

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Федеральный исследовательский центр  
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии  
наук»  
(ИЦиГ СО РАН)**

*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

Диссертация

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д.б.н., профессор Мошкин Михаил Павлович

**Новосибирск 2023**

## Оглавление

Введение.....	4
1. Обзор литературы.....	17
1.1. Применение ВРТ в медицине и животноводстве .....	17
1.2. Беременность при ВРТ .....	21
1.3. Доимплантационное развитие эмбриона.....	23
1.3.1. Морфокинетические параметры развития .....	24
1.3.2. Синхронность и асинхронность дробления .....	25
1.3.3. Внутриклеточная масса и трофэктодерма.....	27
1.3.4. Энергетический метаболизм доимплантационного эмбриона.....	30
1.4. Онтогенез и фенотип потомков, полученных с использованием ВРТ.....	32
1.5. Эпигенетическое перепрограммирование .....	36
1.6. Условия культивирования эмбрионов .....	40
1.6.1. Состав культуральных сред .....	41
1.6.2. Содержание кислорода и углекислого газа .....	43
1.6.3. Водородный показатель (рН).....	44
1.6.4. Температура.....	48
2. Материалы и методы.....	53
2.1. Животные и условия содержания.....	53
2.2. Экспериментальные исследования.....	53
2.2.1. Подготовка самок-доноров ооцитов .....	53
2.2.2. Экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) .....	54
2.2.3. Вымывание эмбрионов из репродуктивных путей самок.....	54
2.2.4. Культивирование <i>in vitro</i> эмбрионов .....	55
2.2.5. Индукция псевдобеременности у самок-реципиенток эмбрионов .....	56
2.2.6. Перенос эмбрионов в воронку яйцевода .....	56
2.2.7. Взвешивание потомков.....	57
2.2.8. Мониторинг спонтанной активности, потребления воды, корма, кислорода, выделения углекислого газа и дыхательного коэффициента.....	57

2.3 Методы .....	57
2.3.1 Time-lapse микроскопия .....	57
2.3.2. Дифференциальное окрашивание внутриклеточной массы (ВКМ) и трофэктодермы (ТЕ) бластоцисты .....	59
2.3.3. Иммунофлуоресцентное окрашивание эмбрионов антителами к 5-метилцитозину (5-meC) .....	60
2.3.4. Статистический анализ.....	63
3. Результаты.....	65
3.1. Время первого эмбрионального дробления .....	65
3.2. Время достижения эмбрионами 4-х и 8-и клеточных стадий .....	66
3.3. Размеры бластомеров.....	69
3.4. Синхронность и асинхронность дробления .....	70
3.5. Число клеток внутриклеточной массы (ВКМ) и трофэктодермы (ТЕ) бластоцисты .....	72
3.6. Общее метилирование ДНК (5-meC) .....	74
3.7. Подсадки эмбрионов самкам-реципиентам.....	76
3.8. Масса потомков.....	77
3.9. Морфофункциональные характеристики потомков.....	79
4. Обсуждение.....	82
Заключение .....	98
Выводы .....	100
Список сокращений .....	101
Список литературы .....	102

## Введение

### Актуальность

Сегодня, спустя сорок пять лет после рождения первого ребенка с помощью экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), с его применением родилось более 8 миллионов человек [1]. Еще более масштабным является использование ЭКО при создании и сохранении генетических коллекций лабораторных животных, а также при тиражировании высокопродуктивных сельскохозяйственных животных.

Несмотря на относительно молодой возраст людей, рожденных при помощи ЭКО, клинические наблюдения показывают, что люди в данной когорте имеют более высокий, чем в контрольной группе, риск развития диабета, нарушений обмена веществ, артериальной гипертензии и нейропсихических расстройств [2]. Кроме того, использование вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) повышает риск развития таких генетических патологий, как синдром Беквита-Видемана, синдром Ангельмана и синдром Рассела-Сильвера [3]. Было установлено, что риск возникновения пороков развития у детей «из пробирки» почти на 60% больше, чем у зачатых естественным путем [4].

Причинами данных нарушений могут быть как непосредственное влияние самой процедуры ЭКО, так и индивидуальные особенности людей, которые обращаются к ВРТ для зачатия и рождения ребенка. В современном мире возраст, в котором женщины рожают детей, с каждым годом увеличивается, однако вместе с возрастом увеличиваются риски для здоровья матери и ребенка. Основными причинами возрастного бесплодия являются снижение овариального резерва и понижение компетентности ооцитов и эмбрионов в связи с повышенной частотой анеуплоидий и пониженной митохондриальной активностью [5]. Однако к процедуре ЭКО прибегают не только пары, в которых невозможность зачатия ребенка обусловлена возрастом одного или обоих партнеров, но и пациенты с различными заболеваниями, такими как репродуктивная дисфункция, избыточный вес, нарушения психоэмоционального статуса [6, 7]. Поэтому,

опираясь только на клинические наблюдения, трудно дифференцировать вклад в потенциальные нарушения здоровья самой процедуры ЭКО и генетико-физиологических особенностей родителей. Благодаря широкому использованию лабораторных животных стала возможной оценка собственного эффекта процедуры ЭКО на морфофункциональные характеристики потомков, не связанного с возрастом и особенностями здоровья доноров ооцитов и сперматозоидов. Так, лабораторией М. Мошкина было показано, что половозрелые потомки, полученные при помощи ЭКО, характеризуются большим по сравнению с контрольными особями относительным содержанием жира и меньшей тощей массой тела [8]. Из этого следует, что развитие доимплантационных эмбрионов *in vitro* и их перенос суррогатным матерям влияют на метаболический фенотип потомков. Кроме того, по данным лаборатории М. Мошкина, у мышей, полученных методом ЭКО, отмечается дестабилизация развития, которая выражается в увеличении флуктуирующей асимметрии паттернов экспрессии генов в билатеральных структурах [9]. Причиной данных особенностей может быть развитие эмбрионов вне материнского организма, ведь, как показывают экспериментальные исследования, доимплантационной стадии отводится критическая роль в эпигенетической модуляции онтогенеза. Именно на этой стадии происходит эпигенетическая трансформация зиготического генома. Процедура ЭКО, таким образом, нарушает стабильность пренатального развития, что проявляется в увеличении флуктуирующей асимметрии паттернов экспрессии генов в билатеральных структурах 16-ти дневных эмбрионов. Проявлением дестабилизации онтогенеза является генетический шум (*gene noise*), который во многом определяется эпигенетическими факторами, такими как метилирование ДНК и пост-трансляционными модификациями гистонов [10].

В поддержании здоровой беременности участвует множество процессов, включая созревание гамет, процесс оплодотворения, доимплантационное развитие, имплантацию бластоцисты в эндометрий матки. Несмотря на значительные успехи в развитии ВРТ и стремление специалистов создать

максимально схожие с естественными условия в лабораториях ЭКО, это до сих пор является трудновыполнимой задачей. Внутренняя среда разных отделов репродуктивного тракта женщины различается содержанием кислорода, температурой и рН [11]. Температура является одним из критических параметров, так как помимо общеизвестного влияния на химические реакции получены данные о температурном влиянии на нуклеосомы и активность ферментативного аппарата [12]. Клиники ЭКО и центры репродукции животных в стремлении максимально приблизить лабораторные условия к естественным используют для культивирования эмбрионов температуру 37 °С, что соответствует внутренней температуре тела человека и многих млекопитающих [13]. Однако, согласно относительно недавно полученным данным, в репродуктивном тракте зафиксирован температурный градиент. *In vivo* измерения у кроликов и свиней показали, что температура каудальной части истмуса (перешейка) на 1–2 °С ниже, чем в краниальной части ампулы [14]. Температура преовуляторных фолликулов (Граафовых пузырьков) кролика на 1–2 °С, свиней на 1.3–1.7 °С ниже, чем температура стромы яичника [15–17]. У человека температура зрелых фолликулов на ~2.3 °С ниже, чем строма яичника [16]. Более того, базальная температура тела женщин тесно связана с менструальным циклом и временем овуляции из-за термогенных свойств прогестерона [18, 19]. Известно, что во время лютеиновой фазы менструального цикла базальная температура тела женщин повышается на 0.31–0.46 °С [20, 21]. Таким образом, при естественном оплодотворении развитие эмбриона происходит в температурном градиенте – от более высокой при образовании зиготы к более низкой при последующем доимплантационном развитии. Несколько исследований подтверждают, что имитация естественного температурного градиента (от более высокой к более низкой температуре) при инкубировании оказывает положительное влияние на процедуру созревания ооцитов *in vitro* и развитие эмбрионов до стадии бластоцисты [22, 23].

Есть и противоположная точка зрения о том, что при использовании более низких температур начального инкубирования метаболизм эмбрионов замедляется, что согласно гипотезе Н. Leese «Тихий эмбрион», способствует

большей жизнеспособности эмбрионов [24]. Установлено, что у эмбрионов человека на 2-ой и 3-ий дни культивирования в среде с 18-ю аминокислотами метаболизм ниже у тех эмбрионов, которые достигали стадии бластоцисты, по сравнению с теми, чье развитие останавливалось [25]. В другом исследовании бычьи эмбрионы с низким аминокислотным метаболизмом имели более высокую вероятность развития до стадии бластоцисты, чем эмбрионы с высоким метаболизмом [26]. Кроме того, потребление пирувата эмбрионами человека на 2-й и 3-й день культивирования было значительно ниже у тех эмбрионов, чей перенос в организм матери привел к беременности, по сравнению с эмбрионами, которые не смогли имплантироваться [27]. Гипотеза «Тихого эмбриона» была использована для объяснения того, как эндометрий «отбирает» эмбрионы высокого качества для имплантации, отбраковывая те, которые излучают «шумный» метаболический сигнал, характерный для высокого оборота питательных веществ, и отдает предпочтение «тихим» [28, 29].

Как известно, первые 24 часа после оплодотворения в доимплантационном развитии являются наиболее критическими для последующего онтогенеза. В этот период у эмбрионов мыши происходит процесс репрограммирования генома, а именно «переход от материнского генома к зиготическому», в результате которого происходит активация зиготического генома (АЗГ), и начинается экспрессия собственных генов [30].

Исходя из этих данных, 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 [14–17]. По некоторым данным, имитация естественных

изменений температуры инкубирования положительно влияет на доимплантационное развитие эмбриона [22,23].

- Существует и обратная точка зрения, свидетельствующая о том, что снижение энергетического обмена на доимплантационной стадии положительно влияет на эмбриональный онтогенез (гипотеза Н. Leese «Тихий эмбрион») [24]. Некоторые исследования подтверждают положительное влияние снижения скорости метаболизма на развитие эмбрионов и успех беременности [25–27].

Таким образом, исходя из этих взаимно противоположных предположений, мы исследовали влияние температур 39 °С, 37 °С и 35 °С в первые 24 часа после оплодотворения на процессы развития эмбрионов. Само оплодотворение проводили при 37 °С, так как есть данные о влиянии этой температуры на целостность веретена деления [31, 32]. Затем следовало 24-х часовое инкубирование при определенной температуре: 35 °С, 37 °С или 39 °С в период прохождения эмбрионами первого дробления. После этого 2-х клеточные эмбрионы переносили в 37 °С и инкубировали до стадии морулы или бластоцисты. С помощью метода time-lapse микроскопии были получены данные о времени слияния пронуклеусов, времени клеточных дроблений эмбрионов, размерах бластомеров, синхронности дроблений и числа клеток внутриклеточной массы (ВКМ) и трофэктодермы (ТЕ). Для оценки влияния температуры на эпигенетический профиль эмбриона был проанализирован общий уровень метилирования ДНК. Влияние температуры при прохождении первого дробления на репродуктивный успех (имплантацию и роды) было оценено подсадками 2-х клеточных эмбрионов разных групп (35 °С, 37 °С и 39 °С) самкам-реципиентам.

Таким образом, благодаря многочисленным исследованиям было установлено, что процедура ЭКО нарушает стабильность пренатального развития. Однако до сих пор неизвестно, какой именно фактор имеет наибольшее влияние на дестабилизацию развития, а также неизвестен диапазон фенотипических эффектов потомков. В связи с этим возникает вопрос об оптимизации пренатального онтогенеза путем направленных изменений условий



инкубационной среды. Одним из таких параметров является температура инкубирования.

Исходя из этого, мы сформулировали цель нашего исследования.

### **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**

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. При выборе температур инкубирования были смоделированы два экспериментальных подхода. Первый подход подразумевал имитацию естественного температурного градиента в репродуктивном тракте (инкубирование при 39 °С в течение первого

эмбрионального дробления и последующее снижение температуры до 37 °С по мере продвижения эмбриона по родовым путям). Вторым подходом предполагалось снижение скорости эмбрионального метаболизма и моделирование гипотезы «Тихого эмбриона» (инкубирование при 35 °С в течение 24 часов после оплодотворения). В качестве контроля использовали общепринятую температуру проведения ЭКО – 37 °С, а также естественное оплодотворение (*in vivo*). При этом впервые установлено:

1. Температура инкубирования в первые 24 часа влияет на скорость слияния пронуклеусов и скорость достижения эмбрионами стадий 2-х, 4-х и 8-и клеток.
2. Температура культивирования *in vitro*, число клеток и взаимодействие данных факторов влияют на размеры бластомеров.
3. Синхронное или асинхронное дробление влияет на скорость, с которой эмбрионы достигают 4-х и 8-и клеточных стадий, а также влияет на размеры бластомеров на 2-х клеточной стадии.
4. Температура инкубирования в первые 24 часа влияет на число клеток трофэктодермы и общее число клеток бластоцисты, а также на отношение внутриклеточной массы и трофэктодермы.
5. На средний уровень и дисперсию общего метилирования ДНК в ядрах эмбрионов влияют такие факторы, как температура инкубирования, число клеток, а также взаимодействие этих факторов.
6. Температура инкубирования в первые 24 часа после оплодотворения влияет на число рожденных потомков.
7. Температура инкубирования не влияет на массу потомков, полученных при переносах эмбрионов на 2-х клеточной стадии.
8. Температура инкубирования эмбрионов влияет на такие морфофункциональные характеристики потомков, как двигательная активность, продолжительность сна, потребление воды и корма, а также потребление кислорода, выделение углекислого газа и дыхательный коэффициент.

## Теоретическая и практическая значимость

Результаты, полученные при изучении эффектов температуры инкубирования *in vitro* эмбрионов на доимплантационное развитие и фенотип потомков, расширяют представления о дестабилизации развития при процедуре ЭКО. Полученные результаты демонстрируют диапазон эффектов влияния температуры инкубирования в первые 24 часа после оплодотворения 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.

## Методология и методы исследования

Для проведения исследований были использованы следующие методы:

**Экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО).** У самцов извлекали каудальную часть эпидидимиса и помещали в каплю среды НТФ (Human Tubal Fluid), покрытую минеральным маслом (Merck, Германия). Далее инкубировали в течение 1 часа в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Thermo Fisher Scientific, США) при температуре 37 °С и выделяли сперматозоиды. У самок после суперовуляции (через 16–17 часов после инъекции ХГЧ) извлекали яйцеводы и вымывали ооциты. Вымытые ооциты помещали в каплю среды НТФ, покрытую минеральным маслом, и помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор (37 °С). Затем переносили сперматозоиды в каплю с ооцитами и помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор (37 °С) на 6 часов для оплодотворения. После этого путем переноса через 4–5 капель среды НТФ отмывали оплодотворенные ооциты и переносили их в каплю среды KSOM AA, покрытую минеральным маслом, и помещали в CO<sub>2</sub> инкубатор при определенной температуре.

**Культивирование *in vitro* эмбрионов.** После оплодотворения зиготы переносили в инкубатор с определенной температурой (35 °С, 37 °С, 39 °С) на 24 часа (первое дробление эмбрионов). Через 24 часа отбирали 2-х клеточные эмбрионы,

переносили в чистую каплю среды KSOM AA и помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор с температурой 37 °C на 48 часов.

**Time-lapse микроскопия.** Мониторинг динамики развития эмбрионов проводился с использованием автоматического микроскопа Lionheart FX (Biotek, США). С помощью данного аппарата были проанализированы время слияния пронуклеусов, клеточных дроблений, размеры бластомеров и синхронность дроблений. Для определения времени первого эмбрионального дробления (слияния пронуклеусов в зиготе и дробления на 2 клетки) временной интервал снимков эмбрионов составлял 30 минут. Для последующего инкубирования до стадии 8-и клеток временной интервал снимков составлял 2 часа.

**Дифференциальное окрашивание внутриклеточной массы (ВКМ) и трофэктодермы (ТЕ) бластоцисты.** Для дифференциального окрашивания бластоцист использовали методику N. Selokar et al., [33], адаптированную для исследования мышинных эмбрионов. Ядра ВКМ, меченные Hoechst 33258, окрашивались в синий цвет, а ядра ТЕ, меченные PI и Hoechst 33258, окрашивались в розово-красный. Количество ядер ВКМ и ТЕ подсчитывали на снимках, для получения которых использовали автоматический микроскоп Lionheart FX (Biotek, США).

**Иммунофлуоресцентное окрашивание эмбрионов антителами к 5-метилцитозину (5-meC).** Для определения уровня общего метилирования ДНК использовали метод иммунофлуоресцентной визуализации связывания антител с высокой специфичностью к 5-метилцитозину (5-meC), описанный Beaujean et al. [34], и адаптированный для исследования мышинных эмбрионов на разных стадиях дробления. Эмбрионы окрашивали моноклональными антителами к 5-meC (Anti-5-methylcytosine antibody [33D3], Abcam, Великобритания). Для получения снимков использовали автоматический микроскоп Lionheart FX (Biotek, США).

**Индукция псевдобеременности у самок-реципиентов эмбрионов.** За 2.5 часа до выключения света (17:00 по времени г. Новосибирск) в клетку с изолированно содержащимся вазэктомированным самцом подсаживали двух самок. Утром

следующего дня самок проверяли на наличие вагинальных пробок. Самок с вагинальными пробками отсаживали в отдельные клетки.

**Перенос эмбрионов в воронку яйцевода.** Псевдобеременных самок-реципиентов наркотизировали при помощи ингаляции изофлураном (Baxter, США) через 12 часов после подсадки их к вазэктомированному самцу. Затем переносили им в воронку яйцевода по 12–16 эмбрионов на стадии 2-х клеток. После этого самок отсаживали в индивидуальные клетки и содержали одиночно на протяжении всего периода беременности и выкармливания потомков.

**Взвешивание потомков.** Для измерения массы тела потомков (самцов) было проведено взвешивание. Взвешивание выполняли в возрасте 3-х недель (при отъеме от матерей), 8-и, 18-и и 24-х недель.

**Мониторинг спонтанной активности, потребления воды, корма, кислорода, выделения углекислого газа и дыхательного коэффициента.** Потомков (самцов) тестировали в приборе PhenoMaster (TSE Systems, Германия) в течение 5-и дней. В приборе каждые 30 минут проводился учет следующих параметров: потребление воды, потребление корма, пройденное расстояние, продолжительность сна, потребление кислорода ( $O_2$ ) и выделение углекислого газа ( $CO_2$ ). Значения были скорректированы по массе тела животного.

**Статистический анализ.** 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 ( $\chi^2$ ), *t*-тест Стьюдента с поправкой Бонферрони. Для анализа данных использовали программу Statistica 10.

### **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.

### **Степень достоверности результатов**

Экспериментальные данные получены с использованием современных методов исследования (time-lapse микроскопия, иммунофлуоресцентное и дифференциальное окрашивание, автоматизированный мониторинг спонтанного поведения животных и др.), которые соответствуют поставленным цели и задачам. Эксперименты выполнены на экспериментальных животных SPF статуса. Выборки животных формировались в соответствии с принципами гуманности и в объеме, строго необходимом для проведения полноценного анализа полученных данных. Для статистической обработки полученных результатов использованы адекватные методы статистического анализа.

### **Личный вклад автора в исследование**

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. Ромащенко.

### **Апробация результатов**

Материалы, положенные в основу диссертации, 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, опубликованных в российских и зарубежных журналах, входящих в международные базы цитирования (WoS, Scopus), а также в трёх тезисах международных и российских научных конференций:

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.

## Конференции

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. – P. 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.

### **Объём и структура диссертации**

Диссертация включает введение, обзор литературы, разделы, описывающие 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.

### **Благодарности**

Автор выражает особую благодарность научному руководителю д.б.н. Мошкину Михаилу Павловичу, д.б.н. Герлинской Людмиле Алексеевне, коллективу отдела генетических ресурсов лабораторных животных, а также «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.



## 1. Обзор литературы

### 1.1. Применение ВРТ в медицине и животноводстве

Широкое применение ВРТ началось после того, как в 1978 г. в Англии родился первый ребёнок «из пробирки» – Louise Brown, которой сегодня уже более сорока лет. Это произошло благодаря врачу-исследователю R. Edwards, который произвел экстракорпоральное оплодотворение одного ооцита, извлеченного из тела матери методом лапароскопии. После этого эмбрион культивировали *in vitro*, а затем на стадии восьми клеток переносили в матку матери [35]. В результате родилась здоровая девочка, а R. Edwards в 2010 г. был удостоен Нобелевской премии по физиологии и медицине.

Метод ЭКО дал развитие множеству других методов, таких как перенос гаметы в Фаллопиеву трубу и интрацитоплазматическая инъекция спермы (ИКСИ), криоконсервация ооцитов, сперматозоидов и эмбрионов, и других, которые в настоящее время объединены собирательным термином «вспомогательные репродуктивные технологии». ВРТ широко применяют не только в медицине, но и в сельскохозяйственной отрасли, так как возможность оптимизировать и «управлять» размножением животных имеет коммерческую ценность. Примерами выгодного использования ВРТ служат поддержание самок в состоянии постоянной лактации, разведение потомства для отбора по желаемому признаку и сохранение видов, находящихся под угрозой исчезновения. Кроме того, ВРТ используют для создания и поддержания коллекций генетических линий лабораторных животных.

Несмотря на успешное применение методов ВРТ сегодня, этому предшествовали долгие годы исследований. Возможность культивирования ооцитов была обнаружена в конце XIX века. В 1887 г. W. Roux извлек эмбрион лягушки на стадии двух клеток и раскаленной иглой уничтожил один из бластомеров. В результате из второго бластомера развился нормальный зародыш лягушки. Это открытие получило подтверждение в 1892 г., когда H. Driesch

провел опыты на зародышах морских ежей, отделив бластомеры друг от друга. Driesch установил, что из каждого отдельного бластомера может развиваться полноценный эмбрион. Данный феномен Driesch назвал «эмбриональной регуляцией» [36]. В 1924 г. Н. Spemann и Н. Mangold экспериментально подтвердили гипотезу о механизме дифференцировки, получившем название «эмбриональной индукции». В 1935 г. получили за это открытие Нобелевскую премию [37]. W. Неаре стал первым, кто в 1891 г. перенес эмбрионы от самки-донора кролика породы Ангора самке-реципиенту Бельгийской линии и добился рождения здоровых крольчат [38]. Этот революционный эксперимент стал началом новой эры эмбриологии – эры искусственного оплодотворения. Однако долгое время никому не удавалось вырастить эмбрионы вне материнского организма. Одной из главных проблем являлось отсутствие оптимальной культуральной среды. Первая среда для культивирования тканей была разработана S. Ringer в 1882 г. [39]. Она представляла собой простой солевой раствор, основанный на сыворотке крови. В этой питательной среде удалось поддержать биение сердца лягушки *in vitro*. С момента создания данного раствора, пригодного для культивации, прошло много лет. В настоящее время питательные среды имеют очень сложный состав и могут содержать до 80 компонентов. Началась эра успешных попыток культивирования доимплантационных эмбрионов. Одним из первых был А. Brachet, который в 1913 г. смог довести развитие кроличьих эмбрионов до стадии бластоцисты и исследовать процесс расширения их внутренней полости [40]. В 1929 г. W.H. Lewis и P.W. Gregory изучили процесс культивирования кроличьих эмбрионов в плазме крови [41]. W. Kuhl и коллеги в 1941 г. первыми произвели культивирование мышинных эмбрионов в кровяном сгустке [42]. В 1947 г. M. Chang сумел успешно прокультивировать и заморозить кроличьи эмбрионы, после чего произвел эмбриональный перенос суррогатным матерям и получил живорожденных крольчат [43]. Позже, в 1959 г., Chang произвел оплодотворение ооцитов кролика *in vitro*, используя аутологичную сыворотку в качестве культуральной среды. В результате 42% эмбрионов продолжили свое развитие,

что в последствии привело к рождению здоровых особей [44]. Со временем методики культивирования доимплантационных эмбрионов модифицировали и улучшали. В 1949 г. J. Hammond сумел довести развитие 4- и 8-клеточных эмбрионов, полученных из организма донора, до стадии бластоцисты в растворе Кребса-Рингера, основанном на бикарбонате, с добавлением белка [45]. Исследования продолжил W. Whitten, который в 1956 г. культивировал 8-клеточные эмбрионы до стадии бластоцисты в среде, содержащей девять компонентов, включая глюкозу, воду и яичный белок [46]. Рождение здоровых потомков мышей после культивирования *in vitro* эмбрионов было достигнуто благодаря использованию обновленной формулы культуральной среды Кребса-Рингера, которая содержала бикарбонат, глюкозу и бычий сывороточный альбумин. Успешное *in vitro* культивирование эмбрионов мыши со стадии зиготы было достигнуто J. Biggers в 1962 г. [47]. Благодаря данным исследованиям учёные далеко продвинулись в понимании механизмов доимплантационного развития, однако такие важные элементы процесса культивирования *in vitro*, как питательная среда и техника искусственного оплодотворения, требовали более глубокого изучения и модификации.

Перед исследователями встал вопрос о том, каким образом действуют различные компоненты питательных сред. Одним из первых целенаправленно изучать эффекты отдельных компонентов среды и их взаимодействия начал R. Brinster. Он добавил в основной состав солей антибиотики и бычий сывороточный альбумин, а также молочную кислоту, нейтрализованную гидроксидом натрия и ионизированной водой. Серия экспериментов Brinster et al. привела к оптимизации таких основных параметров культуральной среды, как pH, осмоляльность, содержание энергетических субстратов и аминокислот [48]. Оптимизированная питательная среда (BMOС-2) была разработана для 2-клеточных эмбрионов мышей и заложила основу для последующих культуральных растворов. В 1968 г. W. Whitten и J. Biggers объединили свои усилия: первые клеточные дробления (от зиготы до 2-х клеточной стадии) эмбрионов произошли *in vitro*, после чего потребовалась сокультивирование с

клетками яйцеводов, чтобы 2-х клеточные эмбрионы достигли стадии бластоцисты [49]. Накопленный опыт позволил перейти к более сложным манипуляциям при культивировании. R. Brinster и J. Biggers смогли оплодотворить ооциты мышей и культивировать их внутри ампулы яйцеводов, которые были извлечены из самок, получивших гормональные препараты, которые увеличивают число ооцитов при овуляции (суперовуляция) [50].

Модификация культуральных сред, отработка таких процедур, как суперовуляция и перенос доимплантационных эмбрионов суррогатным матерям, сделали искусственное оплодотворение естественным шагом в науке. В 1968 г. оплодотворение *in vitro* и последующее культивирование эмбрионов мышей в чашке Петри было проведено D. Whittingham, который использовал модифицированный бикарбонатный раствор Кребса-Рингера, содержащий лактат и пируват натрия, глюкозу, бычью сыворотку, а также антибиотики: стрептомицин и пенициллин [51]. Вскоре после этого, на основе среды ВМОС-2, Whittingham разработал питательную среду М-16, которая широко используется в современных эмбриологических лабораториях. Проведенные исследования показали, что эмбрионы иногда прекращают свое развитие на 2-х клеточной стадии. Это явление было названо 2-х клеточным блоком, который был одной из основных проблем при культивировании эмбрионов *in vitro*. В 1977 г. J. Abramczuk представил новый компонент культуральных сред – этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), которая помогала эмбрионам преодолеть 2-х клеточный блок [52]. В настоящее время ЭДТА применяется в создании многих культуральных сред.

Важным шагом в истории развития ВРТ стало изобретение способа хранения эмбрионов на ранних стадиях в жидком азоте – криоконсервация. Первые успешные беременности после пересадок криоконсервированных эмбрионов произошли в 1984 г. [53]. Следующим шагом в развитии ВРТ стала процедура оплодотворения ооцита одним сперматозоидом, который вводится в него с помощью микроинъектора – ИКСИ. Она используется для лечения мужского

бесплодия, а также когда ооцит плохо проницаем для сперматозоидов. Первыми ИКСИ провели в 1992 г. эмбриологи Р. Devroey и А. Steirteghem [54].

Таким образом, данные, накопленные за многолетнее изучение развития доимплантационных эмбрионов, привели человечество к широкому применению ВРТ. Сегодня наши знания о женской физиологии, эмбриональном развитии и условиях культивирования *in vitro* доимплантационных эмбрионов позволяют производить различные эмбриональные манипуляции, получать потомство «из пробирки» и достигать новых успехов. На сегодняшний день при помощи ВРТ родилось более 8 миллионов людей [1]. Еще шире ВРТ применяются для тиражирования высокопродуктивных сельскохозяйственных животных и сохранения коллекций генетических линий лабораторных животных.

## 1.2. Беременность при ВРТ

Беременность – это физиологический процесс, при котором в матке женского организма развивается один или несколько эмбрионов. В поддержании здоровой беременности участвует множество процессов, включая созревание гамет, процесс оплодотворения, доимплантационное развитие, имплантацию бластоцисты в эндометрий матки и другие. Процесс беременности естественен, однако с каждым годом увеличивается число людей репродуктивного возраста, столкнувшихся с неспособностью самостоятельно зачать ребенка. Наиболее часто употребляемое определение бесплодия – это отсутствие наступления беременности после 12 месяцев половых актов без предохранения. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), проблема бесплодия касается до 186-и миллионов человек в мире [55, 56]. С каждым годом эта цифра увеличивается, так как помимо факторов, связанных с патологиями, на распространение проблемы бесплодия влияют, в частности, ухудшение условий окружающей среды и снижение репродуктивной функции с возрастом.

Для преодоления проблемы бесплодия всё больше людей обращается за помощью к ВРТ. Процесс беременности с использованием ВРТ включает в себя

несколько методик, используемых по отдельности или в комплексе, в зависимости от конкретного случая. При проблемах репродуктивного здоровья женщин применяют стимуляцию яичников гормональными препаратами (суперовуляцию) для индукции овуляции (для пациенток, у которых не происходит овуляция), для более предсказуемой и частой овуляции (у пациенток с нерегулярным циклом), а также для получения большего числа ооцитов. При низком числе сперматозоидов, их низкой подвижности или при рубцевании шейки матки используют искусственную инсеминацию.

ЭКО включает в себя несколько процессов. Сначала проходит процедура суперовуляции, затем ооциты либо культивируют до полного созревания, либо соединяют со сперматозоидами. Если сперматозоиды не способны проникнуть в ооцит, то применяют процедуру ИКСИ. После оплодотворения эмбрионы культивируют в лабораторных условиях, оценивают их морфокинетические характеристики, а затем переносят в матку матери, где эмбрионы имплантируются в эндометрий. Зачастую, перед переносом эмбрионов проводят преимплантационную генетическую диагностику, которая включает в себя тестирование на анеуплоидии, моногенные дефекты и хромосомные структурные перестройки. С увеличением возраста, в котором люди решаются на первую беременность, набирает популярность метод замораживания ооцитов, сперматозоидов и эмбрионов на различных стадиях – криоконсервация. Первое успешное зачатие при переносе криоконсервированных эмбрионов произошло в 1984 г. [53]. Криоконсервация позволяет хранить донорский материал и эмбрионов в жидком азоте на протяжении долгого времени. Есть данные о рождении ребенка после переноса эмбрионов, которые были криоконсервированы и хранились в течение 10 лет [57].

Хотя использование ВРТ признано безопасным, нельзя игнорировать риски как для матери, так и для потомства, связанные с этими процедурами. Доказано, что применение ВРТ увеличивает риск многоплодной беременности, что, в свою очередь, несет такие риски, как материнская, зародышевая и неонатальная смертность [58, 59]. Кроме того, было обнаружено негативное влияние процедуры

суперовуляции: повышенный уровень эстрогена во время переноса эмбрионов увеличивает риск рождения детей с низким весом, а также риск развития преэклампсии [60]. Для минимизации подобных эффектов суперовуляции рекомендовано замораживать эмбрионы, и переносить их в более поздний цикл, когда гормональный уровень будет ближе к уровню естественного цикла. Таким образом, несмотря на значительные успехи в развитии ВРТ, эти технологии могут негативно воздействовать на процессы беременности, тем самым нарушая доимплантационное развитие эмбриона, а также влияя на дальнейший онтогенез и фенотип потомков.

### 1.3. Доимплантационное развитие эмбриона

Период доимплантационного развития считается наиболее критическим, потому что именно в это время происходят такие важнейшие молекулярные события, как активация зиготического генома (АЗГ) и первая спецификация клеточных линий. После оплодотворения, в результате трех стадий дробления появляется 8-и клеточный эмбрион. После этой стадии происходит поляризация и компактизация, образуются два различных типа клеток: трофэктодерма (ТЕ), которая впоследствии формирует плаценту, и клетки внутренней клеточной массы (ВКМ). По достижении стадии бластоцисты ВКМ дифференцируется в эпибласт, который производит все клетки плода, и примитивную эндодерму, которая способствует образованию внезародышевого желточного мешка.

Хотя развитие всех эмбрионов проходит через одни и те же процессы, между эмбрионами есть различия в частоте и сроках событий. Кроме того, многие молекулярные и клеточные события не полностью синхронизированы как между бластомерами внутри эмбриона, так и между соседними эмбрионами. Благодаря развитию *time-lapse* микроскопии, стала возможной прижизненная оценка морфологии, скорости и синхронности дробления эмбрионов.

### 1.3.1. Морфокинетические параметры развития

Морфологическая оценка эмбрионов, полученных в результате ЭКО, используется с момента создания самой процедуры и по настоящее время. Эмбрионы классифицируются и выбираются для переноса в организм матери в соответствии с их морфологическими параметрами. Одной из наиболее широко применяемых классификаций является система D. Gardner [61]. Однако метод оценки только морфологических критериев имеет ограничения для прогнозирования имплантации и живорождения [62, 63]. Было показано, что отбор и перенос эмбрионов по классификации D. Gardner приводит лишь к 20-30% беременностям [64]. Поэтому в настоящее время применяют сразу несколько стратегий оценки эмбрионов. Неинвазивные стратегии включают оценку морфологии, *time-lapse* микроскопию, метаболомные и протеомные профили эмбрионов, а к инвазивным методам относят биопсию эмбриона для генетического и/или хромосомного тестирования.

Стандартная оценка морфокинетических параметров включает анализ числа клеток, скорости дробления, степени фрагментации, наличия многоядерности, размеров и симметрии бластомеров, толщину *zona pellucida*. На стадии бластоцисты оценивается расширение бластоцели, а также число, форма и компактизация клеток в пределах ТЕ и ВКМ [65]. Установлено, что эмбрионы, поделившиеся до стадии 2-х клеток менее чем через 25 часов после ЭКО, чаще приводят к клинической беременности по сравнению с теми, которые не завершили первое дробление к этому времени [66]. В другом исследовании с использованием *time-lapse* микроскопии авторы предложили в качестве предиктора формирования бластоцисты следующие временные интервалы: продолжительность первого цитокинеза ( $14.3 \pm 6$  ч), время между первым и вторым митозом – от 2-х до 3-х клеточной стадии – ( $11.1 \pm 2.2$  ч), время между вторым и третьим митозом – от 3- до 4-клеточной стадии ( $1 \pm 1.6$  ч) [67]. В исследовании J. Aguilar et al. у 42.53% эмбрионов на 2-х клеточной стадии была обнаружена многоядерность бластомеров [68]. Авторы установили, что она



являлась обратимой и не повлияла на частоту имплантации, в то время как многоядерность эмбрионов на стадии 4-х клеток ассоциировалась с ухудшением способности к имплантации [68]. Еще одним важным параметром при оценке морфологии эмбриона является наличие фрагментации. Чем выше ее степень, тем ниже оценка эмбриона. Однако есть данные о том, что незначительная фрагментация (менее 20%) в некоторых случаях может быть обратимой и не имеет влияния на развитие эмбриона. Т. Hardarson et al. было показано, что фрагменты могут реабсорбироваться в новые, только поделившиеся бластомеры [69]. Эти же авторы продемонстрировали, что размеры бластомеров играют важную роль в системе оценки эмбрионов. У 2-х и 4-х клеточных эмбрионов бластомеры должны быть одинакового размера, в то время как у 3-х или 5-и клеточных вполне можно ожидать наличие одной или двух клеток большего или меньшего размера. Исследователи показали, что неравномерное дробление (расщепление клетки на две клетки разного размера) бластомеров негативно влияет как на частоту наступления беременности, так и на частоту имплантации при ЭКО у человека, что можно объяснить более высокой степенью анеуплоидии или многоядерности эмбрионов, возникающей вследствие неравномерного распределения цитоплазматических молекул, например, белков и мРНК [69].

### **1.3.2. Синхронность и асинхронность дробления**

С развитием ВРТ стало известно, что эмбрионы могут делиться как синхронно, так и асинхронно. При синхронном дроблении происходит переход от 2-х клеток сразу к 4-м бластомерам, а при асинхронном дроблении – от 2-х клеток к 3-м бластомерам, и только затем к 4-м (рисунок 1).



Рисунок 1– Синхронное и асинхронное дробление эмбрионов. Снимки получены с использованием автоматического микроскопа Lionheart FX (10x)

При оценке эмбрионов для переноса в организм чаще всего выбирают синхронно поделившиеся эмбрионы, так как есть данные о том, что перенос асинхронно поделившихся эмбрионов дает меньше случаев клинической беременности [69]. Кроме того, в исследовании Z. Wiener-Megnazi et al. синхронно поделившиеся криоконсервированные эмбрионы после размораживания имели более высокие показатели жизнеспособности и более высокую оценку при классификации эмбрионов [70]. Однако при этом авторы не нашли различий в случаях клинической беременности при переносе синхронно и асинхронно поделившихся эмбрионов [70]. M. Kraeussling et al. в своей работе на эмбрионах медаки показал, что чаще всего наблюдается асинхронное дробление, что отражается на размерах бластомеров и объемах цитоплазмы, но не несет негативного влияния на развитие [71]. Работы C. Roux et al. продемонстрировали, что асинхронное дробление в раннем эмбриональном развитии является нормальным и не влияет на показатели имплантации [72, 73]. D. Mashiko et al. в своем исследовании предположили, что синхронность дробления может определяться стохастической вариацией экспрессии генов, особенно тех, которые связаны с клеточным циклом [74].

### 1.3.3. Внутриклеточная масса и трофэктодерма

Первой спецификацией клеточных линий в развитии эмбриона мыши и человека является формирование ТЕ и ВКМ бластоцисты. ТЕ участвует в имплантации, непосредственно взаимодействуя с маткой матери, и дает начало тканям плаценты. Кроме того, в базолатеральных поверхностях ТЕ расположен натрий-калиевый насос ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  АТФ-аза), который играет важную роль в метаболизме эмбриона. Эмбриональное развитие млекопитающих в значительной степени зависит от питательных веществ, получаемых от матери через плаценту. После имплантации эмбриона из ВКМ формируются три зародышевых слоя, из которых в конечном итоге образуются все ткани организма. Возникновение ТЕ и ВКМ начинается после компактизации на стадии 8-и клеток, до этого времени все бластомеры являются тотипотентными. Возникает апикально-базальная полярность, которая проявляется в виде поляризованного распределения различных мембранных и цитоплазматических компонентов вдоль оси от поверхности (апикальная ось) к центру (базальная ось) эмбриона [75]. В результате четвертого дробления образуется 16 бластомеров, некоторые из которых располагаются на поверхности эмбриона, тогда как другие полностью окружены соседними бластомерами. В результате пятого дробления образуется еще больше внешних и внутренних клеток, и эмбрион на стадии 32-х клеток в среднем содержит 12-13 внутренних и 19-20 внешних бластомеров [76]. После этого между бластомерами начинают формироваться одна или несколько небольших полостей. Эти начальные межклеточные полости, очевидно, происходят из внутриклеточных везикул, или вакуолей, которые секретируются из внешних бластомеров путем экзоцитоза [77]. Затем эти полости постепенно расширяются и сливаются друг с другом, образуя единую большую полость - бластоцель. В этот момент эмбрион находится на стадии бластоцисты, в которой внешние клетки – ТЕ – принимают эпителиальную морфологию, чтобы окружить весь эмбрион, в то время как внутренние клетки – ВКМ – объединяются в единую массу, которая прикрепляется к базальной поверхности ТЕ. Бластоциста имеет

четкую морфологическую ось: сторона, где расположена ВКМ, называется эмбриональным (Em) полюсом, а противоположная сторона, где находится полость, называется абэмбриональным (Ab) полюсом. Благодаря такой поляризации ТЕ и ВКМ диверсифицируются в ходе последующего развития. Область ТЕ, контактирующая с ВКМ, дает начало экстраэмбриональной эктодерме в ответ на паракринный сигнал, а именно *Fgf4*, который вырабатывается ВКМ [78]. Популяция клеток ВКМ дает начало примитивной эндодерме на поверхности, обращенной к полости бластоцисты. Хотя воздействие поверхности может вызвать дифференцировку ВКМ в примитивную эндодерму, последние исследования показывают, что клетки-предшественники примитивной эндодермы располагаются в ВКМ мозаично, а позже мигрируют к поверхности [79, 80]. Таким образом, эмбрионально-абэмбриональная (Em-Ab) ось тесно связана с организацией более поздних стадий эмбриона.

Транскрипционные факторы являются важнейшими регуляторами во время эмбрионального развития. Было выявлено несколько транскрипционных факторов, которые необходимы для правильного формирования ТЕ и ВКМ в бластоцисте мыши. *Oct4* (*Pou5f1*) является POU-доменным транскрипционным фактором и экспрессируется в ВКМ [81–83]. Эмбрионы с нокаутированным *Oct4* могут развиваться в бластоцисты, которые выглядят морфологически нормальными, т.е. имеют ТЕ, окружающую бластоцель, и внутренний клеточный агрегат, напоминающий ВКМ. Однако внутренние клеточные агрегаты такой бластоцисты экспрессируют специфические для ТЕ промежуточные филаменты [78]. Кроме того, инактивация *Oct4* в эмбриональных стволовых клетках (ЭСК), которые являются клеточными линиями, полученными из ВКМ, приводит к их дифференцировке в клетки ТЕ [84]. Таким образом, *Oct4* необходим для регуляции плюрипотентности ЭСК. Другой гомеодоменный транскрипционный фактор *Nanog* также необходим для поддержания плюрипотентности в ВКМ и эмбриональных стволовых клетках (ЭСК), хотя, в отличие от *Oct4*, он ограничивает ЭСК от формирования линии примитивной эндодермы [85–88].

*Cdx2* является гомеодоменным транскрипционным фактором каудально-связанного типа и специфически экспрессируется в ТЕ [89]. У *Cdx2*-нокаутированных эмбрионов начальная фаза эпителиализации, включая компактизацию, поляризацию бластомеров и формирование бластоцели, проходит нормально [90, 91]. Однако к стадии поздней бластоцисты такие эмбрионы теряют эпителиальную целостность ТЕ и не могут поддерживать полость бластоцисты. *Cdx2*-нокаутированные эмбрионы также демонстрируют повышенную частоту апоптоза на эмбриональный день E4.5, что может быть связано с разрушением бластоцели [90]. Примечательно, что наблюдается повышенный уровень экспрессии *Oct4* в наружных клетках *Cdx2*-нокаутированных эмбрионов, что указывает на то, что *Cdx2* необходим для подавления экспрессии *Oct4* в ТЕ [84, 90]. Таким образом, *Cdx2* необходим для формирования ТЕ, но необязателен для формирования и поддержания ВКМ.

Между эмбрионами, полученными с помощью ЭКО и при естественном оплодотворении, были выявлены различия в формировании ВКМ и ТЕ. При этом, G. Giritharan et al. было установлено, что процедура ЭКО оказала большее влияние на формирование будущей плаценты. Клетки ТЕ эмбрионов показали дисрегуляцию генов, связанных с дифференцировкой, метаболизмом ретиноевой кислоты и морфогенезом [92]. Противоположные результаты были получены L. Ganeshan et al.: авторы сообщили, что культивирование эмбрионов *in vitro* оказывает основное влияние на потенциал развития клеточной линии ВКМ, а не клеточной линии ТЕ [93].

В клиниках чаще применяют оценку морфологии ВКМ как неинвазивный метод, способный предсказать успех имплантации, живорождение и даже вес новорожденных [94–96]. K. Hardy et al. предположили, что чем меньше в бластоцисте клеток ВКМ, тем они менее жизнеспособны [97]. Есть работы, демонстрирующие, что бластоцисты, полученные *in vitro*, содержат меньше клеток ВКМ, чем эмбрионы, полученные *in vivo* [98, 99]. В ряде исследований было показано, что более крупный размер ВКМ коррелирует с успехом имплантации бластоцисты [100–102]. D. Mashiko et al. предположили, что на

размер ВКМ влияет синхронность и асинхронность дроблений: у асинхронно поделившихся эмбрионов число клеток ВКМ было меньше, чем у синхронно поделившихся [74]. Клетки ВКМ и ТЕ имеют разную активность метаболизма, поэтому соотношение числа клеток ВКМ и ТЕ играет в развитии эмбриона важную роль.

#### **1.3.4. Энергетический метаболизм доимплантационного эмбриона**

В доимплантационном эмбрионе мыши вплоть до стадии бластоцисты преимущественным энергетическим субстратом является пируват [103, 104]. Глюкоза на ранних стадиях доимплантационного развития почти не используется, но к стадии морулы ее потребление возрастает, а к стадии бластоцисты она становится основным энергетическим субстратом [105]. Установлено, что до 44% поглощенной глюкозы может быть преобразовано в лактат [106]. В 1993 г. L. Hewitson и H. Leese предположили, что ТЕ бластоцисты действует как транспортирующий эпителий, экономя питательные вещества для использования их ВКМ, потому что эти клетки потребляют 100% глюкозы, что может быть объяснено преобразованием в лактат, в то время как ТЕ тратит лишь 55% глюкозы [107]. Аналогичные данные были получены для бычьей бластоцисты, где изолированные клетки ТЕ демонстрируют резко повышенный метаболизм с точки зрения потребления глюкозы и пирувата, продукции лактата и метаболизма аминокислот, в отличие от интактной бластоцисты, как будто изолированные клетки ТЕ свободны от «рамок», ограничивающих их активность в целой бластоцисте [108].

Потребление кислорода является главным индикатором способности эмбриона производить аденозинтрифосфат (АТФ). У мышинных, как и у бычьих и свиных эмбрионов, ранние доимплантационные стадии являются стадиями покоя, а значительное увеличение потребляемого количества кислорода происходит на стадии бластоцисты [109, 110]. Эти данные позволяют рассчитать общую продукцию АТФ – сумму, полученную в результате окислительного

фосфорилирования и гликолиза. Таким образом, глюкоза, хотя и является преимущественно используемым субстратом, вносит лишь скромный (17%) вклад в продукцию АТФ в количественном выражении, в то время как на окисление пирувата приходится 40% продукции АТФ [111]. Примерно 40–60% продуцируемого АТФ используется натрий-калиевым насосом ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  АТФ-азой), расположенным на базолатеральных поверхностях ТЕ [112], а остальная часть, как полагают, тратится на синтез макромолекул: ДНК, РНК, белков и липидов.

Аминокислоты входят в состав многих культуральных сред (например, KSOM AA). С точки зрения расхода энергии роль аминокислот в значительной степени упускалась из виду, возможно, потому что до стадии поздней бластоцисты не происходит увеличения в содержании белка эмбрионов [113]. Тем не менее, аминокислоты выполняют и другие функции, включая обеспечение источников энергии, регулирование рН, играют роль антиоксидантов и осмолитов [114, 115]. При культивировании мышинных бластоцист в присутствии полной смеси аминокислот, было обнаружено, что аспартат, глутамат, аргинин, изолейцин и лейцин являются ключевыми аминокислотами, используемыми эмбрионами [116]. Было установлено, что эмбрионы крупного рогатого скота, полученные *in vitro*, имеют более высокий уровень синтеза белка [117] и аминокислотного истощения [26] по сравнению с контрольной группой.

В 2006 г. F. Noughton в работе на бластоцистах мыши показала, что изолированные клетки ТЕ потребляли значительно больше кислорода, производили больше АТФ и содержали большее количество митохондрий, чем изолированные клетки ВКМ. Метаболизм аминокислот был значительно выше в ТЕ, по сравнению с ВКМ. Эти данные позволяют предположить, что ТЕ производит примерно 80% генерируемого АТФ и отвечает за 90% метаболизма аминокислот по сравнению с ВКМ. Было показано, что плюрипотентные клетки ВКМ демонстрировали относительно более «спокойный» метаболизм, чем клетки ТЕ [118].

Однако повышенная скорость метаболизма эмбриона не гарантирует успешное развитие и имплантацию. Согласно гипотезе «Тихий эмбрион», напротив, замедленный метаболизм можно использовать как индикатор жизнеспособности эмбрионов [24], что подтверждено несколькими исследованиями. Установлено, что у эмбрионов человека на 2-ой и 3-ий дни культивирования в среде с 18-ю аминокислотами метаболизм ниже у тех эмбрионов, которые достигают стадии бластоцисты, по сравнению с теми, чье развитие блокируется [25]. Бычьи эмбрионы с низким аминокислотным метаболизмом имеют более высокую вероятность развития до стадии бластоцисты, чем у эмбрионов с высоким метаболизмом [26]. Кроме того, потребление пирувата эмбрионами человека на 2-й и 3-й день культивирования было значительно ниже у тех эмбрионов, чей перенос в организм матери привел к беременности, по сравнению с эмбрионами, которые не смогли имплантироваться [27]. Гипотеза «Тихого эмбриона» была использована для объяснения того, как эндометрий «отбирает» эмбрионы высокого качества для имплантации, отбраковывая те, которые излучают «шумный» метаболический сигнал, характерный для высокого оборота питательных веществ, и отдает предпочтение «тихим» [28, 29].

#### **1.4. Онтогенез и фенотип потомков, полученных с использованием ВРТ**

Хотя с каждым годом число детей, рожденных при помощи ВРТ, увеличивается, имеются данные о том, что эти технологии негативно влияют на фенотип и онтогенез потомков. При ЭКО доимплантационные эмбрионы культивируются вне материнского организма. Известно, что доимплантационная стадия является периодом динамических изменений и репрограммирования, включая обширные модификации генома, протеома, метаболома и эпигенома. Следовательно, в этот период эмбрионы наиболее чувствительны к условиям внешней среды [119]. Согласно «Концепции первопричин здоровья и болезней на ранних периодах развития» (DOHaD – Developmental Origins of Health and



Disease's hypothesis), любое негативное воздействие в критические периоды развития (например, внутриутробный) способно изменять фенотип организма, что может привести к возникновению заболеваний в последующем онтогенезе [120]. Это явление также называют «программированием развития». Таким образом, влияние различных факторов, таких как образ жизни, диета, загрязнение окружающей среды, медицинские и фармацевтические вмешательства, в периоды фенотипической пластичности может воздействовать на организм, изменяя его развитие.

Ряд исследований демонстрирует повышение риска хромосомных аномалий, низкого веса при рождении и преждевременных родов при использовании ВРТ [121–124]. Несколько исследований предполагают связь между родовыми дефектами при применении ЭКО и неблагоприятными исходами развития нервной системы, преэклампсией, предлежанием плаценты и повышением частоты использования Кесарева сечения [125–128]. Все большее число исследований выявляет явные фенотипические различия в скорости роста, прибавке массы тела, росте и параметрах кровяного давления при более поздних (препубертатных) оценках детей, рожденных при помощи ЭКО, по сравнению с детьми, зачатыми естественным путем [129–131]. Также есть данные, подтверждающие, что люди, рожденные при помощи ВРТ, имеют более высокий, чем в контрольной группе, риск развития диабета, нарушений обмена веществ, артериальной гипертензии и нейропсихических расстройств [2]. Так, в исследовании S. Sandin et al. было показано, что применение ЭКО ассоциировано с повышенным риском умственной отсталости по сравнению с естественным оплодотворением, при этом технология ИКСИ увеличивает риски развития аутизма и умственной отсталости даже по сравнению с ЭКО [132]. Обсервационное исследование Liu et al. продемонстрировало, что у детей, рожденных при помощи ВРТ, наблюдаются изменения сердечной функции, что указывает на потенциальную связь ВРТ с повышенным риском и ранним началом патологических изменений в миокарде [133]. Также есть данные о том, что дети, рожденные при помощи ЭКО–ИКСИ, имеют более высокий уровень

артериального давления, субоптимальную сердечную диастолическую функцию и большую, по сравнению с контролем, толщину сосудов [134]. Было проведено исследование качества спермы на мужчинах 18-22 лет, рожденных с помощью ИКСИ. Анализ показал более низкую медиану концентрации сперматозоидов, более низкое общее число сперматозоидов, а также более низкую медиану общего числа подвижных сперматозоидов [135]. Кроме того, использование ВРТ повышает риск развития таких генетических патологий, как синдром Беквита-Видемана, синдром Ангельмана и синдром Рассела-Сильвера [3]. Исследование D. Reefhuis et al. [4] установило, что риск возникновения пороков развития у детей «из пробирки» почти на 60% больше, чем у зачатых естественным путем.

Так как ВРТ широко используются в сельскохозяйственной отрасли, были проведены исследования на коровах и овцах, демонстрирующие, что животные, полученные методом ЭКО, имеют уникальный фенотип, называемый синдромом крупного потомства [136, 137]. В исследованиях, проведенных на мышах, показано позитивное влияние ЭКО на темпы роста самцов [138–141]. Однако, в некоторых работах при культивировании эмбрионов в среде с оптимизированным аминокислотным составом масса тела самцов, полученных после ЭКО, не отличается от контроля [139, 142, 143], а у самок даже превосходит таковую [144].

Один из активно разрабатываемых аспектов фенотипической модуляции потомков, рожденных с помощью ВРТ, относится к увеличению рисков патологий, связанных с нарушениями обмена веществ [145]. Метаболический синдром – это кластер метаболических изменений, характеризующихся ожирением, инсулинорезистентностью, гипертонией, изменением метаболизма глюкозы и дислипидемией, а проявление этих изменений обусловлено особенностями пищевого поведения, физической активности и количеством потребляемой пищи. Важнейшим фактором, приводящим к развитию метаболического синдрома, является изменение баланса между затратами энергии, и ее компенсации за счет пищевых калорий. Кроме того, накопление жира определяется не только объемом потребленной пищи, но и его распределением в суточном цикле [146]. Например, влияние времени дня на

метаболизм мышей известно по меньшей мере с 1940-х годов [147]. Таким образом, метаболический синдром может приводить к повышенному риску развития таких патологий, как сердечно-сосудистые заболевания и диабет 2-го типа [148].

Лабораторией М. Мошкина было показано, что половозрелые потомки, полученные при помощи ЭКО, характеризуются большим по сравнению с контрольными особями относительным содержанием жира и меньшей тощей массой тела. Установлено, что развитие доимплантационных эмбрионов *in vitro* и их перенос суррогатным матерям влияют на метаболический фенотип потомков [8]. Кроме того, у полученных при помощи ЭКО самцов с более высоким относительным содержанием жира по сравнению с контрольной группой, был повышен уровень глюкозы. При этом животные потребляли меньше корма сравнительно с контролем, а различий в двигательной активности (пройденное расстояние) между группами не наблюдалось. Кроме влияния на метаболический фенотип, по данным лаборатории М. Мошкина, у мышей, полученных методом ЭКО, отмечается дестабилизация развития, которая выражается в увеличении флуктуирующей асимметрии (ФА) паттернов экспрессии генов в билатеральных структурах [9]. Реалистичность использования данного критерия как индикатора дестабилизации развития подтверждается клиническими наблюдениями показывающими, что ФА отпечатков пальцев на левой и правой руке, с высокой степенью достоверности ассоциирована с предрасположенностью к диабету [149, 150]. Процедура ЭКО, таким образом, нарушает стабильность пренатального развития, что проявляется в увеличении флуктуирующей асимметрии паттернов экспрессии генов в билатеральных структурах 16-ти дневных эмбрионов. Проявлением дестабилизации онтогенеза является генетический шум (*gene noise*), который во многом определяется эпигенетическими факторами, такими как метилирование ДНК и пост-трансляционными модификациями гистонов [10].

Причиной данных особенностей у потомков, рожденных с помощью ВРТ, может быть развитие эмбрионов вне материнского организма, ведь, как показывают данные, доимплантационной стадии отводится наиболее критическая

роль в эпигенетической модуляции онтогенеза. Именно на этой стадии происходит эпигенетическая трансформация зиготического генома.

Таким образом, ВРТ влияют на эпигенетические процессы, происходящие при развитии эмбриона, что, в свою очередь, влияет на дальнейший онтогенез и фенотип потомков.

### **1.5. Эпигенетическое перепрограммирование**

Влияние эпигенетики на фенотип потомков осуществляется без изменений нуклеотидных последовательностей генома [151]. Эпигенетические процессы включают в себя метилирование ДНК, модификацию гистонов, ремоделирование хроматина и изменение спектра некодирующих РНК. Показано, что эпигенетические процессы влияют на паттерны экспрессии генов, и, таким образом, играют важную роль в функционировании и стабильности генома [152–154]. Более того, эпигенетические изменения устойчиво воспроизводятся не только в череде клеточных поколений, но и могут передаваться от родителей потомкам [155, 156].

При использовании ВРТ, в частности, ЭКО, эмбрионы на доимплантационной стадии культивируются в лабораторных условиях, а ведь именно этой стадии отводится наиболее критическая роль в эпигенетической модуляции онтогенеза. В первые часы после оплодотворения, дифференцированные зародышевые клетки, ооцит и сперматозоиды репрограммируются в тотипотентное состояние, чтобы сформированный зиготический геном мог последовательно управлять дифференцировкой разнообразных типов клеток организма. Процесс этого репрограммирования зависит от материнских РНК и белков, накопленных ооцитом в течение развития. Способность материнских продуктов запускать процесс репрограммирования была продемонстрирована еще в 1962 г. J. Gurdon, когда он создал первую клонированную лягушку, пересадив ядро соматической клетки в ануклеированный ооцит [157]. Хотя подобные эксперименты по переносу ядер

соматических клеток доказали возможность успешного клонирования животных [158], данный процесс всё же является неэффективным, что подразумевает наличие дополнительных эпигенетических факторов, направляющих отцовский и материнский геномы к переходу в состояние тотипотентности после оплодотворения.

Пока идет процесс репрограммирования, зиготический геном остается транскрипционно неактивным [159, 160]. Однако, чтобы эмбрион продолжал развитие после начальной фазы репрограммирования, зиготический геном должен активироваться. Транскрипционный контроль передается зиготе через процесс «перехода от матери к зиготе» (maternal-to-zygotic transition), в течение которого происходит распад материнских продуктов (РНК и белков) и АЗГ [160]. До АЗГ эмбрион переключается между репликацией ДНК (фазой S) и дроблением (митозом) без паузы в фазе промежутка [161]. По мере того, как процесс перехода от матери к зиготе подходит к завершению, цикл дробления замедляется и вводится фаза промежутка, во время которой у клеток есть время для роста перед следующим дроблением. В совокупности эти изменения подготавливают эмбрион к гаструляции, во время которой клетки начинают мигрировать и дифференцироваться в основные зародышевые листки организма.

У эмбрионов людей АЗГ начинается на стадии 8-и клеток, у мышинных эмбрионов – на стадии 2-х клеток [30]. Одним из процессов, благодаря которому устанавливается тотипотентное состояние отцовского и материнского геномов, является метилирование ДНК. Метилирование ДНК – эпигенетическая модификация ДНК, которая ассоциируется с подавлением экспрессии генов и установлением геномной стабильности. Метилирование ДНК заключается в присоединении метильной группы к цитозину в составе CpG-динуклеотида в позиции С5 цитозинового кольца. Метилирование в промоторной зоне гена, как правило, приводит к подавлению экспрессии соответствующего гена. Метилирование – обратимый процесс. В течение эмбрионального развития метилирование ДНК служит «регулирующим», который направляет и ограничивает дифференциацию клеток [119].

ДНК-метилтрансферазы (DNMT) катализируют перенос метильной группы из S-аденозил-1-метионина на 5-ую позицию цитозиновых остатков в ДНК. DNMT3a и DNMT3b – это метилтрансферазы *de novo*, которые осуществляют формирование модели метилирования ДНК на ранних стадиях развития, а также её изменения в процессе дифференцировки клеток. DNMT1 является ДНК-метилтрансферазой, которая поддерживает метилированное состояние ДНК, присоединяя метильные группы к одной из цепей ДНК в точках, где другая, комплементарная ей цепь, метилирована.

В течение развития у млекопитающих происходит 2 этапа деметилирования и реметилирования ДНК. Перед гаметогенезом геном деметилирован в примордиальных зародышевых клетках и затем последовательно геном реметилируется в ходе гаметогенеза, в результате чего устанавливаются полоспецифические импринты. После оплодотворения происходит второй этап деметилирования/реметилирования [162]. У мышинных эмбрионов метилирование ДНК претерпевает широкогеномное репрограммирование. Как только сперматозоиды начинают деконденсацию, протамины замещаются гистонами, начинается специфически активное деметилирование их генома (репликационно-независимое), которое заканчивается через 6-8 часов, в то время как материнский геном остается гиперметилированным. После этого наступает вторая фаза деметилирования ДНК через пассивный репликационно-зависимый процесс, который одинаково затрагивает и материнский, и отцовский геномы. В конце наступает третья фаза репрограммирования метилирования ДНК через восстановление уровней метилирования ДНК *de novo* метилированием к стадии бластоцисты. Кроме того, может наблюдаться линейно-специфичное метилирование ДНК, когда внутриклеточная масса гиперметилирована, а трофэктодерма гипометилирована [163].

При использовании ВРТ, в частности ЭКО, эмбрионы на доимплантационной стадии, которой отводится наиболее критическая роль в эпигенетической регуляции онтогенеза, культивируются в лабораторных условиях вне материнского организма. При оценке влияния ВРТ на развитие эмбрионов есть

сложности в определении собственного вклада процедур, потому что за медицинской помощью в вопросах беременности чаще всего обращаются люди, которые уже имеют определенные проблемы со здоровьем. Однако есть данные, подтверждающие влияние ВРТ на эпигенетическую регуляцию эмбрионов. В. Market-Velker et al. сравнивали, как композиция шести популярных культуральных сред влияет на метилирование и экспрессию трех импринтированных локусов *H19*, *Peg3* и *Snrpn*. Анализ показал, что потеря импринтированного метилирования и экспрессии *H19* происходит при культивировании эмбрионов от 2-х клеточной стадии до бластоцисты во всех средах по сравнению с *in-vivo* контролем, однако показатели различаются, что позволяет выбрать среду, наиболее близкую к естественным показателям [164]. Работа Е. Nelissen et al. показала, что *H19* (*CTCF6*) и *MEST $\alpha$*  и  $\beta$  промоторы относительно гипометилированы в плацентах, полученных методом ЭКО/ИКСИ [165]. Другое исследование показало, что ИКСИ ассоциировано с более высоким уровнем метилирования гена *SNRPN* у потомков [166]. Имеются данные о связи использования ВРТ и повышенным риском развития таких патологий импринтинга, как синдром Беквита-Видемана, синдром Ангельмана и синдром Рассела-Сильвера [167–169].

Таким образом, использование ВРТ повышает риски нарушений в эпигенетических процессах на доимплантационной стадии, что, в свою очередь, влияет на дальнейший онтогенез и фенотип потомков. Одним из путей снижения подобных рисков может быть максимальное приближение культивирования эмбрионов к естественным условиям. Сложность заключается в том, что при использовании ВРТ на эмбрион влияют множество факторов, в частности, состав культуральной среды, температура инкубации эмбрионов, содержание кислорода и углекислого газа.

## 1.6. Условия культивирования эмбрионов

Сравнительно недавно было обнаружено, что внутренняя среда отделов репродуктивного тракта женщины различается содержанием кислорода, температурой и рН [11]. В лаборатории поддержание естественных условий развития эмбриона является трудновыполнимой задачей. Общепринятым стандартом для культивирования эмбрионов вне материнского организма является температура 37 °С – внутренняя температура тела [13]. Культивирование эмбрионов проводится в специализированных CO<sub>2</sub> инкубаторах. Так называемый «большой коробочный» инкубатор считается стандартным, или обычным типом инкубатора. Более современный многокамерный настольный инкубатор содержит несколько отдельных камер, предназначенных для поддержания индивидуальной стабильности температуры, рН, газа и влажности. На сегодняшний день актуальной является технология мониторинга *time-lapse*, которая позволяет постоянно наблюдать за развивающимися эмбрионами без необходимости их извлечения из защищенной среды инкубатора. Содержание кислорода и углекислого газа в инкубаторах варьирует, но, как правило, поддерживается на постоянном уровне.

Еще одним фактором, влияющим на развитие доимплантационного эмбриона, является состав питательных сред, используемых при ЭКО. Есть данные о влиянии коммерчески доступных культуральных сред, в которых инкубируют эмбрионы, на вес детей при рождении [170, 171]. Таким образом, одним из залогов успешного развития эмбрионов в лабораторных условиях является минимизация манипуляций и наблюдений за эмбрионами вне CO<sub>2</sub>-инкубатора, что необходимо для снижения стресса у делящихся эмбрионов [172], а также поддержание условий, максимально приближенных к естественным.



### 1.6.1. Состав культуральных сред

Естественная питательная среда женского полового тракта содержит множество различных соединений, которые поступают в него с кровью или синтезируются эпителиальными клетками репродуктивного тракта [173]. Важнейшие компоненты естественной среды яйцеводов включают в себя  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cl^-$ , энергетические субстраты (лактат, пируват, глюкоза), разнообразные аминокислоты, белки, простагландины, стероидные гормоны и ростовые факторы, в частности, инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР-1), эпидермальный фактор роста и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор [174]. Для обеспечения развития доимплантационных эмбрионов *in vitro* нужно использовать растворы культуральных сред с правильно подобранными компонентами в оптимальных концентрациях. Важными свойствами любой культуральной среды являются стерильность, а также постоянство рН (буферная емкость) и осмолярность.

Первыми культуральными средами служили физиологические растворы, например плазма крови, затем начали использовать более сложные растворы, такие как бикарбонатный раствор Кребса-Рингера с добавлением белка [45]. Одним из первых целенаправленно изучать эффекты отдельных компонентов среды и их взаимодействия начал R. Brinster. Он добавил в основной состав солей антибиотики и бычий сывороточный альбумин, а также молочную кислоту, нейтрализованную гидроксидом натрия и ионизированной водой. Работы R. Brinster привели к оптимизации таких основных параметров культуральной среды, как рН, осмолярность, содержание энергетических субстратов и аминокислот [48]. В 1968 г. D. Whittingham для культивирования эмбрионов использовал модифицированный бикарбонатный раствор Кребса-Рингера, содержащий лактат натрия, пируват натрия, глюкозу, бычью сыворотку, стрептомицин и пенициллин [51]. Вскоре после этого, на основе среды ВМОС-2 D. Whittingham разработал культуральную среду М-16, которая широко используется в современных эмбриологических лабораториях. Одной из

основных проблем при культивировании доимплантационных эмбрионов *in vitro* был двухклеточный блок, при котором эмбрионы прекращали свое развитие на стадии 2-х клеток. В 1977 г. J. Abramczuk представил новый компонент культуральных сред – этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), которая помогала эмбрионам преодолевать двухклеточный блок [52]. В настоящее время ЭДТА входит в состав многих культуральных сред.

На сегодняшний день существует огромное число коммерчески доступных питательных сред, которые используются в лабораториях ВРТ. В повседневной практике используются два основных типа коммерчески доступных культуральных сред. Секвенциальные (или двухэтапные) среды по составу ориентированы на энергетические нужды эмбриона, и подразумевают, что первые три дня эмбрион культивируют в одной среде, а затем переносят в другую, в которой он развивается до стадии бластоцисты. Применение таких культуральных сред требует физического перемещения эмбрионов, что может оказать влияние на их последующее развитие. Одноэтапные среды содержат все компоненты, необходимые эмбриону для развития от зиготы до стадии бластоцисты, следовательно, при применении такого типа среды можно не подвергать эмбрион физическим воздействиям.

Отдельного внимания заслуживает разработка питательной среды KSOM, которая в настоящее время широко используется для культивирования доимплантационных эмбрионов различных животных. Так как было проведено множество удачных экспериментов с использованием различных питательных сред, было неясно, какие из них наиболее пригодны для того или иного этапа развития доимплантационных эмбрионов. При вычислении концентраций различных компонентов среды перед исследователями вставал вопрос о том, какого подхода придерживаться. Первый подход подразумевал использование примерно таких же концентраций, как и в репродуктивном тракте самки. Внешне очень заманчивый подход имел, однако, несколько недостатков. Одним из основных была невозможность определить, какие взаимодействия происходят между компонентами. Альтернативой этому был второй подход, который назвали

«позволь выбрать эмбриону», при котором использовали экспериментально выверенные оптимизированные концентрации компонентов. Сторонники данного подхода, J. Lawitts и J. Biggers, использовали технологию симплексной оптимизации как практическую стратегию для разработки среды культивирования *in vitro* зигот мышей, которые преодолели двух-клеточный блок развития. После 20-и попыток симплексной оптимизации была получена среда, которую назвали SOM [175]. После этого среда была модифицирована увеличением концентрации калия и переименована в KSOM. Было показано, что использование среды KSOM приводит к увеличению числа зигот, достигших стадии бластоцист, и рождению большего числа здоровых детенышей после переноса в матку суррогатных матерей. Позже среда KSOM была улучшена M. Summers добавлением в ее состав двух типов аминокислот: заменимых и незаменимых [176]. Дальнейшие исследования показали, что модифицированная среда KSOM (KSOM AA) с добавлением аминокислот еще больше увеличивает число эмбрионов, достигающих стадии бластоцисты.

### **1.6.2. Содержание кислорода и углекислого газа**

Содержание кислорода в инкубаторе является одним из критических параметров развития эмбриона. Повышенные и нефизиологические концентрации кислорода могут оказывать негативное влияние из-за окислительного стресса, способствуя развитию дефектов у эмбриона, в частности, увеличенной фрагментации [177]. Уровень кислорода в женском репродуктивном тракте составляет 1–5% [178]. Было проведено исследование, в котором сравнивали группы эмбрионов, развивавшихся при 5% и 20% уровня содержания кислорода. Результаты показали, что более низкий (5%) уровень кислорода приводит к увеличению числа эмбрионов хорошего качества и, следовательно, к увеличенной частоте рождения [179]. В свою очередь, слишком низкие уровни содержания кислорода могут нарушить эмбриогенез, который включает в себя многие окислительные метаболические процессы. Установлено, что уже через 1 день

после начала культивирования эмбрионов в питательной среде появляются активные формы кислорода, высокие уровни которых приводят к более низкому проценту оплодотворения и к более низкому числу эмбрионов, развивающихся до стадии бластоцисты [177]. Однако, есть исследования, показывающие, что оксидативный стресс негативно влияет только на эмбрионы на стадиях дробления, а после компактизации не несет отрицательного воздействия, и авторы предлагают использовать 5% уровень кислорода в течение первых трех дней развития, и 20 % – на стадии морулы и бластоцисты [180].

Углекислый газ ( $\text{CO}_2$ ) необходим для нормального развития эмбрионов в инкубаторе. В лабораториях и клиниках ЭКО содержание углекислого газа в инкубаторах обычно составляет 5-6%. Было показано, что повышенная концентрация углекислого газа негативно влияет на развитие эмбрионов до стадии бластоцист [181].

### 1.6.3. Водородный показатель (pH)

Внутриклеточный pH ( $\text{pH}_i$ ) регулирует многие клеточные процессы, такие как стабильность мейотического веретена ооцита, дробление и дифференцировка клеток, формирование цитоскелета, ферментативную активность эмбриона и образование бластоцели. Было показано, что ионная проницаемость мембраны для ионов  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  или  $\text{Cl}^-$ , а также активность ионных каналов изменяются в зависимости от значений  $\text{pH}_i$ . Кроме того, митохондриальная дыхательная цепь использует градиент протонов через митохондриальную мембрану, поэтому ее функционирование частично связано с  $\text{pH}_i$ . То же касается и лизосомальных ферментов [182]. На ядерном уровне даже небольшие изменения  $\text{pH}_i$  (0.1 единицы pH) могут изменить синтез ДНК [183].

Внутренний pH эмбриона человека поддерживается благодаря регулирующим механизмам, в основном обменникам  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  и  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  [184]. Известно, что эмбрионы млекопитающих на стадии морулы и бластоцисты могут более эффективно регулировать собственный pH благодаря наличию плотных

контактов (tight junctions) [185]. Несмотря на способность эмбрионов поддерживать внутриклеточный гомеостаз, изменение внеклеточного рН может стать причиной эмбрионального клеточного стресса [184]. Таким образом, колебания рН могут негативно воздействовать на развитие эмбриона на ранних стадиях развития.

В репродуктивном тракте рН варьирует в разных отделах, и основными механизмами регуляции рН являются обменник  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ , который уменьшает алкалоз, и каналы  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  и  $\text{Na}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ , которые уменьшают ацидоз. Было показано, что рН в трубных выделениях более щелочной, чем в маточном секрете (у коров, свиней и кроликов) [11, 186, 187]. У кроликов рН в маточных трубах равен 7.94 [188]. Такая щелочность связана с высокой активностью карбоангидразы. У женщин рН фолликулярной жидкости варьирует от 7.22 до 7.7 [189, 190], а трубного секрета – между 7.3 и 7.7 [189]. Есть данные о том, что у коров рН в матке сразу после овуляции слегка повышается до 7.35 (до овуляции равен 7.22) [191]. У кроликов рН матки варьирует от 7.47 до 7.9 [192].

В условиях культивирования эмбрионов в инкубаторе,  $\text{CO}_2$  растворяется в питательной среде с образованием угольной кислоты. В основном, внеклеточный рН ( $\text{pH}_o$ ) в культуральной среде является результатом баланса между концентрацией  $\text{CO}_2$  в инкубаторе и концентрацией бикарбоната в самой среде. Как было сказано выше, эмбрионы способны поддерживать собственный гомеостаз, однако есть данные о том, что если колебания  $\text{pH}_o$  слишком резкие или слишком значительные, то механизмы регуляции могут быть нарушены. Более того, K. Phillips et al. показали, что ооциты и ранние эмбрионы человека не способны регулировать слабый ацидоз (рН 7.0) на любой стадии развития вплоть до бластоцисты, но могут регулировать алкалоз (рН 8.0) [193].

На стабильность мейотического веретена мышинового ооцита значительно влияют изменения рН. Используя поляризационную световую микроскопию, N. Swearman et al. показали обратимое увеличение плотности мейотического веретена (полимеризация актиновых филаментов) после инкубации денудированных (без *zona pellucida*) ооцитов мыши в среде с рН 7.4-7.5 вместо рН

7.33 [194]. Повреждение мейотического веретена может быть причиной анеуплоидии и остановки развития. J. Cheng et al. показали, что  $pH_i$  ооцитов мыши увеличивается с возрастом, что может быть результатом снижения активности  $HCO_3^-/Cl^-$  обменника [195]. В более «пожилых» ооцитах увеличение  $pH_i$  может повредить структуру комплекса когезии, что, в свою очередь, приводит к анеуплоидии [195]. У людей, по некоторым данным, незначительное повышение  $pH_o$  (7.5) может иметь позитивное влияние на оплодотворение: при культивировании эмбрионов в среде с  $pH$  7.0 показатели оплодотворения и дробления эмбрионов были ниже, чем при  $pH$  7.5 [196]. В исследовании J. Squirrell et al. было проанализировано влияние изменения  $pH$  на развитие 2-х клеточных эмбрионов хомячков [197]. Их нормальный  $pH_i$  составляет 7.4, изменения под воздействием кислой или щелочной обработки варьировались в диапазоне от 6.85 до 7.68. Изменение  $pH_i$  влияло на цитоскелет (на микрофиламенты, но не на микротрубочки). При щелочном  $pH_i$  микрофиламенты образовывали агрегаты, а при кислом  $pH_i$  сеть микрофиламентов могла формироваться, но распадалась. Авторы предположили, что эти клеточные эффекты изменения  $pH_i$  были вызваны непрямыми механизмами через клеточные пути, включая  $Ca_2^+$  сигнальный путь. Развитие до стадии морулы и бластоцисты было снижено как кислотной, так и щелочной обработкой в дозозависимой реакции. Этот эффект был частично обратимым, в случае если воздействие не превышало 12-и часов [197]. Таким образом, было показано, что эмбрион имеет ограниченную способность восстанавливаться после клеточного стресса, вызванного изменениями  $pH_i$ .

На метаболическом уровне значение  $pH_i$  может влиять на ферментативную активность: например,  $pH_i$  выше 7.2 стимулирует активность фосфофруктокиназы, которая может изменяться даже при очень умеренных колебаниях  $pH$  на 0.2 единицы. Повышение активности фосфофруктокиназы может преждевременно активировать процесс гликолиза, что может привести к остановке развития эмбриона [198]. Присутствие слабых кислот во внеклеточной

среде на ранней стадии развития может снизить  $pH_i$  у эмбрионов мыши и вызвать снижение гликолитической активности [198].

D. Zander-Fox et al. в своем исследовании на мышинных эмбрионах искусственно снижали  $pH_i$  эмбриона слабой кислотой путем «хронического» воздействия (весь период развития от зиготы до бластоцисты), либо путем «острого» воздействия (один раз на стадии 2-х клеточного эмбриона или от 2-х клеточного до 8-и клеточного) [199]. Последствия такого снижения  $pH_i$  включали снижение числа клеток бластоцисты, увеличение апоптоза, снижение экспрессии генов, связанных с клеточным стрессом и участвующих в апоптозе, независимо от периодов воздействия [199].

При использовании культуральных сред следует тщательно следить за их  $pH$ . Важнейшим компонентом питательных сред, регулирующих  $pH$ , является бикарбонат. Существует мнение о том, что оптимальным  $pH_o$  для культивирования эмбрионов является физиологический  $pH$ . Однако во время инкубирования на эмбрион влияют многие факторы, поэтому производители питательных сред рекомендуют поддерживать  $pH_o$  (т.е.  $pH$  среды) немного выше, чем  $pH_i$  (внутриклеточный  $pH$  эмбриона), чтобы компенсировать механизмы окисления, связанные с клеточным метаболизмом (в пределах 7.2 и 7.4) [184]. Также, следует внимательно следить за составом культуральных сред, так как известно, что высокие концентрации лактата (5 мМ) значительно снижают  $pH_i$  зиготы примерно на 0.1 единицы [198]. Лактат действует как слабая кислота (так же как и пируват) в цитозоле зиготы, но этот эффект не наблюдается на стадии морулы, которая становится нечувствительной к изменениям  $pH$ , вероятно, из-за компактизации. Кроме того, пропорции некоторых заменимых аминокислот, таких как таурин или глицин, влияют на  $pH_i$ , поскольку они играют роль цвиттерионов (молекулы с отрицательным и положительным электрическим зарядом, которые могут, в зависимости от  $pH$ , притягивать анионы или протоны). В питательной среде они могут присоединять протоны и, таким образом, буферизировать среду, не допуская падения  $pH_i$  [185]. У коммерчески доступных питательных сред встречаются колебания  $pH$  даже в одной партии. M. Tarahomi et

al. обнаружили, что в трех из пяти исследованных ими сред межсерийные колебания рН составили от 0.20 до 0.23 ( $p < 0.05$ ) [200].

Во время культивирования эмбрионов рН также может варьировать. Установлено, что в течение 4-х дней инкубирования рН значительно увеличивается, и разница между первым и четвертым днем может составлять от 0.04 до 0.08 в зависимости от типа среды [200], но все еще остается в пределах допустимых для клинической практики границ (7.2 – 7.4). Такое изменение рН может быть обусловлено несколькими факторами: изменением аминокислотного состава белка во время культивирования в результате деградации, высвобождением ионов аммония в результате деградации белка (метаболизм эмбриона), или может быть связано с испарением среды.

Температура в инкубаторе также может влиять на рН, слегка изменяя проводимость ионов водорода [182], и внося небольшую погрешность измерения за счет температурного воздействия на электрод, измеряющий рН (0.01 – 0.02 единиц рН/ °С) [201].

#### **1.6.4. Температура**

Температура является одним из наиболее критических параметров, так как, помимо общеизвестного влияния на химические реакции, получены данные о влиянии температуры на нуклеосомы и активность ферментативного аппарата [12]. Кроме того, температура влияет на скорость метаболизма: при изменении (повышении или понижении) температуры всего на 0.5 °С-1.0 °С метаболическая активность изменяется на 5–10% [202].

Общепринятым стандартом для культивирования эмбрионов вне материнского организма является температура 37 °С [13]. Было показано, что культивирование ооцитов и проведение ЭКО при 37 °С влияет на целостность веретена деления и, следовательно, вероятно, имеет важное значение для последующего развития эмбриона [31, 32]. Однако, согласно относительно недавно появившимся данным, в репродуктивном тракте женского организма



зафиксирован температурный градиент. *In vivo* измерения у кроликов и свиней показали, что температура каудальной части истмуса (перешейка) на 1–2 °С ниже, чем в краниальной части ампулы (рисунки 2) [14]. Температура преовуляторных фолликулов (Граафовых пузырьков) кролика на 1–2 °С, свиней на 1.3–1.7 °С ниже, чем температура стромы яичника [12 – 14]. Преовуляторные фолликулы крупного рогатого скота имеют температуру примерно на 1.5 °С–2 °С ниже, чем температура стромы яичника или тела [178]. У человека температура зрелых фолликулов на ~2.3 °С ниже, чем строма яичника [16].

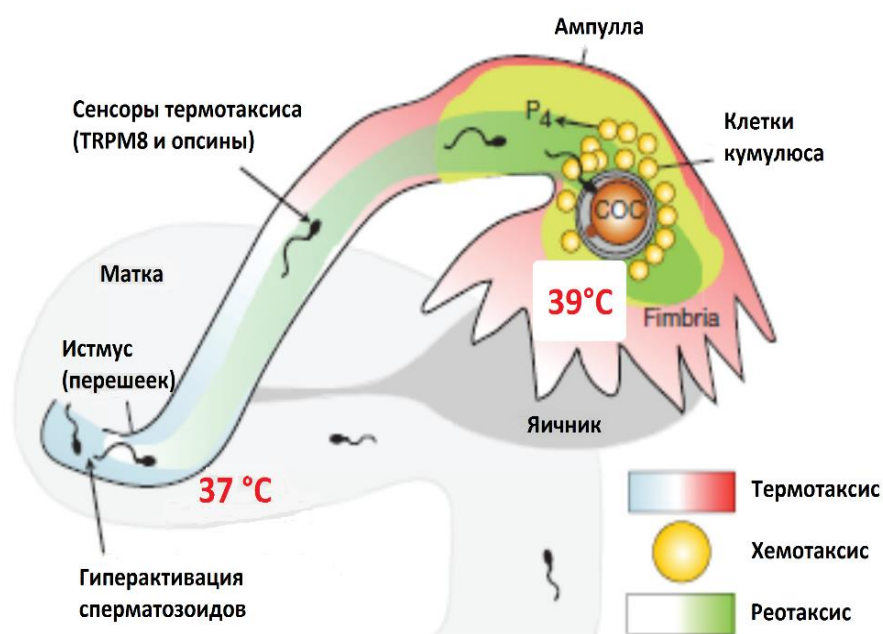


Рисунок 2 – Процесс оплодотворения в яйцеводе по Li et al. (2017) [203]. Яйцевод регулирует оплодотворение с помощью направления сперматозоидов и их гиперактивации. Изображенные температуры (37 °С–39 °С) из исследования Bahat et al. (2012) на кроликах [204]

Также, хорошо известно, что температура тестикул (яичек) у большинства млекопитающих, включая человека, на 2–4 °С ниже, чем основная температура тела. Поддержание более низкой температуры в тестикулах важно для нормального функционирования сперматозоидов, что подтверждено многочисленными исследованиями. В 1965 г. J. Rock et al. показали влияние индуцированной интраскротальной гипертермии на функцию яичек у человека [205]. Было установлено, что повышение температуры мошонки даже на 1 °С

значительно снижает число сперматозоидов в эякуляте. В свою очередь, охлаждение, напротив, приводит к увеличению числа сперматозоидов. В 1968 г. D. Robinson et al. ежедневно понижали температуру мошонки испытуемых на 7 °С путем прикладывания к ней пузыря льда [206]. В результате эксперимента, число сперматозоидов в эякуляте увеличилось почти в три раза по сравнению с исходным средним значением этого показателя.

Известно также, что базальная температура тела женщин тесно связана с менструальным циклом и временем овуляции из-за термогенных свойств прогестерона [97, 98]. Во время лютеиновой фазы менструального цикла базальная температура тела женщин повышается на 0.31–0.46 °С [99, 100]. В исследовании K. Ng et al. [11] предложено несколько факторов, которые могут влиять на колебания температуры в женском репродуктивном тракте: метаболическая активность и скорость потери тепла внутри органов. Авторы предположили, что многие женские причины бесплодия, такие как эндометриоз, ожирение и синдром поликистозных яичников, вероятно, могут менять температурный градиент в репродуктивном тракте [11].

Было проведено несколько работ, в которых показано положительное влияние естественного температурного градиента на процедуру созревания ооцитов *in vitro* и развития эмбрионов до стадии бластоцисты [15, 16]. Традиционная технология производства коровьих эмбрионов *in vitro*, включая созревание ооцитов, оплодотворение и культивирование эмбрионов, осуществляется при температуре 38.5 °С или 39 °С, что соответствует температуре тела крупного рогатого скота. Однако, в исследовании U. Sen et al. было показано, что более низкая температура инкубирования коровьих ооцитов – 36.5 °С – не повлияла на процесс их созревания [23]. По сравнению с контрольной группой (температура 38.5 °С) не было обнаружено различий по таким показателям, как расширение кумулюса, экструзия первого полярного тела и созревание ядер. Более того, пониженная температура (36.5 °С) инкубирования ооцитов не оказала влияния на процесс развития эмбрионов до стадии бластоцисты. Однако, бластоцисты из ооцитов контрольной группы имели

большее число клеток ВКМ, но меньшие показатели общего числа клеток и клеток ТЕ [23]. Исследование Rivera et al. продемонстрировало, что инкубирование зигот или 2-х клеточных эмбрионов при повышении температуры на 1.5 °С в течение менее 9 часов не оказало никакого влияния на развитие эмбрионов коров [208].

Культивирование зиготы мыши при повышенной температуре (39 °С) в течение 96 часов приводило к тому, что большинство эмбрионов останавливали развитие из-за 2-х клеточного блока [209]. При этом, процент эмбрионов, развившихся до стадии бластоцисты, был таким же, как у контрольной группы (37 °С), хотя общее число клеток бластоцисты было значительно ниже контроля, а также были заметны изменения в экспрессии генов [209].

В нескольких проспективных исследованиях изучалось влияние более низкой температуры во время длительного культивирования *in vitro* на развитие эмбрионов человека [210, 211]. Эти исследования продемонстрировали, что культивирование при температуре ниже 37 °С не оказало положительного влияния на развитие эмбрионов или измеряемые клинические результаты. Однако температуры/диапазоны, изученные в этих исследованиях за пределами 37 °С, были ограничены, другие соответствующие культивированию переменные не всегда хорошо контролировались, а о влиянии на скорость дробления эмбрионов не сообщалось. В работе E. Walters et al. [212] было показано, что изменение температуры инкубирования оказало значительное влияние на развитие эмбрионов мыши до стадии бластоцисты и их морфокинетические характеристики. Митотические дробления клеток доимплантационных эмбрионов мыши происходили медленнее при более низкой температуре и ускорялись по мере повышения температуры с 35.0 °С до 37.5 °С [212].

Недавнее исследование D. Moriyama et al. [213] также подтвердило, что температура инкубирования влияет на многие параметры развития эмбрионов мыши. Было установлено, что температурный режим T1 (37 °С днем, 35.5 °С ночью), оказал негативное влияние на развитие эмбриона мыши, повлияв на морфокинетику эмбриона до и после компактизации. На молекулярном уровне

отрицательное воздействие режима T1 проявилось в более высокой экспрессии гена *Apa1* в клетках бластоцисты, а также в метаболизме эмбрионов. С другой стороны, культивирование при температурном режиме T2 (38.5 °C днем и 37 °C ночью), не оказало негативного влияния на эмбриональное развитие или качество эмбрионов, и результаты были схожи с контрольной группой [213]. Еще одно исследование, которое учитывало изменение температуры с циркадными ритмами, было проведено M. Neelke et al. [202]. Группы эмбрионов человека инкубировали в специализированном инкубаторе с циркадным температурным ритмом (с 1 до 6 часов утра: 36.6 °C, постепенное повышение до 37.5 °C; с 11 утра до 9 вечера: 37.5 °C; постепенное снижение до 36.6 °C), при постоянной температуре 36.6 °C или при постоянной температуре 37.1 °C. В результате, было обнаружено положительное влияние циркадного температурного ритма на развитие эмбрионов, но на частоту клинической беременности эти условия инкубирования не повлияли. Культивирование при постоянной температуре 36.6 °C или 37.1 °C не повлияло на развитие эмбрионов, а случаев клинической беременности было больше при 37.1 °C [202].

Таким образом, если женский репродуктивный тракт имеет температурный градиент, то культивирование эмбрионов *in vitro* при температуре 37 °C может быть не самым оптимальным вариантом.

## **2. Материалы и методы**

### **2.1. Животные и условия содержания**

Исследования были выполнены на мышах SPF статуса аутбредной линии CD1 в возрасте 12–18 недель ( $n = 159$ ). Животных содержали в контролируемой среде: искусственном фотопериоде 12.5 С : 11.5 Т (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», сформированном на базе ЦКП SPF-виварий ИЦиГ СО РАН.

### **2.2. Экспериментальные исследования**

#### **2.2.1. Подготовка самок-доноров ооцитов**

Суперовуляцию самок выполняли в два этапа. На первом этапе самкам за 2.5 часа до выключения света (17:00 по времени г. Новосибирска) вводили внутрибрюшинно по 5 МЕ гонадотропина сыворотки жеребых кобыл (ГСЖК) (Intervet International B.V., Нидерланды). На втором этапе, через 48 часов после введения ГСЖК, этим же самкам внутрибрюшинно вводили по 5 МЕ человеческого хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) (Intervet International B.V., Нидерланды).

### **2.2.2. Экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО)**

Для получения сперматозоидов извлекали каудальную часть эпидидимиса самца и помещали в каплю среды НТФ (Human Tubal Fluid), покрытую минеральным маслом (Merck, Германия). Далее инкубировали в течение 1 часа в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Thermo Fisher Scientific, США) при температуре 37 °С и выделяли сперматозоиды. У самок через 16-17 часов после инъекции ХГЧ извлекали яйцеводы и вымывали ооциты. Вымытые ооциты помещали в каплю среды НТФ, покрытую минеральным маслом, и помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор (37 °С). Затем переносили сперматозоиды в каплю с ооцитами и помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор (37 °С) на 6 часов для оплодотворения. После этого путем переноса через 4-5 капель среды НТФ отмывали оплодотворенные ооциты и переносили их в каплю среды KSOM AA, покрытую минеральным маслом, и помещали в CO<sub>2</sub> инкубатор при определенной температуре.

### **2.2.3. Вымывание эмбрионов из репродуктивных путей самок**

Для подготовки самок-доноров 2-х клеточных эмбрионов проводили процедуру суперовуляции. За 5.5 часа до выключения света (14:00 по времени г. Новосибирска) самкам вводили внутривбрюшинно по 5 МЕ гонадотропина сыворотки жеребых кобыл (ГСЖК) (Intervet International B.V., Нидерланды), после чего, через 48 часов после введения ГСЖК, этим же самкам внутривбрюшинно вводили по 5 МЕ человеческого хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) (Intervet International B.V., Нидерланды). После этого, за 2.5 часа до выключения света (17:00 по времени г. Новосибирск) самок подсаживали в клетки к изолированно сидящим самцам (по 2 самки к одному самцу). На следующее утро, через 2 часа после включения света (9:00 по времени г. Новосибирска), самок с вагинальными пробками забивали методом цервикальной дислокации. После извлечения их яйцеводы помещали в каплю среду M2 и вымывали 2-х клеточные эмбрионы, которые затем переносили в калю среды

KSOM AA, покрытую минеральным маслом (Merck, Германия), и инкубировали при 37 °C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе.

#### 2.2.4. Культивирование *in vitro* эмбрионов

После оплодотворения зиготы переносили в инкубатор с определенной температурой (35 °C, 37 °C, 39 °C) на 24 часа (первое дробление эмбрионов). Через 24 часа отбирали 2-х клеточные эмбрионы, переносили в чистую каплю среды KSOM AA и помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор с температурой 37 °C на 48 часов или 72 часа.

##### *Экспериментальные группы:*

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

##### **II. Эксперимент:**

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

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

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

### 2.2.5. Индукция псевдобеременности у самок-реципиенток эмбрионов

За 2.5 часа до выключения света (17:00 по времени г. Новосибирск) в клетки с изолированно содержащимися вазэктомированными самцами подсаживали самок (по 2 самки к одному самцу). Утром следующего дня самок проверяли на наличие вагинальных пробок. Самок с вагинальными пробками отсаживали в отдельные клетки.

### 2.2.6. Перенос эмбрионов в воронку яйцевода

Псевдобеременных самок-реципиентов наркотизировали при помощи ингаляции изофлураном (Baxter, США). Затем переносили им в воронку яйцевода по 12-16 эмбрионов на стадии 2-х клеток. После этого самок отсаживали в индивидуальные клетки и содержали одиночно на протяжении всего периода беременности и выкармливания потомков.

#### *Экспериментальные группы эмбриональных переносов:*

**I. Контроль (*in vivo*):** естественное оплодотворение (покрытие, подтвержденное вагинальными пробками) → беременность в 2-х рогах матки (самок-реципиентов  $n = 8$ , потомков  $n = 56$ ).

#### **II. Эксперимент:**

- 1) **35 °C:** эмбрионы, прошедшие первое дробление при 35 °C → беременность в 1-м роге матки (самок-реципиентов  $n = 13$ , потомков  $n = 50$ );
- 2) **37 °C:** эмбрионы, прошедшие первое дробление при 37 °C → беременность в 1-м роге матки (самок-реципиентов  $n = 10$ , потомков  $n = 26$ );
- 3) **39 °C:** эмбрионы, прошедшие первое дробление при 39 °C → беременность в 1-м роге матки (самок-реципиентов  $n = 14$ , потомков  $n = 5$ ).



### **2.2.7. Взвешивание потомков**

Для измерения массы тела потомков (самцов) было проведено взвешивание. Использовали лабораторные весы Traveler (Ohaus, Китай). Взвешивание выполняли в возрасте 3-х недель (при отъеме от матерей), 8-и, 18-и и 24-х недель.

### **2.2.8. Мониторинг спонтанной активности, потребления воды, корма, кислорода, выделения углекислого газа и дыхательного коэффициента**

Потомков (самцов) в возрасте 12-и недель: 35 °C (n = 12), 37 °C (n = 12) и *in vivo* (n = 8) тестировали в приборе PhenoMaster (TSE Systems, Германия) в течение 5-и дней. Первые 2 дня считались адаптивными и не учитывались при анализе результатов. В приборе каждые 30 минут проводился учет следующих параметров: потребление воды, потребление корма, пройденное расстояние, продолжительность сна, потребление кислорода (O<sub>2</sub>) и выделение углекислого газа (CO<sub>2</sub>). Значения были скорректированы по массе тела животного. Дыхательный коэффициент (RQ) считали, как отношение CO<sub>2</sub> к O<sub>2</sub>. При анализе циркадных ритмов двигательной и пищевой активности значения анализируемых показателей суммировали с интервалом 1 час. Для межгрупповых сравнений двигательной активности, потребления корма и воды использовали суммарные величины за 3-е суток наблюдений.

## **2.3 Методы**

### **2.3.1 Time-lapse микроскопия**

Мониторинг динамики развития эмбрионов проводился с использованием автоматизированного имиджера Lionheart FX (Biotek, США) с программным обеспечением Gen5. Эмбрионы культивировали в 4-х луночных планшетах (Nunc, США), по одной капле культуральной среды (20 мкл) в каждой лунке. В каждую

каплю среды помещали по  $\approx 10$  эмбрионов. Были проанализированы продолжительность клеточных циклов и размеры бластомеров.

*Продолжительность клеточных циклов.* Снимки эмбрионов получены с помощью метода светлого поля (рисунок 3). Применяли следующие параметры съемки: LED Intensity = 10, Camera Gain = 24, Brightness level = 50, Contrast Level = 33. Для лучшего фокусирования камеры использовали функцию «Add beacons»: ставили метку на каждый эмбрион, таким образом, продолжительность клеточных циклов рассчитывалась индивидуально для каждого эмбриона. Эмбрионы вышедшие из фокуса камеры в течение съемки, не учитывались при подсчете результатов. В течение первого эмбрионального дробления (слияния пронуклеусов в зиготе и дробления на 2 клетки) временной интервал снимков эмбрионов составлял 30 минут, использовали объектив 20x (Olympus, Япония). Для последующего инкубирования до стадии 8 клеток временной интервал между снимками составлял 2 часа, использовали объектив 10x (Olympus, Япония).



Рисунок 3 – Снимки эмбриона мыши на стадиях зиготы (20x), 2-х клеток (10x), 4-х клеток (10x) и 8-и клеток (10x). Снимки получены с помощью прибора Lionheart FX

*Размеры бластомеров.* Размеры бластомеров соответствовали временным параметрам и рассчитывались индивидуально для каждого эмбриона. Размеры оценивали на полученных снимках эмбрионов, измерения проводили с помощью программы Image J [214–216]. Бластомеры обводили по периметру, измеряли по параметру «Площадь» («Area») и получали число пикселей в обведенной области. Затем переводили пиксели в квадратные микрометры (рисунок 4).

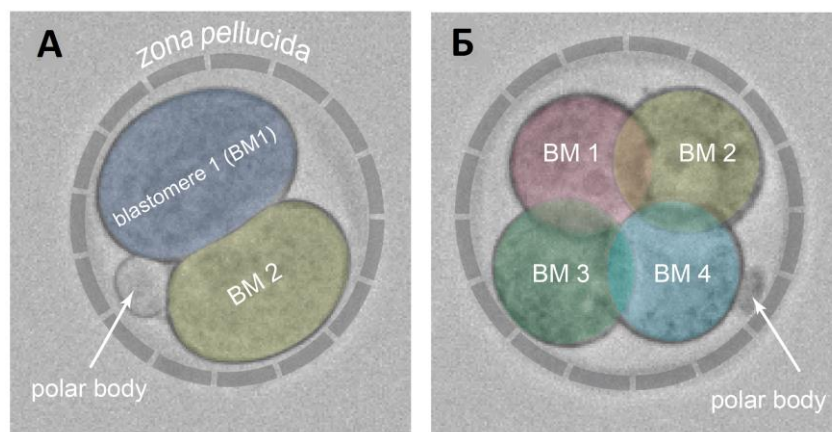


Рисунок 4 – Измерение размеров бластомеров в программе Image J. А – эмбрион на 2-х клеточной стадии, Б – эмбрион на 4-х клеточной стадии. Снимки получены с помощью прибора Lionheart FX (10x)

### 2.3.2. Дифференциальное окрашивание внутриклеточной массы (ВКМ) и трофэктодермы (ТЕ) бластоцисты

Для дифференциального окрашивания бластоцист использовали методику N. Selokar et al. [33], адаптированную для исследования мышинных эмбрионов. Эмбрионы помещали в 45 мкл среды KSOM AA по 10 штук в капле. В каплю добавляли 5 мкл раствора РНКазы А (Синтол, Россия) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) с поливинилпирролидоном (ПВП) (Merck, Германия) в концентрации 1:100. Инкубировали при 39 °С в течение 60 минут. После этого эмбрионы переносили в каплю раствора пропидий йодида (PI) (Merck, Германия) с 0.2% Тритон X-100 (Merck, Германия) в концентрации 1:25 на 30 секунд при комнатной температуре. Затем промывали эмбрионы в трех каплях (по 50 мкл) раствора ФСБ/ПВП. После промывки переносили эмбрионы в раствор Hoechst 33258 (Merck, США) с 4% параформальдегидом (ПФА) (Merck, Германия) в концентрации 1:1000 на 15 минут при комнатной температуре, после чего снова промывали эмбрионы в 3 каплях раствора ФСБ/ПВП. Затем переносили эмбрионы на предметные стекла (БиоВитрум, Россия), покрытые раствором поли-L-лизина (Merck, Германия). Добавляли раствор, содержащий агент, препятствующий фотообесцвечиванию (Abscam, Великобритания), и накрывали препараты покровным стеклом. Ядра ВКМ, меченные Hoechst 33258, окрашивались в синий цвет, а ядра ТЕ, меченные

PI и Hoechst 33258, окрашивались в розово-красный. Количество ядер ВКМ и ТЕ подсчитывали на снимках (рисунок 5), для получения которых использовали автоматический микроскоп Lionheart FX (Biotek, США). Использовали объектив 20x PI FL Phase (Olympus, Япония). Для красителя PI использовали лазер 523 LED (Biotek, США), фильтр куб PI 531/647 (Biotek, США). Для красителя Hoechst 33258 использовали лазер LED 365 (Biotek, США), фильтр DAPI 377/447 (Biotek, США). Для съемки применяли следующие параметры: LED Intensity = 10, Camera Gain = 24, Brightness level = 50, Contrast Level = 33.

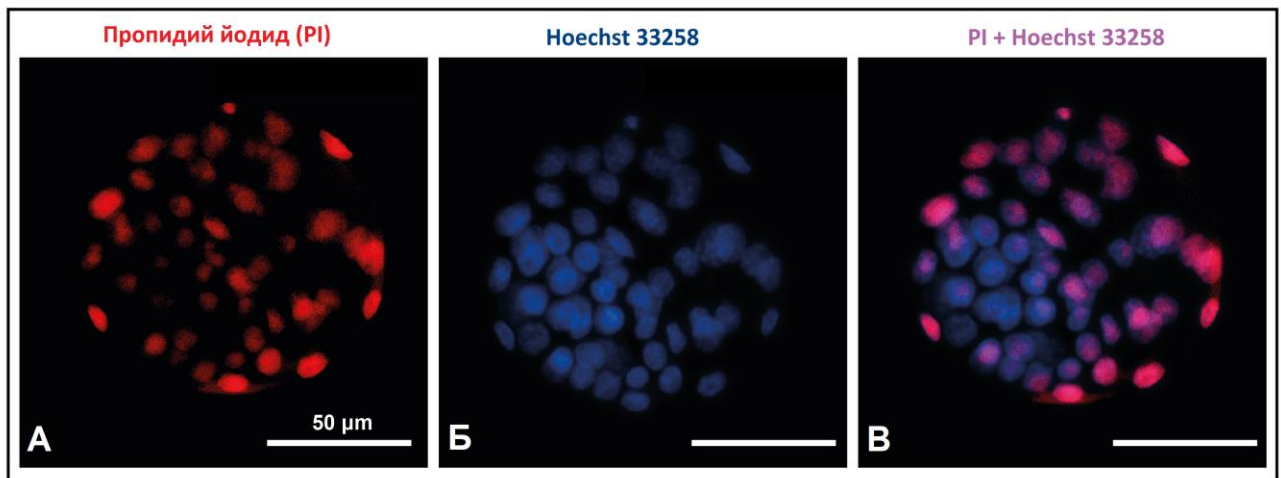


Рисунок 5 – Дифференциальное окрашивание внутриклеточной массы (ВКМ) и трофэктодермы (ТЕ) бластоцисты. А – краситель пропидий йодид (PI) (красный цвет) окрашивает только клетки ТЕ; Б – краситель Hoechst 33258 (синий цвет) окрашивает все клетки бластоцисты; В – объединенное изображение. Снимки получены с помощью прибора Lionheart FX (20x)

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

Для определения уровня метилирования использовали метод иммунофлуоресцентной визуализации связывания антител с высокой специфичностью к 5-метилцитозину (5-meC), описанный Beaujean et al. [34] и адаптированный для исследования мышинных эмбрионов на разных стадиях дробления. Эмбрионы окрашивали моноклональными антителами к 5-meC (Anti-5-methylcytosine antibody [33D3], Abcam, Великобритания). Для этого эмбрионы фиксировали 4% ПФА (Merck, Германия), затем помещали их в 1% раствор

Тритон X-100 (Merck, Германия) и промывали в промывочном буфере. Депуринизацию проводили с использованием 2 N HCl при 37 °C в течение 15 минут. Блокирование неспецифических сайтов связывания проводили с использованием бычьего сывороточного альбумина (БСА) (Merck, Германия). Для удаления остатков РНК инкубировали эмбрионы в растворе РНКазы А (Синтол, Россия) с PBS при 39 °C в течение 60 минут. Эмбрионы инкубировали с первичными антителами anti-5-meC (1:500) при 4 °C всю ночь, затем промывали и инкубировали со вторичными антителами Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen, США) в концентрации 1:500 в течение 60 минут. После промывки следовала инкубация с пропидий йодидом (Merck, Германия) в PBS (25 мкг/мл) и перенос на предметные стекла (БиоВитрум, Россия), покрытые раствором poly-L-lysine (Merck, Германия). Добавляли раствор, содержащий агент, препятствующий фотообесцвечиванию (Abcam, Великобритания), и накрывали препараты покровным стеклом.

Интенсивность флуоресценции подсчитывали на снимках, для получения которых использовали автоматический микроскоп Lionheart FX (Biotek, США). Использовали объектив 20x PI FL Phase (Olympus, Япония). Для красителя PI использовали лазер 523 LED (Biotek, США), фильтр куб PI 531/647 (Biotek, США). Для вторичных антител Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) использовали LED 465 (Biotek, США), фильтр куб GFP 469/525 (Biotek, США). Для съемки применяли следующие параметры: LED Intensity = 10, Camera Gain = 24, Brightness level = 50, Contrast Level = 33.

Общий уровень метилирования исследовали на стадии 2-х бластомеров, после инкубирования в течение 24 часов при температурах 35 °C, 37 °C и 39 °C, и при постоянной температуре инкубации 37 °C на стадиях 4-х и 8-и бластомеров. Оценку интенсивности флуоресценции проводили в программе Image J (рисунок б). Обводили по периметру светящиеся ядра бластомеров, делали их измерения, а также измерения фона (бэкграунда). Скорректированную общую флуоресценцию клеток высчитывали индивидуально для каждого эмбриона по следующей

формуле: от интегрированной плотности отнимали произведение площади выбранной клетки и средней флуоресценции фоновых показателей.

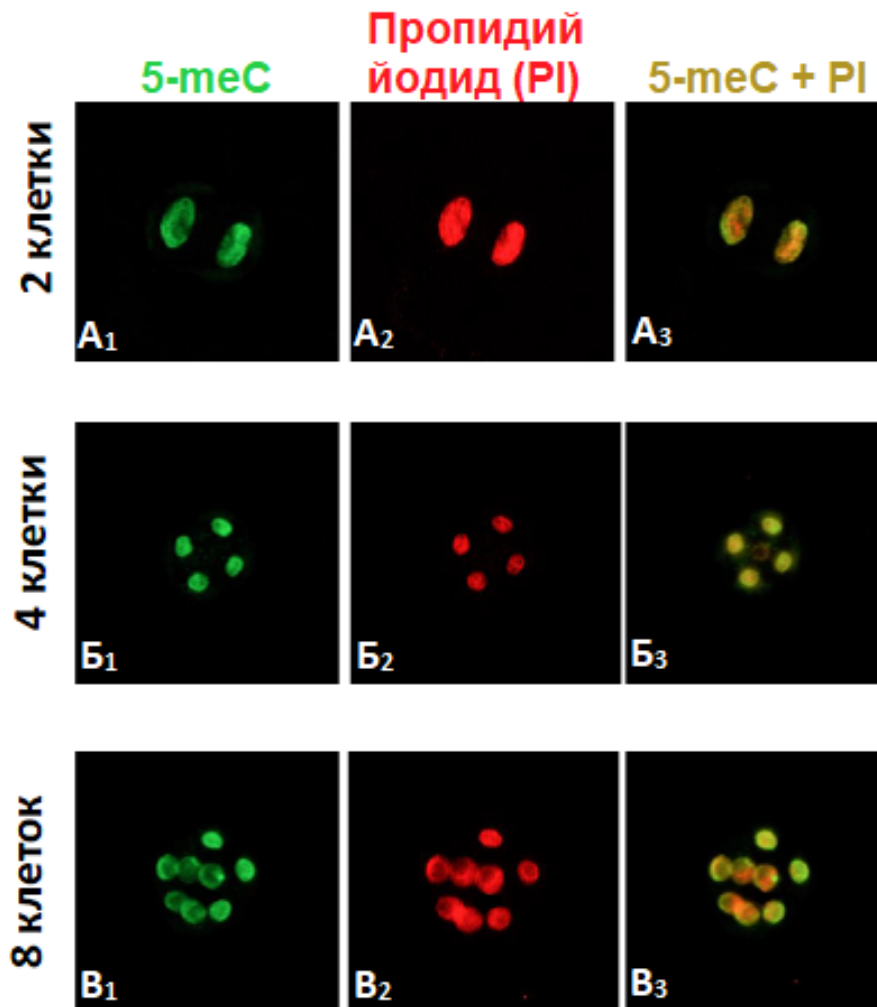


Рисунок 6 – Иммунофлуоресцентное окрашивание эмбрионов антителами к 5-метилцитозину (5-meC). A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> – снимки окрашенного 2-клеточного эмбриона; B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> – снимки окрашенного 4-клеточного эмбриона; B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> – снимки окрашенного 8-клеточного эмбриона. A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>1</sub> – снимки эмбрионов, окрашенных антителами к 5-метилцитозину (5-meC); A<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>2</sub> – снимки эмбрионов, окрашенных пропидий йодидом (PI); A<sub>3</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>3</sub> – объединенное изображение эмбрионов, окрашенных анти-5-meC и PI. Снимки получены с помощью прибора Lionheart FX (20x)

Отношения интенсивности флуоресценций 5-метилцитозина (5-meC) и пропидия йодида (PI) измеряли в эмбрионах, после 24 часов инкубирования при 35 °C (n = 43), 37 °C (n = 33) и 39 °C (n = 37), на стадиях 2, 4 и 8 клеток. В качестве контроля использовали эмбрионы на разных стадиях развития,

полученные при естественном оплодотворении (*in vivo*), вымытые из репродуктивных путей самок (n = 47). Общий уровень метилирования выражен как  $\log_2\left(\frac{5mC}{PI}\right)$ , где 5-mC – интенсивность окрашивания антителами к 5-mC, а PI – интенсивность окрашивания ДНК. Была проведена коррекция  $\log_2\left(\frac{5mC}{PI}\right)$  на групповой эффект (batch effect). Были измерены такие показатели метилирования ДНК как среднее метилирование и меж-индивидуальная изменчивость метилирования (между эмбрионами).

#### 2.3.4. Статистический анализ

Для анализа времени достижения эмбрионами различных стадий использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Для определения статистической значимости использовали *post-hoc* Fisher LSD-test. Для анализа размеров бластомеров использовали двухфакторный дисперсионный анализ (two-way Factorial ANOVA), показывающий значимость влияния факторов температуры, числа клеток и взаимодействия этих факторов. Для определения влияния вида дробления (синхронное или асинхронное) на скорость достижения 4-х и 8-и клеточных стадий применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), на размеры бластомеров – двухфакторный дисперсионный анализ (two-way Factorial ANOVA), показывающий значимость влияния вида дробления, числа клеток и взаимодействия этих факторов. Для анализа числа клеток ВКМ, ТЕ и общего числа клеток бластоцисты использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Для анализа среднего уровня метилирования ДНК и дисперсии использовали двухфакторный дисперсионный анализ (two-way Factorial ANOVA), показывающий значимость влияния факторов температуры, числа клеток и взаимодействия этих факторов. Для определения статистической значимости применяли *t*-тест Стьюдента с поправкой Бонферрони. Доля рожденных потомков от числа подсаженных 2-х клеточных эмбрионов в разных группах оценивалась с помощью критерия хи-квадрат ( $\chi^2$ ). Для анализа массы

потомков применяли ковариационный анализ (ANCOVA) с ковариатой по числу потомков в помете. Для анализа влияния температуры инкубации на такие характеристики потомков, как потребление кислорода ( $O_2$ ), выделение углекислого газа ( $CO_2$ ), значение дыхательного коэффициента (RQ), продолжительность сна, пройденное расстояние, потребление корма и воды, был проведен однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Статистическую значимость считали при  $p < 0.05$ . Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $M \pm SEM$ ). Для анализа данных использовали программу Statistica 10.



### 3. Результаты

#### 3.1. Время первого эмбрионального дробления

Был проведен анализ времени слияния пронуклеусов (pronuclear fading) и дробления зигот до 2-х клеточной стадии с использованием time-lapse микроскопии. Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) показал существенное влияние температуры инкубирования в течение первых 24 часов: 35 °C (n = 42), 37 °C (n = 56) и 39 °C (n = 84) на скорость слияния пронуклеусов и скорость дробления зиготы до 2-х клеточной стадии (таблица 1).

Таблица 1 – Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) влияния температуры инкубирования в течение первых 24 часов (35 °C, 37 °C и 39 °C) на скорость слияния пронуклеусов и скорость перехода на 2-х клеточную стадию ( $p < 0.001$ )

Время	<i>F</i>	<i>p</i>
Слияние пронуклеусов (T1)	95.058	0.000
Дробление на 2 клетки (T2)	117.510	0.000
$\Delta T2-T1$	46.597	0.000

Слияние пронуклеусов происходило быстрее в группе 39 °C, медленнее – в группе 35 °C. Время перехода на 2-клеточную стадию последовательно снижалось от 35 °C до 39 °C (рисунок 7). Эффективность оплодотворения как показатель качества проведения ЭКО представлена в таблице 2. Число 2-х клеточных эмбрионов от зигот по группам существенно не различалось (35 °C × 37 °C:  $\chi^2 = 1.84$ ,  $p = 0.17$ ; 35 °C × 39 °C:  $\chi^2 = 1.04$ ,  $p = 0.31$ ; 37 °C × 39 °C:  $\chi^2 = 0.15$ ,  $p = 0.70$ ). Таким образом, температура инкубирования зигот существенно влияла на такие параметры первого эмбрионального дробления, как скорость слияния пронуклеусов и скорость перехода на 2-х клеточную стадию.

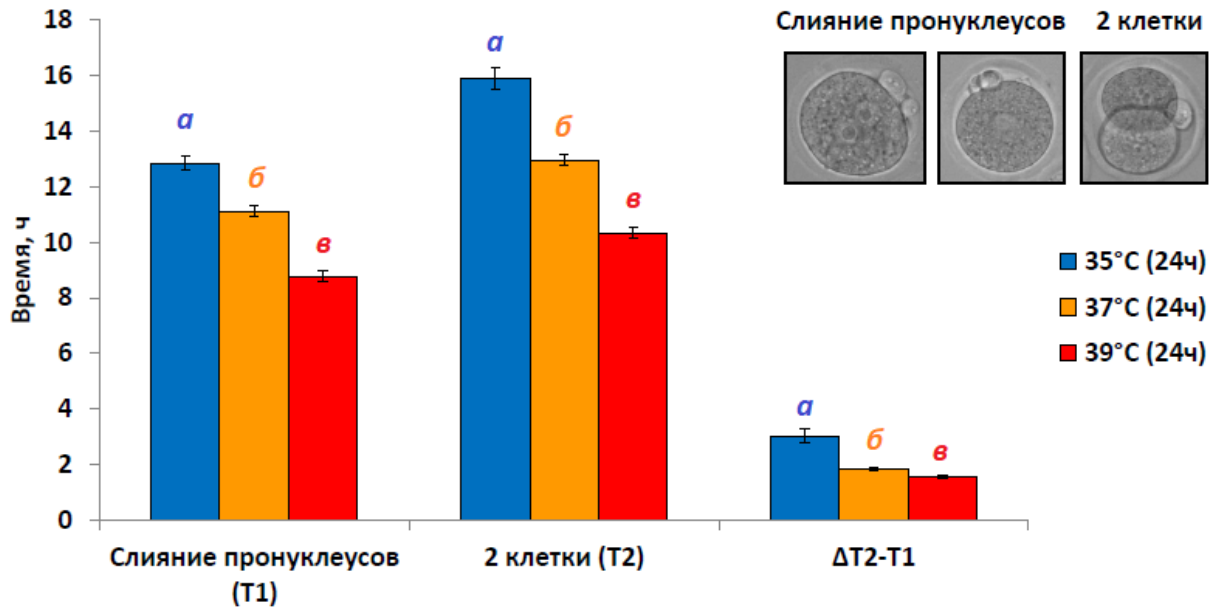


Рисунок 7 – Время первого эмбрионального дробления (часы). T1 – время, за которое происходило слияние пронуклеусов в зиготе, T2 – время достижения 2-х клеточной стадии,  $\Delta T2 - T1$  – разница между ними. Достоверности обозначены разными буквами (Fisher LSD-test:  $p < 0.05$ )

Таблица 2 – Эффективность оплодотворения при ЭКО: доля эмбрионов, прошедших первое дробление (%). Число 2-х клеточных эмбрионов от зигот по группам существенно не различалось ( $35\text{ °C} \times 37\text{ °C}$ :  $\chi^2 = 1.84$ ,  $p = 0.17$ ;  $35\text{ °C} \times 39\text{ °C}$ :  $\chi^2 = 1.04$ ,  $p = 0.31$ ;  $37\text{ °C} \times 39\text{ °C}$ :  $\chi^2 = 0.15$ ,  $p = 0.70$ )

Группа	Число зигот	Число 2-х клеточных эмбрионов	% зигот от 2-х клеточных эмбрионов
35 °C	121	88	72.7
37 °C	122	115	94.3
39 °C	122	108	88.5

### 3.2. Время достижения эмбрионами 4-х и 8-и клеточных стадий

Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) показал существенное влияние температуры инкубирования в течение первых 24 часов (35 °C, 37 °C, 39 °C и контрольная группа – *in vivo*) на скорость второго (4-х клеточная стадия) и третьего (8-и клеточная стадия) эмбриональных дроблений (таблица 3).

Таблица 3 – Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) влияния температуры инкубирования в течение первых 24 часов (35 °С, 37 °С, 39 °С и *in vivo*) на скорость перехода на 4-х и 8-и клеточные стадии (Т4, Т8 –  $p < 0.001$ ,  $\Delta T8 - T4 - p < 0.05$ )

Стадия дробления	<i>F</i>	<i>p</i>
Дробление на 4 клетки (Т4)	10.234	0.000
Дробление на 8 клеток (Т8)	15.117	0.000
$\Delta T8 - T4$	4.131	0.007

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 8). Влияние температуры инкубации зиготы на время перехода от 4-х клеток до 8-и клеток было максимальным в группах 35 °С и 39 °С ( $\Delta T8 - T4$ ). Число эмбрионов, прошедших второе и третье дробления, представлено в таблице 4. Число погибших эмбрионов на стадиях 4-х и 8-и клеток представлено на рисунке 9. Наибольший процент гибели эмбрионов зафиксирован в группе 35 °С, наименьший – в группе *in vivo*. Таким образом, температура инкубирования в первые 24 часа развития эмбриона существенно влияла на скорость перехода на 4-х и 8-и клеточные стадии, а также на эмбриональную гибель.

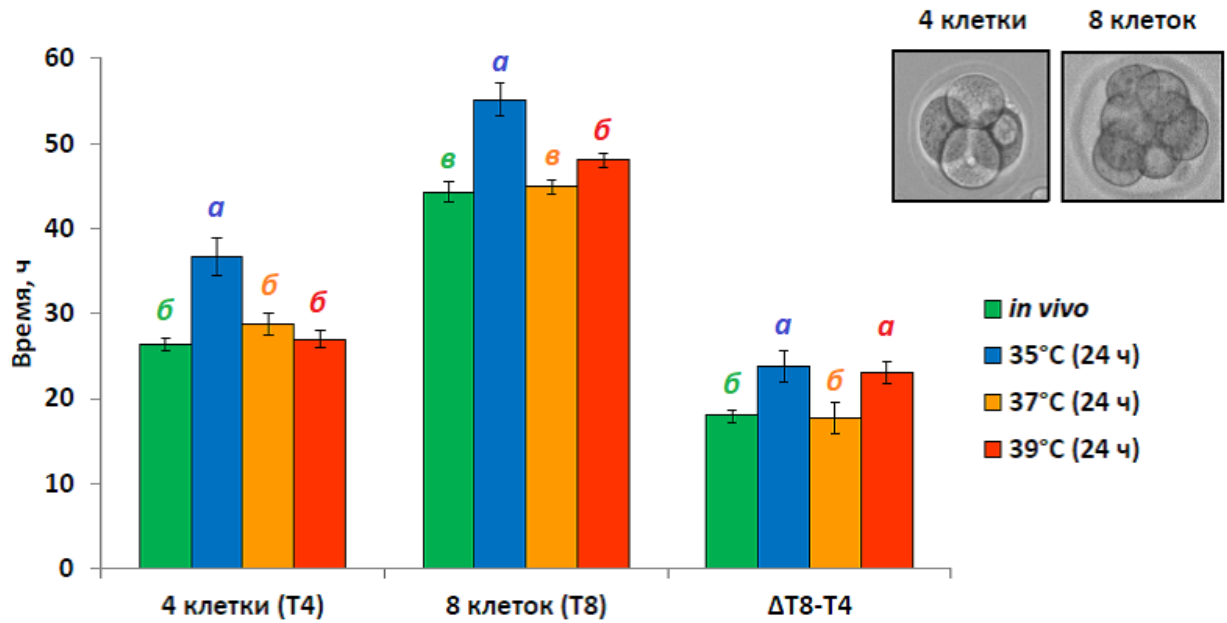


Рисунок 8 – Время достижения 4-х и 8-и клеточных стадий (часы). T4 – время, за которое эмбрионы достигали 4-х клеточной стадии, T8 – 8-и клеточной стадии, ΔT8 - T4 – разница между ними. Достоверности обозначены разными буквами (Fisher LSD-test:  $p < 0.05$ )

Таблица 4 – Число эмбрионов, поделившихся до 4-х и 8-и клеточных стадий, доля от числа 2-х клеточных эмбрионов (%)

Группа	Число 2-х клеточных эмбрионов	Число 4-х клеточных эмбрионов	% 4-х клеточных от 2-х клеточных	Число 8-и клеточных эмбрионов	% 8-и клеточных от 2-х клеточных
<i>in vivo</i>	33	29	87.8	29	87.9
35 °C	43	37	86.1	24	55.8
37 °C	56	54	96.4	45	80.4
39 °C	64	60	93.8	52	81.3

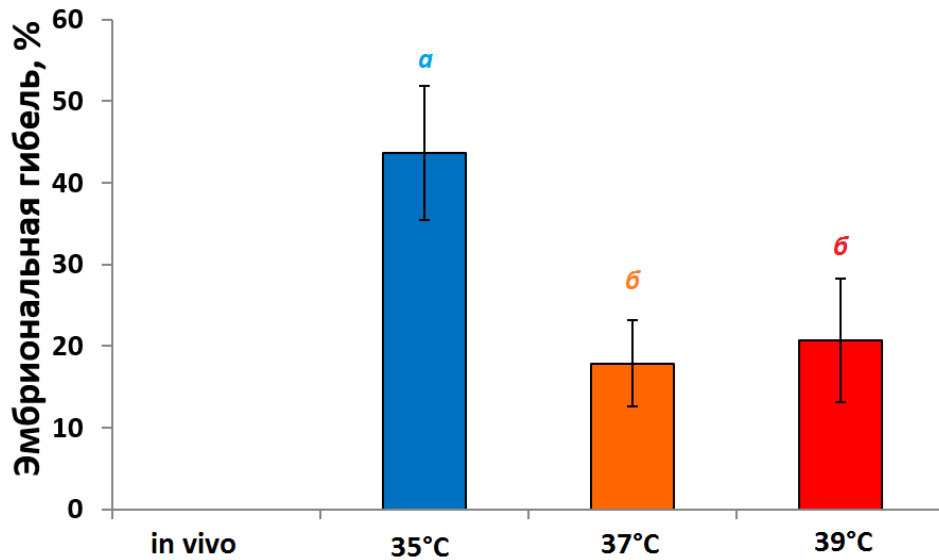


Рисунок 9 – Эмбриональная гибель на стадиях 2-го (4 клетки) и 3-го (8 клеток) дроблений (проценты). Достоверности обозначены разными буквами (Fisher LSD-test:  $p < 0.05$ )

### 3.3. Размеры бластомеров

Анализ снимков эмбрионов выявил различия в размерах бластомеров. Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) показал, что на размеры бластомеров существенно влияли температура инкубации (35 °C, 37 °C, 39 °C и контрольная группа – *in vivo*), число клеток (2 и 4 клетки) и взаимодействие этих факторов (таблица 5).

Таблица 5 – Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) влияния температуры инкубации (35 °C, 37 °C, 39 °C и *in vivo*), числа клеток (2 и 4 клетки) и взаимодействия этих факторов на размеры бластомеров

Факторы	<i>F</i>	<i>p</i>
Температура	68.04	0.000
Число клеток	2638.39	0.000
Температура × Число клеток	3.60	0.001

Минимальную площадь бластомеров наблюдали в группе 35 °C, в сравнении с группами 37 °C, 39 °C и *in vivo*. Размеры бластомеров уменьшались при увеличении числа клеток. На стадии 4-х клеток наибольшая площадь бластомеров была выявлена в группах *in vivo* и 37 °C, наименьшая – в группе 35 °C (рисунок

10). Число эмбрионов ( $n$ ), у которых измеряли размеры бластомеров, представлено в таблице 6. Таким образом, температура инкубирования в первые 24 часа развития эмбриона существенно влияла на размеры бластомеров.

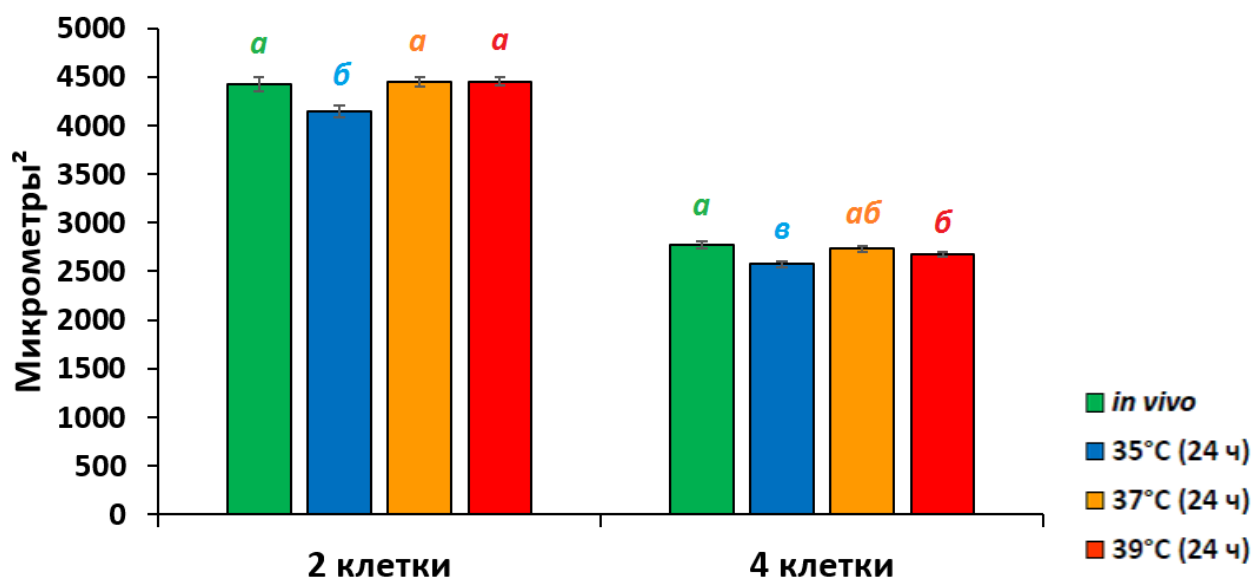


Рисунок 10 – Площади бластомеров на стадиях 2-х и 4-х клеток (микрометры<sup>2</sup>). Достоверности обозначены разными буквами (Fisher LSD-test:  $p < 0.05$ )

Таблица 6 – Число эмбрионов ( $n$ ) разных групп, у которых были измерены размеры бластомеров на стадиях 2-х, 3-х и 4-х клеток

Группа	2 клетки (число эмбрионов)	3 клетки (число эмбрионов)	4 клетки (число эмбрионов)
<i>in vivo</i>	65	33	57
35 °C	417	42	29
37 °C	228	74	141
39 °C	205	24	115

### 3.4. Синхронность и асинхронность дробления

Использование *time-lapse* микроскопии позволило проанализировать синхронность дробления 2-х клеточных эмбрионов. При синхронном дроблении происходил переход от 2-х клеток сразу к 4-м бластомерам, а при асинхронном дроблении – от 2-х клеток к 3-м бластомерам и только затем к 4-м.

Статистически значимых различий между группами не выявлено. Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) выявил существенное влияние

вида дробления на скорость, с которой эмбрионы достигают 4-х и 8-и клеточных стадий (таблица 7). При этом вид дробления не влияет на разницу во времени между 4-х и 8-и клеточными стадиями. Синхронно поделившиеся эмбрионы достигали стадий 4-х и 8-и клеток быстрее, чем асинхронно поделившиеся (рисунок 11).

Таблица 7 – Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) влияния вида дробления (синхронное или асинхронное) на скорость перехода на 4-х и 8-и клеточные стадии

Стадия дробления	<i>F</i>	<i>p</i>
Дробление на 4 клетки (Т4)	25.170	0.000
Дробление на 8 клеток (Т8)	3.964	0.048
ΔТ8 - Т4	2.168	0.143

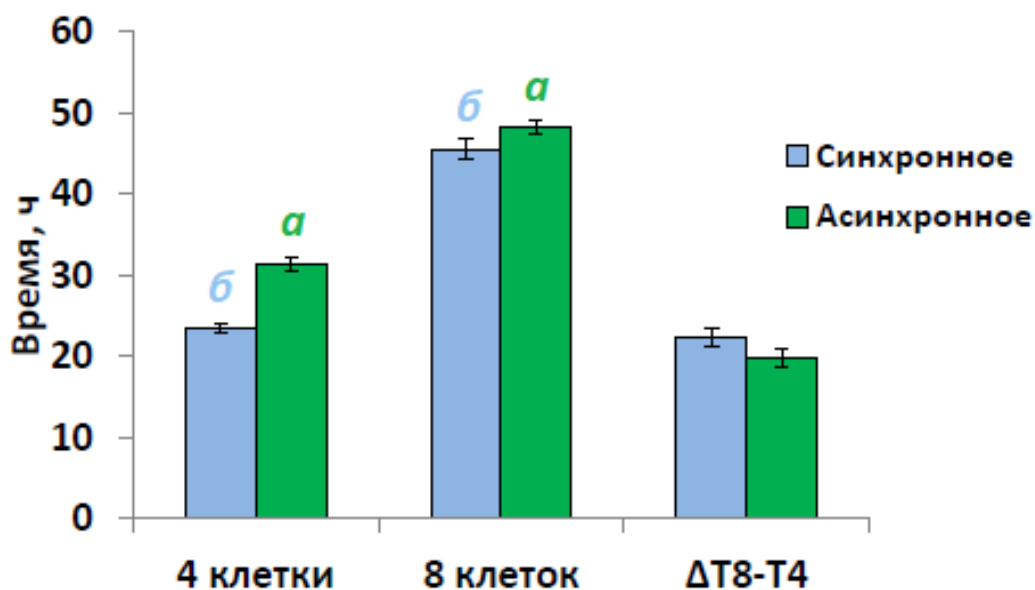


Рисунок 11 – Скорость дробления синхронно и асинхронно поделившихся эмбрионов (часы). Т4 – время, за которое эмбрионы достигали 4-х клеточной стадии, Т8 – 8-и клеточной стадии, ΔТ8 - Т4 – разница между ними.

Достоверности обозначены разными буквами (Fisher LSD-test:  $p < 0.05$ )

С помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) было выявлено влияние синхронности или асинхронности дробления на размеры бластомеров у 2-х и 4-х клеточных эмбрионов. На размеры бластомеров влияли такие факторы, как число клеток, вид дробления и взаимодействие этих факторов (таблица 8). Синхронно поделившиеся эмбрионы на стадии 2-х клеток имели

более крупные размеры бластомеров, чем асинхронно поделившиеся (рисунок 12). Таким образом, синхронность или асинхронность дробления влияла на скорость, с которой эмбрионы достигают 4-х и 8-и клеточных стадий, а также на размеры бластомеров эмбрионов.

Таблица 8 – Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) влияния вида дробления (синхронное или асинхронное), числа клеток (2 или 4 клетки) и взаимодействия этих факторов на размеры бластомеров

Факторы	<i>F</i>	<i>p</i>
Дробление	2981.7	0.000
Число клеток	7.75	0.000
Дробление × число клеток	3.40	0.001

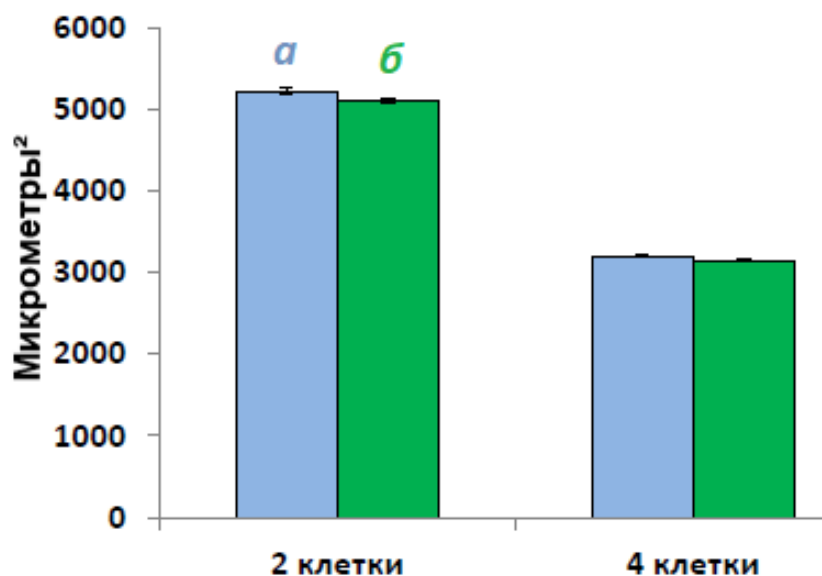


Рисунок 12 – Площади бластомеров синхронно и асинхронно поделившихся эмбрионов (микрометры<sup>2</sup>). Достоверности обозначены разными буквами (Fisher LSD-test:  $p < 0.05$ )

### 3.5. Число клеток внутриклеточной массы (ВКМ) и трофэктодермы (ТЕ) бластоцисты

Для подсчета числа клеток ВКМ и ТЕ, а также общего числа клеток, нами было проведено дифференциальное окрашивание бластоцист: *in vivo* ( $n = 43$ ), 35 °C ( $n = 33$ ), 37 °C ( $n = 29$ ), 39 °C ( $n = 17$ ). Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) показал, что температура инкубирования в первые 24 часа (35 °C, 37



°С, 39 °С и контрольная группа – *in vivo*) влияет на число клеток ТЕ и общее число клеток, а также на отношение ВКМ к ТЕ (таблица 9).

Таблица 9 – Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) влияния температуры инкубации (35 °С, 37 °С, 39 °С и *in vivo*) на число клеток ВКМ, ТЕ и общее число клеток

Число клеток	<i>F</i>	<i>p</i>
ВКМ	1.524	0.212
ТЕ	5.852	0.000
Общее число клеток	5.014	0.002
Отношение ВКМ/ТЕ	3.296	0.022

Общее число клеток было наибольшим в контрольной группе и группе 37 °С. Наименьшее число клеток трофэктодермы зафиксировано в группе 35 °С (рисунок 13). При этом отношение ВКМ к ТЕ было наибольшим в группе 35 °С (рисунок 14). Таким образом, температура инкубирования в первые 24 часа развития эмбриона существенно влияла на число клеток ТЕ, общее число клеток, а также отношение ВКМ к ТЕ.

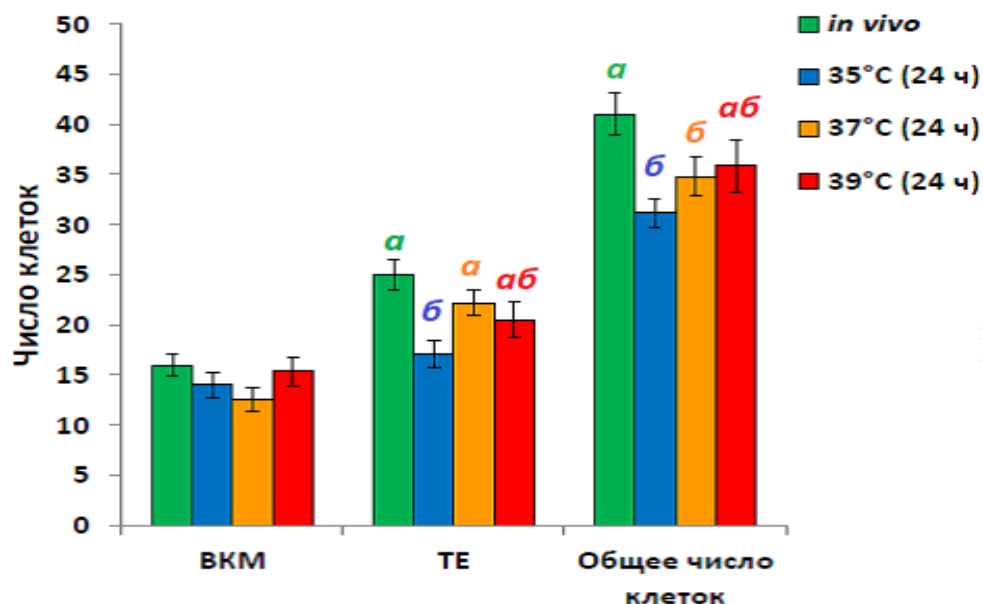


Рисунок 13 – Число клеток ВКМ и ТЕ, а также общее число бластомеров бластоцист. Достоверности обозначены разными буквами (Fisher LSD-test:  $p < 0.05$ )

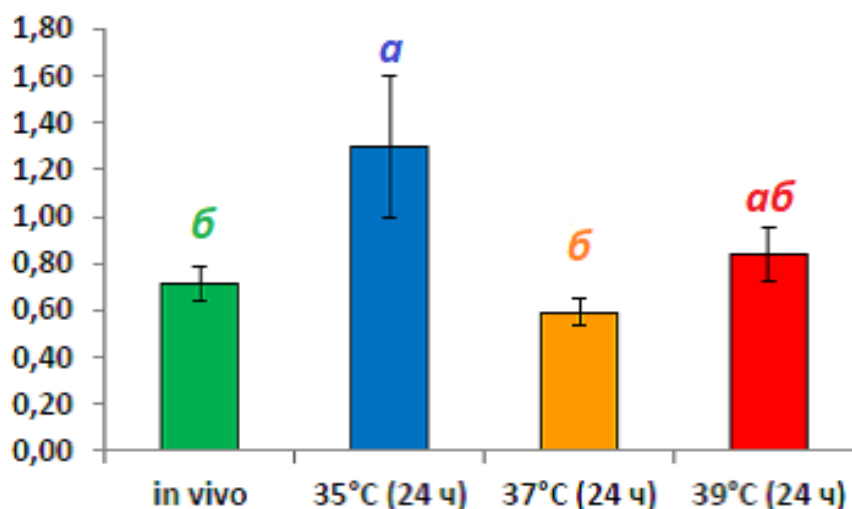


Рисунок 14 – Отношение ВКМ к ТЕ. Достоверности обозначены разными буквами (Fisher LSD-test:  $p < 0.05$ )

### 3.6. Общее метилирование ДНК (5-meC)

С помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) установлено, что на общее метилирование ДНК влияли такие факторы, как температура инкубирования в первые 24 часа: *in vivo* ( $n = 47$ ), 35 °C ( $n = 33$ ), 37 °C ( $n = 37$ ), 39 °C ( $n = 47$ ), число клеток, а также взаимодействие этих факторов (таблица 10).

Таблица 10 – Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) влияния температуры инкубирования в течение первых 24 часов (35 °C, 37 °C, 39 °C и *in vivo*), числа клеток и взаимодействия этих факторов на индекс общего метилирования ДНК ( $\mu$ :  $\log_2$  5-meCH1)

Факторы	<i>F</i>	<i>P</i>
Температура	3.15	0.024
Число клеток	3.84	0.022
Температура × число клеток	2.15	0.046

Средние значения уровня 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 °С и 37 °С, по сравнению с группами 39 °С и контролем. При этом, межэмбриональная флуктуация метилирования была выше у эмбрионов групп 37 °С и 39 °С, а дисперсия в группе 35 °С статистически не отличалась от контроля (рисунок 15). Таким образом, температура инкубирования эмбрионов в первые 24 часа влияла на средний уровень общего метилирования ДНК и дисперсию.

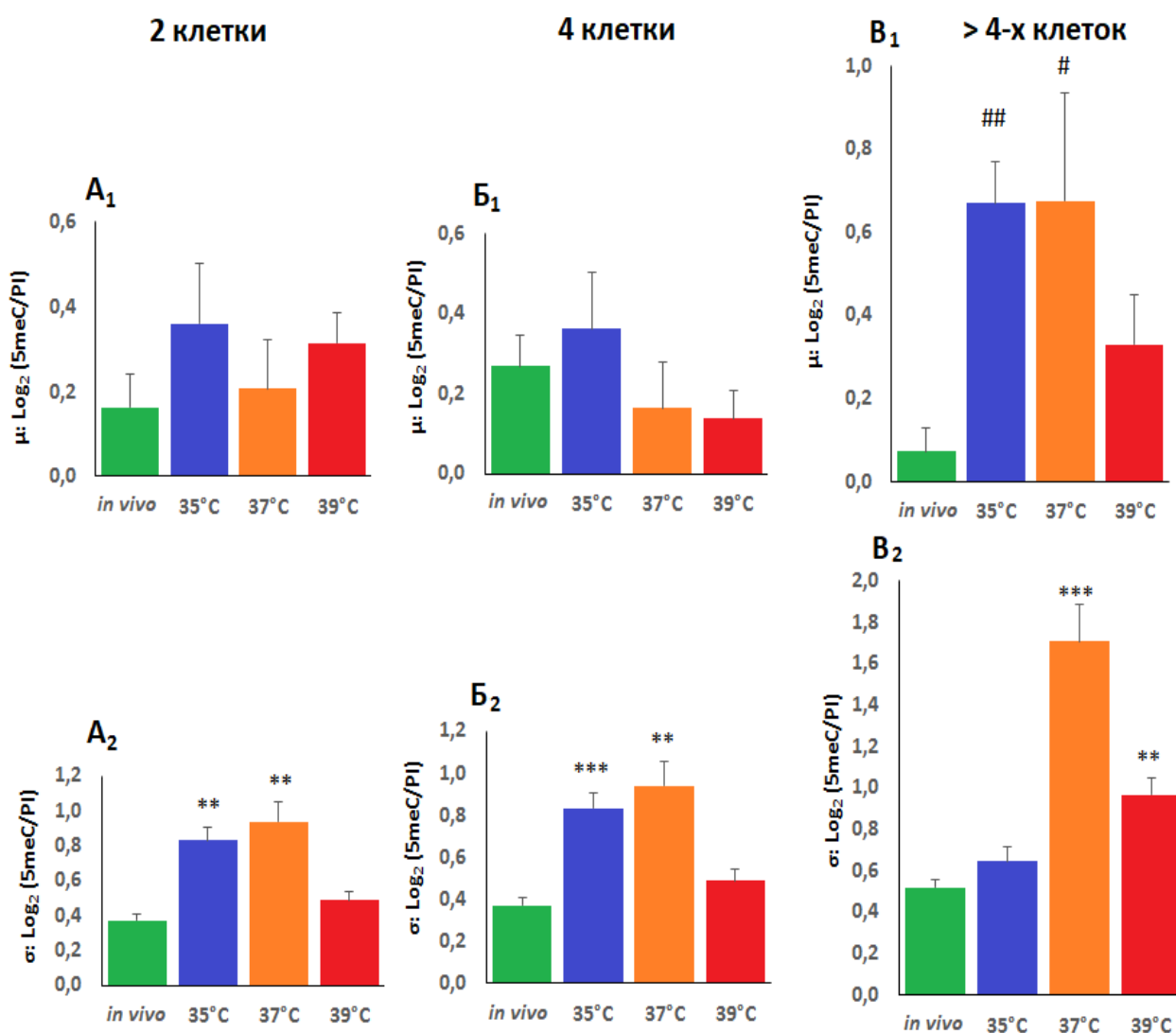


Рисунок 15 – Средний уровень и дисперсия общего метилирования ДНК в ходе доимплантационного развития.  $A_1$  и  $A_2$  - средние значения метилирования ( $\mu$ ) и стандартного отклонения ( $\sigma$ ) на стадии 2-х клеток;  $B_1$  и  $B_2$  -  $\mu$  и  $\sigma$  на стадии 4-х клеток;  $B_1$  и  $B_2$  -  $\mu$  и  $\sigma$  на стадии более 4-х клеток. # -  $p < 0.05$ , ## -  $p < 0.01$  в сравнении с контролем (Fisher LSD test); \*\* -  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  в сравнении с контролем ( $t$ -тест Стьюдента с поправкой Бонферрони)

### 3.7. Подсадки эмбрионов самкам-реципиентам

Эмбрионы на стадии 2-х клеток после 24-х часов инкубирования при 35 °С (n = 199), 37 °С (n = 151) и 39 °С (n = 194) были подсажены в яйцеводы самок-реципиентов. Было проанализировано число рожденных потомков (таблица 11). В качестве контроля использовали естественное оплодотворение.

Таблица 11 – Подсадки 2-х клеточных эмбрионов самкам-реципиентам

Группа	Число подсаженных 2-х клеточных эмбрионов	Число самок-реципиентов	Число родивших самок	Число рожденных потомков	Число потомков на момент отъема (3 недели)
<i>in vivo</i>	-	-	6	56	56
35 °С	199	13	8	50	49
37 °С	151	10	5	26	25
39 °С	194	14	3	5	3

Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) выявил, что температура инкубации в первые 24 часа развития влияет на среднее число рожденных потомков в помете:  $F = 9.873$ ,  $p = 0.000$ . Наибольшее среднее число потомков в помете зафиксировано в контрольной группе *in vivo*, наименьшее – в группе 39 °С (рисунок 16). Была подсчитана доля рожденных потомков от числа подсаженных самкам-реципиентам 2-х клеточных эмбрионов. Наименьшее число потомков родилось в группе 39 °С. Число потомков в группах 35 °С и 37 °С достоверно не различалось (рисунок 17). Таким образом, температура инкубирования в первые 24 часа развития эмбриона существенно влияла на среднее число рожденных потомков в помете.

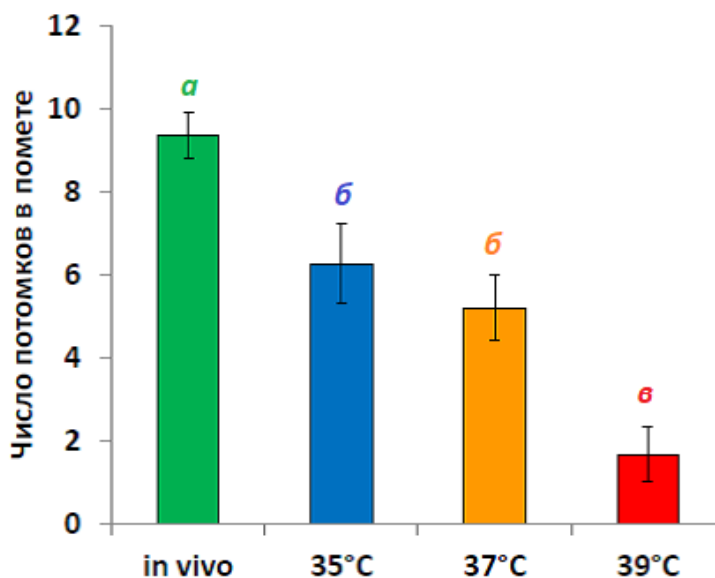


Рисунок 16 – Среднее число рожденных потомков в помете. Достоверности обозначены разными буквами (Fisher LSD-test:  $p < 0.05$ )

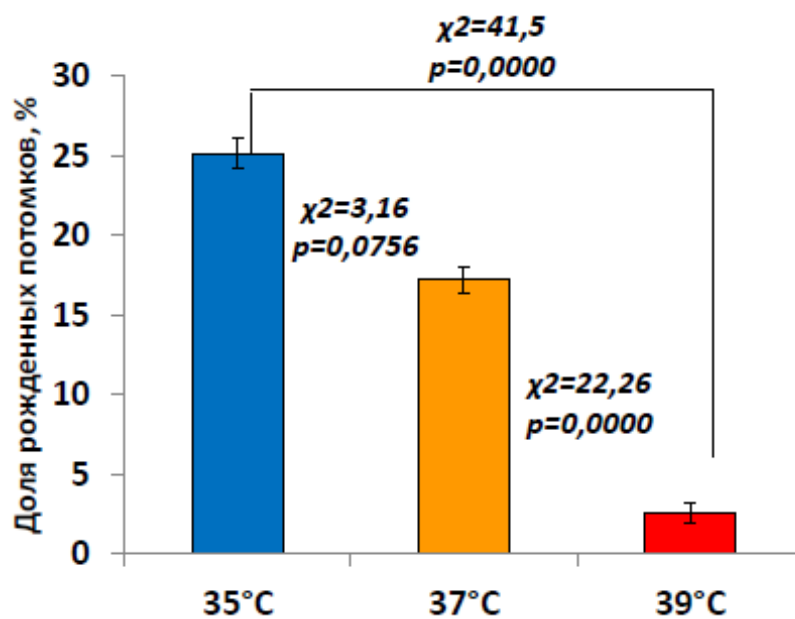


Рисунок 17 – Доля рожденных потомков от числа подсаженных 2-х клеточных эмбрионов (проценты). Достоверности представлены критерием хи-квадрат ( $\chi^2$ )

### 3.8. Масса потомков

Был проведен двухфакторный дисперсионный анализ влияния температуры инкубирования эмбрионов в течение первых 24 часов (35 °C, 37 °C, 39 °C и *in vivo*) на массу потомков с ковариатой по числу потомков в помете (ANCOVA). Фактор температуры инкубирования эмбрионов не влиял на массу потомков, а

фактор числа потомков в помете влиял на массу потомков до 8-и недельного возраста (таблица 12, рисунок 18). Число взвешенных потомков представлено в таблице 13. Таким образом, температура инкубирования в первые 24 часа развития эмбриона не влияла на массу рожденных потомков. На массу в возрасте 3-х и 8-и недель влияло число потомков в помете.

Таблица 12 – Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) влияния температуры инкубирования эмбрионов в течение первых 24 часов (35 °С, 37 °С, 39 °С и *in vivo*) и числа потомков в помете на массу потомков возрастом 3, 8, 18 и 24 недели

Возраст	3 недели		8 недель		18 недель		24 недели	
	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Число в помете	73.476	0.000	34.289	0.000	0.004	0.948	2.409	0.131
Температура	0.588	0.623	1.931	0.127	0.014	0.985	0.295	0.746

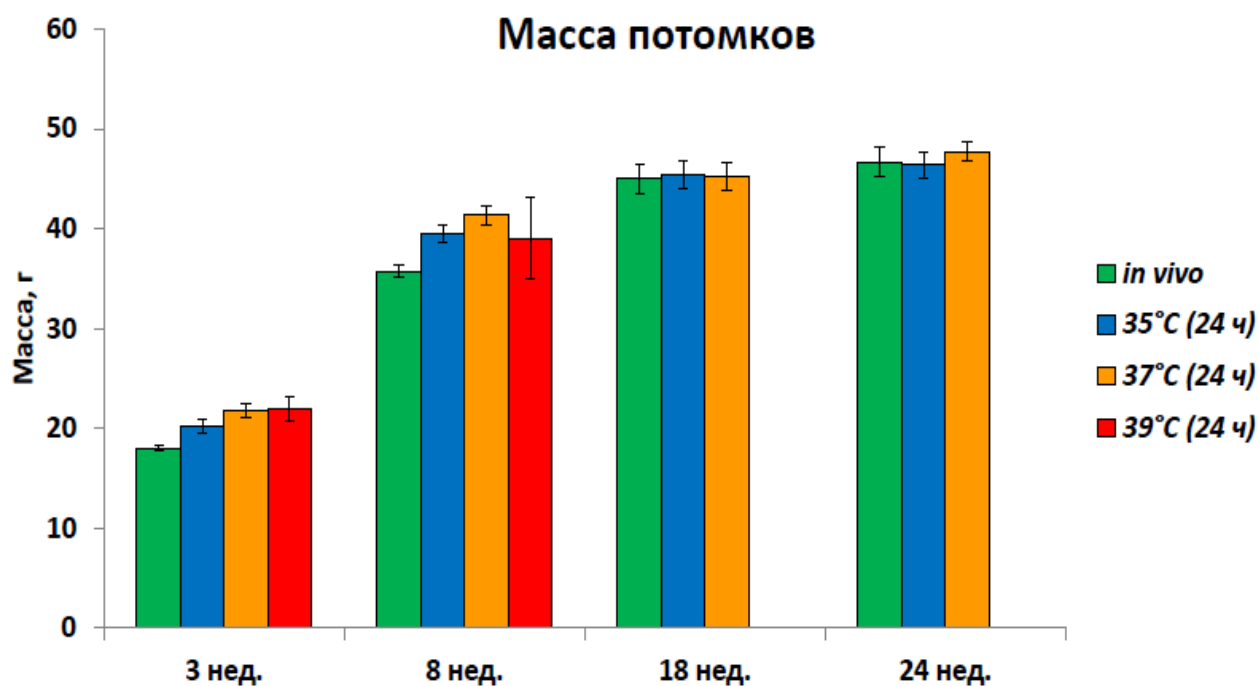


Рисунок 18 – Масса потомков в возрасте 3-х, 8-и, 18-и и 24-х недель (граммы).

Таблица 13 – Число взвешенных потомков

Группа	Масса (3 нед.)	Масса (8 нед.)	Масса (18 нед.)	Масса (24 нед.)
<i>in vivo</i>	56	56	8	8
35 °С	49	48	12	12
37 °С	25	23	12	12
39 °С	3	3	0	0

### 3.9. Морфофункциональные характеристики потомков

Морфофункциональные характеристики потомков разных групп: 35 °С (n = 12), 37 °С (n = 12) и *in vivo* (n = 8) были проанализированы с помощью прибора Phenomaster. Был проведен однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) влияния температуры инкубации в первые 24 часа развития на такие характеристики потомков, как потребление кислорода (O<sub>2</sub>), выделение углекислого газа (CO<sub>2</sub>), значение дыхательного коэффициента (RQ), продолжительность сна, пройденное расстояние, потребление корма и воды (таблица 14).

Таблица 14 – Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) влияния температуры инкубации в первые 24 часа развития на такие характеристики потомков, как потребление кислорода (O<sub>2</sub>), выделение углекислого газа (CO<sub>2</sub>), значение дыхательного коэффициента (RQ), продолжительность сна, пройденное расстояние, потребление корма и воды

№	Время суток	Свет		Темнота	
		<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
1	Потребление O <sub>2</sub>	2.29	0.12	2.89	0.07
2	Выделение CO <sub>2</sub>	2.69	0.08	3.30	0.05
3	Дыхательный коэффициент (RQ)	2.67	0.08	0.36	0.70
4	продолжительность сна	4.76	0.01	0.49	0.61
5	Пройденное расстояние	3.95	0.03	1.17	0.19
6	Потребление корма	3.45	0.04	0.42	0.66
7	Потребление воды	4.13	0.02	3.21	0.05

Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) показал, что температура инкубации в первые 24 часа развития влияет на выделение углекислого газа ( $\text{CO}_2$ ) в темное время, продолжительность сна в светлое время, пройденное расстояние в светлое время, потребление корма в светлое время и потребление воды и в светлое, и в темное время (таблица 14, рисунок 19). Таким образом, потомки из экспериментальных групп (35 °C и 37 °C) характеризуются большей двигательной активностью, особенно в светлое время, большим потреблением корма и воды в сочетании с меньшей продолжительностью сна, и, следовательно, большим энергетическим обменом, по сравнению с контрольной группой животных.



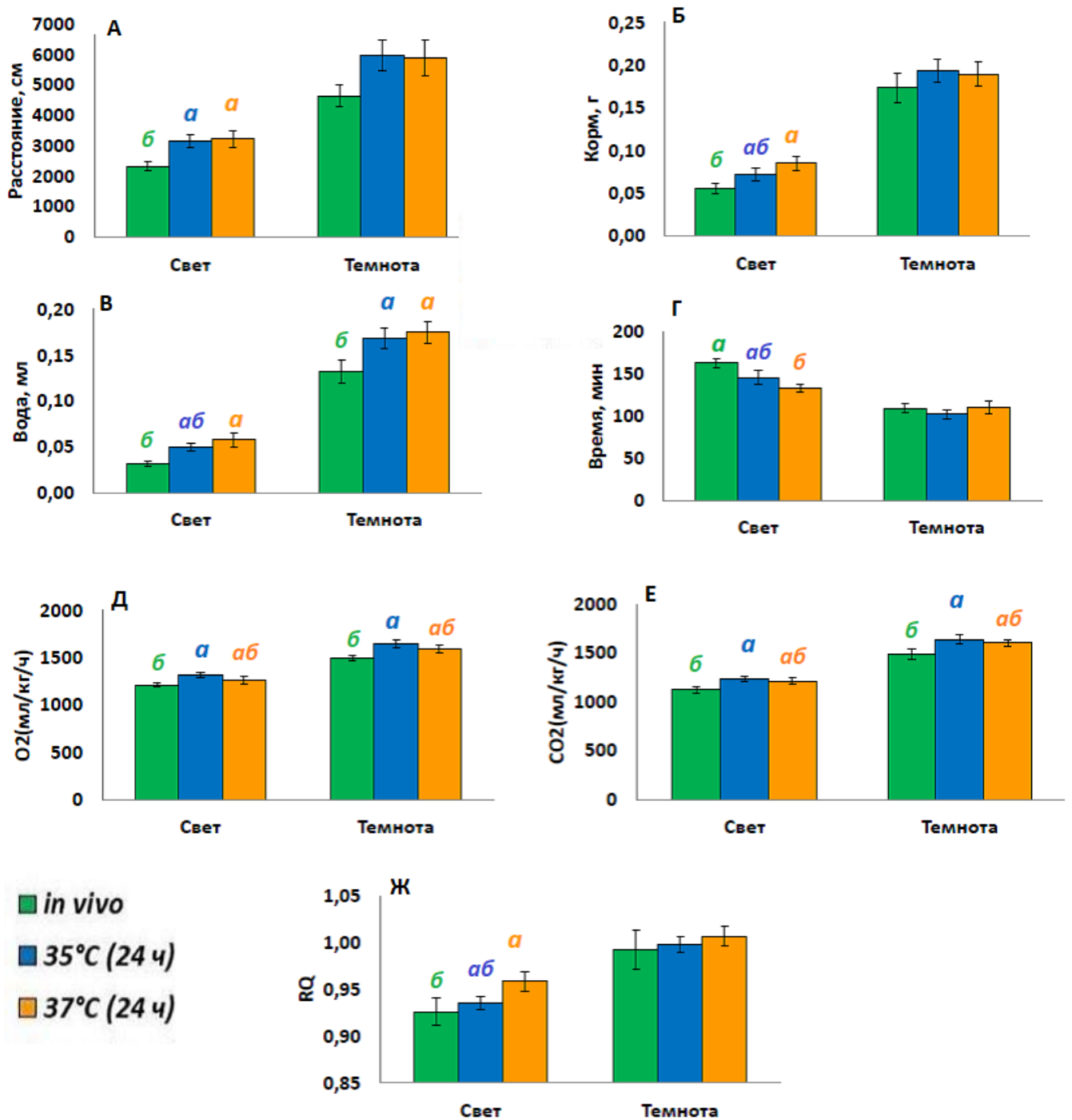


Рисунок 19 – Фенотипические характеристики потомков. А – расстояние, пройденное за час (см); Б – потребление корма за час (г); В – потребление воды за час (мл); Г – продолжительность сна (мин); Д – потребление кислорода (O<sub>2</sub>) за час (мл/кг/ч); Е – выделение углекислого газа (CO<sub>2</sub>) за час (мл/кг/ч); Ж – дыхательный коэффициент (RQ). Достоверности обозначены разными буквами (Fisher LSD-test:  $p < 0.05$ )

#### 4. Обсуждение

На сегодняшний день ЭКО является широко применяемой процедурой, с его помощью родилось более 8 миллионов человек [1], и еще более масштабным является его использование при создании и сохранении генетических коллекций лабораторных животных, а также при тиражировании высокопродуктивных сельскохозяйственных животных. Однако, есть исследования, показывающие, что люди, рожденные при помощи ВРТ имеют более высокий, чем в контрольной группе, риск развития диабета, нарушений обмена веществ, артериальной гипертензии и нейропсихических расстройств [2]. Кроме того, наблюдается повышенный риск развития таких генетических патологий, как синдром Беквита-Видемана, синдром Ангельмана и синдром Рассела-Сильвера [3].

Причинами данных нарушений могут быть как непосредственное влияние самой процедуры ЭКО, так и индивидуальные особенности людей, которые обращаются к ВРТ для зачатия и рождения ребенка. Поэтому, опираясь только на клинические наблюдения, трудно дифференцировать вклад в потенциальные нарушения здоровья самой процедуры ЭКО и генетико-физиологических особенностей родителей. Благодаря широкому использованию лабораторных животных стала возможной оценка собственного эффекта процедуры ЭКО на морфофункциональные характеристики потомков, не связанного с возрастом и особенностями здоровья доноров ооцитов и сперматозоидов.

ЭКО и развитие эмбрионов до переноса в матку проходит в лабораторных условиях, а ведь доимплантационной стадии отводится наиболее критическая роль в эпигенетической модуляции онтогенеза. Именно на этой стадии происходит эпигенетическая трансформация зиготического генома. Процедура ЭКО, таким образом, нарушает стабильность пренатального развития. Проявлением дестабилизации онтогенеза является генетический шум (gene noise), который во многом определяется эпигенетическими факторами, такими как метилирование ДНК и пост-трансляционные модификации гистонов [10].

Для того чтобы проанализировать степень дестабилизации развития при ЭКО, мы выбрали для исследования наиболее контролируемый фактор – температуру инкубирования эмбрионов. Температура является одним из критических параметров, так как, помимо общеизвестного влияния на химические реакции, получены данные о влиянии температуры на нуклеосомы и активность ферментативного аппарата [12]. Кроме того, температура влияет на скорость метаболизма: при изменении (повышении или понижении) температуры всего на 0.5 °С–1.0 °С метаболическая активность изменяется на 5-10% [202].

Клиники ЭКО и центры репродукции животных в стремлении максимально приблизить лабораторные условия к естественным используют для культивирования эмбрионов температуру 37 °С, что соответствует внутренней температуре тела человека и многих млекопитающих [13]. Однако, согласно относительно недавно появившимся данным, в репродуктивном тракте женского организма зафиксирован температурный градиент. *In vivo* измерения у кроликов и свиней показали, что температура каудальной части истмуса (перешейка) на 1–2 °С ниже, чем в краниальной части ампулы [14]. Температура преовуляторных фолликулов (Граафовых пузырьков) кролика на 1–2 °С, свиней на 1.3–1.7 °С ниже, чем температура стромы яичника [12 – 14]. Преовуляторные фолликулы крупного рогатого скота имеют температуру примерно на 1.5 °С–2 °С ниже, чем температура стромы яичника или тела [178]. У человека температура зрелых фолликулов на ~2.3 °С ниже, чем строма яичника [16]. Кроме того, базальная температура женского организма может меняться в зависимости от фазы менструального цикла и времени овуляции из-за термогенных свойств прогестерона [18]. В течение лютеальной фазы менструального цикла базальная температура тела женщины поднимается на 0.31–0.46 °С [20, 21]. Такие заболевания, как эндометриоз и ожирение, также могут менять температурный градиент в репродуктивном тракте [11]. Таким образом, при естественном оплодотворении развитие эмбриона происходит в температурном градиенте – от более высокой при образовании зиготы к более низкой при последующем доимплантационном развитии.

Есть и противоположная точка зрения о том, что при использовании более низких температур начального инкубирования метаболизм эмбрионов замедляется, что согласно гипотезе Н. Leese «Тихий эмбрион», способствует большей жизнеспособности эмбрионов [24]. Установлено, что у эмбрионов человека на 2-ой и 3-ий дни культивирования в среде с 18-ю аминокислотами метаболизм ниже у тех эмбрионов, которые достигали стадии бластоцисты, по сравнению с теми, чье развитие останавливалось [25]. В другом исследовании бычьи эмбрионы с низким аминокислотным метаболизмом имели более высокую вероятность развития до стадии бластоцисты, чем эмбрионы с высоким метаболизмом [26]. Кроме того, потребление пирувата эмбрионами человека на 2-й и 3-й день культивирования было значительно ниже у тех эмбрионов, чей перенос в организм матери привел к беременности, по сравнению с эмбрионами, которые не смогли имплантироваться [27]. Гипотеза «Тихого эмбриона» была использована для объяснения того, как эндометрий «отбирает» эмбрионы высокого качества для имплантации, отбраковывая те, которые излучают «шумный» метаболический сигнал, характерный для высокого оборота питательных веществ, и отдает предпочтение «тихим» [28, 29].

Первые 24 часа после оплодотворения в доимплантационном развитии являются наиболее критическими для последующего онтогенеза. В этот период у эмбрионов мыши происходит процесс репрограммирования генома, а именно «переход от материнского генома к зиготическому», в результате которого происходит АЗГ, и начинается экспрессия собственных генов эмбриона [30].

Исходя из этих данных, 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 [14–17]. По некоторым данным, имитация естественных изменений температуры инкубирования положительно влияет на доимплантационное развитие эмбриона [22, 23].

- Существует и обратная точка зрения, свидетельствующая о том, что снижение энергетического обмена на доимплантационной стадии положительно влияет на эмбриональный онтогенез (гипотеза Н. Leese «Тихий эмбрион») [24]. Некоторые исследования подтверждают положительное влияние снижения метаболизма на развитие эмбрионов и успех беременности [25–27].

Таким образом, исходя из этих взаимно противоположных предположений, мы исследовали влияние температур 39 °С, 37 °С и 35 °С в первые 24 часа после оплодотворения на процессы развития эмбрионов. Само оплодотворение проводили при 37 °С, так как есть данные о влиянии этой температуры на целостность веретена деления [31, 32]. Затем следовало 24-х часовое инкубирование при определенной температуре: 35 °С, 37 °С или 39 °С в период прохождения эмбрионами первого дробления. После этого 2-х клеточные эмбрионы переносили в 37 °С и инкубировали до стадии морулы или бластоцисты.

Нами были проанализированы время слияния пронуклеусов в зиготе, время клеточных дроблений и их синхронность, а также размеры бластомеров, было подсчитано число клеток внутриклеточной массы, трофэктодермы и общее число клеток бластоцисты, был оценен общий уровень метилирования цитозина в ДНК эмбрионов разных групп и дисперсия. Отличительной чертой нашего исследования является получение потомков после переноса самкам-реципиентам эмбрионов, инкубированных при разных температурных режимах. У потомков были проанализированы такие морфофункциональные характеристики, как масса тела в возрасте 3-х, 8-и, 18-и и 24-х недель, а также пройденное расстояние, потребление корма и воды, продолжительность сна, потребление кислорода, выделение углекислого газа и дыхательный коэффициент. В возрасте 12–13 недель был выполнен 3-х суточный мониторинг спонтанной двигательной

активности, продолжительности сна, потребления корма и воды, а также потребления кислорода и выделения углекислого газа.

Для анализа влияния температуры в первые 24 часа после оплодотворения на развитие эмбрионов мыши, нами были получены данные по морфокинетическим характеристикам. Использование *time-lapse* микроскопии позволило оценить морфологические особенности эмбрионов и проанализировать скорость перехода от одной стадии развития к другой. Как известно, оценка морфокинетики является достоверным методом для контроля качества эмбрионов и маркером стресса при культивировании *in vitro* [217]. Хотя использование *time-lapse* систем при ВРТ является обсуждаемой темой в научном сообществе [218–221], отбор эмбрионов человека по морфокинетическому критерию показывает более высокий уровень имплантации эмбрионов, более высокий показатель наступления беременности и более низкие резорбции зародыша (абортывание) на ранних сроках [222].

В нашем исследовании мы установили, что прохождение первого дробления при разных температурных условиях отражается на определенных параметрах развития. В частности, они влияют на время слияния пронуклеусов в зиготе и время перехода на 2-х клеточную стадию. Слияние пронуклеусов и переход на 2-х клеточную стадию происходили быстрее в группе 39 °С, медленнее – у эмбрионов группы 35 °С. Важно отметить, что несмотря на низкую скорость перехода на 2-х клеточную стадию, у эмбрионов группы 35 °С дробление происходило в среднем за 16 часов. В исследовании Y. Shoukir et al. было показано, что эмбрионы, поделившиеся до стадии 2-х клеток менее чем через 25 часов после ЭКО, чаще приводят к клинической беременности по сравнению с теми, которые не завершили первое дробление к этому времени [66].

Кроме этого, температура инкубирования во время первых 24 часов после оплодотворения влияла на время достижения 4-х и 8-и клеточных стадий. Эмбрионам группы 35 °С требовалось больше времени для дробления до 4-х и 8-и бластомеров, чем в группах *in vivo*, 37 °С и 39 °С. Полученные нами данные согласуются с результатами исследования E. Walters et al. [212], в котором митотические дробления доимплантационных эмбрионов мыши проходили

медленнее при более низкой температуре и ускорялись по мере повышения температуры с 35.0 °С до 37.5 °С [212]. Однако следует заметить, что в работе E. Walters et al. применяли постоянный температурный режим инкубирования до стадии бластоцисты. В исследовании Moriyama et al. эмбрионам, инкубированным при 37 °С днём и 35 °С ночью, требовалось больше времени для дробления, чем контрольной группе (37 °С) и группе, инкубированной при температуре 38.5 °С днём, 37 °С ночью [223]. Продолжительность между каждым клеточным дроблением – это время, необходимое для цитоплазматического расщепления, следовательно, удлиненные клеточные циклы группы 35°С могут быть вызваны клеточными перестройками и, возможно, репарациями ДНК до дробления бластомеров [224]. Корреляция между параметрами раннего дробления и развитием до стадии бластоцисты была подтверждена в нескольких работах [219, 222].

Размеры бластомеров играют важную роль в системе морфологической оценки эмбрионов. У 2-х и 4-х клеточных эмбрионов бластомеры должны быть одинакового размера, в то время как у 3-х или 5-и клеточных вполне можно ожидать наличие одной или двух клеток большего или меньшего размера. T. Hardarson et al. продемонстрировали, что неравномерное дробление (расщепление клетки на две клетки разного размера) бластомеров негативно влияет как на частоту наступления беременности, так и на частоту имплантации при ЭКО у человека, что можно объяснить более высокой степенью анеуплоидии или многоядерности эмбрионов, возникающей вследствие неравномерного распределения цитоплазматических молекул, например, белков и мРНК [226]. В нашей работе размеры бластомеров были измерены на стадии 2-х и 4-х клеток. Установлено, что на размеры бластомеров влияли такие факторы, как температура инкубации, число клеток и взаимодействие этих факторов. Минимальная площадь бластомеров обнаружена в группе 35 °С. Размеры бластомеров становились меньше при увеличении числа клеток. На стадии 4-х клеток отмечали наибольшие площади бластомеров в группах *in vivo* и 37 °С.

Еще одним значимым критерием при оценке морфологии эмбрионов является синхронность дроблений. При синхронном дроблении происходит переход от 2-х клеток сразу к 4-м бластомерам, а при асинхронном дроблении – от 2-х клеток к 3-м бластомерам, и только затем к 4-м. При оценке эмбрионов для переноса в организм чаще всего выбирают синхронно поделившиеся, так как есть данные о том, что перенос асинхронно поделившихся эмбрионов дает меньше случаев успешной беременности [69]. Кроме того, в исследовании Z. Wiener-Megnazi et al. синхронно поделившиеся криоконсервированные эмбрионы после размораживания имели более высокие показатели жизнеспособности и более высокую оценку при классификации эмбрионов [70]. Однако при этом авторы не нашли различий в частоте случаев беременности при переносе синхронно и асинхронно поделившихся эмбрионов [70]. M. Kraeussling et al. в своей работе на эмбрионах медаки показал, что чаще всего наблюдается асинхронное дробление, что отражается на размерах бластомеров и объемах цитоплазмы, но не несет негативного влияния на развитие [71]. Работы C. Roux et al. продемонстрировали, что асинхронное дробление в раннем эмбриональном развитии является нормальным и не влияет на показатели имплантации [72, 73]. D. Mashiko et al. в своем исследовании предположили, что синхронность дробления может определяться стохастической вариацией экспрессии генов, особенно тех, которые связаны с клеточным циклом [74]. В нашем исследовании доли синхронно поделившихся эмбрионов во всех группах не отличались, и в целом эмбрионы чаще дробились асинхронно. Анализ синхронности дробления эмбрионов выявил, что синхронно поделившиеся эмбрионы достигают стадий 4-х и 8-и клеток раньше, чем асинхронно поделившиеся. Кроме того, на стадии 2-х клеток синхронно поделившиеся эмбрионы имеют больший размер бластомеров. Это позволяет предположить, что более быстрый рост бластомеров создает предпосылки для синхронного дробления.

При оценке морфологических характеристик эмбриона особое внимание уделяют анализу характеристик бластоцисты. Данный параметр оценки, как показано в некоторых работах, является надежным показателем успеха



беременности [227]. На стадии бластоцисты происходит дифференциация клеток внутриклеточной массы и трофэктодермы, а также образование полости бластоцели. Формирование ТЕ и ВКМ бластоцисты является первой спецификацией клеточных линий в развитии эмбриона мыши и человека. ТЕ участвует в имплантации, непосредственно взаимодействуя с маткой матери, и дает начало тканям плаценты и экстра-эмбриональных мембран [97]. Кроме того, в базолатеральных поверхностях ТЕ расположен натрий-калиевый насос ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  АТФ-аза), который играет важную роль в метаболизме эмбриона. После имплантации эмбриона из ВКМ формируются три зародышевых слоя, из которых впоследствии образуются все ткани организма. Обе линии клеток являются жизненно важными и необходимы для нормального развития эмбриона. Оценка морфологии ВКМ признана наиболее точным неинвазивным методом, способным предсказать успех имплантации, живорождение и даже вес новорожденных [94–96]. D. Mashiko et al. предположили, что на размер ВКМ влияет синхронность и асинхронность дроблений: у асинхронно поделившихся эмбрионов число клеток ВКМ было меньше, чем у синхронно поделившихся [74]. Между эмбрионами, полученными с помощью ЭКО и при естественном оплодотворении, были выявлены различия в формировании ВКМ и ТЕ. При этом G. Giritharan et al. было установлено, что процедура ЭКО оказала большее влияние на формирование будущей плаценты. Клетки ТЕ эмбрионов показали дисрегуляцию генов, связанных с дифференцировкой, метаболизмом ретиноевой кислоты и морфогенезом [92]. Противоположные результаты были получены L. Ganeshan et al.: авторы сообщили, что культивирование эмбрионов *in vitro* оказывает основное влияние на потенциал развития клеточной линии ВКМ, а не клеточной линии ТЕ [93]. Для подсчета клеток ВКМ и ТЕ мы использовали дифференциальное окрашивание бластоцисты красителями Hoechst 33258 и пропидий йодидом. Было обнаружено, что температура инкубации в первые 24 часа влияет на общее число клеток, число клеток ТЕ и на отношение ВКМ к ТЕ. Общее число клеток было максимальным в контрольной группе, минимальным в группах 35 °С и 37 °С. Есть работы, демонстрирующие, что бластоцисты, полученные *in vitro*, содержат

меньше клеток ВКМ, чем эмбрионы, полученные *in vivo* [98, 99]. Однако, в нашей работе эти данные не подтвердились: не было выявлено статистически значимых различий между числом ВКМ у эмбрионов контрольной и экспериментальных групп. Наименьшее число клеток ТЕ было обнаружено в группе 35 °С, и в этой же группе отношение ВКМ к ТЕ было наибольшим. К. Hardy et al. в своей работе сообщили, что чем меньше в бластоцистах клеток ВКМ, тем они менее жизнеспособны [97]. Следовательно, мы предполагаем, что эмбрионы группы 35 °С более жизнеспособные по сравнению с эмбрионами других групп. Кроме того, в ряде исследований было показано, что более крупный размер ВКМ коррелирует с успехом имплантации бластоцисты [100–102].

Наши эксперименты подтвердили влияние температуры инкубации в первые 24 часа после оплодотворения на морфокинетические параметры развития эмбрионов. Установлено, что температура инкубации зигот значимо отражалась на уровне общего метилирования цитозина в ДНК (5 mеС), как одного из индикаторов эпигенетических преобразований. Метилирование ДНК является одним из эпигенетических процессов, которые, помимо метилирования, включают в себя модификацию гистонов, ремоделирование хроматина и изменение спектра некодирующих РНК. Влияние эпигенетики на фенотип потомков осуществляется без изменений нуклеотидных последовательностей генома [151]. Показано, что эпигенетические процессы влияют на паттерны экспрессии генов, которые устойчиво воспроизводятся в клеточных поколениях [155]. Более того, они могут передаваться от родителей потомкам [156]. Метилирование ДНК имеет первостепенное значение для эмбрионального развития млекопитающих, участвует в репрессии транспозонов и генов, а также связано с активно транскрибируемыми генами и с активацией генов в целом. Полное стирание 5-меС родительских геномов во время доимплантационного развития млекопитающих имеет решающее значение для перенастройки метилома гамет в бластомерах. У эмбрионов мыши метилирование ДНК претерпевает широкогеномное репрограммирование [228]. В нашей работе для определения уровня метилирования мы использовали метод иммунофлуоресцентной

визуализации связывания высокоспецифичных антител к 5-метилцитозину (5-meC) [34], адаптированный для исследования эмбрионов на разных стадиях дробления. В качестве положительного контроля использовали эмбрионы на разных стадиях развития, полученные при естественном оплодотворении (*in vivo*), вымытые из репродуктивных путей самок. Было установлено, что на общий уровень метилирования ДНК эмбрионов влияли такие факторы, как температура инкубирования в первые 24 часа развития, число клеток, а также взаимодействие этих факторов. Средние значения уровня 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 °С и 37 °С, при этом показатели группы 39 °С были сопоставимы с контролем. На более поздних стадиях развития (более 4-х клеток) средний уровень метилирования был значительно выше у эмбрионов групп 35 °С и 37 °С, по сравнению с группами 39 °С и контролем. В контрольной группе эмбрионов уровень общего метилирования был ниже, чем у эмбрионов группы 37 °С. Это согласуется с исследованием В. Market-Velker et al., в котором были продемонстрированы измененные показатели метилирования у эмбрионов, культивированных *in vitro* от 2-х клеточной стадии до бластоцисты по сравнению с *in-vivo* контролем [164]. При этом, в нашей работе у группы эмбрионов, прошедших первое дробление при 39 °С, уровень среднего метилирования был сопоставим с контролем и ниже, чем в группах 35 °С и 37 °С. При оценке дисперсии, межэмбриональная флуктуация метилирования была выше у эмбрионов групп 37 °С и 39 °С, а дисперсия в группе 35 °С статистически не отличалась от контроля. Таким образом, температура инкубирования эмбрионов в первые 24 часа влияла на средний уровень общего метилирования ДНК и дисперсию.

Модификация температурных условий развития эмбрионов *in vitro* согласно температурному градиенту в репродуктивных путях, а именно инкубация в первые 24 часа развития в 39 °С с последующим переносом в 37 °С, показывает, что такие эмбрионы быстрее проходят первое дробление, имеют размер

бластомеров, сопоставимый с контролем, а также значительно меньший уровень метилирования, чем у эмбрионов групп 35 °С и 37 °С. Полученные данные позволили нам предположить, что эта температура инкубирования (39 °С) является оптимальным режимом для культивирования эмбрионов. Однако в последующих экспериментах данная гипотеза не подтвердилась.

В отличие от других работ, в которых изучали влияние температуры на развитие эмбрионов [210, 211, 220], наше исследование является первым, в котором были произведены эмбриональные переносы самкам-реципиентам. Широко распространенной практикой при использовании ЭКО является перенос в матку реципиентов эмбрионов на стадии бластоцисты. Этот подход позволяет, опираясь на генетическое исследование единичных клеток, оценить вероятность успешного или неуспешного развития эмбрионов. Однако при работе с коллекциями лабораторных животных более оправданным является криоархивирование и обмен генотипами на более ранних стадиях развития (2 клетки). В нашем эксперименте было принято решение использовать для переноса самкам-реципиентам 2-х клеточные эмбрионы, культивированные при разных температурах. Это было связано с ранее полученными лабораторией М. Мошкина данными о том, что при переносе эмбрионов на стадии 2-х клеток потомки мышей линии CD1 имели более близкие к контрольной группе значения массы тела и содержания жира, по сравнению с потомками, полученными при переносе эмбрионов на стадии бластоцисты [8]. Кроме того, при проведении глюкозотолерантного тестирования потомки, полученные при переносе 2-х клеточных эмбрионов, характеризовались более высокой толерантностью к нагрузке глюкозой по сравнению с контрольной группой и с потомками, полученными при переносе бластоцист [8].

Эксперимент по переносу 2-х клеточных эмбрионов самкам-реципиентам показал, что температура инкубации в первые 24 часа развития 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. Следует отметить, что эмбриональные переносы производились в один рог матки,

в то время как в контрольной группе при естественном оплодотворении беременность протекала в обоих рогах матки. Показатели среднего числа потомков в помете в группах 35 °С и 37 °С не различались. Кроме того, была подсчитана доля рожденных потомков от числа подсаженных самкам-реципиентам 2-х клеточных эмбрионов. Доля рожденных потомков в группах 35 °С и 37 °С достоверно не различалась. Наименьшее число потомков родилось в группе 39 °С. Одной из причин данного факта может быть то, что перенос эмбрионов производили в воронку яйцевода, которая находится в непосредственной близости к ампуле, температура в которой на ~2 °С выше, чем в перешейке маточной трубы. Таким образом, эмбрионы провели при температуре 39 °С не только первые 24 часа, а вдвое больше, что могло повлиять на их жизнеспособность и имплантацию в эндометрий матки. Для подтверждения данной гипотезы необходимы дальнейшие исследования. Другой причиной является то, что, вероятно, эмбрионы группы 39 °С имели повышенную скорость метаболизма, которая, однако, не гарантирует успешное развитие и имплантацию. Согласно гипотезе Н. Leese «Тихий эмбрион», напротив, замедленный метаболизм можно использовать как индикатор жизнеспособности эмбрионов [24]. Установлено, что у эмбрионов человека на 2-ой и 3-ий дни культивирования в среде с 18-ю аминокислотами метаболизм ниже у тех эмбрионов, которые достигают стадии бластоцисты, по сравнению с теми, чье развитие блокируется [25]. Бычьи эмбрионы с низким аминокислотным метаболизмом имеют более высокую вероятность развития до стадии бластоцисты, чем эмбрионы с высоким метаболизмом [26]. Кроме того, потребление пирувата эмбрионами человека на 2-й и 3-й день культивирования было значительно ниже у тех эмбрионов, чей перенос в организм матери привел к беременности, по сравнению с эмбрионами, которые не смогли имплантироваться [27]. Есть данные о том, что эндометрий «отбирает» эмбрионы высокого качества для имплантации, отбраковывая излучающие «шумный» метаболический сигнал, характерный для высокого оборота питательных веществ, и отдает предпочтение «тихим» [28, 29]. Эмбрионы группы 35 °С медленнее достигали стадий 2-х, 4-х и 8-и клеток и

имели наименьший размер бластомеров. При этом у них был наибольший показатель отношения ВКМ к ТЕ, а число рожденных потомков после эмбриональных переносов не отличалось от группы 37 °С. Объяснением успешной имплантации и рождения потомков может быть гипотеза «Тихого эмбриона». Н. Leese et al. предположили, что доимплантационные эмбрионы могут оптимально развиваться при менее стрессовой, 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 – может привести к потере «спокойствия» и повышению скорости метаболизма [178]. Известно, что внутриклеточное производство АТФ у эмбрионов осуществляется в результате окислительного метаболизма, но в качестве нежелательных побочных продуктов этого процесса образуются также активные формы кислорода (АФК). Число вырабатываемых АФК может варьировать в зависимости от скорости окислительного метаболизма, и более высокая метаболическая активность связана с повышенным количеством вырабатываемых АФК [229], которые могут вызывать клеточные повреждения, такие как инактивация клеточных ферментов, повреждение ДНК и перекисное окисление липидов клеточных мембран в эмбриональных клетках [178], что негативно сказывается на развитии доимплантационных эмбрионов. Таким образом, снижения продукции АФК можно добиться при снижении метаболической активности и/или скорости окислительного метаболизма путем инкубирования при более низких температурах.

Для изучения морфофункциональных характеристик потомков, было проведено их взвешивание в возрасте 3-х, 8-и, 18-и и 24-х недель. Также были проанализированы такие показатели, как пройденное расстояние, потребление корма и воды, продолжительность сна, потребление кислорода, выделение углекислого газа и дыхательный коэффициент потомков. Результаты нашего исследования показали, что температура инкубации в первые 24 часа развития доимплантационных эмбрионов не влияет на массу потомков. Важно отметить,

что мы проводили перенос эмбрионов самкам-реципиентам на стадии 2-х клеток, и массы тела потомков контрольной группы и экспериментальных групп статистически не отличались. Ранее в лаборатории М. Мошкина были получены данные, показавшие, что при переносе эмбрионов на стадии бластоцисты масса тела потомков увеличивается как по сравнению с контролем, так и с потомками, полученными при переносе эмбрионов на стадии 2-х клеток [8]. Полученные нами результаты согласуются с данными некоторых исследований, которые показали, что при инкубации в среде с оптимизированным аминокислотным составом масса тела у половозрелых самцов, полученных при помощи ЭКО, не отличалась от контроля [139, 142, 143]. На массу потомков до 8-и недельного возраста влиял фактор числа потомков в помете. Потомки группы 39 °С были выведены из эксперимента после 8-и недельного возраста по причине их недостаточного числа для статистических расчетов.

При анализе данных, полученных с помощью прибора для фенотипирования (Phenomaster), было установлено, что потомки экспериментальных групп (35 °С и 37 °С) имели различия в морфофункциональных характеристиках по сравнению с контрольной группой. Другие исследования на мышинных моделях показали, что у потомства, полученного при помощи ЭКО, наблюдается нарушение метаболизма глюкозы, включая изменение уровня глюкозы натощак и нарушение толерантности к глюкозе во взрослом возрасте [142, 227–230]. В нашем эксперименте животные содержались при искусственном освещении, поэтому «светлое время» соответствует для мышей времени, когда они спят, так как ведут ночной образ жизни. Результаты тестирования показали, что потомки экспериментальных групп характеризовались большей двигательной активностью, особенно в светлое время, и, соответственно, имели меньшую продолжительность сна. Кроме того, они потребляли больше воды и корма в светлое время. У половозрелых потомков, полученных после ЭКО, была установлена большая вариабельность циркадных ритмов спонтанной активности и энергетического обмена по сравнению с таковыми у одновозрастных потомков, полученных при естественном оплодотворении. Известно, что процедуры ВРТ

вливают на липидный обмен и метаболизм глюкозы [142]. 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 [144]. 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. У потомков контрольной группы дыхательный коэффициент был значительно ниже единицы, что говорит о том, что при энергетическом обмене в темное время происходит преимущественно окисление липидов. При этом различий в массе тела между контрольной и экспериментальными группами не было установлено.

В нашем исследовании было установлено, что температура инкубирования в первые 24 часа развития влияет на морфокинетические параметры развития эмбрионов, соотношение числа клеток ВКМ и ТЕ и общий уровень метилирования. После переноса эмбрионов самкам-реципиентам также наблюдался диапазон фенотипических эффектов, связанных с температурой инкубирования в первые 24 часа развития. Потомки группы 35 °С по ряду показателей были ближе к контролю, чем потомки группы 37 °С.

Таким образом, моделирование естественного температурного градиента при инкубировании эмбрионов (от более высокой температуры (39 °С) в момент оплодотворения и до 2-х клеточной стадии к более низкой (37 °С) при последующем развитии и продвижении по репродуктивному тракту) положительно влияет на определенные параметры доимплантационного развития. Однако эксперимент по эмбриональным переносам в организм самок-реципиентов показал, что в данной группе рождается наименьшее число потомков, из чего следует негативное влияние имитации естественных температурных условий инкубирования на имплантацию и пренатальное развитие эмбрионов. Второе проверенное нами предположение о позитивном влиянии



снижения скорости метаболизма эмбрионов – гипотеза «Тихого эмбриона» – напротив, подтвердилось. Исследование продемонстрировало, что на доимплантационном этапе эмбрионы группы 35 °С по некоторым характеристикам отстают от других групп, однако в данной группе родилось больше потомков, чем в группе 39 °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.

## Заключение

Суммируя полученные результаты, можно заключить, что прохождение первого дробления при разных температурных условиях отражается на определенных параметрах развития.

Проведенное нами исследование показало, что моделирование естественного температурного градиента при инкубировании эмбрионов положительно влияет на определенные параметры доимплантационного развития. Слияние пронуклеусов и достижение 2-х клеточной стадии происходило у эмбрионов группы 39 °С быстрее, чем в других группах, а достижение 4-х клеточной стадии не отличалось от контроля, как и размеры бластомеров на 2-х клеточной стадии. По общему числу клеток и числу клеток ТЕ различий между группами контроль, 37 °С и 39 °С не выявлено. На молекулярном уровне межэмбриональная флуктуация уровня метилирования ДНК группы 39 °С была сопоставима с контролем. На более поздних стадиях развития (более 4-х клеток) средний уровень метилирования был значительно выше у эмбрионов групп 35 °С и 37 °С, по сравнению с группами 39 °С и контролем. Однако эксперимент по эмбриональным переносам в организм самок-реципиентов показал, что в данной группе рождается наименьшее число потомков, из чего следует негативное влияние имитации «естественных» температурных условий инкубирования на имплантацию и пренатальное развитие эмбрионов.

Второе проверенное нами предположение – гипотеза «Тихого эмбриона» – о позитивном влиянии снижения скорости метаболизма эмбрионов за счет понижения температуры инкубирования. Исследование продемонстрировало, что на доимплантационном этапе эмбрионы группы 35 °С имели самую низкую скорость слияния пронуклеусов и медленнее достигали 2-х, 4-х и 8-и клеточных стадий, а также имели наименьший размер бластомеров. Однако эмбрионы группы 35 °С имели наибольшее отношение числа клеток ВКМ к ТЕ, что является предиктором успеха беременности. На более поздних стадиях развития (более 4-х клеток) средний уровень метилирования был значительно выше у эмбрионов

групп 35 °С и 37 °С, по сравнению с группами 39 °С и контролем. При этом, при оценке дисперсии, межэмбриональная флуктуация метилирования была выше у эмбрионов групп 37 °С и 39 °С, а дисперсия в группе 35 °С статистически не отличалась от контроля. В данной группе зафиксирован наибольший процент гибели эмбрионов на стадиях 2-го и 3-го дроблений, что можно расценить как эмбриональную селекцию на доимплантационной стадии. «Тихие эмбрионы» группы 35 °С в эксперименте по эмбриональным переносам самкам-реципиентам показали результат, статистически не отличающийся от группы 37 °С. При этом по ряду морфофункциональных характеристик потомки группы 35 °С были ближе к контролю (*in vivo*), чем группа 37 °С. То есть, снижение скорости эмбрионального метаболизма за счет инкубирования при более низкой температуре положительно сказывается на фенотипе рожденных потомков.

Полученные нами результаты расширяют представления о дестабилизации развития при процедуре ЭКО и демонстрируют диапазон эффектов влияния температуры инкубирования в первые 24 часа после оплодотворения на доимплантационное развитие и последующий онтогенез потомков. Полученные данные 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 сокращений**

АЗГ – активация зиготического генома

АТФ – аденозинтрифосфат

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВКМ – внутриклеточная масса

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии

ГСЖК – гонадотропин сыворотки жеребых кобыл

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИКСИ – интрацитоплазматическая инъекция спермы

ПВП – поливинилпирролидон

ПФА – параформальдегид

РНК – рибонуклеиновая кислота

ТЕ – трофэктодерма

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ХГЧ – хорионический гонадотропин человека

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

5 mеС – 5-метилцитозин

DNMT – ДНК-метилтрансфераза

DOHaD – Developmental origins of health and disease («Концепция первопричин здоровья и болезней на ранних периодах развития»)

HCl – соляная кислота

HTF – human tubal fluid

IgG – иммуноглобулин G

KSOM AA – K<sup>+</sup> simple optimized medium + amino acids

pH – водородный показатель

PI – пропидий йодид

RQ – дыхательный коэффициент

**Список литературы**

1. Fauser B. Towards the global coverage of a unified registry of IVF outcomes // *Reproductive Biomedicine. Online.* – 2019. Vol. 38, №2. – P. 133–137.
2. Feuer S.K., Camarano L., Rinaudo P.F. ART and health: clinical outcomes and insights on molecular mechanisms from rodent studies // *Molecular Human Reproduction.* – 2013. Vol. 19, №4.– P. 189–204.
3. Manipalviratn S., DeCherney A., Segars J. Imprinting disorders and assisted reproductive technology // *Fertility and Sterility.* – 2009. Vol. 91, №2. – P. 305–315.
4. Reefhuis J., Honein M., Schieve L., Correa A., Hobbs C., Rasmussen S. Assisted reproductive technology and major structural birth defects in the United States // *Human Reproduction.* – 2009. Vol. 24, № 2. – P. 360–366.
5. Cimadomo D., Fabozzi G., Vaiarelli A., Ubaldi N., Ubaldi F., Rienzi L. Impact of Maternal Age on Oocyte and Embryo Competence // *Frontiers in Endocrinology.* – 2018. Vol. 9. – P. 1.
6. Cauldwell M., Patel R., Steer P., Swan L., Norman-Taylor J., Gatzoulis M., Johnson M. Managing subfertility in patients with heart disease: What are the choices? // *American Heart Journal.* – 2017. Vol. 187. – P. 29–36.
7. Farquhar C., Bhattacharya S., Repping S., Mastenbroek S., Kamath M., Marjoribanks J., Boiyin J. Female subfertility // *Nature Reviews Disease. Primers.* – 2019. Vol. 5, № 1 – P. 7.
8. Анисимова М.В., Гон Я., Юдин Н.С., Мошкин Ю.М., Герлинская Л.А. Метаболический фенотип взрослых потомков мышей, полученных при разных вариантах эмбриональных пересадок // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* – 2020. Т. 24, № 7. – С. 761–769.
9. Moshkin M.P., Gerlinskaya L.A., Moshkin Y.M. Developmental instability in mouse conceived by in vitro fertilization // *Abstracts of the Thirteenth International Multiconference Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology.* – 2022. – P. 674.

10. De Jong T. V., Moshkin Y.M., Guryev V. Gene expression variability: the other dimension in transcriptome analysis // *Physiological Genomics*. – 2019. Vol. 51, № 5. – P. 145–158.
11. Ng K., Mingels R., Morgan H., Macklon N., Cheong Y. In vivo oxygen, temperature and pH dynamics in the female reproductive tract and their importance in human conception: A systematic review // *Human Reproduction Update*. – 2018. Vol. 24, № 1. – P. 15–34.
12. Chereji Ř., Kan T., Grudniewska M., Romashchenko A., Berezikov E., Zhimulev I., Guryev V., Morozov A., Moshkin Y. Genome-wide profiling of nucleosome sensitivity and chromatin accessibility in *Drosophila melanogaster* // *Nucleic Acids Research*. – 2016. Vol. 44, № 3. – P. 1036–1051.
13. Wale P.L., Gardner D.K. The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction // *Human Reproduction Update*. – 2016. Vol. 22, № 1. – P. 2–22.
14. Hunter R.H.F. Temperature gradients in female reproductive tissues // *Reproductive Biomedicine Online*. – 2012. Vol. 24, № 4. – P. 377–380.
15. Grinsted J., Blendstrup K., Andreassen M., Byskov A. Temperature measurements of rabbit antral follicles // *Journal of Reproduction and Fertility*. – 1980. Vol. 60, № 1. – P. 149–155.
16. Grinsted J., Kjer J., Blendstrup K., Pedersen J. Is low temperature of the follicular fluid prior to ovulation necessary for normal oocyte development? // *Fertility and Sterility*. – 1985. Vol. 43, № 1. – P. 34–39.
17. Hunter R.H.F. et al. Pre-ovulatory graafian follicles are cooler than neighbouring stroma in pig ovaries // *Human Reproduction*. Hum Reprod, 2000. Vol. 15, № 2. P. 273–283.
18. Bauman J.E. Basal body temperature: unreliable method of ovulation detection // *Fertility and Sterility* – 1981. Vol. 36, № 6. – P. 729–733.
19. Bull J., Rowland S., Scherwitzl E., Scherwitzl R., Danielsson K., Harper J. Real-world menstrual cycle characteristics of more than 600,000 menstrual cycles //

- NPJ Digital Medicine. – 2019. Vol. 2, № 1. – P. 1–8.
20. Cagnacci A., Arangino S., Tuveri F., Paoletti A., Volpe A. Regulation of the 24h body temperature rhythm of women in luteal phase: Role of gonadal steroids and prostaglandins // *Chronobiology International*. – 2002. Vol. 19, № 4. – P. 721–730.
  21. Coyne M.D., Kesick C.M., Doherty T.J., Kolka M.A., Stephenson L.A. Circadian rhythm changes in core temperature over the menstrual cycle: Method for noninvasive monitoring // *American Journal of Physiology*. – 2000. Vol. 279, № 4. – P.1316–1320.
  22. García-Martínez S., Latorre R., Sanchez-Hurtado M., Sanchez-Hurtado F., Bernabo N., Romar R., Lopez-Albors O., Coy P. Mimicking the temperature gradient between the sow's oviduct and uterus improves in vitro embryo culture output // *Molecular Human Reproduction*. – 2020. Vol. 26, № 10. – P. 748–759.
  23. Şen U., Kuran M. Low incubation temperature successfully supports the in vitro bovine oocyte maturation and subsequent development of embryos // *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. – 2018. Vol. 31, № 6. – P. 827.
  24. Leese H.J. Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability // *Bioessays*. – 2002. Vol. 24, № 9. – P. 845–849.
  25. Houghton F.D., Hawkhead J.A., Humpherson P.G., Hogg J.E., Balen A.H., Rutherford A.J., Leese H.J. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity // *Human Reproduction*. – 2002. Vol. 17, № 4. – P. 999–1005.
  26. Sturme R.G., Bermejo-Alvarez P., Gutierrez-Adan A., Rizos D., Leese H.J., Lonegran P. Amino acid metabolism of bovine blastocysts: a biomarker of sex and viability // *Molecular Reproduction and Development*. – 2010. Vol. 77, № 3. – P. 285–296.
  27. Conaghan J., Hardy K., Handyside A., Winston R., Leese H. Selection criteria for human embryo transfer: a comparison of pyruvate uptake and morphology // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 1993. Vol. 10, № 1. – P. 21–30.
  28. Macklon N.S., Brosens J.J. The human endometrium as a sensor of embryo



- quality // *Biology of Reproduction*. – 2014. Vol. 91, № 4. – P. 98.
29. Teklenburg G. et al. Natural Selection of Human Embryos: Decidualizing Endometrial Stromal Cells Serve as Sensors of Embryo Quality upon Implantation // *PLoS One*. – 2010. Vol. 5, № 4. – P. e10287.
  30. Schulz K.N., Harrison M.M. Mechanisms regulating zygotic genome activation // *Nature Reviews. Genetics*. – 2018. Vol. 20, № 4. – P. 221–234.
  31. Wang W.H. et al. Limited recovery of meiotic spindles in living human oocytes after cooling-rewarming observed using polarized light microscopy // *Human Reproduction*. – 2001. Vol. 16, № 11. – P. 2374–2378.
  32. Wang W.H. et al. Rigorous thermal control during intracytoplasmic sperm injection stabilizes the meiotic spindle and improves fertilization and pregnancy rates // *Fertility and Sterility*. – 2002. Vol. 77, № 6. – P. 1274–1277.
  33. Selokar N.L. et al. A protocol for differential staining of inner cell mass and trophectoderm of embryos for evaluation of health status // *Current Science*. – 2012. Vol. 102, № 9. – P. 1256–1257.
  34. Beaujean N. et al. Antibody-Based Detection of Global Nuclear DNA Methylation in Cells, Tissue Sections, and Mammalian Embryos // *Methods in Molecular Biology*. – 2018. Vol. 1708. – P. 59–80.
  35. Steptoe P.C., Edwards R.G. Birth after the reimplantation of a human embryo // *Lancet*. – 1978. Vol. 2, № 8085. – P. 366.
  36. Белоусов Л.В. Основы общей эмбриологии // МГУ-Наука, 2005. – С. 17–20.
  37. Hamburger V. The heritage of experimental embryology : Hans Spemann and the organizer // Oxford University Press, – 1988. – P. 196.
  38. Heape W. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother // *Proceedings of the Royal Society of London*. – 1891. Vol. 48, № 292–295. – P. 457–458.
  39. Ringer S. Concerning the Influence exerted by each of the Constituents of the Blood on the Contraction of the Ventricle // *Journal of Physiology*. – 1882. Vol. 3, № 5–6. – P. 380–393.
  40. Chronopoulou E., Harper J.C. IVF culture media: Past, present and future //

- Human Reproduction. Update. – 2015. Vol. 21, № 1. – P. 39–55.
41. Lewis W.H., Gregory P.W. Cinematographs of living developing rabbit-eggs // Science. – 1929. Vol. 69, № 1782. – P. 226–229.
  42. Kuhl W. Untersuchungen über die Cytodynamik der Furchung und Frühentwicklung des Eies der weißen Maus // Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, – 1941.
  43. Chang M.C. Normal development of fertilized rabbit ova stored at low temperature for several days // Nature. – 1947. Vol. 159, № 4044. – P. 602–603.
  44. Chang M.C. Fertilization of rabbit ova in vitro // Nature. – 1959. Vol. 184, № 4684. – P. 466–467.
  45. Hammond J. Recovery and culture of tubal mouse ova. // Nature. – 1949. Vol. 163, № 4131. – P. 28.
  46. Whitten W.K. Culture of tubal mouse ova [21] // Nature. – 1956. Vol. 177, № 4498. – P. 96.
  47. Biggers J.D., Gwatkin R.B.L., Brinster R.L. Development of mouse embryos in organ cultures of fallopian tubes on a chemically defined medium // Nature. – 1962. Vol. 194, № 4830. – P. 747–749.
  48. Brinster R.L. In vitro culture of mammalian embryos. // Journal of Animal Sciences. – 1968. Vol. 27 Suppl 1. – P. 1–14.
  49. Whitten W.K., Biggers J.D. Complete development in vitro of the pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. // Journal of Reproduction and Fertility. – 1968. Vol. 17, № 2. – P. 399–401.
  50. Brinster R.L., Biggers J.D. In-vitro fertilization of mouse ova within the explanted fallopian tube // Journal of Reproduction and Fertility. – 1965. Vol. 10, № 2. – P. 277–279.
  51. Whittingham D.G. Fertilization of mouse eggs in vitro // Nature. – 1968. Vol. 220, № 5167. – P. 592–593.
  52. Abramczuk J., Solter D., Koprowski H. The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium // Developmental Biology. – 1977. Vol. 61, № 2. – P. 378–383.

53. Zeilmaker G.H. et al. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos // *Fertility and Sterility*. – 1984. Vol. 42, № 2. – P. 293–296.
54. Van Steirteghem A. et al. Intracytoplasmic sperm injection // *Bailliere's Clinical Obstetrics and Gynaecology*. – 1994. Vol. 8, № 1. – P. 85–93.
55. Mascarenhas M.N. et al. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys // *PLoS Medicine*. – 2012. Vol. 9, № 12. – e1001356.
56. Boivin J. et al. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care // *Human Reproduction*. – 2007. Vol. 22, № 6. – P. 1506–1512.
57. Melantonio P. et al. Delivering embryos following 10 years of cryopreservation, using unpaired freeze/thaw techniques: A case report // *JBRA Assisted Reproduction*. – 2021. Vol. 25, № 4. – P. 644.
58. Schachter M. et al. Monozygotic twinning after assisted reproductive techniques: a phenomenon independent of micromanipulation // *Human Reproduction*. – 2001. Vol. 16, № 6. – P. 1264–1269.
59. Multiple gestation associated with infertility therapy: an American Society for Reproductive Medicine Practice Committee opinion // *Fertility and Sterility*. – 2012. Vol. 97, № 4. – P. 825–834.
60. Belva F. et al. Neonatal outcome of 937 children born after transfer of cryopreserved embryos obtained by ICSI and IVF and comparison with outcome data of fresh ICSI and IVF cycles // *Human Reproduction*. – 2008. Vol. 23, № 10. – P. 2227–2238.
61. Gardner D.K., Schoolcraft W.B. Culture and transfer of human blastocysts // *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. – 1999. Vol. 11, № 3. – P. 307–311.
62. Guerif F. et al. Does early morphology provide additional selection power to blastocyst selection for transfer? // *Reproductive Biomedicine Online*. – 2010. Vol. 21, № 4. – P. 510–519.
63. Montag M., Toth B., Strowitzki T. New approaches to embryo selection //

- Reproductive Biomedicine Online. – 2013. Vol. 27, № 5. – P. 539–546.
64. De Mouzon J. et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2007: results generated from European registers by ESHRE // *Human Reproduction*. – 2012. Vol. 27, № 4. – P. 954.
  65. Balaban B. et al. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting // *Human Reproduction*. – 2011. Vol. 26, № 6. – P. 1270–1283.
  66. Shoukir Y. et al. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability // *Human Reproduction*. – 1997. Vol. 12, № 7. – P. 1531–1536.
  67. Wong C.C. et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage // *Nature Biotechnology* – 2010. Vol. 28, № 10. – P. 1115–1121.
  68. Aguilar J. et al. Study of nucleation status in the second cell cycle of human embryo and its impact on implantation rate // *Fertility and Sterility*. – 2016. Vol. 106, № 2. – P. 291-299.e2.
  69. Hardarson T. et al. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation // *Human Reproduction*. – 2001. Vol. 16, № 2. – P. 313–318.
  70. Wiener-Megnazi Z. et al. Synchronous and Asynchronous Blastomere Cleavage at Cryopreservation: Effect on Subsequent Embryo Survival, Pregnancy and Live Birth Rates // *Journal of Biomedicine Science*. – 2014. Vol. 07, № 05. – P. 243–251.
  71. Kraeussling M., Wagner T.U., Scharl M. Highly Asynchronous and Asymmetric Cleavage Divisions Accompany Early Transcriptional Activity in Pre-Blastula Medaka Embryos // *PLoS One*. – 2011. Vol. 6, № 7. – P. 21741.
  72. Roux C. et al. Morphological classification of human in-vitro fertilization embryos based on the regularity of the asynchronous division process // *Human Reproduction*. Update. – 1995. Vol. 1, № 5. – P. 488–491.
  73. Roux C. et al. Morphometric parameters of living human in-vitro fertilization

- embryos; importance of the asynchronous division process // *Human Reproduction*. – 1995. Vol. 10, № 5. – P. 1201–1207.
74. Mashiko D. et al. Asynchronous division at 4–8-cell stage of preimplantation embryos affects live birth through ICM/TE differentiation // *Scientific Reports* – 2022. Vol. 12, № 1. – P. 1–14.
75. Johnson M.H., McConnell J.M.L. Lineage allocation and cell polarity during mouse embryogenesis // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. – 2004. Vol. 15, № 5. – P. 583–597.
76. Suwińska A. et al. Blastomeres of the mouse embryo lose totipotency after the fifth cleavage division: expression of Cdx2 and Oct4 and developmental potential of inner and outer blastomeres of 16- and 32-cell embryos // *Developmental Biology*. – 2008. Vol. 322, № 1. – P. 133–144.
77. Aziz M., Alexandre H. The origin of the nascent blastocoele in preimplantation mouse embryos ultrastructural cytochemistry and effect of chloroquine // *Roux's Archives of Developmental Biology*. – 1991. Vol. 200, № 2. – P. 77–85.
78. Nichols J. et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4 // *Cell*. – 1998. Vol. 95, № 3. – P. 379–391.
79. Chazaud C. et al. Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway // *Developmental Cell*. – 2006. Vol. 10, № 5. – P. 615–624.
80. Plusa B. et al. Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst // *Development*. – 2008. Vol. 135, № 18. – P. 3081–3091.
81. Okamoto K. et al. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells // *Cell*. – 1990. Vol. 60, № 3. – P. 461–472.
82. Rosner M.H. et al. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo // *Nature*. – 1990. Vol. 345, № 6277. – P. 686–692.
83. Schöler H.R. et al. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4 //

- Nature. – 1990. Vol. 344, № 6265. – P. 435–439.
84. Niwa H., Miyazaki J.I., Smith A.G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells // Nature. Genetics. – 2000. Vol. 24, № 4. – P. 372–376.
  85. Chambers I. et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells // Cell. – 2003. Vol. 113, № 5. – P. 643–655.
  86. Mitsui K. et al. The homeoprotein nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells // Cell. – 2003. Vol. 113, № 5. – P. 631–642.
  87. Kuroda T. et al. Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression // Molecular and Cellular Biology. – 2005. Vol. 25, № 6. – P. 2475–2485.
  88. Rodda D.J. et al. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2 // Journal of Biological Chemistry. – 2005. Vol. 280, № 26. – P. 24731–24737.
  89. Beck F. et al. Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes // Developmental Dynamics. – 1995. Vol. 204, № 3. – P. 219–227.
  90. Strumpf D. et al. Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst // Development. – 2005. Vol. 132, № 9. – P. 2093–2102.
  91. Ralston A., Rossant J. Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophectoderm fate in the early mouse embryo // Developmental Biology. – 2008. Vol. 313, № 2. – P. 614–629.
  92. Giritharan G. et al. Inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) cell gene expression of murine IVF preimplantation embryos is different from in vivo embryos // Fertility and Sterility. – 2008. Vol. 90, № 1. – P. S344.
  93. Ganeshan L., Li A., O'Neill C. Transformation-related protein 53 expression in the early mouse embryo compromises preimplantation embryonic development by preventing the formation of a proliferating inner cell mass // Biology of

- Reproduction. – 2010. Vol. 83, № 6. – P. 958–964.
94. Irani M. et al. Morphologic grading of euploid blastocysts influences implantation and ongoing pregnancy rates // *Fertility and Sterility*. – 2017. Vol. 107, № 3. – P. 664–670.
  95. Licciardi F. et al. Birth weight is associated with inner cell mass grade of blastocysts // *Fertility and Sterility*. – 2015. Vol. 103, № 2. – P. 382-387.e2.
  96. Ai J. et al. The Morphology of Inner Cell Mass Is the Strongest Predictor of Live Birth After a Frozen-Thawed Single Embryo Transfer // *Frontiers in Endocrinology*. – 2021. Vol. 12. – P. 46.
  97. Hardy K., Handyside A.H., Winston R.M.L. The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development in vitro // *Development*. – 1989. Vol. 107, № 3. – P. 597–604.
  98. Iwasaki S. et al. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo // *Journal of Reproduction and Fertility*. – 1990. Vol. 90, № 1. – P. 279–284.
  99. Du F., Looney C.R., X. Y. Evaluation of bovine embryos produced in vitro vs. in vivo by differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells // *Theriogenology*. – 1996. Vol. 1, № 45. – P. 211.
  100. Shapiro B.. et al. Optimal Inner Cell Mass Size and Shape for a Human Blastocyst // *Fertility and Sterility*. – 2000. Vol. 74, № 3. – P. S43.
  101. Richter K.S. et al. Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape // *Fertility and Sterility*. – 2001. Vol. 76, № 6. – P. 1157–1167.
  102. Almagor M. et al. Ratio between inner cell mass diameter and blastocyst diameter is correlated with successful pregnancy outcomes of single blastocyst transfers // *Fertility and Sterility*. – 2016. Vol. 106, № 6. – P. 1386–1391.
  103. Leese H.J., Barton A.M. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos // *Journal of Reproduction Fertility*. – 1984. Vol. 72, № 1. – P. 9–13.
  104. Gardner D.K., Leese H.J. Non-invasive measurement of nutrient uptake by single

- cultured pre-implantation mouse embryos // *Human Reproduction*. – 1986. Vol. 1, № 1. – P. 25–27.
105. Martin K.L., Leese H.J. Role of glucose in mouse preimplantation embryo development // *Molecular Reproduction and Development*. – 1995. Vol. 40, № 4. – P. 436–443.
106. Gardner D.K., Leese H.J. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in vitro // *Journal of Reproduction and Fertility*. – 1990. Vol. 88, № 1. – P. 361–368.
107. Hewitson L.C., Leese H.J. Energy metabolism of the trophectoderm and inner cell mass of the mouse blastocyst // *Journal of Experimental Zoology*. – 1993. Vol. 267, № 3. – P. 337–343.
108. Gopichandran N., Leese H.J. Metabolic characterization of the bovine blastocyst, inner cell mass, trophectoderm and blastocoel fluid // *Reproduction*. – 2003. Vol. 126, № 3. – P. 299–308.
109. Thompson J.G. et al. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos // *Journal of Reproduction and Fertility*. – 1996. Vol. 106, № 2. – P. 299–306.
110. Sturmey R.G., Leese H.J. Energy metabolism in pig oocytes and early embryos // *Reproduction*. – 2003. Vol. 126, № 2. – P. 197–204.
111. Houghton F.D., Leese H.J. Metabolism and developmental competence of the preimplantation embryo // *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. – 2004. Vol. 115. – P. S92-S96.
112. Houghton F.D. et al. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, ATPase activity in the human and bovine preimplantation embryo // *Developmental Biology*. – 2003. Vol. 263, № 2. – P. 360–366.
113. Sellens M.H., Stein S., Sherman M.I. Protein and free amino acid content in preimplantation mouse embryos and in blastocysts under various culture conditions // *Journal of Reproduction and Fertility*. – 1981. Vol. 61, № 2. – P. 307–315.
114. Lane M., Gardner D.K. Differential regulation of mouse embryo development and



- viability by amino acids // *Journal of Reproduction and Fertility*. – 1997. Vol. 109, № 1. – P. 153–164.
115. Lane M., Gardner D.K. Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts // *Human Reproduction*. – 1998. Vol. 13, № 4. – P. 991–997.
116. Lamb V.K., Leese H.J. Uptake of a mixture of amino acids by mouse blastocysts // *Journal of Reproduction and Fertility* – 1994. Vol. 102, № 1. – P. 169–175.
117. Baumann C.G. et al. The quiet embryo hypothesis: molecular characteristics favoring viability // *Molecular reproduction and development*. – 2007. Vol. 74, № 10. – P. 1345–1353.
118. Houghton F.D. Energy metabolism of the inner cell mass and trophectoderm of the mouse blastocyst // *Differentiation*. – 2006. Vol. 74, № 1. – P. 11–18.
119. Marcho C., Cui W., Mager J. Epigenetic Dynamics During Preimplantation Development // *Reproduction*. – 2015. Vol. 150, № 3. – P. R109.
120. Barker D.J.P. The origins of the developmental origins theory // *Journal of Internal Medicine*. – 2007. Vol. 261, № 5. – P. 412–417.
121. Retzliff M.G., Hornstein M.D. Is intracytoplasmic sperm injection safe? // *Fertility and Sterility* – 2003. Vol. 80, № 4. – P. 851–859.
122. Schieve L.A. et al. Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology // *New England Journal of Medicine*. – 2002. Vol. 346, № 10. – P. 731–737.
123. Perri T. et al. Are singleton assisted reproductive technology pregnancies at risk of prematurity? // *Journal of assisted reproduction and genetics*. – 2001. Vol. 18, № 5. – P. 245–249.
124. Zádori J. et al. The incidence of major birth defects following in vitro fertilization // *Journal of assisted reproduction and genetics*. – 2003. Vol. 20, № 3. – P. 131–132.
125. Hansen M. et al. The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization // *New England Journal of Medicine*. – 2002. Vol. 346, № 10. – P. 725–730.

126. Strömberg B. et al. Neurological sequelae in children born after in-vitro fertilisation: a population-based study // *Lancet* – 2002. Vol. 359, № 9305. – P. 461–465.
127. Schieve L.A. et al. Are children born after assisted reproductive technology at increased risk for adverse health outcomes? // *Obstetrics and Gynecology*. – 2004. Vol. 103, № 6. – P. 1154–1163.
128. Tan S.L. et al. Obstetric outcome of in vitro fertilization pregnancies compared with normally conceived pregnancies // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. – 1992. Vol. 167, № 3. – P. 778–784.
129. Miles H.L. et al. In vitro fertilization improves childhood growth and metabolism // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 2007. Vol. 92, № 9. – P. 3441–3445.
130. Ceelen M. et al. Growth and development of children born after in vitro fertilization // *Fertility and Sterility* – 2008. Vol. 90, № 5. – P. 1662–1673.
131. Seggers J. et al. Is ovarian hyperstimulation associated with higher blood pressure in 4-year-old IVF offspring? Part I: multivariable regression analysis // *Human Reproduction*. – 2014. Vol. 29, № 3. – P. 502–509.
132. Sandin S. et al. Autism and mental retardation among offspring born after in vitro fertilization // *JAMA*. – 2013. Vol. 310, № 1. – P. 75–84.
133. Liu H. et al. Association between assisted reproductive technology and cardiac alteration at age 5 years // *JAMA Pediatrics*. – 2015. Vol. 169, № 6. – P. 603–605.
134. Guo X.Y. et al. Cardiovascular and metabolic profiles of offspring conceived by assisted reproductive technologies: a systematic review and meta-analysis // *Fertility and Sterility* – 2017. Vol. 107, № 3. – P. 622-631.e5.
135. Belva F. et al. Semen quality of young adult ICSI offspring: the first results // *Human Reproduction*. – 2016. Vol. 31, № 12. – P. 2811–2820.
136. Young L.E., Sinclair K.D., Wilmut I. Large offspring syndrome in cattle and sheep // *Reviews of Reproduction*. – 1998. Vol. 3, № 3. – P. 155–163.
137. Farin P.W., Piedrahita J.A., Farin C.E. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos // *Theriogenology*. – 2006. Vol.

- 65, № 1. – P. 178–191.
138. Van Montfoort A.P.A. et al. Assisted reproduction treatment and epigenetic inheritance // *Human Reproduction. Update.* – 2012. Vol. 18, № 2. – P. 171–197.
139. Donjacour A. et al. In vitro fertilization affects growth and glucose metabolism in a sex-specific manner in an outbred mouse model // *Biology of Reproduction.* – 2014. Vol. 90, № 4. – P. 80.
140. Narapareddy L. et al. Sex-specific effects of in vitro fertilization on adult metabolic outcomes and hepatic transcriptome and proteome in mouse // *FASEB Journal.* – 2021. Vol. 35, № 4. – P. e21523.
141. Elhakeem A. et al. Association of Assisted Reproductive Technology With Offspring Growth and Adiposity From Infancy to Early Adulthood // *JAMA Network Open.* – 2022. Vol. 5, № 7. – P. E2222106.
142. Duranthon V., Chavatte-Palmer P. Long term effects of ART: What do animals tell us? // *Molecular reproduction and development.* – 2018. Vol. 85, № 4. – P. 348–368.
143. Qin N. et al. Abnormal Glucose Metabolism in Male Mice Offspring Conceived by in vitro Fertilization and Frozen-Thawed Embryo Transfer // *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* – 2021. Vol. 9. – P. 186.
144. Feuer S.K. et al. Use of a mouse in vitro fertilization model to understand the developmental origins of health and disease hypothesis // *Endocrinology.* – 2014. Vol. 155, № 5. – P. 1956–1969.
145. Heber M.F., Ptak G.E. The effects of assisted reproduction technologies on metabolic health and disease // *Biology of Reproduction.* – 2021. Vol. 104, № 4. – P. 734–744.
146. Gill S., Panda S. A Smartphone App Reveals Erratic Diurnal Eating Patterns in Humans that Can Be Modulated for Health Benefits // *Cell Metabolism.* – 2015. Vol. 22, № 5. – P. 789–798.
147. Fuhrman G.J., McLin E.D., Turner M.L. The effect of time of day on the metabolic rate of albino mice; a manometric method // *American Journal of Physiology.* – 1946. Vol. 147. – P. 284–288.

148. Samson S.L., Garber A.J. Metabolic syndrome // *Endocrinology and Metabolism Clinics*. – 2014. Vol. 43, № 1. – P. 1–23.
149. Morris M.R. et al. Fluctuating asymmetry indicates the optimization of growth rate over developmental stability // *Functional Ecology*. – 2012. Vol. 26, № 3. – P. 723–731.
150. Morris M.R. et al. A New Method to Assess Asymmetry in Fingerprints Could Be Used as an Early Indicator of Type 2 Diabetes Mellitus // *Journal of Diabetes Science and Technology*. – 2016. Vol. 10, № 4. – P. 864–871.
151. Berger S.L. et al. An operational definition of epigenetics // *Genes and Development*. – 2009. Vol. 23, № 7. – P. 781–783.
152. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory // *Genes and Development*. – 2002. Vol. 16, № 1. – P. 6–21.
153. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function // *Cell*. – 2007. Vol. 128, № 4. – P. 693–705.
154. Morris K. V., Mattick J.S. The rise of regulatory RNA // *Nature Reviews. Genetics* – 2014. Vol. 15, № 6. – P. 423–437.
155. Nelissen E.C.M. et al. Epigenetics and the placenta // *Human Reproduction. Update*. – 2011. Vol. 17, № 3. – P. 397–417.
156. Xavier M.J. et al. Transgenerational inheritance: How impacts to the epigenetic and genetic information of parents affect offspring health // *Human Reproduction. Update*. – 2019. Vol. 25, № 5. – P. 519–541.
157. Gurdon J.B. The Developmental Capacity of Nuclei taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles // *Development*. – 1962. Vol. 10, № 4. – P. 622–640.
158. Campbell K.H.S. et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line // *Nature*. – 1996. Vol. 380, № 6569. – P. 64–66.
159. Newport J., Kirschner M. A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: II. Control of the onset of transcription // *Cell*. – 1982. Vol. 30, № 3. – P. 687–696.
160. Tadros W., Lipshitz H.D. The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts //

- Development. – 2009. Vol. 136, № 18. – P. 3033–3042.
161. Yuan K. et al. Timing the Drosophila Mid-Blastula Transition: A Cell Cycle-Centered View // Trends in Genetics. – 2016. Vol. 32, № 8. – P. 496–507.
  162. Canovas S. et al. DNA Methylation in Embryo Development: Epigenetic Impact of ART (Assisted Reproductive Technologies) // Bioessays. – 2017. Vol. 39, № 11. – P. 1700106.
  163. Geiman T.M., Muegge K. DNA methylation in early development // Molecular reproduction and development. – 2010. Vol. 77, № 2. – P. 105–113.
  164. Market-Velker B.A., Fernandes A.D., Mann M.R.W. Side-by-side comparison of five commercial media systems in a mouse model: suboptimal in vitro culture interferes with imprint maintenance // Biology of Reproduction. – 2010. Vol. 83, № 6. – P. 938–950.
  165. Nelissen E.C.M. et al. Placentas from pregnancies conceived by IVF/ICSI have a reduced DNA methylation level at the H19 and MEST differentially methylated regions // Human Reproduction. – 2013. Vol. 28, № 4. – P. 1117–1126.
  166. Whitelaw N. et al. Epigenetic status in the offspring of spontaneous and assisted conception // Human Reproduction. – 2014. Vol. 29, № 7. – P. 1452–1458.
  167. Davies M.J. et al. Reproductive technologies and the risk of birth defects // New England Journal of Medicine. – 2012. Vol. 366, № 19. – P. 1803–1813.
  168. Hart R., Norman R.J. The longer-term health outcomes for children born as a result of IVF treatment: Part I--General health outcomes // Human Reproduction. Update. – 2013. Vol. 19, № 3. – P. 232–243.
  169. White C.R. et al. High Frequency of Imprinted Methylation Errors in Human Preimplantation Embryos // Scientific Reports – 2015. Vol. 5, № 1. – P. 1–16.
  170. Zandstra H., Van Montfoort A.P.A., Dumoulin J.C.M. Does the type of culture medium used influence birthweight of children born after IVF? // Human Reproduction. – 2015. Vol. 30, № 3. – P. 530–542.
  171. Kleijkers S.H.M. et al. Influence of embryo culture medium (G5 and HTF) on pregnancy and perinatal outcome after IVF: a multicenter RCT // Human Reproduction. – 2016. Vol. 31, № 10. – P. 2219–2230.

172. Miller K.A. Optimizing culture conditions // Culture Media, Solutions, and Systems in Human ART. – 2014. – P. 235–244.
173. Leese H.J. The formation and function of oviduct fluid // Journal of Reproduction and Fertility – 1988. Vol. 82, № 2. – P. 843–856.
174. Aguilar J. et al. The uterine tubal fluid: secretion, composition and biological effects // Animal Reproduction. – 2018. Vol. 2, № 2. – P. 91–105.
175. Lawitts J.A., Biggers J.D. Optimization of mouse embryo culture media using simplex methods // Journal of Reproduction and Fertility – 1991. Vol. 91, № 2. – P. 543–556.
176. Summers M.C. et al. IVF of mouse ova in a simplex optimized medium supplemented with amino acids // Human Reproduction. – 2000. Vol. 15, № 8. – P. 1791–1801.
177. Bedaiwy M.A. et al. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species // Fertility and Sterility – 2004. Vol. 82, № 3. – P. 593–600.
178. Leese H.J. et al. Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited // Mol. Human Reproduction. – 2008. Vol. 14, № 12. – P. 667–672.
179. Van Montfoort A.P.A. et al. Reduced oxygen concentration during human IVF culture improves embryo utilization and cumulative pregnancy rates per cycle // Human Reproduction Open. – 2020. Vol. 2020, № 1.
180. Herbemont C. et al. Impact of oxygen tension according to embryo stage of development: a prospective randomized study // Scientific Reports – 2021. Vol. 11, № 1. – P. 1–9.
181. Zhang L. et al. CO<sub>2</sub> concentration affects in vitro pig embryo developmental capacity // Polish Journal of Veterinary Sciences. – 2018. Vol. 21, № 3. – P. 609–614.
182. Roos A., Boron W.F. Intracellular pH // Physiological Reviews. – 1981. Vol. 61, № 2. – P. 296–434.
183. Busa W.B. Mechanisms and consequences of pH-mediated cell regulation // Annual Review of Physiology. – 1986. Vol. 48. – P. 389–402.

184. Gatimel N. et al. Need for choosing the ideal pH value for IVF culture media // *Journal of assisted reproduction and genetics*. – 2020. Vol. 37, № 5. – P. 1019–1028.
185. Edwards L.J., Williams D.A., Gardner D.K. Intracellular pH of the mouse preimplantation embryo: amino acids act as buffers of intracellular pH. // *Human Reproduction*. – 1998. Vol. 13, № 12. – P. 3441–3448.
186. Nichol R. et al. Concentrations of energy substrates in oviduct fluid in unilaterally ovariectomised pigs // *Research in Veterinary Science*. – 1998. Vol. 65, № 3. – P. 263–264.
187. Hugentobler S. et al. In situ oviduct and uterine pH in cattle // *Theriogenology*. – 2004. Vol. 61, № 7–8. – P. 1419–1427.
188. Maas D.H., Stein B., Metzger H. PO<sub>2</sub> and pH measurements within the rabbit oviduct following tubal microsurgery: reanastomosis of previously dissected tubes // *Advances in experimental medicine and biology*. – 1984. Vol. 169. – P. 561–570.
189. David A., Serr D.M., Czernobilsky B. Chemical composition of human oviduct fluid // *Fertility and Sterility* – 1973. Vol. 24, № 6. – P. 435–439.
190. Imoedemhe D.A.G. et al. Changes in follicular fluid gas and pH during carbon dioxide pneumoperitoneum for laparoscopic aspiration and their effect on human oocyte fertilizability // *Fertility and Sterility* – 1993. Vol. 59, № 1. – P. 177–182.
191. Mather E.C. “In vivo” uterine lumen pH values of the bovine // *Theriogenology*. – 1975. Vol. 3, № 3. – P. 113–119.
192. Iritani A. et al. Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in rabbits // *Journal of Animal Science* – 1971. Vol. 33, № 4. – P. 829–835.
193. Phillips K.P. et al. Intracellular pH regulation in human preimplantation embryos // *Human Reproduction*. – 2000. Vol. 15, № 4. – P. 896–904.
194. Swearman H. et al. pH: the silent variable significantly impacting meiotic spindle assembly in mouse oocytes // *Reproductive Biomedicine Online*. – 2018. Vol. 37, № 3. – P. 279–290.
195. Cheng J.M. et al. Elevated intracellular pH appears in aged oocytes and causes

- oocyte aneuploidy associated with the loss of cohesion in mice. // *Cell Cycle*. – 2016. Vol. 15, № 18. – P. 2454–2463.
196. Dale B. et al. Intracellular pH regulation in the human oocyte // *Human Reproduction*. – 1998. Vol. 13, № 4. – P. 964–970.
197. Squirrell J.M., Lane M., Bavister B.D. Altering intracellular pH disrupts development and cellular organization in preimplantation hamster embryos // *Biology of Reproduction*. – 2001. Vol. 64, № 6. – P. 1845–1854.
198. Edwards L.J., Williams D.A., Gardner D.K. Intracellular pH of the preimplantation mouse embryo: effects of extracellular pH and weak acids // *Molecular reproduction and development*. – 1998. – P. 434–442.
199. Zander-Fox D.L. et al. Alterations in mouse embryo intracellular pH by DMO during culture impair implantation and fetal growth // *Reproductive Biomedicine Online*. – 2010. Vol. 21, № 2. – P. 219–229.
200. Tarahomi M. et al. pH stability of human preimplantation embryo culture media: effects of culture and batches // *Reproductive Biomedicine Online*. – 2018. Vol. 37, № 4. – P. 409–414.
201. Bates R.G., Covington A.K. Behavior of the glass electrode and other pH-responsive electrodes in biological media // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1968. Vol. 148, № 1. – P. 67–80.
202. Neelke D.M. et al. The effect of different temperature conditions on human embryos in vitro: two sibling studies // *Reproductive Biomedicine Online*. – 2019. Vol. 38, № 4. – P. 508–515.
203. Li S., Winuthayanon W. Oviduct: roles in fertilization and early embryo development // *Journal of Endocrinol.* – 2017. Vol. 232, № 1. – P. R1–R26.
204. Bahat A., Caplan S.R., Eisenbach M. Thermotaxis of Human Sperm Cells in Extraordinarily Shallow Temperature Gradients Over a Wide Range // *PLoS One*. – 2012. Vol. 7, № 7. – P. e41915.
205. Rock J., Robinson D. Effect of induced intrascrotal hyperthermia on testicular function in man // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. – 1965. Vol. 93, № 6. – P. 793–801.



206. Robinson D., Rock J., Menkin M.F. Control of Human Spermatogenesis Intrascrotal Temperature // JAMA. – 1968. Vol. 204, № 4. – P. 290–297.
207. Bauman J.E. Basal body temperature: unreliable method of ovulation detection // Fertility and Sterility – 1981. Vol. 36, № 6. – P. 729–733.
208. Rivera R.M., Hansen P.J. Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range // Reproduction.– 2001. Vol. 121, № 1. – P. 107–115.
209. Choi I. et al. Effects of prolonged exposure of mouse embryos to elevated temperatures on embryonic developmental competence // Reproductive Biomedicine Online. – 2015. Vol. 31, № 2. – P. 171–179.
210. Fawzy M. et al. Comparing 36.5°C with 37°C for human embryo culture: a prospective randomized controlled trial // Reproductive Biomedicine Online. – 2018. Vol. 36, № 6. – P. 620–626.
211. Hong K.H. et al. Examining the temperature of embryo culture in in vitro fertilization: a randomized controlled trial comparing traditional core temperature (37°C) to a more physiologic, cooler temperature (36°C) // Fertility and Sterility – 2014. Vol. 102, № 3. – P. 767–773.
212. Walters E.A. et al. Impact of a controlled culture temperature gradient on mouse embryo development and morphokinetics // Reproductive Biomedicine Online. – 2020. Vol. 40, № 4. – P. 494–499.
213. Moriyama D.F. et al. The effects of temperature variation treatments on embryonic development: a mouse study // Scientific Reports – 2022. Vol. 12, № 1. – P. 1–14.
214. Sepulveda-Rincon L.P. et al. Random Allocation of Blastomere Descendants to the Trophectoderm and ICM of the Bovine Blastocyst // Biology of Reproduction. – 2016. Vol. 95, № 6. P. 1–10.
215. Tian Y. et al. Automatic Blastomere Recognition from a Single Embryo Image // Computational and Mathematical Methods in Medicine. – 2014. Vol. 2014.
216. Rad R.M. et al. A hybrid approach for multiple blastomeres identification in early human embryo images // Computers in Biology and Medicine. – 2018. Vol. 101.

- P. 100–111.
217. Wolff H.S. et al. Advances in quality control: mouse embryo morphokinetics are sensitive markers of in vitro stress. // *Human Reproduction*. – 2013. Vol. 28, № 7. – P. 1776–1782.
  218. Fawzy M. et al. Humid versus dry incubator: a prospective, randomized, controlled trial // *Fertility and Sterility*. – 2017. Vol. 108, № 2. – P. 277–283.
  219. Armstrong S. et al. Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2019. № 5.
  220. Armstrong S. et al. Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2019. № 5.
  221. Alhelou Y., Mat Adenan N.A., Ali J. Embryo culture conditions are significantly improved during uninterrupted incubation: A randomized controlled trial // *Reproductive Biology*. – 2018. Vol. 18, № 1. – P. 40–45.
  222. Pribenszky C., Nilselid A.M., Montag M. Time-lapse culture with morphokinetic embryo selection improves pregnancy and live birth chances and reduces early pregnancy loss: a meta-analysis // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2017. Vol. 35, № 5. – P. 511–520.
  223. Moriyama D.F. et al. The effects of temperature variation treatments on embryonic development: a mouse study // *Scientific Reports*. – 2022. Vol. 12, № 1. – P. 1–14.
  224. Ciray H.N. et al. Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group // *Human Reproduction*. – 2014. Vol. 29, № 12. – P. 2650–2660.
  225. Yang S.H. et al. Effect of morphokinetics and morphological dynamics of cleavage stage on embryo developmental potential: A time-lapse study // *Taiwan. J. Obstetrics and Gynecology*. – 2018. Vol. 57, № 1. – P. 76–82.
  226. Hardarson T. et al. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation // *Human Reproduction*. – 2001. Vol. 16, № 2. – P. 313–318.
  227. Gardner D.K. et al. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome:

- Towards a single blastocyst transfer // *Fertility and Sterility* – 2000. Vol. 73, № 6. – P. 1155–1158.
228. Santos F. et al. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo // *Developmental Biology*. – 2002. Vol. 241, № 1. – P. 172–182.
229. Sturmey R.G. et al. DNA damage and metabolic activity in the preimplantation embryo // *Human Reproduction*. – 2009. Vol. 24, № 1. – P. 81–91.
230. Calle A. et al. Male mice produced by in vitro culture have reduced fertility and transmit organomegaly and glucose intolerance to their male offspring // *Biology of Reproduction*. – 2012. Vol. 87, № 2. – P. 34.
231. Chen M.I. et al. Impaired glucose metabolism in response to high fat diet in female mice conceived by in vitro fertilization (IVF) or ovarian stimulation alone // *PLoS One*. – 2014. Vol. 9, № 11. – P. e113155.
232. Cerny D. et al. Assisted Reproductive Technologies Predispose to Insulin Resistance and Obesity in Male Mice Challenged With a High-Fat Diet // *Endocrinology*. – 2017. Vol. 158, № 5. – P. 1152–1159.
233. Vrooman L.A., Bartolomei M.S. Can assisted reproductive technologies cause adult-onset disease? Evidence from human and mouse // *Reproductive Toxicology*. – 2017. Vol. 68. – P. 72–84.