

ВЛИЯНИЕ ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА ПЕРВОГО ТИПА НА РАЗВИТИЕ *IN VITRO* ЭМБРИОНОВ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ИХ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

© 2021 г. Е. Ю. Брусенцев^а, Е. А. Кизилова^а, Т. Н. Игонина^а,
С. В. Раннева^а, С. Я. Амстиславский^а, *

^аФедеральное государственное бюджетное научное учреждение “Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”,
пр. ак. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: amstis@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.03.2020 г.

После доработки 03.07.2020 г.

Принята к публикации 08.07.2020 г.

Криоконсервацию гамет и эмбрионов широко применяют для сохранения генетических ресурсов животных. В работе исследовано развитие дробящихся эмбрионов мышей линий CD1 в культуре *in vitro* при воздействии инсулиноподобного фактора роста первого типа (IGF-1) после процедур криоконсервации. Зародыши мышей, полученные *in vivo* на стадии 4–6 клеток вначале замораживали, согласно стандартному протоколу программного замораживания с использованием 10%-го раствора пропиленгликоля в качестве криопротектора, а после оттаивания культивировали *in vitro* до стадии бластоцисты в среде KSOM в течение 48 ч. Добавление в среду для культивирования IGF-1 в концентрации 40 нг/мл приводило к повышению доли развивающихся до стадии бластоцисты эмбрионов по сравнению с контролем (78.9 и 47.4% соответственно, $p < 0.01$). Кроме того, заморожено-оттаянные эмбрионы после культивирования с IGF-1 имели большее число клеток по сравнению с контролем (79.8 ± 3.9 и 58.6 ± 3.6 клеток соответственно, $p < 0.001$). Между тем, уровень фрагментации ядер не различался между этими группами бластоцист. Результаты представленных экспериментов свидетельствуют о стимулирующем воздействии фактора роста IGF-1 на развитие дробящихся эмбрионов мышей в преимплантационный период после их криоконсервации.

Ключевые слова: мыши, преимплантационные эмбрионы, криоконсервация, культивирование *in vitro*, IGF-1

DOI: 10.31857/S0475145021020026

ВВЕДЕНИЕ

Криоконсервацию биологических объектов и создание криобанков генетических ресурсов успешно используют для сохранения биоразнообразия животных; в таких криобанках хранят сперматозоиды, ооциты и преимплантационные эмбрионы (Agca, 2012). Однако в процессе охлаждения и последующего оттаивания эмбрионов нередко возникают криповреждения (Игонина и др., 2015). Культивирование эмбрионов *in vitro* после процедур криоконсервации позволяет оценить степень их жизнеспособности (Brusentsev et al., 2014; Игонина и др., 2015).

Современные питательные среды для культивирования *in vitro* репродуктивных клеток могут сильно варьировать по своему химическому составу, оставаясь при этом субоптимальными по сравнению с условиями *in vivo* (Aguilar, Reyley, 2005), что негативно влияет на качество эмбрио-

нов млекопитающих (Khatir et al., 2005; Brusentsev et al., 2014). Известно, что включение отдельных ростовых факторов в состав культуральной среды может минимизировать негативные эффекты культивирования эмбрионов *in vitro* (Amstislavsky et al., 2015; Брусенцев и др., 2015).

Одним из важнейших ростовых факторов, участвующих в росте и развитии фолликулов и эмбрионов, является инсулиноподобный фактор роста 1-го типа (IGF-1), который в перспективе может быть использован в клинической практике. Рецепторы к IGF-1 детектируются, начиная с ранних стадий дробления зародышей мышей (Heuener et al., 1989). В настоящее время имеются данные о стимулирующем воздействии IGF-1 на эмбрионы этих животных (Lin et al., 2003). Однако, изучение воздействия фактора IGF-1 на эмбрионы мышей после процедур замораживания-оттаивания проводили лишь в двух исследо-

ваниях (Desai et al., 2000, 2007). В первом из них изучали развитие *in vitro* преимплантационных эмбрионов после их криоконсервации на стадии морулы (Desai et al., 2000). В другой работе этого же коллектива авторов изучали влияние IGF-1 на развитие *in vitro* преимплантационных эмбрионов после их криоконсервации на стадии зиготы (Desai et al., 2007). Целью настоящего исследования было изучение влияния IGF-1 на развитие *in vitro* эмбрионов мышей после их криоконсервации на стадии дробления.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте было использовано 10 половозрелых самок и пять самцов мышей линии CD1 в возрасте от двух до трех месяцев. Животных содержали в стандартных условиях конвенционального вивария Института цитологии и генетики (Новосибирск, Россия).

Самок мышей линии CD1 на стадии проэструс-эструс ссаживали на ночь с фертильными самцами этой же линии. День обнаружения вагинальной пробки считали первым днем беременности. Таких самок подвергали эвтаназии путем дислокации шейных позвонков на второй день беременности, в 16 ч. Яйцеводы и матку извлекали и промывали средой Flushing Solution (FertiPro, Belgium), как описано ранее (Igonina et al., 2019).

Для криоконсервации дробящихся зародышей мышей применяли программное замораживание. Все полученные эмбрионы были на стадии 4–6 клеток. В качестве криопротектора использовали 10% (v/v) пропиленгликоль (ХимМед, Россия) в среде Flushing Solution (FertiPro, Belgium). Эмбрионы помещали в центральную часть (второй сектор) 0.25 мл пластиковой соломины (Cryo Bio System, Франция) и криоконсервировали с использованием программного замораживателя CL 8800 (CryoLogic, Australia) как описано ранее (Игонина и др., 2015; Amstislavsky et al., 2015).

Для оттаивания соломины с эмбрионами доставали из резервуара с жидким азотом, выдерживали в течение 40 с при комнатной температуре, а затем помещали на 40 с в водяную баню при 30.0°C как описано ранее (Игонина и др., 2015; Amstislavsky et al., 2015). Содержимое выдавливали на чашку Петри (Corning, USA) и освобождали от криопротектора путем переноса оттаянных эмбрионов через три капли (50 мкл) среды Flushing Solution (FertiPro, Бельгия). После удаления криопротектора, эмбрионы оценивали визуально. Зародыши, у которых было разрушено более 25% бластомеров, либо были серьезные нарушения прозрачной оболочки (или ее полное отсутствие) были отбракованы согласно критериям, принятым для оценки эффективности процедуры криоконсервации эмбрионов мышей (Игонина и др.,

2015); остальные – переносили в индивидуальную каплю среды KSOM (Merck, Германия) и культивировали *in vitro* как описано ниже.

Были сформированы две группы: 1) без добавления факторов роста (контроль); 2) с добавлением 40 нг/мл IGF-1 (Merck, Германия). Данная дозировка выбрана нами исходя из литературных данных (Desai et al., 2000, 2007) и наших предварительных исследований. Согласно нашей предыдущей работы, эта дозировка была оптимальной для развития эмбрионов мышей без криоконсервации. Чистота препарата IGF-1 составляла $\geq 98\%$. Культивирование производили под минеральным маслом (Merck, Germany) в течение 48 ч при 37.0°C, 5% CO₂ и влажности 90% в CO₂-инкубаторе New Brunswick™ Galaxy 48R (Eppendorf, Германия).

Оценку преимплантационных эмбрионов проводили микроскопически, определяя стадию их развития при помощи стереомикроскопа S8 APO (Leica Microsystems, Германия). В бластоцистах определяли наличие хэтчинга, подсчитывали число клеток, индекс фрагментации, а также митотический индекс после окрашивания DAPI (2 мкг/мл 4,6-диамидино-2-фенилиндола), как описано нами ранее (Amstislavsky et al., 2015). Подсчет числа интерфазных ядер, их фрагментов и метафазных пластинок в развивающихся бластоцистах производили путем визуальной оценки препаратов с применением флуоресцентного микроскопа AxioImager A1 (Carl Zeiss, Германия), имеющегося в распоряжении ЦКП МАБО СО РАН, с соответствующим кубическим фильтром для окрашивания DAPI. Индекс фрагментации рассчитывали, как число фрагментов $\times 100$ деленое на общее число ядер. Митотический индекс рассчитывали, как число митозов $\times 100$ деленое на общее число ядер.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью стандартного пакета программного обеспечения STATISTICA V 8.0 (StatSoft, Inc). Доли зародышей, развивающихся до стадии бластоцисты сравнивали с помощью теста хи-квадрат. Для сравнения данных по числу клеток в бластоцистах и индексу фрагментации использовали *t*-критерий Стьюдента. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

После процедур замораживания-оттаивания 76 из 89 зародышей, визуально были оценены как морфологически нормальные (т.о. всего было отбраковано ~15%). Все морфологически нормальные эмбрионы были использованы в дальнейших экспериментах: 38 из них культивировали в среде KSOM с добавлением IGF-1 в концентрации 40 нг/мл и 38 – культивировали в той же среде без добавления этого фактора роста. Добавление в

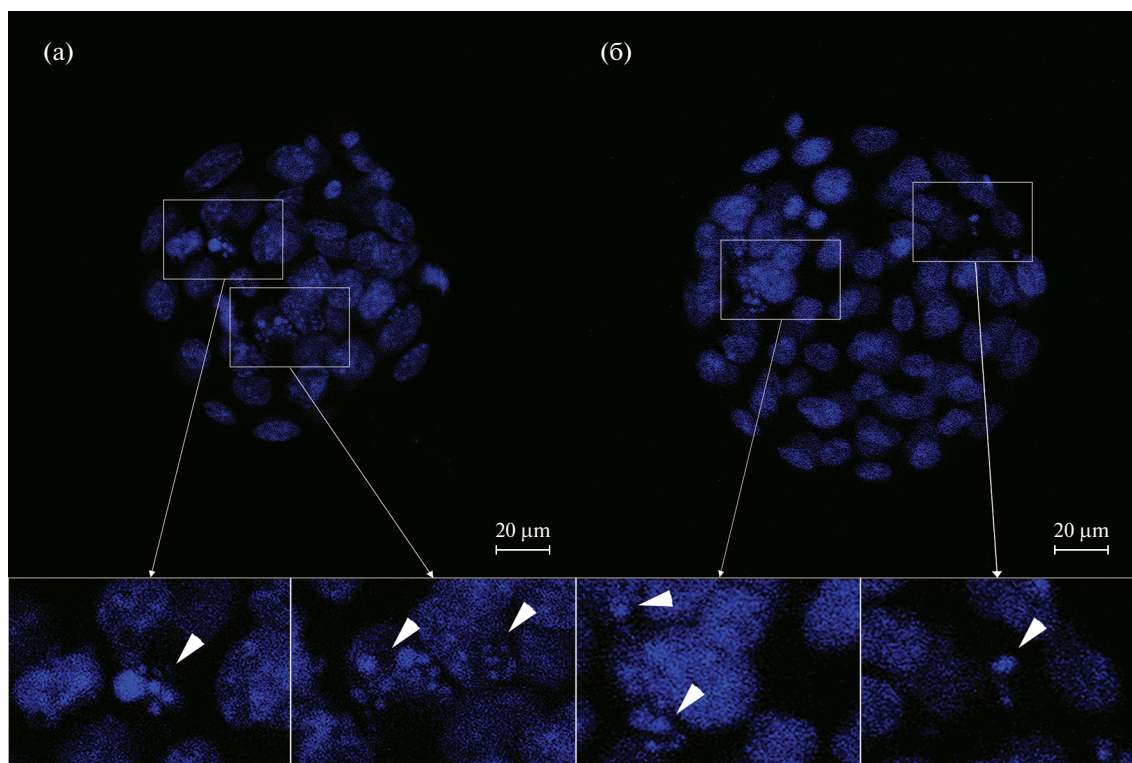


Рис. 1. Бластоцисты после культивирования *in vitro* заморожено-оттаянных эмбрионов мышей. Видны ядра клеток (окраска DAPI). Стрелки указывают на фрагментации ядер. (а) без фактора роста (контроль). (б) с IGF-1 (40 нг/мл).

культуральную среду IGF-1 приводило к улучшению показателей развития эмбрионов по сравнению с контролем (рис. 1а, 1б), таких как доля зародышей, развивающихся до стадии бластоцисты (78.9 и 47.4% соответственно, $p < 0.01$) и число клеток в них (79.8 ± 3.9 и 58.6 ± 3.6 соответственно, $p < 0.001$). Однако не было обнаружено достоверных различий по доле бластоцист достигших стадии хэтчинга между экспериментальной группой и контролем (13.1 и 7.9% соответственно). При этом митотический индекс был существенно ниже при использовании IGF-1 по сравнению с контрольной группой (5.0 ± 0.7 и 14.1 ± 3.0 соответственно, $p < 0.01$). Между тем, не было обнаружено достоверных различий по индексу фрагментации между экспериментальной группой и контролем (9.2 ± 1.5 и 9.8 ± 1.7 соответственно).

ОБСУЖДЕНИЕ

Давно установленный факт замедленного развития зародышей, полученных *in vitro*, по сравнению с эмбрионами, находящимися в условиях *in vivo* (Bowman, McLaren, 1970), указывает на важную роль паракринных факторов, секретируемых репродуктивным трактом, в ускорении их развития. Естественная среда репродуктивных путей млекопитающих содержит множество разнообразных компонентов, в том числе различные факторы

роста (Aguilar, Reyley, 2005). Так, например, в эндометрии человека показана экспрессия большого числа цитокинов и факторов роста, поддерживающих эмбриональное развитие (Kawamura et al., 2012).

Исследования на животных моделях подтверждают важную роль аутокринных/паракринных факторов, секретируемых преимплантационными эмбрионами и репродуктивным трактом для эмбрионального развития и имплантации (Neira et al., 2010). Перспективным подходом к оптимизации культуральных систем является включение отдельных факторов роста, присутствующих во внутриматочной среде *in vivo*, или их комбинаций в питательные среды, что способствует улучшению раннего эмбрионального развития и увеличению доли имплантирующихся зародышей (Kawamura et al., 2012; Брусенцев и др., 2015; Amstislavsky et al., 2015).

В нашей работе было показано, что при культивировании с IGF-1 заморожено-оттаянных эмбрионов на стадии дробления повышается доля развивающихся бластоцист и число клеток в них. Наши данные согласуются с результатами более ранних исследований, в которых было показано, что добавление IGF-1 к средам для культивирования *in vitro* повышало долю развивающихся до стадии бластоцисты эмбрионов у мышей (Desai et al.,

2000), и у других видов млекопитающих (Sirisathien, Brackett, 2003; Chen et al., 2017). В частности, в концентрации 30 нг/мл этот фактор повышал долю образования бластоцист и число клеток в них при культивировании зародышей мышей *in vitro* (Desai et al., 2000). Показано, что IGF-1 стимулирует эмбриональный рост и развитие, действуя в качестве митогенного фактора, индуцирующего пролиферацию клеток через митоген-активированную протеинкиназу (Velazquez et al., 2009). Кроме того, IGF-1 участвует в регулировании связанных с апоптозом генов Bcl-2/Bax (Chen et al., 2017). Это подтверждается результатами других исследований, которые указывают на то, что культивирование с IGF-1 способствует снижению уровня апоптоза в бластоцистах, которое происходит через активацию PI3K/Akt пути (Velazquez et al., 2009).

Согласно нашим данным, митотический индекс в бластоцистах при культивировании с IGF-1 был ниже, чем в контроле. Действительно, наши результаты, в своей совокупности, свидетельствуют о том, что при воздействии данного фактора роста бластоцисты более продвинуты в своем развитии (имеют больше число клеток). Между тем, известно, что в более поздних преимплантационных эмбрионах мышей скорость деления клеток снижается (Copp, 1978; Handyside, Hunter, 1986).

Ранее уже исследовали влияние фактора IGF-1 на процессы восстановления преимплантационных эмбрионов мышей, подвергавшихся криоконсервации на стадии морулы (Desai et al., 2000) и зиготы (Desai et al., 2007). Было показано, что морулы мышей после криоконсервации и последующего оттаивания быстрее достигают стадии бластоцисты и имеют больше клеток, если культивировать их с IGF-1 в концентрации 30 нг/мл (Desai et al., 2000). Однако, если эмбрионы мышей были заморожены на стадии зиготы этот эффект нивелировался (Desai et al., 2007). В данной работе мы восполнили пробел, связанный с тем, что не было изучено влияние этого фактора на развитие зародышей мышей после их криоконсервации на стадии дробления и продемонстрировали способность IGF-1 в концентрации 40 нг/мл стимулировать развитие дробящихся зародышей в преимплантационный период после процедур замораживания-оттаивания.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность ЦКП “Генетических ресурсов лабораторных животных” (<http://spf.bionet.nsc.ru>) и ЦКП “Микроскопического анализа биологических объектов” ИЦиГ СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy>).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке РФФИ № 19-016-00025, бюджетного проекта № 0324-2019-0041-С-01 с использованием оборудования ЦКП “Центр генетических ресурсов лабораторных животных” ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI62119X0023).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования все манипуляции, проводившиеся с экспериментальными животными, методы обезболивания, эвтаназии и ухода за животными до и после экспериментальных вмешательств соответствовали международным нормам по биоэтике.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Авторы Е.Ю. Брусенцев, Т.Н. Игонина и С.Я. Амстиславский придумали и разработали дизайн эксперимента. Авторы Е.Ю. Брусенцев, Т.Н. Игонина и С.В. Раннева получали преимплантационные эмбрионы, проводили их замораживание-оттаивание, а также их культивирование *in vitro*. Автор Е.А. Кизилова проводила окрашивание DAPI, подсчет числа интерфазных ядер, их фрагментов и метафазных пластинок в развивающихся бластоцистах. Авторы Е.Ю. Брусенцев, Т.Н. Игонина, С.В. Раннева и С.Я. Амстиславский участвовали в обработке данных. Авторы Е.Ю. Брусенцев, Т.Н. Игонина и С.Я. Амстиславский участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Брусенцев Е.Ю., Игонина Т.Н., Рожкова И.Н., Рагаева Д.С., Амстиславский С.Я. Эффекты воздействия факторов роста при культивировании *in vitro* эмбрионов мышей и крыс // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2015. Т. 19. № 4. С. 372–377.
- Игонина Т.Н., Брусенцев Е.Ю., Рожкова И.Н., Напримиров В.А., Амстиславский С.Я. Сравнение различных сочетаний криопротекторов и методов оттаивания при криоконсервации эмбрионов мышей и крыс // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2015. Т. 19. № 4. С. 77–81.
- Agca Y. Genome resource banking of biomedically important laboratory animals // Theriogenology. 2012. V. 78. P. 1653–1665.
- Aguiar J.J., Reyley M. The uterine tubal fluid: secretion, composition and biological effects // Anim. Reprod. 2005. V. 2. № 2. P. 91–105.
- Amstislavsky S., Brusentsev E., Kizilova E. et al. Embryo cryopreservation and *in vitro* culture of preimplantation

- embryos in Campbell's hamster (*Phodopus campbelli*) // *Theriogenology*. 2015. V. 83. P. 1056–1063.
- Brusentsev E.Y., Igonina T.N., Amstislavsky S.Y. Traditional and modern approaches to culture of preimplantation mammalian embryos *in vitro* // *Russ. J. Dev. Biol.* 2014. V. 45. P. 53–65.
https://doi.org/10.1134/S1062360414020039
- Bowman P., McLaren A. Cleavage rate of mouse embryos *in vivo* and *in vitro* // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1970. V. 24. № 1. P. 203–207.
- Chen P., Pan Y., Cui Y. et al. Insulin-like growth factor I enhances the developmental competence of yak embryos by modulating aquaporin 3 // *Reprod. Domest. Anim.* 2017. V. 52. № 5. P. 825–835.
- Copp A.J. Interaction between inner cell mass and trophectoderm of the mouse blastocyst. II. The fate of the polar trophectoderm // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1979. V. 51. P. 109–120.
- Desai N., Kattal N., Abdel Hafez F.F., Szeptycki-Lawson J., Goldfarb J. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and co-culture can affect post-thaw development and apoptosis in cryopreserved embryos // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2007. V. 24. № 6. P. 215–222.
- Desai N., Lawson J., Goldfarb J. Assessment of growth factor effects on post-thaw development of cryopreserved mouse morulae to the blastocyst stage // *Hum. Reprod.* 2000. V. 15. № 2. P. 410–418.
- Handyside A.H., Susan H. Cell division and death in the mouse blastocyst before implantation // *Roux. Arch. Dev. Biol.* 1986. V. 195. № 8. P. 519–526.
- Heyner S., Smith R.M., Schultz G.A. Temporally regulated expression of insulin and insulin-like growth factors and their receptors in early mammalian development // *Bioessays*. 1989. V. 11. № 6. P. 171–176.
- Igonina T.N., Ragaeva D.S., Petrova O.M. et al. Effects of *in vitro* culture at the preimplantation embryo stage on early development and hypertension in ISIAH rats // *Hypertens. Pregnancy*. 2019. P. 1–9.
- Kawamura K., Chen Y., Shu Y. et al. Promotion of human early embryonic development and blastocyst outgrowth *in vitro* using autocrine/paracrine growth factors // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 11. e49328.
- 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. V. 40. № 3. P. 245–249.
- 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 Biology*. 2003. V. 4. P. 14.
- Neira J.A., Tainturier D., Pena M.A., Martal J. Effect of the association of IGF-I, IGF-II, bFGF, TGF-beta1, GM-CSF, and LIF on the development of bovine embryos produced *in vitro* // *Theriogenology*. 2010. V. 73. № 5. P. 595–604.
- Sirisathien S., Brackett B.G. TUNEL analyses of bovine blastocysts after culture with EGF and IGF-I // *Mol. Reprod. Dev.* 2003. V. 65. № 1. P. 51–56.
- Velazquez M.A., Zaraza J., Oropeza A., Webb R., Niemann H. The role of IGF1 in the *in vivo* production of bovine embryos from superovulated donors // *Reproduction*. 2009. V. 137. № 2. P. 161–180.

Effects of Insulin-Like Growth Factor 1 on the *in vitro* Development of Mouse Embryos after Cryopreservation

E. Yu. Brusentsev¹, E. A. Kizilova¹, T. N. Igonina¹, S. V. Ranneva¹, and S. Ya. Amstislavsky^{1,*}

¹*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, prosp. Lavrentyeva 10, Novosibirsk, 630090 Russia*

*e-mail: amstis@yandex.ru

Cryopreservation of gametes and embryos is widely used for mammalian Genome Resource Banking. Effects of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on the *in vitro* development of cleavage stage CD1 mouse embryos after their cryopreservation were studied. The mouse embryos developed *in vivo* up to the 4–6 cell stage were frozen in a programmable freezer according to a standard protocol with a 10% propylene glycol as a cryoprotectant, thereafter were thawed and cultured *in vitro* in KSOM for 48 hours. The percentage of embryos developed up to blastocyst stage in culture medium supplemented with IGF-1 (40 ng/mL) was higher as compared to controls (78.9 and 47.4%, respectively, $p < 0.01$). Moreover, blastocysts developed in the presence of IGF-1 contained more cells as compared to controls (79.8 ± 3.9 and 58.6 ± 3.6 cells, respectively, $p < 0.001$). However, index of nuclear fragmentation did not differ between these groups. Experimental results presented herein revealed the stimulating effects of IGF-1 on the mouse preimplantation embryos after their cryopreservation.

Keywords: mice, preimplantation embryos, cryopreservation, *in vitro* culture, IGF-1