

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
РАБОТЫ

УДК 591.39,591.481.11

ВЛИЯНИЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO* И ПЕРЕНОСА ЭМБРИОНОВ
НА ПЛОТНОСТЬ НЕЙРОНОВ И НЕЙРОГЕНЕЗ В ГОЛОВНОМ
МОЗГЕ МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6J

© 2023 г. Е. Ю. Брусенцев¹, Т. Н. Игонина¹, И. Н. Рожкова¹, С. В. Окотруб¹, Д. А. Лебедева^{1,2},
Е. В. Владимирова¹, В. С. Козенева^{1,2}, С. Я. Амстиславский¹, *

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”, Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
“Новосибирский национальный исследовательский государственный университет”, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 02.02.2023 г.

После доработки 07.03.2023 г.

Принята к публикации 09.03.2023 г.

Настоящее исследование направлено на изучение долгосрочных эффектов культивирования *in vitro* (*in vitro* culture – IVC) и переноса эмбрионов (embryo transfer – ET) на плотность нейронов в гиппокампе и нейрогенез у взрослых мышей C57BL/6J. Потомство мышей C57BL/6J, рожденных естественным путем (группа C57BL), сравнивали с мышами C57BL/6J, рожденными после культивирования *in vitro* и переноса эмбрионов самкам-реципиентам C57BL/6J (группа ET-C57BL). В возрасте трех месяцев групповых различий по массе тела и соотношению масс мозга и тела обнаружено не было, хотя наблюдали половые различия по этим показателям. Потомство обоих полов, родившееся после культивирования *in vitro* и переноса эмбрионов, имело более низкий уровень нейрогенеза в зубчатой извилине (dentate gyrus – DG) гиппокампа по сравнению с контрольной группой C57BL. В заключение, культивирование *in vitro* и перенос эмбрионов не оказывали существенного влияния на массу тела и мозга у потомства, но влияли на нейрогенез в гиппокампе у взрослых потомков обоих полов. Кроме того, обнаружено снижение числа пирамидных нейронов в СА3 области гиппокампа у самок группы ET-C57BL.

Ключевые слова: C57BL/6J, преимплантационные эмбрионы, культивирование *in vitro*, плотность нейронов, гиппокамп, нейрогенез

DOI: 10.31857/S1027813323030068, **EDN:** YURBMM

ВВЕДЕНИЕ

Культивирование эмбрионов *in vitro* (*in vitro* culture – IVC) и перенос эмбрионов (embryo transfer – ET) являются ключевыми вспомогательными репродуктивными технологиями (ВРТ), широко применяемыми на лабораторных животных и в современной репродуктивной медицине [1, 2]. Возможные долгосрочные эффекты применения этих технологий на здоровье потомства широко обсуждаются [1, 3]. Хорошо документированы изменения сердечно-сосудистой [4, 5] и нервной [6, 7] систем у детей и взрослых, зачатых при помощи ВРТ. Однако до сих пор неясно, вызваны ли наблюдаемые изменения собственно применением репродуктивных технологий или их следует отнести к субфертильности пар [8], их возрасту [9] или наличию хронических заболеваний у па-

циентов, проходящих протоколы ВРТ [10]. Недавний обзор показывает, что, хотя многие исследования, описывающие наблюдения за развитием детей, рожденных после ВРТ, указывают на связь частоты определенных заболеваний и применения этих технологий, информация в данной области по-прежнему ограничена и достаточно противоречива [3].

Онтогенетическая концепция здоровья и болезни (Developmental Origins of Health and Disease – DOHaD) указывает на то, что пренатальное воздействие измененных условий окружающей среды влияет на постнатальное развитие ребенка, обмен веществ и восприимчивость к болезням во взрослом возрасте [11]. Недавно гипотеза DOHaD была расширена и на преимплантационные стадии развития [12, 13]. В литературе обсуждается повышение частоты проявлений расстройств аутистического спектра (РАС) у детей, зачатых с помощью ВРТ [14–16]. Между тем, после диффе-

* Адресат для корреспонденции: 630090 Россия, Новосибирск, пр-кт Академика Лаврентьева, 10; e-mail: amstis@yandex.ru.

ренцированного учета всех факторов, таких, как экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) или интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (ИКСИ), а также одиночный/множественный способ переноса эмбрионов, эта связь становится далеко не очевидной [17]. Вспомогательные репродуктивные технологии характеризуются многочисленными и сложными терапевтическими процедурами, которые до сих пор не унифицированы и могут варьировать в разных клиниках, что особенно затрудняет выявление индивидуальных факторов риска для детей [18].

Повышенное кровяное давление и сосудистую дисфункцию наблюдали у потомства фертильных и здоровых лабораторных мышей, зачатых с помощью ВРТ, что свидетельствует о некоторых эффектах, связанных именно с применением данных технологий [19, 20]. Помимо сердечно-сосудистых изменений, у мышей, рожденных в результате ВРТ обнаружили изменения эмоционального поведения [21–24]. Также было высказано предположение, что культивирование *in vitro* оказывает более существенное влияние по сравнению с другими компонентами ВРТ на фетоплацентарное развитие, что приводит к ухудшению здоровья потомства, предположительно из-за эпигенетических нарушений [25]. Между тем, некоторые наблюдения на лабораторных мышках и крысах свидетельствуют о том, что такие репродуктивные технологии, как культивирование *in vitro* или криоконсервация эмбрионов в сочетании с переносом эмбрионов, могут снижать артериальное давление у потомства [23], смягчать проявление генетически predetermined артериальной гипертензии [26] и снижать подверженность некоторым заболеваниям [27].

В ряде исследований выявлена связь ВРТ с повышением частоты возникновения заболеваний нервной системы, в частности, детского церебрального паралича [28, 29] и РАС [14–16], однако биологический механизм этой связи до сих пор не ясен. Кроме того, в некоторых работах показано, что для детей с РАС характерны аномальный характер роста и развития мозга, изменения плотности нейронов в некоторых структурах лимбической системы, в частности, в гиппокампе [30–32].

Данное исследование направлено на определение долгосрочных эффектов культивирования *in vitro* и переноса эмбрионов на развитие нервной системы потомства, в частности, на оценку влияния этих процедур на плотность нейронов в гиппокампе, а также нейрогенез у мышей линии C57BL/6J.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные. Работа проведена на потомках мышей линии C57BL/6J, ро-

жденных как после естественной беременности, так и после культивирования *in vitro* преимплантационных эмбрионов с последующим их переносом в рог матки самки-реципиента той же линии. Были сформированы следующие группы животных для исследования:

1) группа C57BL – контроль (естественно рожденные мыши линии C57BL/6J): шесть пометов, 2–6 мышей в помете, $n = 26$ (9 самцов и 17 самок);

2) группа ET-C57BL – мыши линии C57BL/6J (рожденные после культивирования *in vitro* – IVC = 44 ч и переноса эмбрионов – ET): семь пометов, 2–5 мышей в помете, $n = 23$ (14 самцов и 9 самок).

Мышей содержали в SPF-виварии Института цитологии и генетики (ИЦиГ) г. Новосибирск в индивидуально вентилируемых клетках размерами 36 см × 25 см × 14 см (длина × ширина × высота) с подстилом из древесной стружки при температуре 22–24°C; цикл день/ночь 14 : 10 (рассвет в 3 ч ночи), влажность 40–50%, свободный доступ к стандартному корму (V1534–300, Sniff, Soest, Германия) и очищенной воде, обогащенной минеральными добавками (Северянка; Экопроект, Россия). Самок с детенышами содержали совместно до 25-го дня после рождения потомков. Все эксперименты были одобрены Комитетом по биоэтике ИЦиГ и соответствуют Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей.

Спаривание доноров и получение эмбрионов. Самкам мышей линии C57BL/6J ($n = 7$) в возрасте 8–16 нед. делали инъекцию 5 МЕ гонадотропина сыровотки жеребых кобыл (ГСЖК; Фоллигон, Intervet, Нидерланды) и через 48 ч 5 МЕ хорионического гонадотропина человека (ХГЧ; Хорулон, Intervet, Нидерланды) для индукции суперовуляции. Самок на ночь ссаживали с фертильными самцами той же линии. Спаривание проверяли по вагинальной пробке на следующее утро, а день, когда эта пробка была обнаружена, считали первым днем после фертильного спаривания (*dpc* 1), то есть первым днем беременности. Беременных самок подвергали эвтаназии при помощи CO₂ на *dpc* 2, чтобы получить эмбрионы на стадии 2-х бластомеров. Яйцеводы и рога матки промывали средой FertiCult™ Flushing (FertiPro, Бельгия). Полученные эмбрионы оценивали под стереомикроскопом S8 APO (Leica Microsystems, Германия) при увеличении ×80. Эмбрионы без видимых дефектов (бластомеров без повреждений не менее 75%) и с целыми прозрачными оболочками (*zonae pellucidae*) отбирали для культивирования *in vitro*, а некачественные эмбрионы (поврежденных бластомеров более 25%) отбраковывали.

Получение псевдобеременных самок-реципиентов. В качестве самок-реципиентов для переноса эмбрионов использовали мышей линии C57BL/6J

($n = 7$). Самок в проэструсе или эструсе ссаживали с вазэктомированными гибридными самцами (CD1 \times C57BL/6J), проверенных на стерильность. Через 8–12 ч после спаривания самок проверяли на наличие вагинальных пробок. День, когда была обнаружена вагинальная пробка, считали первым днем псевдобеременности.

Культивирование *in vitro* и перенос эмбрионов. Преимплантационные эмбрионы мышей линий C57BL/6J на стадии 2-х бластомеров получали на *dpc* 2 и помещали в капли по 20 мкл KSOM (Merck, Германия) на 35-мм чашки Петри (Corning, США). Затем их культивировали под минеральным маслом (Merck, Германия) группами по 5–11 в CO₂-инкубаторе New Brunswick™ Galaxy 48R (Eppendorf, Германия) в стандартных условиях (5% CO₂, 37°C и влажности 90%) в течение 48 ч. Развитие эмбрионов оценивали под стереомикроскопом S8 APO (Leica Microsystems, Германия). Через 48 ч нормально развивающиеся бластоцисты ($n = 61$) были перенесены в рог матки самок-реципиентов на третий день их псевдобеременности.

Самкам-реципиентам вводили внутривенно 0.01 мг/кг медетомидина гидрохлорида (Медитин, 1 мг/мл; Апи-Сан, Россия) и через 10 мин 50 мг/кг кетамина гидрохлорида (Кетамин, 50 мг/мл; Московский эндокринный завод, Россия). Затем подкожно вводили 0.01 мл амоксициллина (амоксициллина тригидрат, 150 мг/мл; Апи-Сан, Россия). Шерсть в месте разреза сбривали на правой стороне спины на 1 см от нижнего ребра в вентральном направлении, кожу обрабатывали 70%-ным этиловым спиртом. Кожу и подлежащий мышечный слой в области над маткой разрезали дорсовентрально на расстоянии 5 мм от нижнего ребра в каудальном направлении. Висцеральный жировой слой, соединенный с яйчником, яйцеводом и верхней частью матки, захватывали пинцетом и приподнимали. Эмбрионы (5–11 на самку) переносили стеклянным капилляром в правый рог матки в 5 мкл среды FertiCult™ Flushing (FertiPro, Бельгия). Разрез зашивали рассасывающейся хирургической нитью (Vicryl; Johnson & Johnson, США) и присыпали антибиотиком (амоксициллина тригидрат; Апи-Сан, Россия), после чего операционный шов обрабатывали антисептиком (Ацербин, Montavit Pharmazeutische Fabrik GmbH, Австрия).

Измерение массы тела потомства. Мышат всех групп взвешивали на портативных цифровых весах (ScoutPro SPS2001 F, Ohaus Corporation, США) на 7-й, 14-й и 21-й день после рождения (Д7, Д14 и Д21).

Интракардиальная перфузия. Перфузию осуществляли через систему кровообращения для фиксации головного мозга. Мышей наркотизировали, вводя им внутримышечно 75 мкл (на 10 г веса) медетомидина гидрохлорида (Медитин,

1 мг/мл; Апи-Сан, Россия) и 60 мкл (на 10 г веса) золетила (Virbac, Франция). Далее им вводили через кровеносную систему 30–50 мл фосфатно-солевого буфера (PBS), а затем 4% раствор формалина на PBS. После этого мозг извлекали и помещали в 30% раствор сахарозы на PBS при +4°C для обезвоживания и последующей фиксации в течение следующих 3–4 нед., пока фиксированный материал не опустится на дно колбы. Образцы мозга подготавливали с помощью Tissue-Tek O.C.T. (Sakura Finetek, США), затем замораживали и хранили при –70°C.

Приготовление замороженных срезов мозга. С использованием атласа [33] делали замороженные срезы областей гиппокампа (CA1, CA2, CA3) и зубчатой извилины – dentate gyrus – DG) на расстоянии –1.46...–1.82 мм от брегмы. Срезы толщиной 10 мкм готовили при –25°C на криотоме (HM550 OP, Thermo Scientific, США) и помещали на предметные стекла (Superfrost Plus, Menzel-Glaser; Thermo Fisher Scientific, США).

Иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание. Окрашивание образцов проводили по протоколам производителей наборов с небольшими модификациями. Перед процедурой окрашивания срезы обезвоживали с последующей регидратацией в течение пяти минут в PBS. Затем после регидратации в 10 mM щелочно-цитратного буфера (pH 9) при 95°C на водяной бане (TW-2.02, Elmi, Латвия) в течение 15 мин проводили индуцированную нагреванием демаскировку эпитопов. После этого срезы удаляли из буфера и охлаждали до комнатной температуры. Затем образцы трижды промывали в буфере PBS-Tween: PBS с добавлением 0.1% Tween-20 P9416-100ML (Merck, Германия). После этого в каждую секцию на пять минут добавляли Protein Block (ab64226, Abcam, Великобритания) и удаляли лишнюю жидкость в соответствии с рекомендацией производителя. После этого добавляли 50 мкл первичного антитела и оставляли на ночь при +4°C во влажной темной камере.

Используемые концентрации антител составляли 1 : 800 как для anti-NeuN (ab177487, Abcam, Великобритания), так и для anti-DCX (ab18723, Abcam, Великобритания). Затем срезы промывали буфером PBS-Tween, удаляли лишнюю жидкость, добавляли 50 мкл вторичного антитела Goat Anti-Rabbit IgG H&L AF488 (ab150077, Abcam, Великобритания) в концентрации 1 : 600 и оставляли во влажной среде в темной камере на два часа при +4°C. После этого образцы промывали буфером PBS-Tween, удаляли излишки жидкости и монтировали в среде ProLong, Glass AntifadeMountant (Thermo P36982, Thermo Fisher Scientific, США). После добавления антител срезы обрабатывали в темной камере, защищенной от света.

Таблица 1. Данные по репродукции мышей C57BL/6J

Параметры	Группы	
	C57BL	ET-C57BL
Число реципиентов/пометов	6	7
Продолжительность беременности (дни)	20.20 ± 0.20	21.14 ± 0.26*
Число перенесенных эмбрионов (в среднем на самку)	—	61 (8.71 ± 0.56)
Имплантация эмбрионов, %	—	47
Общее число потомков	26	23
Средний размер помета	4.20 ± 0.80	4.00 ± 0.53

* $p < 0.05$ по сравнению с группой C57BL.

Анализ плотности нейронов. Анализ плотности меченых антителами нейронов проводили с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 (Carl Zeiss, Германия), EC Plan-Neofluar 40x/1.30 Oil DIC (Carl Zeiss, Германия) для всех областей гиппокампа. Число меченых нейронов подсчитывали с помощью программного обеспечения ImageJ. Плотность нейронов, меченных антителами, рассчитывали, как число нейронов в интересующей области на объем (мм^3). Плотность меченых антителами нейронов подсчитывали в CA1, CA2, CA3 и DG областях гиппокампа.

Статистический анализ. Анализ результатов проводили с использованием программы STATISTICA v. 12.0 (StatSoft, Inc., США). Все данные были проверены на нормальность с помощью теста Колмогорова-Смирнова. Репродуктивные данные оценивали по критерию χ^2 . Для оценки массы тела потомков в первые недели после рождения использовали дисперсионный анализ с повторными измерениями. Средние значения продолжительности беременности и размера помета сравнивали между группами по t -критерию Стьюдента. Массу тела и мозга, их соотношение, а также плотность нейронов оценивали с помощью многофакторного дисперсионного анализа с последующим апостериорным сравнением LSD-методом Фишера. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего ($m \pm \text{SEM}$). За уровень значимости принимали $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Репродуктивные данные. Продолжительность беременности, число перенесенных эмбрионов и размер пометов для исследованных групп представлены в табл. 1. Средняя продолжительность беременности в группе C57BL составила 20.20 ± 0.20 дней, а размер приплода 4.20 ± 0.80 (шесть пометов с общим числом потомков 26; 2–6 мышей в помете). В общей сложности 61 эмбрион C57BL/6J был перенесен семи самкам-реципиентам той же линии (в среднем 8.71 ± 0.56 эмбрио-

нов на перенос). После переноса эмбрионов рождаемость составила 47% (28 рожденных мышат с размером помета 2–4 детеныша на помет). Не было обнаружено различий по средней численности приплодов ($p > 0.05$) между группами. Однако достоверно большую продолжительность беременности ($p < 0.05$) наблюдали в группе ET-C57BL по сравнению с группой C57BL. Статистических различий по соотношению полов в потомстве между группами обнаружено не было.

Анализ раннего постнатального развития. Дисперсионный анализ с повторными измерениями выявил значимое влияние фактора “возраст” ($F_{2,90} = 1383.40$, $p < 0.001$) на массу тела потомства в раннем постнатальном периоде, что соответствует нормальному физиологическому развитию (табл. 2). Кроме того, на массу тела оказывал влияние фактор “тип развития” ($F_{1,45} = 5.27$, $p < 0.05$); в группе мышей, рожденных после культивирования *in vitro* и переноса эмбрионов масса тела была выше, чем в контроле. Однако последующее апостериорное сравнение не выявило различий по массе тела потомства в раннем постнатальном периоде в пределах каждого возраста.

Анализ массы тела и мозга у взрослых потомков. Данные по массе тела и мозга, а также соотношению массы тела к массе мозга у молодых взрослых потомков представлены в табл. 3. Многофакторный дисперсионный анализ выявил значимое влияние “пола” на массу тела ($F_{1,39} = 36.34$, $p < 0.001$) и на соотношение масс мозга и тела ($F_{1,39} = 27.44$, $p < 0.001$), но не на массу мозга ($p > 0.05$). Кроме того, многофакторный дисперсионный анализ выявил значимое влияние взаимодействия факторов “пол” и “тип развития” на массу тела ($F_{1,39} = 7.94$, $p < 0.01$) и на соотношение массы мозг/тело ($F_{1,39} = 5.95$, $p < 0.05$), но не на массу мозга ($p > 0.05$). Апостериорное сравнение подтвердило значительную разницу по массе тела между полами. Масса тела самок из группы C57BL ($p < 0.01$) и у самок группы ET-C57BL ($p < 0.05$) была достоверно ниже по сравнению с самцами тех же групп (табл. 3).

Таблица 2. Масса тела потомства (возраст седьмой, 14-й и 21-й день), полученного после переноса эмбрионов мышей C57BL/6J, и зачатого естественным путем

День после родов	Группы			
	C57BL		ET-C57BL	
	самцы (<i>n</i> = 9)	самки (<i>n</i> = 17)	самцы (<i>n</i> = 14)	самки (<i>n</i> = 9)
Д7	3.62 ± 0.33	3.43 ± 0.25	3.84 ± 0.16	4.13 ± 0.18
Д14	6.87 ± 0.44	6.51 ± 0.31	7.11 ± 0.22	7.82 ± 0.27
Д21	8.62 ± 0.59	8.00 ± 0.36	8.95 ± 0.28	9.41 ± 0.27

Таблица 3. Масса тела и мозга потомства мышей C57BL/6J в возрасте трех месяцев, полученного после переноса эмбрионов, и зачатых естественным путем

Параметры	Группы			
	C57BL		ET-C57BL	
	самцы (<i>n</i> = 5)	самки (<i>n</i> = 13)	самцы (<i>n</i> = 14)	самки (<i>n</i> = 9)
Масса тела	28.26 ± 0.94	21.06 ± 0.38**	25.69 ± 0.73	23.08 ± 0.94*
Масса мозга	0.458 ± 0.007	0.447 ± 0.005	0.443 ± 0.008	0.440 ± 0.005
Соотношение мозг/тело	0.016 ± 0.005	0.021 ± 0.001**	0.017 ± 0.001	0.019 ± 0.001*

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с самцами той же группы.

Анализ плотности нейронов. Данные по плотности нейронов в СА1 области гиппокампа представлены на рис. 1. Многофакторный дисперсионный анализ не выявил значимого влияния “типа развития”, “пола” и взаимодействия между этими факторами на данный параметр ($p > 0.05$). Апостериорное сравнение выявило лишь тенденцию ($p = 0.075$) к уменьшению числа нейронов в СА1 области гиппокампа у самок ET-C57BL по сравнению с особями группы C57BL того же пола ($0.65 \times 10^6 \pm 0.05 \times 10^6$ против $0.94 \times 10^6 \pm 0.07 \times 10^6$).

Данные по плотности нейронов в СА2 представлены на рис. 2а–д. Многофакторный дисперсионный анализ не выявил значимого влияния “типа развития”, “пола” и взаимодействия между этими факторами на данный параметр ($p > 0.05$). Апостериорное сравнение также не выявило различий.

Данные по плотности нейронов в СА3 представлены на рис. 2ж–л. Многофакторный дисперсионный анализ не выявил значимого влияния “типа развития”, “пола” и взаимодействия между этими факторами на данный параметр ($p > 0.05$). Однако апостериорное сравнение выявило уменьшение числа нейронов ($p < 0.05$) в СА3 области гиппокампа у самок ET-C57BL по сравнению с самками группы C57BL ($3.36 \times 10^5 \pm 0.11 \times 10^5$ против $4.85 \times 10^5 \pm 0.49 \times 10^5$).

Данные по плотности нейронов в DG представлены на рис. 3а–д. Многофакторный дисперсионный анализ выявил значимое влияние “пола” ($F_{1,15} = 4.84$, $p < 0.05$) на этот показатель. Однако значимого влияния “типа развития” и взаимодействия “типа развития” и “пола” выявлено не было ($p > 0.05$). Апостериорное сравнение частично подтвердило влияние пола, показав тенденцию ($p = 0.062$) к уменьшению числа нейронов в DG области гиппокампа у самок ET-C57BL по сравнению с самцами той же группы ($1.27 \times 10^6 \pm 0.06 \times 10^6$ против $1.50 \times 10^6 \pm 0.04 \times 10^6$).

Данные по нейрогенезу в DG области гиппокампа представлены на рис. 3ж–л. Многофакторный дисперсионный анализ выявил достоверное влияние “типа развития” ($F_{1,14} = 18.66$; $p < 0.001$) на этот показатель. Однако значимого влияния “пола” и взаимодействия “типа развития” и “пола” выявлено не было ($p > 0.05$). Апостериорное сравнение подтвердило достоверную разницу по уровню нейрогенеза в субгранулярной зоне DG области гиппокампа между группами. В этой зоне у самцов ($p < 0.05$) и самок ($p < 0.01$) группы ET-C57BL было достоверно меньше DCX-позитивных нейронов по сравнению с контролями того же пола ($0.74 \times 10^4 \pm 0.22 \times 10^4$ против $2.01 \times 10^4 \pm 0.66 \times 10^4$ для самцов; $0.60 \times 10^4 \pm 0.11 \times 10^4$ против $1.65 \times 10^4 \pm 0.42 \times 10^4$ для самок).

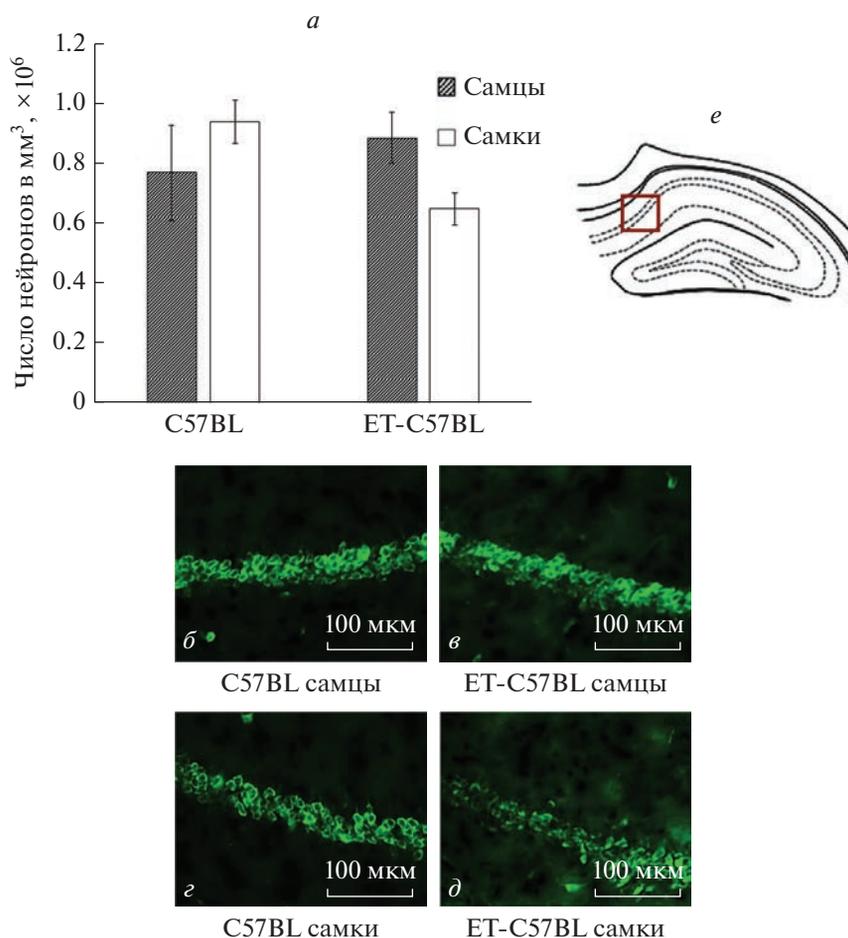


Рис. 1. Число меченых против NeuN пирамидных нейронов в CA1 области гиппокампа у потомков C57BL и ET-C57BL. *a* – число нейронов на мм³; *б–д* – репрезентативные срезы: *б* – у самцов группы C57BL, *в* – у самцов группы ET-C57BL, *з* – у самок группы C57BL, *д* – у самок группы ET-C57BL, *е* – схематическое представление анализируемой области.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Большинство исследований на людях показали, что ЭКО в сочетании с переносом эмбрионов не влияло на нормальное постнатальное развитие детей, зачатых с помощью ВРТ [6, 34]. В одной работе была выявлена положительная связь между зачатием с помощью ВРТ и когнитивными способностями детей в возрасте трех и пяти лет [35]. Однако, согласно недавнему обзору [3], возможно и негативное влияние ВРТ на когнитивные способности детей, хотя если анализировать лишь детей, рожденных в результате одноплодной беременности, статистическая значимость исчезает. Данные клинических отчетов предполагают, что изменения в развитии детей, зачатых с помощью ВРТ, могут быть связаны с использованием различных сред для культивирования эмбрионов *in vitro*, что делает выборки более гетерогенными и усложняет анализ [36, 37].

Работа, выполненная на лабораторных мышах, подтверждает эти выводы медицинской литературы и позволяет предположить, что различия в экспрессии генов на стадии бластоцисты могут быть связаны с культивированием *in vitro* либо в простой среде, либо в среде, обогащенной различными ингредиентами [18]. Однако другое исследование на мышах указывает на то, что эффекты культуральной среды могут не сохраняться после имплантации [38].

Было продемонстрировано, что KSOM, который мы использовали в данном исследовании, является оптимальной средой для культивирования эмбрионов *in vitro* у нескольких видов животных [39]. Взрослые потомки мужского пола обеих исследуемых групп имели большую массу тела по сравнению с самками; соотношение мозга к телу было ниже у первых, чем у вторых. Этот результат хорошо согласуется с недавним сообщением о том, что, начиная с пятой недели постнатального развития, самцы C57BL/6J тяжелее самок [40], и их

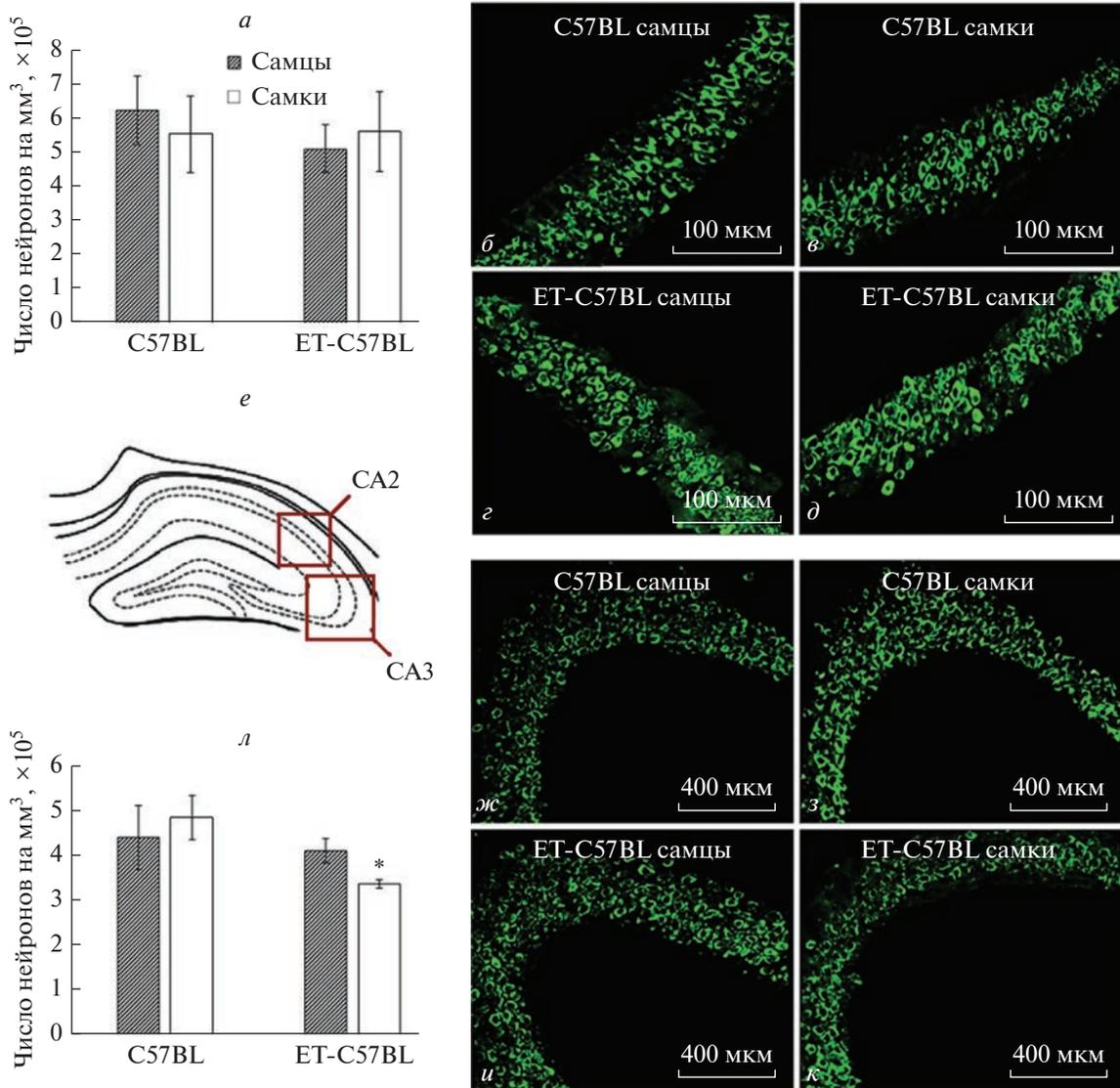


Рис. 2. Число меченых против NeuN пирамидных нейронов в CA2 и CA3 областях гиппокампа у потомков C57BL и ET-C57BL. *а* – число нейронов на мм³ в области CA2; *б–д* – репрезентативные срезы в области CA2: *б* – у самцов группы C57BL; *в* – у самок группы C57BL; *з* – у самцов группы ET-C57BL; *д* – у самок группы ET-C57BL; *е* – схематическое представление анализируемых областей; *ж–к* – репрезентативные срезы в области CA3: *ж* – у самцов группы C57BL; *з* – у самок группы C57BL; *и* – у самцов группы ET-C57BL; *к* – у самок группы ET-C57BL; *л* – число нейронов на мм³ в области CA3. Различия между самками C57BL и ET-C57BL групп: * $p < 0.05$.

соотношение мозга к телу ниже [41]. Отсутствие различий в данных параметрах между потомками, родившимися после применения ВРТ и естественно рожденными согласуется с выводами другой работы на мышах в которой было показано, что культивирование *in vitro* на разных культуральных средах и перенос эмбрионов не приводят к существенным отклонениям в общем развитии по сравнению с контролем [38].

Существует лишь несколько исследований, посвященных особенностям мозга детей, зачатых с помощью ВРТ, но единого мнения по данному вопросу на сегодняшний день нет [42–44]. Пока-

зано, что размер некоторых отделов головного мозга у детей, зачатых с помощью ВРТ, увеличивается к 11-й неделе гестационного срока [44]. Риск повреждения белого вещества в возрасте двух лет у недоношенных детей, зачатых с помощью ВРТ, был выше по сравнению с недоношенными детьми, зачатыми естественным путем [43]. Однако в другом исследовании было показано, что дети в возрасте двух лет, родившиеся после ВРТ, имели сходную моторику, уровень когнитивных способностей и развитие речи, как и дети, родившиеся после естественного зачатия [42]. В настоящее время не существует исследований на людях, которые

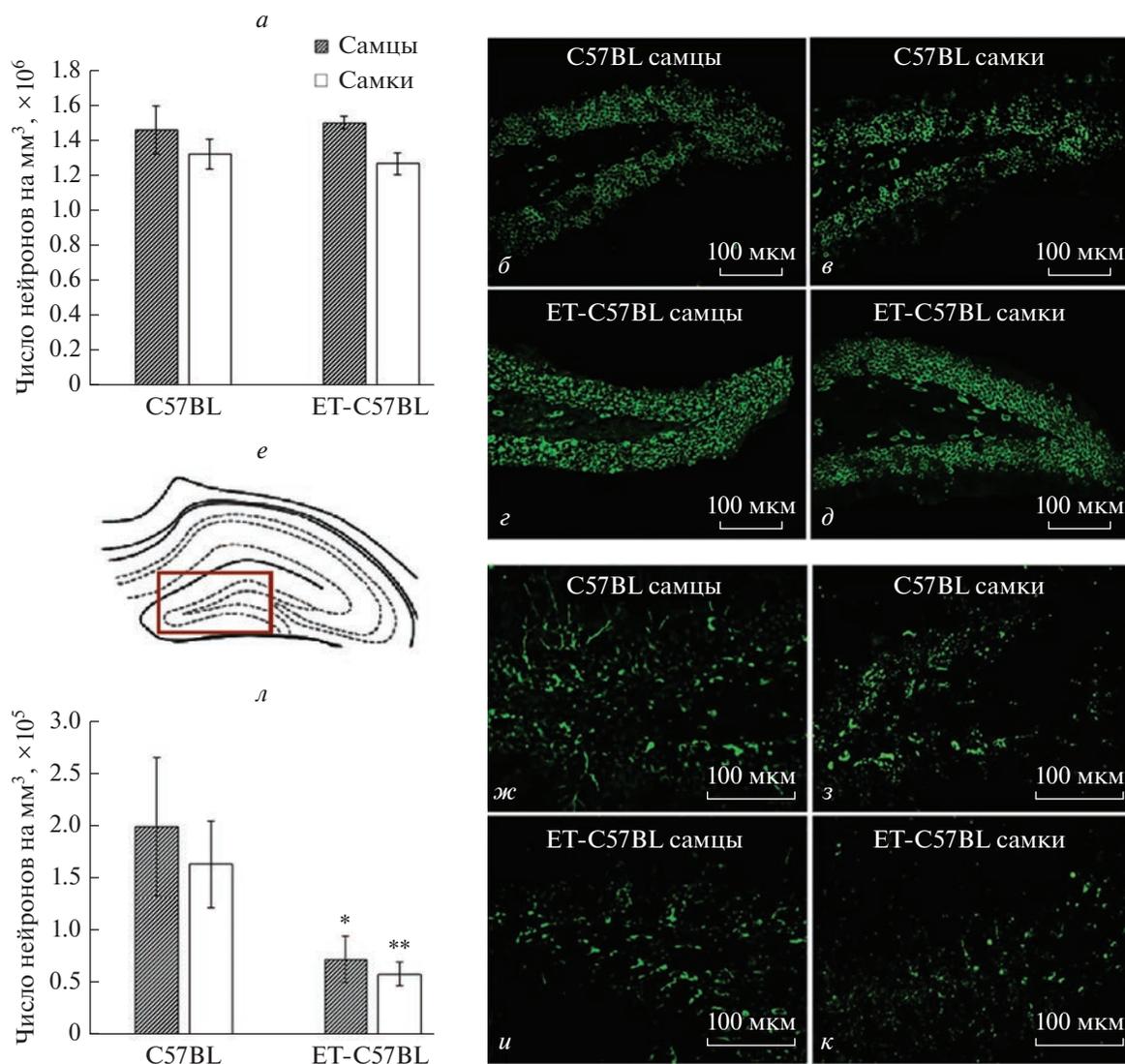


Рис. 3. Число меченых против NeuN пирамидных нейронов и нейрогенез в DG области гиппокампа у потомков C57BL и ET-C57BL. *а* – число нейронов на мм³; *б–д* – репрезентативные срезы в области DG: *б* – у самцов группы C57BL; *в* – у самок группы C57BL; *г* – у самцов группы ET-C57BL; *д* – у самок группы ET-C57BL; *е* – схематическое представление анализируемой области; *ж–к* – репрезентативные срезы субгранулярной зоны DG иллюстрирующие уровень нейрогенеза: *ж* – у самцов группы C57BL; *з* – у самок группы C57BL; *и* – у самцов группы ET-C57BL; *к* – у самок группы ET-C57BL; *л* – число меченых против DCX нейронов на мм³ в субгранулярной зоне DG. Различия между C57BL и ET-C57BL группами одного пола: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

рассматривают долгосрочные эффекты культивирования *in vitro* и переноса эмбрионов на развитие гиппокампа.

В нашем исследовании была выявлена тенденция к уменьшению числа нейронов в области CA1 у самок группы ET-C57BL по сравнению с контролем и в зубчатой извилине по сравнению с самцами той же группы. Кроме того, было обнаружено меньше пирамидных нейронов в CA3 зоне гиппокампа у самок группы ET-C57BL. Ранее у мышей линии C57BL/6N, рожденных после переноса эмбрионов, наблюдали изменения эмоционального поведения, причем только у самок [24].

Уменьшение плотности нейронов может быть связано с нарушением процесса нейрогенеза, который играет существенную роль при возникновении психических расстройств у человека [45]. Наше исследование показывает, что у мышей группы ET-C57BL, рожденных с применением ВРТ, уровень нейрогенеза в субгранулярной зоне DG гиппокампа был, действительно, существенно снижен.

Различия по плотности нейронов между самцами и самками могут быть связаны с разным уровнем транскрипции многих генов у преимплантационных эмбрионов мышей разного пола [46, 47]. На этапе раннего развития эмбриона

имеются эпигенетические различия между полами, в частности, эмбрионы мышей разного пола отличаются как по скорости развития, так и некоторым метаболическим особенностям, что, в частности, может быть одной из причин обнаруженных различий по плотности нейронов у потомков разного пола, рожденных после культивирования эмбрионов *in vitro* и последующего их переноса [48–51].

В более ранних исследованиях было изучено влияние ВРТ на различные структуры головного мозга у мышей и крыс [52–55]. В исследованиях на мышцах было показано, что индуцирование суперовуляции помощью ГСЖК и ХГЧ у самок-доноров эмбрионов в сочетании с эмбриотрансфером приводит к изменению экспрессии генов, участвующих в развитии нервной системы [52]. Другое исследование на мышцах показало, что ЭКО в сочетании с переносом эмбрионов вызывает изменения в экспрессии генов и синтезе белков, а также влияет на уровень метилирования ДНК в головном мозге [53]. Обнаруженные в этих работах изменения в мозге потомков могут быть связаны с применением различных репродуктивных технологий в их разных сочетаниях. Между тем, насколько нам известно, нет опубликованных работ, посвященных влиянию культивирования *in vitro* в сочетании с суперовуляцией и переносом эмбрионов (без применения ЭКО) на плотность нейронов и нейрогенез в головном мозге у потомства.

Имеются данные на мышцах, указывающие на значительные изменения в паттерне экспрессии генов, связанные с культивированием *in vitro* преимплантационных эмбрионов [56]. Кроме того, исследования на мышцах показали значительное влияние линии мышей на экспрессию генов в плаценте после применения культивирования *in vitro* [56]. Кроме того, обнаружено, что в головном мозге мышей, рожденных после ЭКО, отмечается снижение синтеза некоторых белков, в частности, *Tuba1c*, *Crk* и *Psm3*, что, как полагают авторы, связано с эпигенетическими нарушениями [57]. Также у самцов мышей, полученных в результате ЭКО, последующего краткосрочного культивирования *in vitro* и переноса эмбрионов, выявлено снижение некоторых нейротрофинов (BDNF, GDNF и NGF) в гиппокампе [58]. В наших более ранних исследованиях на крысах было показано снижение уровня BDNF в гиппокампе после некоторых процедур, связанных с ВРТ [55]. Можно предположить, что процедуры ВРТ, в частности, культивирование *in vitro* и перенос эмбрионов, могут приводить к более низкому уровню нейротрофных факторов в некоторых областях мозга, что приводит к наблюдаемому в нашем исследовании снижению плотности пирамидных нейронов в некоторых областях гиппокампа у потомков, полученных после применения этих процедур ВРТ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Культивирование *in vitro* и перенос эмбрионов не оказывают существенного влияния на массу тела и мозга у потомства, но влияют на нейрогенез в субгранулярной зоне зубчатой извилины у взрослых потомков обоих полов, а также на плотность нейронов в СА3 области гиппокампа у самок.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке РНФ № 23-25-00123. Содержание животных осуществляли благодаря бюджетному проекту № FWNR-2022-0023 с использованием оборудования ЦКП “Центр генетических ресурсов лабораторных животных” ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI62119X0023). Микроскопические работы выполнены в ЦКП “Микроскопического анализа биологических объектов” ИЦиГ СО РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение. Содержание экспериментальных животных и все процедуры выполнены в соответствии с международными правилами обращения с животными Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Eight Edition, Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; National Research Council © 2011 National Academy of Sciences (США). Работа с животными регламентирована следующими документами: “Правила надлежащей лабораторной практики в Российской Федерации”, утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016 г.; межгосударственными стандартами ГОСТ 33215-2014 “Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными” (Правила оборудования помещений и организации процедур, дата введения 2015-07-01). Условия содержания животных и проведенные эксперименты были одобрены Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Berntsen S., Soderstrom-Anttila V., Wennerholm U.-B., Laivuori H., Loft A., Oldereid N.B., Romundstad L.B., Bergh C., Pinborg A. // Hum. Reprod. Update. 2019. V. 25. P. 137–158.
2. Ramos-Ibeas P., Heras S., Gomez-Redondo I., Planells B., Fernandez-Gonzalez R., Pericuesta E., Laguna-Barraza R., Perez-Cerezales S., Gutierrez-Adan A. // Mol. Reprod. Dev. 2019. V. 86. P. 1292–1306.
3. Bergh C., Wennerholm U.B. // Ups. J. Med. Sci. 2020. V. 125. P. 152–157.
4. Scherrer U., Rexhaj E., Allemann Y., Sartori C., Rimoldi S.F. // Eur. Heart. J. 2015. V. 36. P. 1583–1589.

5. Meister T.A., Rimoldi S.F., Soria R., von Arx R., Messerli F.H., Sartori C., Scherrer U., Rexhaj E. // J. Am. Coll. Cardiol. 2018. V. 72. P. 1267–1274.
6. Rumbold A.R., Moore V.M., Whitrow M.J., Oswald T.K., Moran L.J., Fernandez R.C., Barnhart K.T., Davies M.J. // Hum. Reprod. 2017. V. 32. P. 1489–1507.
7. La Rovere M., Franzago M., Stuppia L. // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 4169.
8. Pontesilli M., Painter R.C., Grooten I.J., van der Post J.A., Mol B.W., Vrijkotte T.G., Repping S., Roseboom T.J. // Reprod. Biomed. Online. 2015. V. 30. P. 258–267.
9. Gleicher N., Kushnir V.A., Barad D.H. // Reprod. Biol. Endocrinol. 2014. V. 12. P. 22.
10. Dayan N., Lanes A., Walker M.C., Spitzer K.A., Laskin C.A. // Fertil. Steril. 2016. V. 105. P. 1003–1009.
11. Barker D.J.P. // J. Int. Med. 2007. V. 261. P. 412–417.
12. Fleming T.P., Velazquez M.A., Eckert J.J. // J. Dev. Orig. Health. Dis. 2015. V. 6. P. 377–383.
13. Li X., Zhang M., Pan X., Xu Z., Sun M. // Birth. Defects. Res. 2017. V. 109. P. 744–757.
14. Sandin S., Nygren K.G., Iliadou A., Hultman C.M., Reichenberg A. // JAMA. 2013. V. 310. P. 75–84.
15. Kissin D.M., Zhang Y., Boulet S.L., Fountain C., Bearman P., Schieve L., Yeargin-Allsopp M., Jamieson D.J. // Hum. Reprod. 2015. V. 30. P. 454–465.
16. Liu L., Gao J., He X., Cai Y., Wang L., Fan X. // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 46207.
17. Andreadou M.T., Katsaras G.N., Talimtzis P., Doxani C., Zintzaras E., Stefanidis I. // Eur. J. Pediatr. 2021. V. 180. P. 2741–2755.
18. Sunde A. // In Vitro Fertilization. 2019. P. 877–889.
19. Watkins A.J., Platt D., Papenbrock T., Wilkins A., Eckert J.J., Kwong W.Y., Osmond C., Hanson M., Fleming T.P. // Proc. Natl. Acad. Sci. 2007. V. 104. P. 5449–5454.
20. Rexhaj E., Paoloni-Giacobino A., Rimoldi S.F., Fuster D.G., Anderegg M., Somm E., Bouillet E., Allemann Y., Sartori C., Scherrer U. // J. Clin. Invest. 2013. V. 27. P. 5052–5060.
21. Ecker D.J., Stein P., Xu Z., Williams C.J., Kopf G.S., Bilker W.B., Abel T., Schultz R.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 1595–1600.
22. Rose C., Schwegler H., Hanke J., Rohl F.W., Yilmazer-Hanke D.M. // Behav. Brain. Res. 2006. V. 173. P. 163–168.
23. Lopez-Cardona A.P., Fernandez-Gonzalez R., Perez-Crespo M., Alen F., de Fonseca F.R., Orio L., Gutierrez-Adan A. // Biol. Reprod. 2015. V. 93. P. 85.
24. Lerch S., Tolksdorf G., Schutz P., Brandwein C., Dormann C., Gass P., Chourbaji S. // J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. 2016. V. 55. P. 510–519.
25. Duranthon V., Chavatte-Palmer P. // Mol. Reprod. Dev. 2018. V. 85. P. 348–368.
26. Igonina T.N., Ragaeva D.S., Petrova O.M., Rozkova I.N., Brusentsev E.Y., Amstislavsky S.Y. // Hypertens. Pregnancy. 2019. V. 38. P. 208–216.
27. Auroux M., Cerutti I., Ducot B., Loeuillet A. // Reprod. Toxicol. 2004. V. 18. P. 813–818.
28. Klemetti R., Sevon T., Gissler M., Hemminki E. // Pediatr. 2006. V. 118. P. 1819–1827.
29. Kallen A.J., Finnstrom O.O., Lindam A.P., Nilsson E.M.E., Nygren K-G., Otterblad Olausson P.M. // Eur. J. Paediatr. Neurol. 2010. V. 14. P. 526–530.
30. Bauman M.L., Kemper T.L. // Int. J. Dev. Neurosci. 2005. V. 23. P. 183–187.
31. Courchesne E., Pierce K. // Int. J. Dev. Neurosci. 2005. V. 23. P. 153–170.
32. Varghese M., Keshav N., Jacot-Descombes S., Warda T., Wicinski B., Dickstein D.L., Harony-Nicolas H., De Rubeis S., Drapeau E., Buxbaum J.D., Hof P.R. // Acta. Neuropathol. 2017. V. 134. P. 537–566.
33. Paxinos G., Franklin K. // Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 4th ed., Academic Press, 2012.
34. Mintjens S., Menting M.D., Gemke R.J.B.J., van Poppe M.N.M., van Wely M., Bendorp A.J., Tjon Kon Fat R.I., Mol B.W.J., Painter R.C., van de Beek C., Roseboom T.J. // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 2019. V. 242. P. 131–138.
35. Barbascia A., Mills M.C. // Hum. Reprod. 2017. V. 32. P. 1482–1488.
36. Bouillon C., Leandri R., Desch L., Ernst A., Bruno C., Cerf C., Chiron A., Souchay C., Burguet A., Jimenez C., Sagot P., Fauque P. // PLoS One. 2016. V. 11. e0150857.
37. Zandstra H., Smits L.J.M., van Kuijk S.M.J., van Golde R.J.T., Evers J.L.H., Dumoulin J.C.M., van Montfoort A.P.A. // Hum. Reprod. Open. 2018. V. 2018. hoy018.
38. Hemkemeyer S.A., Schwarzer C., Boiani M., Ehmcke J., Le Gac S., Schlatt S., Nordhoff V. // Hum. Reprod. 2014. V. 29. P. 220–233.
39. Раннева С.В., Брусенцев Е.Ю., Игонина Т.Н., Рагаева Д.С., Рожкова И.Н., Еришов Н.И., Левинсон А.Л., Амстиславский С.Я. // Онтогенез. 2020. Т. 51. С. 417–439.
40. Rathod Y.D., Di Fulvio M. // PLoS One. 2021. V. 16. e0246569.
41. Fairless A.H., Dow H.C., Kreibich A.S., Torre M., Kuruvilla M., Gordon E., Morton E.A., Tan J., Berrettini W.H., Li H., Abel T., Brodtkin E.S. // Behav. Brain. Res. 2012. V. 228. P. 299–310.
42. Balayla J., Sheehy O., Fraser W.D., Seguin J.R., Trasler J., Monnier P., MacLeod A.A., Simard M.N., Muckle G., Berard A. // Obstet. Gynecol. 2017. V. 129. P. 265–272.
43. Huang X., Fu J. // Front. Pediatr. 2021. V. 9. P. 686670.
44. Husen S.C., Koning I.V., Go A.T.J.I., Groenenberg I.A.L., Willemsen S.P., Rousian M., Steegers-Theunissen R.P.M. // Hum. Reprod. 2021. V. 36. P. 596–604.
45. Schoenfeld T.J., Cameron H.A. // Neuropsychopharmacology. 2015. V. 40. P. 113–128.
46. Peaston A.E., Evsikov A.V., Graber J.H., de Vries W.N., Holbrook A.E., Solter D., Knowles B.B. // Dev. Cell. 2004. V. 7. P. 597–606.
47. Fernandez-Gonzalez R., Ramirez M.A., Pericuesta E., Calle A., Gutierrez-Adan A. // Biol. Reprod. 2010. V. 83. P. 720–727.
48. Peippo J., Bredbacka P. // Mol. Reprod. Dev. 1995. V. 40. P. 56–61.
49. Perez-Crespo M., Ramirez M.A., Fernandez-Gonzalez R., Rizo D., Lonergan P., Pintado B., Gutierrez-Adan A. // Mol. Reprod. Dev. 2005. V. 72. P. 502–510.

50. Gutierrez-Adan A., Perez-Crespo M., Fernandez-Gonzalez R., Ramirez M.A., Moreira P., Pintado B., Lonergan P., Rizos D. // *Reprod. Domest. Anim.* 2006. V. 41. P. 54–62.
51. Bermejo-Alvarez P., Rizos D., Lonergan P., Gutierrez-Adan A. // *Reproduction.* 2011. V. 141. P. 563–570.
52. Mainigi M., Rosenzweig J.M., Lei J., Mensah V., Thomaier L., Talbot Jr C.C., Olalere D., Ord T., Rozzah R., Johnston M.V., Burd I. // *Reprod. Sci.* 2016. V. 23. P. 785–794.
53. Hu M., Lou Y., Liu S., Mao Y., Le F., Wang L., Li L., Wang Q., Li H., Lou H., Wang N., Jin F. // *Mol. Hum. Reprod.* 2020. V. 26. P. 141–153.
54. Рожкова И.Н., Брусенцев Е.Ю., Игонина Т.Н., Рагаева Д.С., Петрова О.М., Напримеров В.А., Тихонова М.А., Амстиславская Т.Г., Амстиславский С.Я. // *Журнал высшей нервной деятельности.* 2019. Т. 69. С. 618–628.
55. Rozhkova I., Brusentsev E., Igonina T., Ragaeva D., Petrova O., Tikhonova M.A., Akopyan A.A., Amstislavskaya T.G., Antonov Y.V., Amstislavsky S. // *Hypertens. Pregnancy.* 2020. V. 39. P. 283–294.
56. de Waal E., Mak W., Calhoun S., Stein P., Ord T., Krapp C., Coutifaris C., Schultz R.M., Bartolomei M.S. // *Biol. Reprod.* 2014. V. 90. P. 22.
57. Zhu W., Zheng J., Wen Y., Li Y., Zhou C., Wang Z. // *Gynecol. Endocrinol.* 2020. V. 36. P. 973–977.
58. Qin N.X., Zhao Y.R., Shi W.H., Zhou Z.Y., Zou K.X., Yu C.J., Liu X., Dong Z.H., Mao Y.T., Zhou C.L., Yu J.L., Liu X.M., Sheng J.Z., Ding G.L., Zhao W.L., Wu Y.T., Huang H.F. // *Reproduction.* 2021. V. 162. P. 437–448.

Effect of *In Vitro* Culture and Embryo Transfer on Neuronal Density and Neurogenesis in the Brain of C57BL/6J Mice

E. Yu. Brusentsev^a, T. N. Igonina^a, I. N. Rozhkova^a, S. V. Okotrub^a, D. A. Lebedeva^{a, b},
E. V. Vladimirova^a, V. S. Kozeneva^{a, b}, and S. Ya. Amstislavsky^a

^a *Institute of Cytology and Genetics (ICG), Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

^b *Novosibirsk State University (NSU), Novosibirsk, Russia*

The current research is aimed to determine the long-term effects of the *in vitro* culture (IVC) and embryo transfer (ET) on the neonatal offspring development, as well as on the adult hippocampal neuronal densities, as well hippocampal neurogenesis in C57BL/6J mice. Offspring of naturally born C57BL/6J mice (C57BL group) were compared with C57BL/6J mice born as a result of the IVC combined with ET to C57BL/6J recipient females (ET-C57BL group). At age of 3 mo., no group differences were observed in the body weight and brain-to-body ratio, although sex differences in these variables were observed. The offspring of both sexes born after IVC-ET exhibited the lower level of neurogenesis in the dentate gyrus (DG) of the hippocampus as compared to the control C57BL group. To conclude, IVC and ET exerted no major effects on body and brain weight in offspring, but affected hippocampal neurogenesis in the adult offspring of both sexes. Besides, the number of pyramidal neurons in the CA3 area of hippocampus was lower in female offspring of ET-C57BL group.

Keywords: C57BL/6J, preimplantation embryos, in vitro culture, neuronal density, hippocampus, neurogenesis