

КОНДИЦИОНИРОВАННЫЕ ЭМБРИОНАМИ СРЕДЫ ВОЗДЕЙСТВУЮТ НА МИГРАЦИЮ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК *IN-VITRO*

© 2025 г. Е. В. Тыщук*, М. С. Зементова, Е. М. Комарова, Е. А. Лесик, К. В. Обьедкова, О. Н. Беспалова, С. А. Сельков, Д. И. Соколов

Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

**e-mail: lisatyshchuk@yandex.ru*

Поступила в редакцию 09.10.2024 г.

После доработки 23.12.2024 г.

Принята к публикации 09.01.2025 г.

В настоящее время основным способом отбора наилучших эмбрионов для переноса в рамках вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) является морфологическая оценка. Для стандартизации процесса отбора с целью увеличения эффективности переноса необходима разработка других объективных и неинвазивных методов. Одним из методов может служить оценка содержания растворимых факторов в образцах сред, полученных при инкубации эмбрионов. Целью исследования явилось определение цитокинов IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IP-10, G-CSF и GM-CSF в кондиционированных эмбрионами средах, а также оценка влияния этих сред на функциональную активность эндотелиальных клеток. Мы не обнаружили стабильного содержания перечисленных цитокинов в кондиционированных эмбрионами средах после 2 суток инкубации. Тем не менее среды, полученные от эмбрионов качества А и АВ, состоящих из 3 или 4 клеток, оказывали эффект на миграцию эндотелиальных клеток. В дальнейшем необходимо определить природу активных молекул, присутствующих в составе кондиционированных эмбрионами сред, которые могут служить потенциальными маркерами для выбора лучших эмбрионов.

Ключевые слова: качество эмбрионов, эмбриональные супернатанты, цитокины эмбрионов

DOI: 10.31857/S0044452925010017, **EDN:** CGZABK

ВВЕДЕНИЕ

Бесплодие — заболевание, с которым сталкивается от 12.6% до 17.5% пар по всему миру [1]. В связи с этим область вспомогательных репродуктивных технологий активно развивается. Эффективность искусственного оплодотворения по разным оценкам составляет 35–40% [2, 3]. Выделяют множество причин неудач процедуры. Одной из них является качество эмбрионов, в связи с чем важнейшей задачей является их быстрая и неинвазивная оценка с целью выявления наилучших эмбрионов для переноса. Основным методом оценки качества эмбрионов на данный момент является морфологическая оценка, которая включает в себя описание количества клеток и их состояния. Поскольку такая оценка является субъективной и ее сложно стандартизировать, существуют и другие методы оценки эмбрионов: измерение потребления кислорода [4], анализ генетических параметров [5], а также автоматизация наблюдения и отбора эмбрионов [6]. Тем не менее описанных методов недостаточно для улучшения критериев выбора эмбриона, в свя-

зи с чем необходима разработка и внедрение других неинвазивных способов их оценки. Одним из перспективных способов является омиксный подход, который заключается в оценке содержания метаболитов, способных служить маркерами успешной имплантации [7]. При этом интерес вызывают цитокины — группа белков, секретируемая всеми клетками организма, в том числе клетками blastocysts. Посредством цитокинов клетки регулируют функции как самих себя, так и клеток окружения, при этом достаточно пикомолярных концентраций. С 1990-х годов проводятся исследования по оценке содержания цитокинов в жидкостях, полученных после культивирования эмбрионов [8–10]. Среди анализов IL-1, IL-6, TGF- β , TNF и рецепторы к TNF, CSF1, поскольку предполагается, что они играют наиболее важную роль в процессе имплантации. В ряде исследований авторы отмечают корреляцию между содержанием цитокина в среде и качеством эмбриона [11] либо успешностью имплантации [12], однако необходимы исследования на большем количестве пациентов для того, чтобы

выявить закономерности и сделать соответствующие выводы.

Говоря о роли растворимых молекул в зоне плацентации, можно выделить несколько процессов, которые они регулируют. Во-первых, они участвуют в создании условий для повышения рецептивности эндометрия. Показано, что на рецептивность эндометрия влияют белки PP14 [13], MUC-1 и GdA [14], IFN λ [15], GM-CSF [16], TNF α [17]. Во-вторых, цитокины регулируют децидуализацию. В этом процессе участвуют NK-клетки матки (uNK), привлечение которых к зоне децидуализации происходит путем выделения хемокинов клетками окружения, в том числе CXCL12 клетками трофобласта [18]. Тем не менее повышенное количество uNK-клеток в зоне децидуализации становится причиной избыточного невынашивания [19], что говорит о необходимости поддержания оптимального содержания растворимых факторов. В-третьих, в области имплантации присутствуют материнские иммунные клетки, регуляция активности которых необходима для успешной плацентации. Для тонкой регуляции активности, а также поддержания популяций Т-хелперов и регуляторных Т- и NK-клеток необходимы цитокины и хемокины, например IFN- γ , IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-17, IL-22, IL-27, CXCL10, CXCL11 и другие [20, 21]

Ключевой процесс, определяющий успешность имплантации, — ангиогенез, формирование новых сосудов, необходимых для снабжения эмбриона питательными веществами [22]. В ходе ангиогенеза эндотелиальные клетки активируются в ответ на стимулирующий сигнал, после чего происходит дестабилизация сосуда и перестройка его стенки. После этого эндотелиальные клетки пролиферируют и мигрируют, образуют контакты и капиллярные трубки. Процесс завершается установлением новых базальных мембран и матрикса. В ходе имплантации и ремоделирования спиральных артерий матки в стенки сосудов также проникают пролиферирующие клетки трофобласта. Все описанные стадии проходят под влиянием цитокинов, выделяемых как самим эмбрионом, так и клетками в составе сосудов, а также микроокружением [23–25].

Таким образом, в ходе имплантации происходит множество процессов, регуляция которых осуществляется за счет выделения клетками цитокинов. Эмбрион также синтезирует цитокины, влияя на рецептивность эндометрия и активность клеток окружения, например uNK-клеток. Учитывая это, необходимо рассматривать спектр цитокинов, выделяемых эмбрионами, как возможный маркер неинвазивной оценки их качества. Несмотря на то что исследования в этой области ведутся с 90-х годов, разные группы исследователей сообщают о противоречащих результатах. Это связано с различиями в способах культивирования эмбрионов, способах

анализа и чувствительностью методов. Таким образом, целью настоящего исследования явилась оценка содержания цитокинов в кондиционированных эмбрионами средах (КЭС), а также влияния этих сред на функциональное состояние эндотелиальных клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии

В работе использовали эндотелиальные клетки линии EA.hy926 (ATCC, США). Клетки культивировали во флаконах для адгезионных культур в соответствии с рекомендациями производителя. При культивировании использовали культуральную среду следующего состава: среда DMEM/F12 (Биолот, Россия), 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (Биолот, Россия), 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Sigma-Aldrich Chem Co., США), 8 ммоль/л L-глутамин (Sigma-Aldrich Chem Co., США) и 1% НАТ (Sigma-Aldrich Chem Co., США). Для дезинтеграции монослоя клеток использовали раствор версена (Биолот, Россия).

Эмбриональные супернатанты

В работе использовали КЭС, которые представляют собой отработанную культуральную среду G-TL для 1–5 дней культивирования (Vitrolife, Швеция), полученную от дробящихся эмбрионов (44 \pm 1 час культивирования). КЭС замораживали и хранили при -80 °С. В дальнейшем анализировали содержание цитокинов в КЭС, а также влияние КЭС на способность эндотелиальных клеток к пролиферации и миграции. Оценка качества и стадии развития эмбрионов *in vitro* производилась ежедневно. Анализ качества эмбрионов на 2 и 3-е сутки эмбрионального развития осуществлялся по скорости дробления, степени цитоплазматической фрагментации, форме, симметричности и относительным размерам бластомеров (A. Van Steirghem et al., 1995). Качество эмбрионов на 4-е сутки культивирования, достигших стадии морулы, оценивали по степени компактизации бластомеров [26]. Оценка качества эмбрионов на 5–6-е сутки культивирования базировалась на анализе клеток трофэктодермы, внутренней клеточной массы и размера полости [27]. В результате в работу брали КЭС эмбрионов с качеством А, АВ, В и С.

Оценка эффекта, оказываемого средой для культивирования эмбрионов, на клетки эндотелия

В экспериментах по оценке пролиферации (оценивали в соответствии с п. 4 раздела “Материалы и методы”) и миграции (оценивали в соответствии

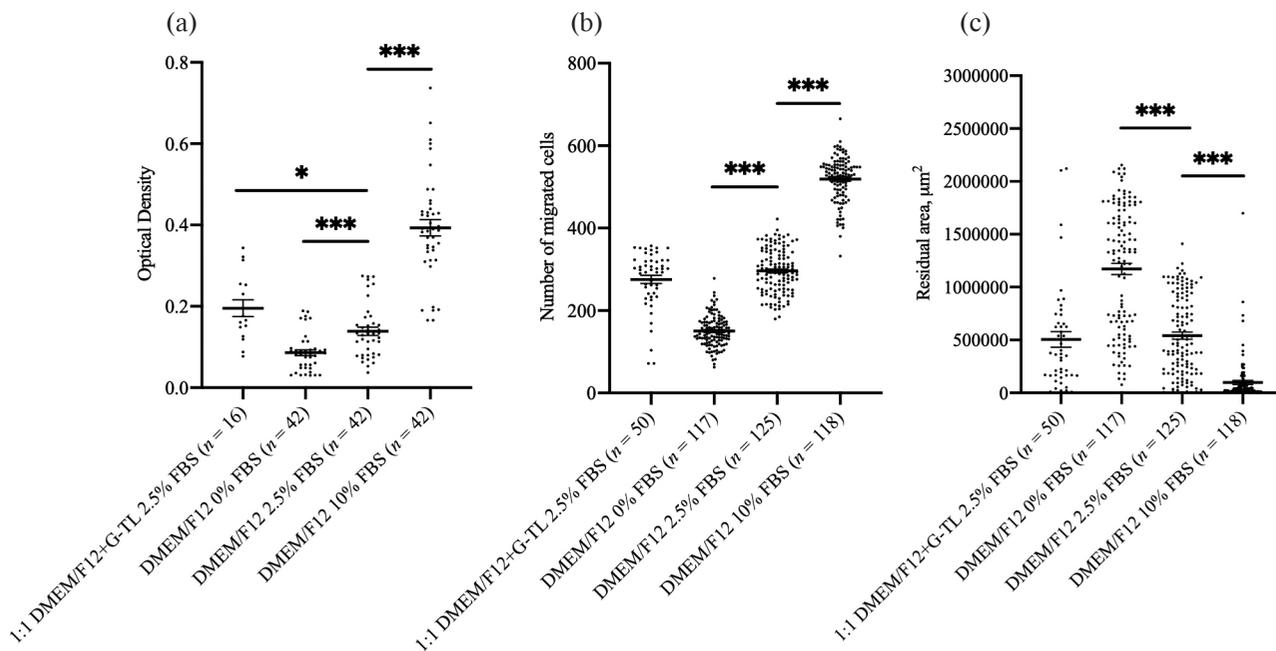


Рис. 1. Пролiferация клеток (а), количество мигрировавших клеток (б) и остаточная площадь десквамированного слоя клеток (с). 1:1 DMEM/F12 + G-TL 2.5% FBS — уровень миграции клеток в присутствии среды DMEM/F12 и среды G-TL с 2.5% ЭТС; DMEM/F12 0% FBS — уровень миграции в присутствии среды с 0% ЭТС; DMEM/F12 2.5% FBS — уровень миграции в присутствии среды с 2.5% ЭТС; DMEM/F12 10% FBS — уровень миграции в присутствии среды с 10% ЭТС. Достоверность различий: * — $p < 0.05$; *** — $p < 0.001$.

с п. 5 раздела “Материалы и методы”) использовали раствор, состоящий из равных частей КЭС и среды DMEM/F12 с 2.5% ЭТС. Такой раствор позволял восполнить среду для культивирования эндотелиальных клеток необходимыми веществами. Поскольку среда G-TL в составе КЭС содержит гиалуроновую кислоту, человеческий альбумин и другие вещества, способные повлиять на ответ эндотелиальных клеток, необходимо было сравнить способность клеток к пролиферации и миграции в среде G-TL и среде DMEM/F12 (рис. 1). Показатель пролиферации клеток в присутствии раствора, состоящего из среды DMEM/F12 и среды G-TL в равном соотношении с добавлением 2.5% ЭТС, был выше уровня пролиферации в присутствии среды DMEM/F12 и 2.5% ЭТС (рис. 1а). В связи с этим в экспериментах по оценке пролиферации и миграции в качестве контроля использовали значения, полученные при инкубации клеток в растворе, состоящем из среды DMEM/F12 и среды G-TL в соотношении 1:1 с добавлением 2.5% ЭТС.

Оценка пролиферативной активности эндотелиальных клеток

Клетки вносили в лунки 96-луночного плоскодонного планшета в концентрации 2.5×10^3 в 100 мкл полной культуральной среды. Спустя сутки среду удаляли и вносили 80 мкл раствора, состоящего из равных частей КЭС и культуральной сре-

ды DMEM/F12, содержащей 2.5 % ЭТС. В эксперименте исследовали КЭС от 41 эмбриона разного качества. В качестве контролей использовали среду DMEM/F12 с 0%, 2.5% и 10% ЭТС, а также раствор, состоящий из равных частей среды DMEM/F12 с 2.5% ЭТС и среды G-TL. По окончании срока инкубации клетки окрашивали 10 мин в 100 мкл 0.2% раствора кристаллического фиолетового (Sigma-Aldrich Chem Co., США), содержащего 5% метанола. После этого планшет шестикратно отмывали дистиллированной водой и высушивали. Краситель экстрагировали 50% раствором уксусной кислоты. Анализ изменения оптической плотности проводили на микропланшетном ридере (BioTec, США) при длине волны 540 нм (отсекающая 620 нм). Об изменении уровня пролиферации судили по изменению оптической плотности пробы и количеству клеток по сравнению с контролем.

Оценка миграционной активности эндотелиальных клеток

Клетки вносили в лунки 96-луночного плоскодонного планшета в концентрации 3.5×10^4 в 100 мкл полной культуральной среды на основе DMEM/F12. Спустя сутки нарушали монослой клеток, проводя вертикальную черту наконечником посередине каждой лунки, после чего планшет отмывали раствором Хенкса (Биолот, Россия). Ширину полученной линии фотографировали в трех положениях в

каждой лунке при помощи камеры AxioCamMR5. После этого клеткам заменяли раствор Хенкса на 70 мкл раствора, состоящего из равных частей КЭС и культуральной среды DMEM/F12, содержащей 2.5% ЭТС. В эксперименте исследовали КЭС от 41 эмбриона разного качества. Клетки культивировали в присутствии КЭС в течение 24 ч. В качестве контролей использовали среду с 0%, 2.5% и 10% ЭТС, а также раствор, состоящий из культуральной среды DMEM/F12 с 2.5% ЭТС и среды G-TL в соотношении 1:1. По окончании срока инкубации клетки окрашивали раствором кристаллического фиолетового, как описано ранее. Для учета полученных результатов каждую лунку снова фотографировали в трех полях зрения. Анализ полученных данных проводили с помощью разработанной ранее в Отделе иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта» компьютерной программы MarkMigration (Россия) [28]. Программа предназначена для автоматического анализа изображений клеточных структур, полученных в ходе анализа миграционной активности клеток. Для каждого из обрабатываемых изображений программа позволяет автоматически учитывать остаточную площадь линии разрушенного монослоя после миграции и определяет число клеток, расположенных внутри данной области. Детектирование клеток производится на основе фильтрации изображений по пороговому значению цвета клеточного ядра. Об изменении миграционной активности клеток судили по изменению количества мигрировавших клеток в опыте по отношению к контролю, а также по изменению площади линии после миграции клеток в лунке по сравнению с контролем.

*Анализ содержания цитокинов
в кондиционированных эмбрионами средах*

Содержание цитокинов в КЭС оценивали при помощи стандартных наборов для СВА-анализа (BD, США), (табл. 1) согласно рекомендациям

производителя при помощи проточного цитометра FACSCanto II (BD, США). В анализ были отобраны 53 КЭС от 4-клеточных эмбрионов качества А, АВ и В. В качестве контроля использовали среду G-TL. Выбор цитокинов, качества эмбрионов и срок культивирования был основан на данных литературы, в соответствии с которыми стадия 4-клеточного эмбриона является наиболее удачной с точки зрения обнаружения цитокинов и их роли в регуляции микроокружения [29–37].

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили в программе GraphPad Prism 8.0.1. с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни, а также применяли поправку Бонферрони. Каждое разведение кондиционированных эмбрионами сред было проанализировано в одном повторе в каждом эксперименте (пролиферация, миграция — $n = 41$, СВА-анализ цитокинов — $n = 53$). Каждая контрольная проба была проанализирована в шести повторах при анализе пролиферации и миграции и в двух повторах при СВА анализе.

РЕЗУЛЬТАТЫ

КЭС эмбрионов на стадии 4 клеток оказали большее влияние на пролиферацию клеток эндотелия, чем КЭС эмбрионов на стадии 2 клеток

При анализе пролиферации клеток сравнивали эффект, оказываемый КЭС эмбрионов разного качества (рис. 2а) и разной клеточности (рис. 2б). Кроме того, проанализировали различия между эффектом от КЭС эмбрионов одного качества, но разной клеточности (рис. 2б) или одной клеточности, но разного качества (рис. 2д). В результате было показано, что во всех случаях значения пролиферации не отличались от контрольного значения. Тем не менее пролиферация клеток в присутствии КЭС 4-клеточ-

Таблица 1. Цитокины, оцениваемые в кондиционированных эмбрионами средах

Цитокин	Роль цитокина при имплантации	Каталожный номер	Минимальная регистрируемая концентрация
IL-1 β	Стимулирует инвазию трофобласта [35]	561509	274–200.000 фг/мл
IL-4	Снижение воспаления [38]	561510	274–200.000 фг/мл
IL-5	Способствует децидуализации [39]	561511	274–200.000 фг/мл
IL-6	Стимулирует инвазию трофобласта [39]	561512	274–200.000 фг/мл
IL-8	Стимулирует инвазию трофобласта [39]	561513	274–200.000 фг/мл
IL-10	Снижение воспаления [38]	561514	274–200.000 фг/мл
IP-10	Хемоаттрактант бластоцисты [39, 40]	558280	10–2.500 пг/мл
G-CSF	Регулирует развитие трофобласта и инвазию [41]	558326	10–2.500 пг/мл
GM-CSF	Модулирует хатчинг [42]	558335	10–2.500 пг/мл

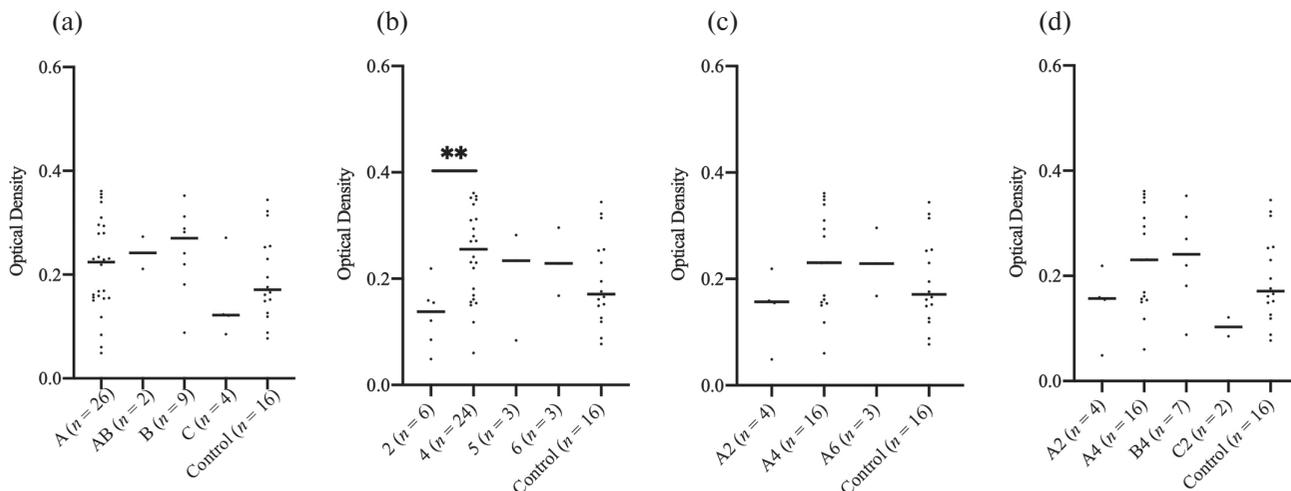


Рис. 2. Пролиферация клеток в присутствии КЭС. (а) — КЭС эмбрионов разного качества (А, АВ, В или С) и среды с 2.5% ЭТС; (б) — КЭС эмбрионов разной клеточности (2, 4, 5 или 6 бластомеров); (с) — КЭС эмбрионов разного качества и клеточности 2 или 4 бластомера; (д) — КЭС эмбрионов качества А разной клеточности (2, 4 или 6 бластомеров); Control — уровень пролиферации клеток в средах DMEM/F12 и G-TL в соотношении 1:1 и 2.5% ЭТС. Достоверность различий: ** — $p < 0.005$.

ных эмбрионов была выше пролиферации в присутствии КЭС 2-клеточных эмбрионов (рис. 2б).

Оценка миграционной активности эндотелиальных клеток

1. КЭС эмбрионов качества А и АВ стимулировали миграционную активность клеток

Миграционную активность оценивали путем подсчета клеток, мигрировавших в область десквамации и измерения остаточной площади этой области, не покрытой мигрировавшими клетками. В качестве контроля принимали значения, наблюдаемые при культивировании клеток в средах DMEM/F12 и G-TL в соотношении 1:1 и 2.5% ЭТС. Миграционная активность клеток была повышена в присутствии КЭС эмбрионов качества А и АВ, что выражалось в увеличении количества клеток в зоне миграции относительно контроля. КЭС эмбрионов качества В и С не влияли на миграцию клеток (рис. 3а). Количество мигрировавших клеток после инкубации с КЭС эмбрионов качества А было выше, чем в присутствии КЭС эмбрионов качества В. Кроме того, миграция клеток в присутствии КЭС эмбрионов качества АВ была выше, чем в присутствии КЭС эмбрионов качества А, В и С, что выражалось как в увеличении количества клеток в зоне миграции (в случае А, В и С), так и в уменьшении остаточной площади (в случае А и С) (рис. 3а).

2. КЭС эмбрионов на стадии 3 и 4 бластомеров усиливали миграционную активность клеток эндотелия. Эффект КЭС эмбрионов на стадии 3 и 8 клеток был выше эффекта КЭС 2-клеточных эмбрионов

Анализ миграции клеток в присутствии КЭС эмбрионов разной клеточности показал, что ми-

грация в присутствии КЭС эмбрионов на стадии 3 и 4 клеток была выше по сравнению с контролем, что выражалось в увеличении количества мигрировавших клеток. КЭС эмбрионов на стадии 2, 5, 6, 8 клеток не изменяли миграционную активность клеток эндотелия относительно контроля (рис. 3с). Количество мигрировавших клеток после инкубации с КЭС 3-клеточных эмбрионов было выше по сравнению с числом, наблюдаемым при инкубации с КЭС 2-клеточных эмбрионов. Остаточная площадь после инкубации с КЭС 8-клеточных эмбрионов была ниже по сравнению с площадью, наблюдаемой после инкубации с КЭС 2-клеточных эмбрионов (рис. 3с).

3. КЭС эмбрионов качества А на стадии 2, 3 и 4 бластомеров, а также качества С на стадии 4 бластомеров усиливали миграционную активность клеток эндотелия

Анализ миграционной активности эндотелиальных клеток в присутствии КЭС эмбрионов различной клеточности и качества показал, что КЭС эмбрионов качества В на стадии 4, 5 и 8 клеток не оказывали влияния на миграционную активность клеток эндотелия (рис. 2б). Инкубация клеток в присутствии КЭС 4-клеточных эмбрионов качества С приводила к увеличению количества мигрировавших клеток относительно контроля, а также относительно количества, наблюдаемого при инкубации с КЭС 2-клеточных эмбрионов того же качества. Кроме того, в присутствии КЭС 4-клеточных эмбрионов качества С наблюдалось снижение остаточной площади по сравнению с КЭС 2-клеточных эмбрионов того же качества и базовым уровнем (рис. 2б). КЭС эмбрионов качества А на стадии 2, 3 и 4, но не 5 и 6 бластомеров повышали миграцион-

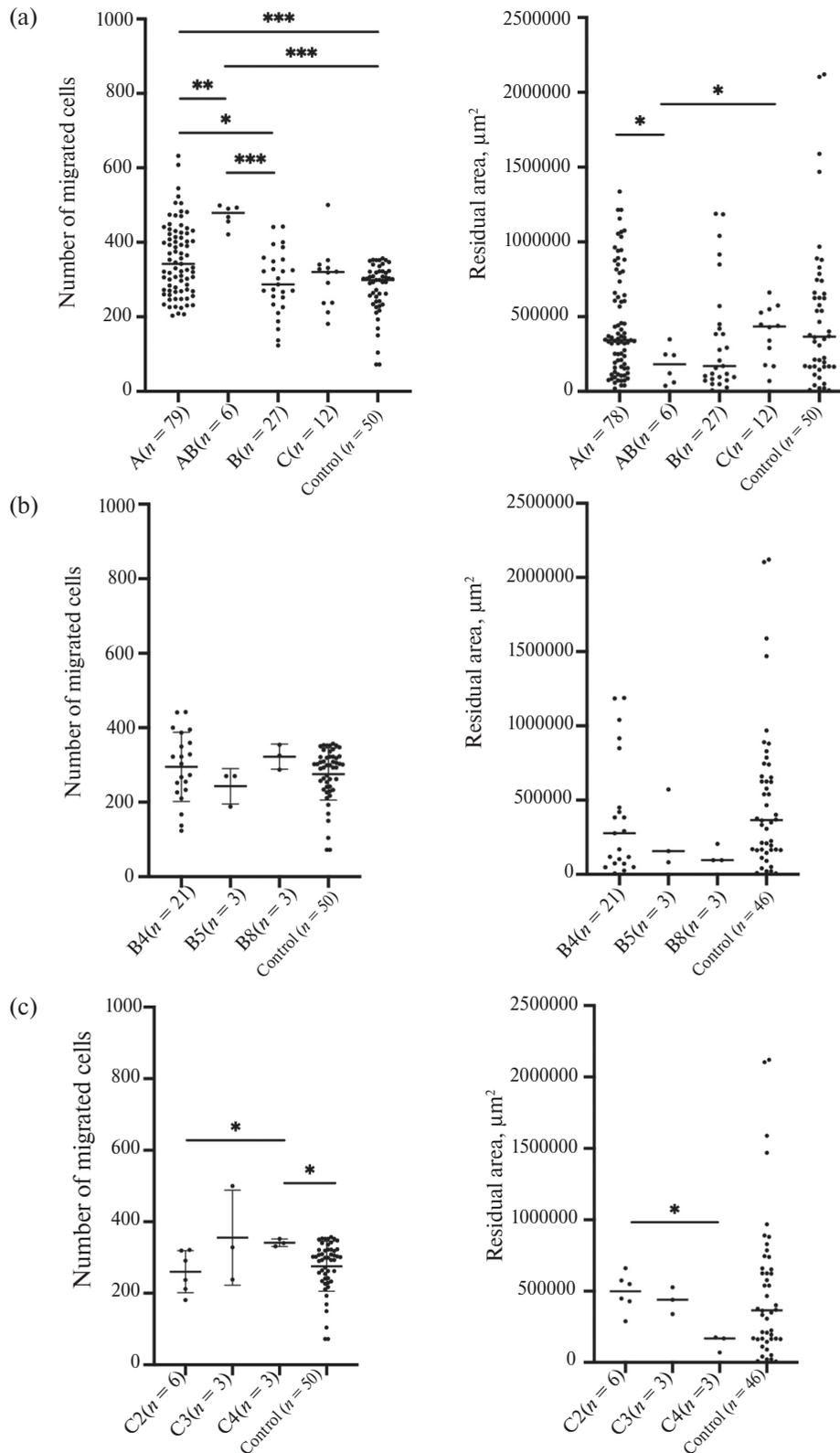


Рис. 3. Количество мигрировавших клеток и остаточная площадь десквамированного слоя клеток в присутствии КЭС. (a) — КЭС эмбрионов разного качества (А, АВ, В или С); (b) — КЭС эмбрионов качества В разной клеточности (4, 5 или 8 бластомеров); (c) — КЭС эмбрионов качества С разной клеточности (2, 3 или 4 бластомера); (d) — КЭС эмбрионов качества А разной клеточности (2, 3, 4, 5 или 6 бластомеров); (e) — КЭС эмбрионов разной клеточности (2, 3, 4, 5, 6 или 8 бластомеров); (f) — КЭС эмбрионов разного качества и клеточности. Control — уровень пролиферации клеток в средах DMEM/F12 и G-TL в соотношении 1:1 и 2.5% ЭТС. Достоверность различий: * — $p < 0.05$; ** — $p < 0.01$; *** — $p < 0.001$.

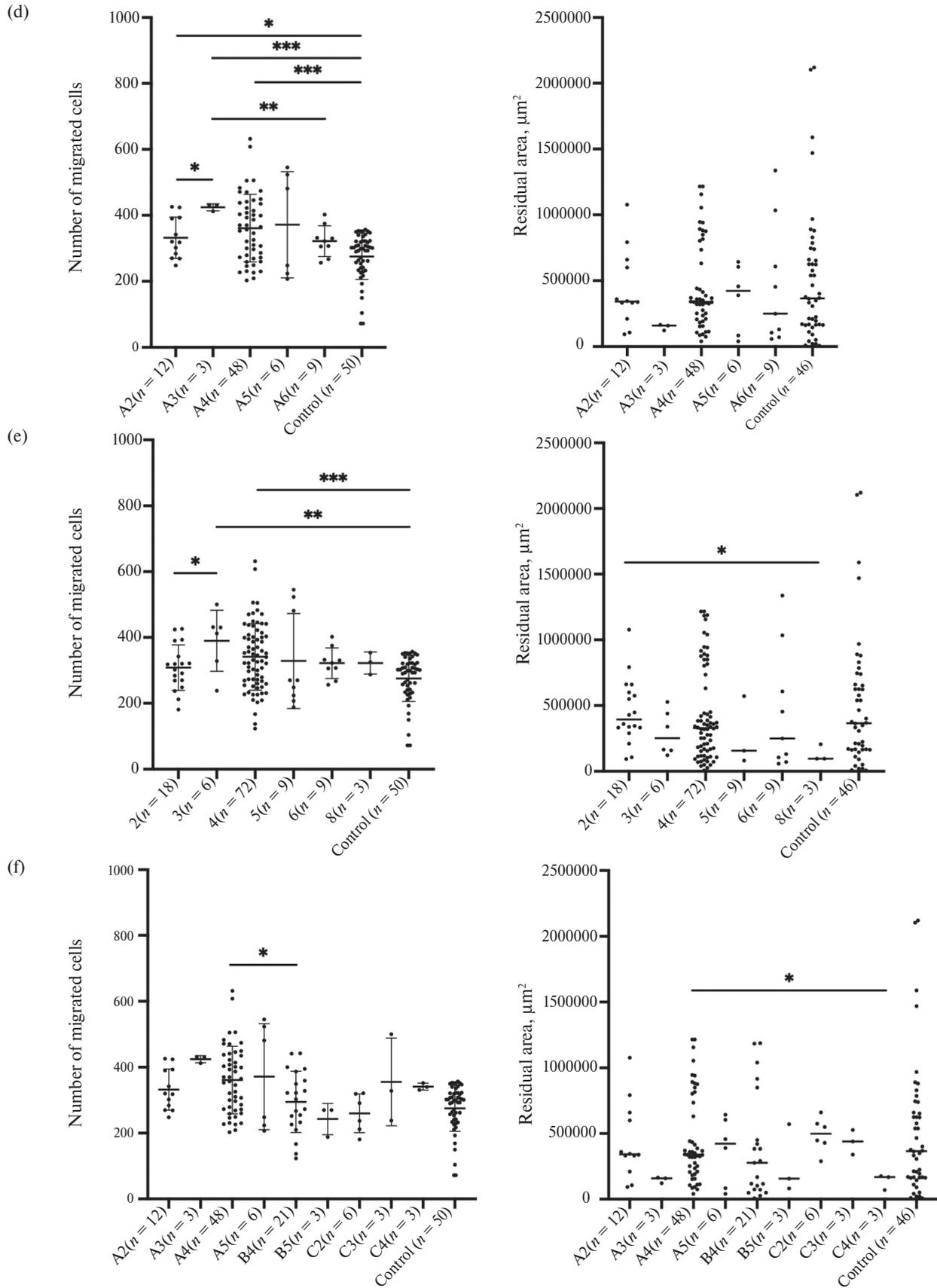


Рис. 3.

ную активность клеток эндотелия, что выражалось в увеличении количества клеток в зоне миграции относительно контроля (рис. 3с). Кроме того, количество мигрировавших клеток после инкубации с КЭС 3-клеточных эмбрионов качества А было выше, чем после инкубации с КЭС эмбрионов качества А на стадии 2 и 6 клеток (рис. 3с).

4. Среди 4-клеточных эмбрионов на миграционную активность клеток эндотелия наибольший эффект оказывали КЭС эмбрионов качества А и С

Сравнение эффекта КЭС эмбрионов одной клеточности, но разного качества показало, что в присутствии КЭС 4-клеточных эмбрионов качества А количество мигрировавших клеток было выше, чем в присутствии КЭС 4-клеточных эмбрионов качества В. Остаточная площадь после инкубации с КЭС 4-клеточных эмбрионов качества А была больше, чем площадь после инкубации с КЭС 4-клеточных эмбрионов качества С (рис. 3е).

Таким образом, наибольший эффект в отношении миграционной активности эндотелиальных клеток оказывали КЭС эмбрионов на стадии 4 клеток качества А, АВ и С.

Оценка содержания цитокинов

В ходе анализа было исследовано содержание 9 цитокинов (табл. 1) в 53 образцах КЭС. В качестве образцов выбрали КЭС 4-клеточных эмбрионов качества А и АВ, поскольку они оказали наибольшее влияние на пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, что связано с содержанием в них активных веществ. Кроме того, проанализировали КЭС 4-клеточных эмбрионов качества В. В результате анализа не удалось выявить стабильного со-

держания ни одного из выбранных цитокинов. Ни в одной пробе КЭС эмбриона качества В не были обнаружены цитокины. Полученные результаты для всех образцов представлены в дополнительных материалах (табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании были изучены эмбриональные жидкости от 94 эмбрионов различного качества. В частности, оценивали содержание в них цитокинов и влияние на пролиферацию и миграцию клеток эндотелия.

Содержание цитокинов с указанием методов исследования и источников указано в табл. 3. Анализ литературы показал, что наибольшая частота выявления цитокинов в кондиционированных эмбрионами средах происходит на второй день культивирования или на стадии 4 клеток [29–37]. Информации о наличии цитокинов IL-4, IL-5, IP-10, G-CSF в составе КЭС не было обнаружено. Тем не менее показано, что трофобласт способен к секреции противовоспалительных цитокинов IL-4, IL-5 и провоспалительного G-CSF, что способствует развитию беременности (табл. 1) [38, 43, 44]. IP-10 (CXCL-10) является важнейшим хемоаттрактантом бластоцисты и его секреция разными клетками при имплантации уточняется [39, 40]. В результате анализа не удалось обнаружить высоких концентраций перечисленных цитокинов. Поскольку чувствительность используемых нами наборов была высокой (табл. 1), мы полагаем, что полученные результаты не совпадают с результатами, приведенными в табл. 3, из-за разницы в схемах инкубации эмбрионов. Согласно приведенным в

Таблица 3. Содержание цитокинов в КЭС и методы их обнаружения

Цитокин	Концентрация	Метод обнаружения и чувствительность	Ссылка
IL-1 β	37 \pm 5 пг/мл	ELISA; сутки инкубации, чувствительность 2 пг/млм	[45]
IL-4	—	—	—
IL-5	—	—	—
IL-6	49.4 \pm 30.2 пг/мл	Оценка роста клеточной линии B13.29, зависимой от IL-6; сутки инкубации, чувствительность 2.5 пг/мл	[8]
	0.4827 \pm 0.2933 пг/мл	SIMOA Cytokine 3-plex A kit; 5 и 6 дни инкубации, чувствительность 0.0060 пг/мл	[11]
IL-8	100 — 2000 пг/мл	ELISA, Chemikine human IL-6 EIA Kit;	[46]
	2320.0 \pm 111.2 единиц сопротивления переноса заряда, R _{ст}	Электрохимическая импедансная спектроскопия с модификациями	[47]
IL-10	4.56 \pm 1.81 пг/мл	ELISA, eBioscience, BMS204/3MST; 3 и 4 дни инкубации	[47]
IL-10	0.0091 \pm 0.0069 пг/мл	SIMOA Cytokine 3-plex A kit; 5 и 6 дни инкубации, чувствительность 0.0022 пг/мл	[11]
IP-10	—	—	—
G-CSF	—	—	—
GM-CSF	Не обнаружен	Affymetrix Procarta immunoassays; 2 и более суток инкубации, чувствительность 1.2–2.000 пг/мл	[31]

таблице источникам, концентрация цитокинов может сильно варьировать в зависимости от продолжительности инкубации и количества бластомеров.

Тем не менее мы обнаружили, что исследуемые кондиционированные эмбрионами среды обладают функциональной активностью, поскольку они воздействовали на миграцию эндотелиальных клеток. При этом отмечались различия в эффекте кондиционированных сред от эмбрионов разного качества и клеточности. Причинами этого могут быть: 1) различия в уровне синтеза эмбрионами факторов, воспринимаемых эндотелием; 2) различия в способности эмбрионов поглощать вещества, входящие в состав КЭС: компоненты среды для культивирования, а также факторы, выделяемые самими эмбрионами.

В результате оценки влияния КЭС на пролиферацию эндотелиальных клеток было показано, что КЭС 4-клеточных эмбрионов усиливали пролиферацию клеток по сравнению с КЭС 2-клеточных эмбрионов. Тем не менее оба эти показателя достоверно не отличались от контрольного уровня. Из этого можно сделать вывод, что эмбрионы на стадии 4 клеток поглощают меньше питательных веществ из среды либо же выделяют большее количество цитокинов, чем эмбрионы на стадии 2 клеток, однако в пределах контрольных значений.

Что касается результатов, полученных в ходе оценки миграции эндотелия, КЭС эмбрионов на стадии 3 и 4 клеток также оказали большее влияние на эндотелий, нежели жидкости 2-клеточных эмбрионов, что подтверждает предположение об их более эффективном синтезе цитокинов, либо менее эффективном поглощении цитокинов из среды. Кроме того, можно предположить, что с увеличением клеточности логично ожидать увеличение интенсивности синтеза эмбрионами цитокинов и, как следствие, увеличение влияния на клетки эндотелия. Отчасти такой эффект наблюдался и КЭС эмбрионов на стадии 8 клеток уменьшали остаточную площадь десквамированного слоя эндотелиальных клеток относительно уровня, наблюдаемого в присутствии КЭС 2-клеточных эмбрионов (но не контрольного уровня). Тем не менее наибольший эффект на миграционную способность эндотелия, а именно на количество мигрировавших клеток, оказали КЭС, полученные от эмбрионов 3 и 4 клеток.

Если оценивать связь между качеством эмбрионов и силой их влияния на способность эндотелиальных клеток к миграции, наилучшие результаты показали КЭС эмбрионов качества А и АВ. КЭС эмбрионов качества С на стадии 4 клеток также увеличивали количество мигрировавших клеток относительно контроля. Наименьший эффект оказывали КЭС эмбрионов качества В.

Таким образом, в настоящем исследовании мы показали, что жидкости, полученные от эмбрионов

качества А и АВ, состоящих из 3 или 4 клеток, оказывают наибольший эффект на функциональную активность эндотелиальных клеток. В дальнейшем требуется определить природу активных молекул, входящих в состав этих жидкостей, которые могут служить потенциальными маркерами для определения наилучших эмбрионов.

Среди цитокинов и других факторов, стимулирующих ангиогенез, можно выделить эстроген [48], хорионический гонадотропин (hCG) [49], VEGF [50], PlGF [51], FGF [52], EGF [53], ангиопоэтины [54, 55], матриксные металлопротеиназы (MMPs) [56] и другие факторы [53]. Поскольку показано, что hCG эмбрион выделяет начиная с 8 суток [57], а эстроген и прогестерон синтезируются уже сформированной плацентой [58, 59], исследуемые эмбрионы не могли выделять их и активировать эндотелиальные клетки. Клетки трофобласта являются активными продуцентами MMPs. Показано, что они секретируют MMPs в ходе децидуализации эндометрия [60], однако способен ли трофобласт к их секреции до прикрепления бластоцисты к матке, не установлено. Одним из наиболее вероятных метаболитов, способных повлиять на активность эндотелия, является VEGF. В одном из исследований показали, что VEGF-A секретируется клетками эмбриона на ранних стадиях развития и что он (но не другие цитокины: EGF, LIF, CSF-1, IFN γ , IGF-I, IGF-II, IL-1 β , IL-6, IL-10, PDGF, TGF α , TGF β , PlGF, hCG) активирует пролиферацию клеток линии hEMVEC [61]. Еще одной группой соединений, оказывающих эффект на клетки окружения эмбриона, являются микроРНК: так, для hsa-miR-320a показан эффект в отношении миграции клеток стромы эндометрия [62]. Таким образом, влияние на функциональную активность эндотелиальных клеток предположительно могли оказывать различные метаболиты в составе КЭС (аминокислоты, соли, глюкоза) [36], VEGF-A [61], различные гемокины, например CCL15 [33] и микроРНК [62].

Подводя итог, в настоящем исследовании мы показали, что КЭС эмбрионов на стадии 4 клеток оказывают влияние на пролиферацию эндотелиальных клеток, а на стадии 3 или 4 клеток — на их миграцию. КЭС эмбрионов качества А, АВ и С усиливают миграцию эндотелия. Цитокины IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IP-10, G-CSF и GM-CSF не определяются в КЭС 4-клеточных эмбрионов после 2 суток культивирования. Тем не менее КЭС эмбрионов уже на этом сроке обладают активностью в отношении эндотелиальных клеток. В связи с этим необходимо исследовать природу входящих в их состав веществ с целью их использования как потенциальных маркеров для выбора лучших эмбрионов. Использованный нами подход для определения качества эмбрионов при помощи оценки влияния

КЭС на эндотелиальные клетки в целом совпадает с морфологической оценкой и может быть использован для дополнительного скрининга. Учитывая, что некоторые КЭС от эмбрионов В и С также обладали функциональной активностью в отношении эндотелия, предлагаемый нами тест может лечь в основу отбора для подсадки эмбрионов качеством ниже А.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В настоящем исследовании оценивали клинично-лабораторные данные, полученные в результате обследования пациенток, проходивших лечение в отделении вспомогательных репродуктивных технологий ФГБНУ “НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта” с июня 2023 г по декабрь 2023 г. Получено информированное согласие пациенток на обследование. Все процедуры, выполненные с использованием биоматериала, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ “НИИ АГиР имени Д.О. Отта” (протокол №125 от 12.05.2023).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана государственной программой поисковых научных исследований № 1022040700815-2-3.2.2;3.1.3-1-11 (FGWN- 2023-0006).

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация, Д.И.С.; методология, Е.В.Т., М.С.З.; проверка данных, Е.В.Т., М.З., Д.И.С.; формальный анализ, Е.В.Т., М.С.З., Д.И.С.; подготовка супернатантов, Е.М.К., Е.А.Л., К.В.О.; постановка экспериментов, Е.В.Т., М.С.З.; ресурсы, С.А.С., Д.И.С.; курирование, Д.И.С.; написание статьи — подготовка рукописи, Е.В.Т., М.С.З., Д.И.С.; написание статьи — рассмотрение и рецензирование, С.А.С.; визуализация, Е.В.Т., М.С.З., Д.И.С.; руководство, Д.И.С.; администрирование, О.Н.Б., С.А.С., Д.И.С.; привлечение финансирования, С.А.С., Д.И.С. Все авторы прочитали и согласны с настоящей версией статьи.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Njagi P, Groot W, Arsenijevic J, Dyer S, Mburu G, Kiarie J* (2023) Financial costs of assisted reproductive technology for patients in low- and middle-income countries: a systematic review. *Hum Reprod Open* 2023: hoad007. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoad007>
2. *Armstrong S, Bhide P, Jordan V, Pacey A, Marjoribanks J, Farquhar C* (2019) Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev* 5: CD011320. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011320.pub4>
3. *Sun Y, Cui L, Lu Y, Tan J, Dong X, Ni T, Yan J, Guan Y, Hao G, Liu JY, Zhang B, Wei D, Hong Y, He Y, Qi J, Xu B, Lu J, Zhang Q, Zhao S, Ji X, Du X, Zhang J, Liu J, Wang J, Huang Y, Huang D, Du Y, Vankelecom H, Zhang H, Chen ZJ* (2023) Prednisone vs Placebo and Live Birth in Patients With Recurrent Implantation Failure Undergoing In Vitro Fertilization: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 329: 1460–1468. <https://doi.org/10.1001/jama.2023.5302>
4. *Alegre L, Del Gallego R, Arrones S, Hernandez P, Munoz M, Meseguer M* (2019) Novel noninvasive embryo selection algorithm combining time-lapse morphokinetics and oxidative status of the spent embryo culture medium. *Fertil Steril* 111: 918–927 e3. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.01.022>
5. *Huang L, Bogale B, Tang Y, Lu S, Xie XS, Racowsky C* (2019) Noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy in spent medium may be more reliable than trophectoderm biopsy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116: 14105–14112. <https://doi.org/10.1073/pnas.1907472116>
6. *Kaser DJ, Farland LV, Missmer SA, Racowsky C* (2017) Prospective study of automated versus manual annotation of early time-lapse markers in the human preimplantation embryo. *Hum Reprod* 32: 1604–1611. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex229>
7. *Hernandez-Vargas P, Munoz M, Dominguez F* (2020) Identifying biomarkers for predicting successful embryo implantation: applying single to multi-OMICs to improve reproductive outcomes. *Hum Reprod Update* 26: 264–301. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmz042>
8. *Austgulen R, Arntzen KJ, Vatten LJ, Kahn J, Sunde A* (1995) Detection of cytokines (interleukin-1, interleukin-6, transforming growth factor-beta) and soluble tumour necrosis factor receptors in embryo culture fluids during in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 10: 171–176. <https://doi.org/10.1093/humrep/10.1.171>
9. *Simon C, Moreno C, Remohi J, Pellicer A* (1998) Cytokines and embryo implantation. *J Reprod Immunol* 39: 117–31. [https://doi.org/10.1016/s0165-0378\(98\)00017-5](https://doi.org/10.1016/s0165-0378(98)00017-5)
10. *Zolti M, Ben-Rafael Z, Meirom R, Shemesh M, Bider D, Mashiach S, Apte RN* (1991) Cytokine involvement in oocytes and early embryos. *Fertil Steril* 56: 265–272. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)54483-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)54483-5)
11. *Zhong H, Sun Q, Chen P, Xiong F, Li G, Wan C, Yao Z, Zeng Y* (2020) Detection of IL-6, IL-10, and TNF-alpha level in human single-blastocyst conditioned medium using ultrasensitive Single Molecule Array platform and its relationship with embryo quality and implantation: a pilot study. *J Assist Reprod Genet* 37: 1695–1702. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01805-7>
12. *Zollner U, Bischofs S, Lalic I, Zollner K-P* (2012) LIF and TNF alpha concentrations in embryo culture media are predictive for embryo implantation in IVF. *Asian Pacific Journal of Reproduction* 1: 277–282. [https://doi.org/10.1016/S2305-0500\(13\)60092-5](https://doi.org/10.1016/S2305-0500(13)60092-5)
13. *Dalton CF, Laird SM, Estdale SE, Saravelos HG, Li TC* (1998) Endometrial protein PP14 and CA-125 in recurrent miscarriage patients; correlation with pregnancy outcome. *Hum Reprod* 13: 3197–3202. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.11.3197>

14. Bastu E, Mutlu MF, Yasa C, Dural O, Nehir Aytan A, Celik C, Buyru F, Yeh J (2015) Role of Mucin 1 and Glycodelin A in recurrent implantation failure. *Fertil Steril* 103: 1059–1064 e2. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.01.025>
15. Yao K, Sun Y, Ye X, Wu Y (2023) Interferon-lambda contributes to endometrial receptivity. *Reproduction* 165: 569–582. <https://doi.org/10.1530/REP-22-0463>
16. Wei W, Wang N, Zhu Y, Liao M, Wang B, Du T, Zhang J, Mao X (2023) GM-CSF improves endometrial receptivity in a thin endometrium rat model by upregulating HOXA10. *Mol Hum Reprod* 30. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaad042>
17. Lv J, Shan X, Yang H, Wen Y, Zhang X, Chen H, Li H, Tian D, Wang CC, Zhang R, Li TC, Zhang X, Zhao X, Lu Y, Qin L, Zhu M, Xu W (2022) Single Cell Proteomics Profiling Reveals That Embryo-Secreted TNF-alpha Plays a Critical Role During Embryo Implantation to the Endometrium. *Reprod Sci* 29: 1608–1617. <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00833-7>
18. Aplin JD, Ruane PT (2017) Embryo-epithelium interactions during implantation at a glance. *J Cell Sci* 130: 15–22. <https://doi.org/10.1242/jcs.175943>
19. Von Woon E, Greer O, Shah N, Nikolaou D, Johnson M, Male V (2022) Number and function of uterine natural killer cells in recurrent miscarriage and implantation failure: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 28: 548–582. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmac006>
20. Yang X, Tian Y, Zheng L, Luu T, Kwak-Kim J (2022) The Update Immune-Regulatory Role of Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in Recurrent Pregnancy Losses. *Int J Mol Sci* 24. <https://doi.org/10.3390/ijms24010132>
21. Zhang X, Wei H (2021) Role of Decidual Natural Killer Cells in Human Pregnancy and Related Pregnancy Complications. *Front Immunol* 12: 728291. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.728291>
22. Chen X, Man GCW, Liu Y, Wu F, Huang J, Li TC, Wang CC (2017) Physiological and pathological angiogenesis in endometrium at the time of embryo implantation. *Am J Reprod Immunol* 78. <https://doi.org/10.1111/aji.12693>
23. Chen JX, Chen Y, DeBusk L, Lin W, Lin PC (2004) Dual functional roles of Tie-2/angiopoietin in TNF-alpha-mediated angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H187–95. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01058.2003>
24. Johnson KE, Wilgus TA (2014) Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 3: 647–661. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0517>
25. Herbert SP, Stainier DY (2011) Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 551–564. <https://doi.org/10.1038/nrm3176>
26. Tao J, Tamis R, Fink K, Williams B, Nelson-White T, Craig R (2002) The neglected morula/compact stage embryo transfer. *Hum Reprod* 17: 1513–1518. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.6.1513>
27. Gardner DK, Schoolcraft WB (1999) Culture and transfer of human blastocysts. *Curr Opin Obstet Gynecol* 11: 307–311. <https://doi.org/10.1097/00001703-199906000-00013>
28. Марков АС, МКЛ, Соколов ДИ, Сельков СА, MARK-MIGRATION. 2019: Россия.
29. Acuna-Gonzalez RJ, Olvera-Valencia M, Lopez-Canales JS, Lozano-Cuenca J, Osorio-Caballero M, Flores-Herrera H (2021) MiR-191-5p is upregulated in culture media of implanted human embryo on day fifth of development. *Reprod Biol Endocrinol* 19: 109. <https://doi.org/10.1186/s12958-021-00786-1>
30. Butler SA, Luttoo J, Freire MO, Abban TK, Borrelli PT, Iles RK (2013) Human chorionic gonadotropin (hCG) in the secretome of cultured embryos: hyperglycosylated hCG and hCG-free beta subunit are potential markers for infertility management and treatment. *Reprod Sci* 20: 1038–1045. <https://doi.org/10.1177/1933719112427279>
31. Dominguez F, Meseguer M, Aparicio-Ruiz B, Piqueras P, Quinonero A, Simon C (2015) New strategy for diagnosing embryo implantation potential by combining proteomics and time-lapse technologies. *Fertil Steril* 104: 908–914. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.06.032>
32. Freis A, Roesner S, Marshall A, Rehnitz J, von Horn K, Capp E, Dietrich JE, Strowitzki T, Germeyer A (2021) Non-invasive Embryo Assessment: Altered Individual Protein Profile in Spent Culture Media from Embryos Transferred at Day 5. *Reprod Sci* 28: 1866–1873. <https://doi.org/10.1007/s43032-020-00362-9>
33. Lee I, Ahn SH, Kim HI, Baek HW, Park YJ, Kim H, Aljassim AI, Shin W, Ryu C, Yoon J, Lee JH, Yun BH, Seo SK, Park JH, Choi YS, Cho S, Lee BS (2021) Cytokines in culture media of preimplantation embryos during in vitro fertilization: Impact on embryo quality. *Cytokine* 148: 155714. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155714>
34. Tabiasco J, Perrier d'Hauterive S, Thonon F, Parinaud J, Leandri R, Foidart JM, Chaouat G, Munaut C, Lombroso R, Selva J, Bergere M, Hammoud I, Kozma N, Aguerre-Girr M, Swales AK, Sargent IL, Le Bouteiller P, Ledee N (2009) Soluble HLA-G in IVF/ICSI embryo culture supernatants does not always predict implantation success: a multicentre study. *Reprod Biomed Online* 18: 374–381. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60096-x](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60096-x)
35. Taskin EA, Baltaci V, Cagiran G, Aytac R (2012) Detection of IL-1beta in culture media supernatants of pre-implantation human embryos; its relation with embryo grades and development. *Gynecol Endocrinol* 28: 296–298. <https://doi.org/10.3109/09513590.2011.631627>
36. Zhao Q, Yin T, Peng J, Zou Y, Yang J, Shen A, Hu J (2013) Noninvasive metabolomic profiling of human embryo culture media using a simple spectroscopy adjunct to morphology for embryo assessment in in vitro fertilization (IVF). *Int J Mol Sci* 14: 6556–6570. <https://doi.org/10.3390/ijms14046556>
37. Zmuidinaite R, Sharara FI, Iles RK (2021) Current Advancements in Noninvasive Profiling of the Embryo Culture Media Secretome. *Int J Mol Sci* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22052513>

38. *Torricelli M, Voltolini C, Bloise E, Biliotti G, Giovannelli A, De Bonis M, Imperatore A, Petraglia F* (2009) Urocortin increases IL-4 and IL-10 secretion and reverses LPS-induced TNF-alpha release from human trophoblast primary cells. *Am J Reprod Immunol* 62: 224–231. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2009.00729.x>
39. *Sharma S, Godbole G, Modi D* (2016) Decidual Control of Trophoblast Invasion. *Am J Reprod Immunol* 75: 341–350. <https://doi.org/10.1111/aji.12466>
40. *Sela HY, Goldman-Wohl DS, Haimov-Kochman R, Greenfield C, Natanson-Yaron S, Hamani Y, Revel A, Lavy Y, Singer O, Yachimovich-Cohen N, Turetsky T, Mandelboim O, Reubinoff B, Yagel S* (2013) Human trophoblast apposition is regulated by interferon gamma-induced protein 10 (IP-10) during early implantation. *Placenta* 34: 222–230. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.12.008>
41. *Ding J, Wang J, Cai X, Yin T, Zhang Y, Yang C, Yang J* (2022) Granulocyte colony-stimulating factor in reproductive-related disease: Function, regulation and therapeutic effect. *Biomed Pharmacother* 150: 112903. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112903>
42. *Seshagiri PB, Vani V, Madhulika P* (2016) Cytokines and Blastocyst Hatching. *Am J Reprod Immunol* 75: 208–217. <https://doi.org/10.1111/aji.12464>
43. *Gao P, Zha Y, Wei L, Zhou X, Zhu S, Zhang H, Gao X, Jiang Y, Chen Y, Li J, Zhang J, Yu J, Wang S, Liu H, Feng L* (2022) G-CSF: A vehicle for communication between trophoblasts and macrophages which may cause problems in recurrent spontaneous abortion. *Placenta* 121: 164–172. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2022.03.125>
44. *Scott VL, Shack LA, Eells JB, Ryan PL, Donaldson JR, Coats KS* (2011) Immunomodulator expression in trophoblasts from the feline immunodeficiency virus (FIV)-infected cat. *Virology* 8: 336. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-336>
45. *Ines Baranao R, Piazza A, Rumi LS, Polak de Fried E* (1997) Interleukin-1 beta levels in human embryo culture supernatants and their predictive value for pregnancy. *Early Hum Dev* 48: 71–80. [https://doi.org/10.1016/s0378-3782\(96\)01837-3](https://doi.org/10.1016/s0378-3782(96)01837-3)
46. *Dominguez F, Gadea B, Mercader A, Esteban FJ, Pellicer A, Simon C* (2010) Embryologic outcome and secretome profile of implanted blastocysts obtained after coculture in human endometrial epithelial cells versus the sequential system. *Fertil Steril* 93: 774–782 e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.10.019>
47. *Abreu CM, Thomas V, Knaggs P, Bunkheila A, Cruz A, Teixeira SR, Alpuim P, Francis LW, Gebriel A, Ibrahim A, Margarit L, Gonzalez D, Freitas PP, Conlan RS, Mendes Pinto I* (2020) Non-invasive molecular assessment of human embryo development and implantation potential. *Biosens Bioelectron* 157: 112144. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112144>
48. *Losordo DW, Isner JM* (2001) Estrogen and angiogenesis: A review. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 6–12. <https://doi.org/10.1161/01.atv.21.1.6>
49. *Jing G, Yao J, Dang Y, Liang W, Xie L, Chen J, Li Z* (2021) The role of beta-HCG and VEGF-MEK/ERK signaling pathway in villi angiogenesis in patients with missed abortion. *Placenta* 103: 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2020.10.005>
50. *Ozgokece C, Ocal A, Ermis IS* (2023) Expression of NF-kappaB and VEGF in normal placenta and placenta previa patients. *Adv Clin Exp Med* 32: 297–306. <https://doi.org/10.17219/acem/154858>
51. *Melincovici CS, Bosca AB, Susman S, Marginean M, Miha C, Istrate M, Moldovan IM, Roman AL, Miha CM* (2018) Vascular endothelial growth factor (VEGF) — key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol* 59: 455–467.
52. *Jin S, Yang C, Huang J, Liu L, Zhang Y, Li S, Zhang L, Sun Q, Yang P* (2020) Conditioned medium derived from FGF-2-modified GMSCs enhances migration and angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells. *Stem Cell Res Ther* 11: 68. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-1584-3>
53. *Karizbodagh MP, Rashidi B, Sahebkar A, Masoudifar A, Mirzaei H* (2017) Implantation Window and Angiogenesis. *J Cell Biochem* 118: 4141–4151. <https://doi.org/10.1002/jcb.26088>
54. *Akwii RG, Sajib MS, Zahra FT, Mikelis CM* (2019) Role of Angiopoietin-2 in Vascular Physiology and Pathophysiology. *Cells* 8. <https://doi.org/10.3390/cells8050471>
55. *Chaube B, Citrin KM, Sahraei M, Singh AK, de Urturi DS, Ding W, Pierce RW, Raaisa R, Cardone R, Kibbey R, Fernandez-Hernando C, Suarez Y* (2023) Suppression of angiopoietin-like 4 reprograms endothelial cell metabolism and inhibits angiogenesis. *Nat Commun* 14: 8251. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-43900-0>
56. *Majali-Martinez A, Hiden U, Ghaffari-Tabrizi-Wizsy N, Lang U, Desoye G, Dieber-Rotheneder M* (2016) Placental membrane-type metalloproteinases (MT-MMPs): Key players in pregnancy. *Cell Adh Migr* 10: 136–146. <https://doi.org/10.1080/19336918.2015.1110671>
57. *d'Hauterive SP, Close R, Gridelet V, Mawet M, Nisolle M, Geenen V* (2022) Human Chorionic Gonadotropin and Early Embryogenesis: Review. *Int J Mol Sci* 23. <https://doi.org/10.3390/ijms23031380>
58. *Albrecht ED, Pepe GJ* (1990) Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy. *Endocr Rev* 11: 124–150. <https://doi.org/10.1210/edrv-11-1-124>
59. *Halasz M, Szekeres-Bartho J* (2013) The role of progesterone in implantation and trophoblast invasion. *J Reprod Immunol* 97: 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2012.10.011>
60. *Espino YSS, Flores-Pliego A, Espejel-Nunez A, Medina-Bastidas D, Vadillo-Ortega F, Zaga-Clavellina V, Estrada-Gutierrez G* (2017) New Insights into the Role of Matrix Metalloproteinases in Preeclampsia. *Int J Mol Sci* 18: <https://doi.org/10.3390/ijms18071448>
61. *Kapiteijn K, Koolwijk P, van der Weiden RM, van Nieuw Amerongen G, Plaisier M, van Hinsbergh VW, Helmerhorst FM* (2006) Human embryo-conditioned medium stimulates in vitro endometrial angiogenesis. *Fertil Steril* 85 Suppl 1: 1232–1239. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.11.029>

62. *Berkhout RP, Keijser R, Repping S, Lambalk CB, Afink GB, Mastenbroek S, Hamer G* (2020) High-quality human preimplantation embryos stimulate endometrial stromal cell migration via secretion of microRNA hsa-miR-320a. *Hum Reprod* 35: 1797–1807. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa149>

EMBRYO-CONDITIONED MEDIA AFFECT THE FUNCTIONAL STATE OF ENDOTHELIAL CELLS

E. V. Tyshchuk, M. S. Zementova, E. M. Komarova, E. A. Lesik, K. V. Ob'edkova, O. N. Beshpalova, S. A. Selkov, and D. I. Sokolov

Research Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductology named after D.O. Ott, Saint Petersburg, Russia

**e-mail: lisatyshchuk@yandex.ru*

Currently, the main method of selecting high-quality embryos in assisted reproduction is based on morphological evaluation. In order to standardize the selection process and increase transfer efficiency, it is necessary to develop other objective, non-invasive methods. One potential approach is the assessment of soluble factors in media samples collected during embryo incubation. The aim of the study was to determine the levels of IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IP-10, G-CSF, and GM-CSF in embryo-conditioned media, as well as assess the effect of these media on the functional activity of endothelial cells. We did not find stable levels of these cytokines in the embryo-conditioned medium after 2 days of incubation. Nevertheless, the media obtained from embryos of quality A and AB, consisting of 3 or 4 cells, had an effect on the proliferation and migration of endothelial cells. In the future, it will be necessary to identify the nature of active molecules present in embryo-conditioned media in order to determine their potential as markers for selecting the best embryos.

Keywords: embryo quality, embryo supernatants, embryo cytokines