

УДК 636.4.:59.082.591.1.

© 2008

*Мартынченко Н.А., доктор биологических наук,
главный научный сотрудник лаборатории физиологии,
Институт свиноводства им. А.В. Квасницкого УААН*

ФАКТОРЫ ПОВЫШЕНИЯ УРОВНЯ ИМПЛАНТАЦИИ ТРАНСПЛАНТИРОВАННЫХ ЭМБРИОНОВ

Постановка проблемы. Имплантация эмбрионов в материнский эндометрий – первая и критическая ступень в становлении беременности, а трансплантация эмбрионов – единственный метод достижения конечного результата любой репродуктивной биотехнологии. Однако во всех случаях эмбриопродукции *in vitro*, криоконсервации эмбрионов, сохранения генофонда *ex situ* или ДНК-технологий количество полученного приплода составляет менее 10% от числа трансплантированных уникальных эмбрионов (43, 55). Главным фактором недостаточной эффективности применения трансцервикальных или хирургических методов трансплантации является низкий уровень имплантации пересаженных эмбрионов. По результатам анализа 26961 циклов трансплантации эмбрионов из системы IVF, осуществленных в 1994 г. медицинскими репродуктологами США и Канады, установлено, что клиническая беременность составила 29,1% от числа пересадок (51), а в настоящее время считается успешным достигнутый уровень 50% клинической беременности у женщин после трансплантации эмбрионов, однако от 60 до 92% их не имплантируется (52). Пренатальное выживание у свиноматок-реципиентов колеблется от 7,1 до 62,5% (16-17, 24, 31, 36-37, 66). Причины этого явления интенсивно изучаются и нуждаются в расшифровке взаимосвязей механических, анатомических и физиологических закономерностей в системе матка реципиента / эмбрионы донора. На данный момент такие исследования наиболее продвинуты в области медицинских вспомогательных репродуктивных технологий (Assisted Reproductive Technology – ART), поэтому данный обзор может раскрыть содержание затронутой проблемы лишь при использовании клинических данных наряду с результатами, полученными в экспериментах на животных, в частности, на свиньях, используемых в качестве модели во многих медико-биологических исследованиях.

Висвітлено сучасний стан результатів трансплантації ембріонів за рівнем їх імплантації, ендогенні та екзогенні фактори впливу на цей процес і можливі шляхи підвищення рівня вагітності реципієнтів.

Комплекс морфо-функциональных факторов, влияющих на имплантацию.

Анатомические особенности репродуктивного тракта реципиента и механические факторы влияния на имплантацию. Первая позиция включает влияние главного анатомического фактора – профиля цервикального канала и угла расположения маточного тела относительно цервикса. Самый сложный профиль цервикального канала имеет свинья: штопоробразной конфигурации в соответствии с формой пениса хряка, с хрящевидными "замками", расположенный под углом, близким 40° к осевой линии туловища, тогда как тело матки расположено по лонгитудинальной оси в горизонтальной проекции (1). Это создает трудности для введения внутриматочных катетеров: механическое раздражение цервикса вызывает сокращение его мускулатуры и временную (иногда дольше часа) непроходимость для среды с эмбрионами, а в случае насильственного введения – экспульсию их маткой (7, 27). Попытки механического преодоления сопротивляемости цервикса приводят к грубой травме слизистой, нередко с кровотечением. Данные литературы о влиянии на результат трансплантации следов крови или слизи на катетере очень противоречивы, однако, статистическое исследование клинических результатов 669 пересадок исключительно высококачественных эмбрионов, показало 49,7% беременности, отсутствие влияния наличия слизи на или в катетере, извлеченном из матки, и достоверное снижение показателей беременности при наличии крови в катетере (9). Среди множества других механических раздражителей рецепторов репродуктивного тракта реципиента существенно влияет объем среды (46), причем особое значение придается траектории и скорости продвижения в матку катетера и скорости инъекции среды с эмбрионами. Комплексное исследование всех этих факторов, на основании разработанной математической моде-

ли, привело к основному выводу о необходимости мягкого и продолжительного, не менее 10 сек., введения среды с эмбрионами во избежание перемешивания ее с эндометриальными секретами, что повышает электрический потенциал матки и, следовательно, может способствовать экспульсии введенных эмбрионов (21). Mogeno VM et al., 2004 (45) показали отсутствие негативного воздействия пузырьков воздуха в катетере, а в нашей практике наличие воздушных пробок в катетере считается необходимым фактором предупреждения потери эмбрионов. Большое значение придается правильному манипулированию с катетером в матке: достигнув заданной глубины, необходимо мягко слегка оттянуть его назад и после этого ввести эмбрионы, а прежде, чем вынимать, отсоединить инъекционный шприц, чтобы не создавать разреженного пространства в шприце и избежать обратного засасывания в него эмбрионов (27). При пересадке эмбрионов корове манипуляции в репродуктивном тракте, даже самые минимальные, приводят к выбросу в просвет матки простагландина $F_{2\alpha}$, который является специфическим лютеолитическим фактором (53). Вследствие наступающей резорбции желтых тел погибают не только трансплантанты, но и собственные эмбрионы реципиента, если он был спарен. Очевидно, что именно такой механизм возобновления циклов часто наблюдается у свиной, процедура внутриматочной трансплантации у которых, из-за анатомических особенностей репродуктивного аппарата, неизмеримо более жесткая, чем у коровы.

Возрастные структурные особенности эмбрионов донора. Результаты трансплантации эмбрионов разных видов животных и человека свидетельствуют о более высоком уровне (до 50%) имплантации бластоцист на стадии кавитации, чем начавших дробление зигот и морул (12, 22). Существует положительная взаимосвязь между диаметром бластоцист донора и рождением поросят-трансплантантов, которых тем больше, чем выше процент бластоцист с диаметром, превышающим средний, в пуле пересаживаемых эмбрионов ($r = 0,86$; детерминация $d = 73,60\%$; $p < 0,05$) (7). Выход из *Zona pellucida* (ZP) всегда является критическим моментом в развитии эмбрионов, поскольку ее толщина (4, 23), прочность и эластичность индивидуально очень вариabельны, причем между толщиной и прочностью существует криволинейный тип связи: только 12,8% случаев прочности ZP обусловлены фактором ее толщины ($\eta = 0,358$), а основное

значение имеет фактор ее эластичности (4). Показатель имплантации человеческих эмбрионов коррелирует с изменчивостью толщины ZP, а выбраковка эмбрионов низкого по этому признаку качества существенно улучшает показатели беременности (23). Удаление ZP после оттаивания бластоцист свиной повышало выживаемость эмбрионов на 12,6% и количество клеток в развивающихся бластоцистах на 55,5% ($P < 0,05$), через 24 часа *in vitro* (11). В этих исследованиях химическое истончение ZP не оказало влияния на результаты пересадок, что было подтверждено в рандомизированном исследовании частичного энзимного переваривания проназой ZP (54). В отличие от этого, полное удаление ZP кислым раствором Тироды повысило уровень имплантации эмбрионов почти вдвое (37,5% против 15,7% в контроле) и уровень беременности с 30,0% до 46,1% (35). Аналогично позитивный результат получен от лазерной техники освобождения эмбриона из ZP, причем такое вмешательство особенно эффективно в случаях предшествующей неоднократной утраты имплантации пациентками (10, 48). В опытах криоконсервации удаление ZP с ооцитов свиной с последующим оплодотворением *in vitro* привело к формированию нормальных бластоцист и рождению живых поросят (65). На результат трансплантации влияют физиологические процессы в матке реципиента, в первую очередь – двигательная активность миометрия, частота сокращений которого прогрессивно уменьшается по мере развития лютеальной фазы цикла и в период, отвечающий стадии кавитации бластоцисты, приближается к покою (22). Именно эта стадия развития эмбрионов и, соответственно, стадия эстрального цикла реципиента являются оптимальными для трансплантации. При использовании предварительно спаренных реципиентов коррективы вносит хронологическая конфигурация в системе матка/эмбрионы. Наши исследования показали, что решающим фактором имплантации эмбрионов донора является оптимизация физиологических составляющих этой системы во взаимосвязи возраста сингенных и аллогенных эмбрионов с возрастом матки реципиента (6).

Факторы повышения эффективности трансплантации эмбрионов.

Тестирование и селекция эмбрионов. Для успешной беременности реципиента требуется максимальный эффект от каждой отдельной ступени процедуры трансплантации. Биологическая разноразличность гамет, в частности ооцитов, и развивающихся из них эмбрионов, обусловлена

эволюционно на генетическом уровне как первая ступень естественного отбора, откуда следует, что главное условие высокого уровня имплантации после трансплантации эмбрионов – адекватный этому феномену отбор наиболее полноценных экземпляров. Из пула потенциальных трансплантантов должны быть исключены, в первую очередь, экземпляры, отстающие в развитии. Вторым решающим фактором является соответствие требованиям эмбрионов донора маточной среды реципиента, качество которой, в свою очередь, определяется качеством пересаженных эмбрионов, активно воздействующих на эндометрий. Наличие в пуле трансплантантов неполноценных экземпляров вызывает, вследствие их гибели, нарушение биохимического состава маточной среды. Матка реагирует на нежизнеспособные экземпляры массивным выбросом лейкоцитов, атакующих не только гибнущие, но и полноценные эмбрионы. Именно поэтому во всех технологиях трансплантации эмбрионов в животноводстве и ART используют как ведущее звено индивидуальный отбор потенциальных трансплантантов по их качеству. Сложность состоит в том, что к эмбрионам, подлежащим трансплантации, нельзя применять инвазивных методов. Существует множество тестов качества эмбрионов для последующей жесткой выбраковки неполноценных экземпляров. В каждом пуле ооцитов, выделенных из фолликулов свиньи, свыше 60% морфологически неполноценных и апоптозных (3), а среди зигот и эмбрионов первых стадий дробления 19% имеют ненормально низкий уровень РНК и SH-групп, проявляя в предимплантационный период 8-12-го дня признаки морфологической неполноценности или явной дегенерации (2). Качество ооцитов обусловлено не только генетически, но и фенотипически. Так, ооциты, образовавшиеся в недостаточно васкуляризованных фолликулах, генерируют эмбрионы с низкой способностью к развитию и имплантации (33). Считается ненадежным тестом ультразвуковое определение скорости роста фолликула или качества кумулюсных клеток ооцита с целью прогноза способности к развитию сформировавшегося из него эмбриона (52). Поэтому в ART рекомендуется двойной или даже тройной отбор эмбрионов на разных стадиях манипуляций *in vitro* и признан надежным показателем качества эмбриона темп дробления зиготы: присутствие 4 или 5 бластомеров на 2-й день и, по крайней мере, 7 бластомеров на 3-й после осеменения, при отсутствии многоядерных бластомеров и менее 20 % фрагментирован-

ных клеток на 2-й и 3-й день после оплодотворения (25, 41, 47). Имплантация и клиническая беременность выше (17,9% и 45,8%) при наличии рано раздробившихся эмбрионов, нежели поздно (5,1% and 16,7%, соответственно; $P < .05$) (34). Аналогичные результаты получены и в других многочисленных проверках влияния интенсивности развития эмбриона на его способность имплантироваться. Так, анализ 258 пересадок показал, что наличие 2 бластомеров через 24-26 часов после осеменения повышает уровень имплантации на 7%, а клинической беременности на 13,2% ($P < .05$) (57). Между качеством 2-3-дневных эмбрионов и качеством их на стадии бластоцисты существует положительная корреляция, а так как бластоциста дает больше информации (качество внутренней клеточной массы и трофобласта), то предложено культивировать тестируемые дробящиеся эмбрионы до стадии 5-дневной бластоцисты, после чего отбирать только те экземпляры, которые показали высший балл на обеих ступенях оценки (19). Вычисление уравнения прямолинейной регрессии и построение графика на основе процента бластоцист с диаметром выше среднего в пуле пересаживаемых эмбрионов позволяет прогнозировать результат трансплантации (7). Предложен метод прогноза имплантации путем параллельного определения уровня энзима 11 β -гидроксистероида дегидрогеназы (11 β -HSD) в биологических пробах от женщины-пациента и в среде ооцита. Этот энзим является конвертированным до неактивной формы кортизолом и между уровнем его в среде ооцита и наступлением беременности после IVF существует негативная корреляция (59). Исследование свыше 20000 случаев трансплантации эмбрионов, тестируемых на наличие анеуплоидии, подтвердило целесообразность прогнозирования беременности генетическим тестом хромосомной патологии, что существенно повышает уровень имплантации и снижает уровень спонтанных аборт (39). Соответствие гормонального зеркала донора процессу оогенеза, в качестве прогноза беременности, контролируют анализом фолликулярной жидкости (42) и сыворотки крови на соотношение эстрадиол/прогестерон (28). Попытка использовать в прогностических целях уровень материнского грелина оказалась неудачной (58). Показателем уровня метаболизма эмбриона служит контроль поглощения им пирувата или глюкозы (29), кругооборот аминокислот (32), кислорода и многие другие биохимические показатели, но все они трудоемкие и сложные, поэтому не находят

применения в практике. Простой и надежный тест – определение степени вязкости цитоплазмы ооцита, основанный на деструктивных ее изменениях в процессе отмирания клетки. У живого ооцита, в отличие от мертвого, после прекращения механического на него воздействия, следы деформации исчезают. Наши исследования (4) показали, что повышение степени вязкости цитоплазмы отмирающего *in vitro* ооцита происходит постепенно, и степень деформации яйца нарастает также постепенно. Кульминацией этого процесса является полная постмортальная коагуляция цитоплазмы, которую теперь невозможно деформировать: когда под давлением эластометра ZP разрывается и легко удаляется, ее содержимое обнаруживается в виде плотного правильного шара. Эластичность ZP живого ооцита коровы составляет $86,92 \pm 2,86$ % увеличения ее диаметра до момента разрыва, отмирающего – не более $71,25 \pm 3,70$ ($p < 0,01$). Наши данные нашли подтверждение в исследованиях Ebneg T. et al, 2003 (19), которые предложили, по сути, этот же тест в применении к интрацитоплазматической сперминъекции (ИЦСИ) оплодотворения ооцита. На 1008 женских ооцитах установили, что в норме сферическая форма после ИЦСИ восстанавливается в течение 2-3 мин., а наличие деформации в виде воронки достоверно снижает показатели способности эмбриона к развитию и имплантации. Аналогичный биологический феномен обнаружен недавно в спермальной плазме, гипервязкость которой связана с низким уровнем оплодотворения (50,4% против 64,6% при нормальной вязкости) и имплантации (10,5% против 16,5%), а также беременности (28% против 39,9%) (20). Как альтернатива селекции ооцитов и эмбрионов по качеству, предложен способ повышения их качества и жизнеспособности путем морфо-функционального воздействия. Суть метода состоит во введении в процессе ИЦСИ репликативных митохондрий из ооцита донора, свободных от мутагенной ДНК. В процессе репликации во время эмбрионального развития происходит количественное или функциональное увеличение копий митохондрий, 60-90% которых свободны от любых других цитоплазматических компонентов (63). Типично репликационный митохондриальный препарат содержит от 2000 до 20000 митохондрий в объеме от 5 до 15 пкЛ. Для длительного хранения митохондрии могут быть криоконсервированы. С этой же целью повышения способности к имплантации, используют введение в ооциты или доимплантационные эмбрионы митохондриаль-

но-связанных протеинов семейства Bcl-2 (64).

Оптимизация маточной среды реципиента.

В последнее время ведется интенсивный поиск химико-биологических факторов развития blastocysts в системе *in vitro*, которые в дальнейшем могли бы быть использованы для оптимизации маточной среды реципиента (EDTA или Hb, простаглицин, спермальная плазма и др.). В одном из клинических исследований для подготовки матки к приему эмбрионов пациентки получали пироксикам в оральной дозе 10 мг за 1-2 часа до трансплантации (98 свежих эмбрионов и 39 замороженно-оттаянных), а в контрольной группе получали плацебо. Пироксикам способствовал повышению уровня имплантаций до 18,7% и беременностей до 46,8% против 8,6% и 27,6%, соответственно, в контрольной группе (44). У коров-реципиентов уровень стельности был повышен путем блокады лютеолиза, вызванного раздражением цервикса. Применяли в/м инъекции антагониста простагландина F2 α и его рецепторов – флуниксина меглумина (flunixin meglumine, BANAMINE, Schering Corp., Kenilworth, NJ, USA) непосредственно до или после трансплантации эмбрионов (60). Перспективно для повышения уровня имплантации использование феномена влияния спермальной плазмы (СП) на развитие свиных эмбрионов, мишенью которой являются эндометриальные клетки. После спаривания свиноматки в эндометрии возникает транзитная острая воспалительная реакция при экстенсивной пролиферации маточных желез и выбросе в полость матки полиморфноядерных гранулоцитов (13, 50). Однако СП хряка содержит также специфический протеин иммуносупрессивного действия, защищающий эмбрионы от иммунных атак организма самки (14). Экспериментальная проверка показала, что через 34 час после инфузии СП в матку (в преовуляторный период) наблюдается экспрессия цитокинов и острое воспаление эндометрия с выбросом преимущественно макрофагов, и эта реакция сохраняется на 5-й и на 9-й дни после обработки. Важно, что этот процесс сопровождается изменением динамики развития эмбрионов и повышением их выживаемости в доимплантационный период: на 5-й и на 9-й день было вымыто от обработанных свиноматок на 33% эмбрионов больше, а пропорция живых среди них увеличилась с 77% до 91% против контроля. На 9-й день диаметр blastocyst был на 40% больше ($P < 0,001$) (49). Роль СП в процессах имплантации и развития эмбрионов донора характеризуют результаты нашего поискового опыта: 5 сви-

номаток через 34 час от начала охоты были осеменены спермой с мертвыми спермиями и впоследствии им пересадили в среднем по 17,2 бластоцист в возрасте от 5 до 9 дней (7). Один реципиент опоросился, и по результатам генетического анализа все 4 поросенка происходили от донора, бластоцисты которого были 7-дневными и синхронными с маткой реципиента (44,4% пренатальной выживаемости). Ни одна из 8-дневных бластоцист второго донора, асинхронных с маткой, не имплантировалась. Возможность улучшить результаты трансплантации эмбрионов путем внутриматочного введения спермы подтверждается данными клинических исследований: внутриматочное осеменение пациенток непосредственно перед оттаиванием и пересадкой замороженных эмбрионов достоверно повысило уровень имплантации и клинической беременности (26). Существует гипотеза, что релаксин, секретируемый лютеальными клетками, принимает участие в имплантационном процессе. Для ее проверки когда-то безуспешно пытались применить свиной релаксин (2 мг интравагинально в день трансплантации и повторно через 3 дня после нее) в системе ART (40). Однако ряд более поздних клинических экспериментов с использованием новых методов подтвердил реальность этого феномена, доказав, что низкий уровень релаксина может быть причиной отсутствия беременности после трансплантации. В этом случае механизм действия релаксина заключался в вазодилатации поверхностных сосудов эндометрия и пролиферации его эпителия. Установлено, что уровень секреции релаксина на 10-й день менструального цикла культивируемыми *in vitro* лютеальными клетками положительно коррелирует (в отличие от уровня прогестерона и ХГЧ сыворотки крови пациента) с уровнем имплантации (56). Это позволило прогнозировать доношенную беременность, которая

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Квасницкий А.В., Конюхова В.А., Конюхова Л.А. Искусственное осеменение свиней (фракционный метод). – К.: УАСХН. – 1961. – 225 с.
2. Квасницкий О.В., Мартиненко Н.А. Цитоспектрофотометричне дослідження вмісту РНК і SH-груп у зародках свиней/ Український біохімічний журнал. – 1977. – 49. – 2. – С. 3-8.
3. Лобченко В.А. Количество и качество ооцитов в яичниках свиньи в зависимости от уровня половой зрелости и фазы эстрального цикла/ Сельскохозяйственная биология. – 1990. – 2. – С. 83-87.

имела место во всех случаях уровня релаксина >800 пг/мл, тогда как только 13% такой беременности наблюдалось при уровне <200 пг/мл. При низком уровне секреции релаксина лютеальными клетками у пациенток наблюдался ненормально низкий его уровень и в сыворотке крови. На этом основании авторами был запатентован способ повышения уровня имплантации оплодотворенных *in vitro* эмбрионов путем применения экзогенного релаксина или активации эндогенной его продукции (источником релаксина служил клеточный экстракт, ежедневно снимаемый при культивировании лютеальных клеток) (61).

"Вспомогательные эмбрионы" для поддержания беременности. Существует несколько вариантов метода сохранения жизнеспособности и имплантации пересаженных эмбрионов за счет "вспомогательных эмбрионов", присутствие которых необходимо в критический период распознавания беременности маткой реципиента: 1 – дополнительная трансплантация партеногенетических эмбрионов, погибающих к 30-му дню беременности (15); 2 – использование реципиентов, беременных собственными эмбрионами (5, 30, 38, 62); 3 – использование реципиентов, спаренных в режиме задержки (6, 8) Наиболее эффективен последний вариант, устраняющий явление супериндукции и, при соблюдении рекомендованной авторами хронологической конфигурации в системе матка реципиента / сингенные и аллогенные эмбрионы, обеспечивает 83% опоросов и размер гнезда поросят $9,2 \pm 1,06$, среди которых $76,3 \pm 13,3\%$ трансплантантов ($P < 0,05$).

Заключение. Проблема повышения уровня имплантации трансплантированных эмбрионов может быть решена на базе комплексного метода, учитывающего взаимосвязь морфо-физиологических эндогенных и физических экзогенных факторов повышения качества эмбрионов и оптимизации маточной среды.

4. Мартиненко Н.А. Еластичність та міцність прозорої оболонки яйцеклітин великої рогатої худоби як показник їх біологічної нерівноцінності та різноякісності/ Фізіол. журн. АН УРСР. – 1965. – 11. – 4. – С. 432-436.
5. Мартиненко Н.А., Денисюк П.В., Чирков О.Г. Спосіб нехірургічної трансплантації ембріонів свині // Патент UA 28926 А, Кл. А 61D 19/04. – пріор. 12.11.1997. – Бюл. №80. – 29.12.99.
6. Мартыненко Н.А., Чирков А.Г., Денисюк П.В. и др. Трансцервикальная трансплантация эмбрионов свиньи и нейтрализация супериндукции

- при использовании спаренных реципиентов// Вісник Полтавської державної аграрної академії. – 2004. – 2. – С. 13-17.
7. Чирков О.Г. Фізіологічні фактори оптимізації умов розвитку в матці реципієнта ембріонів свині, трансплантованих нехірургічно (транскервікально). Дисертація... канд. с.г. наук, 03.00.13. – фізіол. людини і тварин. Ін-т свинарства ім. О.В. Квасницького УААН. – Полтава, 2005. – 134 с.
8. Чирков О.Г., Мартиненко Н.А., Денисюк П.В. та ін. Спосіб оптимізації умов розвитку трансплантованих транскервікально ембріонів свиней // Патент UA 4709, Кл.А61 D19/00. – пріор. 8.11.2002. – Бюл. №2. - 15.02.2005.
9. Alvero R., R.M. Hearn-Stokes, W.H. Catherino et al. The presence of blood in the transfer catheter negatively influences outcome at embryo transfer// Human Reprod. 2003. – 18. – 9. – P. 1848-1852.
10. Balaban B., Urman B., Yakin K., Isiklar F. Laser-assisted hatching increases pregnancy and implantation rates in cryopreserved embryos that were all wed to cleave in vitro after thawing: a prospective randomized study// Hum. Reprod. - 2006. – 21. – 8. – P.2136-2140.
11. Beebe L., Cameron RD, Blackshaw A.W., Keates H.L. Changes to porcine blastocyst vitrification methods and improved litter size after transfer // Theriogenology. – 2005. – 64. – P. 879-890.
12. Berthelot F., Ventu E., Cognie E. et al. Development of OPS vitrified pig blastocysts: Effects of size of the collected blastocysts, cryoprotectant concentration used for vitrification and number of blastocysts transferred// Theriogenology. -2007. – 68. – P. 178-185.
13. Bishop R.J., Lee C.S., Brandon M.R., Meeusen E. Inflammatory response in the pig uterus by seminal plasma// J. Reprod. Immunol. 1994. – 26. – 2. – pp. 131-146.
14. Claus R. Physiological role of seminal components in the reproductive tract of the female pig// J. Reprod. Fertil. Suppl. – 1990. – 40. – pp. 117-131.
15. De Sousa PA, Dobrinsky JR, Zhu J, et al. Somatic cell nuclear transfer in the pig: Control of pronuclear formation and integration with improved methods for activation and maintenance of pregnancy// Biol. Reprod. – 2002. – 66. – P.642-650.
16. Durco-Steveink D.V.B., Smits J.M., Hazeleger W., Merks J.W. Non-surgical embryo transfer in pigs// 5th Annual ESDAR Conf., 23-25 November 2000. – P.18.
17. Durco-Severink DV., Smits JM., Hazeleger W., Merks JW. Reproduction results after non-surgical embryo transfer in sows// Theriogenology. – 2001. – 53. – P.361.
18. Ebner T., M.Moser, M.Sommergruber, G.Tews. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development// Human Reprod. Update. – 2003. – 9. – 3. – P.251-262.
19. Ebner T, Moser M., Sommergruber M. et al. Developmental competence of oocytes showing increased cytoplasmic viscosity/ Hum. Reprod. – 2003. – 18. – 6. – P. 1294-1298.
20. Esfandiari N, Burjaq H, Gotlieb L et al. Seminal hyperviscosity is associated with poor outcome of in vitro fertilization and embryo transfer: a prospective study// Fertil Steril. – 2008 Feb 2 (Epub ahead of print) PMID: 18249373.
21. Eytan O., Elad D., Jaffa A.J. Bioengineering Studies of the Embryo Transfer Procedure// Ann. N.Y.Acad.Sci. – vol.1101-Reprod. biomech. – 2007 – P. 21-37.
22. Fanchin R., Ayoubi J-M., Righini C. et al. Uterine contractility decreases at the time of blastocyst transfers// Human Reprod. – 2001. – 16. – 6. – P. 1115-1119.
23. Gabrielsen A., Lindenberg S., Petersen K. The impact of the zona pellucida thickness variation of human embryos on pregnancy outcome in relation to suboptimal embryo development// Human Reprod. – 2001. – 16. – 10. – P. 2166-2170.
24. Galvin J.M., Killian D.B., Stevart A.N. A procedure for successful nonsurgical embryo transfer in swine// Theriogenology. – 1994. – 41. – P. 1279-1289.
25. Gerris J, de Neubourg D, Mangelschots K, et al. Prevention of twin pregnancy after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection based on strict embryo criteria // Hum Reprod 1999. – 14. – 10. – P. 2581-2587.
26. Geva E., Yovel I., Lerner-Geva L., Lessing J.B. Intrauterine insemination before transfer of frozen-thawed embryos may improve the pregnancy rate for couples with unexplained infertility // Fertil Steril. – 2000. – 73. – 4 – P. 755-760.
27. Ghazzawi I.M., S. Al-Hasani, R. Karaki, S. Sousa Transfer technique and catheter choice influence the incidence of transcervical embryo expulsion and the outcome of IVF// Human Reprod. – 1999. – 14. – 3. – P. 677-682.
28. Gruber I., Just A., Birner M. et al. Serum estradiol/progesterone ratio on day of embryo transfer may predict reproductive outcome following controlled ovarian hyperstimulation and in vitro fertilization// J Exp Clin As.Reprod. – 2007 – 4. – P.1-7.
29. Gardner D.K., Lane M., Stevens J., Schoolcraft, W.B. Noninvasive assessment of human embryo

- nutrient consumption as a measure of developmental potential// *Fertil. Steril.*, – 2001. – 76. – P. 1175-1180.
30. *Hagbin Z., Naiqing C., Li Li, Xinmin Z., Qingxin W.J.* Nuclear transplantation from pig blastomeres // *J. Agricult. Biotech.* 2001. – 9. – 2. – P.183-186.
31. *Hazeleger W., Kemp B.* Farrowing rate and litter size after transcervical embryo transfer// *Repr d.Dom.Anim.* – 1994 – 29. – P. 481-487.
32. *Houghton F.D., Hawkhead J.A. et al.* Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity// *Hum. Reprod.*, 2002. – 17. – P.,999-1005.
33. *Huey, S., Abuhamad, A., Barroso, G. et al.* Per follicular bloodflow Doppler indices but not follicular pO₂, pCO₂, or pH, predict oocyte developmental competence in in vitro fertilization// *Fertil. Steril.* – 1999. – 72. – P. 707-712.
34. *Isiklar A, Mercan R, Balaban B et al.* Early cleavage of human embryos to the two-cell stage. // *J Reprod Med.* – 2002. – 47. – 7. – P.540-544.
35. *Jelinkova L, Pavelkova J, Strehler I.* Improved implantation rate after chemical removal of the zona pellucida// *Fertil Steril.* – 2003. – 79. – 6. – P.1299-303.
36. *Kano M., Ichikawa A., Masuda T., Kobayashi S.* Non-surgical porcine embryo transfer by a balloon catheter producing subsequent high farrowing rate// *J.Anim.Sci.* – 2000. – 71. – 6. – P.579-585.
37. *Kikuchi K., Kashiwazaki N., Noguchi J. et al.* Development competence after transfer to recipients of porcine oocytes matured, fertilized, and cultured in vitro// *Biol.Reprod.* – 1999. – 60. – P.336-340.
38. *King T.J., Dobrinsky J.R., Zhu J., et al.* Embryo development and establishment of pregnancy after embryo transfer in pigs coping with limitations in the availability of viable embryos// *Reproduction.* – 2002. – 123. – 4. – P.507-515.
39. *Kuliev A, Verlinsky Y.* Impact of preimplantation genetic diagnosis for chromosomal disorders on reproductive outcome / *Reprod.Biomed.Online.* – 2008. – 16. – 1. – P. 9-10.
40. *MacLennan AH, Kerin JF, Kirby C et al.* The effect of porcine relaxin vaginally applied at human embryo transfer in an in vitro fertilization programme// *Aust. N Z J Obstet Gynaecol.* 1985. – 25. – 1. – P.68-71.
41. MASSON Prognostic factors of implantation/2004. – 33. – N1 – C2. – P.21-24
42. *Mendoza, C., Ruiz-Requena, E., Ortega, E., et al.* Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. *Hum. Reprod.*, 2002, 17. – P. 1017-1022.
43. *Misumi K., Suzuki M., Sato S., Saito N.* Successful production of piglets derived from vitrified morulae and early blastocysts using a microdroplet method// *Theriogenology.* – 2003. – 60. – 2. – P.253-260.
44. *Moon H.S., Park S.H., Lee J.O. et al.* Treatment with piroxicam before embryo transfer increases the pregnancy rate after in vitro fertilization and embryo transfer/ *Fertil. Steril.* – 2004. – 82.-4. – P.:816-820.
45. *Moreno VM^a, Balasch JM., Vidal E. et al.* Air in the transfer catheter does not affect the success of embryo transfer/ *Fertil. Steril.* – 2004. – 81. – 5. – P. 1366-1370.
46. *Nakazawa Y., Misawa H., Fujino Y. et al.* Effect of volume of non-surgical embryo transfer medium on ability of porcine embryos to survive to term// *J.Reprod.Dev.* – 2008. – 54/-1. – P.30-34.
47. *Neubourg D.D., Mangelschots K., van Royen E., et al.* Impact of patients' choice for single embryo transfer of a top quality embryo versus double embryo transfer in the first IVF/ICSI cycle// *Hum Reprod.* – 2002. – 17. – 10. – P. 2621-2625.
48. *Petersen C.G., Mauri A.L., Baruffi R.L. et al.* Implantation failures: success of assisted hatching with quarter-laser zona thinning// *Reprod Biomed Online.* 2005. – 10, – 2. – P.224-229.
49. *Robertson S.A., O'Leary S., Armstrong D.T.* Influence of semen on inflammatory modulators of embryo implantation/ *Reprod Suppl.* – 2006. – 62. – P.231-245.
50. *Rozeboom K.J., Troedsson M.H., Molitor T.W., Crabo B.J.* The effect of spermatozoa and seminal plasma on leucocyte migration into uterus of gilts// *J. Anim. Sci.* – 1999. – 77. – 8. – P.2201-2206.
51. SART/ASRM (1996) Assisted reproductive technology in the United States and Canada: 1994 results generated from the American Soc.Reprod.Med./Soc.for Assisted Reprod. Technology Registry. *Fertil. Steril.* – 66. – P. 697-705.
52. *Scott L.* The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos// *Hum. Reprod.Update.* – 2003. – 9. – 3. – P. 237-249.
53. *Schrack F.N, et al.* Prostaglandin F_{2α} appears to directly influence early embryonic survival in Cattle : would administration of Flunixin meglumine be beneficial during embryo transfer// *Proc.American Embryo Transfer Assoc.* – 2000. – P.9-16, Sacramento CA.
54. *Sellami A, Poncelet C.* A prospective randomized study to assess the benefit of partial zona pellucida digestion before frozen-thawed embryo transfers/ *Hum Reprod.* – 2006. – 21. – 9. – P. 2384-2389.

-
55. *Springmann K, Brem G.* Embryo transfer in swine in relation to a gene transfer program// Tierarztl Prax Suppl. – 1989-4. – P.21-25.
56. *Stewart D.R., VandeVoort C.A.* Relaxin secretion by human granulosa cell culture is predictive of in-vitro fertilization-embryo transfer success/ Hum Reprod. – 1999. – 14. – 2. – P.338-344.
57. *Tsai Y.C., Chung M.T., Sung Y.H. et al.* Clinical value of early cleavage embryo/ Int J Gynaecol Obstet. – 2002. – 76. – 3. – P.:293-297.
58. *Vidal C., Roa H., Pinilla L. et al.* Maternal serum ghrelin levels in early IVF pregnancies: lack of prognostic value for viable pregnancy and altered post-prandial responses/ Hum. Reprod. – 2008. – 23.-4. – P.958-963.
59. (WO 1994/021815) Predictive assay for the outcome of IVF // Priority data 23.03.1993 GB; PCT/GB1994/000596.
60. (WO 2006/078535A2)–Improving embryo development and survival// PCT/US 2006/001091. – Priority data 19.01.2005.
61. (WO/1998/059247) Relaxin levels correlated to IVF/ET pregnancy success// PCT/US1998/012921. – Priority data 23.06. 1997.
62. (WO 2002/074078 A2) Systems of transferring embryos and managing recipients// 2002, P T/US02/02930/ – Priority Data 30/01.
63. (WO/2001/030980) Methods and compositions for enhancing developmental potential of oocytes and zygotes – PCT/CA00/01283// Priority Data 27/10/1999.
64. WO 2007/003033 A1 –Methods and compositions for enhancing developmental potential of oocytes and preimplantation embryos// PCT/CA2006/000991.- Priority Data 17.06.2005.
65. *Wu GM, Lai L, Mao J. et al.* Birth of piglets by in vitro fertilization of zona-free porcine oocytes/ Theriogenology. – 2004. – 62. – 8. – P. 1544-1556.
66. *Yonemura I., Fudjino Y., Irie S., Miura Y.* Transcervical transfer of porcine embryos under practical conditions// J.Reprod.Dev. – 1996. – 42. – 2. – P. 89-94.