

Метаболический фенотип взрослых потомков мышей, полученных при разных вариантах эмбриональных пересадок

М.В. Анисимова¹, Я. Гон², Н.С. Юдин¹ , Ю.М. Мошкин¹, Л.А. Герлинская¹

¹ Федеральное исследовательское учреждение Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия


² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

 e-mail: yudin@bionet.nsc.ru

Аннотация. Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) занимают все более заметное место в репродуктологии. Кроме того, в развитых странах ВРТ обеспечивают воспроизводство более 50 % крупного рогатого скота, а в коллекциях генетических линий лабораторных животных являются неотъемлемым компонентом криоархивирования и редеривации. Процедуры ВРТ включают развитие ранних эмбрионов вне материнского организма и высокую вероятность неполной синхронизации физиологического состояния суррогатной матери и пересаживаемых эмбрионов. Поскольку все это происходит на стадии наибольшей восприимчивости зародышей к эпигенетическому перепрограммированию, то полный цикл ВРТ и его отдельные составляющие могут приводить к устойчивым фенотипическим изменениям потомков. Данное влияние подтверждают исследования морфофункциональных характеристик половозрелых потомков мышей аутбредной линии CD1, полученных с использованием разных вариантов трансплантации ранних эмбрионов. Сравнительные исследования массы и состава тела, базального уровня глюкозы и реакции на глюкозную нагрузку (глюкозотолерантный тест) выполнены на половозрелых самцах и самках, потомках матерей, не подвергавшихся экспериментальным воздействиям в период беременности (группа контроля); двухклеточных эмбрионах, вымытых у беременных самок, после инкубирования до стадии бластоцист и пересаженных суррогатным матерям (группа 2 кл. – бл.); при пересадках двухклеточных эмбрионов (группа 2 кл. – 2 кл.) и бластоцист (группа бл. – бл.) сразу после вымывания. Во всех экспериментах эмбрионы пересаживали вынашивающим самкам той же линии. Установлено, что половозрелые потомки, полученные при всех вариантах пересадок, характеризуются большим по сравнению с контрольными особями относительным содержанием жира и, соответственно, меньшей тощей массой тела. Этот эффект был выражен сильнее у самок, чем у самцов. В отличие от состава тела пересадки эмбрионов в большей степени влияли на базальную концентрацию глюкозы и показатели глюкозотолерантного теста у самцов, чем у самок. При этом потомки групп 2 кл. – 2 кл. и 2 кл. – бл. характеризовались более высокой толерантностью к нагрузке глюкозой по сравнению с контрольной группой и группой бл. – бл. Устойчивые отклонения состава тела и показателей гомеостаза глюкозы, выявленные у потомков при разных вариантах эмбриотрансплантации, свидетельствуют о фенотипической значимости процедур, используемых при вспомогательных репродуктивных технологиях. Ключевые слова: пересадки эмбрионов; половозрелые потомки; метаболический фенотип; состав тела; глюкозотолерантный тест.


Для цитирования: Анисимова М.В., Гон Я., Юдин Н.С., Мошкин Ю.М., Герлинская Л.А. Метаболический фенотип взрослых потомков мышей, полученных при разных вариантах эмбриональных пересадок. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(7):761-769. DOI 10.18699/VJ20.671

Metabolic phenotype of adult mice offspring obtained from different variants of embryo transfer

М.В. Анисимова¹, Ya. Gong², N.S. Yudin¹ , Yu.M. Moshkin¹, L.A. Gerlinskaya¹

¹ Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 e-mail: yudin@bionet.nsc.ru

Abstract. Assisted reproductive technologies (ART) increasingly occupy the study of human reproduction. In addition, in developed countries they contribute to breeding of more than 50 % of cattle. In the management of collections of genetic lines of laboratory animals, these technologies are obligatory components of cryopreservation and redervation. ART procedures include the development of early embryos outside the mother's body and the high probability of incomplete synchronization of the physiological state of the surrogate mother and transplanted embryos. Since all this occurs at the stage of the highest susceptibility of embryos to epigenetic reprogramming, the full cycle of ART and its individual components can lead to stable phenotypic changes in the offspring. Their reality is confirmed by studies of the morphological and functional characteristics of sexually mature offspring of CD1 outbred mice, obtained using

different variants of early embryo transplantation. Comparative studies of body mass and body composition, basal glucose level and response to glucose load (glucose-tolerance test – GTT) have been done on sexually mature males and females. Animals were separated in 4 groups according to the variant of embryo transplantation: group (control) – natural mating; group (2cl-bl) – incubation of 2-cell up to blastocysts; group (2cl-2cl) – removal and transplantation of the 2-cell embryo without incubation; group (bl-bl) removal and transplantation of the blastocysts without incubation. All embryos were transplanted to recipient females of the same line. It was found that sexually mature offspring obtained with all variants of transplantations had a higher relative fat content and, correspondingly, lower lean mass compared to the control. This effect was more pronounced in females than in males. Unlike body compositions, embryo transplantations had a greater effect on basal glucose concentration and GTT in males than in females. In this case, the offspring of the 2cl-2cl and 2cl-bl groups were characterized by a higher tolerance to glucose load (GTT) compared with the control and the bl-bl group. Stable deviations of body compositions and glucose homeostasis indices detected in experimental groups of progenies indicate the phenotypic significance of the embryo transplantations per se.

Key words: embryo transfer; mature offspring; metabolic phenotype; body composition; glucose tolerance test.

For citation: Anisimova M.V., Gong Ya., Yudin N.S., Moshkin Yu.M., Gerlinskaya L.A. Metabolic phenotype of adult mice offspring obtained from different variants of embryo transfer. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(7):761-769. DOI 10.18699/VJ20.671 (in Russian)

Введение

В мире более 45 млн брачных пар сталкиваются с бесплодием. Преодолеть эту проблему помогают вспомогательные репродуктивные технологии: экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) и внутриклеточная инъекция сперматозоида (intracytoplasmic sperm injection – ИКСИ). Со времени первого успешного применения ВРТ в клинической практике (1978 г.) число детей, рожденных с помощью ЭКО, возросло до 7 млн во всем мире. Сегодня в развитых странах ~1 % детей рождаются методом ЭКО (International Committee..., 2012). Большинство этих детей относят к категории здоровых (Davies et al., 2012), хотя в некоторых исследованиях отмечаются потенциальные риски патологий беременности и новорожденных (Templeton, 2000; Hansen et al., 2013). При проведении ЭКО повышается риск осложнений беременности (Romundstad et al., 2008; Esh-Broder et al., 2011; Chen et al., 2015), среди которых аномальный рост плаценты, перинатальная смертность, преждевременные роды и низкий вес при рождении (Helmerhorst et al., 2004; Ceelen et al., 2008; Rinaudo, Lamb, 2008; Naavaldsen et al., 2012). Дети, зачатые с помощью ЭКО, в подростковом возрасте демонстрируют статистически значимые различия в динамике роста (Ceelen et al., 2009), отложении жира (Ceelen et al., 2007), уровнях артериального давления и концентрации глюкозы в крови (Ceelen et al., 2008).

При использовании ЭКО у лабораторных животных и крупного рогатого скота наблюдается внутриутробное ограничение роста на ранних сроках беременности, за которым следуют ускоренные темпы развития плода от средней до поздней беременности, что коррелирует с увеличением роста плаценты. Исследования на коровах и овцах дополнительно показывают, что потомки, полученные методом ЭКО, демонстрируют уникальный фенотип, так называемый синдром крупного потомства (Young et al., 1998; Sinclair et al., 2000; Farin et al., 2006).

Успешность преимплантационного развития обеспечивается строго скоординированными физиологическими и эпигенетическими трансформациями в период развития от зиготы до бластоцисты. Поддержка здоровой беременности обеспечивается многочисленными материнскими факторами, контролируемыми процессами созревания га-

мет, оплодотворение, доимплантационное развитие и имплантацию бластоцист. Согласно гипотезе Бакера, неблагоприятные условия материнской среды играют ведущую роль в развитии отклонений в период внутриутробного развития и, как следствие, формировании физиологического и метаболического фенотипа новорожденных, ассоциированного с увеличением риска хронических заболеваний во взрослом возрасте (Barker, 2007). Метаболические потребности развивающегося эмбриона зависят от стадии клеточного деления и удовлетворяются за счет гуморального состава внутриматочной среды, включая питательные вещества и факторы роста, которая меняется по мере того, как эмбрион перемещается из яйцевода в матку (Leese, 2012). Важно отметить, что динамичность гуморального окружения практически отсутствует при культивировании эмбрионов *in vitro*.

Риски долговременных неблагоприятных последствий процедур ЭКО зависят от многих переменных, таких как качество и способ получения ооцитов; метод фертилизации *in vitro* (ЭКО/ИКСИ); состав культуральной среды; физические факторы окружающей среды (CO_2/O_2 , температура, влажность); продолжительность развития в условиях *in vitro*. Кроме того, на беременность и онтогенез влияет синхронизация степени развития эмбрионов и морфофункционального состояния организма вынашивающей матери. Плодово-материнская синхронизация во многом зависит от стадии эмбриогенеза и трансплантации зародышей в яйцевод или матку.

В данной работе показаны долговременные последствия инкубирования *in vitro* двухклеточных эмбрионов до стадии бластоцист и пересадок либо двухклеточных эмбрионов в яйцевод, либо бластоцист в матку на метаболический фенотип взрослых потомков. Эти варианты пересадок моделируют ВРТ при: а) редеривации и криоархивировании двухклеточных эмбрионов с последующей пересадкой в яйцевод; б) размножении сельскохозяйственных животных на основе криоархивированных бластоцист; в) выполнении ЭКО или ИКСИ в клинической практике, которые включают оплодотворение *in vitro*, инкубирование до стадии бластоцисты и пересадку суррогатной матери. Результаты показали, что все варианты пересадок влияют на метаболический фенотип половозрелых по-

томков, что проявляется в статистически значимых изменениях состава тела и толерантности к глюкозе. Кроме того, это исследование подтвердило важность использования зачатых *in vivo* эмбрионов с последующей пересадкой суррогатным реципиентам в качестве надлежащих контролей для дальнейшего изучения долговременных фенотипических эффектов экстракорпорального оплодотворения.

Материалы и методы

Условия содержания и животные

Исследование выполнено в ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ИЦиГ СО РАН (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI62114X0010). Мышей аутбредной линии CD1 содержали в контролируемых условиях среды: фотопериод 14С:10Т, при температуре 22–24 °С и влажности 40–50 %. В качестве подстилочного материала использовали обеспыленные березовые гранулы (ООО «Альбион», Новосибирск). Корм (SNIFF, Германия) и воду давали без ограничений. Корм и подстилку предоставляли животным после автоклавирования (121 °С). Протокол эксперимента одобрен комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН.

Группы животных

Исследования выполнены на потомках обоего пола линии CD1 в возрасте 3–12 нед., полученных с использованием методов ВРТ. В соответствии с методом получения исследованные животные разделены на четыре группы:

- 1) потомки матерей, не подвергавшихся экспериментальным воздействиям в период беременности (контроль). Животных исследовали в возрасте 3 ($n = 113$), 7 ($n = 113$), 10 ($n = 111$) и 12 ($n = 16$) нед.;
- 2) потомки, полученные после культивирования *in vitro* двухклеточных эмбрионов до стадии бластоцист и пересадки самкам-реципиентам (2 кл. – бл.). Животных исследовали в возрасте 3 ($n = 23$), 7 ($n = 23$), 10 ($n = 19$) и 12 ($n = 16$) нед.;
- 3) потомки, полученные путем вымывания эмбрионов на стадии бластоцисты и пересадки самкам-реципиентам (Бл. – бл.). Животных исследовали в возрасте 3 ($n = 30$), 7 ($n = 19$), 10 ($n = 19$) и 12 ($n = 16$) нед.;
- 4) потомки, полученные путем вымывания эмбрионов на стадии двух клеток и пересадки самкам-реципиентам (2 кл. – 2 кл.). Животных исследовали в возрасте 3 ($n = 27$), 7 ($n = 27$), 10 ($n = 27$) и 12 ($n = 16$) нед.

Экспериментальные процедуры

Вазэктомия самцов. Самцам в возрасте 8–10 нед. производили вазэктомию путем пережигания семявыносящих канальцев. Процедура проводилась под общей анестезией (домитор 15 мг/100 г веса мыши, золетил 3 мг/100 г веса мыши).

Подготовка самок-доноров эмбрионов. Для стимуляции овуляции проводили процедуру суперовуляции самок, которую выполняли в два этапа. На первом этапе самкам за 2 ч до выключения света (18:00 по местному времени) вводили внутривагинально по 5 IU гонадотропина сывотки жеребых кобыл (PMSG) (Intervet International B.V.,

Нидерланды). На втором этапе, через 48 ч после введения PMSG, этим же самкам внутривагинально вводили по 5 IU человеческого хорионического гонадотропина (hCG) (Intervet International B.V., Нидерланды). Сразу после введения hCG самок по одной подсаживали к фертильным самцам той же линии и утром следующего дня самок проверяли на наличие вагинальных пробок. Через 24 ч после обнаружения вагинальной пробки извлекали яйцеводы и с помощью шприца вымывали двухклеточные эмбрионы. Через 3 сут выделяли матки, из которых вымывали бластоцисты. Вымытые эмбрионы помещали в каплю среды HTF (human tubal fluid). Эмбрионы с нормальной морфологией переносили в заранее подготовленную каплю среды KSOM, покрытую минеральным маслом, и помещали в CO₂-инкубатор (37 °С) до трансплантации эмбрионов псевдобеременным самкам-реципиентам.

Индукция псевдобеременности у самок-реципиентов эмбрионов. Перед выключением света в комнате содержания животных (17:00) в клетку с изолированно содержащимся вазэктомизированным самцом подсаживали трех самок. Утром следующего дня самок проверяли на наличие вагинальных пробок. Самок с вагинальными пробками отсаживали в отдельные клетки.

Культивирование эмбрионов. Часть двухклеточных эмбрионов, полученных описанным выше методом, в течение 3 дней инкубировали в культуральной среде KSOM AA при 5 % CO₂ и 37 °С. Бластоцисты без морфологических дефектов пересаживали самкам-реципиентам.

Пересадки эмбрионов. Самок-реципиентов двухклеточных эмбрионов (12 ч после подсадки самок к вазэктомизированному самцу) и бластоцист (3–3.5 сут после подсадки самок к вазэктомизированному самцу) усыпляли при помощи ингаляционного наркоза – изофлурана (Baxter, США). Наркотизированным самкам подсаживали двухклеточные эмбрионы через воронку в яйцевод, а бластоцисты – в матку через надрез со стороны спины. После подсадки 8–10 эмбрионов самок отсаживали в индивидуальные клетки и содержали одиночно на протяжении беременности и выкармливания.

Исследование потомков

Взвешивание потомков. Потомков взвешивали в возрасте 3 (при отъеме от матерей), 7 и 10 нед.

Определение состава тела. Измерения общего жира и тощей массы проводили половозрелым потомкам в возрасте 7 и 10 нед. при помощи низкопольного магнитно-резонансного томографа (EchoMRI, США).

Глюкозотолерантный тест. Толерантность к глюкозе исследовали у потомков в возрасте 11–12 нед. За 16 ч до инъекций глюкозы из клеток содержания мышей извлекали кормушку. Глюкозу («ПанЭко», Россия) вводили внутривагинально из расчета 10 мкл 20 % глюкозы на 1 г веса мыши. Кровь брали из кончика хвоста в 5 временных точках: 0 – базовый уровень глюкозы до введения и после, 1 – через 15 мин, 2 – через 30 мин, 3 – через 60 мин и 4 – через 120 мин. Измерение уровня глюкозы проводили с помощью глюкометра Contour TS (Bayer, Швейцария). В качестве интегрального показателя глюкозотолерантного теста (ГТТ) рассчитывали площадь под кривой концентрации глюкозы (average under curve – AUC).

Статистический анализ

Проверка на нормальность распределения эмпирических данных показала, что для всех изучаемых параметров можно использовать параметрическую статистику. Межгрупповые сравнения средних проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа, определяя наименьшую достоверную разность (least significant difference – LSD). Статистическую зависимость показателей фенотипа от числа новорожденных и массы тела при отъеме от матерей оценивали на основе линейных корреляций. Влияние вариантов пересадки и пола потомков на массу и состав тела анализировали путем двухфакторного ковариационного анализа (ANCOVA) с факторами «пол» и «вариант пересадки» и ковариатами «число новорожденных» и «масса тела» при отъеме. Для глюкозы и показателей теста толерантности к глюкозе применяли двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA).

Результаты

Плодовитость и масса тела при отъеме от матерей

На размер пометов при отъеме от матерей значимо влиял способ их получения (табл. 1). При пересадках эмбрионов отмечено существенное снижение размера пометов по

сравнению с контрольной группой. Вместе с тем разные способы пересадок не влияли на среднее число новорожденных ($p > 0.05$, LSD-тест, см. табл. 1). Соотношение полов при разных вариантах пересадок и в целом по всем экспериментальным группам хотя и было сдвинуто в пользу самцов (45 самцов, 35 самок), но этот сдвиг не был статистически значимым: $\chi^2 = 0.63$, $p = 0.43$ при сравнении с теоретически ожидаемым 1:1. Ковариационный анализ (ANCOVA) изменчивости массы тела трехнедельных потомков с факторами «группа», «пол» и размером помета в качестве ковариаты показал значимые эффекты группы: $F_{3,184} = 11.42$, $p < 0.001$. Фактор пола потомка, а также взаимодействие факторов группы и пола новорожденных не влияли на массу потомков в этом возрасте: $F_{1,184} = 0.671$, $p = 0.414$ и $F_{3,184} = 0.597$, $p = 0.618$ соответственно. При сравнении массы трехнедельных потомков, полученных при разных вариантах пересадок, отмечено, что самцы и самки в группах 2 кл. – бл. были самыми тяжелыми, а в 2 кл. – 2 кл. – самыми легкими (см. табл. 1).

Размер помета и масса тела в возрасте 3 нед. коррелировали с массой тела, относительным содержанием жира и тощей массой потомков в возрасте 7 и 10 нед. (табл. 2), но не коррелировали с концентрацией глюкозы и показателями ГТТ. Исходя из этих результатов, все варианты

Таблица 1. Размер помета и масса тела при отъеме у мышей, полученных при разных вариантах эмбриональных пересадок

Группа	Размер помета, среднее \pm SE (n)	Масса тела (г), среднее \pm SE (n)	
		Самцы	Самки
Контроль	12.5 \pm 0.58 (9) ^A	11.7 \pm 0.34 (54) ^D	11.7 \pm 0.30 (59) ^D
2 кл. – 2 кл.	6.75 \pm 1.11 (4) ^B	15.1 \pm 0.77 (17) ^C	15.0 \pm 0.92 (10) ^C
2 кл. – бл.	4.43 \pm 0.78 (7) ^B	20.7 \pm 0.92 (14) ^A	20.1 \pm 1.00 (9) ^A
Бл. – бл.	5.00 \pm 0.93 (6) ^B	18.2 \pm 0.77 (14) ^B	17.8 \pm 0.39 (16) ^B

Примечание. Обозначения групп здесь и далее: контроль – потомки, полученные путем естественных спариваний; 2 кл. – 2 кл. – потомки, полученные путем вымывания эмбрионов на стадии двух клеток и пересадки самкам-реципиентам; 2 кл. – бл. – потомки, полученные после культивирования *in vitro* двухклеточных эмбрионов до стадии бластоцист и пересадки самкам-реципиентам; Бл. – бл. – потомки, полученные путем вымывания эмбрионов на стадии бластоцист и пересадки самкам-реципиентам.

A, B, C, D – разными буквами обозначены достоверно различающиеся средние ($p < 0.05$, LSD-тест); SE – стандартная ошибка; n – количество животных в группе.

Таблица 2. Корреляция состава тела и показателей теста толерантности к глюкозе

с размером помета и массой тела мышей при отъеме (данные по объединенной выборке)

Признак	Размер помета, r; p		Масса тела, r; p	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Возраст 7 недель				
Масса тела	-0.61; < 0.001	-0.45; < 0.001	0.60; < 0.001	0.39; < 0.001
Жир, %	-0.26; 0.015	-0.54; < 0.001	0.25; 0.19	0.45; < 0.001
Тощая масса, %	0.46; < 0.001	0.70; < 0.001	-0.49; < 0.001	-0.64; < 0.001
Возраст 10 недель				
Масса тела	-0.60; < 0.001	-0.48; < 0.001	0.53; < 0.001	0.31; 0.003
Жир, %	-0.43; < 0.001	-0.61; < 0.001	0.35; 0.001	0.45; < 0.001
Тощая масса, %	0.43; < 0.001	0.60; < 0.001	-0.31; 0.003	-0.41; < 0.001
Концентрация глюкозы и тест толерантности к глюкозе				
Глюкоза, базальный уровень	0.03; 0.880	0.10; 0.599	-0.10; 0.565	0.03; 0.860
Площадь под кривой концентрации глюкозы	0.22; 0.218	0.24; 0.195	0.08; 0.664	-0.31; 0.090

Примечание. r – коэффициент корреляции, p – уровень достоверности.

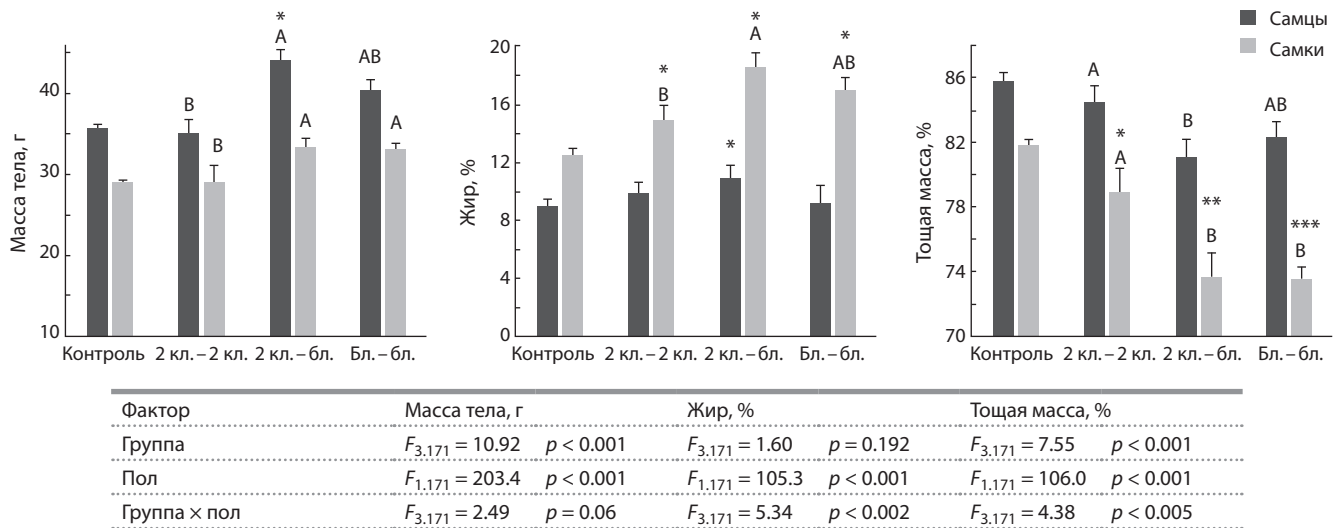


Рис. 1. Масса тела и относительные значения жира и тощей массы у потомков мышей в возрасте 7 нед.

Здесь и далее таблица показывает влияние факторов «группа», «пол» и их взаимодействия. ANCOVA с ковариатами (эффекты не показаны) по размеру пометов и массе тела в трехнедельном возрасте. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ по сравнению с контролем. Разными буквами обозначены достоверно различающиеся средние ($p < 0.05$, LSD-тест). ANCOVA, рассчитанный для самцов и самок каждой экспериментальной группы.

межгрупповых сравнений массы и состава тела выполняли с помощью ковариационного анализа (ANCOVA), в который наряду с анализируемыми факторами включали две ковариаты – «размер помета» и «вес потомков» при отъеме от матерей.

Масса и состав тела половозрелых потомков

Ковариационный анализ (ANCOVA) показал значимое влияние факторов группы, пола и их взаимодействия на массу и состав тела потомков в возрасте 7 нед. (рис. 1). Статистическую значимость отличий самцов и самок каждой экспериментальной группы от контрольной группы также оценивали с помощью ANCOVA. У самцов в возрасте 7 нед. установлено достоверное превышение контрольных значений массы тела и относительного содержания жира в группе 2 кл. – бл. Масса тела самок в этом возрасте в контрольной и экспериментальной группах значимо не различалась. Вместе с тем содержание жира у самок, полученных при разных вариантах пересадок, достоверно превосходило значения, наблюдаемые у контрольных особей. Соответственно, тощая масса самок экспериментальных групп была ниже таковой в группе контроля. Различная фенотипическая реакция на пересадки самцов и самок подтверждена статистически значимыми эффектами взаимодействия факторов «группа» и «пол» (см. рис. 1). Объединение в общую группу данных по всем пересаженным потомкам показало, что содержание жира и тощей массы статистически значимо отличалось от группы контроля только у самок: жир – 16.8 ± 0.54 против 12.5 ± 0.39 % ($p < 0.05$, ANCOVA); тощая масса – 75.4 ± 0.60 против 81.9 ± 0.43 % ($p < 0.05$, ANCOVA).

Поскольку размер помета достоверно не различался между экспериментальными группами, для выявления эффектов, обусловленных разными вариантами пересадок, статистические сравнения между этими группами проводили отдельно для самцов и самок с помощью одно-

факторного дисперсионного анализа. Наибольшие значения массы тела установлены у особей обоего пола в группе 2 кл. – бл., наименьшие – в группе 2 кл. – 2 кл. (см. рис. 1). Относительное содержание жира, как и масса тела, были наибольшими у самцов и самок группы 2 кл. – бл., а значения тощей массы, соответственно, наименьшими.

Статистический анализ межгрупповых различий в возрасте 10 нед., выполненный по изложенной выше схеме, показал значимое влияние экспериментальной группы, пола и взаимодействия факторов (группы и пола) на общую и тощую массу потомков (рис. 2). На содержание жира фактор «группа» не оказывал значимого влияния, но достоверно влиял фактор пола, а также взаимодействие факторов – «пол» и «группа». При сравнении экспериментальных групп с контрольной установлено, что у самцов доля жира превышала контрольные значения только в группе 2 кл. – 2 кл., а тощая масса была ниже, чем в контроле, в группах 2 кл. – бл. и Бл. – бл. У самок всех экспериментальных групп относительное содержание жира превышало контрольные значения. Соответственно, тощая масса была ниже, чем в контроле, но статистически значимым это различие было только в группе Бл. – бл. Как и в возрасте 7 нед., изменение состава тела, обусловленное пересадкой эмбрионов, было более выраженным у самок, чем у самцов. При объединении данных групп потомков разных вариантов эмбриональных пересадок статистически значимые отличия от контрольной группы были выявлены только у самок: жир – 19.5 ± 0.65 против 13.4 ± 0.46 % ($p < 0.05$, ANCOVA); тощая масса – 71.8 ± 0.65 против 77.5 ± 0.46 % ($p < 0.05$, ANCOVA).

Экспериментальные группы обоего пола между собой достоверно не различались. Эти результаты показывают, что если влияние способа получения потомков на массу тела нивелируется в возрасте 10 нед., то различия в жире и тощей массе по сравнению с группой контроля сохраняются и в этом возрасте.

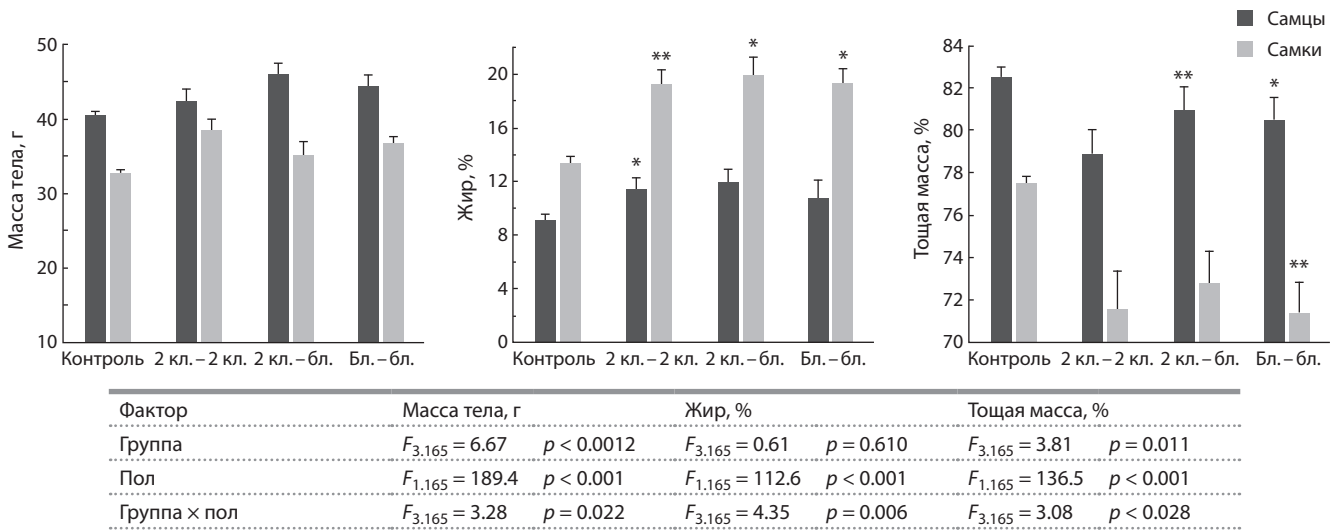


Рис. 2. Масса тела и относительные значения жира и тощей массы у потомков мышей в возрасте 10 нед.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ по сравнению с контролем. ANCOVA с ковариатами по размеру пометов и массе тела в трехнедельном возрасте.

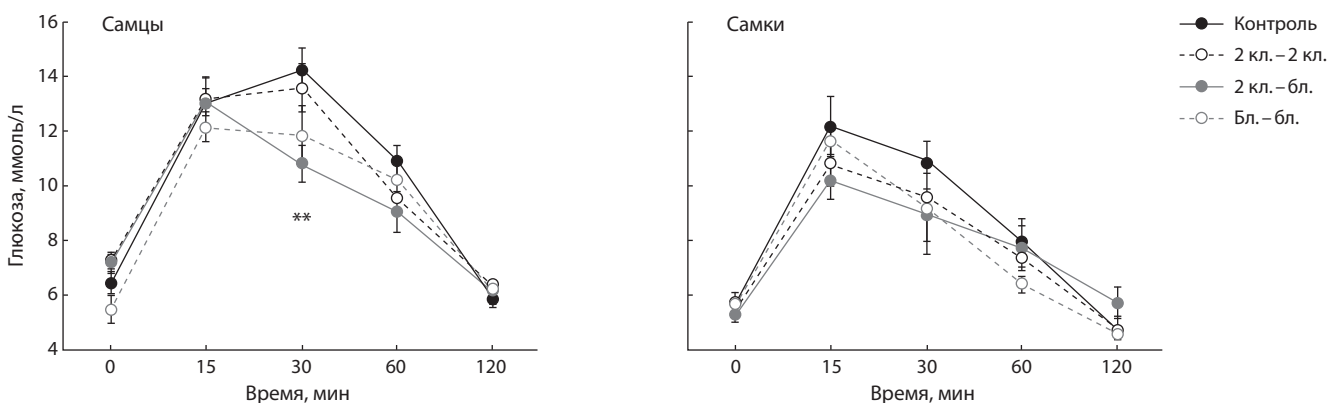
Глюкозотолерантный тест

Уровень глюкозы до и во время нагрузочной пробы (ГТТ) не коррелировал с числом потомков в пометах и массой тела при отъеме от матерей. Это обстоятельство позволило проанализировать влияние пересадок и пола, не прибегая к использованию ковариат. Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что базальный уровень глюкозы существенно зависел от пола потомков ($F_{1,56} = 19.74$, $p < 0.001$) и взаимодействия факторов «пол» и «группа» ($F_{3,56} = 3.69$, $p = 0.017$) (табл. 3). Собственный эффект экспериментальной группы был статистически незначимым ($F_{3,56} = 1.90$, $p = 0.14$). Концентрация глюкозы в разные сроки нагрузочной пробы (ГТТ) была достоверно ниже у самок разных групп, чем у самцов (рис. 3). Варианты

Таблица 3. Базальная концентрация глюкозы у половозрелых самцов и самок мышей, полученных при разных вариантах эмбриональных пересадок

Группа	Самцы, среднее ± SE (n)	Самки, среднее ± SE (n)
Контроль	6.46 ± 0.39 (8) ^{A, B}	5.65 ± 0.46 (8)
2 кл. – 2 кл.	7.23 ± 0.35 (9) ^A	5.46 ± 0.18 (7)
2 кл. – бл.	7.17 ± 0.34 (9) ^A	5.24 ± 0.21 (7)
Бл. – бл.	5.50 ± 0.50 (7) ^B	5.62 ± 0.18 (9)

A, B – разными буквами обозначены достоверно различающиеся средние ($p < 0.05$, LSD-тест); SE – стандартная ошибка, n – количество животных в группе.



Фактор	df	0 мин	15 мин	30 мин	60 мин	120 мин
Группа	3.56	$F = 1.90$ $p = 0.139$	$F = 0.58$ $p = 0.631$	$F = 4.20$ $p = 0.009$	$F = 1.40$ $p = 0.251$	$F = 1.22$ $p = 0.311$
Пол	1.56	$F = 19.74$ $p < 0.001$	$F = 9.22$ $p = 0.004$	$F = 25.6$ $p < 0.001$	$F = 31.37$ $p < 0.001$	$F = 17.42$ $p < 0.001$
Группа × пол	3.56	$F = 3.69$ $p = 0.017$	$F = 1.09$ $p = 0.361$	$F = 0.63$ $p = 0.600$	$F = 1.33$ $p = 0.272$	$F = 1.03$ $p = 0.386$

Рис. 3. Концентрация глюкозы после углеводной нагрузки.

Таблица показывает влияние экспериментальной группы и пола на концентрацию глюкозы в разные сроки после углеводной нагрузки. ** $p < 0.01$ по сравнению с контрольной группой (t-тест Стьюдента).

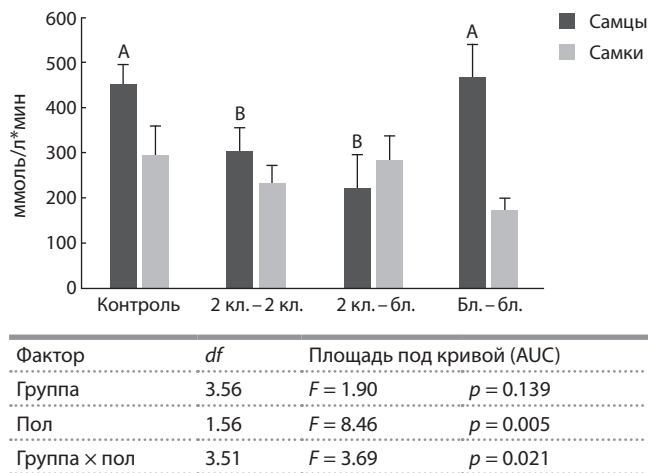


Рис. 4. Площади под кривой прироста концентрации глюкозы у потомков экспериментальных групп.

Таблица показывает влияние экспериментальной группы и пола на значения AUC. Различающиеся средние значения ($p < 0.05$, LSD-тест) обозначены разными буквами.

пересадок статистически значимо влияли на уровень глюкозы, измеренный на 30-й мин ГТТ. При этом наибольшие значения отмечены у контрольных особей, а наименьшие – у потомков группы 2 кл. – бл.

Площадь под кривой прироста концентрации глюкозы (AUC) варьировала в зависимости от пола животных и взаимодействия факторов пола и группы (рис. 4). Последнее обстоятельство выразилось в том, что варианты пересадок влияли на AUC только у самцов. При этом наибольшие значения AUC отмечены у контрольных животных и потомков, полученных при вымывании и пересадке blastocyst (группа Бл. – бл.). У самцов групп 2 кл. – 2 кл. и 2 кл. – бл. значения AUC были достоверно ниже.

Обсуждение

Результаты наших исследований показали, что пересадка эмбрионов суррогатной матери даже без предварительной инкубации оказывает долгосрочное влияние на метаболический фенотип взрослых потомков. Эти данные подтверждают положение о высокой вероятности эпигенетического перепрограммирования на доимплантационной стадии развития (Fleming et al., 2004; Rehfeldt, Kuhn, 2006; Burdge et al., 2007; Nelson, Lawlor, 2011; Fleming et al., 2012; Mulligan et al., 2012). Следует отметить, что в подавляющем большинстве исследований долгосрочных последствий ЭКО в качестве главного фактора рассматривают состав культуральной среды (Fernández-Gonzalez et al., 2004; Dumoulin et al., 2010; Bouillon et al., 2016). Наше исследование показывает, что влияние культивирования эмбрионов *in vitro* от двух клеток до blastocyst проявляется главным образом в большей массе тела и содержании жира у самцов в возрасте 7 нед. по сравнению с самцами, полученными естественным способом. В отличие от самцов масса тела самок, полученных при разных вариантах пересадок, не отличалась от группы контроля в возрасте 7 и 10 нед. Однако самки экспериментальных групп имели большее, чем в группе контроля, относительное содержа-

ние жира и меньшие значения тощей массы. Поскольку эти же отличия от контрольных особей были статистически достоверными как в экспериментах с культивированием эмбрионов от двух клеток до blastocyst, так и при пересадке двух клеточных эмбрионов и blastocyst без культивирования, можно заключить, что сама процедура эмбриотрансплантации вносит вклад в метаболические изменения потомков женского пола.

Кроме того, условия преимплантационного этапа и стадия развития в момент пересадки влияли на толерантность к глюкозе потомков мужского пола, полученных после пересадок двух клеточных эмбрионов и blastocyst и после культивирования *in vitro*. При этом следует отметить, что самцы, рожденные после пересадок интактных blastocyst, не отличались по этому признаку от контрольных особей. Полученные в нашем исследовании данные массы тела и толерантности к глюкозе демонстрируют некоторую схожесть долговременных последствий культивирования на преимплантационной стадии развития с метаболическими изменениями у взрослых потомков (Donjacour et al., 2014; López-Cardona et al., 2015). Анализ данных литературы о влиянии ВРТ на пре- и постимплантационное развитие, а также постнатальный фенотип показывает, что воздействие ВРТ зависит от вида млекопитающих, пола, используемой культуральной среды, а также возраста модельных видов (Duranthon, Chavatte-Palmer, 2018). При этом авторы подчеркивают, что очень трудно сделать общие выводы, за исключением того факта, что процедуры ВРТ влияют на липидный обмен и метаболизм глюкозы. Предложено несколько связанных между собой гипотез, объясняющих, каким образом неблагоприятные факторы на ранних этапах развития могут оказывать долгосрочное влияние на здоровье потомков (Feuer, Rinaudo, 2012, 2017).

Гипотеза начального триггера предполагает, что в основе относительно сходных метаболических фенотипов (метаболизм глюкозы, липидный обмен и изменения артериального давления) лежат эпигенетические механизмы программирования генома. Период развития от стадии зиготы до blastocyst является наиболее эпигенетически уязвимым, поэтому считается, что реакция эмбриона на искусственную среду приводит к изменениям экспрессии генов, которые включены в программу формирования обмена веществ. Согласно следующей гипотезе, влияние манипуляций *in vitro* на экспрессию ключевых генов, выполняющих функции регулятора транскрипции в преимплантационных эмбрионах, может по-разному влиять на типы клеток и объяснить специфичность профилей экспрессии генов в разных тканях, наблюдаемых при использовании ВРТ. Наконец, предполагается влияние условий преимплантационного развития на глобальную экспрессию генов, обусловленную транскрипционными изменениями, которые эпигенетически поддерживаются в нескольких локусах, в том числе при дифференцировке клеток (Feuer et al., 2014).

Следует отметить, что значительно меньше внимания уделяется долговременным последствиям ВРТ, обусловленным реакцией суррогатной матери на эмбриональные антигены, формирующей гуморальное обеспечение для нормального развития плодов. Сегодня уже нет никаких сомнений, что материнские Т- и В-клетки распознают

антигены плода и реагируют на его присутствие. Это явление подтверждено на экспериментальных моделях, в которых ответы Т- и В-клеток на природные или модельные антигены прослеживались *in vivo* и *in vitro* (Moldenhauer et al., 2010; Taglauer et al., 2010). Кроме того, наличие антиген-реактивных Т-лимфоцитов и антител к генам гистосовместимости хорошо известно и задокументировано у беременных женщин (James et al., 2003; Kahn, Baltimore, 2010). Результаты наших ранее опубликованных исследований показывают долговременные эффекты иммуногенетических различий между суррогатной матерью и эмбрионом на стадиях двух клеток и бластоцисты на метаболический и поведенческий фенотип взрослых потомков (Gerlinskaya, Evsikov, 2001; Gerlinskaya et al., 2019). Влияние факторов иммуногенетического диалога матери и плода на фенотип потомков может отличаться при пересадках, выполняемых на аутбредных (в нашем случае линия CD1) и инбредных линиях мышей.

Заключение

Таким образом, развитие доимплантационных эмбрионов *in vitro* и даже их пересадки без предварительного культивирования влияют на метаболический фенотип потомков. Эти ключевые процедуры ВРТ могут существенно влиять на воспроизводимость результатов при использовании технологий криоархивирования для воспроизводства генетических линий лабораторных животных, хозяйственно значимые признаки и репродукцию ценных пород сельскохозяйственных животных, а также вероятность метаболических отклонений у новорожденных, зачатых с помощью экстракорпорального оплодотворения.

Список литературы / References

- Barker D.J. The origins of the developmental origins theory. *J. Intern. Med.* 2007;261(5):412-417. DOI 10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x.
- Bouillon C., Léandri R., Desch L., Ernst A., Bruno C., Cerf C., Chiron A., Souchay C., Burguet A., Jimenez C., Fauque P. Does embryo culture medium influence the health and development of children born after *in vitro* fertilization? *PLoS ONE.* 2016;11(3):e0150857. DOI 10.1371/journal.pone.0150857.
- Burdge G.C., Hanson M.A., Slater-jefferies J.L., Lillycrop K.A. Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? *Br. J. Nutr.* 2007;97(6):1036-1046. DOI 10.1017/S0007114507682920.
- Ceelen M., van Weissenbruch M.M., Roos J.C., Vermeiden J.P., van Leeuwen F.E., Delemarre-van de Waal H.A. Body composition in children and adolescents born after *in vitro* fertilization or spontaneous conception. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007;92(9):3417-3423. DOI 10.1210/jc.2006-2896.
- Ceelen M., van Weissenbruch M.M., Roos J.C., Vermeiden J.P., van Leeuwen F.E., Delemarre-van de Waal H.A. Cardiometabolic differences in children born after *in vitro* fertilization: Follow-up study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008;93(5):1682-1688. DOI 10.1210/jc.2007-2432.
- Ceelen M., van Weissenbruch M.M., Prein J., Smit J.J., Vermeiden J.P., Spreeuwenberg M., van Leeuwen F.E., Delemarre-van de Waal H.A. Growth during infancy and early childhood in relation to blood pressure and body fat measures at age 8–18 years of IVF children and spontaneously conceived controls born to subfertile parents. *Hum. Reprod.* 2009;24(11):2788-2795. DOI 10.1093/humrep/dep273.
- Chen S., Sun F.Z., Huang X., Wang X., Tang N., Zhu B., Li B. Assisted reproduction causes placental maldevelopment and dysfunction linked to reduced fetal weight in mice. *Sci. Rep.* 2015;5:10596. DOI 10.1038/srep10596.
- Davies M.J., Moore V.M., Willson K.J., Van Essen P., Priest K., Scott H., Haan E.A., Chan A. Reproductive technologies and the risk of birth defects. *N. Engl. J. Med.* 2012;366(19):1803-1813. DOI 10.1056/NEJMoa1008095.
- Donjacour A., Liu X., Lin W., Simbulan R., Rinaudo P.F. *In vitro* fertilization affects growth and glucose metabolism in a sex-specific manner in an outbred mouse model. *Biol. Reprod.* 2014;90(4):80. DOI 10.1095/biolreprod.113.113134.
- Dumoulin J.C., Land J.A., Van Montfoort A.P., Nelissen E.C., Coonen E., Derhaag J.G., Schreurs I.L., Dunselman G.A., Kester A.D., Geraedts J.P., Evers J.L. Effect of *in vitro* culture of human embryos on birthweight of newborns. *Hum. Reprod.* 2010;25(3):605-612. DOI 10.1093/humrep/dep456.
- Duranthon V., Chavatte-Palmer P. Long term effects of ART: What do animals tell us? *Mol. Reprod. Dev.* 2018;85(4):348-368. DOI 10.1002/mrd.22970.
- Esh-Broder E., Ariel I., Abas-Bashir N., Bdolah Y., Celnikier D.H. Placenta accreta is associated with IVF pregnancies: a retrospective chart review. *BJOG.* 2011;118(9):1084-1089. DOI 10.1111/j.1471-0528.2011.02976.x.
- Farin P.W., Piedrahita J.A., Farin C.E. Errors in development of fetuses and placentas from *in vitro*-produced bovine embryos. *Theriogenology.* 2006;65(1):178-191. DOI 10.1016/j.theriogenology.2005.09.022.
- Fernández-Gonzalez R., Moreira P., Bilbao A., Jiménez A., Pérez-Crespo M., Angel Ramírez M., Rodríguez De Fonseca F., Pintado B., Gutiérrez-Adán A. Long-term effect of *in vitro* culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004;101(16):5880-5885. DOI 10.1073/pnas.0308560101.
- Feuer S.K., Liu X., Donjacour A., Lin W., Simbulan R.K., Giritharan G., Kolahi K., Ameri K., Maltepe E., Rinaudo P.F. Use of a mouse *in vitro* fertilization model to understand the developmental origins of health and disease hypothesis. *Endocrinology.* 2014;155(5):1956-1969. DOI 10.1210/en.2013-2081.
- Feuer S.K., Rinaudo P. Preimplantation stress and development. *Birth Defects Res. C Embryo Today.* 2012;96(4):299-314. DOI 10.1002/bdrc.21022.
- Feuer S.K., Rinaudo P.F. Physiological, metabolic and transcriptional postnatal phenotypes of *in vitro* fertilization (IVF) in the mouse. *J. Dev. Orig. Health Dis.* 2017;8(4):403-410. DOI 10.1017/S204017441700023X.
- Fleming T.P., Kwong W.Y., Porter R., Ursell E., Fesenko I., Wilkins A., Miller D.J., Watkins A.J., Eckert J.J. The embryo and its future. *Biol. Reprod.* 2004;71(4):1046-1054. DOI 10.1095/biolreprod.104.030957.
- Fleming T.P., Velazquez M.A., Eckert J.J., Lucas E.S., Watkins A.J. Nutrition of females during the peri-conceptional period and effects on foetal programming and health of offspring. *Anim. Reprod. Sci.* 2012;130(3-4):193-197. DOI 10.1016/j.anireprosci.2012.01.015.
- Gerlinskaya L.A., Evsikov V.I. Influence of genetic dissimilarity of mother and fetus on progesterone concentrations in pregnant mice and adaptive features of offspring. *Reproduction.* 2001;121(3):409-117. DOI 10.1530/rep.0.1210409.
- Gerlinskaya L.A., Litvinova E.A., Kontsevaya G.V., Feofanova N.A., Ahasova K.M., Anisimova M.V., Maslennikova S.O., Zolotykh M.A., Moshkin Y.M., Moshkin M.P. Phenotypic variations in transferred progeny due to genotype of surrogate mother. *Mol. Hum. Reprod.* 2019;1:25(2):88-99. DOI 10.1093/molehr/gay052.
- Haavaldsen C., Tanbo T., Eskild A. Placental weight in singleton pregnancies with and without assisted reproductive technology: a population study of 536,567 pregnancies. *Hum. Reprod.* 2012;27(2):576-582. DOI 10.1093/humrep/der428.
- Hansen M., Kurinczuk J.J., Milne E., de Klerk N., Bower C. Assisted reproductive technology and birth defects: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update.* 2013;19(4):330-353. DOI 10.1093/humupd/dmt006.

- Helmerhorst F.M., Perquin D.A., Donker D., Keirse M.J. Perinatal outcome of singletons and twins after assisted conception: a systematic review of controlled studies. *BMJ Open*. 2004;328(7434):261. DOI 10.1136/bmj.37957.560278.EE.
- International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART), European Society of Human Reproduction and Embryology Annual Meeting, 2012. Istanbul, Turkey.
- James E., Chai J.G., Dewchand H., Macchiarulo E., Dazzi F., Simpson E. Multiparity induces priming to male-specific minor histocompatibility antigen, HY, in mice and humans. *Blood*. 2003;102(1):388-393. DOI 10.1182/blood-2002-10-3170.
- Kahn D.A., Baltimore D. Pregnancy induces a fetal antigen-specific maternal T regulatory cell response that contributes to tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010;107(20):9299-9304. DOI 10.1073/pnas.1003909107.
- Leese H.J. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. *Reproduction*. 2012;143(4):417-427. DOI 10.1530/REP-11-0484.
- López-Cardona A.P., Fernández-González R., Pérez-Crespo M., Alén F., de Fonseca F.R., Orío L., Gutierrez-Adan A. Effects of synchronous and asynchronous embryo transfer on postnatal development, adult health, and behavior in mice. *Biol. Reprod.* 2015;93(4):85. DOI 10.1095/biolreprod.115.130385.
- Moldenhauer L.M., Hayball J.D., Robertson S.A. Utilising T cell receptor transgenic mice to define mechanisms of maternal T cell tolerance in pregnancy. *J. Reprod. Immunol.* 2010;87(1-2):1-13. DOI 10.1016/j.jri.2010.05.007.
- Mulligan C.J., D'Errico N.C., Stees J., Hughes D.A. Methylation changes at NR3C1 in newborns associate with maternal prenatal stress exposure and newborn birth weight. *Epigenetics*. 2012;7(8):853-857. DOI 10.4161/epi.21180.
- Nelson S.M., Lawlor D.A. Predicting live birth, preterm delivery, and low birth weight in infants born from in vitro fertilisation: a prospective study of 144,018 treatment cycles. *PLoS Med.* 2011;8(1):e1000386. DOI 10.1371/journal.pmed.1000386.
- Rehfeldt C., Kuhn G. Consequences of birth weight for postnatal growth performance and carcass quality in pigs as related to myogenesis. *J. Anim. Sci.* 2006;84(Suppl.):113-123. DOI 10.2527/2006.8413_supple113x.
- Rinaudo P.F., Lamb J. Fetal origins of perinatal morbidity and/or adult disease. *Semin. Reprod. Med.* 2008;26(5):436-445. DOI 10.1055/s-0028-1087109.
- Romundstad L.B., Romundstad P.R., Sunde A., von Düring V., Skjaerven R., Gunnell D., Vatten L.J. Effects of technology or maternal factors on perinatal outcome after assisted fertilisation: a population-based cohort study. *Lancet*. 2008;372(9640):737-743. DOI 10.1016/S0140-6736(08)61041-7.
- Sinclair K.D., Young L.E., Wilmut I., McEvoy T.G. In-utero overgrowth in ruminants following embryo culture: lessons from mice and a warning to men. *Hum. Reprod.* 2000;15(Suppl. 5):68-86. DOI 10.1093/humrep/15.suppl_5.68.
- Taglauer E.S., Adams Waldorf K.M., Petroff M.G. The hidden maternal-fetal interface: events involving the lymphoid organs in maternal-fetal tolerance. *Int. J. Dev. Biol.* 2010;54(2-3):421-430. DOI 10.1387/ijdb.082800et.
- Templeton A. Infertility and the establishment of pregnancy-overview. *Br. Med. Bul.* 2000;56(3):577-587. DOI 10.1258/0007142001903283.
- Young L.E., Sinclair K.D., Wilmut I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev. Reprod.* 1998;3(3):155-163. DOI 10.1530/ror.0.0030155.

ORCID ID

M.V. Anisimova orcid.org/0000-0003-1522-9433
N.S. Yudin orcid.org/0000-0002-1947-5554
L.A. Gerlinskaya orcid.org/000-0002-8118-1362

Благодарности. Исследование выполнено при поддержке РФФ, грант № 20-14-00055. В работе использованы ресурсы ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ИЦиГ СО РАН, который поддерживается бюджетными проектами № АААА-А17-17072710029-7 и 0259-2019-0004.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 01.06.2020. После доработки 20.07.2020. Принята к публикации 21.07.2020.