

Сравнение преимплантационного развития эмбрионов крыс линий OXYS и WAG в условиях *in vivo* и *in vitro*

В.В. Кожевникова^{1,2}, Т.Н. Игонина¹, Е.Ю. Брусенцев¹, В.И. Мокроусова^{1,2}, Е.А. Кизилова^{1,2}, И.Н. Рожкова¹, В.А. Напримеров^{1,3}, С.Я. Амстиславский¹ ✉

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

Линия крыс OXYS является моделью преждевременного старения. Ранее были проведены многочисленные исследования, направленные на изучение особенностей поведения и физиологии крыс этой линии в период постнатальной жизни, однако преимплантационное развитие эмбрионов линии OXYS до сих пор не изучено. В настоящей работе исследовано преимплантационное развитие эмбрионов крыс линии OXYS как в условиях *in vivo*, так и при культивировании *in vitro*. В качестве контроля для всех экспериментов служила линия крыс WAG. Для исследования преимплантационного развития *in vivo* у крыс линий OXYS и WAG на 5-й день беременности из репродуктивных путей извлекали эмбрионы. У эмбрионов оценивали стадию развития и долю зародышей, достигших стадии бластоцисты, подсчитывали число клеток, входящих в состав бластоцисты. При изучении особенностей культивирования в условиях *in vitro* эмбрионы двух линий крыс извлекали из репродуктивных путей на сутки раньше, на 4-й день беременности, на стадии дробления эмбрионов. Такие эмбрионы, состоящие всего из восьми blastomeres на данной стадии развития, культивировали *in vitro* в течение 48 ч в среде P1 в присутствии ростового фактора IGF-1 (200 нг/мл) либо без него. После культивирования у эмбрионов крыс так же, как и в эксперименте по оценке развития эмбрионов *in vivo*, подсчитывали долю зародышей, достигших стадии бластоцисты, и оценивали число клеток, представленных в бластоцисте. В статье показано, что на 5-е сутки развития в репродуктивных путях самок крыс линии OXYS представлено большее число эмбрионов по сравнению с линией WAG. Развившиеся в условиях *in vivo* бластоцисты крыс линии OXYS на 5-е сутки содержат меньшее число клеток по сравнению с эмбрионами линии WAG. Культивирование ранних эмбрионов крыс линии OXYS и WAG в среде P1 нивелирует различия в скорости развития между этими линиями, а присутствие IGF-1 в культуральной среде не оказывает ни положительного, ни отрицательного эффекта на их развитие в условиях *in vitro*.

Ключевые слова: крысы OXYS; крысы WAG; преимплантационное развитие *in vivo*; культивирование *in vitro*; эмбрионы; IGF-1.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Кожевникова В.В., Игонина Т.Н., Брусенцев Е.Ю., Мокроусова В.И., Кизилова Е.А., Рожкова И.Н., Напримеров В.А., Амстиславский С.Я. Сравнение преимплантационного развития эмбрионов крыс линий OXYS и WAG в условиях *in vivo* и *in vitro*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017; 21(7):810-815. DOI 10.18699/VJ17.300

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kozhevnikova V.V., Igonina T.N., Brusentsev E.Yu., Mokrousova V.I., Kizilova E.A., Rozhkova I.N., Naprimerov V.A., Amstislavsky S.Ya. Comparison of *in vivo* and *in vitro* preimplantation embryo development in OXYS and WAG rats. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(7):810-815. DOI 10.18699/VJ17.300 (in Russian)

Received 04.08.2017
Accepted for publication 18.10.2017
© AUTHORS, 2017

✉ e-mail: amstis@yandex.ru

Comparison of *in vivo* and *in vitro* preimplantation embryo development in OXYS and WAG rats

V.V. Kozhevnikova^{1,2}, T.N. Igonina¹, E.Yu. Brusentsev¹, V.I. Mokrousova^{1,2}, E.A. Kizilova^{1,2}, I.N. Rozhkova¹, V.A. Naprimerov^{1,3}, S.Ya. Amstislavsky¹ ✉

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

OXYS rats are the model of precocious senescence. Numerous studies addressed physiology and behavior in rats of this strain during a postnatal period of their life, however, preimplantation development in OXYS rats has not yet been investigated. This study is addressing preimplantation embryonic development in OXYS rats both *in vivo* and *in vitro*. Rats of the WAG strain were used as controls. For studying the *in vivo* development, the embryos were collected from OXYS and WAG rats on day 5 post coitum, the stages of embryo development were estimated, the percentage of embryos at blastocyst stage and the cell numbers in these blastocysts were counted. In a special experiment, for studying *in vitro* development, the embryos were collected from both rat strains on day 4 post coitum and were cultured *in vitro* in P1 medium for 48 hours with or without supplementation with IGF-1 (200 ng/mL). Thereafter the percentage of embryos at blastocyst stage and the cell numbers in these blastocysts were counted in the same manner as for the *in vivo* experiment. This study reports that *in vivo* derived blastocysts of OXYS rats contain fewer cells on day 5 of their development than *in vivo* derived blastocysts of WAG rats. *In vitro* culture of the early preimplantation embryos in P1 medium mitigated the difference in the rate of embryo development between these two strains, the addition of IGF-1 into culture medium exerts neither negative nor positive effect on the rate of *in vitro* embryo development in rats of both strains.

Key words: OXYS rats; WAG rats; *in vivo* preimplantation development; *in vitro* culture; embryos; IGF-1.

В настоящее время существует большое разнообразие сред для культивирования эмбрионов млекопитающих. Культуральные среды различаются по своим трофическим добавкам, гормонам и другим компонентам, однако доля развивающихся эмбрионов в условиях *in vitro* чаще всего ниже по сравнению с таковыми в условиях *in vivo*. Такие различия показаны на мышах (Harlow, Quinn, 1982), крысах (Miyoshi et al., 1997) и эмбрионах других млекопитающих (Roth et al., 1994; Khatir et al., 2005). Более того, между полученными в условиях *in vivo* и *in vitro* эмбрионами имеются различия в уровне метилирования ДНК (Horigi et al., 2010), потреблении глюкозы и метаболизме аминокислот (Krischer, 2013). Подробнее различия в метаболизме и других параметрах у эмбрионов млекопитающих при их развитии в условиях *in vivo* и *in vitro* проанализированы в обзоре (Брусенцев и др., 2014).

С момента оплодотворения и до имплантации эмбрион развивается в жидкости, которая заполняет яйцеводы и матку, однако в условиях *in vitro* до сих пор не создана уникальная среда, которая бы полностью воспроизводила естественные условия *in utero* (Summers, Biggers, 2003). Этот поиск представляется трудной задачей (Брусенцев и др., 2014), но можно найти отдельные компоненты, которые играют ключевую роль в развитии эмбрионов, чтобы максимально приблизить условия их развития к тем, что имеются *in vivo*.

Открытие роли гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) в процессах дробления и имплантации стало настоящим прорывом в культивировании эмбрионов млекопитающих (Robertson, 2007). На основе этих данных для клиник ЭКО создана специальная среда (EmbryoGen, Origio) для эмбрионов с добавлением фактора GM-CSF (Renzini et al., 2013). Инсулиноподобный фактор роста первого типа (IGF-1) также является одним из известных факторов роста, действующих на преимплантационные эмбрионы (Velazquez et al., 2011; Green, Day, 2013). IGF-1 обнаруживают у разных видов животных, он присутствует у мышей (Manabe et al., 2013), крыс (Zhang et al., 1994), коров (Xia et al., 1996), а также в репродуктивных путях человека (Lighten et al., 1998). Экспрессия IGF-1 в репродуктивных путях мышей идет под контролем гормонов яичника, в частности прогестерона и эстрадиола, а повышение уровня экспрессии этого ростового фактора отмечается с 4-го дня после оплодотворения и сохраняется на 5-й–6-й день, т. е. именно в перипреимплантационный период (Karur et al., 1992).

Помимо ключевой роли IGF-1 в регуляции клеточного роста, дифференцировки и апоптоза, этот ростовой фактор задействован в процессах старения у многих организмов, включая круглых червей, дрозофил и млекопитающих (Kenyon, 2001; Bergman et al., 2008). Известно, что низкий уровень IGF-1, а также нокаут его рецептора в гетерозиготе увеличивают продолжительность жизни у мышей (Holzenberger et al., 2003).

Эффекты IGF-1 продемонстрированы на эмбрионах мышей (Harvey, Kaye, 1992; Heyner et al., 1993; Lin et al., 2003), крупного рогатого скота (Velazquez et al., 2011), человека (Lighten et al., 1998) и домашней кошки (Thongkittidilok et al., 2014), но на крысах подобные исследования не проводились. Несмотря на то что крысы OXYS

являются уникальной моделью старения, существует лишь одна работа, в которой изучено преимплантационное развитие крыс этой линии *in vitro* (Брусенцев и др., 2015). В этой работе показано, что GM-CSF не влияет на скорость развития эмбрионов крыс линии OXYS, но в ней не исследовано влияние на развитие эмбрионов фактора IGF-1, задействованного в процессах старения.

Цель настоящего исследования – изучение преимплантационного развития крыс OXYS *in vivo* и *in vitro* в сравнении с крысами WAG, в том числе при участии фактора роста IGF-1.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. В качестве доноров эмбрионов использовали половозрелых самок крыс линий WAG и OXYS (возраст 10–14 нед). Для спаривания с целью получения эмбрионов использовали самцов тех же линий того же возраста. Животных содержали в стандартных условиях конвенционального вивария Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия). Все эксперименты на животных одобрены Комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 5 от 13.05.2011) и соответствуют Европейской конвенции о защите позвоночных животных.

Получение *in vivo* эмбрионов крыс на стадии бластоцисты. Для сравнения темпов развития эмбрионов у крыс линий WAG и OXYS проанализированы эмбрионы на стадии бластоцисты, полученные в условиях *in vivo*. Для этого половозрелых самок крыс линий WAG (9) и OXYS (7), находящихся в состоянии эструса, который определяли с помощью анализа влагалищных мазков, ссаживали на ночь с самцами соответствующих линий. День обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке считали первым днем беременности. Эмбрионы вымывали через 120 ч после обнаружения сперматозоидов в мазке у крыс. Самок крыс подвергали эвтаназии путем помещения в CO₂-камеру. Эмбрионы получали путем промывания яйцеводов с помощью инсулиновых шприцев с иглой диаметром 0.3 мм со средой FertiCult Flushing medium (FertiPro, Бельгия).

Бластоцисты, полученные *in vivo*, классифицировали в зависимости от размера их полости. Если полость бластоцисты была менее 50 % от всего объема эмбриона, то такие эмбрионы относили к категории 1, если более 50 %, – к категории 2. После оценки эмбрионы фиксировали в 4 % растворе формальдегида (Merk, Германия) и хранили при температуре +4 °C для дальнейшего подсчета ядер в бластоцистах.

Получение эмбрионов крыс на стадии дробления и дальнейшее культивирование *in vitro* и в присутствии фактора роста IGF-1. Для эксперимента *in vitro* получали эмбрионы крыс через 96 ч после обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке. В работе использованы только восьмиклеточные эмбрионы крыс OXYS и WAG.

Анализ полученных эмбрионов проводили с использованием стереомикроскопа Leica S8 APO (Leica Microsystems, Германия) с увеличением до ×80. Качество эмбрионов оценивали по таким критериям, как стадия эмбрионального развития, целостность блестящей оболочки и число неповрежденных бластомеров.

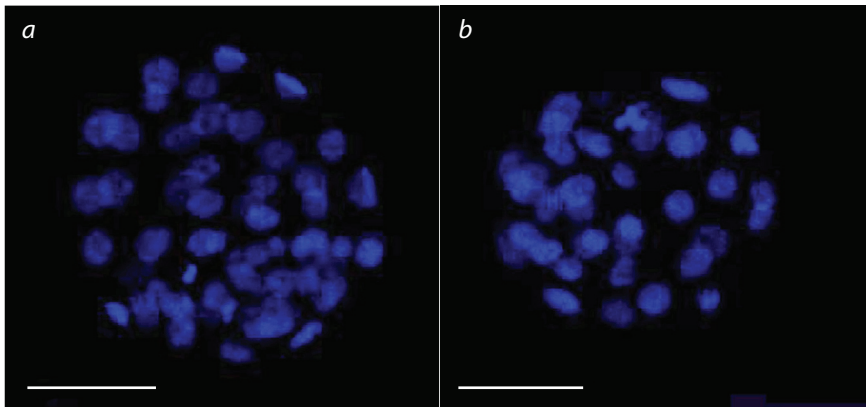


Fig. 1. Blastocysts of WAG and OXYS rats obtained *in vivo* on day 5 of development. Fluorescence microscopy of DAPI-stained rat embryos: (a) WAG strain, (b) OXYS strain. Scale bar 50 μm .

Полученные эмбрионы промывали в трех каплях среды FertiCult Flushing medium и распределяли по группам (3–5 эмбрионов в 50 мкл питательной среды). Культивирование эмбрионов крыс проводили в каплях среды P1 (Cosmo Bio, США) под минеральным маслом (Sigma, США). Дальнейшее развитие эмбрионов проходило в условиях CO_2 -инкубатора (Galaxy 48R/48S, Eppendorf-MG), при температуре 37 °C, 5 % CO_2 и влажности 90 %. В эксперименте по влиянию факторов роста на крысиные эмбрионы было сформировано четыре группы: эмбрионы крыс линии WAG без добавления фактора (контрольная) и с добавлением IGF-1 (200 нг/мл), а также эмбрионы крыс линии OXYS без добавления фактора (контрольная) и с добавлением IGF-1 (200 нг/мл).

Оценку развития эмбрионов производили каждые 24 ч культивирования, фотодокументирование эмбрионов проводили при $\times 250$ увеличении с использованием микроскопа M205 FA (Leica Microsystems, Германия). По окончании культивирования эмбрионы фиксировали в 4 % растворе формальдегида (Merk, Германия) и хранили при температуре +4 °C для дальнейшего подсчета ядер в бластоцисте.

Окраска интерфазных ядер в клетках преимплантационных эмбрионов. Бластоцисты помещали в 1 мл фосфатно-солевого буфера Дюльбекко (DPBS) (Sigma, США), содержащего 4 % формальдегида (Merk, Германия) при pH 7.4–7.6. После фиксации эмбрионы промывали три раза в 500 мкл DPBS, выдерживали в 0.3 % растворе Triton X-100 в течение 5 мин и подвергали воздействию 2 мкг/мл 4,6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI) (Sigma, США) в DPBS в течение 10 мин при комнатной температуре и затем промывали в DPBS. Окрашенные эмбрионы помещали в каплю DPBS на чистое предметное стекло и накрывали покровным стеклом. Стекла с препаратами были проанализированы и подсчитано число клеток с использованием микроскопа M205 FA (Leica Microsystems, Германия) с соответствующими фильтрами для окрашивания DAPI. Подсчет числа ядер в эмбрионе производили вручную путем визуальной оценки препаратов.

Статистический анализ. Результаты по подсчету числа клеток в бластоцистах крыс в зависимости от их категории и анализу общего числа полученных эмбрионов представлены как среднее \pm ошибка среднего. Сравнение проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Для анализа данных по числу клеток в бластоцистах без разделения их по категориям использовали двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA). В качестве факторов использованы «линия» и «условия развития». *Post hoc* анализ осуществляли с помощью критерия Фишера. Проценты эмбрионов, достигающих стадии бластоцисты в разных экспериментальных группах, сравнивали с помощью критерия χ^2 . Статистическую обработку проводили с использованием стандартного пакета программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, Inc). Различия считали достоверно значимыми при $p < 0.05$.

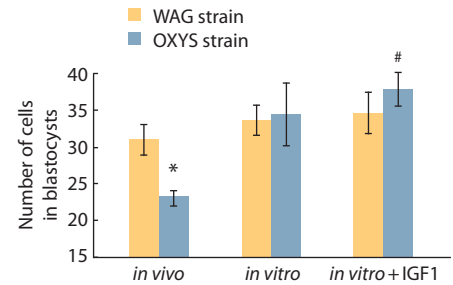


Fig. 2. Number of cells in WAG and OXYS rat blastocysts (regardless of grade) obtained *in vivo* and after *in vitro* culturing, with or without IGF1.

* $p < 0.05$ vs. WAG blastocysts obtained *in vivo*, # $p < 0.05$ vs. OXYS blastocysts obtained *in vivo*.

Результаты

Показано, что через 120 ч после обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке в репродуктивных путях крыс линии OXYS присутствует большее число эмбрионов по сравнению с линией WAG: 9.7 ± 0.9 ($n = 7$) и 7.2 ± 0.4 ($n = 9$) соответственно ($p < 0.05$). Доля эмбрионов, достигающих стадии бластоцисты на 5-е сутки развития *in vivo*, не отличается у крыс линий OXYS и WAG (61.8 и 69.8 % соответственно). При этом наблюдаются значительные различия в числе клеток, входящих в состав бластоцист (рис. 1, 2; табл. 1). Влияние факторов «линия» и «условия развития» на этот показатель не было достоверным. *Post hoc* анализ, тем не менее, показал, что эмбрионы крыс линии OXYS на 5-е сутки развития состоят из меньшего числа клеток, чем у крыс линии WAG ($p < 0.05$) (см. рис. 2).

Следует отметить, что такие межлинейные различия проявляются ($p < 0.05$) и при отдельном сравнении числа клеток по второй категории бластоцист (т. е. стадии поздней и экспандированной бластоцисты, стадии хетчинга) (см. табл. 1).

Межлинейные различия по числу клеток, входящих в состав бластоцисты, нивелировались в эксперименте по культивированию дробящихся эмбрионов крыс в условиях *in vitro* в течение 48 ч (см. рис. 2). После культивирования число клеток в бластоцистах крыс линии OXYS не отличалось от такового у крыс линии WAG (34.5 ± 4.2 и 33.7 ± 1.1 соответ-

Table 1. Number of cells in embryos of WAG and OXYS rats obtained *in vivo* on day 5 of pregnancy with regard to blastocyst grade

Strain	Blastocysts		Number of cells in blastocysts	
	Grade 1 (%)	Grade 2 (%)	Grade 1 (number of embryos)	Grade 2 (number of embryos)
WAG	9 (17.0)	28 (52.8)	22.0 ± 1.6 (6)	33.7 ± 1.1 (20)
OXYS	14 (20.6)	28 (41.2)	19.1 ± 0.9 (13)	26.4 ± 1.2 (16)*

* $p < 0.05$ vs. the number of cells in WAG rats in blastocysts of the same grade.

Table 2. Comparison of the growth rate of WAG and OXYS rat embryos *in vitro* and with growth factor IGF1

Group		Number of embryos (number of donor animals)	Blastocyst stage (%)	
			after 24 h	after 48 h
WAG strain	Control	21 (6)	3 (14.3)	7 (33.3)
	200 ng/mL IGF1	16 (4)	4 (25)	6 (37.5)
OXYS strain	Control	28 (7)	0 (0)	13 (46.4)
	200 ng/mL IGF1	14 (4)	2 (14.3)	4 (28.6)

ственно). *Post hoc* анализ показал, что при добавлении фактора IGF-1 при культивировании *in vitro* эмбрионов крыс линии OXYS число клеток в бластоцистах не отличалось от такового при культивировании без фактора, хотя было достоверно больше ($p < 0.05$) по сравнению с эмбрионами той же линии, полученными *in vivo* (см. рис. 2). Более того, доля развивающихся бластоцист при добавлении к дробящимся восьмиклеточным эмбрионам крыс IGF-1 в дозе 200 нг/мл не отличалась от контрольных групп *in vitro* (табл. 2).

Обсуждение

В проведенном нами эксперименте по подсчету клеток в бластоцистах крыс, полученных после пяти дней развития *in vivo*, их число варьировало от 23 до 31, а при развитии *in vitro* (три дня развития *in vivo* плюс два дня развития *in vitro*) составляло 33–38 клеток на эмбрион. Эти результаты не противоречат данным литературы (Schiffner, Spielmann, 1976; Kito et al., 2008; Porova et al., 2011), несмотря на то что культивирование эмбрионов проходило на неспецифической для крыс среде P1, которая по своему составу близка к среде R1ECM, разработанной специально для эмбрионов крыс. По данным литературы, на среде R1ECM при культивировании эмбрионов крыс со стадии двух клеток доля развивающихся бластоцист составляет 32.7 % (Porova et al., 2011), что согласуется с темпами развития эмбрионов крыс в нашем эксперименте, 28.6–46.4 % при культивировании со стадии восьми клеток. Таким образом, коммерческую среду P1, применяемую в клиниках ЭКО для человека, можно также использовать как альтернативу среде R1ECM для культивирования эмбрионов крыс.

В работе (Scott, Whittingham, 1996) указывается, что среди мышей существуют так называемые «медленные» и «быстрые линии»: эмбрионы таких линий демонстрируют различия в темпах эмбрионального развития в условиях

как *in vivo*, так и *in vitro*. Этот же критерий можно применить и по отношению к крысам. Обнаруженные нами межлинейные различия по числу клеток в бластоцистах крыс линий OXYS и WAG, по всей видимости, обусловлены изменениями в маточной жидкости, из которой эмбрионы получают питательные вещества до момента имплантации. Поскольку линия крыс OXYS является моделью раннего старения, а в старении задействованы механизмы с участием фактора роста IGF-1 (Kenyon, 2001; Berryman et al., 2008), мы предположили, что у крыс линии OXYS концентрация этого фактора может быть изменена и за счет этого наблюдается сниженное число клеток в бластоцистах, полученных *in vivo*.

На основе этой гипотезы проведен эксперимент по культивированию *in vitro* восьмиклеточных эмбрионов крыс обеих линий с участием фактора роста IGF-1. Наша гипотеза об измененном уровне данного фактора у крыс OXYS не подтвердилась, поскольку в отсутствие фактора роста IGF-1 после культивирования в течение 48 ч эмбрионы линии OXYS «догнали» по числу клеток линию WAG. Скорее всего, в маточной жидкости у крыс линии OXYS существует нехватка других, более значимых компонентов среды, например аминокислот и белков, поскольку показано, что оптимальные концентрации этих базовых компонентов очень важны для развития эмбрионов млекопитающих (Summers, Biggers, 2003).

В наших экспериментах обнаружено, что потенциальная плодовитость, оцененная по числу эмбрионов, извлеченных из репродуктивных путей, в расчете на самку на 5-й день беременности у крыс линии OXYS выше по сравнению с линией WAG, но после рождения детенышей эти две линии не различаются по числу мышей в помете (Igonina et al., 2017). Это, возможно, связано с более высоким уровнем постимплантационных потерь у крыс OXYS.

В более раннем исследовании (Брусенцев и др., 2015) показано, что добавление GM-CSF в среду при культиви-

ровании *in vitro* приводит к возрастанию доли эмбрионов, достигающих стадии бластоцисты у мышей, однако фактор не оказывает какого-либо влияния на развитие крысиных эмбрионов. В настоящей работе не обнаружено также влияния фактора IGF-1 на развитие преимплантационных эмбрионов крыс *in vitro*.

Предварительный анализ различных доз фактора роста проводился нами в работе с эмбрионами мышей, использовали дозировки 10 и 20 нг/мл. При этом в наших предыдущих исследованиях на мышах влияния этих малых доз IGF-1 на скорость развития эмбрионов *in vitro* не обнаружено, хотя при одиночном культивировании эмбрионов кошек показано, что добавление в культуральную среду IGF-1 в концентрации 25 и 50 нг/мл приводило к увеличению доли эмбрионов, достигших стадии бластоцисты, тогда как более высокие концентрации IGF-1 не оказывали значимого эффекта (Thongkittidilok et al., 2014). В работе М.А. Velazquez с коллегами (2011) использовали IGF-1 в концентрации 100 и 1000 нг/мл при культивировании эмбрионов крупного рогатого скота. В отличие от более низкой дозы, применение максимальной дозировки приводило к возрастанию числа клеток в ВКМ и в целом в эмбрионах. Выбранная нами достаточно высокая дозировка IGF-1 (200 нг/мл) не оказывала эффекта на эмбрионы крыс. Дальнейший фармакологический анализ с применением других дозровок и систем культивирования позволит окончательно убедиться в том, что IGF-1 не оказывает заметного влияния на темпы развития эмбрионов у крыс.

Отсутствие эффектов и GM-CSF, и IGF-1, по-видимому, может быть связано с особенностями преимплантационного развития у крыс. Возможно, что рецепторы к ростовым факторам появляются у крыс на более поздних стадиях, чем у мышей. Это предположение нуждается в экспериментальной проверке, так как в мировой литературе нам не удалось найти информации по динамике появления рецепторов к этим факторам роста в преимплантационных эмбрионах крыс.

Несмотря на многочисленные исследования влияния IGF-1 на развитие преимплантационных эмбрионов, проведенных главным образом на мышах (Schultz, Heyner, 1993; Брусенцев и др., 2014), его роль в процессах раннего эмбрионального развития неоднозначна. Одни исследователи отмечают его положительные эффекты на процессы дробления и образования бластоцист (Harvey, Kaye, 1992), другие – только на хетчинг (Lin et al., 2003), а некоторые не обнаруживают эффектов вовсе (Green, Day, 2013). По-видимому, такие неоднозначные выводы могут быть обусловлены не только различием дозровок, но и условиями культивирования, поскольку показано, что на экспрессию генов, в том числе и экспрессию рецепторов к IGF-1, может влиять состав среды (Ho et al., 1995).

В настоящей работе впервые изучено развитие эмбрионов крыс линии OXYS как *in vivo*, так и *in vitro*, в том числе и при участии фактора роста IGF-1. Результаты нашего исследования показывают, что эмбрионы крыс линии OXYS в условиях *in vivo* содержат меньше число клеток на стадии бластоцисты и их можно отнести к «медленной» линии, а линия WAG в сравнении с линией OXYS является «быстрой». Более того, как показали недавние исследо-

вания, крысы OXYS характеризуются сниженным весом в неонатальный период и у них медленнее формируются некоторые рефлексы, свидетельствующие об их замедленном развитии по сравнению с крысами WAG в ходе раннего постнатального онтогенеза (Igonina et al., 2017). Все эти наблюдения подтверждают гипотезу о генетически обусловленном замедлении развития в эмбриональный и ранний неонатальный периоды, что может быть связано с измененным профилем компонентов маточной жидкости, каждый из которых очень важен для развития эмбрионов (Summers, Biggers, 2003; Брусенцев и др., 2014).

Acknowledgments

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 15-04-05509, and budgeted project 0324-2016-0002 of the Human and Animal Genetics Department, Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Berryman D.E., Christiansen J.S., Johannsson G., Thorne M.O., Korchick J.J. Role of the GH/IGF-1 axis in lifespan and healthspan: Lessons from animal models. *Growth Horm. IGF Res.* 2008;18(6):455-471. DOI 10.1016/j.ghir.2008.05.005.
- Brusentsev E.Yu., Igonina T.N., Amstislavsky S.Ya. Traditional and modern approaches to culture of preimplantation mammalian embryos *in vitro*. *Ontogenez = Ontogenesis (Moscow)*. 2014;45(2):73-88. (in Russian)
- Brusentsev E.Yu., Igonina T.N., Rozhkova I.N., Ragaeva D.S., Amstislavsky S.Ya. Effects of growth factors during *in vitro* culture of mouse and rat embryos. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2015;19(4):372-377 DOI 10.18699/VJ15.046. (in Russian)
- Green C.J., Day M.L. Insulin-like growth factor 1 acts as an autocrine factor to improve early embryogenesis *in vitro*. *Int. J. Dev. Biol.* 2013;57(11-12):837-44. DOI 10.1387/ijdb.130044md. PubMed PMID: 24623075.
- Harlow G.M., Quinn P. Development of preimplantation mouse embryos *in vivo* and *in vitro*. *Aust. J. Biol. Sci.* 1982;35(2):187-193.
- Harvey M.B., Kaye P.L. Insulin-like growth factor-1 stimulates growth of mouse preimplantation embryos *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 1992; 31(3):195-199.
- Heyner S., Shi C.Z., Garside W.T., Smith R.M. Functions of the IGFs in early mammalian development. *Mol. Reprod. Dev.* 1993;35(4): 421-425.
- Ho Y., Wigglesworth K., Eppig J.J., Schultz R.M. Preimplantation development of mouse embryos in KSOM: augmentation by amino acids and analysis of gene expression. *Mol. Reprod. Dev.* 1995;41: 232-238.
- Holzenberger M., Dupont J., Ducos B., Leneuve P., Gélouën A., Even P.C., Cervera P., Le Bouc Y. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature*. 2003;421(6919):182-187.
- Horii T., Yanagisawa E., Kimura M., Morita S., Hatada I. Epigenetic differences between embryonic stem cells generated from blastocysts developed *in vitro* and *in vivo*. *Cell Reprogram.* 2010;12(5):551-563. DOI 10.1089/cell.2009.0104.
- Igonina T.N., Ragaeva D.S., Tikhonova M.A., Petrova O.M., Herbeck Yu.E., Rozhkova I.N., Amstislavskaya T.G., Amstislavsky S.Ya. Neurodevelopment and behavior in neonatal OXYS rats with genetically determined accelerated senescence. *Brain Res.* 2017 (in press).
- Kapur S., Tamada H., Dey S.K., Andrews G.K. Expression of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and its receptor in the peri-implantation mouse uterus, and cell-specific regulation of IGF-1 gene expression by estradiol and progesterone. *Biol. Reprod.* 1992;46(2):208-219.

- Kenyon C. A conserved regulatory system for aging. *Cell*. 2001;105(2):165-168.
- Khatir H., Anouassi A., Tibary A. *In vitro* and *in vivo* developmental competence of dromedary (*Camelus dromedarius*) embryos produced *in vitro* using two culture systems (mKSOMaa and oviductal cells). *Reprod. Domest. Anim.* 2005;40(3):245-249.
- Kito S., Kaneko Y., Yano H., Tateno S., Ohta Y. Developmental responses of 2-cell embryos to oxygen tension and bovine serum albumin in Wistar rats. *Exp. Anim.* 2008;57(2):123-128.
- Krisner R.L. *In vivo* and *in vitro* environmental effects on mammalian oocyte quality. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2013;1:393-417. DOI 10.1146/annurev-animal-031412-103647.
- Lighten A.D., Moore G.E., Winston R.M., Hardy K. Routine addition of human insulin-like growth factor-I ligand could benefit clinical *in vitro* fertilization culture. *Hum. Reprod.* 1998;13(11):3144-3150.
- Lin T.-C., Yen J.-M., Gong K.-B., Hsu T.-T., Chen L.-R. IGF-1/IGFBP-1 increases blastocyst formation and total blastocyst cell number in mouse embryo culture and facilitates the establishment of a stem-cell line. *BMC Cell Biol.* 2003;4:14. DOI 10.1186/1471-21214-14.
- Manabe Y., Tochigi M., Moriwaki A., Takeuchi S., Takahashi S. Insulin-like growth factor 1 mRNA expression in the uterus of streptozotocin-treated diabetic mice. *J. Reprod. Dev.* 2013;59(4):398-404. DOI 10.1262/jrd.2012-169.
- Miyoshi K., Kono T., Niwa K. Stage-dependent development of rat 1-cell embryos in a chemically defined medium after fertilization *in vivo* and *in vitro*. *Biol. Reprod.* 1997;56(1):180-185.
- Popova E., Bader M., Krivokharchenko A. Effect of culture conditions on viability of mouse and rat embryos developed *in vitro*. *Genes*. 2011;2(2):332-344. DOI 10.3390/genes2020332.
- Renzini M., Dal Canto M., Coticchio G., Comi R., Brigante C., Caliari I., Brambillasca F., Merola M., Lain M., Turchi D. Clinical efficiency and perinatal outcome of ART cycles following embryo culture in the presence of GM-CSF in patients with miscarriage or early pregnancy loss history. *Hum. Reprod.* 2013;28(1):160-202.
- Robertson S.A. GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007;18(3-4):287-298.
- Roth T.L., Swanson W.F., Wildt D.E. Developmental competence of domestic cat embryos fertilized *in vivo* versus *in vitro*. *Biol. Reprod.* 1994;51(3):441-451.
- Schiffner J., Spielmann H. Fluorometric assay of the protein content of mouse and rat embryos during preimplantation development. *J. Reprod. Fertil.* 1976;47(1):145-147.
- Schultz G.A., Heyner S. Growth factors in preimplantation mammalian embryos. *Oxf. Rev. Reprod. Biol.* 1993;15:43-81.
- Scott L., Whittingham D.G. Influence of genetic background and media components on the development of mouse embryos *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 1996;3(3):336-346.
- Summers M.C., Biggers J.D. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Hum. Reprod. Update.* 2003;9(6):557-582.
- Thongkittidilok C., Tharasanit T., Sananmuang T. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) enhances developmental competence of cat embryos cultured singly by modulating the expression of its receptor (IGF-1R) and reducing developmental block. *Growth Horm. IGF Res.* 2014;24(2-3):76-82.
- Velazquez M.A., Hermann D., Kues W.A., Niemann H. Increased apoptosis in bovine blastocysts exposed to high levels of IGF1 is not associated with downregulation of the IGF1 receptor. *Reproduction.* 2011;41(1):91-103. DOI 10.1530/REP-10-0336.
- Xia P., Han V.K., Viuff D., Armstrong D.T., Watson A.J. Expression of insulin-like growth factors in two bovine oviductal cultures employed for embryo co-culture. *J. Endocrinol.* 1996;149:41-53.
- Zhang X., Kidder G.M., Watson A.J., Schultz G.A., Armstrong D.T. Possible roles of insulin and insulin-like growth factors in rat preimplantation development: investigation of gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Reprod. Fertil.* 1994; 100(2):375-380.