

УДК 577.95;575;591.3;592/599

ТРАДИЦИОННЫЕ И СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К КУЛЬТИВИРОВАНИЮ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ *IN VITRO*

© 2014 г. Е. Ю. Брусенцев¹, Т. Н. Игонина¹, С. Я. Амстиславский^{1,2}

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН

630090 Новосибирск, пр. Лаврентьева, д. 10

² Новосибирский государственный университет

630090 Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2

E-mail: amstis@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 28.03.13 г.

Окончательный вариант получен 28.10.13 г.

В обзоре рассмотрены основные принципы и методы культивирования *in vitro* преимплантационных зародышей млекопитающих. Описаны особенности развития зародышей *in vitro* присущие различным видам животных с учетом состава питательных сред, причем особое внимание уделено тем видам, которые традиционно считаются лабораторными, т.е. мышам, крысам и хомячкам. Анализируются эффекты субоптимальных условий культивирования преимплантационных эмбрионов на формирование фенотипа развившихся из этих эмбрионов особей. Анализируются новые подходы, направленные на оптимизацию условий развития преимплантационных эмбрионов млекопитающих *in vitro*.

Ключевые слова: культивирование *in vitro*, преимплантационные эмбрионы, факторы роста.

DOI: 10.7868/S0475145014020037

Культивирование *in vitro* гамет и преимплантационных эмбрионов млекопитающих является основой современных репродуктивных технологий, таких как ЭКО, создание банков (криобанков) генетических ресурсов и многих других так называемых “вспомогательных репродуктивных технологий” (assisted reproductive technologies). Хотя исследования в этой области проводятся достаточно длительный срок, до сих пор многие вопросы относительно влияния оплодотворения *in vitro* и последующего культивирования на развитие эмбриона и фенотипические признаки в постнатальном онтогенезе остаются неясными.

После рождения первого ребенка, зачатого в результате ЭКО (Stephoe, Edwards, 1978), прошло уже 35 лет и, общее число детей, рожденных с применением вспомогательных репродуктивных технологий, достигло 5 миллионов (Sandin et al., 2013). В настоящее время наряду с традиционным вариантом ЭКО, предполагающим минимальные воздействия на зародыши и гаметы и относительно небольшое время пребывания их в культуральных средах, все большее значение приобретают

более сложные технологии, такие как, например, ICSI (Intracytoplasmic sperm injection) (Рожкова и др., 2012; Sandin et al., 2013). Более того, одной из основных тенденций в данной области, начиная с 2000-х гг., является более длительное культивирование полученных при помощи ЭКО зародышей человека (Hardy, Spanos, 2002). Все это порождает запрос на изучение возможных отдаленных эффектов воздействия *in vitro* на стадии преимплантационного зародыша на последующий онтогенез, склонность к тем или иным заболеваниям, а также на поиск новых подходов к культивированию преимплантационных зародышей вне организма.

Имеются определенные технические и клинические сложности в изучении детей, рожденных в результате ЭКО и других репродуктивных технологий, в сравнении с обычными детьми (Hansen et al., 2005), поскольку методики ЭКО на протяжении 35 лет изменялись, и разные лаборатории придерживались не одинаковых протоколов, а также из-за молодого возраста подавляющего большинства детей, рожденных в результате ЭКО

(Watkins, Fleming, 2009). В связи с этим, особое значение приобретают экспериментальные работы на лабораторных животных, которые позволяют, как изучать эффекты культивирования преимплантационных эмбрионов в условиях *in vitro*, так и исследовать факторы, способствующие оптимизации этих условий.

Репродуктивные технологии активно применяются на лабораторных и сельскохозяйственных животных, что связано как с запросом на создание криобанков для сохранения генетических ресурсов редких и исчезающих видов животных, так и с ускорением генетического прогресса в сельском хозяйстве (Амстиславский, Трукшин, 2010; Amstislavsky et al., 2012). Эти технологии имеют своим элементом культивирование преимплантационных эмбрионов *in vitro*. Наряду с исследованием видовой специфики, то есть специальных требований к условиям развития вне организма, характерных для того или иного вида млекопитающих (Herrick et al., 2007), имеются общие принципы культивирования эмбрионов животных *in vitro*. В нижеследующих разделах обзора дан критический анализ этих принципов, а также рассмотрена гипотеза о том, что здоровье и болезни определяются условиями пренатального онтогенеза. Наиболее полно представлены данные, полученные на традиционных лабораторных животных: мышах, крысах и золотистых хомячках. Кроме того, проанализированы эффекты субоптимальных условий *in vitro* на формирование фенотипа и представлены современные подходы, направленные на оптимизацию развития *in vitro* преимплантационных эмбрионов млекопитающих.

ГИПОТЕЗА DONAD В СВЯЗИ С ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫМ ПЕРИОДОМ РАЗВИТИЯ

Представляется уместным упомянуть классические наблюдения Дэвида Баркера, который выявил взаимосвязь условий течения беременности, веса ребенка при рождении и последующего риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, диабета второго типа и других патологий. Баркером была сформулирована гипотеза о том, что здоровье и болезни взрослого человека определяются условиями его раннего онтогенеза, прежде всего – пренатального (Barker, 1995; Paneth, Susser, 1995). Согласно гипотезе DONaD (Developmental Origins of Health and Disease), адаптивные ответы на окружающие стимулы во время критических периодов пренатального онтогенеза могут иметь долговременные последствия из-за перепрограммирования ключевых систем регуляции гомеостаза (Bateson et al., 2004). По отношению к пре-

имплантационным зародышам выделяют два основных аспекта в рамках данной гипотезы: “stress-response models” и “quiet embryo hypothesis” (Leese, 2012).

В исследованиях связанных с “stress—response models”, изучают различные факторы стресса, которые могут испытывать преимплантационные зародыши при субоптимальных условиях их культивирования *in vitro* и связывают воздействия этих факторов с изменениями в метаболизме и характере развития эмбриона (Xie et al., 2011). “Stress—response models” включает в себя несколько моделей, которые образуют основу для описания метаболизма ооцита и преимплантационного эмбриона во время стресса. Одной из таких моделей является направленное поддержание гомеостаза в условиях стресса, особенно в период дробления преимплантационного зародыша (Lane, Gardner, 2004). Другая модель показывает, что изменение среды, в которой развивается преимплантационный эмбрион *in vitro*, может привести к нарушениям фенотипа, который формируются в постнатальном онтогенезе (Thompson et al., 2002). Значение последней модели заключается в том, что метаболизм преимплантационного эмбриона может быть изменен, задолго до нарушения в экспрессии генов, что, в конце концов, может приводить к аномальному развитию плода.

“Quiet embryo hypothesis”, основана на том, что в норме системы поддержания гомеостаза в преимплантационном эмбрионе препятствуют нарушению его метаболизма и проявлению деструктивных тенденций (Leese, 2002). Например, потребление кислорода является важным индикатором интенсивности метаболизма, так как основная часть АТФ необходимая для развития преимплантационного эмбриона образуется за счет процесса окислительного фосфорилирования. Преимплантационный эмбрион имеет сниженный метаболизм в отношении потребления кислорода, начиная со стадии зиготы до морулы (Leese, 2012), что позволяет избежать повреждений, вызванных образованием свободных радикалов. В исследованиях на преимплантационных эмбрионах коровы и свиньи было показано, что существует взаимосвязь между повреждением ДНК и интенсивностью метаболизма: чем выше был уровень обменных процессов у эмбрионов, тем больше было повреждений, и наоборот, эмбрионы с более низким уровнем метаболизма меньше подвергались повреждению (Baumann et al., 2007).

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Выделяют три типа питательных сред по способу получения и составу используемых для этого компонентов: естественные, полусинтетические и синтетические. Важными свойствами любой питательной среды являются: стерильность, а также постоянство рН (буферная емкость) и осмолярность. Для нормального развития преимплантационного эмбриона *in vitro* необходимо поддерживать рН в интервале от 7.2 до 7.4; содержание эндотоксинов не должно превышать нормы (не более 0.25 ЕЭ/мл); раствор должен быть изотоничным жидкости яйцевода; в нем должны отсутствовать патогены.

Естественные питательные среды готовят из продуктов природного происхождения, например, эмбрионального экстракта (Hare, Morgan, 1954). Качественный и количественный состав данного типа сред может сильно варьировать, и их практически не используют для культивирования преимплантационных эмбрионов млекопитающих (Summers, Biggers, 2003).

Полусинтетические питательные среды создаются на основе искусственных растворов с известным составом с добавлением естественных компонентов, например, фетальной сыворотки крупного рогатого скота (КРС) (Han, Niwa, 2003). Их можно рассматривать как модифицированные варианты синтетических питательных сред.

Наибольшее же распространение при культивировании эмбрионов получили синтетические питательные среды. Одной из особенностей синтетических питательных сред является их точный качественный и количественный состав; они считаются “простыми”, если содержат менее 12 компонентов, и, соответственно “сложными”, если ингредиентов больше (Summers, Biggers, 2003; Lane, Gardner, 2007). При выборе компонентов и концентраций для их создания используются два основных подхода: “back-to-nature” и “let the embryo choose”.

При первом подходе – “back-to-nature” изучают состав среды, которая присутствует при развитии эмбриона в репродуктивных путях. Согласно этому подходу, концентрация веществ в создаваемой синтетической среде базируется на знании состава компонентов естественной среды, в которой развиваются преимплантационные эмбрионы, движущиеся от места оплодотворения (ампула яйцевода) в матку (Summers, Biggers, 2003).

Второй подход – “let the embryo choose”, основан на эмпирическом подборе компонентов сред и их концентраций с последующей проверкой в

тестах с культивированием эмбрионов. Создание питательной среды связано с выбором концентраций всех отдельных элементов, поскольку эффекты каждого из компонентов могут зависеть от концентрации других составляющих. Концентрация того или иного вещества, которая оказывает максимальный позитивный эффект на развитие эмбрионов отбирается при создании среды (Summers, Biggers, 2003).

Оба подхода к созданию синтетических питательных сред имеют свои ограничения. Подход “back-to-nature” ограничивается трудностью определения концентрации веществ в естественной среде развития преимплантационного эмбриона, а подход “let the embryo choose” определяет концентрацию конечного множества компонентов, которая приводит к максимальной реакции, но при этом сложно учесть эффекты взаимодействия различных соединений (Summers, Biggers, 2003). Синтетические питательные среды готовят на основе сложного физиологического раствора с учетом этих подходов. Эта основа представляет собой водный раствор нескольких простых неорганических солей, которые позволяют поддерживать осмотическое давление и рН питательной среды на постоянном уровне с добавлением энергетического субстрата, в качестве которого обычно используют глюкозу. Самыми распространенными из них являются растворы Эрла, Кребса–Рингера, Тироде или Хенкса.

К синтетическим питательным средам, предназначенным для культивирования преимплантационных эмбрионов млекопитающих, относят: M16, KSOM, R1ECM, HECM, среда 199 и многие другие. Одной из первых и наиболее сложных сред, применявшихся для культивирования эмбрионов различных видов животных, является среда 199 (Morgan et al., 1950; Честков и др., 2010). Для улучшения состава среды, в качестве стимулирующего развитие эмбрионов фактора в нее могут добавлять 5–15% сыворотки крови КРС и других млекопитающих (Han, Niwa, 2003; Graves et al., 2004). В качестве источника аминокислот иногда используют бычий сывороточный альбумин (БСА) (Niwa et al., 1980; Parkening, Cisneros, 1988), хотя в некоторые среды добавляют свободные аминокислоты, которые являются необходимым субстратом, как для пластического, так и для энергетического обмена (McKiernan, Bavister, 1990; Barnett, Bavister, 1996).

В процессе катаболизма эмбрион перерабатывает аминокислоты с образованием аммония, который обладает высокой эмбриотоксичностью (Lane, Gardner, 1995). Существует два способа решения данной проблемы. Во-первых, можно перенести эмбрионы в каплю свежей питательной

среды (Summers, Biggers, 2003), а во-вторых, удалить вредный побочный продукт при помощи специально разработанного метода с использованием фермента глутаматдегидрогеназы, который осуществляет трансаминирование α -кетоглутарата, присоединяя к нему свободный аммоний, образуя в качестве продукта безвредный для клеток глутамат (Lane, Gardner, 1995).

Выбор среды зависит как от видовой принадлежности, так и от стадии развития преимплантационного эмбриона (Summers, Biggers, 2003; Lane, Gardner, 2007). У большинства видов млекопитающих преимплантационные эмбрионы на стадии морулы переходят из яйцевода в матку (Амстиславский, 2011), где среда несколько отличается по своему составу (Summers, Biggers, 2003). В силу того, что состав среды в яйцеводах и матке различен, зачастую, для ранних стадий развития эмбрионов используют один состав среды, а для более поздних, начиная с морулы и до поздней бластоцисты – другой состав (*sequential media*) (Summers, Biggers, 2003).

Добавление стимулирующих факторов может различным образом влиять на культивируемые зародыши в зависимости от стадии развития, на которой они находятся. Например, добавление фетальной сыворотки КРС стимулирует развитие зародышей крысы на стадии формирования бластоцисты, но угнетает развитие эмбрионов этого вида на более ранних этапах (Han, Niwa, 2003). Показано, что среды, которые содержат в своем составе свободные аминокислоты, благотворно влияют на процесс образования бластоцист. Они более предпочтительны при культивировании поздних стадий преимплантационных эмбрионов по сравнению с теми, которые имеют в своем составе альбумины (например, БСА) (Zhang, Armstrong, 1990).

Согласно подходу “back-to-nature”, в среде должны содержаться питательные вещества, которые участвуют в процессах метаболизма (пластического и энергетического обмена). Энергетическим субстратом для эмбриона в матке является глюкоза, хотя в питательные среды можно добавлять и другие компоненты в качестве источников энергии (пируват, фруктозу, галактозу) (Brison, Leese, 1991; Ludwig et al., 2001). В процессе метаболизма эмбрион перерабатывает глюкозу с образованием в качестве побочного продукта лактата, увеличение концентрации которого в среде подавляет энергетический обмен. Зародыши млекопитающих при культивировании *in vitro* образуют большее количество лактата, чем в условиях *in vivo*, что приводит к увеличению его концентрации в капле питательной среды и тормозит их развитие (Brison, Leese, 1991). Это обстоятельство, наряду с

тем, что разные стадии преимплантационного зародыша отличаются разными требованиями к среде, является одной из причин того, что при длительном культивировании производят замену среды на свежую (Summers, Biggers, 2003).

В синтетические питательные среды иногда добавляют некоторые вспомогательные вещества: феноловый красный в качестве индикатора pH, антибиотики с целью предотвращения бактериального заражения и другие. В качестве антибиотиков обычно используют пенициллин и/или стрептомицин, а также в некоторых случаях микостатин (против заражения спорами дрожжевых грибов рода *Candida*) (Summers, Biggers, 2003). Показано, однако, что пенициллин и его производные угнетают развитие эмбрионов некоторых видов млекопитающих; в этих случаях применяют другие антибиотики (Barnett, Bavister, 1996).

Витамины являются кофакторами многих ферментативных процессов, протекающих в быстро делящихся клетках преимплантационного эмбриона. Добавление их в питательную среду улучшает и стабилизирует метаболизм в клетках эмбриона и способствует его развитию (Bavister et al., 1983; Kane, Bavister, 1988; Честков и др., 2010). Нуклеотиды необходимы для синтеза нуклеиновых кислот и особенно активно они потребляются, начиная со стадии морулы, когда происходит наиболее интенсивное деление клеток эмбриона (Wales, 1975; Leese, 2012). Антиоксиданты, например глутатион, защищают клетки эмбриона от вредоносного воздействия образующихся в ходе метаболизма свободных радикалов (супероксидного аниона, перекиси водорода и других) (Choe et al., 2010).

Прозрачная оболочка (*zona pellucida*) выполняет важнейшую барьерную и структурную функцию во время преимплантационного развития млекопитающих (Рожкова и др., 2012). В питательную среду, в некоторых случаях, добавляют эмульгаторы и осмолиты, например: твин, поливиниловый спирт (ПВС), таурин и другие. Эти вещества способны поддерживать клеточный гомеостаз за счет регуляции поступления воды через оболочку эмбриона и цитоплазматическую мембрану отдельных бластомеров, а также препятствовать нарушению структуры *zona pellucida* (Seshagiri, Bavister, 1989; Ludwig et al., 2001).

Преимплантационные эмбрионы мышей и других видов млекопитающих развиваются в атмосфере, состоящей из 95% воздуха и 5% углекислого газа. Это стандартные условия культивирования *in vitro* (Genbacev et al., 1996; Amstislavsky et al., 2000). Энергетический обмен в клетках преимплантационного эмбриона идет по пути гликолиза, то есть без участия кислорода, а присутствие

в среде последнего оказывает повреждающее действие на клетки эмбриона и угнетает его развитие (McKiernan, Bavister, 1990). Более того образование свободных радикалов зависит от содержания кислорода в атмосфере закрытого сосуда, в котором происходит культивирование, что оказывает большое влияние на развивающиеся эмбрионы (Leese, 2012). При культивировании преимплантационных эмбрионов некоторых видов млекопитающих и человека иногда используют мультигазовые смеси, регулируя содержание в ней не только углекислого газа, но и кислорода, причем показано, что снижение содержания кислорода способствует лучшему развитию эмбрионов (Vajta et al., 2000; Santos et al., 2013).

Более подробно об истории создания культуральных сред, принципах используемых при их отборе и усовершенствовании, а также о современных тенденциях в этой области можно узнать из соответствующих обзорных статей (Summers, Biggers, 2003; Lane, Gardner, 2007; Smith et al., 2012).

ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЭМБРИОНОВ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

При культивировании эмбрионов млекопитающих необходимо учитывать видовую специфику (Amstislavsky et al., 2012). Существенные различия наблюдаются при культивировании зародышей даже таких близкородственных видов лабораторных животных, как мыши (Summers, Biggers, 2003; Popova et al., 2011), крысы (Miyoshi et al., 1997; Han, Niwa, 2003) и хомячки (Barnett, Bavister, 1996; Ludwig et al., 2001). Для работы с эмбрионами мышей часто применяют такие среды, как BWW, M16, среда 199, KSOM, хотя эмбрионы мыши способны развиваться и во многих других средах (Biggers et al., 1971; Gardner, Leese, 1990; Summers, Biggers, 2003; Честков и др., 2010). Если эмбрионы мышей могут развиваться и на самых простых культуральных средах (Taft, 2008), то для культивирования эмбрионов таких видов как крысы (Miyoshi et al., 1997), хомячки (Kane, Bavister, 1988) и некоторых других млекопитающих (Herrick et al., 2007) со стадии зиготы до морулы желательно наличие в среде аминокислот, нуклеотидов и витаминов.

Для создания питательных сред различных видов лабораторных животных используют преимущественно принцип “let the embryo choose”. Это можно проиллюстрировать на истории создания сред для культивирования эмбрионов хомячков. При культивировании зародышей этого вида млекопитающих на средах, предназначенных для мышей, происходят блоки их развития на стадии

2-х и 4-х бластомеров (Schini, Bavister, 1988). Полный блок развития возникает при одновременном присутствии в питательной среде глюкозы и фосфатов, однако, среда с глюкозой, но без фосфатов оказывает угнетающее действие на развивающиеся эмбрионы хомячков гораздо меньше (Schini, Bavister, 1988).

Пользуясь принципом “let the embryo choose”, из среды для развития зародышей хомячков полностью удалили фосфаты, а содержание глюкозы существенно снизили, таким образом, появилась среда HECM-1 (hamster embryo culture medium) специально предназначенная для культивирования зародышей этого вида млекопитающих (Schini, Bavister, 1988; McKiernan, Bavister, 1990). Впоследствии, путем модификации, были получены различные модификации этой среды. Среда HECM-1, HECM-2 и HECM-4 содержат пируват, аминокислоты, витамины и ПВС, что благоприятно сказывается на развитии эмбрионов хомячка (McKiernan, Bavister, 1990; Barnett, Bavister, 1996). Среда HECM-9 содержит в своем составе, помимо перечисленных компонентов, таурин, который выполняет функцию осмолита, а также быть использован эмбрионами в качестве регулятора энергетического обмена, при этом появляется возможность снизить содержание глюкозы в среде (Ludwig et al., 2001). Людвиг с соавторами (Ludwig et al., 2001) также показали, что в качестве энергетического субстрата при культивировании зародышей хомячков фруктоза предпочтительней, чем глюкоза, что соответствует более ранним выводам о блокирующем влиянии глюкозы на развитие эмбрионов этого вида животных (Schini, Bavister, 1988).

Исторически проблему культивирования зародышей крыс системно начали решать позже, чем проблему культивирования эмбрионов хомячков. Оказалось, что среды, которые используют для культивирования зародышей мышей, не подходят для крыс. В среде M16, например, удается культивировать эмбрионы крыс со стадии зиготы до стадии 2-х клеток, после чего возникает блок и дальнейшего развития не происходит (Popova et al., 2011). Негативное влияние, вызывающее полную остановку развития эмбрионов крыс и хомячков, оказывают фосфаты, присутствующие во всех питательных средах, основанных на солевых растворах Эрла, Кребса—Рингера и Тирода (Miyoshi et al., 1997; Zhou et al., 2003). Полное удаление фосфатов из среды и снижение в ней содержания глюкозы способствует снятию блока с развивающихся эмбрионов крыс (Zhang, Armstrong, 1990). Исходя из этого, на основе раствора Кребса—Рингера была создана специализированная среда R1ECM (Miyoshi et al., 1995) и впо-

следствии ее модификация (mRIECM) (Miyoshi et al., 1997).

При культивировании зародышей крыс со стадии дробления до поздней бластоцисты эмбрионы активно потребляют не только глюкозу, но и пируват в качестве энергетического субстрата (Brison, Leese, 1991). Причем пируват интенсивно потребляется дробящимися зародышами до морулы, а глюкоза — со стадии морулы до образования бластоцисты, особенно в период формирования бластоцеля (Brison, Leese, 1991; Lane, Gardner, 2007). Добавленные в питательную среду свободные аминокислоты могут использоваться клетками эмбриона в качестве энергетического ресурса, что позволяет удалить из среды глюкозу (Zhang, Armstrong, 1990). При снижении концентрации глюкозы в культуральной среде понижается синтез лактата, что приводит к улучшению характеристик развития эмбрионов крыс на стадии образования бластоцисты (Brison, Leese, 1991).

Некой общей возможностью для культивирования *in vitro* преимплантационных эмбрионов мышей, крыс и хомячков является модифицированный раствор Кребса–Рингера, из которого удалены фосфаты (Niwa et al., 1980). Эта успешная попытка выполненная более 30 лет назад является хорошей основой для создания универсальной среды для культивирования всех трех перечисленных выше видов грызунов. Однако это направление еще нуждается в дальнейших экспериментах. Тем не менее, анализ литературы и наш собственный опыт свидетельствует о том, что модифицированная среда R1ECM изначально созданная для культивирования преимплантационных эмбрионов крыс, может рассматриваться в качестве “универсальной”, так как на этой среде успешно развиваются как эмбрионы мышей и крыс (Porova et al., 2011; Рагаева и др., 2013), так и эмбрионы хомячков Джунгарского (Брусенцев и др., 2013) и Кэмпбелла (Amstislavsky et al., 2013).

Исследования по культивированию преимплантационных эмбрионов проводят и на других видах млекопитающих, таких как куны (Amstislavsky et al., 2000; Amstislavsky et al., 2012), кошачьи (Herrick et al., 2007), псовые (Lindeberg et al., 1993; Luvoni et al., 2006), КРС (Sugimura et al., 2012), приматы (Tkachenko et al., 2010) и другие. В основном, для подбора питательных сред, в данных случаях, используют принцип “let the embryo choose”. Все эти материалы, полученные на “животных–моделях”, учитываются и при создании сред для культивирования эмбрионов человека. Однако подробное рассмотрение сред применяющихся по отношению к зародышам человека выходит за рамки данной статьи.

ЭФФЕКТЫ СУБОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ НА ФОРМИРОВАНИЕ ФЕНОТИПА РОЖДЕННЫХ ОСОБЕЙ

Отдаленные эффекты воздействия факторов роста на стадии преимплантационного эмбриона на постнатальный онтогенез изучены крайне скудно. Культивирование эмбрионов *in vitro* в субоптимальных условиях, согласно концепции: “stress-response models” (Leese, 2012), приводит к отклонениям в росте, специфическим аномалиям в течение фетального и постнатального развития (Bavister, 1995; Grace, Sinclair, 2009). При трансплантации эмбрионов овец и КРС после их культивирования *in vitro* обнаружен “синдром больших новорожденных”, главная характеристика которого — повышенный фетальный рост, из-за чего при рождении такие телята и ягнята имеют большую массу, по сравнению с контролем (Young et al., 1998). На более поздних этапах онтогенеза характеристики роста выравнивались, но некоторые органы имели непропорционально большой вес (McEvoy et al., 2001). Питательные среды, с которыми связывали появление синдрома больших новорожденных, различались, однако, в большинстве из них присутствовала фетальная сыворотка (McEvoy et al., 2001).

Мыши, полученные из преимплантационных эмбрионов культивированных *in vitro* в субоптимальных условиях со стадии 8-ми клеток до бластоцисты, имели, наоборот, меньшую массу по сравнению с контролем (Bowman, McLaren, 1970). Кроме того, многочисленные исследования влияния культуральных сред на развитие эмбрионов мыши выявили нарушения экспрессии генов (Khosla et al., 2001; Fernandez-Gonzalez et al., 2004), изменение метаболизма эмбриона и снижение числа клеток в бластоцисте (Fleming et al., 2004; Sjöblom et al., 2005), а также долгосрочные изменения, затрагивающие фетальный/постнатальный рост, размер органов, структуру сердца, количество нейронов (Khosla et al., 2001; Calle et al., 2012) и поведение (Ecker et al., 2004). В результате всех этих изменений у мышей, полученных после культивирования эмбрионов *in vitro*, на определенных этапах постнатального онтогенеза наблюдалось повышенное кровяное давление, другие сердечно-сосудистые заболевания (Watkins, Fleming, 2009), ожирение (Calle et al., 2012), возрастание тревожности и недостаток памяти (Fernandez-Gonzalez et al., 2004).

Таким образом, результаты экспериментов на лабораторных и сельскохозяйственных животных указывают на связь между ранним эмбриональным развитием и постнатальным здоровьем. Хотя механизмы, реализующие эту связь, остаются не

вполне ясными, одной из возможных причин может быть то, что эмбрионы не получают некоторых необходимых сигналов (в виде ростовых факторов, цитокинов и т.д.) во время культивирования *in vitro*, что приводит к нарушению регуляции экспрессии генов (Loneragan et al., 2003) и отклонениям в ходе пренатального и постнатального онтогенеза, что сказывается на формировании фенотипа (Robertson, 2007).

Другим следствием, помимо изменений фенотипа, является низкая частота имплантации эмбрионов млекопитающих и человека после их культивирования *in vitro* в субоптимальных условиях и последующей трансплантации. Низкая частота имплантации эмбрионов представляется в качестве основной проблемы программы ЭКО, так как, в большинстве случаев, лишь 10–30% трансплантированных эмбрионов человека успешно имплантируется (Hardy, Spanos, 2002).

В настоящее время появляются сведения по оптимизации сред предназначенных для ЭКО и последующего культивирования зародышей человека, в том числе и с использованием факторов роста. Более того, уже накопилось много экспериментальных результатов, полученных на различных видах млекопитающих, свидетельствующих о том, что изменение физических условий культивирования, либо добавление в культуральную среду гормонально активных компонентов, прежде всего – ростовых факторов, может существенно оптимизировать развитие преимплантационных эмбрионов *in vitro*. Эти новые подходы и приемы, призванные улучшить условия развития зародышей вне организма, описаны в следующем разделе данного обзора.

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ОПТИМИЗАЦИИ УСЛОВИЙ РАЗВИТИЯ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ *IN VITRO*

На разных видах млекопитающих показано, что культивирование эмбрионов в группе оказывает благотворное воздействие на преимплантационное развитие в условиях *in vitro* (Paria, Dey, 1990; Spindler, Wildt, 2002). Зародыши кошек хорошего или отличного качества и, особенно, поздних стадий преимплантационного развития существенным образом стимулировали дробящиеся эмбрионы этого же вида млекопитающих при совместном культивировании в условиях *in vitro* (Spindler, Wildt, 2002). Интересно, что совместное культивирование эмбрионов кошек с эмбрионами других видов, в частности мышей и КРС тоже оказывало позитивное действие, несмотря на то, что все три перечисленных вида относятся к раз-

ным отрядам млекопитающих (Spindler et al., 2006). Авторы связывают улучшение характеристик развития эмбрионов при совместном культивировании их в группе с воздействием выделяемых каждым эмбрионом ростовых факторов. Имеются и прямые экспериментальные подтверждения, что эти факторы оказывают стимулирующее влияние на зародышевое развитие в условиях *in vitro*.

Добавление факторов роста в питательную среду может оказывать позитивное влияние на развитие эмбрионов различных видов млекопитающих и повышать частоту имплантации эмбрионов (Seshagiri et al., 2002; Aflalo et al., 2007; Jessmon et al., 2009). Каждый из ростовых факторов воздействует на соответствующие рецепторы, появляющиеся на разных стадиях развития эмбриона, причем некоторые из них воздействуют как на сами эмбрионы, так и на рецепторы репродуктивных путей (Hardy, Spanos, 2002). По своему химическому составу все факторы роста являются пептидами либо небольшими молекулами глобулярных белков, которые можно отнести к цитокинам или гормонам. Классификация и свойства факторов роста, их эффекты на различные органы млекопитающих подробно описаны в соответствующих обзорных статьях (Gerwin et al., 1995; Стойка и др., 2004; Robertson, 2007; Jessmon et al., 2009; Singh et al., 2011). В данной работе мы ограничимся лишь эффектами ростовых факторов непосредственно на преимплантационные эмбрионы млекопитающих и на органы репродуктивной системы.

Преимущественно в исследованиях на мышах, золотистых хомячках, крысах и человеке, продемонстрировано, что многие ростовые факторы ускоряют развитие дробящихся преимплантационных эмбрионов в культуре *in vitro* (таблица). Следует, однако отметить, что влияние этих факторов проявляется в определенных дозах, причем если в оптимальных концентрациях они действуют стимулирующе, то при воздействии субоптимальных доз эффект не наблюдается либо даже может иметь место угнетение развития ранних зародышей (Elaimi et al., 2012). Несмотря на то, что все перечисленные в таблице ростовые факторы в той или иной мере стимулируют развитие преимплантационных эмбрионов *in vitro*, имеются индивидуальные особенности их воздействия.

Рецепторы к факторам роста появляются у разных видов млекопитающих на тех или иных стадиях развития эмбриона (Hardy, Spanos, 2002; Стойка и др., 2004). Например, у человека рецепторы к EGF (epidermal growth factor) и TGF- β (transforming growth factors) появляются уже на

Эффекты отдельных ростовых факторов на развитие эмбрионов лабораторных животных и их имплантацию

Название фактора добавляемого в культуральную среду	Эффекты на развитие зародышей	Вид животных	Ссылки
Цитокины			
<i>Группа воспалительных цитокинов</i>			
Лейкемия—ингибирующий фактор (LIF)	1. Влияет на скорость развития преимплантационных эмбрионов в культуре <i>in vitro</i> до стадии бластоцисты;	человек хомячки	Dunglison et al., 1996 Seshagiri et al., 2002
	2. Способствует хэтчингу и имплантации эмбрионов;	человек	Dunglison et al., 1996
	3. Снижает число резорбированных плодов после трансплантации самке—реципиенту	мыши	Lavranos et al., 1995
Фактор некроза опухолей α (TNF- α)	1. Влияет на скорость развития преимплантационных эмбрионов в культуре <i>in vitro</i> до стадии бластоцисты;	мыши	Gerwin et al., 1995
	2. Способствует клеточной дифференцировке во время эмбриогенеза;	мыши	Gerwin et al., 1995
	3. Усиливает процессы апоптоза в бластоцисте	мыши	Pampfer et al., 1997
<i>Группа противовоспалительных цитокинов</i>			
Эпидермальный фактор роста (EGF)	1. Влияет на скорость развития преимплантационных эмбрионов в культуре <i>in vitro</i> до стадии бластоцисты;	мыши	Paria, Dey, 1990; Dadi et al., 2007
	2. Способствует формированию и росту ВКМ в бластоцисте;	мыши	Desai et al., 2007
	3. Способствует хэтчингу и имплантации эмбрионов	хомячки крысы мыши	Seshagiri et al., 2002 Aflalo et al., 2007 Morita et al., 1994
Гепарин—связывающий эпидермальный фактор роста (НВ—EGF)	1. Влияет на скорость развития преимплантационных эмбрионов в культуре <i>in vitro</i> до стадии бластоцисты;	человек	Martin et al., 1998
	2. Способствует хэтчингу и имплантации эмбрионов;	хомячки мыши	Seshagiri et al., 2002; Das et al., 1994; Lim, Dey, 2009
	3. Благоприятно влияет на образование контактов между клетками эндометрия и трофобласта	человек крысы мыши	Jessmon et al., 2009 Jessmon et al., 2009 Jessmon et al., 2009
Трансформирующий фактор роста α (TGF- α)	1. Влияет на скорость развития преимплантационных эмбрионов в культуре <i>in vitro</i> до стадии бластоцисты;	мыши хомячки КРС	Paria, Dey, 1990 Seshagiri et al., 2002 Larson et al., 1992
	2. Нормализует образование бластоцеля;	мыши	Dardik, Schultz, 1991
	3. Повышает синтез белка в трофэктодерме бластоцисты;	мыши	Dardik et al., 1992
	4. Предохраняет бластомеры от апоптоза;	мыши	Brison, Schultz, 1997
	5. Способствует хэтчингу и имплантации эмбрионов	мыши	Singh et al., 2011
Трансформирующий фактор роста β (TGF- β)	1. Влияет на скорость развития преимплантационных эмбрионов в культуре <i>in vitro</i> до стадии бластоцисты (в комбинации с другими факторами);	мыши хомячки	Paria, Dey, 1990 Seshagiri et al., 2002
	2. Способствует хэтчингу и имплантации эмбрионов	человек	Austgulen et al., 1995

Таблица. Окончание

Название фактора добавляемого в культуральную среду	Эффекты на развитие зародышей	Вид животных	Ссылки
<i>Группа регуляторов иммунитета</i>			
Гранулоцитарно—макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF)	1. Влияет на скорость развития преимплантационных эмбрионов в культуре <i>in vitro</i> до стадии бластоцисты; 2. Способствует формированию и росту ВКМ в бластоцисте; 3. Усиливает транспорт глюкозы в клетки эмбриона; 4. Предохраняет бластомеры от апоптоза; 5. Способствует хэтчингу и имплантации эмбрионов; 6. Нормализует вес потомства при рождении после трансплантации полученных в результате культивирования <i>in vitro</i> эмбрионов	мыши человек КРС мышь человек мыши мыши человек мыши человек мыши	Robertson et al., 2001; Elaimi et al., 2012 Sjöblom et al., 1999; 2002 De Moraes, Hansen, 1997 Desai et al., 2007 Sjöblom et al., 1999; 2002 Robertson et al., 2001 Behr et al., 2005 Sjöblom et al., 2002 Robertson et al., 2001 Sjöblom et al., 1999 Sjöblom et al., 2005
Гормоны			
Инсулиноподобный фактор роста I (IGF-I)	1. Влияет на скорость развития преимплантационных эмбрионов в культуре <i>in vitro</i> до стадии бластоцисты; 2. Способствует формированию и росту ВКМ в бластоцисте; 3. Предохраняет бластомеры от апоптоза	мыши мыши кролики	Desai et al., 2000 Rappolee et al., 1992 Herrler et al., 1998
Инсулиноподобный фактор роста II (IGF-II)	1. Влияет на скорость развития преимплантационных эмбрионов в культуре <i>in vitro</i> до стадии бластоцисты; 2. Способствует формированию и росту ВКМ в бластоцисте; 3. Повышает синтез белка в трофэктодерме бластоцисты	мыши мыши мыши	Desai et al., 2000; Rappolee et al., 1992 Harvey, Kaye, 1992 Rappolee et al., 1992
Инсулин	1. Влияет на скорость развития преимплантационных эмбрионов в культуре <i>in vitro</i> до стадии бластоцисты; 2. Способствует формированию и росту ВКМ в бластоцисте; 3. Повышает синтез белка в трофэктодерме бластоцисты; 4. Усиливает транспорт глюкозы в клетки эмбриона	мыши мыши мыши мыши	Harvey, Kaye, 1990 Harvey, Kaye, 1990 Harvey, Kaye, 1988 Kaye et al., 1992
β -эндорфин	1. Влияет на скорость развития преимплантационных эмбрионов в культуре <i>in vitro</i> до стадии бластоцисты; 2. Снижает количество аномально развивающихся бластоцист	мыши мыши	Чернов и др., 2012 Чернов и др., 2012

стадии ооцита (Normanno et al., 2001; Hardy, Spanos, 2002). Экспрессия мРНК рецепторов к инсулину и инсулиноподобным факторам IGF-I, IGF-II (insulin like growth factors) а также к TNF (tumor necrosis factor) начинается на ранних стадиях дробления зародыша (Hardy, Spanos, 2002), хотя сами рецепторы (по крайней мере, IGF-I), появляются лишь на стадии бластоцисты. В то же время экспрессия мРНК рецепторов к LIF (leukemia inhibitory factor) в эмбрионах человека начинается лишь на стадии бластоцисты (Hardy, Spanos, 2002). Появление рецепторов к ростовым факторам на преимплантационных стадиях развития эмбрионов млекопитающих имеет большое функциональное значение, поскольку факторы роста влияют на развитие эмбрионов и многие важные процессы, такие как апоптоз и имплантация (Dunlison et al., 1996; Behr et al., 2005; Sjöblom et al., 2002; Стойка и др., 2004; Dadi et al., 2007).

Воздействие различных ростовых факторов на некоторые процессы, происходящие во время преимплантационного развития млекопитающих, может быть диаметрально противоположным. Так, например, для развивающихся эмбрионов млекопитающих, в частности мышей (Handyside, Hanter, 1986) и человека (Hardy et al., 1989), характерно то, что, начиная со стадии бластоцисты, наблюдаются процессы апоптоза отдельных бластомеров. На преимплантационных зародышах мыши, кролика и человека продемонстрировано, что добавление в культуральную среду таких факторов, как GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), IGF-I или TGF- α приводило к уменьшению процессов апоптоза (Brison, Schultz, 1997; Herrler et al., 1998; Sjöblom et al., 2002; Behr et al., 2005). В то же время, добавление TNF- α , напротив, приводило к усилению процессов апоптоза в преимплантационных эмбрионах мыши (Pampfer et al., 1997). На эмбрионах мыши также продемонстрировано, что TGF- α способствовал синтезу белка в преимплантационных эмбрионах (Dardik et al., 1992), а инсулин и GM-CSF усиливают транспорт глюкозы (Kaye et al., 1992; Robertson et al., 2001).

Некоторые из ростовых факторов влияют как на собственно развивающийся эмбрион, так и на слизистую матки, способствуя процессу имплантации. Так, например, цитокин LIF ускоряет развитие эмбрионов мыши, начиная со стадии 8-ми бластомеров и до стадии вылупившейся бластоцисты (Lavranos et al., 1995); увеличивает долю вылупившихся бластоцист при культивировании эмбрионов *in vitro* и повышает частоту имплантации (Dunlison et al., 1996; Seshagiri et al., 2002). Рецепторы к этому фактору обнаружены не только в преимплантационных зародышах, но и в мат-

ке (Hardy, Spanos, 2002). Таким образом, LIF способствует имплантации, воздействуя как на развивающиеся эмбрионы, так и на репродуктивные пути (Laird et al., 1997; Dimitriadis et al., 2010). Аналогичным стимулирующим эффектом на развитие эмбрионов млекопитающих на стадии бластоцисты, а именно, на хэтчинг (вылупление) и имплантацию обладают такие факторы, как EGF, HB-EGF, TGF- α , TGF- β и GM-CSF (Austgulen et al., 1995; De Moraes, Hansen, 1997; Robertson et al., 2001; Seshagiri et al., 2002; Singh et al., 2011). Два из перечисленных факторов, а именно EGF и TGF- α также способствуют формированию бластоцеля (Dardik, Schultz, 1991; Larson et al., 1992). Инсулин и инсулиноподобные ростовые факторы (IGF-I, IGF-II), а также EGF и GM-CSF благотворно влияют на формирование и рост внутренней клеточной массы (ВКМ) бластоцисты (Harvey, Kaye, 1988; 1990; 1992; Rappolee et al., 1992; Sjöblom et al., 1999; 2002; Desai et al., 2000; 2007). Экспериментально показано, что воздействие EGF при культивировании преимплантационных эмбрионов *in vitro* повышает долю имплантирующихся зародышей как мышей (Morita et al., 1994), так и крыс (Aflalo et al., 2007). HB-EGF также играет важнейшую роль в имплантации эмбрионов (Das et al., 1994; Lim, Dey, 2009), способствуя образованию контактов между клетками эндометрия и трофобласта (Jessmon et al., 2009).

Воздействие факторов роста в ходе культивирования зародышей млекопитающих *in vitro* может влиять на фенотип рожденных из этих зародышей потомков. В частности, GM-CSF способен оказывать воздействие на вес и развитие новорожденных (Sjöblom et al., 2005; Robertson, 2007) и корректировать некоторые негативные эффекты культивирования эмбрионов *in vitro* в субоптимальных условиях. Вес потомства полученного в результате трансплантации зародышей мышей развивавшихся в среде *in vitro* был ниже, чем в контроле. Однако добавление в питательную среду GM-CSF существенным образом смягчало эти эффекты (Sjöblom et al., 2005).

В связи с открытием влияния ростовых факторов на развивающиеся эмбрионы, особое внимание уделяется объему среды, в котором происходит их культивирование. В специальных исследованиях было показано, что скорость развития дробящихся зародышей до стадии морулы и бластоцисты различна при культивировании в каплях питательной среды разного объема (Paria, Dey, 1990; Lane, Gardner, 1992). При этом было показано, что уменьшение до определенного предела объема капли, в которой находятся зародыши в процессе культивирования *in vitro*, способ-

ствует более активному их развитию (Lane, Gardner, 1992).

На основании этих наблюдений Габором Вайта была предложена так называемая WOW (well of the well) система для оптимизации культивирования эмбрионов, которая представляет собой чашку Петри, с выплавленными на ее дне микроскопическими лунками, в которые помещают эмбрионы для культивирования (Vajta et al., 2000; 2008). Было подтверждено, что при культивировании эмбрионов КРС с применением данного метода, увеличивался процент развившихся бластоцист, снижался уровень апоптоза и возрастал процент имплантировавшихся зародышей (Vajta et al., 2000; Sugimura et al., 2010). В работе на свиньях показано, что применение WOW системы способствовало развитию эмбрионов после процедур дозревания яйцеклеток *in vitro* и последующего их оплодотворения при помощи метода ICSI (Taka et al., 2005). Эффективность этой системы была подтверждена и при проведении ЭКО и последующем культивировании эмбрионов человека (Vajta et al., 2008). Другим подходом к культивированию эмбрионов в малых объемах среды является так называемая система “стеклянный яйцевод” (GO – glass oviduct), суть которой состоит в том, что культивирование происходит в тонком стеклянном капилляре; при этом также улучшаются характеристики развития зародышей (Thouas et al., 2003).

В последние годы интенсивно развивается совершенно новое направление при культивировании эмбрионов и ооцитов, а именно: изучение физических факторов таких, как механические взаимодействия, градиент диффузии, движение эмбриона в среде и поверхностные эффекты, которые могут влиять на развитие зародыша в культуре (Smith et al., 2012). Выяснилось, что состав поверхности, на которой находятся эмбриональные клетки, оказывает большое влияние на их развитие (Villa-Diaz et al., 2010). Появляются работы, в которых описаны положительные эффекты при культивировании эмбрионов и ооцитов на специально разработанных динамических платформах и в матриксах, которые помогают осуществлять различные манипуляции с микроокружением эмбриона или ооцита в культуре (Smith et al., 2012). К динамическим системам относятся поверхности с вибрацией, с наклоном и контролируемым потоком жидкости, а также специализированные шейкеры и ротаторы (Smith et al., 2012). Отдельно следует отметить попытки создания пространственного окружения эмбрионов и ооцитов при культивировании их в трехмерных матриксах, созданных, в частности, на основе гидрогелей (Xu et al., 2006).

Применение описанных выше технологических приемов, основанных на знании физических и биологических основ развития эмбрионов в культуре *in vitro*, позволяет увеличить эффективность этих методов применительно к лабораторным животным (Стойка и др., 2004; Smith et al., 2012), и дает новые возможности при работе с экзотическими и исчезающими видами млекопитающих (Amstislavsky et al., 2012; Брусенцев и др., 2013).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Рожкову И.Н., Рагаеву Д.С., Абрамову Т.О., Галустян Е.А. за высказанные замечания по написанию данного манускрипта, а Мошкина М.П. и Напримерова В.А. за обсуждение идей лежащих в основе данной работы.

Работа выполнена при поддержке РФФИ № 13-04-00685, а также проекта РАН № 30.1 программы “Биоразнообразие”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Амстиславский С.Я. Репродуктивная биология и эмбриотехнология млекопитающих // LAP LAMBERT Academic Publishing, Saarbrücken, Germany. 2011. 284 с.
- Амстиславский С.Я., Трушкин И.С. Криобанк эмбрионов млекопитающих: выбор приоритетов и оптимальных репродуктивных технологий // Онтогенез. 2010. № 1. С. 19–31.
- Брусенцев Е.Ю., Рожкова И.Н., Абрамова Т.О., Амстиславский С.Я. Криоконсервация эмбрионов джунгарского хомячка (*Phodopus sungorus*) и влияние факторов роста на их последующее развитие // III ежегодная конференция специалистов по работе с лабораторными животными. Новосибирск, 2013. С. 13.
- Рагаева Д.С., Брусенцев Е.Ю., Рожкова И.Н. и др. Криоконсервация и культивирование эмбрионов гипертензивных крыс НИСАГ: физиологические и поведенческие эффекты // III ежегодная конференция специалистов по работе с лабораторными животными. Новосибирск, 2013. С. 40.
- Рожкова И.Н., Брусенцев Е.Ю., Амстиславский С.Я. Оболочки преимплантационных зародышей млекопитающих как мишень репродуктивных технологий // Онтогенез. 2012. № 5. С. 1–11.
- Стойка Р.С., Панчук Р.Р., Стойка Б.Р. Полипептидные факторы роста в процессах эмбрионального развития и опухолевого роста // Онтогенез. 2004. Т. 35. № 4. С. 254–272.
- Чернов А.С., Давыдова Г.А., Ковалицкая Ю.А. Исследование неопиоидной рецепции β -эндорфина в доимплантационном развитии эмбрионов мыши *in vitro* // Биоорганическая химия. 2012. Т. 38. № 2. С. 206–213.

- Честков В.В., Мартынов А.В., Калинина Е.С., Щепкина Ю.В. Питательные среды для ЭКО: сравнение роли основных компонент // Проблемы репродукции. 2010. № 3. С. 53–56.
- Aflalo E.D., Sod-Moriah U.A., Potashnik G., Har-Vardi I. EGF increases expression and activity of PAs in preimplantation rat embryos and their implantation rate // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2007. 5:4.
- Amstislavsky S., Brusentsev E., Rozhkova I., Igonina T. Cryopreservation of Campbell's dwarf hamster embryos as a model for exotic hamster species cryobanking // *Proceedings of 9th International Conference on Behaviour, Physiology and Genetics of Wildlife*. Ed.: Schumann A., Watcher B., Ortmann S., Hofer H. 18th–21th September 2013, Berlin, Germany, Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research. P. 22.
- Amstislavsky S., Lindeberg H., Luvoni G.C. Reproductive technologies relevant to the genome resource bank in carnivora // *Reprod. Dom. Anim.* 2012. V. 47. P. 164–175.
- Amstislavsky S., Lindeberg H., Jarvinen M. et al. Ex-situ preservation of Mustelidae: primer of application of genetic resource bank concept with the use of polecats as the model species // *Scientifur*. 2000. V. 24. P. 45–58.
- Austgulen R., Arntzen K.J., Vatten L.J. et al. Detection of cytokines (interleukin-1, interleukin-6, transforming growth factor- β) and soluble tumour necrosis factor receptors in embryo culture fluids during in-vitro fertilization // *Hum. Reprod.* 1995. V. 10. № 1. P. 171–176.
- Barker D.J. Fetal origins of coronary heart disease // *BMJ*. 1995. V. 311. P. 171–174.
- Barnett D.K., Bavister B.D. Inhibitory effect of glucose and phosphate on the second cleavage division of hamster embryos: is it linked to metabolism? // *Hum. Reprod.* 1996. V. 11. № 1. P. 177–183.
- Bateson P., Barker D., Clutton-Brock T., Deb D. et al. Developmental plasticity and human health // *Nature*. 2004. V. 430. P. 419–421.
- Baumann C.G., Morris D.G., Sreenan J.M., Leese H.J. The quiet embryo hypothesis: molecular characteristics favoring viability // *Mol. Reprod. and Devel.* 2007. V. 74. P. 1345–1353.
- Bavister B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts // *Hum. Reprod. Update*. 1995. V. 1. № 2. P. 91–148.
- Bavister B.D., Leibfried M.L., Lieberman G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium // *Biol. Reprod.* 1983. V. 28. № 1. P. 235–247.
- Behr B., Mooney S., Wen Y. et al. Preliminary experience with low concentration of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: a potential regulator in preimplantation mouse embryo development and apoptosis // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2005. V. 22. № 1. P. 25–32.
- Biggers J.D., Whitten W.K., Whittingham D.G. The culture of mouse embryos *in vitro* // *Methods in Mammalian Embryology*. 1971. P. 86–116.
- Bowman P., McLaren A. Viability and growth of mouse embryos after *in vitro* culture and fusion // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1970. V. 23. № 3. P. 693–704.
- Brison D.R., Schultz R.M. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha // *Biol. Reprod.* 1997. V. 56. № 5. P. 1088–1096.
- Brison D.R., Leese H.J. Energy metabolism in late preimplantation rat embryos // *J. Reprod. Fertil.* 1991. V. 93. № 1. P. 245–251.
- Calle A., Fernandez-Gonzalez R., Ramos-Ibeas P. et al. Long-term and transgenerational effects of *in vitro* culture on mouse embryos // *Theriogenology*. 2012. V. 77. № 4. P. 785–793.
- Choe C., Shin Y.W., Kim E.J. et al. Synergistic effects of glutathione and β -mercaptoethanol treatment during *in vitro* maturation of porcine oocytes on early embryonic development in a culture system supplemented with L-cysteine // *J. Reprod. Dev.* 2010. V. 56. № 6. P. 575–582.
- Dadi T.D., Li M.W., Lloyd K.C. EGF and TGF- α supplementation enhances development of cloned mouse embryos // *Cloning. Stem. Cells*. 2007. V. 9. № 3. P. 315–326.
- Dardik A., Smith R.M., Schultz R.M. Colocalization of transforming growth factor- α and a functional epidermal growth factor receptor (EGFR) to the inner cell mass and preferential localization of the EGFR on the basolateral surface of the trophectoderm in the mouse blastocyst // *Dev. Biol.* 1992. V. 154. № 2. P. 396–409.
- Dardik A., Schultz R.M. Blastocoel expansion in the preimplantation mouse embryo: stimulatory effect of TGF- α and EGF // *Development*. 1991. V. 113. № 3. P. 919–930.
- Das S.K., Wang X.N., Paria B.C. et al. Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporarily by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation // *Development*. 1994. V. 120. № 5. P. 1071–1083.
- De Moraes A.A., Hansen P.J. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes development of *in vitro* produced bovine embryos // *Biol. Reprod.* 1997. V. 57. № 5. P. 1060–1065.
- Desai N., Kattal N., AbdelHafez F.F. et al. 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.
- Dimitriadis E., Nie G., Hannan N. et al. Local regulation of implantation at the human fetal-maternal interface // *Internat. J. Devel. Biol.* 2010. V. 54. P. 313–322.
- Dunghlison G.F., Barlow D.H., Sargent I.L. Leukaemia inhibitory factor significantly enhances the blastocyst forma-

- tion rates of human embryos cultured in serum-free medium // *Hum. Reprod.* 1996. V. 11. № 1. P. 191–196.
- Ecker D.J., Stein P., Xu Z. et al.* Long-term effects of culture of preimplantation mouse embryos on behavior // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 6. P. 1595–1600.
- Elaimi A., Gardner K., Kistnareddy K., Harper J.* The effect of GM-CSF on development and aneuploidy in murine blastocysts // *Hum. Reprod.* 2012. V. 27. № 6. P. 1590–1595.
- Fernandez-Gonzalez R., Moreira P., Bilbao A. et al.* 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. V. 101. № 16. P. 5880–5885.
- Fleming T.P., Kwong W.Y., Porter R. et al.* The embryo and its future // *Biol. Reprod.* 2004. V. 71. № 4. P. 1046–1054.
- Gardner D.K., Leese H.J.* Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro* // *J. Reprod. Fertil.* 1990. V. 88. № 1. P. 361–368.
- Genbacev O., Joslin R., Damsky C.H. et al.* Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion *in vitro* and models the placental defects that occur in preeclampsia // *J. Clin. Invest.* 1996. V. 97. № 2. P. 540–550.
- Gerwin N., Jia G.Q., Kulbacki R., Gutierrez-Ramos J.C.* Interleukin gene expression in mouse preimplantation development // *Dev. Immunol.* 1995. V. 4. № 3. P. 169–179.
- Grace K.S., Sinclair K.D.* Assisted reproductive technology, epigenetics, and long-term health: a developmental time bomb still ticking // *Semin. Reprod. Med.* 2009. V. 27. № 5. P. 409–416.
- Graves J.E., Higdon H.L., Johnson J.E. et al.* Longevity of donor serum // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2004. V. 21. № 2. P. 51–53.
- Han M.S., Niwa K.* Effects of BSA and fetal bovine serum in culture medium on development of rat embryos // *J. Reprod. Dev.* 2003. V. 49. № 3. P. 235–242.
- Handyside A.H., Hunter S.* Cell division and death in the mouse blastocyst before implantation // *Roux's Arch. Dev. Biol.* 1986. V. 195. P. 519–526.
- Hansen M., Bower C., Milne E. et al.* Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects – a systematic review // *Hum. Reprod.* 2005. V. 20. № 2. P. 328–238.
- Hardy K., Handyside A.H., Winston R.M.* The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development *in vitro* // *Development.* 1989. V. 107. P. 597–604.
- Hardy K., Spanos S.* Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo // *J. Endocrinol.* 2002. V. 172. № 2. P. 221–236.
- Hare J.D., Morgan H.R.* Studies on the factors essential to the initiation and maintenance of multiplication of psittacosis virus (6BC strain) in deficient cells in tissue culture // *J. Exp. Med.* 1954. V. 99. № 5. P. 461–479.
- Harvey M.B., Kaye P.L.* IGF-2 stimulates growth and metabolism of early mouse embryos // *Mech. Dev.* 1992. V. 38. № 3. P. 169–173.
- Harvey M.B., Kaye P.L.* Insulin increases the cell number of the inner cell mass and stimulates morphological development of mouse blastocysts *in vitro* // *Development.* 1990. V. 110. № 3. P. 963–967.
- Harvey M.B., Kaye P.L.* Insulin stimulates protein synthesis in compacted mouse embryos // *Endocrinology.* 1988. V. 122. № 3. P. 1182–1184.
- Herrick J.R., Bond J.B., Magarey G.M. et al.* Toward a feline-optimized culture medium: impact of ions, carbohydrates, essential amino acids, vitamins, and serum on development and metabolism of *in vitro* fertilization-derived feline embryos relative to embryos grown *in vivo* // *Biol. Reprod.* 2007. V. 76. № 5. P. 858–870.
- Herrler A., Krusche C.A., Beier H.M.* Insulin and insulin-like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis // *Biol. Reprod.* 1998. V. 59. № 6. P. 1302–1310.
- Jessmon P., Leach R.E., Armant D.R.* Diverse functions of HBEGF during pregnancy // *Mol. Reprod. Dev.* 2009. V. 76. № 12. P. 1116–1127.
- Kane M.T., Bavister B.D.* Vitamin requirements for development of eight-cell hamster embryos to hatching blastocysts *in vitro* // *Biol. Reprod.* 1988. V. 39. № 5. P. 1137–1143.
- Kaye P.L., Bell K.L., Beebe L.F. et al.* Insulin and the insulin-like growth factors (IGFs) in preimplantation development // *Reprod. Fertil. Dev.* 1992. V. 4. № 4. P. 373–386.
- Khosla S., Dean W., Reik W., Feil R.* Culture of preimplantation embryos and its long-term effects on gene expression and phenotype // *Hum. Reprod. Update.* 2001. V. 7. № 4. P. 419–427.
- Laird S.M., Tuckerman E.M., Dalton C.F. et al.* The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture // *Hum. Reprod.* 1997. V. 12. P. 569–574.
- Lane M., Gardner D.K.* Embryo culture medium: which is the best? // *Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2007. V. 21. № 1. P. 83–100.
- Lane M., Gardner D.K.* Understanding cellular disruptions during early embryo development that perturb viability and fetal development // *Reproduction, Fertility, and Development.* 2004. V. 17. P. 371–378.
- Lane M., Gardner D.K.* Removal of embryo-toxic ammonium from the culture medium by *in situ* enzymatic conversion to glutamate // *J. Exp. Zool.* 1995. V. 271. № 5. P. 356–363.
- Lane M., Gardner D.K.* Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of mouse embryos *in vitro* // *Hum. Reprod.* 1992. V. 7. № 4. P. 558–562.

- Larson R.C., Ignatz G.G., Currie W.B. Platelet derived growth factor (PDGF) stimulates development of bovine embryos during the fourth cell cycle // *Development*. 1992. V. 115. № 3. P. 821–826.
- Lavranos T.C., Rathjen P.D., Seamark R.F. Trophic effects of myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF) on mouse embryos // *J. Reprod. Fertil.* 1995. V. 105. № 2. P. 331–338.
- Leese H.J. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on // *Reproduction*. 2012. V. 143. № 4. P. 417–427.
- Leese H.J. Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability // *Bioessays*. 2002. V. 24. P. 845–849.
- Lim H.J., Dey S.K. HB-EGF: a unique mediator of embryo–uterine interactions during implantation // *Exp. Cell. Res.* 2009. V. 315. № 4. P. 619–626.
- Lindeberg H., Jalkanen L., Savolainen R. *In vitro* culture of silver fox embryos // *Theriogenology*. 1993. V. 40. № 4. P. 779–788.
- Loneragan P., Rizos D., Gutiérrez-Adán A., Fair T., Boland M.P. Effect of culture environment on embryo quality and gene expression – experience from animal studies // *Reprod. Biomed. Online*. 2003. V. 7. № 6. P. 657–663.
- Ludwig T.E., Squirrell J.M., Palmenberg A.C., Bavister B.D. Relationship between development, metabolism, and mitochondrial organization in 2–cell hamster embryos in the presence of low levels of phosphate. *Biol. Reprod.* 2001. V. 65. № 6. P. 1648–1654.
- Luvoni G.C., Chigioni S., Beccaglia M. Embryo production in dogs: from *in vitro* fertilization to cloning // *Reprod. Domest. Anim.* 2006. V. 41. № 4. P. 286–290.
- Martin K.L., Barlow D.H., Sargent I.L. Heparin–binding epidermal growth factor significantly improves human blastocyst development and hatching in serum–free medium // *Hum. Reprod.* 1998. V. 13. № 6. P. 1645–1652.
- McEvoy T.G., Robinson J.J., Sinclair K.D. Developmental consequences of embryo and cell manipulation in mice and farm animals // *Reproduction*. 2001. V. 122. № 4. P. 507–518.
- McKiernan S.H., Bavister B.D. Environmental variables influencing *in vitro* development of hamster 2–cell embryos to the blastocyst stage // *Biol. Reprod.* 1990. V. 43. № 3. P. 404–413.
- Miyoshi K., Kono T., Niwa K. Stage–dependent development of rat 1–cell embryos in a chemically defined medium after fertilization *in vivo* and *in vitro* // *Biol. Reprod.* 1997. V. 56. № 1. P. 180–185.
- Miyoshi K., Abeydeera L.R., Okuda K., Niwa K. Effects of osmolarity and amino acids in a chemically defined medium on development of rat one–cell embryos // *J. Reprod. Fertil.* 1995. V. 103. № 1. P. 27–32.
- Morgan J.F., Morton H.J., Parker R.C. Nutrition of animal cells in tissue culture; initial studies on a synthetic medium // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1950. V. 73. № 1. P. 1–8.
- Morita Y., Tsutsumi O., Taketani Y. *In vitro* treatment of embryos with epidermal growth factor improves viability and increases the implantation rate of blastocysts transferred to recipient mice // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1994. V. 171. № 2. P. 406–409.
- Niwa K., Imai H., Kim C.I., Iritani A. Fertilization *in vitro* of hamster and mouse eggs in a chemically defined medium // *J. Reprod. Fertil.* 1980. V. 58. № 1. P. 109–114.
- Normanno N., Bianco C., De Luca A. et al. The role of the EGF–related peptides in tumor growth // *Front. Biosci.* 2001. V. 6. P. 685–707.
- Pampfer S., Vanderheyden I., McCracken J. et al. Increased cell death in rat blastocysts exposed to maternal diabetes in utero and to high glucose or tumor necrosis factor– α *in vitro* // *Development*. 1997. V. 124. P. 4827–4836.
- Paneth N., Susser M. Early origin of coronary heart disease (the “Barker hypothesis”) // *BMJ*. 1995. V. 310. P. 411–412.
- Paria B.C., Dey S.K. Preimplantation embryo development *in vitro*: cooperative interactions among embryos and role of growth factors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990. V. 87. № 12. P. 4756–4760.
- Parkening T.A., Cisneros P.L. Fertilization of Chinese hamster ova *in vitro* and *in vivo* and their subsequent development in culture // *Biol. Reprod.* 1988. V. 39. № 2. P. 409–418.
- Popova E., Bader M., Krivokharchenko A. Effect of culture conditions on viability of mouse and rat embryos developed *in vitro* // *Genes*. 2011. № 2. P. 332–344.
- Rappolee D.A., Sturm K.S., Behrendtsen O. et al. Insulin–like growth factor II acts through an endogenous growth pathway regulated by imprinting in early mouse embryos // *Genes. Dev.* 1992. V. 6. № 6. P. 939–952.
- Robertson S.A. GM–CSF regulation of embryo development and pregnancy // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007. V. 18. № 3. P. 287–298.
- Robertson S.A., Sjöblom C., Jasper M.J. et al. Granulocyte–macrophage colony–stimulating factor promotes glucose transport and blastomere viability in murine preimplantation embryos // *Biol. Reprod.* 2001. V. 64. № 4. P. 1206–1215.
- Sandin S., Nygren K.G., Iliadou A. et al. Autism and mental retardation among offspring born after *in vitro* fertilization // *JAMA*. 2013. V. 310. № 1. P. 75–84.
- Santos M.J., Gámiz P., Albert C. et al. Reduced oxygen tension improves embryo quality but not clinical pregnancy rates: a randomized clinical study into ovum donation cycles // *Fertil. Steril.* 2013. V. 100. № 2. P. 402–407.
- Schini S.A., Bavister B.D. Two–cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose // *Biol. Reprod.* 1988. V. 39. № 5. P. 1183–1192.
- Seshagiri P.B., Mishra A., Ramesh G., Rao R.P. Regulation of peri–attachment embryo development in the golden hamster: role of growth factors // *J. Reprod. Immunol.* 2002. V. 53. № 1–2. P. 203–213.

- Seshagiri P.B., Bavister B.D.* Phosphate is required for inhibition by glucose of development of hamster 8-cell embryos *in vitro* // *Biol. Reprod.* 1989. V. 40. № 3. P. 607–614.
- Singh M., Chaudhry P., Asselin E.* Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors // *J. Endocrinol.* 2011. V. 210. № 1. P. 5–14.
- Sjöblom C., Roberts C.T., Wikland M., Robertson S.A.* Granulocyte–macrophage colony–stimulating factor alleviates adverse consequences of embryo culture on fetal growth trajectory and placental morphogenesis // *Endocrinology.* 2005. V. 146. № 5. P. 2142–2153.
- Sjöblom C., Wikland M., Robertson S.A.* Granulocyte–macrophage colony–stimulating factor (GM–CSF) acts independently of the beta common subunit of the GM–CSF receptor to prevent inner cell mass apoptosis in human embryos // *Biol. Reprod.* 2002. V. 67. № 6. P. 1817–1823.
- Sjöblom C., Wikland M., Robertson S.A.* Granulocyte–macrophage colony–stimulating factor promotes human blastocyst development *in vitro* // *Hum. Reprod.* 1999. V. 14. № 12. P. 3069–3076.
- Smith G.D., Takayama S., Swain J.E.* Rethinking *in vitro* embryo culture: new developments in culture platforms and potential to improve assisted reproductive technologies // *Biol. Reprod.* 2012. V. 86. № 3. P. 1–10.
- Spindler R.E., Crichton E.G., Agca Y. et al.* Improved felid embryo development by group culture is maintained with heterospecific companions // *Theriogenology.* 2006. V. 66. № 1. P. 82–92.
- Spindler R.E., Wildt D.E.* Quality and age of companion felid embryos modulate enhanced development by group culture // *Biol. Reprod.* 2002. V. 66. № 1. P. 167–173.
- Stephoe P.C., Edwards R.G.* Birth after the reimplantation of a human embryo // *Lancet.* 1978. V. 312. P. 366.
- Sugimura S., Akai T., Hashiyada Y. et al.* Promising system for selecting healthy *in vitro*–fertilized embryos in cattle // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 5. P. 1–12.
- Sugimura S., Akai T., Somjai T. et al.* Time–lapse cinematography–compatible polystyrene–based microwell culture system: a novel tool for tracking the development of individual bovine embryos // *Biol. Reprod.* 2010. V. 83. № 6. P. 970–978.
- Summers M.C., Biggers J.D.* Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues // *Hum. Reprod. Update.* 2003. V. 9. № 6. P. 557–582.
- Taft R.A.* Virtues and limitations of the preimplantation mouse embryo as a model system // *Theriogenology.* 2008. V. 69. № 1. P. 10–16.
- Taka M., Iwayama H., Fukui Y.* Effect of the well of the well (WOW) system on *in vitro* culture for porcine embryos after intracytoplasmic sperm injection // *J. Reprod. Dev.* 2005. V. 51. № 4. P. 533–537.
- Thompson J.G., Kind K.L., Roberts C.T. et al.* Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: short– and long–term consequences for the health of children conceived through assisted reproduction technology: more reason for caution? // *Hum. Reprod.* 2002. V. 17. P. 2783–2786.
- Thouas G.A., Jones G.M., Trounson A.O.* The “GO” system – a novel method of microculture for *in vitro* development of mouse zygotes to the blastocyst stage // *Reproduction.* 2003. V. 126. № 2. P. 161–169.
- Tkachenko O.Y., Delimitreva S., Isachenko E. et al.* Epidermal growth factor effects on marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) oocyte *in vitro* maturation, IVF and embryo development are altered by gonadotrophin concentration during oocyte maturation // *Hum. Reprod.* 2010. V. 25. № 8. P. 2047–2058.
- Vajta G., Korösi T., Du Y. et al.* The Well-of-the-Well system: an efficient approach to improve embryo development // *Reprod. Biomed. Online.* 2008. V. 17. № 1. P. 73–81.
- Vajta G., Peura T.T., Holm P. et al.* New method for culture of zona–included or zona–free embryos: the Well of the Well (WOW) system // *Mol. Reprod. Dev.* 2000. V. 55. № 3. P. 256–264.
- Villa-Diaz L.G., Nandivada H., Ding J. et al.* Synthetic polymer coatings for long–term growth of human embryonic stem cells // *Nat. Biotechnol.* 2010. V. 28. № 6. P. 581–583.
- Wales R.G.* Maturation of the mammalian embryo: biochemical aspects // *Biol. Reprod.* 1975. V. 12. № 1. P. 66–81.
- Watkins A.J., Fleming T.P.* Blastocyst environment and its influence on offspring cardiovascular health: the heart of the matter // *J. Anat.* 2009. V. 215. № 1. P. 52–59.
- Xie Y., Awonuga A.O., Zhou S. et al.* Interpreting the stress response of early mammalian embryos and their stem cells // *Internat. Rev. of Cell and Mol. Biol.* 2011. V. 287. P. 43–95.
- Xu M., Kreeger P.K., Shea L.D., Woodruff T.K.* Tissue–engineered follicles produce live, fertile offspring // *Tissue Eng.* 2006. V. 12. № 10. P. 2739–2746.
- Young L.E., Sinclair K.D., Wilmut I.* Large offspring syndrome in cattle and sheep // *Rev. Reprod.* 1998. V. 3. № 3. P. 155–163.
- Zhang X., Armstrong D.T.* Presence of amino acids and insulin in a chemically defined medium improves development of 8–cell rat embryos *in vitro* and subsequent implantation *in vivo* // *Biol. Reprod.* 1990. V. 42. № 4. P. 662–668.
- Zhou Y., Galat V., Garton R. et al.* Two–phase chemically defined culture system for preimplantation rat embryos // *Genesis.* 2003. V. 36. № 3. P. 129–133.

Traditional and Modern Approaches to Culture of Preimplantation Mammalian Embryos In Vitro

E. Yu. Brusentsev^a, T. N. Igonina^a, and S. Ya. Amstislavsky^{a, b}

^a *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,
pr. Akademika Lavrent'eva 10, Novosibirsk, 630090 Russia*

^b *Novosibirsk State University, ul. Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia
e-mail: amstis@bionet.nsc.ru*

Received March 28, 2013; in final form, October 28, 2013

Abstract—This review covers the basic principles and methods of in vitro culture of preimplantation mammalian embryos. The features of in vitro development of embryos of various species of animals with allowance for the composition of nutrient media are described, with special attention paid to those species that have traditionally been considered as laboratory (i.e., mice, rats, and hamsters). The effects of suboptimal culturing conditions of preimplantation embryos on the formation of the phenotype of individuals developed from these embryos are discussed. New approaches to optimize the conditions of the development of preimplantation mammalian embryos in vitro are analyzed.

Keywords: culture in vitro, preimplantation embryos, growth factors