ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН НААН

Федорова Світлана

Володимирівна

**МЕХАНІЗМИ РАННЬОГО ЕМБРІОНАЛЬНОГО РОЗВИТКУ**

Реферат до здачі кандидатського іспиту

по спеціальності 03.00.23 – біотехнологія

Науковий керівник

Доктор сільськогосподарських наук

Мадіч А.В.

Львів-2007

**Зміст**

Вступ

1. Будова і рівні регуляції репродуктивної системи ссавців

2. Ранній ембріональний розвиток ссавців

2.1 Доімплантаційний розвиток

2.2 Імплантація

2.3 Роль стероїдних гормонів в імплантаційних процесах.

3. Фізіологічні та молекулярні механізми імплантації

3.1 Модель імплантації у ссавців

3.2 Функціональні зміни у тканинах матки при імплантації

3.3 Процеси адгезії

3.4 Апоптоз на ранніх стадіях ембріонального розвитку

3.5 Роль трофобласта у процесах інвазії

4. Роль білкових ростових факторів у становленні вагітності.

4.1 Ростові фактори – регулятори ембріонального розвитку

4.2 Механізми дії ростових факторів

4.3 Взаємодія рецепторів факторів росту з лігандами

4.4 Фактори росту на різних стадіях ембріонального розвитку

4.5Ростові фактори під час децидуалізації

4.6 Ростові фактори під час імплантації

5. Список літератури

**Вступ**

Керівники тваринницьких господарств звичайно зацікавлені у підвищенні продуктивності сільськогосподарських тварин. Їх кінцевою метою є підвищення якості та кількості продукції без зростання видатків на утримання поголів’я. Біотехнологічні методи дозволяють поліпшити продуктивність худоби за допомогою різних варіантів селекційного розведення.

Велика рогата худоба відноситься до одноплідних видів – тому від однієї корови за звичайних умов можна отримати у ліпшому випадку одне теля на рік, в той час як у її яєчнику містяться сотні тисяч статевих клітин (ооцитів), які являють собою необмежений генетичний резерв. Кардинальне вирішення проблеми прискореного відтворення худоби полягає в тому, щоб перейти до нетрадиційних способів збільшення плідності. Для цього застосовується ціла низка біотехнологічних методів, які розроблені на основі поглиблених досліджень репродуктивної функції, її регуляції, а також на вдосконаленні прийомів маніпуляцій з ембріонами, статевими та соматичними клітинами. В перспективі біотехнологія розглядається як основа прискореного відтворення високопродуктивних тварин та цілих популяцій.

За останній час набула практичного застосування трансплантація ембріонів, яка розглядається як ефективний метод біотехнології прискореного відтворення високоцінних племінних тварин.

Однією з най поширених проблем, які перешкоджають стопроцентному виходу телят після трансплантації – це переривання вагітності на різних критичних стадіях розвитку ембріона. Звичайно виділяють три критичних періоди розвитку ембріона – це стадія дроблення зиготи, стадія імплантації ембріона в порожнину матки і стадія плацентації. На стадії дроблення зиготи проблема порушень корегується, як правило в умовах дозрівання ембріонів in vitro шляхом використання поживних середовищ, які містять специфічних біологічно-активні речовини, серед яких гормони, специфічні білки, енергетичні субстанції, мікро- і макроелементи. Друга стадія – імплантація не вивчена досконало і являє певні труднощі для дослідження в умовах in vitro. За умов in vivo, під час підготовки репродуктивних органів самки до прийняття зиготи в дію вступають складні регуляторні системи, що пов’язані з білковими ростовими факторами. Це низькомолекулярні сполуки, які специфічно впливають на проліферацію клітин. В результаті взаємодії ростових факторів з клітинними рецепторами активується комплекс клітинних реакцій Тому дослідження участі різних специфічних для ранніх стадіях вагітності білків до сих пір є актуальним і потребує подальшого вивчення.

**1.Будова і рівні регуляції репродуктивної системи ссавців**

Репродуктивна система, подібно до інших систем організму, є функціональною системою – тобто містить периферичну та центральну ланку і працює на принципах прямого і зворотнього зв’язків. На відміну від інших систем, репродуктивна система функціонує нерівномірно у період повного існування організму – оптимальна функціональна активність настає після періоду статевого дозрівання і знижується до кінця життя. Це називається періодом фертильності. Організована репродуктивна система по принципу ієрархії – в ній розрізняють 5 рівнів, кожен з яких регулюється вищими системами. [20]

Перший рівень – це тканини-мішені (статеві органи, матка, молочні залози). Вони є локусами безпосередньої дії гормонів. В тканинах цих органів містяться рецептори до статевих гормонів (цитозольні рецептори) – таких, як естрадіол, прогестерон, тестостерон. Вільні молекули стероїдних гормонів захоплюються специфічним рецептором білкової природи і утворюють гормон-рецепторний комплекс, який транспортується до клітинного ядра, де взаємодіє безпосередньо з нуклеїновими кислотами.

Крім гормонів, до першого рівня відносяться також внутрішньоклітинні медіатори, які регулюють всі обмінні процеси і простагландини, які відіграють велику роль у протіканні вагітності [23].

Другий рівень – яєчники, в яких відбувається синтез стероїдів і розвиток фолікулів. Яєчник – це парний орган, є основним органом репродуктивної системи. Саме в ньому йде дозрівання фолікулів. В першій фазі циклу – фолікулярній фазі, або фазі проліферації зростає концентрація фолікулінів, а в матці відбувається активна проліферація епітелію. В середині циклу відбувається овуляція - розрив стінки яєчника і вихід яйцеклітини, після чого вона потрапляє у яйцепровід. Яйцеклітина може бути запліднена при злитті із сперматозоїдом або може розсмоктатись у черевній порожнині, а замість фолікула розвивається жовте тіло, яке синтезує та секретує другу половину циклу прогестерон і розсмоктується до початку нового циклу. При настанні вагітності воно називається жовтим тілом вагітності. Прогестерон утримує матку в стані нормотонусу. [11]

Кожен цикл слизова матки готується до імплантації – ендометрій активно проліферує, стає рихлим, з великою кількістю секреторних залоз. Запліднення відбувається в ділянці ампулярних відділів рогів матки, запліднена яйцеклітина – зигота починає рухатись по рогу матки у її порожнину. Під час руху вона дробиться і на стадії бластули відбувається імплантація. [9]

У фолікулярну фази яєчники активно синтезують естроген, пік цього настає у лютеїнову фазу, після овуляції збільшується синтез прогестерону і зменшується відповідно рівень естрогену. 80% стероїдних гормонів знаходяться у зв’язаному стані і транспортуються стероїдзв’язуючими білками або по неспецифічній системі (альбумінами і еритроцитами).

Також в яєчниках синтезуються простогландини, інгібіни – білкові речовини, які гальмують виділення фолікулостимулюючого гормону (ФСГ) та речовини місцевої дії – окситоцин, релаксин – які сприяють зворотньому розвитку жовтого тіла.

Третій рівень – це гіпофіз. Його клітини секретують гонадотропні гормони:

* ФСГ – сприяє розвитку фолікула
* лютеїнізуючий гормон – сприяє розвитку жовтого тіла
* лютеотропний гормон також сприяє розвитку жовтого тіла

ЛГ и ЛТГ сприяють овуляції: якщо овуляція не настала, то вони спричиняють такий розвиток яйцеклітини, що вона може бути запліднена.

* пролактин – сприяє атрезії фолікула і регулює лактацію

Четвертий рівень – гіпоталамус, який виробляє так звані рілізінг-фактори (соматоліберин, адренокортикотропний рілізінг-фактор, тиреоліберин, ФСГ рілізінг-фактор, люліберин). Завдяки портальному кровообігу між гіпоталамусом і гіпофізом забезпечується генетично запрограмований ритм їх секреції і обміну.

П’ятий рівень – церебральні структури, які сприймають імпульси із зовнішнього середовища і передають їх через нейротрансмітери.

**2. Ембріональний розвиток ссавців**

**2.1 Доімплантаційний розвиток**

У ссавців живлення за рахунок яйцеклітин відбувається тільки на ранніх стадіях, а далі, навіть до народження, воно здійснюється виключно за рахунок організму матері. Яйцеклітини вкриті двома оболонками – первинною і вторинною. Первинна – це плазмолемма клітини, вторинна утворюється фоллікулярними клітинами, з яких побудовані стінки фоллікула і які оточують яйцеклітину після її виходу з яєчника [2].

Дроблення у різних тварин відбувається по-різному. Процес дроблення великої рогатої худоби триває 8 днів, з яких 4 дні – в яйцепроводі і 4 дні в матці. У щурів доімплантаційний період складає 6 днів. Повне дроблення ссавців відбувається несинхронне - в результаті утворюються бластомери різної величини і зародок відповідно складається з 3,5,7 і т.д. бластомерів. Останні звичайно лежать у вигляді купки клітин (ця стадія носить назву морули). Вже у процесі дроблення відбувається відокремлення зародкових частин від незародкових – бластомери утворюються двох типів: дрібні світлі і більш грубі темні. [1]

Дрібні і світлі бластомери розташовуються ззовні і утворюють трофобласт, поступово обростаючи більш грубими темними бластомерами. Трофобласт в подальшому не приймає участі у побудові тіла зародка, але відіграє велику роль при імплантації та подальшому живленні ембріона.

Грубі і темні клітини утворюють ембріобласт, за рахунок якого формується тіло зародка, а пізніше виникають всі зовнішньозародкові органи.

Дроблячись, зародок пересувається по яйцепроводу у напрямку матки і поглинає секрет маткових залоз, який накопичується між трофо- і ембріобластом. Клітини трофобласту поглинають рідину і формують порожнину, розміри якої швидко збільшуються - утворюється трофобластичний пухирець. Він складається із зовнішнього шару клітин – трофобласту і внутрішнього скупчення клітин - ембріобласту, які, прилягаючи до трофобласту формують зародковий вузлик та порожнину бластули, яка заповнена рідиною. Ця стадія носить назву бластоцисти. [4]

У корів такий пухирець розвивається впродовж 7-11 дів і має форму кульки. На 12-ту добу діаметр пухирця у корів становить 1 мм, а на 13-ту він видовжується і становиться веретеноподібним.

Розвиток бластули відбувається під прикриттям яскравої оболонки колишньої яйцеклітини і третинними оболонками. Після вилуплення (розрив яскравої оболонки і вихід бластули) бластула імплантується в слизову оболонку матки. Клітини трофобласту синтезують специфічні ферменти, які руйнують тканину матки і зародковий пухирець, занурюючись в них, контактує з організмом матері. У корови це відбувається на 13-15-й день, у щурів на 7-й день після заліднення [17].

2.2 Загальна схема імплантації

Імплантація ембріона у порожнину матки – складний, багатоступінчастий процес, регуляція якого здійснюється за участі великої кількості гуморальних факторів і різноманітних міжмолекулярних та міжклітинних взаємодій.

Як було зазначено вище, запліднена яйцеклітина потрапляє у порожнину матки на стадії морули. Там вона розвивається у бластоцисту. Материнській організм сприйнятливий до бластоцисти, що імплантується тільки у межах строго визначеного по часу “вікна імплантації”. Поява у ендометрії трансмембранного глікопротеїну MUC-1 обмежує часові рамки “вікна імплантації” [27].

Під час фаз опозиції (протистояння ембріона і матки) та прикріплення на зовнішній мембрані бластоцисти утворюються багаточисельні мікровип’ячування – піноподи, в результаті чого вона входить у тісний контакт з матковим епітелієм, що означає перехід в стадію адгезії. Від’ємний електричний заряд на поверхні епітеліальних клітин сприяє зближенню бластоцисти з поверхнею ендометрію [25].

2.3 Роль стероїдних гормонів в імплантаційних процесах

Основними регуляторами морфологічних змін функціонального шару ендометрію протягом статевого циклу та у доімплантаційний період є стероїди, що синтезуються яєчниками. Тільки підготовлений циклічним впливом стероїдних гормонів ендометрій буде готовим до сприйняття бластоцисти та її гуморальних сигналів [13].

Встановлено, що ембріони самі можуть впливати на функції материнського організму протягом періоду імплантації. До імплантації розвиток ембріона залежить від секретів яйцепроводів і матки, від особливостей будови і функцій статевих органів самок, в яких розвивається бластоциста. Доказом цього є те, що культивування ембріонів корів до стадії бластоцисти можливо лише у поживному середовищі, максимально наближеним за хімічним складом до середовища яйцепроводів [22].

Відомо, що материнські стероїдні гормони регулюють синтез гормонів статевого тракту і таким чином можуть впливати на розвиток ембріона. Ембріональний розвиток після стадії одношарової бластоцисти відбувається нерівномірно до тих пір, поки ембріон не звільняється від зони пеллюцида – це відбувається під дією протеолітичних ферментів, які утворюються в ендометрії. Ці ферменти контролюються стероїдами яєчників, а їх активність стимулюється самою бластоцистою та починається на початкових етапах імплантації

Для всіх видів ссавців під час статевого циклу характерні дві слідуючі закономірності:

* зростаюча секреція естрогенів у фазі селекції і розвитку фолікулів, яка у хронологічному відношенні тільки неопосередкованно впливає на імплантацію;
* синтез великих кількостей прогестинів у секреторну фазу циклу, що співпадає по часу з імплантацією.

Рахується, що на відміну від прогестерону, естрогени впливають на імплантацію опосередковано. Естрадіол виступає у ролі пермісивного агента, тоді як прямий вплив характерний для локальних факторів, яких він регулює – цитокінів, молекул адгезії і факторів росту [23]. Більше того, вирішальну роль в імплантації відіграє не абсолютний вміст стероїдних гормонів, які діють на тканини-мішені органів репродуктивної системи, а морфологічна структура ендометрію, а саме ступінь рецептивності останнього, тобто кількість функціонально повноцінних рецепторів до відповідних стероїдних гормонів. [5]

Естрогени, одночасно із стимуляцією проліферації клітин маткового епітелію, активують розвиток секреторного апарату клітин ендометрію і синтез рецепторів до естрогенів та прогестерону, за допомогою яких і здійснюється різноманітний вплив гормонів на клітини. Вся родина стероїдних рецепторів являє собою клас білків, що функціонують на ядерному рівні і по суті, регулюють транскрипційні процеси. У відсутність лігандів стероїдні рецептори знаходяться у комплексі з білками теплового шоку. При зв’язуванні з стероїдом відбувається дисоціація цього комплексу і димеризація рецептора. Димер володіє здатністю зв’язуватись з відповідними, строго специфічними для стероїдів послідовностями ядерної ДНК, що забезпечує селективність у відношенні кожного з них і впливає на транскрипцію генів-мішеней. Всі стероїдні рецептори можуть конкурувати за одні і ті ж загальні транскрипційні факторі.

Більша частина гормон-рецепторних комплексів у ядрі дисоціюється і інактивується. В цитоплазму повертаються вільний стероїд та інактивований під дією ядерних фосфатаз рецептор. Гормон ніяких змін не зазнає.

Головним фізіологічним регулятором експресії ядерних рецепторів всередині клітин-мішеней є рівень циркулюючих вільних гормонів. Естрадіол підсилює синтез власних рецепторів, рецепторів до прогестерону і рецепторів андрогенів. Прогестерон, навпаки, пригнічує синтез як власних рецепторів, так і рецепторів естрадіолу [5], [14].

.

**3. Фізіологічні та молекулярні механізми імплантаційних процесів**

**3.1 Модель імплантації у ссавців**

Багаточисельні дослідження на модельних тваринах, головним чином на мишах, виявили велику кількість молекул, які приймають участь у процесах імплантації. Генетичні дослідження за допомогою targeting-методики допомогли ідентифікувати багато факторів росту та їх рецепторів, включаючи епідермальний фактор росту (ЕФР), трансформуючі фактори росту (ТФР) та інтерлейкіни, які приймають участь у процесах імплантації ембріонів. Крім того, in vitro дослідження показали, що гепарин-зв’язаний епідермальний фактор росту стимулює адгезію бластоцистів миші, а фібронектин та його рецептори задіяні у процесах утворення відростків трофобласту при адгезії бластоцист. [9]

In vitro дослідження імплантації у людини виявили наступні стадії:

1. Людська вилуплена бластоциста прикріплюється, а потім проростає у моношар внутрішньоматкової строми;
2. Трофобласт розпластовуєтьсяя по всій поверхні моношару стромальних клітин та з двох полюсів проростає в ці клітини;

Спільне культивування бластоцист та культури стромальних клітин значно стимулює синтез бластоцистами hCG. [7]

Таким чином, імплантація у всіх ссавців може бути описана як трьохстадійний процес: спочатку бластоциста активує відповідні ферментативні перетворення в ендометрію матки, які будуть сприяти процесам імплантації – це досягається двостороннім паракринним “діалогом” між матковою оболонкою і бластоцистою. Далі трофоектодерма приєднюється до люмінального епітелію оболонки матки шляхом взаємодії сигнальних молекул та їх рецепторів, і таким чином проростає через шар епітеліоцитів до базальної мембрани. І остання, третя стадія полягає у проростанні трофоектодерми в основну строму матки. Всі епітеліальні клітини синтезують інтегрини 3, 1 і 4, лептин та глікопротеїд MUC-1 – епітеліальне похідне глікокаліксу. Вважається, що саме його нестача на поверхні місця прикріплення бластоцисти і сповільнює імплантаційні процеси [20].

**3.2 Функціональні зміни у тканинах матки при імплантації**

Маточний ендометрій протягом доімплантаційного періоду багаторазово змінюється. Всі його компоненти - залозистий епітелій, покривний епітелій, стромальні клітини та міжклітинний матрикс зазнають морфологічних, клітинних і молекулярних змін [20], [25].

Залозистий епітелій. В період імплантації збільшується мітотична активність залоз. Секреторна активність залоз сягає максимума. Плацентарний протеїн 14 (ПП14) - головний компонент секреторного продукту залоз ендометрію протягом другою половини лютеїнової фази циклу і ранніх стадій вагітності. Це глікопротеїн з Мм 42 кД – прогестеронзалежний ендометріальний білок, який попереджує лімфопроліферацію і пригнічує активність природних клітин-кіллерів, яких є особливо багато на ранніх стадіях вагітності. Цей білок захищає ембріон, що імплантується від імунної системи матері.

Покривний епітелій. Це тканина, яка вкриває внутрішню порожнину матки. Він першим контактує з бластоцистою і саме в ньому відбуваються основні анатомічні і молекулярні зміни, які підвищують рецепторну активність ендометрію до нідації бластоцисти. У період імплантації на поверхні покривного епітелію з’вляються піноподи, цей процес інгібуться естрогеном і активуються прогестероном, їх поява співпадає з утворенням “вікна імплантації” – точки найвищої рецептивної активності ендометрію. MUC-1 – циклозалежний глікопротеїн, який був виявлений у мишей і людини. У мишей синтез мРНК MUC-1 та її білкового продукту в покривному епітелії зменшується в період діеструсу і стає майже непомітним перед адгезією бластоцисти. У людини синтез MUC-1 в ендометрії сягає максимума саме під час імплантації, що доводить двояку його роль у різних видів ссавців.

Стромальні клітини складаються, головним чином, з 2-х різних популяцій клітин: фібробластів і лейкоцитів. У другій половині секреторної фази статевого циклу фібробласти під дією прогестерону трансформуються у псевдодецидуальні клітини. У цьому процесі приймають участь такі регуляторні молекули, як гістаміни, простагландини, лейкотрієни, плацента-стимулюючий фактор, інтерлейкін-1 і ангіотензин. Ці механізми відповідають за контроль неадекватної імуносупресії, коли організм матері починає відповідати на вростання трофобласта негативною імунною реакцією.

Зовнішньоклітинний матрикс. Більшість його компонентів виробляється стромальними фібробластоми. Протягом проліферативної фази статевого циклу фібронектин і колагени типів ІІІ, V та VI є головними інтерстеціальними компонентами. При наближенні імплантації колагенові волокна розсмоктуються і міжклітинний матрикс стає менш в’язким, знижується стромальна імунореактивність до колагенів типів ІІІ і V, а колаген типу VI майже зовсім зникає – це спричиняє набряк слизової та збільшення зовнішньоклітинного простору. На ранній стадії лютеїнової фази циклу навкого стромальних клітин з’являються ламінін та фібронектин. Колаген починає активно синтезуватись на заключній стадії циклу – на початку трансформації стромальних клітин у перидецидуальні. Рахується, що саме зовнішньоклітинний матрикс чітко визначає межи, у яких відбуваються клітинні процеси раннього ембріонального розвитку: міграція, імплантація, а потім і плацентація. [27]

Таким чином, процес імплантації контролюється складними взаємодіями великої кількості сигнальних і ефекторних сполук, які продукуються ендометрієм, імунокомпетентними клітинами матері та ембріоном. Однак власно імплантації передують процеси, які розвиваються в ендометрії в секреторній фазі статевого циклу. У відповідності з цим реакція ендометрію в ході імплантації поділяється на три фази:

Перша фаза. Знаходиться під контролем естрогенів та прогестерона і характеризується змінами у покривних та залозистих епітеліальних клітинах ендометрію, результатом чого є підготовка до опозиції та приєднання бластоцисти. Гормональні впливи на ендометрій залежать від наявності ядерних рецепторів до стероїдних гормонів. Наростання концентрації рецепторів спостерігається у напрямі від функціонального шару до базального, що корелює із встановленням максимальної рецептивності матки, необхідної для імплантації. Паралельно зі змінами в системі стероїдних рецепторів, клітини епітелію піддаються змінам у структурі цитоскелету та профілю секреції білків. Ці зміни можуть бути попереджені антагоністами прогестеронових рецепторів у лютеїновій фазі циклу.

Друга фаза. Модуляція гормональних стероїдних ефектів ембріональними факторами. Початок секреції бластоцистою хоріонічного гонадотропіну та інших білків ранньої вагітності викликає додаткові зміни у клітинах ендометрію. В клітинах покривного епітелію відбувається ендореплікація, утворюються “епітеліальні бляшки”. Залозистий епітелій відповідає на дію ембріональних регуляторів модифікацією головного секреторного продукта – глікоделіну, який дає імуннопротекторний ефект у відношенні вагітності, що починається. Стромальні фібробласти починають процес свого диференціювання, набувають децидуального фенотипу и починають продукувати актинові філаменти.

Третя фаза. Інвазія трофобласта і перебудова стромального компонента ендометрію. При цьому на покривному епітелії зникають “епітеліальні бляшки”, залозистий епітелій залишається високо секреторно активним. В цій фазі закінчується трансформація фібробластів в децидуальні клітини, які починають синтезувати і секретувати весь спектр ростових факторів, які властиві для ранніх стадій вагітності.

3.3 Процеси адгезії

Маркерами ендометріальної функціональності та готовності ендометрію до імплантації є молекули адгезії. Адгезія - це процес прикріплення бластоцисти до поверхні матки. Цей процес опосередкований активністю цитоскелету, специфічних білків адгезії та їх рецепторів, що забезпечує адекватну локалізацію бластоцисти і активацію внутрішньоклітинних сигнальних біохімічних шляхів, що супроводжує клітинну активацію. Всі молекули, які приймають участь в процесах адгезії, є клітинними поверхневими рецепторними білками. Є 4 основних групи таких молекул: інтегріни, кадгеріни, селектини та супергруппа іммуноглобілінов [27], [14].

Інтегріни взаємодіють з різними лігандами, включаючи глікопротеїни зовнішньоклітинного матриксу та молекули на клітинних мембранах. Вони полегшують міграцію та прикріплення клітин до матриксу, опосередковують міжклітинні взаємодії та передачу сигналів. Ендометрій відноситься до тканин з високим рівнем експресії інтегрінів, які відіграють значну роль у процесах запліднення, імплантації та розвитку плаценти. Рахується, що присутність трьох типів цих сполук – a1b1, a4b1, avb3 - тільки протягом 20-24 дня циклу полегшує імунологічне розпізнавання ембріона та забезпечує позитивний результат імплантації. Цікаво, що додавання деяких молекул адгезії у культуральне середовище підвищувало якість ембріонів та збільшувало частоту їх наступної імплантації при трансплантації [6], [27].

Клітинна адгезія - важливий регулятор апоптозу. Індукція апоптозу за рахунок порушення взаємодії клітин із субстратом особливо добре проявляється в ендотеліальних та епітеліальних клітинах. Показано, що зміни у структірі інтегринів можуть вплинути на розвиток апоптоза.

3.4 Апоптоз на ранніх стадіях ембріонального розвитку

Це запрограмована клітинна смерть, яка контролюється генетично та характеризується активацією протеолітичних ферментів (каспаз), специфічною фрагментацією ДНК, розривами плазматичної мембрани та розпадом клітини на апоптичні тільця. Саме апоптозом контролюються характерні морофологічні зміни, які визначають готовність ендометрію до імплантації бластоцисти. Встановлено, що апоптоз розвивається у специфічних популяціях клітин ендометрію протягом усього статевого циклу. В ранньому проліферуючому ендометрію апоптозу підлягають клітини функціонального шару, у пізню проліферативну фазу і до самої середини секреторної фази ознак апоптозу в ендометрії не спостерігається. [18]

На початку пізньої секреторної фази апоптоз знову спостерігається у стромальних клітинах ендометрію. Початку апоптозу в залозах і стромі передує зниження концентрації 17-β естрадіолу та прогестерону у сироватці крові. Зниження кількості рецепторів до естрогену і прогестерону в матковому епітелії обернено корелює з ростом апоптичного індекса в цих тканинах. Клітини базального шару не піддаються апоптозу ні в одну з стадій естрального циклу. Продемонстровано, що можна експериментально моделювати запуск процесів апоптозу в ендометрії тварин in vitro шляхом вилучення стероїдних гормонів. Встановлено, що активація апоптоза в ендометрії корелює із змінами в концентрації 17-β естрадіолу та прогестерону у сироватці крові під час циклу, концентрацією клітинних рецепторів до естрогенам і прогестерону, а також з кількісними характеристиками проліферативних і секреторних змін в епітеліальних і стромальних клітинах ендометрію.

Показано участь апоптичних змін ендометрію в ході нормального процесу імплантації мишачих ембріонів. [28].

3.5 Роль трофобласта у процесах інвазії

Після прикріплення бластоциста починає зморщуватись і вкорочуватись та в інвазивну стадію вступає більш ущільненою. На цій стадії головну роль відіграє трофобласт, оскільки саме цією частиною бластоциста занурюється в строму. Занурення відбувається з обох боків – всередині знаходиться частина ембріобласту. Тобто трофобластична частина керує всім процесом інвазії взагалі. Бластоциста в такому стані набуває біполярну вісь симетрії – таку ж саму орієнтацію приймають і клітини строми в тому місці, куди імплантується бластоциста – очевидно, що регуляція є двосторонньою і взаємною.

При цитологічних дослідження (фарбуванні) тотальних препаратів добре видно короткі хрестоподібні структури волокон актину трофобласту поверх більш темних волокон стромального актину, розташованих нижче. Існують дані, які підтверджують наявність волокон актину та цитокератину в самих клітинах трофобласту на останніх стадіях перед інвазією, що може служити своєрідним “якорем” для укорінення в строму. Трофобласт проростає в строму так глибоко, що покривний епітелій повністю змикається над ним. [7]

**4. Роль білкових ростових факторів у встановленні вагітності**

4.1 Ростові фактори – регулятори ембріонального розвитку

При підготовці материнського організму до імплантації в якості локальних клітинних медіаторів дії стероїдів, які задіяні в циклічних змінах ендометрію, виступають ростові фактори. В доімплантаційний період вони присутні в ендометріальній тканині в дуже значних кількостях. Епідермальний фактор росту (ЕФР), інсуліноподібні фактори росту (ІФР-1 і 2), фактор росту фібробластів (ФРФ), фактори росту родини трансформуючих факторів росту (ТФР) активують мітотичну активність і властивість до диференціації клітин ендометрію, що підвищує сприйнятливість його до бластоцисти, яка імплантується під час “вікна імплантації”. Дією факторів росту опосередковуються специфічні зміни кількісного і якісного складу субпопуляцій лейкоцитів, які обумовлюють адекватну материнську імуносупресію та ендометріальну відповідь на занурення трофобласта.

Джерелом синтезу та секреції більшості ростових факторів і цитокінів є епітеліальні клітини, макрофаги та лімфоцити. Експериментально доведено, що синтез цитокінів нативними клітинами-кіллерами знаходиться під контролем прогестерону. Фактори росту і цитокіни являють собою декілька родин пептидів, які залучені у паракринні, інтракринні та аутокринні механізми регуляції клітинних реакцій за рахунок зв’язування із специфічними рецепторами клітинної поверхні [3], [23].

ссавець вагітність імплантація

4.2 Механізми дії ростових факторів

На відміну від ендокринних механізмів регуляції клітинної проліферації існують паракринні механізми, які діють на тканинному рівні. При цьому ростові фактори здійснюють дію головним чином на сусідні клітини.

Аутокринний тип регуляції – це коли клітини відповідають на дію фактору, який продукують самі і мають на нього рецептори. Цей тип регуляції має велике значення в період раннього ембріонального розвитку, коли йде активне розмноження ембріональних плюрипотентних клітин.

На відміну від стероїдних гормонів, які синтезуються з одного загального попередника, кожен поліпептидний фактор росту утворюється із свого попередника в результаті його процесінгу. Є дані, що ці попередники – трансмембранні білки, а активна форма фактору росту утворюється в результаті протеолітичного розщеплення зовнішньоклітинної ділянки молекули-попередника – тобто попередник є поліфункціональним пепетидом, а сама трансмембранна форма деяких факторів є рецептором для ліганду, що входить у його склад. Таким чином, є підстава вважати, що попередники деяких ростових факторів проявляють біологічну активність, залишаючись вбудованими в плазматичну мембрану клітин – у такому випадку вони взаємодіють із специфічними рецепторами сусідніх клітин без попереднього процесінгу. Такий спосіб регуляції клітинної проліферації називається юкстакринним. Є данні, що юкстакринна регуляція відіграє роль не тільки при міжклітинній адгезії, але і у ході стимуляції проліферації клітин. Особливо важливим це є в періоди раннього ембріонального розвитку, коли ще відсутні клітини, які секретують спеціальні гормони та ростові фактори [4], [8].

У послідовності взаємодії ростового фактора та клітини-мішені можна виділити певні послідовності:

* взаємодія фактору росту із специфічним рецептором плазматичної мембрани клітини-мішені;
* утворення і активація ліганд-рецепторного комплексу;
* біологічні ефекти, які виникають під дією регуляторних сигналів, індукованих фактором росту.

4.3 Взаємодія рецепторів факторів росту з лігандами

Рецептори факторів росту розташовані на поверхні зовнішньої мембрани клітин. Вони представлені численним класом глікопротеїдів з достатньо великою молекулярною вагою. Найбільш детально вивчено будову рецепторів інсуліну та епідермального фактор росту (ЕФР). Рецептор інсуліну складається з двох α- та двох β-субодиниць, які з’єднані між собою дисульфідними містками. Молекула рецептора складається із трьох основних функціонально різних доменів: ліганд-зв’язуючого, який багатий на вуглеводневі структури, трансмембранного, який складається переважно із залишків гідрофобних амінокислот, і цитоплазматичного, якій володіє ендогенною протеінкназною активністю. Цьому домену, який каталізує фосфорилювання білкових субстратів плазматичної мембрани і цитозолю по залишках тирозину, відводиться важлива роль у механізмах передачі регуляторного сигналу всередину клітин-мішеней. [12], [3]

Зв’язування рецептора з фактором росту забезпечує димеризацію і активацію тирозинкінази. Так ініціюється каскад реакцій фосфорилювання. Субстратами фосфорилювання є різні кінази, фосфоліпази і самі рецептори факторів росту. В якості біологічних ефектів фосфорилювання відбувається зміна мітогенних характеристик тканин, і диференціювання клітин, стимуляція транспортних систем і активація метаболічних шляхів.

Після взаємодії фактора росту з рецепторами клітинної поверхні відбувається процес кластеризації ліганд-рецепторних комплексів – процес їх агрегації у визначених місцях клітинної поверхні. Це необхідно для подальшого проникнення комплексів всередину клітин-мішеней. Після взаємодії інтенсивність зв’язування лігандів на поверхні клітин значно знижується – частина ліганд-рецепторних комплексів інтерналізується (піддається розщепленню в лізосомах), а частина повертається на поверхню клітин. Також виявлено, що після впливу деяких факторів росту на клітини у останніх змінюється здатність до зв’язування інших факторів росту.

Утворення комплексів факторів росту з рецепторами призводить до значних змін останніх. На відміну від рецепторів стероїдних гормонів, рівень мРНК рецепторів факторів росту багатократно збільшується протягом декількох годин після впливу. [2], [3].

4.4 Фактори росту на різних стадіях ембріонального розвитку

Всі періоди розвитку ембріонів співпадають у часі з перебудовою їх білкового складу. Перехід з однієї стадії в іншу пов’язують з регуляторним впливом специфічних білків, які діють на клітини локально по аутокринному або паракринному механізму. Під час аутокринної регуляції клітини, які секретують ростовий фактор, є одночасно і мішенями його дії, а під час паракринної регуляції фактори росту діють на сусідні клітини - мишені. За допомогою цих механізмів поліпептидні фактори росту виконують регуляторну роль в ембріональному періоді розвитку тварин.

Паракринні механізми регуляції клітинної проліферації, що діють на тканинному рівні, є еволюційно більш давніми ніж ендокринні. За цих умов фактори росту діють на клітини зблизька. Вони секретуються у позаклітинний простір, де можуть зв’язуватися зі специфічними рецепторами, що знаходяться на інших клітинах і які синтезують цей фактор росту [3].

Довгий час лишалося невідомим чи є аутокринна регуляція проліферації клітин феноменом, що характерний тільки для клітинної трансформації, чи це є загальнобіологічний механізм, за допомогою якого регулюються процеси клітинного розмноження. Згодом дослідженнями на ембріональних клітинах ссавців було доведено, що аутокринна регуляція проліферації має важливе значення під час ранніх періодів розвитку, коли відбувається активний поділ первинних ембріональних клітин [2].

Вже на початку доімплантаційного періоду ряд факторів росту починає проявляти ембріотрофічну активність. Наявність ТФР-α і внутрішньоклітинного домену до рецептора ЕФР вже виявляється у 4-клітиного ембріона. У 8- та 14-клітинних ембріонів виявляються ТФР- α, внутрішньо- та зовнішньоклітинні домени до рецепторів ЕФР, ІФР-1 та його рецептор. ТФР-β виявляється у ембріонах вівці на 12-16-й день, тоді як в культурі ендометрію його взагалі не має. Припускають, що продукування ембріоном ТФР-β розпочинається після материнського “впізнання” вагітності і співпадає по часу з імплантацією. Доведено, що родина ТФР-β відіграє важливу роль в цих процесах, адже саме вони забезпечує рецептивність ендометрію у відношенні бластоцисти. Децидуальний ТФР-β материнського походження може пригнічувати надлишкову інвазію трофобласта, а введення антагоністів ТФР-β викликало повне інгібування імплантації бластоцисти.

В останні роки багато уваги приділяється вивченню юкстакринної регуляції через ТФР-α в клітинах людського ендометрію при імплантації. Показано, що трансмембранна форма ТФР-α епітелію матки впливала на рецептор ЕФР мишиної бластоцисти при прямому міжклітинному контакті. Індукція та пік синтезу ТФР-α у мембранах епітелію матки співпадали по часу з періодом імплантації та були пов’язані з відповідним зростанням експресії рецепторів ЕФР на бластоцисті. При зв’язуванні ТФР-α з рецептором ЕФР розвивається два види відповіді: мітогенна і активація внутрішньоклітинних сигнальних шляхів. Така двостороння дія має дуже важливе значення у репродукції – при експресії ембріоном рецепторів ЕФР, які можуть взаємодіяти з ТФР-α ендометрію материнського організму, з одного боку стимулюється ріст і диференціювання ембріона, а з іншого – активується мітогенний сигнал у самих клітинах ендометрію, де відбувається інвазія. [10], [8].

Ранні доімплантаційні ембріони мишок і корів мають рецептори різних ростових факторів серед яких трансформуючий ростовий фактор TGF-α і TGF-β та інсуліноподібний ростовий фактор IGF-І, що в більшості випадків починають проявлятися на стадії незаплідненої яйцеклітини [19]. Доведено, що епідермальний ростовий фактор (EGF) здатний стимулювати ембріональний розвиток мишачих ембріонів у культурі. Інсулін стимулював синтез білків у 8-ми клітинних ембріонах мишок, бластоцистах і експандованих бластоцистах, специфічно впливав на диференціацію, оскільки він стимулював клітинне дроблення тільки внутрішньої клітинної маси, в той час як трофоектодермальні клітини лишалися „байдужими” до цього впливу [15]. Вплив інсуліну на ембріональний розвиток був очевидним навіть до 8-бластомерної стадії, коли виявляли тільки м-РНК інсулінового рецептору і не було виявлено будь-яких білків [21].

Рецептори IGF-1 було виявлено в ранньому ембріональному розвитку і доведено, що IGF-1 активує стимуляцію ембріонального метаболізму починаючи з 2-клітинної стадії розвитку. Попередніми дослідженнями на ембріонах свиней [8] виявлено вплив інсуліну на біосинтез естрадіолу, що дуже важливо для маткових шляхів, стимулює ембріональний диск до синтезу чотирьох нових білків, які потім беруть участь у механізмі материнського розпізнавання вагітності [24]. В цьому контексті ідентифікація IGF-І та IGF-II у рідині яйцепроводів свині разом з присутністю у епітелії яйцепроводів корів IGF-ІІ транскрипцій дозволило припустити, що білки, які пов’язані з інсуліном, є медіаторами впливу яйцепроводів на ембріональний розвиток. Відмічають, що яйцепроводи овець і корів секретують білки, які посилюють дію інсуліну в стимуляції мітозів ембріонального трофобласту [24].

Паралельні дослідження довели присутність м-РНК TGF-α та TGF-β, епідермального фактора росту, фактора росту тромбоцитів PDGF та інших ростових факторів у яйцепроводах ссавців [3]. Фактори росту PDGF, активін та епідермальний ростовий фактор ідентифіковано серед білків, які секретуються і локалізуються в окремих ділянках протоків яйцепроводів [25].

Зустрічається застереження щодо дії високих концентрацій ростових факторів у середовищі, які пригнічують проліферацію клітин яйцепроводів та кумулюсу [22].

Експерименти ряду авторів з вивчення впливу факторів росту на розвиток і дроблення ранніх ембріонів тварин доводять позитивний ефект цих поліпептидів при культивуванні цих ембріонів in vitro на фідерних моношарах. Y. Tsuchiya et al. підтвердили суттєвий вплив EGF в кількості 10нг/мл, інсуліну- 20мкг/мл не тільки на розвиток in vitro бластоцист овець, але й змогли отримати з їх внутрішньої клітинної маси колонію стовбурових ембріональних клітин, які були життєздатними на протязі 8 тижнів. Цікаво, що інсулін більш сприятливо впливав на формування ЕСК-колоній. Створені колонії клітин росли добре, але після першого пасажу зменшили інтенсивність росту, зберігаючи свою морфологію. Додавання EGF у середовище також спричинило ріст деяких колоній, але колонії були маленькі і росли слабо. Після двох пасажів вони також зберігали свою морфологію.

За даними Y. Iwakura et al присутність лейкеміє інгибуючого ростового фактору (LIF) та EGF в кількості 10 нг/мл сприяло суттєвому збільшенню колонії стовбуроподібних (плюріпотентних) клітин при культивуванні їх на фідерному моношарі ембріонального фібробласта протягом 5 днів. Подібні результати були раніше отримані на вівцях із застосуванням двох типів фідерних шарів: стовбурових клітин, що сформовані плюріпотентними клітинами бластоцист мишок і ембріональним фібробластом, які одержали з плодів вівцематок 32-го дня вагітності [17].

Glister C. at elв експерименті спостерігали in vitro дозрівання і запліднення 1761 ооцитів, дійшли висновку, що додавання ростових факторів, таких як IGF-1, TGF-α, EGF та PDGF в кількості 10 нг/мл до культурального середовища, однак, сприяє швидкості дроблення ембріонів, розвитку до стадії бластоцисти і вилуплення бластоцист з прозорої оболонки в присутності сироватки. [15]

4.5 Ростові фактори під час децидуалізації

Клітини строми у ссавців піддаються децидуальній трансформації безпосередньо перед імплантацією під впливом метаболічного сигналу з сторони бластоцисти. Перед реакцією приєднання бластоцисти до ендометрію спостерігається підвищений рівень експрессії ЕФР. Децидуальна трансформація локалізується спочатку безпосередньо біля бластоцисти, потім метаболічний сигнал епітелію передається стромі, що активує відповідну стромальну децидуальну реакцію.

Сама децидуалізація включає у себе багаточисельні зміни у стромальних клітинах. Спочатку збільшується проліферація мезенхімальних клітин, які піддаються постмітотичній диференціації і, таким чином, формують первинну децидуальну зону. Потім проліферують і диференціюються розташовані далі мезенхімальні клітини, в результаті чого утворюється вторинна децидуальна зона. Її клітини далі диференціюються і піддаються апоптозу, звільняючи таким чином місце для ембріона [10].

Серед різноманітних факторів росту, які експресуються у децидуальних клітинах у цей період – ІФР-1, рецептори до ЕФР, ТФР-α та гепарин-зв’язаного ЕФР. Наприклад, при введенні геперин-зв’яаного ЕФР у поживне середовище in vitro викликало локальну реакцію клітин ендометрію, яка полягала у підвищенні проникності судин та підсиленні процесів децидуалізації. [24]. Також є дуже важливим факт міжклітинної взаємодії між клітинами строми і ендометрію, які реалізуються сигнальними молекулами гістаміну та простагландинами. Збільшення продукції простагландину E2 модулює секрецію активатора плазміногена урокіназного типу, який експресується у стромальних клітинах ендометрію. Акумуляція активатора плазміногена і наступна судинна реакція знаходиться під контролем ЕФР. Цей ефект може інгібуватись інгібіторами транскрипції або трансляції. Ефекторні молекули родин ЕФР, інтерлейкін-1 і трансформуючі фактори росту -α та -β виявляються у гризунів на ранніх стадіях імплантації. Показано, що ген ЕФР експресується у просвіті матки миші, де знаходяться бластоцисти безпосередньо перед імплантацією. ЕФР сприяє росту бластоцисти і розростанню трофобластів in vitro. Такий же ефект спостерігається у стромальних клітинах ендометрію людини [25], [26].

Виявлена висока активність ЕФР у клітинах залозистого епітелію матки, тоді як у стромі та міометрію його рівень був набагато нижче. У свиней на 2-4-й день вагітності ЕФР виявлявся переважно в епітелії матки. На 5-й день його експресія в епітелії знижувалась, але на 6-7-й день виявлялась вже в децидуальних клітинах. Крім того, цей фактор був виявлений у трофоектодермі і у внутрішній клітинній масі доімплантаційного ембріона на 4-5-й день чи в ембріональній ендодермі та мезодермі на 5-6-й день вагітності. Передбачається, що ЕФР відіграє важливу роль у рості, міграції та адгезії клітин ендометрію, а також у формуванні міжклітинного матриксу протягом статевого циклу і на ранніх стадіях розвитку ембріона. Також рецептори ЕФР були виявлені у плаценті, що демонструє участь родини ЕФР у підтриманні вагітності. [8]

В ембріонах на ранніх стадіях розвитку продемонстровано присутність всієї родини інтерлейкінів, яка включає в себе декілька гомологічних поліпептидів та їх рецепторів. В організмі жінок поліпептиди родини ІЛ-1 були присутні у макрофагах та ендотеліальних клітинах, переважно в секреторній фазі статевого циклу [10]. На ранніх стадіях вагітност взаємодія ембріонального ІЛ-1 та рецепторів ІЛ-1 в ендометрії може забезпечувати впізнання та імплантацію ембріона. [1], [2].

ІЛ-1 та ТФР-β відіграють суттєву роль в імплантаційних процесах за рахунок регуляції експресії стромою ендометрію тканинних інгібіторів металлопротеїназ –1 та –3, а також колагенази IV типу, які є дуже важливі при інвазії трофобласта. Зниження синтезу колагена IV типу в стромі матки починається в середині секреторної фази і продовжується після імплантації. Рахується, що зменшення в’язкості цього типу колагену – головний фактор, який сприяє розвитку набряку у зовнішньоклітинному просторі при імплантації бластоцисти. Прогестерон інгібував стимулюючий ефект ІЛ-1 у відношенні металопротеїнази-3 у секреторній фазі in vivo та in vitro. Відомо, що подавлення активності металопротеїназ є необхідним для зберігання стабільності тканин при інвазійних процесах при імплантації та розвитку плаценти. ЕФР та ФРФ, навпаки, підвищували рівень протеолітичних ферментів, які продукуються ендометріальними стромальними клітинами у процесі децидуалізації in vitro , але не впливали на активність їх інгібіторів. [9]

4.6 Ростові фактори під час імплантації

Основну роль у проліферації клітинних компонентів залозистого епітелію ендометрію, строми, гладеньких м’язів та ендотелію судин відіграють специфічно експресовані під час проліферативної фази циклу ЕФР, ІФР-1 та ІФР-2, ФРФ.

Вважається, що інсуліноподібні фактори росту стимулюють мітоз і диференціацію клітин ендометрію протягом статевого циклу і на ранній стадії вагітності, є мітогенними для клітин строми та залозистого епітелію. ІФР-1 індукує багаточисельні локальні відповіді у клітинах ендометрію – такі, як підвищення локальної проникності судин, децидуалізацію та експресію деяких генів. Під час імплантації на стадії інвазії трофобласта ІФР-1 та ІФР-2 виявляють різні по локалізації та часовим характеристикам профілі експресії. Так, ІФР-1 експресувався у стромі та залозистому епітелії – тобто на ділянках, які є початковими на етапах прикріплення та інвазії трофобласта. Велика кількість ІФР-2 була виявлена в частині апікальних клітин, тоді як у базальному шарі на латеральних плазматичних мембранах більше виявляється ІФР-1. Це свідчить про вирішальну роль ІФР-2 у процесах саме адгезії. Тварини, у яких порушений ген ІФР-1, проявляли знижену фертильність. В різних групах клітин трофобласту виявляється знижений рівень ІФР-1 і навпаки, підвищений рівень ІФР-2. [10]

При вивченні родини ІФР-зв’язуючих білків встановлено, експресія ІФРСБ-1 знаходиться під контролем прогестерону, а сам ІФРСБ-1 виступає в ролі білка, який захищає материнський організм від надлишкової інвазії трофобласта і вже на 7-10-й день циклу ці білкі виявляються в децидуальних клітинах на ділянці імплантації.. [19]

Неопосередкована дія 17-β-естрадіолу на проліферацію епітеліальних клітин ендометрію проявляється у впливі естрадіолу на секрецію ІФР-1 стромальними клітинами ендометрію. Одночасно виявлені стимулюючі ефекти інсуліну на проліферацію клітин ендометрію, які здійснюються через активацію стромальних клітин. [11], [27].

**5. Список літератури**

1. Гьюдай Линда С. Имплантирующаяся оплодотворённая яйцеклетка и материнский организм // Проблемы эндокринологии, 1999; Т.5. С.30-32
2. Чернуха Г.Е., Сметник В.П., Роль факторов роста в функции репродуктивной системы // Проблемы эндокринологии, 1996, Т.2. С.8-13
3. Фильченков А.А., Стойка Р.С., Быкорез А.И. Трансформирующие факторы роста, 1994, 291 С.
4. Monniaux D., Monget P., Besnard N. Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. // Theriogenology.-1997. Vol.47. №1. P. 3-12
5. Abigail L. Fowden. Endocrine regulation of fetal growth // Reproduction. Fertility. Development // 1995. Vol.7. P.351-363
6. Aplin J.D. Adhesion molecules in implantation // Reviewes of reproduction. 1997. Vol.2. P.84-93
7. Bass K., Morrish D., Roth I. Human cytotrophoblast invasion is up-regulated by EGF:evidence that paracrine factors modify this process // Developmental biology.- 1994.- Vol.164. №2.- P.550-556
8. Buyalos R.P., Cai X. Preimplantation embryo development enhanced by Epidermal Growth Factor // Journal of Assisted Reproduction and Genetic.-1994. Vol.11. №1. P.33-37
9. Carson D.D., Bangchi I., Dey S.K. Embryo implantation // Developmental biology. 2000. Vol.223. P.217-237
10. Carver J., Martin K., Spyropoulou I. An in vitro model for stromal invasion during implantation of the human blastocyst // Human reproduction. 2005. Vol.18. P.283-290
11. Davis J.S., May J.V., Keel B.A. Mechanisms of hormone and growth factors action in the bovine corpus luteum //Theriogenology.- 1996.- Vol. 45,№ 7.- Р.1351-1380
12. Derrar N., Price C.A., Sirard M.A., Effect of growth factors and co-culture with ovarian medulla on the activation of primordial follicles in explants of bovine ovarian cortex // Theriogenology. 2000. Vol.54. №4. P.587-598
13. Duque P., Gómez E., Díaz E. et all, Use of two replacements of serum during bovine embryo culture in vitro // Theriogenology. 2005. Vol.59. №3-4. P.889-899.
14. Fujimoto J., Sakaghuchi H., Hirose R., Tamaya T. Significance of sex steroids in roles of cadherin subfamily and its related proteins in the uterine endometrium and placenta.// Horm.Res. 1998. Vol.50. P.30-36
15. Glister C., Groome N., Khight. Oocyte-mediated suppression of FSH and IGF-induced secretion of steroids and inhibin-related proteins by bovine granulose cells in vitro: possible role of TGF-α .// Biology of reproduction. 2003. Vol.68. P.758-765
16. Guler A., Poulin N., Mermillod P., Effect of growth factor EGF and IGF-I and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes // Theriogenology.2000. Vol. 54. №2. P.209-218
17. Iwakura Y. Mechnism of blastocyst formation of the mouse embryo // Development // Growth and Differentiation. 1989. Vol.31. №6. P.523-529
18. Kokawa K., Shikone T., Nakano R., Apoptosis in the human uterine endometrium during the menstrual cycle.// J.Clin.Endocrinol.Metab, 1996. Vol.81. P.4144-4147
19. Lackey B.R., Gray S.L., Henricks D.M. Physiological basis of use of insulin-like growth factors in reproductive applications: A Review // Theriogenology.- 2000.-Vol.53, № 5.- P.1147-1156
20. Lee K.Y., De Mayo F.J Animal models of implantation // Reproduction. 2004.Vol.128. P.679-695
21. Mann G.E., Green M.P., Sinclair K.D., Effects of circulating progesterone and insulin on early embryo development in beef heifers //Animal Reproduction Science. 2003. Vol.79. №1-2/ P.71-79
22. Merriman J.A., Whittingham D.G. and Carroll J., The effect of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor on the developmental capacity of in-vitro matnrated mouse oocytes // Human Reproduction. 1998. Vol.13. № 3. P.690-695
23. Sharkey A. Cytokines and implantation // Reviewes of reproduction. 1998. Vol.2. P.84-93
24. Sirisathein S., Hernandes-Fonseca H.J., Influences of Epidermal Growth Factor and Insulin Growth factor-I on bovine blastocyst development in vitro // Animal Reproduction Science. 2003. Vol.77. №1-2/ P.21-32
25. Spencer T.E., Burghardt., Johnson G.A., Bazer F.W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy // Animal Reproduction Science. 2004. Vol.82-83. P.537-550
26. Taga M., Suginami H., Cell adhesion and reproduction. // Horm.Res. 1998. Vol.50. P.2-6
27. Ueda O., Yorozu K., Kamada N. Possible expansion of "window of implantation" in pseudopregnant mice: time of implantation of embryos at different stages of developmental transferred into the same recipient // Biology of reproduction. 2003. Vol.69. P.1085-1090
28. Wang Y., Rippstein P. U., Tsang B. K. . Role and Gonadotrophic Regulation of X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein Expression During Rat Ovarian Follicular Development In Vitro//Biology of Reproduction. 2003. Vol. 68. №2. P. 610 - 619.