

На правах рукописи

СТАНОВА АЛИЯ КОНСТАНТИНОВНА

**ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ИНКУБИРОВАНИЯ *IN VITRO*
ЭМБРИОНОВ МЫШЕЙ НА ДОИМПЛАНТАЦИОННОЕ РАЗВИТИЕ И
ФЕНОТИП ПОТОМКОВ**

1.5.5 – Физиология человека и животных (биологические науки)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск, 2023

Работа выполнена в лаборатории генетики лабораторных животных Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН)» (г. Новосибирск).

Научный руководитель:

Мошкин Михаил Павлович – д.б.н., главный научный сотрудник, заведующий лабораторией генетики лабораторных животных Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН)», (г. Новосибирск).

Официальные оппоненты:

Кузьмина Татьяна Ивановна – д.б.н, заведующая лабораторией биологии развития Всероссийского научно-исследовательского института генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста (ВНИИГРЖ)», (г. Санкт-Петербург – Пушкин).

Назарова Галина Григорьевна – д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории структуры и динамики популяций животных Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук (ИСиЭЖ СО РАН)», (г. Новосибирск).

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физиологии имени И.П. Павлова Российской академии наук (ИФ РАН)» (г. Санкт-Петербург).

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2024 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.178.01. при ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины» по адресу: 630117, г. Новосибирск, ул. акад. Тимакова, 4. Адреса для корреспонденции: тел. (383)335-98-01, факс (383) 335-97-54, эл. почта dissovet@neuronm.ru/.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИНМ и на сайте <http://www.neuronm.ru/>.

Автореферат разослан _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
д-р биол. наук

М.А. Тихонова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Изучение механизмов адаптации к условиям существования относится к центральным направлениям физиологии. Эти исследования охватывают все стадии индивидуального развития – от младенчества до глубокой старости. Но организмы приобретают статус индивидуумов сразу после фертилизации яйцеклеток, которые у млекопитающих попадают в различные внутриутробные условия. Параметры внутриматочной среды варьируют в широком диапазоне (Chen et al., 2023), но их изучение с позиций физиологии адаптации практически отсутствует. Одной из эффективных моделей для изучения приспособительных реакций на доимплантационной стадии развития является экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), которое предполагает начальные стадии развития вне материнского организма. Известно, что доимплантационная стадия играет критическую роль в эпигенетической модуляции онтогенеза. Именно в первые 24 часа после оплодотворения у эмбрионов мыши происходит процесс эпигенетического репрограммирования, а именно активация зиготического генома (Schulz & Harrison, 2018). Процедура ЭКО, таким образом, нарушает стабильность доимплантационного развития. В связи с этим возникает вопрос об оптимизации пренатального онтогенеза путем направленных изменений условий культивирования *in vitro*. Одним из таких параметров является температура. Исходя из этого, мы разработали экспериментальный подход, согласно которому воздействие разных температур на эмбрионы мыши происходило в течение первых 24 часов после оплодотворения. При выборе температур инкубирования мы руководствовались двумя взаимно противоположными предположениями:

- Согласно недавно установленным данным, эмбрион развивается в температурном градиенте: от более высокой температуры в момент оплодотворения к более низкой при последующем развитии и продвижении по репродуктивному тракту (Hunter, 2012; Hunter et al., 2000). По некоторым данным, имитация естественных изменений температуры инкубирования положительно влияет на доимплантационное развитие эмбриона (García-Martínez et al., 2020; Şen & Kuran, 2018).

- Существует и обратная точка зрения, свидетельствующая о том, что снижение энергетического обмена на доимплантационной стадии положительно влияет на эмбриональный онтогенез (гипотеза «Тихий эмбрион») (Leese, 2002). Некоторые исследования подтверждают положительное влияние снижения метаболизма на развитие эмбрионов и успех беременности (Conaghan et al., 1993; Houghton et al., 2002; Sturmeý et al., 2010).

Цель исследования:

Изучить влияние температуры инкубирования *in vitro* эмбрионов на доимплантационное развитие и фенотип потомков.

Задачи:

1. Исследовать скорость клеточных дроблений эмбрионов на доимплантационной стадии в зависимости от условий развития вне материнского организма;
2. Оценить морфологию доимплантационных эмбрионов, а именно размеры бластомеров, синхронность дробления и соотношение числа клеток внутриклеточной массы и трофэктодермы в зависимости от условий развития *in vitro*;
3. Исследовать влияние условий инкубирования на средний уровень и дисперсию общего метилирования ДНК в клеточных ядрах эмбрионов на разных стадиях развития;
4. Изучить морфофункциональные характеристики потомков, полученных путем ЭКО при разных температурах первого клеточного дробления.

Научная новизна результатов

Влияние режима культивирования *in vitro*, а именно воздействие определенной температуры в первые 24 часа после оплодотворения и последующий перенос 2-х клеточных эмбрионов в «стандартные» температурные условия (37 °С), впервые использован нами для изучения особенностей эффектов температуры инкубирования на доимплантационное развитие эмбрионов.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты, полученные при изучении эффектов температуры инкубирования *in vitro* эмбрионов, расширяют представления о дестабилизации развития при процедуре ЭКО, а также демонстрируют диапазон влияния данного фактора на доимплантационное развитие и последующий онтогенез потомков. Эти данные могут быть полезны при разработке оптимальных протоколов ЭКО в центрах по разведению лабораторных животных и в сельском хозяйстве.

Положения, выносимые на защиту

1. Температура инкубирования в первые 24 часа после оплодотворения вызывает изменение скорости слияния пронуклеусов в зиготе и скорости достижения эмбрионами 2-х, 4-х и 8-и клеточных стадий.
2. Данный фактор влияет на морфологию доимплантационных эмбрионов, а именно на размеры бластомеров и соотношение числа клеток внутриклеточной массы и трофэктодермы.

3. Температура инкубирования воздействует на средний уровень и дисперсию общего метилирования ДНК в ядрах эмбрионов.
4. Условия культивирования влияют на энергетический фенотип потомков.

Апробация результатов

Данные, полученные при выполнении работы, были представлены и обсуждены на 13-й Международной мультikonференции «Биоинформатика геномной регуляции и структурной/системной биологии – BGRS/SB» (Новосибирск, 2022) и на конференции специалистов по лабораторным животным Rus-LASA (Москва, 2021).

Публикации

Основные результаты работы представлены в трех научных статьях, две из них опубликованы в зарубежных журналах, входящих в международные базы цитирования (WoS, Scopus), а также в трёх тезисах международных и российских научных конференций.

Объём и структура диссертации

Диссертация включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты, обсуждение результатов, выводы, список сокращений и список цитируемой литературы. Работа изложена на 123 страницах, содержит 19 рисунков и 14 таблиц. Библиографический указатель включает 233 источника литературы.

Личный вклад автора

Автором лично выполнены все экспериментальные исследования и статистическая обработка данных. Мониторинг спонтанной активности, потребления воды, корма, кислорода, выделения углекислого газа и измерение дыхательного коэффициента потомков в приборе Phenomaster выполнен совместно с к.б.н. Н.В. Хоцкиным и к.б.н. А.В. Ромашенко.

Благодарности

Автор выражает особую благодарность «Центру генетических ресурсов лабораторных животных ФИЦ ИЦиГ СО РАН» за предоставление свободных от видоспецифических патогенов (SPF) животных, доступ к оборудованию и возможность проведения исследований с сохранением SPF-статуса в течение всего эксперимента.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Животные и экспериментальные группы

Исследования были выполнены на мышах SPF-статуса аутбредной линии CD1 (n=159) в возрасте 12–18 недель. Животных содержали в контролируемой среде: искусственном фотопериоде 12.5С:11.5Т

(светлое:темное время), температуре 22–24 °С и влажности воздуха 40–50%. В качестве подстилочного материала использовали обеспыленные березовые гранулы (ООО «Альбион», Россия). Корм (SNIFF, Германия) и воду после автоклавирования (121 °С) давали без ограничений. Животных содержали в индивидуально вентилируемых клетках (OptiMice, США): самцов – одиночно, самок – по 5 особей в клетке. Протокол эксперимента одобрен комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН (№ 20 от 03.11.2014). Исследование выполнено в ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных», сформированный на базе ЦКП SPF-виварий ИЦиГ СО РАН.

Экспериментальные группы:

Культивирование *in vitro* эмбрионов

I. Контроль: естественное оплодотворение → развитие в материнском организме (24 часа после покрытия, подтвержденного вагинальными пробками) → вымывание эмбрионов из яйцеводов → развитие до стадии морулы/бластоцисты при 37 °С (самок n=10, самцов n=5).

II. Эксперимент:

1) **35 °С:** оплодотворение *in vitro* при 37 °С → прохождение первого дробления (24 часа) при 35 °С → развитие до стадии морулы/бластоцисты при 37 °С (самок n=30, самцов n=3);

2) **37 °С:** оплодотворение *in vitro* при 37 °С → прохождение первого дробления (24 часа) при 37 °С → развитие до стадии морулы/бластоцисты при 37 °С (самок n=30, самцов n=3);

3) **39 °С:** оплодотворение *in vitro* при 37 °С → прохождение первого дробления (24 часа) при 39 °С → развитие до стадии морулы/бластоцисты при 37 °С (самок n=30, самцов n=3).

Эмбриональные переносы

I. Контроль: самок-реципиентов (n=8), потомков (n=56).

II. Эксперимент:

1) **35 °С:** самок-реципиентов (n=13), потомков (n=50);

2) **37 °С:** самок-реципиентов (n=10), потомков (n=26);

3) **39 °С:** самок-реципиентов (n=14), потомков (n=5).

2.2. Методы исследования

Для получения эмбрионов были использованы следующие методы:

1. Экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО);
2. Культивирование *in vitro* эмбрионов.

Для исследования характеристик доимплантационных эмбрионов были применены:

1. Time-lapse микроскопия;
2. Дифференциальное окрашивание внутриклеточной массы (ВКМ) и трофэктодермы (ТЕ) бластоцисты;

3. Иммунофлуоресцентное окрашивание эмбрионов антителами к 5-метилцитозину (5-meC).

Для получения потомков и изучения их морфофункциональных характеристик были использованы следующие методы:

1. Перенос эмбрионов в воронку яйцевода;
2. Взвешивание потомков;
3. Мониторинг спонтанной активности, потребления воды, корма, кислорода, выделения углекислого газа и измерение дыхательного коэффициента.

При статистической обработке данных использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), двухфакторный дисперсионный анализ (two-way Factorial ANOVA), ковариационный анализ (ANCOVA), *post-hoc* Fisher LSD-test, критерий хи-квадрат (χ^2), *t*-тест Стьюдента с поправкой Бонферрони.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Время первого дробления и время достижения 4-х и 8-и клеточных стадий

Температура инкубирования в течение первых 24 часов влияла на скорость слияния пронуклеусов ($F_{2,179}=95.1$; $p<0.001$) и скорость дробления зиготы ($F_{2,179}=117.5$; $p<0.001$), а также на разницу между ними ($F_{2,179}=46.6$; $p<0.001$). Слияние пронуклеусов происходило быстрее в группе 39 °С, медленнее – в группе 35 °С. Время перехода на 2-клеточную стадию последовательно снижалось от 35 °С до 39 °С (рисунок 1А).

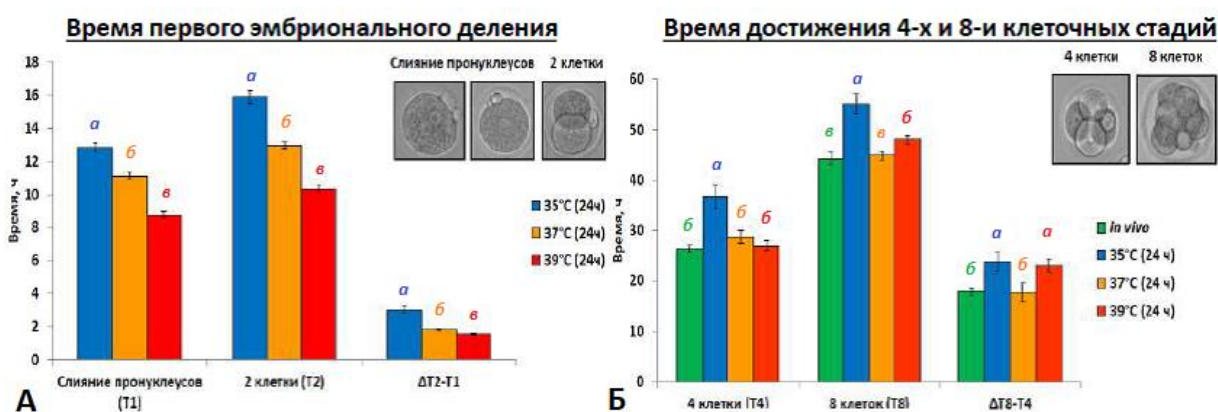


Рисунок 1 – Время эмбриональных дроблений (часы). А – время первого эмбрионального дробления. Б – время достижения 4-х и 8-и клеточных стадий. Достоверности обозначены разными буквами (Fisher LSD-test: $p<0.05$)

Было установлено статистически значимое влияние температуры инкубирования в течение первых 24 часов на скорость достижения 4-х ($F_{3,176}=10.2$; $p<0.001$) и 8-и клеточных стадий ($F_{3,146}=15.1$; $p<0.001$), а также на разницу между ними ($F_{3,147}=15.1$; $p<0.001$). Достижение 4-х клеточной стадии требовало больше времени у эмбрионов группы 35 °С (n=37), по сравнению с группами *in vivo* (n=29), 37 °С (n=54) и 39 °С (n=60). Скорость перехода на 8-

и клеточную стадию была ниже в группах 35 °С (n=24) и 39 °С (n=52), по сравнению с *in vivo* (n=29) и 37 °С (n=45) (рисунок 1Б). Влияние температуры инкубации зиготы на время перехода от 4-х клеток до 8-и клеток было максимальным в группах 35 °С и 39 °С (ΔT8-T4).

3.2. Размеры бластомеров

На размеры бластомеров достоверно влияли температура при культивировании *in vitro* ($F_{3,3705}=68.1$; $p<0.001$), число клеток ($F_{2,3705}=2638.4$; $p<0.001$) и взаимодействие этих факторов ($F_{6,3705}=3.6$; $p<0.001$). Минимальную площадь бластомеров наблюдали в группе 35 °С. Размеры бластомеров уменьшались при увеличении числа клеток. На стадии 4-х клеток наибольшая площадь бластомеров была выявлена в группах *in vivo* и 37 °С, наименьшая – в группе 35 °С (рисунок 2).

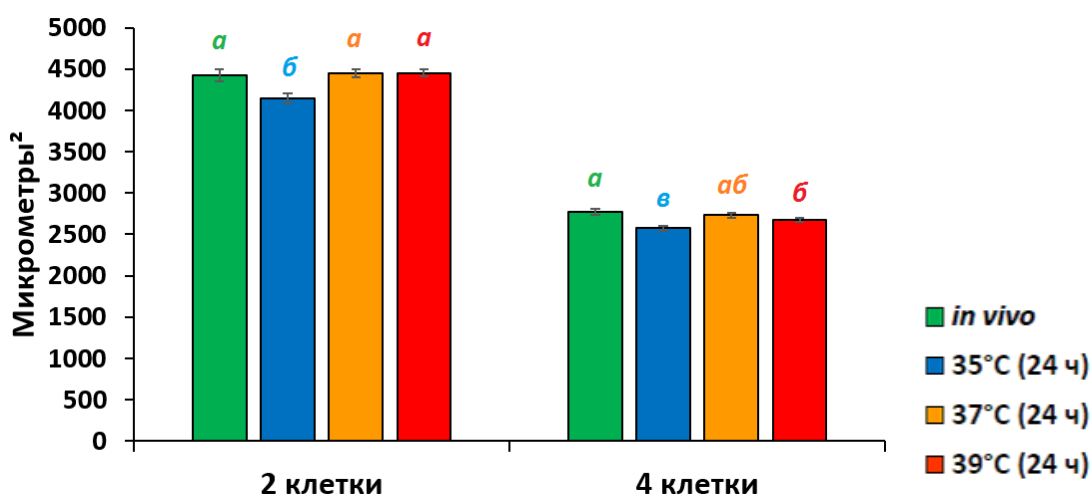


Рисунок 2 – Площади бластомеров на стадиях 2-х и 4-х клеток (микрометры²). Достоверности обозначены разными буквами (Fisher LSD-test: $p<0.05$)

3.3. Число клеток ВКМ и ТЕ бластоцисты

Было проведено дифференциальное окрашивание бластоцист: *in vivo* (n=43), 35 °С (n=33), 37 °С (n=29), 39 °С (n=17). Установлено, что температура инкубирования в первые 24 часа влияет на число клеток ТЕ ($F_{3,118}=5.9$; $p<0.001$) и общее число клеток ($F_{3,118}=5.01$; $p<0.001$), а также на отношение ВКМ к ТЕ ($F_{3,118}=3.3$; $p<0.05$). Общее число клеток было больше в контрольной группе и группе 37 °С. Меньшее число клеток трофэктодермы было обнаружено в группе 35 °С (рисунок 3). При этом отношение ВКМ к ТЕ было наибольшим в группе 35 °С.

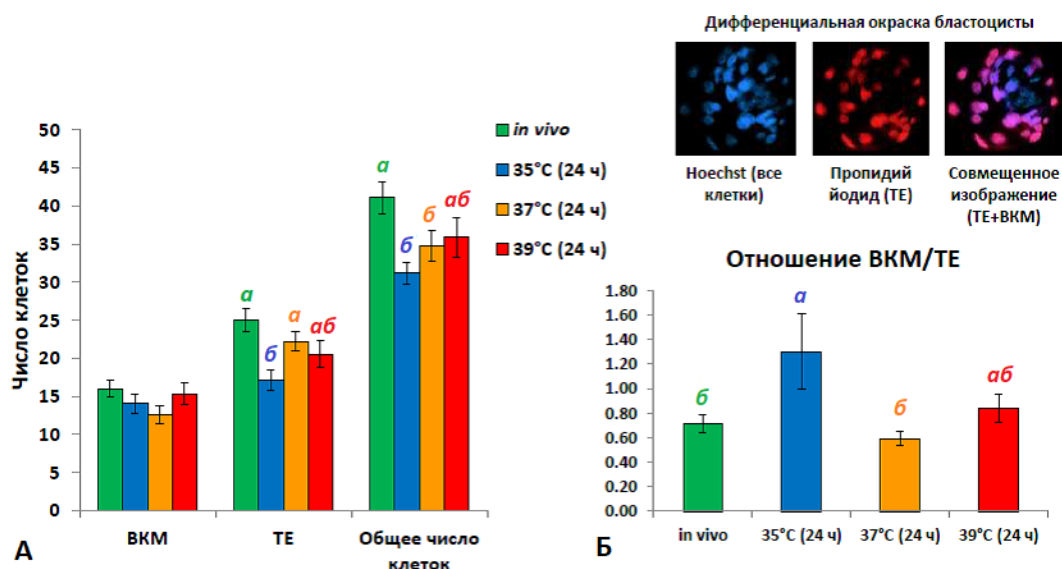


Рисунок 3 – Число клеток ВКМ и ТЕ и общее число бластомеров бластоцист. А – средние значения общего числа клеток, ВКМ и ТЕ. Б – отношение ВКМ к ТЕ. Достоверности обозначены разными буквами (Fisher LSD-test: $p < 0.05$)

3.4. Общее метилирование ДНК (5-meC)

Достоверно на уровень общего метилирования ДНК влияли такие факторы, как температура инкубирования в первые 24 часа ($F_{3,608}=3.15$; $p=0.024$), число клеток ($F_{2,608}=3.84$; $p=0.022$), а также взаимодействие этих факторов ($F_{6,608}=2.15$; $p=0.046$). Средние значения общего метилирования ДНК на стадиях 2-х и 4-х клеток между группами статистически не различались, однако при оценке дисперсии межэмбриональная флуктуация уровня метилирования была больше у эмбрионов в группах 35 °C и 37 °C, при этом показатели группы 39 °C были сопоставимы с контролем. На более поздних стадиях развития (более 4-х клеток) средний уровень метилирования был значительно выше у эмбрионов групп 35 °C и 37 °C, по сравнению с группами 39 °C и контролем. При этом, межэмбриональная флуктуация метилирования была выше у эмбрионов групп 37 °C и 39 °C, а дисперсия в группе 35 °C статистически не отличалась от контроля (рисунок 4).

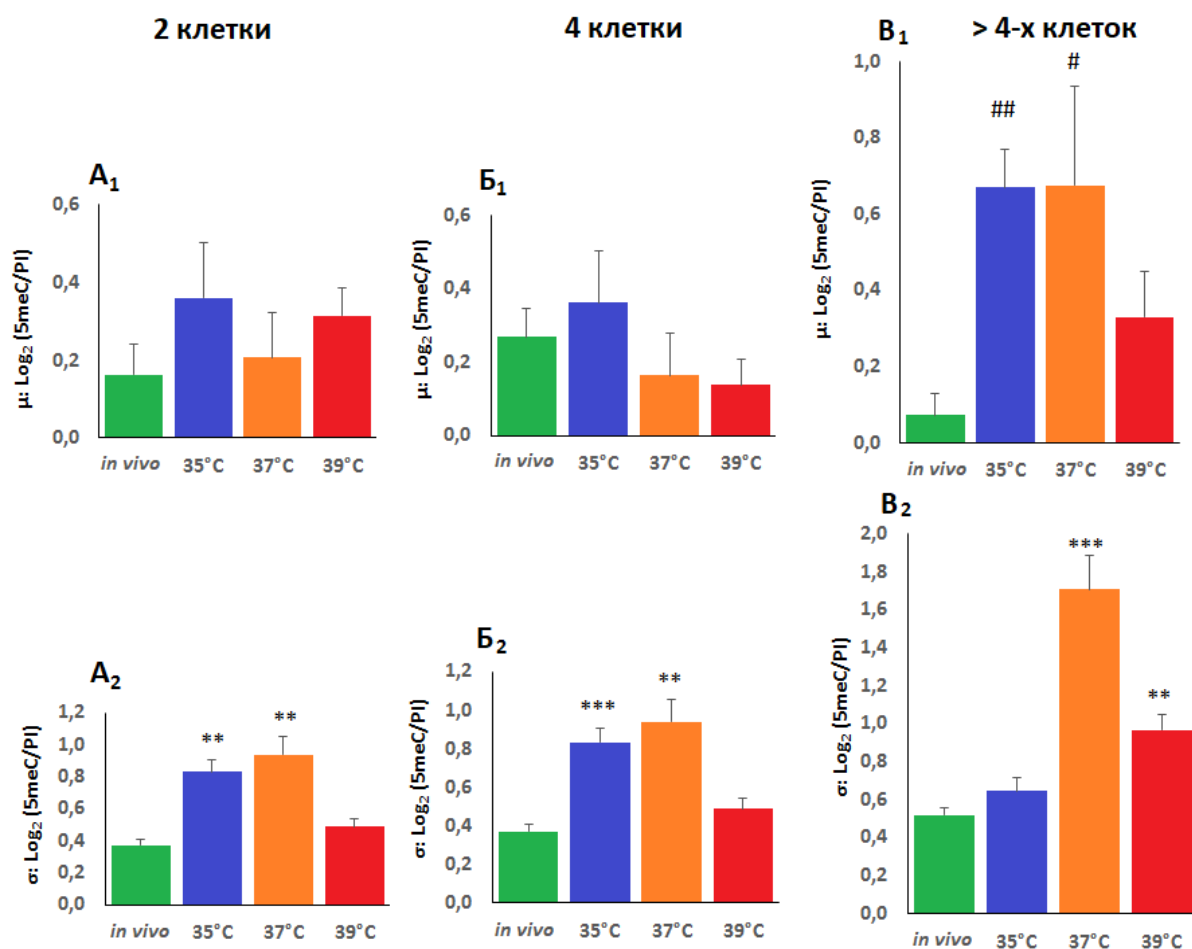


Рисунок 4 – Средний уровень и дисперсия общего метилирования ДНК: А₁ и А₂ – средние значения метилирования (μ) и стандартного отклонения (σ) на стадии 2-х клеток; Б₁ и Б₂ – μ и σ на стадии 4-х клеток; В₁ и В₂ – μ и σ на стадии более 4-х клеток. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ в сравнении с контролем (Fisher LSD-test); ** $p < 0.01$, *** $p < 0.01$ по сравнению с контролем (t -тест Стьюдента с поправкой Бонферрони)

3.5. Подсадки эмбрионов самкам-реципиентам

Эмбрионы на стадии 2-х клеток после 24-х часов инкубирования при 35 °C (n=199), 37 °C (n=151) и 39 °C (n=194) были перенесены в яйцеводы самок-реципиентов. Установлено, что температура культивирования *in vitro* в первые 24 часа развития достоверно влияет на среднее число рожденных потомков в помете ($F_{3,18}=9.9$; $p < 0.001$). Больше число потомков в помете обнаружено в контрольной группе *in vivo*, меньше – в группе 39 °C. Была подсчитана доля рожденных потомков от числа подсаженных самкам-реципиентам 2-х клеточных эмбрионов. Меньше число потомков родилось в группе 39 °C (39 °C × 35 °C: $\chi^2=41.5$, $p < 0.001$; 39 °C × 37 °C: $\chi^2=22.3$, $p < 0.001$). Число потомков в группах 35 °C и 37 °C достоверно не различалось ($\chi^2=3.16$, $p=0.07$).

3.6. Морфофункциональные характеристики потомков

Морфофункциональные характеристики потомков разных групп: 35 °C (n=12), 37 °C (n=12) и *in vivo* (n=8) были оценены с помощью прибора Phenomaster. Было установлено, что температура культивирования *in vitro* в первые 24 часа развития влияет на выделение CO₂ в темное время ($F_{2,29}=3.3$; $p<0.05$), в светлое время на продолжительность сна ($F_{2,29}=4.8$; $p<0.01$), пройденное расстояние ($F_{2,29}=3.9$; $p<0.05$), потребление корма ($F_{2,29}=3.5$; $p<0.05$) и потребление воды и в светлое ($F_{2,29}=4.1$; $p<0.05$), и в темное время ($F_{2,29}=3.2$; $p<0.05$). Для потомков экспериментальных групп (35 °C и 37 °C) была характерна большая двигательная активность, особенно в светлое время, большее потребление корма и воды в сочетании с меньшей продолжительностью сна, и, следовательно, большим энергетическим обменом, по сравнению с контрольной группой.

4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Одной из причин повышенного риска нарушений обмена веществ, артериальной гипертензии и других хронических заболеваний у людей, рожденных при помощи ЭКО, может быть экспериментально показанная ранее дестабилизация эмбрионального развития (Moshkin et al., 2022). В связи с этим возникает вопрос об оптимизации пренатального онтогенеза путем направленных изменений условий культивирования *in vitro*. Одним из таких критериев является температура. В нашем исследовании мы обнаружили, что прохождение первого дробления при разных температурных условиях отражается на определенных параметрах развития. Эмбрионы группы 35 °C показывали большее время достижения стадий слияния пронуклеусов, и формирования 2-х, 4-х и 8-и клеток по сравнению с оплодотворением *in vivo*. Полученные нами данные согласуются с результатами ранее проведенного исследования, в котором митотические дробления доимплантационных эмбрионов мыши проходили медленнее при более низкой температуре и ускорялись по мере повышения температуры с 35.0 °C до 37.5 °C (Walters et al., 2020). Слияние пронуклеусов и достижение 2-х клеточной стадии происходило у эмбрионов группы 39 °C быстрее, чем в других группах, а достижение 4-х клеточной стадии не отличалось от контроля. Это согласуется с другим исследованием, в котором эмбрионам, инкубированным при 37 °C днём и 35 °C ночью, требовалось больше времени для дробления, чем контролю (37 °C) и группе, инкубированной при температуре 38.5 °C днём, 37 °C ночью (Moriyama et al., 2022).

В нашей работе установлено, что на размеры бластомеров влияли такие факторы, как температура культивирования *in vitro*, число клеток и взаимодействие этих факторов. Минимальные размеры бластомеров были обнаружены в группе 35 °C. Размеры бластомеров уменьшались при увеличении числа клеток. При оценке морфологических характеристик эмбриона особое внимание уделяли анализу особенностей развития бластоцисты. Нами установлено, что температура инкубирования влияет на

общее число клеток, и, в частности, в ТЕ, и на отношение ВКМ к ТЕ. Общее число клеток было максимальным в контрольной группе, минимальным в группах 35 °С и 37 °С. Меньшее число клеток ТЕ было обнаружено в группе 35 °С, и отношение ВКМ к ТЕ было наибольшим. В некоторых исследованиях было показано, что размер ВКМ положительно коррелирует с успехом имплантации бластоцисты (Almagor et al., 2016; Richter et al., 2001; Shapiro et al., 2000).

Температура культивирования *in vitro* зигот значимо отражалась на уровне общего метилирования цитозина в ДНК (5-meC), как одного из индикаторов эпигенетических преобразований. В нашей работе было установлено, что на 5-meC эмбрионов влияли такие факторы, как температура инкубирования, число клеток, а также взаимодействие этих факторов. Средние значения уровня 5-meC на стадиях 2-х и 4-х клеток между группами статистически не различались, межэмбриональная флуктуация 5-meC группы 39 °С была сопоставима с контролем. На более поздних стадиях развития (более 4-х клеток) средний уровень 5-meC был значительно выше у эмбрионов групп 35 °С и 37 °С, по сравнению с группами 39 °С и контролем. Это согласуется с исследованием, в котором были продемонстрированы измененные показатели 5-meC у эмбрионов, культивированных *in vitro* от 2-х клеточной стадии до бластоцисты по сравнению с *in vivo* контролем (Market-Velker et al., 2010). В отличие от других работ, в которых изучали влияние температуры на развитие эмбрионов (Fawzy et al., 2018; Hong et al., 2014; Moriyama et al., 2022), наше исследование является первым, в котором были проведены переносы эмбрионов в репродуктивные пути самок-реципиентов. Нами было установлено, что температура инкубирования эмбрионов влияет на среднее число рожденных потомков в помете. Наибольшее число потомков в помете было зафиксировано в контрольной группе *in vivo*, наименьшее – в группе 39 °С. Показатели среднего числа потомков в помете в группах 35 °С и 37 °С не различались. Вероятно, эмбрионы группы 39 °С имели повышенный метаболизм, который, однако, не гарантирует успешное развитие и имплантацию. Согласно гипотезе “Тихий эмбрион”, напротив, замедленный метаболизм можно использовать как индикатор жизнеспособности эмбрионов (Leese, 2002). Автор данной гипотезы предположил, что доимплантационные эмбрионы могут оптимально развиваться при пониженной скорости метаболизма, которая возникает при более низкой температуре инкубирования (в нашем исследовании – 35 °С), а культивирование гамет и эмбрионов при более высокой, соответствующей температуре тела – 37 °С и выше, что может привести к потере “спокойствия” и повышению скорости метаболизма (Leese et al., 2008). Для изучения морфофункциональных характеристик потомков, было проведено их фенотипирование с помощью прибора PhenoMaster. Потомки экспериментальных групп (35 °С и 37 °С) имели меньшую продолжительность сна и, соответственно, характеризовались большей двигательной активностью, особенно в светлое время. Кроме того, они

потребляли больше воды и корма в светлое время. Различия в спонтанной активности, потреблении корма, воды и показателях энергетического обмена установлены в ночные часы, что является отражением уменьшения продолжительности сна у потомков, полученных после ЭКО. Известно, что процедуры ВРТ влияют на липидный обмен и метаболизм глюкозы (Duranton et al., 2018). Однако анализ пищевого поведения мышей, полученных путем ЭКО, встречается в единичных работах и ограничивается лишь оценкой суточного потребления корма без анализа циркадной динамики и без сопоставления с уровнем двигательной активности (Feuer et al., 2014). Важно отметить, что показатели потребления корма и воды у потомков группы 35 °С были более близки к контролю, чем у группы 37 °С. Показатели потребления кислорода и выделения углекислого газа были наиболее высокими у потомков группы 35 °С, а по дыхательному коэффициенту эта группа была также ближе к контролю, чем группа 37 °С.

Таким образом, моделирование естественного температурного градиента при культивировании *in vitro* положительно влияет на определенные параметры доимплантационного развития, однако эксперимент по эмбриональным переносам самкам-реципиентам показал, что в данной группе рождается меньшее число потомков. Второе экспериментально проверенное нами предположение о позитивном влиянии снижения интенсивности метаболизма – гипотеза “Тихого эмбриона” – продемонстрировало, что на доимплантационном этапе эмбрионы группы 35 °С по некоторым критериям отстают от других групп, однако в данной группе родилось больше потомков, чем в группе 39 °С, и их число не отличалось от группы 37 °С. При этом по ряду морфофункциональных характеристик потомки группы 35 °С были ближе к контролю (*in vivo*), чем группа 37 °С. Полученные результаты могут быть использованы при оптимизации протоколов и проведении процедуры ЭКО в центрах создания и сохранения генетических коллекций лабораторных животных, а также в сельском хозяйстве.

ВЫВОДЫ

1. Температурные условия инкубирования *in vitro* влияют на время слияния пронуклеусов и дробления эмбрионов до 8-и клеточной стадии, в частности, при 35 °С данные процессы замедляются.
2. Понижение температуры до 35 °С при инкубировании *in vitro* приводит к уменьшению размеров бластомеров на 2-х, 4-х и 8-и клеточных стадиях и повышает соотношение числа клеток ВКМ к ТЕ в бластоцисте.
3. Температура инкубирования *in vitro* влияет на уровень общего метилирования ДНК и его флуктуации, в частности, на более поздних стадиях доимплантационного развития средний уровень метилирования становится значительно выше у эмбрионов групп 35 °С и 37 °С.
4. Число родившихся потомков уменьшалось после инкубирования *in vitro* доимплантационных эмбрионов при 39 °С и последующего переноса самкам-

реципиентам, при этом у половозрелых особей, полученных после культивирования при 35 °С и 37 °С, зафиксированы более высокие показатели спонтанной активности и энергетического обмена по сравнению с таковыми у одновозрастных мышей, полученных при естественном оплодотворении, и более того, понижение температуры инкубирования до 35 °С приближало морфофункциональные характеристики потомков к контролю (*in vivo*).

5. В целом, полученные результаты показывают, что при имитации естественного температурного градиента показатели доимплантационного развития, включая уровень и вариабельность общего метилирования, приближаются к таковым, наблюдаемым при естественном оплодотворении. В свою очередь, имитация эффекта «Тихого эмбриона» повышает эффективность постимплантационного развития и способствует сближению фенотипических характеристик потомков из группы 35 °С к показателям контрольных потомков.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. Анисимова М.В., Гон Л., Концевая Г.В., Ромащенко А.В., Хоцкин Н.В., **Станова А.К.**, Герлинская Л.А., Мошкин М.П. Композиция тела как индикатор метаболических изменений у мышей, полученных путем оплодотворения *in vitro* // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2023. – Т. 27, №4. – С. 357. Q3.
2. Babochkina T. I., Gerlinskaya L. A., Anisimova M. V., Kontsevaya G. V., Feofanova N. A., **Stanova A. K.**, Moshkin M. P., Moshkin Y. M. Mother–Fetus Immune Cross-Talk Coordinates “Extrinsic”/“Intrinsic” Embryo Gene Expression Noise and Growth Stability // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23, № 20. – P. 12467. Q1.
3. Kontsevaya, G. V., Gerlinskaya, L. A., Moshkin, Y. M., Anisimova, M. V., **Stanova, A. K.**, Babochkina, T. I., & Moshkin, M. P. The Effects of Sperm and Seminal Fluid of Immunized Male Mice on In Vitro Fertilization and Surrogate Mother–Embryo Interaction // International Journal of Molecular Sciences – 2021. – Vol. 22, № 19. – P. 10650. Q1.

Тезисы

1. **Stanova A.K.** The impact of temperature conditions of incubation on mouse embryonic development during *in vitro* fertilization // Abstracts of Thirteenth International Multiconference Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022). –2022. –P. 684.
2. Babochkina T.I., Gerlinskaya L.A., Anisimova M.V., Kontsevaya G.V., Feofanova N.A., **Stanova A.K.**, Orbant M.O., Moshkin M.P., Moshkin Y.M. The gene expression fluctuation asymmetry as an indicator of development instability in different MHC compatibility models of mother-fetus interactions in mouse strains // Abstracts of Thirteenth International Multiconference

Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022). –2022. –Р. 668.

3. **Станова А.К.** Влияние температуры деления зиготы на синхронность развития и уровень общего метилирования эмбрионов при *in vitro* фертилизации мышей // Тезисы Девятой конференции специалистов по лабораторным животным Rus-LASA. –2021. – С. 11.