаимодействия между трофобластом, дендритными, эпителиальными клетками эндометрия и эндометриальными лейкоцитами, представленными uNK, макрофагами и Т-клетками<sup>2</sup>.

### GM-CSF и макрофаги эндометрия

Необходимым условием для наступления и нормального течения беременности является иммунная толерантность материнского организма по отношению к эмбриону, несущему, в том числе, отцовские антигены. Становление иммунной толерантности происходит благодаря презентации отцовских антигенов Т-клеткам дендритными клетками и макрофагами эндометрия<sup>3</sup>.

После попадания спермы в репродуктивный тракт эпителиальные клетки эндометрия начинают активно синтезировать некоторые цитокины, и, в первую очередь, GM-CSF. При участии GM-CSF происходит активация и созревание дендритных клеток и макрофагов эндометрия. Данные клетки, в свою очередь, осуществляют презентацию отцовских антигенов Т-клеткам эндометрия. Регуляторные Т-клетки запускают каскад процессов, ведущих к толерантности по отношению к отцовским антигенам<sup>4</sup>.

У мышей, нокаутных по гену GM-CSF, в эндометрии присутствует нормальное количество макрофагов и дендритных клеток. Однако попадание спермы в репродуктивный тракт не сопровождается их активацией. Вследствие нарушения данного механизма у таких мышей повышена частота неудач имплантации и спонтанных прерываний беременности. Таким образом, доказано участие GM-CSF в становлении иммунной толерантности материнского организма по отношению к эмбриону<sup>3</sup>.

### GM-CSF и uNK

Натуральные киллеры (uNK) - наиболее многочисленная популяция лейкоцитов эндометрия<sup>2</sup>. В отличие от NK-клеток периферической крови, uNK не экспрессируют классические маркеры NK клеток (CD3, CD4, CD8, CD57, CD16), но несут на своей поверхности маркеры CD38 и CD56. Эти клетки описывают как CD16<sup>dim</sup>, CD56<sup>bright</sup>, они практически не обладают цитотоксической активностью и способны к продукции большого количества цитокинов. Лишь небольшая часть uNK, характеризующаяся как CD16<sup>bright</sup>, CD56<sup>dim</sup>, сходна с NK клетками периферической крови по своему фенотипу и цитотоксической активности. У пациенток с привычным невынашиванием неясного генеза снижено количество CD16<sup>dim</sup>, CD56<sup>bright</sup> и повышено число цитотоксических CD16<sup>bright</sup>, CD56<sup>dim</sup>.

Количество uNK возрастает во второй половине лютеиновой фазы и при наступлении беременности. uNK контактируют с клетками вневорсинчатого трофобласта, осуществляющими инвазию в децидуальную оболочку и замещающими клетки эндотелия в спиральных артериях матки. Инвазия трофобласта и ремоделирование спиральных артерий являются необходимыми условиями для нормального развития плаценты и обеспечения полноценного кровоснабжения плода.



Последствиями нарушения данных процессов могут быть спонтанный аборт или преэклампсия. Показано, что преэклампсия, развивающаяся вследствие нарушения ремоделирования спиральных артерий, наблюдается при дефиците uNK или полиморфизме рецепторов uNK, распознающих антигены трофобласта.

При взаимодействии с клетками трофобласта uNK выделяют LIF, M-CSF, TGF $\beta$  и GM-CSF, а инвазия трофобласта и развитие плаценты происходят под контролем данных цитокинов<sup>5,6</sup>.

### GM-CSF и Т-клетки эндометрия

Показано, что цитокины, характерные для Th1 клеток – THF, IFN $\gamma$  и IL2 – вызывают гибель клеток трофобласта и прерывание беременности, а цитокины, выделяемые Th2 клетками (IL4, IL5, IL6, IL10, IL13, напротив, необходимы для нормального течения беременности. В упрощённом виде, смещение баланса цитокинов Th1  $\rightarrow$  Th2 может стать причиной спонтанного аборта<sup>7</sup>. Смещение баланса в пользу благоприятных для имплантации Th2 цитокинов происходит вследствие опосредованной GM-CSF активации взаимодействующих с Т-клетками uNK и дендритных клеток эндометрия<sup>8</sup>.

### Новые данные об эффективности среды ЭмбриоГен

Тот факт, что исследование было проведено на базе 13 клиник, продемонстрировал возможность эффективного применения среды ЭмбриоГен в различных лабораториях. После публикации данных исследования и получения сертификатов CE в 2011г. и FDA в 2012г., ЭмбриоГен стал доступен для врачей и пациентов клиник большинства стран мира. Интересные результаты основного исследования способствовали применению ЭмбриоГена для культивирования эмбрионов пациенток сложных групп (со спонтанным прерыванием беременности в анамнезе, повторными неудачными попытками ЭКО/ИКСИ и т.д. Результаты работы команд нескольких клиник, начавших работу с ЭмбриоГеном в 2011-2012гг., к настоящему моменту уже опубликованы<sup>9,10</sup>.

Ретроспективное исследование на группе из 350 пациенток с отягощённым анамнезом (спонтанное прерывание беременности или отсутствие имплантации), показало, что использование среды ЭмбриоГен позволяет достоверно снизить частоту спонтанного аборта первого триместра (13,8% против 44,4%,  $p < 0,05$ , УЗИ на 12 неделе) и увеличить вероятность рождения детей (19,5% против 9,5%,  $p < 0,05$ ) по сравнению со стандартно применяемой схемой культивирования ISM1+BlastAssist<sup>9</sup>. Проспективное рандомизированное исследование продемонстрировало возможность эффективного применения среды ЭмбриоГен у пациенток, имеющих две и более неудачные попытки ЭКО/ИКСИ в анамнезе<sup>10</sup>.

<sup>1</sup> Ziebe, et al., A randomized clinical trial to evaluate the effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in embryo culture medium for in vitro fertilization. *Fert. & Stert.* 2013; Vol 99, Issue 6: 1600-1609.e2

<sup>2</sup> Laird et al., Cytokine expression in the endometrium of women with implantation failure and recurrent miscarriage. *Reprod BioMed Online*, 2006;13(1):13-23

<sup>3</sup> Moldenhauer et al., GM-CSF regulates uterine macrophage and dendritic cell maturation and antigen presentation. *J Reprod Immunol*, 2010; 86(1): 31-32

<sup>4</sup> Robertson et al., Activating T regulatory cells for tolerance in early pregnancy — the contribution of seminal fluid. *J of Reprod Immunol*, 2009; 83 (1–2); 109-116

<sup>5</sup> Quenby, Farquharson. Uterine natural killer cells, implantation failure and recurrent miscarriage. *Reprod BioMed Online*, 2006; 13(1): 24-28

<sup>6</sup> Dosiou, Giudice. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. *Endocr Rev.* 2005 Feb;26(1):44-62.

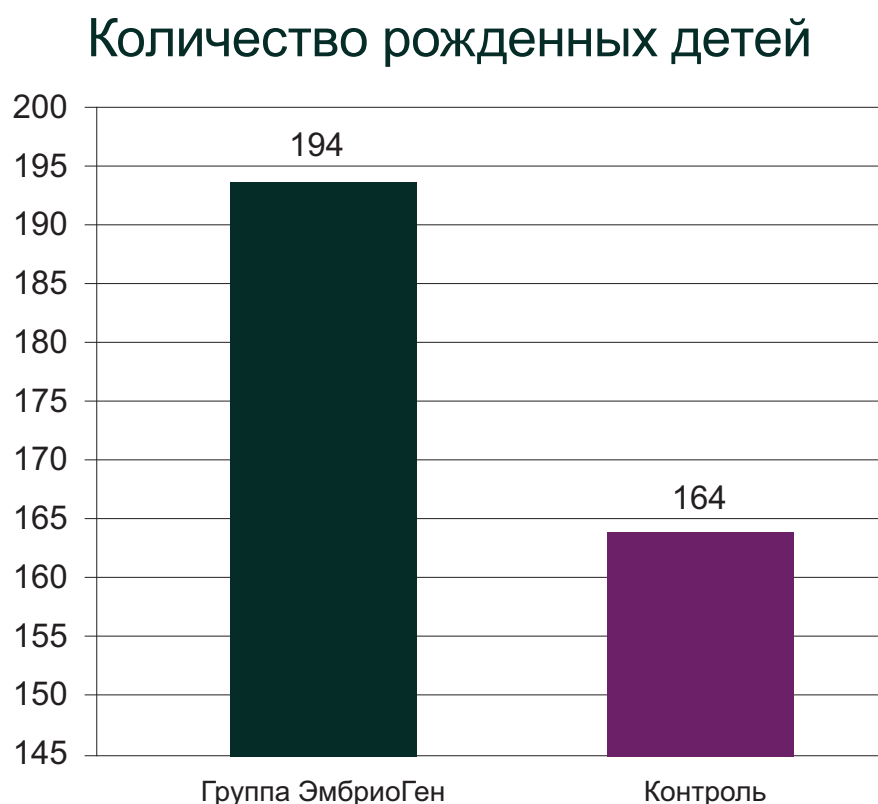
<sup>7</sup> Makhseed. Th1 and Th2 cytokine profiles in recurrent aborters with successful pregnancy and with subsequent abortions. *Hum Reprod*, 2001,16(10):2219-26

<sup>8</sup> Lim et al. The role of T-helper cytokines in human reproduction. *Fert Stert*, 2000;73(1):136-42.

<sup>9</sup> Renzini et al., Clinical efficiency and perinatal outcome of ART cycles following embryo culture in the presence of GM-CSF in patients with miscarriage or early pregnancy loss history. *Hum Reprod* 2013;28(1):i142

<sup>10</sup> Sfountouris et al., Effect of GM-CSF on pregnancy rates in patients with multiple unsuccessful IVF attempts. *Hum Reprod* 2013;28(1):i62

# Безопасность применения ЭмбриоГен



Безопасность добавления GM-CSF в среды для культивирования *in vitro* подтверждена многочисленными исследованиями на эмбрионах млекопитающих<sup>1</sup>, результатами доклинических испытаний<sup>2</sup> и данными о здоровье детей, рождённых в ходе основного проспективного многоцентрового рандомизированного двойного слепого исследования<sup>3</sup>.

Согласно данным доклинических испытаний с использованием методов цитогенетического анализа, GM-CSF не оказывает негативного влияния на развитие эмбрионов человека<sup>2</sup>. В ходе проведения основного исследования родилось 358 детей, из них 194 | благодаря среде ЭмбриоГен. Последний ребёнок в рамках исследования был рождён в марте 2011 года. Было показано отсутствие достоверных различий в весе новорожденных, частоте врождённых пороков развития и сроке родоразрешения между опытной и контрольной группами. В обеих группах значения данных показателей были предсказуемы и соответствовали популяционным<sup>3</sup>.

Среда ЭмбриоГен имеет следующие регистрационные документы и сертификаты:

- Сертификат соответствия № РОСС DK.ИМ28.Н01232;
- Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2011/10904 от 31 октября 2011 г.
- CE (CE 0543)
- одобрен FDA
- лицензирован Canada Medical Device

<sup>1</sup> Robertson, GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy. Cytokine & Growth Factor Rev 2007;18:287-298

<sup>2</sup> Agerholm et al. Culture of human oocytes with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor has no effect on embryonic chromosomal constitution. Reprod Biomed Online 2010;20:477-84.

<sup>3</sup> Ziebe et al., A randomized clinical trial to evaluate the effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in embryo culture medium for in vitro fertilization. Fert. & Stert. 2013; Vol 99, Issue 6: 1600-1609.e2

# Кому показано использование среды ЭмбриоГен?

ЭмбриоГен может быть эффективно использован для культивирования эмбрионов во всех циклах ЭКО/ИКСИ. Однако, согласно результатам исследования, эффект применения GM-CSF наиболее выражен в группе пациенток с возможным нарушением цитокинового взаимодействия эмбриона и эндометрия<sup>3</sup>.

## Показания к применению среды ЭмбриоГен:

- Повторные неудачи имплантации (перенос эмбрионов хорошего качества, не приведший к наступлению беременности)
- Неоднократный преглинический спонтанный аборт (биохимическая беременность)
- Неоднократный спонтанный аборт
- Идиопатическое бесплодие



Единая среда для проведения оплодотворения, культивирования и переноса эмбриона

Перенос в полость матки осуществляется на третий день культивирования

Флакон 3мл для работы с гаметам и эмбрионами одной пациентки

Разработана на базе модифицированной среды ЭмбриоАссист с добавлением 2нг/мл рекомбинантного GM-CSF

ООО «ОРИДЖИО» является эксклюзивным дистрибьютором культуральных сред MediCult, SAGE, микроинструментов Humagen, продукции MidAtlantic, а также настольного инкубатора Planer (GDBT37-01-ORIGIO) и лабораторного оборудования ScanLaf на территории России. Компания проводит консультационную поддержку эмбриологов, участвует в организации образовательных курсов и семинаров в России и зарубежом, обеспечивает комплексное оснащение лабораторий ЭКО и поддержку научных исследований.



a CooperSurgical Company

origio

196158 Санкт-Петербург, Пулковское шоссе д.40/4 лит. А. БЦ "Технополис"  
Тел. +7 (812) 318-02-90 [info-ru@origio.com](mailto:info-ru@origio.com) [www.origio.ru](http://www.origio.ru)