

ЭмбриоГен

Первая культуральная среда, содержащая фактор роста

естественное
развитие эмбриона



успешная
имплантация

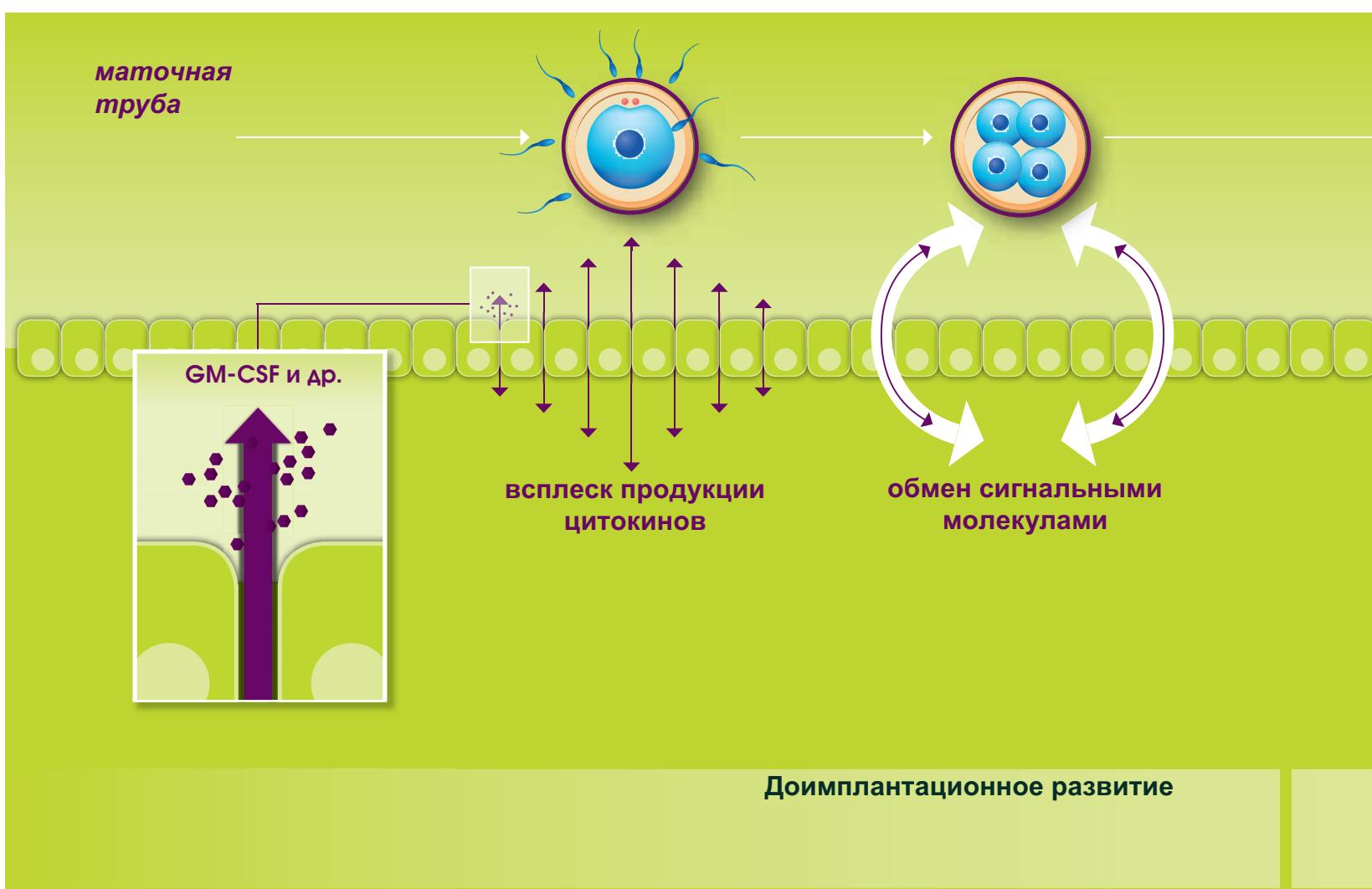


origio
for life

Цитокины, факторы

При естественном зачатии от момента оплодотворения до имплантации эмбрион развивается в среде, богатой цитокинами и факторами роста¹. Данные вещества - сигнальные молекулы, регулирующие пролиферацию, дифференцировку и метаболизм клеток¹ синтезируются клетками тканей женской репродуктивной системы и самим развивающимся эмбрионом². Пролиферация и дифференцировка эмбриональных клеток, взаимодействие бластоциты 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 цитокинов³.

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.



¹ Lédee et al., Cytokines in follicular fluids, implantation and miscarriage. J Reprod Immunol, 2011;90:133-134.

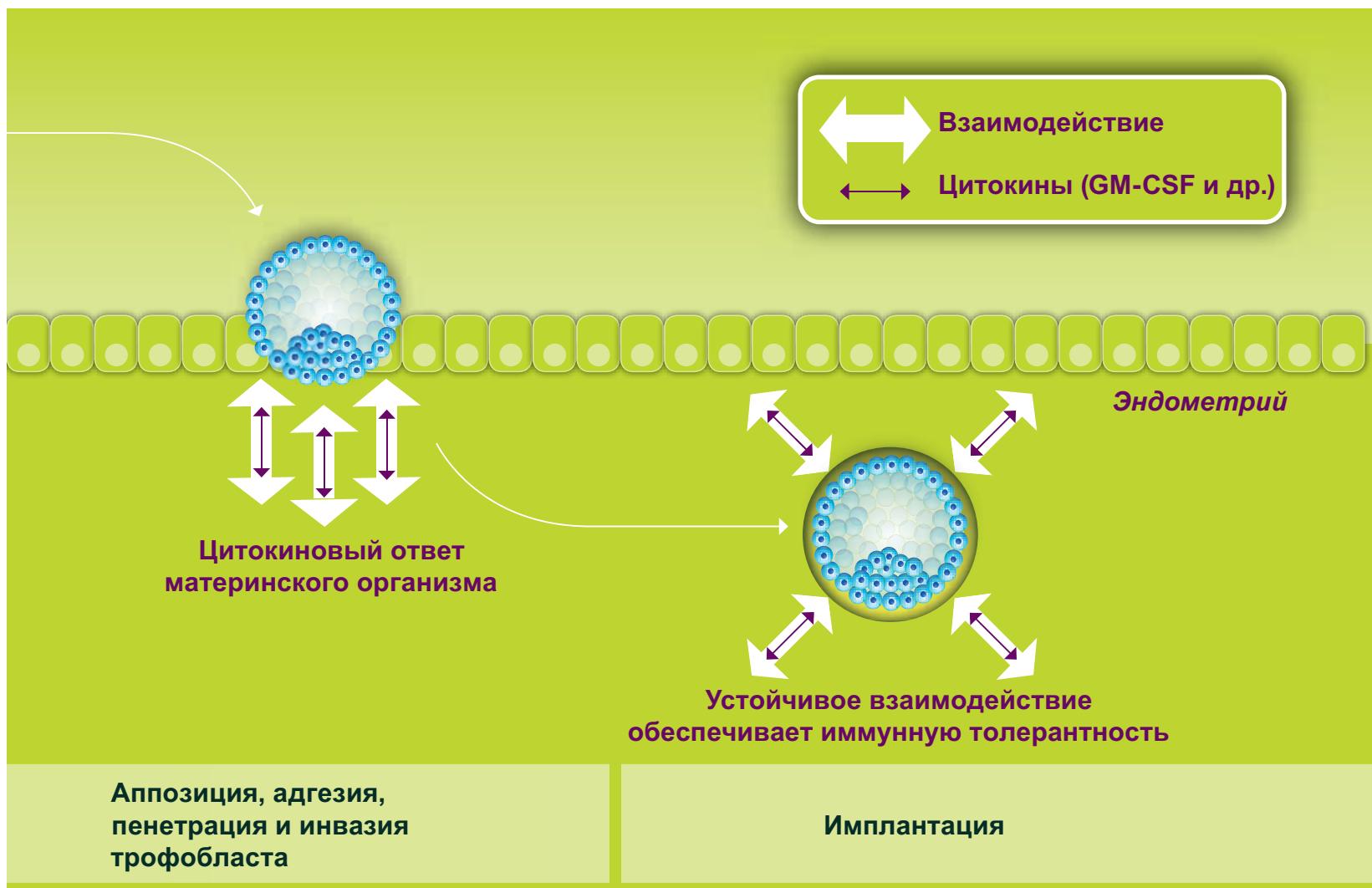
² Segerer et al., Upregulation of chemokine and cytokine production during pregnancy, Gynecol. Obstet. Invest, 2009; 67:145-150

³ 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 беременность

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 функции⁴. Reцепторы к GM-CSF обнаруживаются на мембране эмбриональных клеток уже на стадии двух бластомеров⁵.

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 ооцита⁶. 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 имплантации⁷.



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

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

⁶ Lédee 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

⁷ 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 эндометрия¹. Исследования, проведённые на мышах, нокаутных по гену GM-CSF, продемонстрировали значительное снижение показателей fertильности у таких животных. Мутация по гену GM-CSF вызывает нарушение формирование 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-CSF².

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 генов³.

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 эмбрион⁴.

Положительное влияние присутствия GM-CSF в культуральной среде на развитие и имплантацию эмбриона было подтверждено экспериментами на эмбрионах коров, свиней и овец¹. Результаты исследований на эмбрионах млекопитающих, а также положительный опыт доклинических испытаний⁵ способствовали созданию среды ЭмбриоГен. Эта среда содержит 2нг/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 исследованием⁶.

¹ 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.

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

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

⁴ Sjöblom 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.

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

⁶ 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



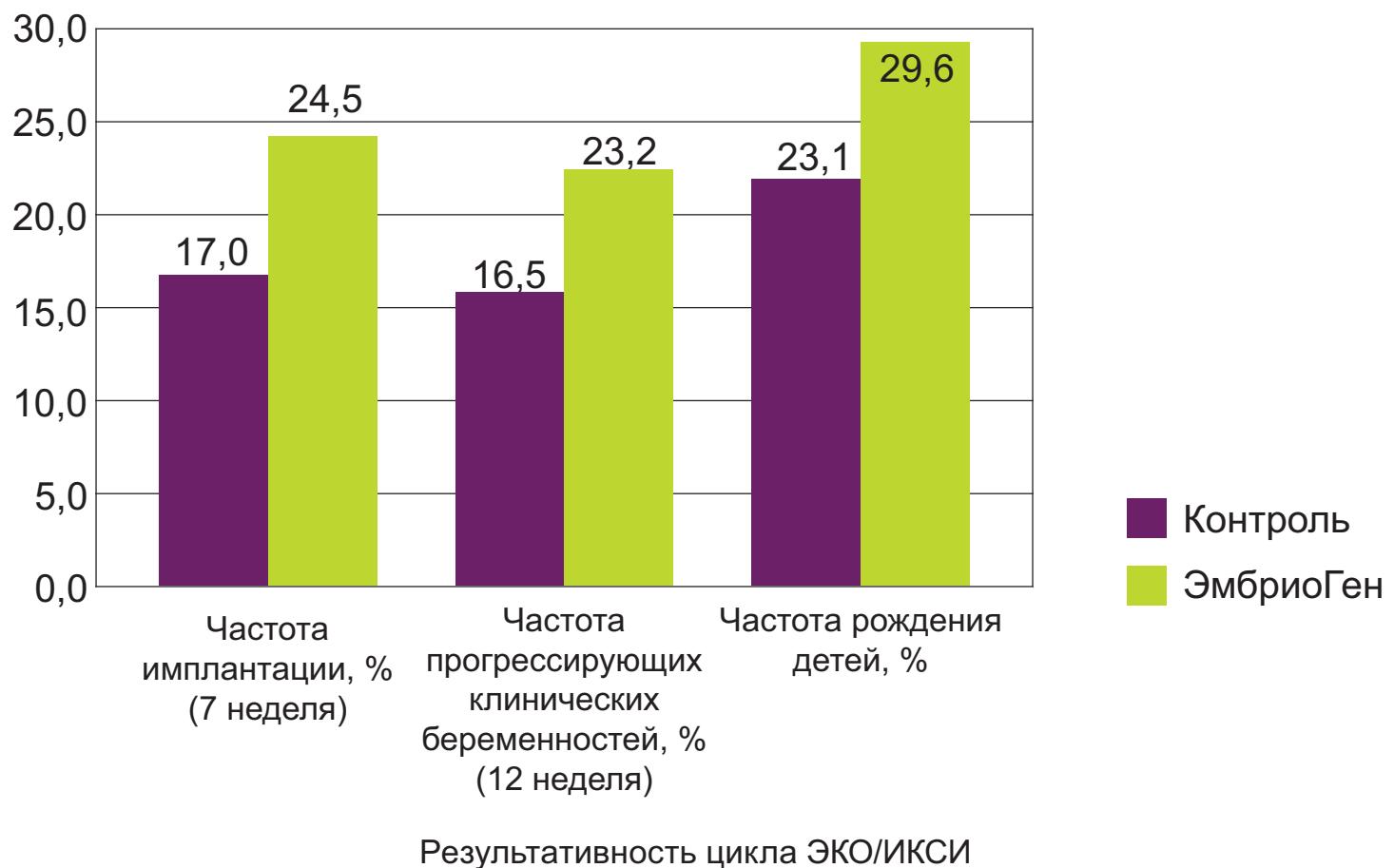
**Эффективность подтверждена самым масштабным
исследованием культуральных сред в истории ВРТ⁶**

- 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



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

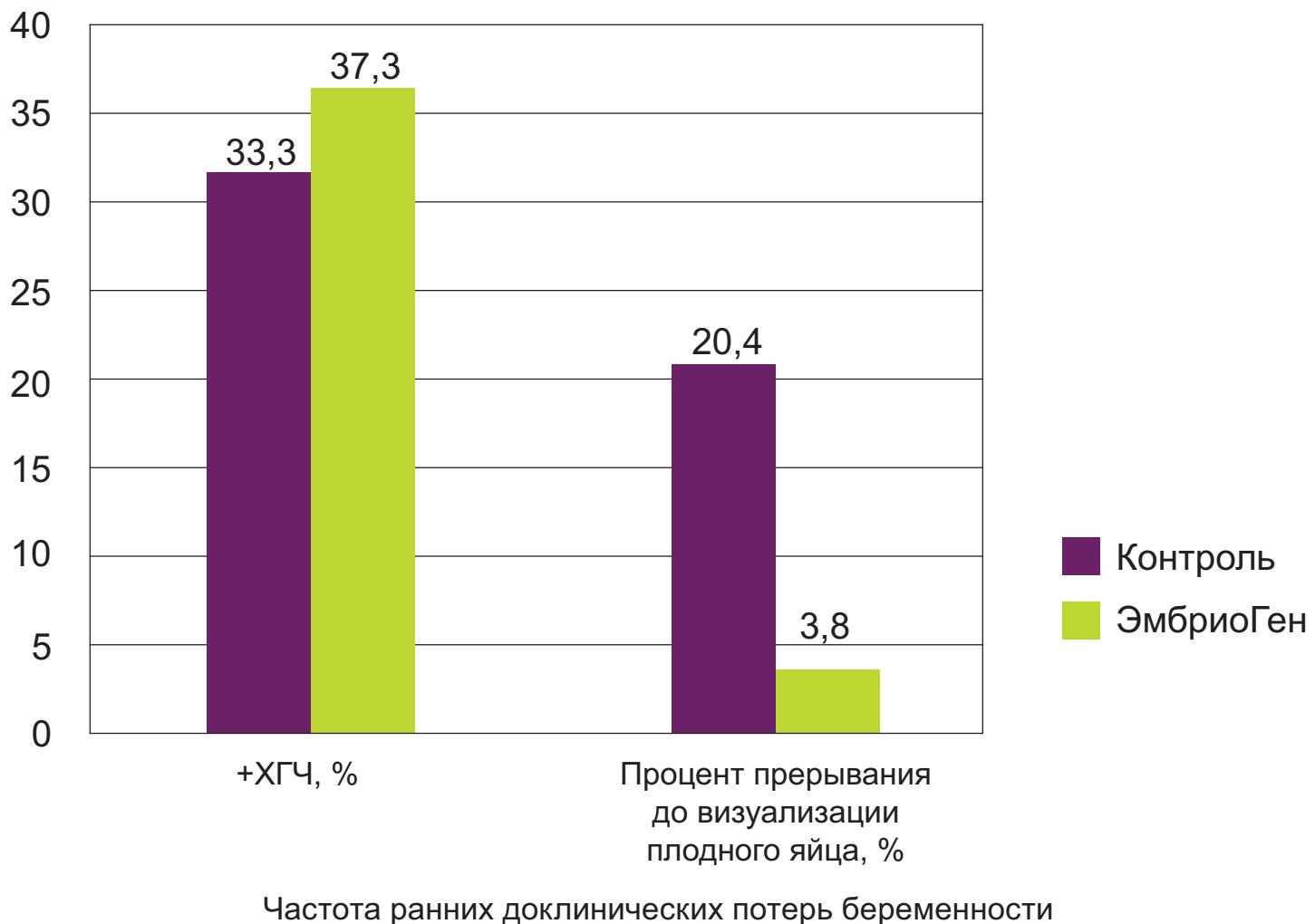
Частота имплантации | отношение количества жизнеспособных плодов (определяется по наличию сердцебиения) к количеству перенесённых эмбрионов.

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 беременности¹

прерыванием беременности в анамнезе



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.

¹ 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 анамнезе¹. 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-клетками².

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 эндометрия³.

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 антигенам⁴.

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 эмбриону³.

GM-CSF и uNK

Натуральные киллеры (uNK) - наиболее многочисленная популяция лейкоцитов эндометрия². 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 описываются как CD16^{dim}, CD56^{bright}, они практически не обладают цитотоксической активностью и способны к продукции большого количества цитокинов. Лишь небольшая часть uNK, характеризуемая как CD16^{bright}, CD56^{dim}, сходна с NK клетками периферической крови по своему фенотипу и цитотоксической активности. У пациенток с привычным невынашиванием неясного генеза снижено количество CD16^{dim}, CD56^{bright} и повышенное число цитотоксических CD16^{bright}, CD56^{dim}.

Количество uNK возрастает во второй половине лuteиновой 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 пре-эклампсия. 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 β и GM-CSF, а инвазия трофобласта и развитие плаценты происходят под контролем данных цитокинов^{5,6}.

GM-CSF и Т-клетки эндометрия

Показано, что цитокины, характерные для Th1 клеток – THF, IFN γ 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 → Th2 может стать причиной спонтанного аборта⁷. Смещение баланса в пользу благоприятных для имплантации Th2 цитокинов происходит вследствие опосредованной GM-CSF активации взаимодействующих с Т-клетками uNK и дендритных клеток эндометрия⁸.

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^{9,10}.

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+BlastAssist⁹. Проспективное рандомизированное исследование продемонстрировало возможность эффективного применения среды ЭмбриоГен у пациенток, имеющих две и более неудачные попытки ЭКО/ИКСИ в анамнезе¹⁰.

¹ 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

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

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

⁴ 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

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

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

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

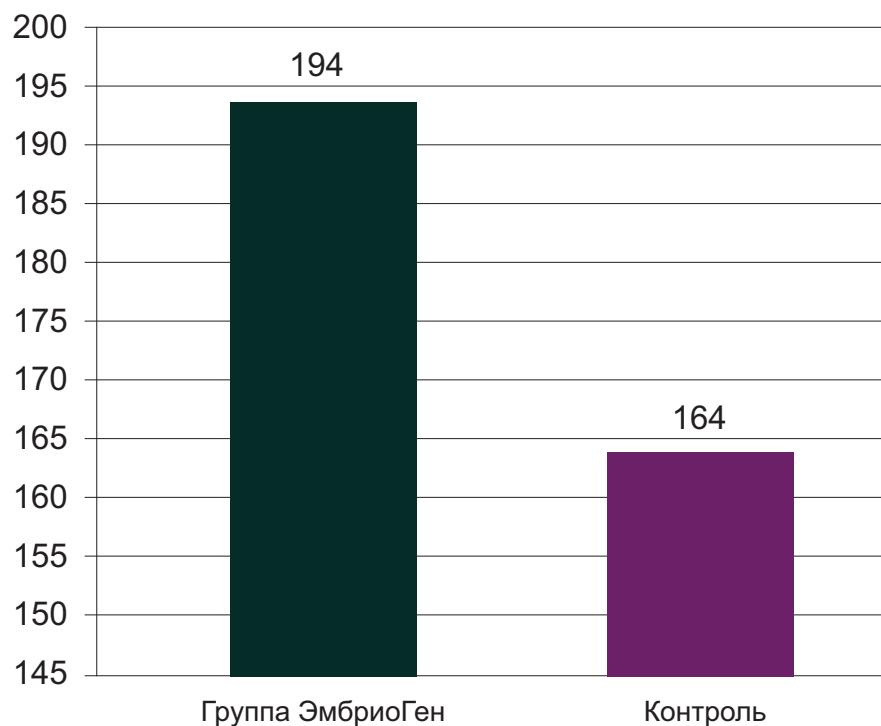
⁸ Lim et al.. The role of T-helper cytokines in human reproduction. Fert Stert, 2000;73(1):136-42.

⁹ 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

¹⁰ Sfontouris 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

Количество рожденных детей



Безопасность добавления GM-CSF в среды для культивирования *in vitro* подтверждена многочисленными исследованиями на эмбрионах млекопитающих¹, результатами до-клинических испытаний² и данными о здоровье детей, рожденных в ходе основного проспективного многоцентрового рандомизированного двойного слепого исследования³.

Согласно данным доклинических испытаний с использованием методов цитогенетического анализа, GM-CSF не оказывает негативного влияния на развитие эмбрионов человека². 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 предсказуемые и соответствовали популяционным³.

Среда ЭмбриоГен имеет следующие регистрационные документы и сертификаты:

- Сертификат соответствия № РОСС DK.ИМ28.H01232;
- Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2011/10904 от 31 октября 2011 г.
- CE (CE 0543)
- одобрен FDA
- лицензирован Canada Medical Device

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

² 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.

³ 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 эндометрия³.

Показания к применению среды ЭмбриоГен:

- **Повторные неудачи имплантации (перенос эмбрионов хорошего качества, не приведший к наступлению беременности)**
- **Неоднократный преклинический 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 гаметами и эмбрионами одной пациентки

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

ООО «ОРИДЖИО» является эксклюзивным дистрибутором 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.



origio

a CooperSurgical Company

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