

УДК 612.67;591.3;611.81;592/599

## ВЛИЯНИЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЭМБРИОНОВ НА ОНТОГЕНЕЗ ПОТОМСТВА У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© 2020 г. С. В. Раннева<sup>a, b</sup>, Е. Ю. Брусенцев<sup>a</sup>, Т. Н. Игонина<sup>a</sup>, Д. С. Рагаева<sup>a</sup>, И. Н. Рожкова<sup>a</sup>,  
Н. И. Ершов<sup>a</sup>, А. Л. Левинсон<sup>c</sup>, С. Я. Амстиславский<sup>a, b, \*</sup>

<sup>a</sup>ФГБНУ “ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН”, пр. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090 Россия

<sup>b</sup>ФГАОУ ВО “Новосибирский национальный исследовательский государственный университет” (НГУ),  
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090 Россия

<sup>c</sup>Новосибирский центр репродуктивной медицины, ул. Героев Революции, 3, Новосибирск, 630037 Россия

\*e-mail: amstis@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.02.2020 г.

После доработки 16.06.2020 г.

Принята к публикации 19.06.2020 г.

Представлен обзор данных, касающихся влияния вспомогательных репродуктивных технологий, главным образом культивирования *in vitro* преимплантационных эмбрионов, на пре- и постнатальное развитие млекопитающих. Рассмотрены особенности воздействия питательных сред на развитие зародыша и на формирующийся плод. Особое внимание уделено отдаленным эффектам у потомков, рожденных после применения этих процедур.

**Ключевые слова:** вспомогательные репродуктивные технологии, культивирование *in vitro*, преимплантационный эмбрион, плод, онтогенез, эпигенетика, отдаленные эффекты

DOI: 10.31857/S0475145020060075

### ВВЕДЕНИЕ

Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) применяют в медицине для преодоления бесплодия уже более 40 лет (Stephoe, Edwards, 1978; Berntsen et al., 2019). Согласно международному глоссарию, под термином “ВРТ” подразумеваются любые манипуляции *in vitro* с ооцитами, сперматозоидами или эмбрионами человека с целью репродукции, в том числе культивирование эмбрионов *in vitro* (Zegers-Hochschild et al., 2017). Фундаментальные процессы эпигенетического репрограммирования генома, которые происходят на стадии созревания гамет и раннего эмбрионального развития млекопитающих, совпадают по времени с некоторыми этапами ВРТ, в частности, с культивированием эмбрионов в искусственных средах (Reik et al., 2001). Между тем, питательные среды, в которых развиваются *in vitro* эмбрионы млекопитающих, отличаются по качественному и количественному составу от внутриутробной среды яйцеводов и матки, в которых происходит раннее пренатальное развитие *in vivo* (Summers, Biggers, 2003; Aguilar, Reyley, 2005). Кроме того, эмбрионы при культивировании *in vitro* испытывают недостаток в сигнальных молекулах (гормоны, цитокины, факторы роста) со стороны репродуктивного тракта (Makieva et al., 2018). Это может быть устранено добавлением соответствующих компо-

нентов в культуральную среду, в том числе жидкой среды яйцевода и матки, а также со-культивированием эмбрионов с аутологичными клетками эндометрия (Canovas et al., 2017; Le Saint et al., 2019). Тем не менее, в ходе культивирования эмбрионы подвергаются действию различных факторов: флуктуации рН, высокой концентрации кислорода, изменению осмоляльности и других (Sunde, 2019). Эти факторы могут приводить к нарушениям естественных процессов репрограммирования, а именно отсутствию деметилирования, либо, напротив, aberrантному метилированию локусов, которые в норме не являются метилированными, и фенотипическим отклонениям, в частности, возрастанию риска заболеваний, связанных с нарушением геномного импринтинга у потомков (Mani et al., 2020).

В настоящее время накапливаются данные о здоровье детей, рожденных после применения ВРТ (Berntsen et al., 2019; Ramos-Ibeas et al., 2019; Sunde, 2019). Дети, зачатые с использованием ВРТ, чаще рождаются преждевременно, также у них чаще наблюдается сниженная масса тела при рождении (Hayashi et al., 2012). Однако на текущий момент нет однозначного ответа на вопрос, является ли это эффектом от применения ВРТ или следствием бесплодия и возраста родителей (Hayashi et al 2012; Sunkara et al., 2019). Поэтому

изучение влияния культивирования *in vitro* и других этапов ВРТ на онтогенез и фенотипические характеристики потомства в постнатальный период является крайне актуальным. Первая глава нашего обзора посвящена историческим аспектам разработки сред для культивирования эмбрионов человека и животных, а также современному состоянию данной проблемы. В следующих главах мы акцентировали внимание на влиянии некоторых этапов ВРТ, связанных с экстракорпоральным оплодотворением (ЭКО) и культивированием эмбрионов *in vitro*, на пре- и постнатальное развитие организма млекопитающих. Рассмотрение более сложных протоколов, включающих в себя криоконсервацию гамет и эмбрионов, а также преимплантационную генетическую диагностику, выходит за рамки данного обзора.

### ОПТИМИЗАЦИЯ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СИСТЕМ

Жидкая среда яйцеводов и матки млекопитающих обеспечивает необходимые условия для ооцитов, движения сперматозоидов, оплодотворения и раннего развития эмбрионов (Aguilar, Reyley, 2005; Aviles et al., 2010). Естественная питательная среда половых путей самки содержит множество различных соединений, которые поступают туда через кровь, либо синтезируются эпителиальными клетками репродуктивного тракта (Leese, 1988). Важными компонентами среды яйцеводов и матки являются ионы  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cl^-$ , энергетические субстраты (лактат, пируват, глюкоза), разнообразные аминокислоты, протеины, простагландины, стероидные гормоны и ростовые факторы, такие как инсулиноподобный фактор роста первого типа – IGF-1, эпидермальный фактор роста – EGF, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор – GM-CSF (Aguilar, Reyley, 2005). Список эмбриотропных факторов, секретлируемых эпителиальными клетками репродуктивного тракта, до сих пор точно не определен и с каждым годом растет (Aviles et al., 2010). Для обеспечения развития преимплантационных эмбрионов *in vitro* важно использовать растворы с правильно подобранными компонентами в оптимальных концентрациях, а также наиболее приемлемый газовый состав атмосферы, в которой осуществляется данный процесс.

#### *Разработка питательных сред для культивирования *in vitro* преимплантационных эмбрионов млекопитающих*

При создании питательных сред исследователи используют два основных подхода: “back-to-nature”, когда компоненты и их концентрации стараются сделать максимально приближенными по составу к таковым репродуктивных путей

и “let embryo choose”, когда их состав подбирают эмпирическим путем (Summers, Biggers, 2003; Брусенцев и др., 2014). В настоящее время наиболее популярными средами для культивирования *in vitro* преимплантационных эмбрионов лабораторных животных являются: KSOM, KSOMaa, HECM, mR1ECM, G1/2, SOF, CZB (Summers, Biggers, 2003; Брусенцев и др., 2014; Finger et al., 2015; Belli et al., 2019). Состав этих питательных сред представлен в табл. 1. Питательные среды, которые были весьма популярны при культивировании эмбрионов лабораторных животных ранее, в частности, среда M16, разработанная в 1971 г., представляют, в наше время, скорее исторический интерес (Summers, Biggers, 2003) и в таблицу не включены. Некоторые из культуральных сред, представленных в табл. 1, состоят из минимального числа необходимых веществ, подобранных по принципу “let embryo choose”, как, например, среда KSOM ( $K^+$  simplex optimized medium), которая содержит 11 ингредиентов (при добавлении сывороточного альбумина – 12). Несмотря на небольшое число компонентов, данная среда является сбалансированной по их концентрациям и оптимально подходит для развития ранних зародышей мышей (Summers, Biggers, 2003; Брусенцев и др., 2014). Однако для других видов млекопитающих используют, зачастую, более богатые компонентами варианты этой среды, в частности, KSOMaa, в которой 32 компонента, благодаря добавлению аминокислот (Biggers et al., 2000; Summers, 2014; Belli et al., 2019).

В среды для культивирования эмбрионов некоторых животных добавляют 5–15% сыворотки крупного рогатого скота (КРС) или других млекопитающих (Han, Niwa, 2003; Amstislavsky et al., 2018). Также для оптимизации среды иногда добавляют репродуктивные жидкости (фолликулярную, яйцевода или матки). Так, например, в эксперименте по культивированию ранних зародышей свиней добавление этих компонентов не только улучшает качество развивающихся бластоцист, но и корректирует эпигенетические изменения, вызванные применением ВРТ (Canovas et al., 2017). Другим подходом для оптимизации питательной среды является добавление в нее осмолитов, таких как сывороточный альбумин (Summers, Biggers, 2003; Брусенцев и др., 2014; Brusentsev et al., 2018) или его синтетические аналоги, в частности, поливиниловый спирт – ПВС (Cozzi et al., 2010; Брусенцев и др., 2014). В качестве ресурса для пластического обмена используют свободные аминокислоты (Cozzi et al., 2010).

#### *Преодоление двухклеточного блока развития преимплантационных эмбрионов грызунов*

Проблемой культивирования со стадии зиготы ранних зародышей грызунов (мышей, хомячков,

**Таблица 1.** Состав некоторых синтетических питательных сред, наиболее часто используемых при культивировании *in vitro* преимплантационных эмбрионов лабораторных животных

Компоненты	Название питательной среды (концентрация компонентов мМ за исключением сноски)									
	KSOM <sup>3</sup>	KSOM <sub>aa</sub> <sup>4,6</sup>	KSOM <sub>gaa</sub> <sup>5</sup>	HECM <sup>2</sup>	mR1ECM <sup>7</sup>	G1.2/2.2 <sup>4</sup>		SOF <sup>1</sup>	SOFAa <sup>6</sup>	CZB <sup>4</sup>
NaCl	95.0	95.0	95.0	98.0	110.0	90.1	90.1	107.7	107.7	81.3
KCl	2.5	2.5	2.5	3.2	3.2	5.5	5.5	7.2	7.2	4.7
CaCl <sub>2</sub>	1.7	1.7	1.7	2.0	2.0	1.8	1.8	1.7	1.2	1.7
MgCl <sub>2</sub>	—	—	—	0.5	0.5	—	—	0.5	0.5	—
MgSO <sub>4</sub>	0.2	0.2	0.2	—	—	1.0	1.0	—	—	1.2
NaHCO <sub>3</sub>	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.1	25.1	25.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4	0.4	0.4	—	—	—	—	1.2	1.2	1.2
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	—	—	—	—	—	0.3	0.3	—	—	—
Лактат натрия	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.5	5.9	3.3	3.3	31.3
Пируват натрия	0.2	0.2	0.2	0.5	0.5	0.3	0.1	0.3	0.4	0.3
Глюкоза	0.2	0.2	5.56	—	7.5	0.5	3.2	1.5	—	—
Глутамин	1.0	1.0	1.0	1.0	0.1	0.5	—	—	—	1.0
Таурин	—	—	—	7.0	—	—	—	—	—	—
ЭДТА	0.01	0.01	0.01	—	—	0.01	—	—	—	0.1
Инозитол	—	—	—	—	—	—	0.01	—	—	—
Никотинамид	—	—	—	—	—	—	0.08	—	—	—
Пантотенат	—	—	—	—	—	—	0.004	—	—	—
Пиридоксин	—	—	—	—	—	—	0.005	—	—	—
Рибофлавин	—	—	—	—	—	—	0.0003	—	—	—
Тиамин	—	—	—	—	—	—	0.003	—	—	—
Фолиевая к-та	—	—	—	—	—	—	0.002	—	—	—
Холин хлорид	—	—	—	—	—	—	0.007	—	—	—
СА <sup>а</sup>	1.0*	3.0*	1.0*	—	4.0*	2.0*	2.0*	32*	8*	5.0*
ПВС <sup>б</sup>	—	—	—	1.0*	—	—	—	—	—	—
ЗАК <sup>в</sup>	—	1.0 <sup>#</sup>	1.0 <sup>#</sup>	2.0 <sup>#</sup>	2.0 <sup>#</sup>	2.0 <sup>#</sup>	2.0 <sup>#</sup>	—	2.0 <sup>#</sup>	—
НЗАК <sup>г</sup>	—	0.5 <sup>#</sup>	0.5 <sup>#</sup>	1.0 <sup>#</sup>	1.0 <sup>#</sup>	1.0 <sup>#</sup>	1.0 <sup>#</sup>	—	1.0 <sup>#</sup>	—

<sup>а</sup> Сывороточный альбумин, <sup>б</sup> поливиниловый спирт, <sup>в</sup> заменимые аминокислоты, <sup>г</sup> незаменимые аминокислоты; \* — мг/мл, # — % (v/v). <sup>1</sup> Tervit et al., 1972; <sup>2</sup> Schini, Bavister, 1988; <sup>3</sup> Lawitts, Biggers, 1993; <sup>4</sup> Gardner et al., 2004; <sup>5</sup> Biggers et al., 2005; <sup>6</sup> Sagirkaya et al., 2006; <sup>7</sup> Cozzi et al., 2010.

крыс) долгое время являлся двухклеточный блок развития (Schini, Bavister, 1988; Lawitts, Biggers, 1991; Miyoshi et al., 1994). Многочисленные попытки преодоления блока включали в себя модификацию состава сред путем изменения концентраций некоторых базовых компонентов: NaCl, KCl, NaHCO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, пирувата, глюкозы, а также добавлением дополнительных компонентов, таких как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) и глутамин (Chatot et al., 1990). С использованием симплекс-метода, который позволил оптимизировать концентрации компонентов культуральной среды, Джоном Биггерсом и его коллегами была создана среда SOM — simplex optimized medium (Lawitts, Biggers, 1991; Summers, 2014).

Культивирование на данной среде позволило не только преодолеть двухклеточный блок развития эмбрионов мышей, но и получить высокий процент бластоцист (Lawitts, Biggers, 1991). Впоследствии среда SOM была модифицирована и получила название KSOM, то есть среда SOM, обогащенная калием (Lawitts, Biggers, 1993). Исследователи показали успешное развитие мышечных эмбрионов до стадии бластоцисты на модифицированной среде mKSOM, обогащенной глюкозой (Biggers, McGinnis, 2001). Также было установлено, что в случае с мышечными эмбрионами, наличие в среде KSOM фосфатов вызывает блок развития лишь у малой группы зигот, чувствительных к данному компоненту (Biggers, McGinnis, 2001).

Между тем, было показано негативное влияние наличия фосфатов в культуральной среде на развитие эмбрионов хомячков (Schini, Bavister, 1988) и крыс (Miyoshi et al., 1994). Для культивирования эмбрионов хомячков была создана среда hamster embryo culture medium (HECM), в которой отсутствуют фосфаты (табл. 1). До настоящего времени было создано десять модификаций этой среды (Seshagiri, Vani, 2019). На основе HECM была создана специализированная среда rat one-cell embryo culture medium (R1ECM), предназначенная для культивирования эмбрионов крыс (табл. 1). Эмбрионы некоторых линий крыс удавалось культивировать при помощи этой среды вполне успешно (Miyoshi et al., 1994; Брусенцев и др., 2015). Между тем, недавно была создана модификация среды KSOM, предназначенная для культивирования крысиных эмбрионов (KSOM-R), в составе которой были исключены все фосфаты и добавлены таурин, глицин, глутамат и аланин (Nakamura et al., 2016). Было показано, что в среде KSOM-R эмбрионы крыс развиваются быстрее, чем в mR1ECM (Men et al., 2020).

*Оптимальные среды для культивирования  
преимплантационных эмбрионов разных  
видов млекопитающих*

На сегодняшний день не существует универсальной питательной среды, на которой можно было бы культивировать *in vitro* преимплантационные эмбрионы всех видов млекопитающих. Тем не менее, большой прогресс достигнут в оптимизации культуральных сред в экспериментах, при культивировании эмбрионов лабораторных животных (Summers, Biggers, 2003; Брусенцев и др., 2014; Summers, 2014). В настоящее время, успешно культивируют ранние зародыши таких млекопитающих как куньи (Amstislavsky et al., 2012), кошачьи (Herrick et al., 2007; Amstislavsky et al., 2018; Brusentsev et al., 2018), псовые (Lindeberg et al., 1993; Luvoni et al., 2006), КРС (Sugimura et al., 2012) и многих других. При культивировании эмбрионов млекопитающих необходимо учитывать их видовую специфику (Amstislavsky et al., 2012), так как существенные отличия наблюдаются при развитии *in vitro* зародышей даже таких близкородственных видов грызунов, как мыши (Summers, Biggers, 2003; Брусенцев и др., 2015), крысы (Miyoshi et al., 1995; Han, Niwa, 2003; Брусенцев и др., 2015; Igonina et al., 2019) и хомячки (Schini, Bavister, 1988; Amstislavsky et al., 2015; Brusentsev et al., 2015). При подборе концентраций компонентов питательных сред, в частности, пирувата также учитывают видовую специфику. Примером служат эмбрионы свиней, богатые липидными гранулами, потребности которых отличаются от эмбрионов мышей с низким содержанием внутривителлиновых липидов (Bradley, Swann, 2019).

На средах KSOM (mKSOM, KSOMaa и KSOM-R) эффективно развиваются ранние зародыши мыши (Belli et al., 2019), крысы (Men et al., 2020), крупного рогатого скота (Nedambale et al., 2004), кролика (Liu et al., 1996), овцы (Aghaz et al., 2016), свиньи (Machaty et al., 1998) и верблюда (Yaqoob et al., 2017). Среда HECM и созданная на ее основе R1ECM применяются для развития ранних зародышей мышей (Брусенцев и др., 2015), хомячков (Amstislavsky et al., 2015; Brusentsev et al., 2015; Seshagiri, Vani, 2019), крыс (Miyoshi et al., 1995; Igonina et al., 2019) и макак (Zhou et al., 2006). Можно выделить и другие среды-кандидаты на “универсальность”, на которых можно успешно культивировать *in vitro* преимплантационные эмбрионы различных видов млекопитающих, такие как G1/2, SOF и CZB. Среда G1/2 или G1.2/2.2 используется для культивирования эмбрионов мыши (Finger et al., 2015), лошади (Choi et al., 2003a), КРС (Lane et al., 2003), козы (Hosseini et al., 2015) и свиньи (Swain et al., 2001). Различные модификации среды SOF (SOFaa, SOF1/2 и другие) используется для культивирования *in vitro* эмбрионов КРС (Nedambale et al., 2004), овцы (Mara et al., 2014), козы (Hosseini et al., 2015), ламы (Trasorras et al., 2014), собаки (Rodrigues et al., 2004) и кошки (Sananmuang et al., 2011). На среде CZB развиваются ранние зародыши мыши (Chatot et al., 1990), лошади (Choi et al., 2003b), козы (Izquierdo et al., 1999), свиньи (Pollard et al., 1995) и хорька (Li et al., 2001). Однако какой бы сбалансированной не была искусственная питательная среда для культивирования *in vitro* преимплантационных эмбрионов, она все равно остается субоптимальной, в частности, потому, что на развитие эмбрионов *in vivo* воздействуют различные гормоны и факторы роста, как уже было сказано ранее (Aguilar, Reyley, 2005).

Включение отдельных факторов роста или их комбинации в культуральную среду *in vitro* способствует улучшению раннего эмбрионального развития и увеличению доли имплантирующихся зародышей (Kawamura et al., 2012; Брусенцев и др., 2014). Ряд исследований указывает на ускорение развития преимплантационных эмбрионов млекопитающих при добавлении таких ростовых факторов, как IGF-1 (Кожевникова и др., 2017), EGF (Брусенцев и др., 2015), GM-CSF (Amstislavsky et al., 2015) и других, а также комбинации нескольких факторов роста (Kawamura et al., 2012). Стимулирующее воздействие на развитие эмбрионов млекопитающих *in vitro* оказывают также хорионический гонадотропин человека (ХГЧ), бета-эндорфин, инсулин и другие гормоны (Брусенцев и др., 2014; Dinopoulou et al., 2016).

*Влияние физико-химических параметров  
культивирования на развитие  
преимплантационных эмбрионов  
млекопитающих in vitro*

Такие условия, как температура, влажность, pH культуральной среды, состав газовой смеси, поддерживаемые в лабораторных CO<sub>2</sub>-инкубаторах, могут существенно повлиять на развитие эмбрионов (Брусенцев и др., 2014). Основным правилом эмбриологической лаборатории является поддержание стабильности среды, где происходит культивирование эмбрионов *in vitro*: необходимо минимизировать число манипуляций и наблюдений за эмбриологическим материалом вне CO<sub>2</sub>-инкубатора, чтобы снизить стресс для дробящихся зародышей (Miller, 2014).

Температурный контроль, а также контроль влажности в CO<sub>2</sub>-инкубаторе, является наиболее важным для системы культивирования, так как развивающиеся эмбрионы очень чувствительны к перепадам температуры (Miller, 2014). В настоящий момент наиболее оптимальной температурой для поддержания развития ранних зародышей вне организма считается температура около 37°C (Swain et al., 2016), а также влажность около 90% (Higdon et al., 2008). Кроме того, необходимо учитывать, что в каждом конкретном CO<sub>2</sub>-инкубаторе температура неравномерно распределена, и существуют “холодные” и “горячие” зоны, где температура может различаться (Miller, 2014).

Важнейшим показателем для поддержания развития преимплантационных эмбрионов вне организма матери является pH культуральной среды (Брусенцев и др., 2014). Компоненты питательных сред, а также состав газовой смеси инкубатора, подбирают таким образом, чтобы обеспечить pH в интервале 7.2–7.4 (Брусенцев и др., 2014). Основным компонентом питательной среды, который регулирует данный показатель, является бикарбонат натрия, который обычно добавляется в среду в концентрации 25 мМ (Брусенцев и др., 2014). Инкубатор поддерживает pH на нужном уровне благодаря постоянному содержанию в нем 5–7% CO<sub>2</sub> (Higdon et al., 2008).

Оптимальный состав газовой смеси оказывает большое влияние на результативность культивирования преимплантационных эмбрионов *in vitro* (Брусенцев и др., 2014). Часто газовый состав в инкубаторе содержит 5% CO<sub>2</sub> и 95% воздуха (Higdon et al., 2008). *In vivo* эмбрионы млекопитающих находятся в среде, где содержание кислорода в 2.5 и более раз ниже, чем в атмосфере (Fischer, Bavister, 1993; Menezo et al., 2013). Было показано, что высокое содержание O<sub>2</sub> ухудшает развитие эмбрионов, приводит к повышению частоты возникновения нарушений в митохондриях, высокому уровню активных форм кислорода, а также может влиять

на процессы расхождения хромосом (Menezo et al., 2013; Belli et al., 2019). В эксперименте было показано, что снижение содержания кислорода в газовой смеси с 20 до 5% при культивировании эмбрионов мышей существенно улучшает их развитие (Belli et al., 2019). Кроме того, некоторые летучие органические соединения (стирол, формальдегид, глутаровый альдегид, толуол), а также микроорганизмы в воздухе лаборатории, могут оказывать негативное влияние на процесс культивирования эмбрионов (Miller, 2014).

*Культивирование in vitro преимплантационных эмбрионов человека*

Результаты исследований, полученных на различных видах животных, учитывают и при создании сред для культивирования *in vitro* эмбрионов человека (Брусенцев и др., 2014). Большой прогресс достигнут в оптимизации культуральных сред, используемых в медицине (Youssef et al., 2015). Важное значение для культивирования *in vitro* эмбрионов человека является развитие двухступенчатых сред – sequential media, а также переход к одноступенчатому протоколу – single media (Morbeck et al., 2014, 2017). Состав некоторых фирменных питательных сред, используемых на сегодняшний день в репродуктивной медицине, представлен в табл. 2.

Двухступенчатый метод был создан исследователями с использованием подхода “back-to-nature” для максимального приближения условий культивирования к естественным условиям среды с меняющимся составом (Gardner, 1998; Gardner, Lane, 2014). По отношению к культивированию *in vitro* ранних зародышей человека были разработаны следующие двухступенчатые питательные среды: 1) G1/2 от компании Vitrolife, Швеция; 2) QACM/QABM от компании CooperSurgical (SAGE), Дания; 3) SICM/SIBM от компании Cook, США; 4) IVC1/IVC3 от компании InVivoCare, США; 5) ISM1/BA от компании CooperSurgical (Origio), Дания (Morbeck et al., 2014). Позднее, используя подход “let embryo choose”, исследователями были разработаны одноступенчатые питательные среды, которые подходят как для ранних, так и для более поздних стадий развития (Morbeck et al., 2017). К этим средам относятся: 1) Global от компании CooperSurgical (LifeGlobal), Дания; 2) CSC от компании FUJIFILM Irvine Scientific, Япония; 3) G-TL от компании Vitrolife, Швеция; 4) 1-Step от компании CooperSurgical (Origio), Дания (Morbeck et al., 2017). Такие среды позволяют совершать меньше манипуляций с эмбрионами и таким образом сводить к минимуму вероятность повреждений (Dieamant et al., 2017).

По аналогии со средами для культивирования *in vitro* преимплантационных эмбрионов млеко-

**Таблица 2.** Состав некоторых синтетических питательных сред, наиболее часто используемых при культивировании *in vitro* преимплантационных эмбрионов человека

Компоненты	Название питательной среды (концентрация компонентов, мМ, за исключением сноски)																
	G1/2 <sup>1,3</sup>		QACM/QABM <sup>1</sup>		SICM/SIBM <sup>1</sup>		IVC1/IVC3 <sup>1,3</sup>		ISM1/BA <sup>1</sup>		Global <sup>1,2</sup>		CSC <sup>1,2</sup>		G-TL <sup>2</sup>		1-Step <sup>2</sup>
Кальций	1.1	1.1	2.2	1.1	1.1	2.1	1.9	1.8	1.4	1.6	1.9	1.0	2.1				
Фосфор	0.3	0.3	0.3	0.4	0.3	—	0.3	0.3	1.1	0.2	0.2	0.3	0.3				
Калий	5.8	5.8	4.7	4.9	4.8	4.6	4.9	8.4	5.3	2.8	2.8	5.5	2.9				
Хлор	124.0	127.0	118.0	113.0	122.0	107.0	108.0	116.0	114.0	108.0	112.0	106.0	112.0				
Натрий	152.0	149.0	132.0	132.0	140.0	142.0	143.0	131.0	144.0	138.0	138.0	137.0	132.0				
Магний	1.7	1.7	1.8	1.8	1.5	0.2	0.2	0.9	0.8	0.2	0.8	1.6	1.8				
Железо	—	3.0**	1.0**	2.0**	11.0**	5.0**	5.0**	9.0**	57.0**	—	4.0**	—	—				
Селен	—	—	—	—	3.0**	—	—	4.0**	4.0**	—	—	—	—				
Алюминий	1.0**	1.0**	18.0**	21.0**	1.0**	2.0**	6.0**	5.0**	16.0**	1.0**	—	—	—				
Хром	0.1**	0.2**	0.2**	0.2**	0.3**	0.7**	0.9**	0.2**	1.2**	0.4**	0.7**	—	—				
Кобальт	0.3**	0.2**	0.2**	0.2**	0.3**	0.2**	0.2**	0.5**	0.6**	0.1**	0.2**	—	—				
Марганец	0.5**	0.6**	3.6**	3.6**	0.5**	0.6**	0.6**	1.4**	0.8**	0.4**	0.8**	—	—				
Глюкоза	0.5	3.4	0.1	2.8	0.3	3.1	2.7	1.0	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2				
Цитрат	0.080	0.080	—	0.200	—	—	0.200	0.020	0.003	—	0.020	0.010	—				
Октонат	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.7	0.3	0.3	0.4				
Лактат	10.8	6.0	3.9	3.9	1.8	10.1	9.4	3.2	2.4	4.9	5.7	10.0	4.4				
Пируват	0.3	0.1	0.5	0.1	0.4	0.1	0.1	2.0	0.2	0.2	0.3	0.6	0.2				
Аргинин	—	360.0 <sup>#</sup>	—	313.0 <sup>#</sup>	25.0 <sup>#</sup>	—	590.0 <sup>#</sup>	138.0 <sup>#</sup>	124.0 <sup>#</sup>	278.0 <sup>#</sup>	292.0 <sup>#</sup>	324.0 <sup>#</sup>	336.0 <sup>#</sup>				
Цистеин	—	54.0 <sup>#</sup>	—	54.0 <sup>#</sup>	2.0 <sup>#</sup>	—	9.0 <sup>#</sup>	42.0 <sup>#</sup>	38.0 <sup>#</sup>	32.0 <sup>#</sup>	34.0 <sup>#</sup>	26.0 <sup>#</sup>	28.0 <sup>#</sup>				
Гистидин	—	121.0 <sup>#</sup>	—	102.0 <sup>#</sup>	8.0 <sup>#</sup>	—	188.0 <sup>#</sup>	99.0 <sup>#</sup>	54.0 <sup>#</sup>	76.0 <sup>#</sup>	80.0 <sup>#</sup>	89.0 <sup>#</sup>	90.0 <sup>#</sup>				

Таблица 2. Окончание

Компоненты	Название питательной среды (концентрация компонентов, мМ, за исключением сноски)											
	G1/2 <sup>1,3</sup>	QACM/QABM <sup>1</sup>	SICM/SIBM <sup>1</sup>	IVC1/IVC3 <sup>1,3</sup>	ISM1/BA <sup>1</sup>	Global <sup>1,2</sup>	CSC <sup>1,2</sup>	G-TL <sup>2</sup>	1-Step <sup>2</sup>			
Изолейцин	—	209.0 <sup>#</sup>	17.0 <sup>#</sup>	169.0 <sup>#</sup>	—	388.0 <sup>#</sup>	147.0 <sup>#</sup>	208.0 <sup>#</sup>	182.0 <sup>#</sup>	199.0 <sup>#</sup>	215.0 <sup>#</sup>	204.0 <sup>#</sup>
Лейцин	—	227.0 <sup>#</sup>	18.0 <sup>#</sup>	182.0 <sup>#</sup>	—	408.0 <sup>#</sup>	158.0 <sup>#</sup>	217.0 <sup>#</sup>	177.0 <sup>#</sup>	188.0 <sup>#</sup>	204.0 <sup>#</sup>	206.0 <sup>#</sup>
Лизин	—	223.0 <sup>#</sup>	18.0 <sup>#</sup>	174.0 <sup>#</sup>	—	417.0 <sup>#</sup>	148.0 <sup>#</sup>	179.0 <sup>#</sup>	154.0 <sup>#</sup>	168.0 <sup>#</sup>	182.0 <sup>#</sup>	182.0 <sup>#</sup>
Метионин	—	56.0 <sup>#</sup>	4.0 <sup>#</sup>	43.0 <sup>#</sup>	—	100.0 <sup>#</sup>	89.0 <sup>#</sup>	54.0 <sup>#</sup>	44.0 <sup>#</sup>	50.0 <sup>#</sup>	54.0 <sup>#</sup>	54.0 <sup>#</sup>
Фенилаланин	—	106.0 <sup>#</sup>	8.0 <sup>#</sup>	86.0 <sup>#</sup>	—	200.0 <sup>#</sup>	90.0 <sup>#</sup>	104.0 <sup>#</sup>	79.0 <sup>#</sup>	83.0 <sup>#</sup>	91.0 <sup>#</sup>	92.0 <sup>#</sup>
Треонин	—	210.0 <sup>#</sup>	18.0 <sup>#</sup>	172.0 <sup>#</sup>	—	374.0 <sup>#</sup>	81.0 <sup>#</sup>	211.0 <sup>#</sup>	162.0 <sup>#</sup>	176.0 <sup>#</sup>	184.0 <sup>#</sup>	204.0 <sup>#</sup>
Триптофан	—	28.0 <sup>#</sup>	2.0 <sup>#</sup>	22.0 <sup>#</sup>	—	51.0 <sup>#</sup>	100.0 <sup>#</sup>	21.0 <sup>#</sup>	18.0 <sup>#</sup>	20.0 <sup>#</sup>	21.0 <sup>#</sup>	23.0 <sup>#</sup>
Тирозин	—	100.0 <sup>#</sup>	12.0 <sup>#</sup>	114.0 <sup>#</sup>	—	186.0 <sup>#</sup>	70.0 <sup>#</sup>	91.0 <sup>#</sup>	69.0 <sup>#</sup>	75.0 <sup>#</sup>	80.0 <sup>#</sup>	83.0 <sup>#</sup>
Валин	—	224.0 <sup>#</sup>	17.0 <sup>#</sup>	179.0 <sup>#</sup>	—	428.0 <sup>#</sup>	356.0 <sup>#</sup>	225.0 <sup>#</sup>	163.0 <sup>#</sup>	174.0 <sup>#</sup>	200.0 <sup>#</sup>	196.0 <sup>#</sup>
Аланин	148.0 <sup>#</sup>	—	135.0 <sup>#</sup>	135.0 <sup>#</sup>	—	136.0 <sup>#</sup>	338.0 <sup>#</sup>	124.0 <sup>#</sup>	46.0 <sup>#</sup>	48.0 <sup>#</sup>	63.0 <sup>#</sup>	38.0 <sup>#</sup>
Аспарагин	126.0 <sup>#</sup>	112.0 <sup>#</sup>	88.0 <sup>#</sup>	84.0 <sup>#</sup>	—	113.0 <sup>#</sup>	73.0 <sup>#</sup>	104.0 <sup>#</sup>	42.0 <sup>#</sup>	46.0 <sup>#</sup>	40.0 <sup>#</sup>	36.0 <sup>#</sup>
Аспаргат	—	93.0 <sup>#</sup>	81.0 <sup>#</sup>	85.0 <sup>#</sup>	—	95.0 <sup>#</sup>	6.0 <sup>#</sup>	578.0 <sup>#</sup>	42.0 <sup>#</sup>	43.0 <sup>#</sup>	12.0 <sup>#</sup>	58.0 <sup>#</sup>
Глутамат	—	—	90.0 <sup>#</sup>	87.0 <sup>#</sup>	—	103.0 <sup>#</sup>	1.0 <sup>#</sup>	102.0 <sup>#</sup>	40.0 <sup>#</sup>	41.0 <sup>#</sup>	—	49.0 <sup>#</sup>
Глутамин	—	—	30.0 <sup>#</sup>	26.0 <sup>#</sup>	—	—	778.0 <sup>#</sup>	—	—	—	10.0 <sup>#</sup>	36.0 <sup>#</sup>
Глицин	135.0 <sup>#</sup>	119.0 <sup>#</sup>	6647.0 <sup>#</sup>	4815.0 <sup>#</sup>	—	121.0 <sup>#</sup>	1760.0 <sup>#</sup>	701.0 <sup>#</sup>	42.0 <sup>#</sup>	44.0 <sup>#</sup>	185.0 <sup>#</sup>	48.0 <sup>#</sup>
Пролин	112.0 <sup>#</sup>	93.0 <sup>#</sup>	85.0 <sup>#</sup>	80.0 <sup>#</sup>	—	99.0 <sup>#</sup>	82.0 <sup>#</sup>	96.0 <sup>#</sup>	55.0 <sup>#</sup>	60.0 <sup>#</sup>	126.0 <sup>#</sup>	66.0 <sup>#</sup>
Серин	127.0 <sup>#</sup>	107.0 <sup>#</sup>	92.0 <sup>#</sup>	89.0 <sup>#</sup>	—	109.0 <sup>#</sup>	96.0 <sup>#</sup>	113.0 <sup>#</sup>	40.0 <sup>#</sup>	42.0 <sup>#</sup>	96.0 <sup>#</sup>	46.0 <sup>#</sup>
Таурин	131.0 <sup>#</sup>	122.0 <sup>#</sup>	6489.0 <sup>#</sup>	6380.0 <sup>#</sup>	—	—	296.0 <sup>#</sup>	—	—	—	48.0 <sup>#</sup>	—
САа	4.0 <sup>*</sup>	5.0 <sup>*</sup>	5.0 <sup>*</sup>	5.0 <sup>*</sup>	4.0 <sup>*</sup>	1.0 <sup>*</sup>	5.0 <sup>*</sup>	5.0 <sup>*</sup>	10.0 <sup>*</sup>	5.0 <sup>*</sup>	5.0 <sup>*</sup>	5.0 <sup>*</sup>

<sup>a</sup> Сывороточный альбумин, \* — мг/л, \*\* — мкг/л, <sup>#</sup> — мкМ; <sup>1</sup> Morbeck et al., 2014; <sup>2</sup> Morbeck et al., 2017; <sup>3</sup> Tarahomi et al., 2019.

питающих, в клинике также используют добавление некоторых гормонов и факторов роста с целью повышения эффективности ВРТ (Ziebe et al., 2013). Учитывая сложный каскад молекулярных взаимодействий между эндометрием и эмбрионом (Makieva et al., 2018), был применен другой подход к оптимизации систем культивирования, а именно со-культивирование эмбрионов с аутологичными эндотелиальными клетками эндометрия (Le Saint et al., 2019). В недавнем клиническом исследовании было показано, что такой способ культивирования существенно увеличивает процент получения blastocист хорошего качества по сравнению с традиционным методом (Le Saint et al., 2019). Однако, такой подход является технически сложным и дорогостоящим, что затрудняет его внедрение в клиническую практику.

### ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ *IN VITRO* И ВЛИЯНИЕ НА ПОСЛЕДУЮЩИЙ ОНТОГЕНЕЗ

Пять десятилетий назад, в самом начале истории культивирования эмбрионов лабораторных животных, было показано, что развитие преимплантационных зародышей мышей *in vitro* происходит значительно медленнее по сравнению с их развитием *in vivo* (Bowman, McLaren, 1970). Однако, следует отметить, что такие результаты были получены не в самых благоприятных для культивирования условиях, а именно, с использованием питательных растворов, которые изначально были разработаны для выращивания соматических клеток, а не эмбрионов, с несбалансированными концентрациями компонентов и в отсутствие CO<sub>2</sub> инкубаторов. В некоторых работах, в частности, в исследовании Шварцер с соавторами (2012) было выявлено, что *in vitro* эмбрионы мыши развивались даже лучше, чем *in vivo*, показателем чего было повышение частоты формирования blastocист и индекса имплантации (Schwarzer et al., 2012). Также, в этой работе было изучено влияние культуральной среды на транскриптом эмбрионов и число клеток в blastocистах, и сделан вывод о том, что сама по себе процедура извлечения эмбрионов с последующим эмбриотрансфером снижает качество эмбрионов и изменяет их транскриптом (Schwarzer et al., 2012). Ранее было показано, что такие рутинные манипуляции с эмбрионами приводят к aberrантной экспрессии некоторых импринтированных генов в эмбриональных и внезародышевых тканях в постимплантационном периоде (Rivera et al., 2008). Интересно отметить, что пипетирование эмбрионов активирует стресс-чувствительные киназы MARK8/9, которые влияют на пролиферацию клеток и вовлечены в индукцию апоптоза (Xie et al., 2007). Исследователи предполагают, что

эпигенетические дефекты, наблюдаемые при переносе эмбрионов, могут быть результатом активации стресс-чувствительных MAP-киназ (Rivera et al., 2008).

В условиях *in vitro* на развитие эмбрионов влияет накопление аммония вследствие распада нестабильного L-глутамин (Biggers et al., 2004; Men et al., 2020). В современных версиях KSOM для того, чтобы снизить накопление аммония, вместо L-глутамин часто используют более стабильные дипептиды, такие как L-аланин-L-глутамин (AlaGln) и L-глицин-L-глутамин (GlyGln) (Biggers et al., 2004). Интересно, что при культивировании эмбрионов крыс процент развивающихся blastocист стремительно падает при такой замене (Gln → AlaGln/GlyGln), в отличие от мышей (Men et al., 2020). Авторы связывают эти негативные эффекты с неправильно подобранной концентрацией дипептидов, которая подходит лишь для мышей, а также с возможной неспособностью крысиных эмбрионов эффективно утилизировать эти вещества, вследствие низкой аффинности их дипептидаз (Men et al., 2020). В случае культивирования эмбрионов крыс предлагают другие способы избежать накопления аммония, например, заменять культуральную среду на новую каждые 24 ч (Nakamura et al., 2016), либо увеличивать ее объем (Men et al., 2020).

Условия культивирования *in vitro* эмбрионов млекопитающих влияют на темпы их развития, что проявляется в изменении числа клеток в blastocистах, а также нарушении экспрессии генов и развития плода (Mani, Manigi, 2018; Ramos-Ibeas et al., 2019). Более подробно влияние культивирования на эпигеном, а также на постимплантационное развитие плода описано в следующих подразделах. Так, в эндометрии человека показана экспрессия большого числа цитокинов, поддерживающих развитие ранних зародышей (Kawamura et al., 2012). Данные последних лет свидетельствуют о том, что культивирование *in vitro* преимплантационных эмбрионов сопровождается изменением экспрессии некоторых генов (Sunde, 2019).

#### *Влияние культивирования in vitro на изменение экспрессии генов в преимплантационных эмбрионах лабораторных животных*

К настоящему времени на эмбрионах различных видов млекопитающих получены данные, указывающие на значительные изменения в паттерне экспрессии генов, обусловленные применением ВРТ (de Waal et al., 2014). Однако в большинстве работ исследовали совокупный эффект ВРТ на фенотип и экспрессию генов, но не вклад отдельных этапов (de Waal et al., 2014; Feuer et al., 2016). Кроме того, исследования на мышах показали значительное влияние на результат культи-



вирования межлинейных различий (de Waal et al., 2014).

В работе о влиянии различных этапов *in vitro* процедур на состояние транскриптома blastоцист и взрослых потомков, показано, что именно условия культивирования, и в первую очередь, концентрация кислорода, провоцируют наибольшие отклонения экспрессии генов в blastоцистах мышей (Feuer et al., 2016). При этом каждая комбинация исследованных процедур характеризуется своим уникальным профилем экспрессии, ассоциированным с различными сигнальными и метаболическими путями (Feuer et al., 2016).

Наибольшее внимание исследователей сосредоточено на эффектах ВРТ по отношению к эпигенетической регуляции экспрессии генов, и в частности, на нарушениях геномного импринтинга в ходе раннего развития эмбриона (Market-Velker et al., 2010). Именно в контексте фактора состава среды для культивирования, одним из наиболее показательных можно считать исследование на мышах, в котором проводят параллельное сравнение пяти коммерческих культуральных сред (KSOMaa, Global, HTF, P1/MB и G1.5/G2.5) в сравнении с наиболее бедной средой Whitten's и условиями *in vivo* (Market-Velker et al., 2010). Анализ метилирования и экспрессии трех импринтируемых локусов, *H19*, *Peg3* и *Snrpn*, при культивировании до стадии blastоцисты показал, что во всех шести средах происходит утрата как отцовского (*H19*), так и материнского (*Peg3* и *Snrpn*) импринтинга, хотя и в разной степени, что позволило ранжировать среды по приближенности к условиям *in vivo* (Market-Velker et al., 2010).

Масштабные изменения в профилях метилирования и экспрессии генов эмбриона в результате культивирования были показаны с помощью полногеномных методов. Так, с помощью RNA-seq и RBAT-seq было показано, что культивирование эмбрионов свиньи в сравнении с *in vivo* условиями приводит к изменению паттернов метилирования и экспрессии генов, связанных с репрограммированием, импринтингом и развитием клеток (Canovas et al., 2017). Более того, добавление в культуральную систему содержимого репродуктивных путей приводило к менее выраженным отклонениям экспрессии генов и эпигеноме на стадии blastоцисты, что обусловлено, в частности, предотвращением деметилирования локуса *IGF2R*, непосредственно ассоциированного с синдромом крупного потомства (Canovas et al., 2017).

На модели мышей совместный эффект *in vitro* оплодотворения и культивирования на транскриптом и эпигеноме экстраэмбриональных и плацентарных тканей был исследован с помощью RNA-seq и MeDIP-seq (Tan et al., 2016). Было выявлено 409 генов, экспрессия которых была изменена в соответствии с гипо- или гиперметилированием их

промоторов в ответ на *in vitro* процедуры (Tan et al., 2016). Выявленные гены функционально связаны с формированием цитоскелета, развитием сосудов, органов и метаболизмом всего организма. Было также показано, что степень гипометилирования генома в эмбрионах КРС более выражена при увеличении длительности их культивирования *in vitro* (Salilew-Wondim et al., 2015).

#### *Влияние культивирования in vitro на изменения в профиле экспрессии генов и эпигеноме эмбрионов человека*

Значительное влияние состава культуральной среды на профиль экспрессии генов показано и на эмбрионах людей (Kleijkers et al., 2015). В частности, было выявлено, что культивирование ранних зародышей человека в достаточно простой среде HTF по сравнению с богатой многокомпонентной средой Vitrolife G5 Plus приводит на стадии blastоцисты к значительному изменению экспрессии 951 гена, большинство которых ассоциировано с апоптозом, деградацией белка, метаболизмом и контролем клеточного цикла, что, в частности, выражается в двукратном снижении частоты имплантации (Kleijkers et al., 2015). Очевидно, что стадия развития эмбриона и возраст донора играют заметную роль в наблюдаемых изменениях транскриптома при сравнении вышеупомянутых культуральных сред (Mantikou et al., 2016). Однако такой результат являлся вполне ожидаемым, поскольку среда HTF предназначена лишь для созревания ооцитов и, собственно, оплодотворения. Намного больший интерес представляют собой сравнение влияния сред, предназначенных для культивирования эмбрионов со стадии зиготы до момента переноса эмбриона в матку, на транскриптом blastоцист одного класса, однако, в связи с этическими ограничениями, проведение таких исследований затруднено. Морбек с коллегами (2017) провели детальные исследования состава культуральных сред CSC, Global, G-TL и 1-Step, которые используются в репродуктивной медицине (Morbeck et al., 2017). Было показано, что эти среды существенно различны по концентрации пирувата, лактата и составу аминокислот (Morbeck et al., 2017). Более того, было обнаружено, что состав сред, а также концентрация кислорода, достоверно влияет на процент развития blastоцист (Morbeck et al., 2017).

Стоит отметить, что в упомянутых работах подчеркивается выраженная стохастичность наблюдаемых изменений в транскриптом и эпигеноме эмбрионов, что может также отражать значительное влияние других биологических факторов на системы регуляции экспрессии генов ранних зародышей, помимо условий их культивирования (Mani, Mainigi, 2018; Ramos-Ibeas et al., 2019). Более детально влияние различных факторов культивиро-

вания на эпигеном эмбриона описано в соответствующих обзорных работах (Mani, Mainigi, 2018; Ramos-Ibeas et al., 2019).

*Влияние культивирования in vitro ранних эмбрионов млекопитающих на их постимплантационное развитие*

Условия оплодотворения и раннего преимплантационного развития эмбриона *in vivo* и *in vitro* существенно отличаются друг от друга (Summers, Biggers, 2003). Различные компоненты питательных сред и другие факторы культивирования способны нарушить формирование бластоцисты, вызвать уменьшение числа клеток во внутренней клеточной массе и изменения в экспрессии генов, которые впоследствии могут повлиять на течение беременности (Ramos-Ibeas et al., 2019). В частности, после процедуры ЭКО с последующим культивированием преимплантационных эмбрионов мыши на таких питательных средах как KSOMaa и Whitten's, повышается частота выкидышей (Delle Piane et al., 2010). Однако, в другой работе после культивирования эмбрионов мышей по 13 протоколам, используемым в настоящее время в клинике, не было отмечено повышенной частоты выкидышей (Schwarzer et al., 2012). Более того, в некоторых протоколах было отмечено снижение этого явления (Schwarzer et al., 2012). Также у разных видов млекопитающих после применения ВРТ, в том числе после культивирования *in vitro*, обнаруживается ограничение роста плода на ранних сроках беременности, однако, на более поздних ее этапах, наблюдается как значительное увеличение размера плаценты, так и ускорение развития плода (Delle Piane et al., 2010; Bloise et al., 2012, 2014). Это компенсаторное увеличение размеров плаценты в ответ на внутриутробную задержку роста у зародышей после применения ВРТ обеспечивает, вероятно, дополнительную поддержку плода (Bloise et al., 2014).

Противоречивые данные получены на мышах по влиянию ВРТ, и, в частности, культивирования *in vitro*, на изменение уровня апоптоза в плаценте (Raunig et al., 2011; Bloise et al., 2012). Одни исследователи показали усиление апоптоза после процедур ЭКО или интрацитоплазматической инъекции сперматозоида – ИКСИ (Raunig et al., 2011), другие такого изменения не обнаружили (Bloise et al., 2012). Также показана связь ВРТ с изменениями в транскриптоме плаценты у мышей (Delle Piane et al., 2010; Fauque et al., 2010), а также снижением плотности кровеносных сосудов в ней у КРС (Miles et al., 2005). Исходя из вышесказанного, можно заключить, что воздействие, которым подвергается преимплантационный эмбрион при проведении ВРТ, в частности, в период культивирования *in vitro*, оказывают влияние на дальнейшее пренатальное развитие плода,

а также, как показывают другие исследования, могут иметь отдаленные последствия в постнатальном онтогенезе у животных (Duranthon, Chavatte-Palmer, 2018; Sunde, 2019).

*Влияние культивирования in vitro эмбрионов человека на их постимплантационное развитие*

Влияние ВРТ на постимплантационное развитие было показано и у человека, при этом отклонения были подобны тем, что обнаружены на животных, в частности, в некоторых случаях, наблюдалась внутриутробная задержка роста плода, компенсаторное увеличение размеров плаценты и вероятность возникновения микрокальцинаций (Joy et al., 2012; Naavaldsen et al., 2012; Nelissen et al., 2013). Однако, частота спонтанных аборт при применении ВРТ в целом оставалась такой же, как и после естественного зачатия, хотя данных, включающих в себя сопутствующие факторы материнского возраста и другие, недостаточно, чтобы сделать однозначный вывод (Bloise et al., 2014). Новорожденные, зачатые с использованием ВРТ, чаще рождаются преждевременно и имеют низкую массу тела при рождении по сравнению с зачатыми естественным путем (Pandey et al., 2012; Wennerholm et al., 2020). Перинатальная смертность и врожденные аномалии в таких случаях также встречаются достоверно чаще, чем при спонтанной беременности (Pandey et al., 2012).

Несколько работ посвящено сравнению различных протоколов культивирования эмбрионов, которые используются в настоящее время в клинике, на внутриутробное развитие и перинатальные исходы (Zandstra et al., 2015). Однако, из 11 работ по этой теме, только в пяти было показано, что среды разных производителей могут влиять на массу тела ребенка при рождении, в шести эффекта не наблюдали (Zandstra et al., 2015).

Таким образом, качественный и количественный состав питательной среды, предназначенной для культивирования *in vitro* эмбрионов различных видов млекопитающих, в том числе и человека, а также другие условия, например, парциальное давление кислорода, могут оказывать влияние на эффективность развития преимплантационных зародышей. Исследования в данном направлении до сих пор являются актуальными, и нуждаются в продолжении.

**ВЛИЯНИЕ ВРТ НА ПОСТНАТАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ ПОТОМКОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

Согласно гипотезе “Онтогенетического происхождения здоровья и болезней” (Developmental Origins of Health and Disease) определенные нарушения у взрослых организмов зависят от условий их пренатального развития, в частности, от пита-

ния матери и, соответственно, зародыша во время беременности (Barker, 2007). В современной понимании этой гипотезы, она также касается периодов преимплантационного развития и имплантации (Fleming et al., 2015). В этой связи, весьма существенное влияние на раннее развитие зародышей может оказывать питательная среда, используемая для оплодотворения и культивирования *in vitro* (Sunde et al., 2019).

Исследования на животных показывают, что метаболизм у взрослых особей зависит от условий, с которыми они сталкиваются на преимплантационной стадии развития. ЭКО и культивирование *in vitro* ранних зародышей могут приводить к преобразованию траектории роста и развития организма, а на более поздних этапах онтогенеза, к нарушению липидного и углеводного метаболизма мышей (Bloise, 2014; Duranthon, Chavatte-Palmer, 2018). Так, небольшие изменения в соотношении пирувата и лактата в культуральной среде оказывают влияние на митохондриальную активность в зиготах и имеют долгосрочные последствия на вес потомков при рождении и дальнейший постнатальный рост у мышей (Banrezes et al., 2011). В другом исследовании было показано, что культивирование эмбрионов мышей в субоптимальной среде Whitten's при содержании кислорода в газовой смеси 20% приводило к усиленному постнатальному росту у самцов, сниженной толерантности к глюкозе и увеличенному левому желудочку сердца, тогда как при оптимальных условиях культивирования (KSOMaа и 5% O<sub>2</sub>) изменений у потомков не наблюдалось (Donjacour et al., 2014). В то же время имеются данные, указывающие на то, что использование как субоптимальной среды Whitten's, так и оптимальной среды KSOMaа для культивирования эмбрионов мышей приводило к изменению траектории постнатального роста, накоплению жира, повышению гипергликемии и нарушению функции поджелудочной железы у взрослых особей (Feuer et al., 2014). Кроме того, у мышей после процедур ЭКО и ИКСИ на среде CZB выявлены нарушения углеводного обмена: у потомков наблюдался больший вес при рождении и снижение толерантности к глюкозе, а также повышенная резистентность к инсулину (Scott et al., 2010). Полученные в этом исследовании результаты по весу при рождении противоречат некоторым исследованиям на людях, поскольку в некоторых случаях у детей, зачатых с помощью ВРТ вес при рождении не выше, а ниже, чем у детей после естественного зачатия (Wennerholm, Bergh, 2020). Данное противоречие может быть объяснено тем, что в отличие от человека, у мышей величина помета может существенно снижаться после ВРТ, за счет чего зародыши получают больше питательных веществ, а также использованием для экспериментов молодых и здоровых самок для вынашивания

беременностей, в то время как в клинику ВРТ обращаются люди с репродуктивными проблемами.

ЭКО и культивирование эмбрионов *in vitro* может вызывать некоторые изменения в развитии и функционировании сердечно-сосудистой системы. Культивирование *in vitro* эмбрионов мышей, начиная с двухклеточной стадии, приводило к повышенному артериальному давлению, связанному с повышенной активностью ангиотензин-превращающего фермента в сыворотке крови у самок в возрасте 27 нед. (Watkins et al., 2007). В другом исследовании было показано, что эндотелиальная дисфункция и повышенное артериальное давление (АД) у самцов мышей, полученных после применения ВРТ, сопровождалось изменениями в метилировании промотора гена, кодирующего eNOS в аорте, что коррелировало со сниженной экспрессией eNOS в сосудах и сниженным синтезом NO (Rexhaj et al., 2013). Однако, использование субоптимальной среды Whitten's приводило к снижению систолического давления у самцов мышей (Donjacour et al., 2014). В исследовании на гипертензивных крысах линии НИСАГ было показано, что культивирование *in vitro* преимплантационных эмбрионов в среде mR1ECM приводило к смягчению артериальной гипертензии, характерной для животных данной линии (Igonina et al., 2019). Эти расхождения в результатах исследователей могут быть связаны с различиями в экспериментальном дизайне, методах измерения артериального давления и генетическими характеристиками лабораторных животных.

В работах на мышах также находят различные поведенческие отклонения в постнатальном онтогенезе у животных рожденных после применения методов ВРТ (Ecker et al., 2004; Fernandez-Gonzalez et al., 2004). В частности, оплодотворенные *in vivo* эмбрионы инкубировали в среде KSOM с добавлением 10% фетальной сыворотки, при этом показана задержка в прорезывании резцов и созревании двигательной активности потомков в раннем постнатальном периоде развития, а также ухудшение долговременной памяти в возрасте 21 дня, сниженная тревожность в 5-месячном возрасте с последующим ее повышением в возрасте 15 мес. (Fernandez-Gonzalez et al., 2004). В другом исследовании у взрослых мышей, полученных из *in vivo* оплодотворенных и прокультивированных в средах KSOM и Whitten's эмбрионов, в возрасте 4–5 мес. наблюдалась сниженная тревожность, ухудшение пространственной памяти и увеличение локомоторной активности (Ecker et al., 2004). Однако, у потомков, полученных после использования среды HTF для культивирования эмбрионов мыши до стадии бластоцисты, никакого влияния на способность к обучению не выявлено (Li et al., 2011).

Таким образом, исследования на лабораторных моделях дают возможность оценки эффектов процедур ВРТ на долгосрочное здоровье и постнатальный фенотип. Тем не менее, важно отметить, что эффекты культуральной среды на лабораторных животных могут различаться в зависимости от генетической модели, выбранной для исследования, от возраста, в котором исследуют эффекты, а также от половой принадлежности потомков.

### ВЛИЯНИЕ ВРТ НА ПОСТНАТАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ ЧЕЛОВЕКА

Лечение бесплодия у человека с помощью методов ВРТ включает в себя такие основные этапы, как овариальная стимуляция, получение ооцитов и сперматозоидов, ЭКО/ИКСИ, культивирование эмбрионов *in vitro*, а также эмбриотрансфер. Все эти процедуры могут потенциально влиять на развивающийся эмбрион и, следовательно, на будущее здоровье ребенка. Кроме того, эти методы действуют в комплексе, что необходимо учитывать при интерпретации эффектов отдельных этапов ВРТ. Дополнительное влияние на здоровье потомства могут оказывать такие факторы, как собственно бесплодие и сопутствующие заболевания родителей (Jaques et al., 2010; Hayashi et al., 2012), материнский возраст (Kahveci et al., 2018; Pinheiro et al., 2019) и гормональная стимуляция яичников (Klemetti et al., 2010; Labarta et al., 2014). Вопрос о взаимодействии всех этих факторов и их связи с неблагоприятным влиянием на здоровье детей все еще остается открытым.

Следует также отметить, что до сих пор не существует единого “стандартного протокола” проведения ЭКО и культивирования *in vitro* преимплантационных эмбрионов в репродуктивной медицине. Различные лаборатории по всему миру используют разные питательные среды для проведения процедур ВРТ (Sunde, 2019). Анализируя фенотип детей, рожденных после культивирования эмбрионов *in vitro* на разных коммерческих средах, некоторые исследователи находят достоверное влияние этого фактора (Dumoulin et al., 2010; Kleijkers et al., 2015), другие же не находят никаких различий (Ziebe et al., 2013). Такое противоречие полученных результатов объясняется крайней сложностью интерпретации клинических данных, поскольку затруднительно провести стандартизацию условий исследования, в частности, еще и потому, что количественный состав компонентов большинства коммерческих сред, используемых в клинике, не предоставляется производителем (Tarahomi et al., 2019). Однако имеются исследования, иллюстрирующие значительные композиционные различия в составах некоторых коммерческих сред (Morbeck et al., 2017; Tarahomi et al., 2019).

### Перинатальные характеристики

Исследования последствий применения ВРТ на человеке прежде всего сосредоточены на показателях беременности и живорождений. Дети, зачатые с помощью ВРТ, несколько чаще рождаются недоношенными и имеют низкий для гестационного возраста вес, а также повышенный риск врожденных пороков развития (D'Angelo et al., 2011; Pinborg et al., 2013; Sunkara et al., 2019). Первоначально считалось, что это связано с многоплодной беременностью, но недавно эти риски также подтверждены по сравнению с естественно зачатыми и при одноплодной беременности (Pandey et al., 2012; Wennerholm, Bergh, 2020). Повышенные риски возникновения неблагоприятных перинатальных исходов после применения методов ВРТ связаны, по-видимому, со многими факторами (Sunkara et al., 2019). Ряд исследований указывает на связь неблагоприятных перинатальных исходов с субфертильностью пациентов (Jaques et al., 2010; Hayashi et al., 2012) возрастом родителей (Kahveci et al., 2018; Pinheiro et al., 2019). Между тем, различия по перинатальным исходам между спонтанными и полученными с помощью ВРТ беременностями сохраняются и после исключения влияния данных факторов (Pinborg et al., 2013), что может свидетельствовать о вкладе именно манипуляций в ходе ВРТ.

В частности, такой необходимый этап ВРТ, как овариальная стимуляция может оказывать негативное влияние на перинатальные исходы, даже в случае применения ее у женщин перед естественным зачатием (Klemetti et al., 2010; D'Angelo et al., 2011; Labarta et al., 2014). Одним из подходов является сравнение естественных и полученных с помощью ВРТ беременностей у одной и той же женщины. Такие исследования показывают повышенный риск преждевременных родов после применения ВРТ по сравнению с естественным зачатием (Pinborg et al., 2013), следовательно, факторы, связанные с гормональной стимуляцией и/или методами ВРТ, также могут играть важную роль. Интересную работу проделала немецко-британская группа, в которой была проанализирована выборка женщин, родивших первого ребенка после ИКСИ, а второго после применения данной процедуры, так и в результате естественного зачатия (Ludwig et al., 2008). Не было установлено достоверных отличий по продолжительности беременности, а также по весу новорожденных в обеих группах (Ludwig et al., 2008). В другой работе этих же исследователей было показано повышение частоты крипторхизма у мальчиков, рожденных после ИКСИ, по сравнению с естественно зачатыми (Ludwig et al., 2009a). Однако не было обнаружено никаких существенных различий по остальным показателям здоровья, в том числе по неврологическим отклонениям,

двигательным навыкам, эмоциональному развитию и интеллекту (Ludwig et al., 2009a, 2009b).

### Эпигенетические нарушения

Применение методов ВРТ сопряжено с потенциально чувствительным к воздействиям окружающей среды периодом эпигенетического перепрограммирования. Так, первая волна деметилирования-реметилирования происходит во время гаметогенеза, а вторая в течение преимплантационного развития (Zacchini et al., 2019). Анализ уровней метилирования некоторых генов в плаценте показал, что различия метилирования ДНК у детей, зачатых естественным путем и при помощи ВРТ, наблюдаются независимо от наличия родительского бесплодия (Song et al., 2015). Эпигенетические изменения связанные, вероятно, с культивированием *in vitro*, наблюдались также в человеческих гаметах и эмбрионах (El Hajj, Naaf, 2013). Было продемонстрировано, что экспрессия генов в преимплантационных зародышах изменяется в зависимости от культуральной среды, используемой для ЭКО и последующего *in vitro* культивирования (Kleijkers et al., 2015). Однако в другом исследовании пришли к выводу, что на глобальный профиль экспрессии генов в эмбрионе человека большее влияние оказывают такие факторы, как стадия развития эмбрионов и материнский возраст, а не тестируемая среда и условия культивирования (Mantikou et al., 2016).

ВРТ-ассоциированные изменения метилирования ДНК найдены в регионах дифференциально метилированной области (DMR), которые импринтированы во время гаметогенеза и эмбрионального развития (Hiura et al., 2014). По данным метаанализа Лазаравичиут с соавторами (2014), безлени геномного импринтинга, группа редких врожденных расстройств, возникают несколько чаще после применения ЭКО (Lazaraviciute et al., 2014). Установлено, что ВРТ ассоциированы с более высокой вероятностью развития заболеваний, обусловленных нарушениями геномного импринтинга, таких синдромов как Беквита-Видемана (СБВ), Ангельмана, Прадера-Вилли и Сильвера-Рассела (Nattori et al., 2019). Однако в клинической практике это не имеет большого значения. Например, СБВ остается крайне редким заболеванием даже при десятикратном увеличении риска у детей, рожденных после применения ВРТ (Mussa et al., 2017).

Одним из факторов, связанным с нарушением геномного импринтинга является мужская субфертильность. Метаанализ из 24 исследований показал значительное гипометилирование импринтированного гена *H19*, а также гиперметилирование *SNRPN* и *MEST* в сперматозоидах мужчин с идиопатическим бесплодием по сравнению с фертильным контролем (Santi et al., 2017). Дру-

гим фактором, который может влиять на эпигенетическое перепрограммирование в ооцитах, является гормональная индукция овуляции (Sato et al., 2007; Marshall, Rivera, 2018). Однако исследования ооцитов на людях ограничены в связи с небольшим количеством материала и недостатком подходящего контроля, с учетом возраста и общего расстройства оогенеза. Показано, что ооциты на стадии GV и MI, полученные от субфертильных женщин в результате гормональной стимуляции яичников, имеют увеличение метилирования гена *H19* и потерю метилирования в гене *PEG1* (Sato et al., 2007). Кроме того, необходимо учитывать влияние материнского возраста на эпигеном, поскольку известно, что поздний репродуктивный возраст связан с aberrантным глобальным метилированием ДНК в ооцитах и эмбрионах (Marshall, Rivera, 2018). В исследовании Хиура с соавторами (2014) обнаружен клеточный мозаицизм по уровням метилирования у детей с болезнями геномного импринтинга, зачатых с помощью ВРТ, что позволяет предположить, что эти изменения происходят во время первых делений клеток в период культивирования эмбрионов *in vitro* (Hiura et al., 2014). Таким образом, до сих пор неизвестно, когда возникают ошибки геномного импринтинга и какие факторы предрасполагают к эпигенетическим изменениям. Однако, имеется четкая ассоциация между применением ВРТ и специфическими нарушениями импринтинга.

### Метаболический синдром

Предпосылки к возникновению у людей отклонений в работе сердечно-сосудистой системы, а также заболеваний, связанных с нарушениями метаболизма, зачатых с использованием ВРТ, отмечали еще с тех пор, когда гипотеза DONaD была применена к преимплантационному периоду (Fleming et al., 2015, 2018). На протяжении более 40 лет у полученных в результате применения ВРТ потомков было исследовано состояние сердечно-сосудистой системы, сначала у детей, затем подростков и молодых взрослых (Ceelen et al., 2008; Scherrer et al., 2012; Guo et al., 2017; Meister et al., 2018; Halliday et al., 2019).

В одной из первых работ у детей препубертатного возраста (12 лет) было обнаружено небольшое, но достоверное повышение систолического артериального давления (САД) —  $109 \pm 11$  у детей после ВРТ по сравнению с  $105 \pm 10$  мм рт. ст. у естественно зачатых, и диастолического артериального давления (ДАД) —  $61 \pm 7$  у рожденных с применением ВРТ детей по сравнению с  $59 \pm 7$  мм рт. ст. у естественно зачатых (Ceelen et al., 2008). Стоит отметить, что в данной работе в качестве контроля использовалась выборка детей, рожденных у субфертильных родителей, таким образом, влияние родительского фактора бесплодия было ис-

ключено (Ceelen et al., 2008). Однако, несмотря на то что показатели АД были повышены, они оставались в пределах нормы для детей такого возраста (Ceelen et al., 2008).

В систематическом обзоре Гуо с соавторами (2017) был проведен метаанализ данных по артериальному давлению, включающих в себя выборку из 872 детей, зачатых в циклах ЭКО-ИКСИ и 3034 детей, зачатых естественных путем из 10 клинических исследований, в котором была обнаружена небольшая, но достоверная средневзвешенная разница в 1.88 мм рт. ст. по САД, и 1.52 мм рт. ст. по ДАД (Guo et al., 2017). Однако показатель гетерогенности в группах был довольно высоким. Между тем, этот показатель значительно снизился, когда авторы метаанализа стратифицировали выборку по году рождения. Это позволило выявить интересную особенность — дети, рожденные в 1990–1999 гг., имели достоверное повышение как САД (3.75 мм рт. ст.), так и ДАД (2.70 мм рт. ст.), в отличие от группы детей, рожденных в 2000–2009 гг. (0.186 мм рт. ст. — разница по САД и 0.19 мм рт. ст. — разница по ДАД). В дальнейшем авторы оценили вклад факторов более молодого возраста и преобладающего числа детей, зачатых с использованием именно ИКСИ, в 2000–2009 гг., но не обнаружили их влияния. Авторы предположили, что совершенствование программ ВРТ с течением времени, в том числе протоколов стимуляции овуляции и условий культивирования эмбрионов, внесли свой вклад в нивелирование различий по показателям АД между группами (Guo et al., 2017).

В этом же обзоре представлен метаанализ метаболических показателей, таких как уровень инсулина натощак, уровень глюкозы и липидный профиль у детей, зачатых с использованием ВРТ. Кроме того, объединены и проанализированы данные исследований по индексу массы тела (ИМТ), который является одним из диагностических критериев метаболического синдрома (Guo et al., 2017). Метаанализ семи исследований показал, что у детей, зачатых с помощью ЭКО/ИКСИ ( $n = 477$ ), наблюдается более высокий уровень инсулина натощак по сравнению с естественно зачатыми детьми ( $n = 185$ ), но не меняется уровень глюкозы и индекс инсулинорезистентности (Guo et al., 2017). Метаанализ данных пяти исследований показал, что дети, рожденные в результате ВРТ ( $n = 332$ ), имели статистически более низкий уровень липопротеинов низкой плотности по сравнению с детьми, рожденными в результате естественного оплодотворения ( $n = 1701$ ), в то время как уровень липопротеинов высокой плотности не отличался между группами. Таким образом, дети после ВРТ, имели более благоприятный липидный профиль (Guo et al., 2017). Данные 14 исследований, сообщавших об ИМТ (суммарная выборка составила 1914 детей после ЭКО-ИКСИ

и 3881 естественно зачатых), были объединены и проанализированы в том же обзоре: оказалось, что различия по данному показателю между группами не наблюдалось (Guo et al., 2017).

Интересные результаты были представлены в недавней работе, авторы которой проанализировали уровни важного компонента липидного гомеостаза — пропротеинконвертазы субтилизин/кексин 9 типа (PCSK9) в плазме крови у детей, зачатых с использованием ВРТ ( $n = 73$ ) и естественно рожденных ( $n = 73$ ) (Vlachopoulos et al., 2019). Было показано, что уровень PCSK9 возрастает с возрастом (в пределах двух лет, от восьми до десяти) у детей, рожденных после ВРТ, в то время как у естественно зачатых, напротив, снижается (Vlachopoulos et al., 2019). Возрастание уровня PCSK9 приводит к постепенному ухудшению липидного профиля у таких детей, что ведет к возрастанию рисков сердечно-сосудистых заболеваний (Vlachopoulos et al., 2019). Результаты данного исследования подчеркивают роль показателей липидного обмена как ранних индикаторов скрытых кардиометаболических нарушений в соответствии с методом зачатия (Vlachopoulos et al., 2019). Однако стоит отметить, что размер выборок был небольшим, и не был учтен вклад дополнительных факторов. Для того чтобы сделать однозначный вывод, необходимы дальнейшие исследования с большим размером выборок.

Помимо показателей АД, исследователями изучались структурно-функциональные особенности сердечно-сосудистой системы у детей, зачатых с использованием ВРТ (Scherrer et al., 2012; Valenzuela-Alcazar et al., 2013; Von Arx et al., 2015). В одной из этих работ показано проявление признаков как системной, так и легочной эндотелиальной дисфункции во время препубертатного периода (Scherrer et al., 2012). Позднее было показано, что изменения затрагивают не только АД и функцию сосудов, но и структуру сердца (Valenzuela-Alcazar et al., 2013; Von Arx et al., 2015). Были выявлены признаки ремоделирования сердца и сосудов у плодов и младенцев, зачатых с использованием ВРТ (Valenzuela-Alcazar et al., 2013). Следует отметить, что в данной работе различия между группами сохранялись даже после исключения из выборки детей с низкой массой тела при рождении, так как известно, что фетальное ремоделирование сердца ассоциировано с внутриутробной задержкой роста и соответственно низкой массой тела плода (Valenzuela-Alcazar et al., 2013). Таким образом, авторы предположили, что различия были связаны непосредственно с применением ВРТ, а не перинатальными факторами (Valenzuela-Alcazar et al., 2013). Недавно этой же группой исследователей было показано, что выявленные различия сохраняются до возраста трех лет (Valenzuela-Alcazar et al., 2019).

Однако вопрос о различиях на более поздних этапах жизни все еще остается дискуссионным: некоторые исследователи сообщают о дисфункции левого желудочка у детей 4–5 лет (Zhou et al., 2014; Liu et al., 2015), другие – о дисфункции правого желудочка у детей 12 лет, но проявляющейся только в стрессовых условиях (Von Arx et al., 2015). В недавнем исследовании на предмет признаков эндотелиальной дисфункции и мониторинга АД были протестированы дети подросткового возраста (средний возраст – 16.5 лет) (Meister et al., 2018). Стоит отметить, что в этой работе исследовалась та же когорта детей, что и в предыдущем исследовании с использованием таких же методов; выборки были выравнены по массе тела при рождении и гестационному возрасту, ни у кого из матерей детей из этих выборок не было осложненной беременности, которые бы могли внести свой вклад в отклонение от нормальных параметров функционирования сердечно-сосудистой системы (Scherrer et al., 2012). Оказалось, что спустя пять лет признаки системной эндотелиальной дисфункции у детей сохранились примерно в той же мере (Meister et al., 2018). Более того, 8 из 52 детей в группе ВРТ уже в этом возрасте подходили под критерии артериальной гипертензии первой степени (АД > 130/80 мм рт. ст.). Следует отметить, что в данной работе были исключены недоношенные дети и с низкой массой тела при рождении. Однако ограничениями в этой работе являлся сравнительно небольшой размер выборки (54 человека в группе ВРТ и 40 в контроле), а также то обстоятельство, что все дети являлись пациентами одной клиники (Meister et al., 2018). В противоположность данному исследованию, у молодых людей (22–35 лет) в Австралии в выборках из 193 человек в группе ВРТ и 86 в контрольной группе не было обнаружено каких-либо отклонений в параметрах работы сердечно-сосудистой системы (Halliday et al., 2019).

В связи с тем, что в клинических исследованиях выборки являются неоднородными вследствие влияния огромного числа факторов, вклад которых зачастую невозможно учесть в человеческой популяции, на данном этапе сложно вычленить влияние именно ВРТ, а тем более этапа культивирования эмбрионов. Тем не менее, следует более внимательно отнестись к состоянию здоровья и проводить мониторинг состояния сердечно-сосудистой системы у людей, зачатых в циклах ВРТ. Так как многие из выявленных признаков хоть и находятся в пределах нормы для данных возрастов, но являются прогностическими критериями заболеваний в будущем. Механизмы, лежащие в основе таких отклонений, до сих пор остаются неясными, однако если принять во внимание исследования на лабораторных моделях, можно предположить, что одной из причин могут быть специфиче-

ские изменения в паттернах экспрессии генов в системах регуляции АД (Wang et al., 2018).

Таким образом, в настоящее время накоплены данные по состоянию здоровья детей, рожденных после стандартного комплекса процедур ВРТ, состоящего обычно из ЭКО, либо ИКСИ с последующим культивированием *in vitro* и переносом эмбрионов. У некоторых детей, выявлены ВРТ-ассоциированные отклонения в сердечно-сосудистой, нервной и других системах организма, у них отмечают более высокие показатели систолического и диастолического давления, уровня глюкозы (Ceelen et al., 2008) и инсулина в крови (Guo et al., 2017), снижение периферической чувствительности к инсулину (Chen et al., 2014), а также более высокий коэффициент риска возникновения диабета (Kettner et al., 2016). Помимо этого, у них могут возникать изменения когнитивных способностей и интеллекта (Sandin et al., 2013; Liu et al., 2017).

#### *Заболевания центральной нервной системы*

Несмотря на то, что исследований, в которых пытались установить причинно-следственную связь между применением ВРТ и возникновением неврологических расстройств у детей достаточно много (Klemetti et al., 2006; Maimburg, Vaeth, 2007; Kallen et al., 2010; Sandin et al., 2013; Liu et al., 2017), лишь в нескольких из этих работ обнаружены предпосылки ее существования. В частности, противоречивые результаты были получены при попытках найти взаимосвязь между применением ВРТ и частотой возникновения детского церебрального паралича – ДЦП (Klemetti et al., 2006; Kallen et al., 2010). В одном из исследований было показано повышение риска возникновения этой патологии после применения ЭКО (Klemetti et al., 2006), однако в другой работе среди одноплодных беременностей статистически достоверного влияния этого фактора обнаружено не было, тем не менее исследователи показали более высокий риск развития ДЦП при вынашивании двойни (Kallen et al., 2010).

Противоречивые результаты были получены и по расстройствам аутистического спектра – РАС (Maimburg, Vaeth, 2007; Lehti et al., 2013; Sandin et al., 2013; Liu et al., 2017). В ранней работе на относительно небольшой выборке (976 человек) из Дании, за период 1990–1999 гг., было обнаружено снижение риска возникновения аутизма у детей после ВРТ на 59% по сравнению с зачатыми естественным путем (Maimburg, Vaeth, 2007). В другом более позднем исследовании, проведенный анализ истории болезни 16582 детей из Финляндии (рожденных в период 1991–2005 годы), не выявил достоверного влияния ЭКО на частоту РАС (Lehti et al., 2013). Однако наблюдалась достоверная связь данной процедуры с синдромом Аспергера у мальчиков (Lehti et al., 2013). Важно отме-



титель, что работы, связанные с исследованием влияния ВРТ на здоровье, в частности, на развитие нервной системы потомков, довольно гетерогенны по дизайну (Rumbold et al., 2017), например, исследовали смешанные группы детей, не разделенных по способу зачатия – ЭКО/ИКСИ (Pinborg et al., 2003).

Одна из первых работ, в которой разделили группы по способу зачатия (ЭКО или ИКСИ), была проведена в Швеции на обширной выборке более 2.5 миллиона человек, рожденных 1982–2007 гг. (Sandin et al., 2013). В данной работе было обнаружено незначительное повышение риска развития РАС, а также умственной отсталости, у детей, зачатых с использованием более инвазивного метода – ИКСИ, по сравнению с зачатыми путем применения традиционного ЭКО (Sandin et al., 2013). В дальнейшем, этот результат был подтвержден в работе, в которой изучали последствия применения ВРТ в клиниках США (Kissin et al., 2015). Авторы выявили, что 0.9% детей, рожденных с данным диагнозом после ИКСИ и 0.6% после ЭКО (Kissin et al., 2015). В других работах исследователи не выявили различий в неврологических функциях и когнитивных способностях у детей после ЭКО/ИКСИ и одноплодной беременности (Place, Englert, 2003; Ponjaert-Kristoffersen et al., 2004, 2005; Belva et al., 2007; Leunens et al., 2008; Wagenaar et al., 2008). В бельгийской работе на выборке из 66 детей, зачатых с помощью ИКСИ, 52 после ЭКО и 59 в контроле не было выявлено значительных отличий при сравнении этих групп между собой в возрасте трех и пяти лет по вербальным навыкам и IQ, но только при учете уровня родительского образования (Place, Englert, 2003). Другая группа исследователей из Бельгии позднее также не обнаружила значительных отличий по неврологическим показателям у детей в возрасте восьми лет, рожденных после ИКСИ ( $n = 150$ ) по сравнению с естественно зачатыми ( $n = 147$ ), кроме незначительных изменений в тестах на баланс и диадохокinez, которые ВРТ-группа выполняла несколько хуже (Belva et al., 2007). Однако, в тесте на касание кончиков пальцев дети, зачатые с помощью ИКСИ, имели лучшие показатели (Belva et al., 2007). В международном исследовании (на выборке из трех стран мира) при сравнении детей в дошкольном возрасте, рожденных после ИКСИ (300 человек) и естественно зачатых (260 человек) также не было обнаружено различий по итогам теста Векслера (Ponjaert-Kristoffersen et al., 2004). Позднее эта же группа на выборке детей пятилетнего возраста из пяти европейских стран (ИКСИ, ЭКО и контроль: 511, 424 и 488 человек, соответственно) показала, что способ зачатия (ЭКО или ИКСИ) не оказывает влияние на интеллектуальное развитие ребенка (Ponjaert-Kristoffersen et al., 2005). Тем не менее, авторы уточняют, что такие факторы, как

возраст и образование матери могут влиять на когнитивное развитие детей, рожденных с помощью ВРТ, по сравнению с естественно зачатыми (Ponjaert-Kristoffersen et al., 2005). Эта же группа позднее показала, что дети в возрасте восьми лет, рожденные в Бельгии, из группы ВРТ ( $n = 151$ ) имели более высокий показатель IQ по сравнению с контролем ( $n = 153$ ); авторы связывают это с более высоким уровнем образования их матерей (Leunens et al., 2006). Тем не менее, через два года у этих детей показатели интеллектуального развития выравнивались, что также может быть связано с ослаблением эффекта влияния матери (Leunens et al., 2008). В нидерландской работе, выполненной на выборке из школьников в возрасте 8–18 лет, было проведено исследование влияния ЭКО на когнитивные способности детей (Wagenaar et al., 2008). В результате не было выявлено достоверных отличий между группами ЭКО ( $n = 233$ ) и контролем ( $n = 233$ ) по успеваемости и умственным способностям (Wagenaar et al., 2008). Британские ученые показали, что дети, рожденные в результате ВРТ в возрасте трех и пяти лет, имели более высокие показатели вербальных способностей по сравнению с естественно зачатыми; однако к 11-ти годам эта разница нивелировалась (Barbuscia, Mills, 2017). Данные из представленных работ свидетельствуют в пользу того, что в человеческом обществе более важную роль для формирования когнитивных способностей у ребенка играют социальные факторы в семье, нежели возможное влияние процедуры ВРТ.

В 2017 г. был опубликован первый метаанализ, который включал в себя три популяционных исследования и восемь исследований типа “случай-контроль”, проведенные за период 2006–2015 гг., на разнородной выборке из более восьми миллионов детей, который подтвердил связь применения ВРТ с незначительным повышением риска возникновения РАС у потомков (Liu et al., 2017). Четыре из взятых в анализ исследований были проведены в Европе, четыре в Америке и три в Азии. В работах, которые вошли в данный метаанализ оценивалось влияние либо в целом ВРТ, либо ЭКО или ИКСИ по отдельности. В целом, результаты метаанализа показали, что использование ВРТ может приводить к повышению частоты РАС у детей. Кроме того, в европейских странах, а также среди азиатского населения показана достоверная связь между ВРТ и риском развития РАС. Авторы метаанализа предполагают, что возможно эпигенетические изменения, возникающие вследствие манипуляций с гаметами и эмбрионами, гормональной стимуляции, замораживанием и культивированием эмбрионов и других процедур ВРТ лежат в основе выявленного феномена (Liu et al., 2017). Однако, для подтверждения данной гипотезы, необходимо про-



ведение молекулярно-генетического анализа эмбрионов, полученных *in vitro* (Liu et al., 2017).

Приведенный обзор литературных источников демонстрирует, что данные о влиянии ВРТ на развитие заболеваний ЦНС у людей весьма противоречивы и сложно интерпретируемы. Кроме того, важную роль в постнатальной жизни ребенка играет материнский фактор, здоровье и возраст родителей, а также их уровень образования (Ponjaert-Kristoffersen et al., 2005; Barbuscia, Mills, 2017). Поэтому, для того чтобы корректно оценить влияние тех или иных репродуктивных процедур на перинатальные исходы, необходимо исключить влияние негативных материнских факторов (Sunkara et al., 2019). Исходя из этого, для понимания воздействия данных технологий на организм потомков создают экспериментальные модели на животных (Ramos-Ibeas et al., 2019).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, имеется достаточно много работ, в которых делают попытку установить связь между применением ВРТ и изменением развития как в пренатальном, так и в постнатальном онтогенезе. В настоящее время существует разнообразие питательных сред для культивирования *in vitro* преимплантационных эмбрионов млекопитающих, в том числе, человека. Качественный и количественный состав этих сред может оказывать существенное влияние на пре- и постимплантационное развитие зародышей. Несмотря на то, что большинство младенцев после ВРТ здоровы, некоторые исследования показывают, что эти процедуры могут влиять как на перинатальные исходы, так и на долгосрочное здоровье этих детей (Duganthon, Chavatte-Palmer, 2018). Более того, имеются работы, в которых устанавливают взаимосвязь между ВРТ и различными заболеваниями ЦНС у человека. Однако результаты этих исследований до сих пор остаются весьма противоречивыми. Поскольку интерпретация медицинских данных затруднена в связи с сопутствующими заболеваниями родителей, различиями в применяемых протоколах и другими сложно поддающимися учету факторами, все это создает мотивацию для постановки экспериментов на лабораторных животных.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность ЦКП “Генетических ресурсов лабораторных животных” и ЦКП “Микроскопического анализа биологических объектов” ИЦиГ СО РАН.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-015-

00162), а также бюджетного проекта ИЦиГ СО РАН (проект № 0259-2019-0003-С-01).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

### ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

С.В. Раннева и Е.Ю. Брусенцев ответственны за подготовку раздела “Оптимизация культуральных систем”, а также подготовку таблиц; Д.С. Рагаева и Н.И. Ершов ответственны за подготовку раздела “Особенности развития преимплантационных эмбрионов млекопитающих *in vitro* и влияние на последующий онтогенез”; Т.Н. Игонина, И.Н. Рожкова и А.Л. Левинсон ответственны за подготовку раздела “Отдаленные последствия врт на постнатальное развитие потомков млекопитающих”; С.Я. Амстиславский участвовал в написании всех разделов и осуществлял общую редакцию статьи.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Брусенцев Е.Ю., Игонина Т.Н., Рожкова И.Н., Рагаева Д.С., Амстиславский С.Я. Эффекты воздействия факторов роста при культивировании *in vitro* эмбрионов мышей и крыс // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015. Т. 19. № 4. С. 372–377.
- Брусенцев Е.Ю., Игонина Т.Н., Амстиславский С.Я. Традиционные и современные подходы к культивированию преимплантационных эмбрионов *in vitro* // Онтогенез. 2014. Т. 45. № 2. С. 73–88.
- Кожевникова В.В., Игонина Т.Н., Брусенцев Е.Ю. и др. Сравнение преимплантационного развития эмбрионов крыс линий OXYS и WAG в условиях *in vivo* и *in vitro* // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. Т. 21. № 7. С. 810–815.
- Adamson G.D., de Mouzon J., Chambers G.M. et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology: world report on assisted reproductive technology, 2011 // Fertility and Sterility. 2018. V. 110. № 6. P. 1067–1080.
- Aghaz F., Hajarian H., Karami Shabankareh H. *In vitro* culture medium (IVC) supplementation with sericin improves developmental competence of ovine zygotes // Reprod. Biol. 2016. V. 16. № 1. P. 87–90.
- Aguiar J., Reyley M. The uterine tubal fluid: secretion, composition and biological effects // Anim. Reprod. 2005. V. 2. № 2. P. 91–105.
- Amstislavsky S., Brusentsev E., Kizilova E. et al. Sperm cryopreservation in the Far-Eastern wildcat (*Prionailurus bengalensis euphilurus*) // Reprod. Dom. Anim. 2018. V. 53. № 5. P. 1219–1226.

- Amstislavsky S., Brusentsev E., Kizilova E. et al.* Embryo cryopreservation and *in vitro* culture of preimplantation embryos in Campbell's hamster (*Phodopus campbelli*) // *Theriogenology*. 2015. V. 83. № 6. P. 1056–1063.
- Amstislavsky S., Lindeberg H., Luvoni G.* Reproductive technologies relevant to the genome resource bank in Carnivora // *Reprod. Domest. Anim.* 2012. V. 47. № 1. P. 164–175.
- Aviles M., Gutierrez-Adan A., Coy P.* Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs? // *Molecular Human Reproduction*. 2010. V. 16. № 12. P. 896–906.
- Banrezes B., Sainte-Beuve T., Canon E. et al.* Adult body weight is programmed by a redox-regulated and energy-dependent process during the pronuclear stage in mouse // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 12. e29388.
- Barbuscia A., Mills M.C.* Cognitive development in children up to age 11 years born after ART—a longitudinal cohort study // *Hum. Reprod.* 2017. V. 24. P. 1–7.
- Barker D.J.* The origins of the developmental origins theory // *J. Intern. Med.* 2007. V. 261. № 5. P. 412–417.
- Belli M., Zhang L., Liu X. et al.* Oxygen concentration alters mitochondrial structure and function in *in vitro* fertilized preimplantation mouse embryos // *Hum. Reprod.* 2019. V. 34. № 4. P. 601–611.
- Belva F., Henriot S., Liebaers I. et al.* Medical outcome of 8-year-old singleton ICSI children (born > or = 32 weeks' gestation) and a spontaneously conceived comparison group // *Hum. Reprod.* 2007. V. 22. № 2. P. 506–515.
- Berntsen S., Soderstrom-Anttila V., Wennerholm U.B. et al.* The health of children conceived by ART: “the chicken or the egg?” // *Hum. Reprod. Update*. 2019. V. 25. № 2. P. 137–158.
- Biggers J.D., McGinnis L.K., Lawitts J.A.* One-step versus two-step culture of mouse preimplantation embryos: is there a difference? // *Hum. Reprod.* 2005. V. 20. № 12. P. 3376–3384.
- Biggers J.D., McGinnis L.K., Lawitts J.A.* Enhanced effect of glycyl-L-glutamine on mouse preimplantation embryos *in vitro* // *Reprod. Biomed. Online*. 2004. V. 9. № 1. P. 59–69.
- Biggers J.D., McGinnis L.K.* Evidence that glucose is not always an inhibitor of mouse preimplantation development *in vitro* // *Hum. Reprod.* 2001. V. 16. № 1. P. 153–163.
- Biggers J.D., McGinnis L.K., Raffin M.* Amino acids and preimplantation development of the mouse in protein-free potassium simplex optimized medium // *Biol. Reprod.* 2000. V. 63. № 1. P. 281–293.
- Bloise E., Feuer S.K., Rinaudo P.F.* Comparative intrauterine development and placental function of ART concepti: implications for human reproductive medicine and animal breeding // *Hum. Reprod. Update*. 2014. V. 20. № 6. P. 822–839.
- Bloise E., Lin W., Liu X. et al.* Impaired placental nutrient transport in mice generated by *in vitro* fertilization // *Endocrinology*. 2012. V. 153. P. 3457–3467.
- Bowman P., McLaren A.* Cleavage rate of mouse embryos *in vivo* and *in vitro* // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1970. V. 24. № 1. P. 203–207.
- Bradley J., Swann K.* Mitochondria and lipid metabolism in mammalian oocytes and early embryos // *Int. J. Dev. Biol.* 2019. V. 63. P. 93–103.
- Brusentsev E., Kizilova E., Mokrousova V. et al.* Characteristics and fertility of domestic cat epididymal spermatozoa cryopreserved with two different freezing media // *Theriogenology*. 2018. V. 110. P. 148–152.
- Brusentsev E. Yu., Igonina T.N., Abramova T.O. et al.* Cryopreservation, *in vitro* culture and transfer of preimplantation embryos in Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*) // *Reprod. Dom. Anim.* 2015. V. 50. P. 677–683.
- Canovas S., Ivanova E., Romar R. et al.* DNA methylation and gene expression changes derived from assisted reproductive technologies can be decreased by reproductive fluids // *Elife*. 2017. V. 6. P. 1–24.
- Ceelen M., van Weissenbruch M.M., Vermeiden J.P.W. et al.* Cardiometabolic differences in children born after *in vitro* fertilization: follow-up study // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008. V. 93. № 5. P. 1682–1688.
- Chatot C.L., Lewis J.L., Torres I., Ziomek C.A.* Development of 1-cell embryos from different strains of mice in CZB medium // *Biol. Reprod.* 1990. V. 42. № 3. P. 432–440.
- Chen M., Wu L., Zhao J. et al.* Altered glucose metabolism in mouse and humans conceived by IVF // *Diabetes*. 2014. V. 63. № 10. P. 3189–3198.
- Choi Y.H., Love C.C., Varner D.D., Love L.B., Hinrichs K.* Effects of gas conditions, time of medium change, and ratio of medium to embryo on *in vitro* development of horse oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection // *Theriogenology*. 2003a. V. 59. № 5–6. P. 1219–1229.
- Choi Y.H., Chung Y.G., Walker S.C., Westhusin M.E., Hinrichs K.* *In vitro* development of equine nuclear transfer embryos: effects of oocyte maturation media and amino acid composition during embryo culture // *Zygote*. 2003b. V. 11. № 1. P. 77–86.
- Cozzi J., Wang E., Jacquet C. et al.* Procedures for somatic cell nuclear transfer in the rat // *Methods Mol. Biol.* 2010. V. 597. P. 137–150.
- D'Angelo D.V., Whitehead N., Helms K., Barfield W., Ahluwalia I.B.* Birth outcomes of intended pregnancies among women who used assisted reproductive technology, ovulation stimulation, or no treatment // *Fertil. Steril.* 2011. V. 96. № 2. P. 314–320.
- de Waal E., Mak W., Calhoun S. et al.* *In vitro* culture increases the frequency of stochastic epigenetic errors at imprinted genes in placental tissues from mouse concept produced through assisted reproductive technologies // *Biol. Reprod.* 2014. V. 90. № 2. P. 22.
- Delle Piane L., Lin W., Liu X. et al.* Effect of the method of conception and embryo transfer procedure on mid-gestation placenta and fetal development in an IVF mouse model // *Hum. Reprod.* 2010. V. 25. P. 2039–2046.
- Dieamant F., Petersen C.G., Mauri A.L. et al.* Single versus sequential culture medium: which is better at improving ongoing pregnancy rates? A systematic review and meta-analysis // *JBRA Assist. Reprod.* 2017. V. 21. № 3. P. 240–246.
- Dinopoulou V., Drakakis P., Kefala S. et al.* Effect of recombinant-LH and hCG in the absence of FSH on *in vitro* maturation (IVM) fertilization and early embryonic development of mouse germinal vesicle (GV)-stage oocytes // *Reprod. Biol.* 2016. V. 16. № 2. P. 138–146.

- 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. V. 90. № 4. P. 80.
- Dumoulin J.C., Land J.A., Van Montfoort A.P., et al. Effect of *in vitro* culture of human embryos on birthweight of newborns // *Hum. Reprod.* 2010. V. 25. № 3. P. 605–612.
- Duranthon V., Chavatte-Palmer P. Long term effects of ART: What do animals tell us? // *Mol. Reprod. Dev.* 2018. V. 85. № 4. P. 348–368.
- 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. 1595–1600.
- El Hajj N., Haaf T. Epigenetic disturbances in *in vitro* cultured gametes and embryos: implications for human assisted reproduction // *Fertil. Steril.* 2013. V. 99. № 3. P. 632–641.
- Fauque P., Mondon F., Letourneur F. et al. *In vitro* fertilization and embryo culture strongly impact the placental transcriptome in the mouse model // *PLoS One.* 2010. V. 5. e9218.
- 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.
- Feuer S., Liu X., Donjacour A., et al. Common and specific transcriptional signatures in mouse embryos and adult tissues induced by *in vitro* procedures // *Reproduction.* 2016. pii: REP-16-0473.
- Feuer S.K., Liu X., Donjacour A. et al. Use of a mouse *in vitro* fertilization model to understand the developmental origins of health and disease hypothesis // *Endocrinology.* 2014. V. 155. № 5. P. 1956–1969.
- Finger B.J., Harvey A.J., Green M.P., Gardner D.K. Combined parental obesity negatively impacts preimplantation mouse embryo development, kinetics, morphology and metabolism // *Hum. Reprod.* 2015. V. 30. № 9. P. 2084–2096.
- Fischer B., Bavister B.D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits // *Reproduction.* 1993. V. 99. № 2. P. 673–679.
- Fleming T.P., Watkins A.J., Velazquez M.A. et al. Origins of lifetime health around the time of conception: causes and consequences // *Lancet.* 2018. V. 391. № 10132. P. 1842–1852.
- Fleming T.P., Velazquez M.A., Eckert J.J. Embryos, DOHaD and David Barker // *J. Dev. Orig. Health. Dis.* 2015. V. 6. № 5. P. 377–383.
- Gardner D.K., Lane M. Mammalian preimplantation embryo culture // *Methods. Mol. Biol.* 2014. V. 1092. P. 167–182.
- Gardner D.K., Lane M., Watson A.J. A Laboratory Guide to the Mammalian Embryo. Oxford University Press, 2004. 393 p.
- Gardner D.K. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture // *Theriogenology.* 1998. V. 49. № 1. P. 83–102.
- Guo X.Y., Liu X.M., Jin L. et al. Cardiovascular and metabolic profiles of offspring conceived by assisted reproductive technologies: a systematic review and meta-analysis // *Fertil. Steril.* 2017. V. 107. № 3. P. 622–631.
- 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. V. 27. P. 576–582.
- Halliday J., Lewis S., Kennedy J. et al. Health of adults aged 22 to 35 years conceived by assisted reproductive technology // *Fertil. Steril.* 2019. V. 112. № 1. P. 130–139.
- 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.
- Hattori H., Hiura H., Kitamura A. et al. Association of four imprinting disorders and ART // *Clin. Epigenetics.* 2019. V. 11. № 1. P. 21.
- Hayashi M., Nakai A., Satoh S., Matsuda Y. Adverse obstetric and perinatal outcomes of singleton pregnancies may be related to maternal factors associated with infertility rather than the type of assisted reproductive technology procedure used // *Fertil. Steril.* 2012. V. 98. № 4. P. 922–928.
- 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.
- Higdon H.L. 3rd, Blackhurst D.W., Boone W.R. Incubator management in an assisted reproductive technology laboratory // *Techniques and Instrumentation.* 2008. V. 89. № 3. P. 703–710.
- Hiura H., Okae H., Chiba H. et al. Imprinting methylation errors in ART // *Reprod. Med. Biol.* 2014. V. 13. № 4. P. 193–202.
- Hosseini S.M., Hajian M., Ostadhosseini S. et al. Contrasting effects of G1.2/G2.2 and SOF1/SOF2 embryo culture media on pre- and post-implantation development of non-transgenic and transgenic cloned goat embryos // *Reprod. Biomed. Online.* 2015. V. 31. № 3. P. 372–383.
- Igonina T.N., Ragaeva D.S., Petrova O.M. et al. Effects of *in vitro* culture at the preimplantation embryo stage on early development and hypertension in ISIAH rats // *Hypertens. Pregnancy.* 2019. V. 38. № 4. P. 208–216.
- Izquierdo D., Villamediana P., Paramio M.T. Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes // *Theriogenology.* 1999. V. 52. № 5. P. 847–861.
- Jaques A.M., Amor D.J., Baker H.W. et al. Adverse obstetric and perinatal outcomes in subfertile women conceiving without assisted reproductive technologies // *Fertil. Steril.* 2010. V. 94. № 7. P. 2674–2679.
- Joy J., Gannon C., McClure N., Cooke I. Is assisted reproduction associated with abnormal placentation? // *Pediatr. Dev. Pathol.* 2012. V. 15. P. 306–314.
- Kahveci B., Melekoglu R., Evruke I.C., Cetin C. The effect of advanced maternal age on perinatal outcomes in nulliparous singleton pregnancies // *BMC Preg. Child.* 2018. V. 18. № 1. P. 343.
- Kallen A.J., Finnstrom O.O., Lindam A.P. et al. Cerebral palsy in children born after *in vitro* fertilization. Is the risk decreasing? // *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 2010. V. 14. № 6. P. 526–530.

- Kasterstein E., Strassburger D., Komarovskiy D. et al. The effect of two distinct levels of oxygen concentration on embryo development in a sibling oocyte study // *J. Assisted Reproduction and Genetics*. 2013. V. 30. № 8. P. 1073–1079.
- Kawamura K., Chen Y., Shu Y. et al. Promotion of human early embryonic development and blastocyst outgrowth in vitro using autocrine/paracrine growth factors // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 11. e49328.
- Kettner L.O., Matthiesen N.B., Ramlau-Hansen C.H. et al. Fertility treatment and childhood type 1 diabetes mellitus: a nationwide cohort study of 565,116 live births // *Fertil. Steril.* 2016. V. 106. № 7. P. 1751–1756.
- Kissin D.M., Zhang Y., Boulet S.L. et al. Association of assisted reproductive technology (ART) treatment and parental infertility diagnosis with autism in ART-conceived children // *Hum. Reprod.* 2015. V. 30. № 2. P. 454–465.
- Klemetti R., Sevon T., Gissler M., Hemminki E. Health of children born after ovulation induction // *Fertil. Steril.* 2010. V. 93. № 4. P. 1157–1168.
- Klemetti R., Sevon T., Gissler M., Hemminki E. Health of children born as a result of *in vitro* fertilization // *Pediatrics*. 2006. V. 118. № 5. P. 1819–1827.
- Kleijkers S.H., Eijssen L.M., Coonen E. et al. Differences in gene expression profiles between human preimplantation embryos cultured in two different IVF culture media // *Hum. Reprod.* 2015. V. 30. № 10. P. 2303–2311.
- Labarta E., Bosch E., Pellicer A. Impact of ovarian stimulation with gonadotrophins on embryo aneuploidy // *Hum. Reprod. Update*. 2014. V. 20. № 6. P. 964.
- Lane M., Gardner D.K., Hasler M.J., Hasler J.F. Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture // *Theriogenology*. 2003. V. 60. № 3. P. 407–419.
- Lawitts J.A., Biggers J.D. Culture of Preimplantation Embryos // *Methods. Enzymol.* 1993. V. 225. P. 153–164.
- Lawitts J.A., Biggers J.D. Overcoming the 2-cell block by modifying standard components in a mouse embryo culture medium // *Biol. Reprod.* 1991. V. 45. № 2. P. 245–251.
- Lazaraviciute G., Kauser M., Bhattacharya S., Haggarty P., Bhattacharya S. A systematic review and meta-analysis of DNA methylation levels and imprinting disorders in children conceived by IVF/ICSI compared with children conceived spontaneously // *Hum. Reprod. Update*. 2014. V. 20. № 6. P. 840–852.
- Le Saint C., Crespo K., Bourdieu A. et al. Autologous endometrial cell co-culture improves human embryo development to high-quality blastocysts: a randomized controlled trial // *Reproductive Biomedicine Online*. 2019. V. 38. № 3. P. 321–329.
- Leese H.J. The formation and function of oviduct fluid // *J. Reprod. Fertil.* 1988. V. 82. P. 843–856.
- Lehti V., Brown A.S., Gissler M. et al. Autism spectrum disorders in IVF children: a national case-control study in Finland // *Hum. Reprod.* 2013. V. 28. № 3. P. 812–818.
- Leunens L., Celestin-Westreich S., Bonduelle M., Liebaers I., Ponjaert-Kristoffersen I. Follow-up of cognitive and motor development of 10-year-old singleton children born after ICSI compared with spontaneously conceived children // *Hum. Reprod.* 2008. V. 23. № 1. P. 105–111.
- Leunens L., Celestin-Westreich S., Bonduelle M., Liebaers I., Ponjaert-Kristoffersen I. Cognitive and motor development of 8-year-old children born after ICSI compared to spontaneously conceived children // *Hum. Reprod.* 2006. V. 21. № 11. P. 2922–2929.
- Li L., Le F., Wang L.Y. et al. Normal epigenetic inheritance in mice conceived by *in vitro* fertilization and embryo transfer // *J. Zhejiang Univ. Sci. B*. 2011. V. 12. № 10. P. 796–804.
- Li Z.Y., Jiang Q.S., Zhang Y.L., Liu X.M., Engelhardt J.F. Successful production of offspring after superovulation and *in vitro* culture of embryos from domestic ferrets (*Mustela putorius furo*) // *Reproduction*. 2001. V. 122. № 4. P. 611–618.
- Lindeberg H., Jalkanen L., Savolainen R. *In vitro* culture of silver fox embryos // *Theriogenology*. 1993. V. 40. № 4. P. 779–788.
- Liu L., Gao J., He X. et al. Association between assisted reproductive technology and the risk of autism spectrum disorders in the offspring: a meta-analysis // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 46207.
- Liu H., Zhang Y., Gu H. et al. Association between assisted reproductive technology and cardiac alteration at age 5 years // *JAMA Pediatr.* 2015. V. 169. № 6. P. 603–605.
- Liu Z., Foote R.H., Simkin M.E. Effect of amino acids and alpha-amanitin on the development of rabbit embryos in modified protein-free KSOM with HEPES // *Mol. Reprod. Dev.* 1996. V. 45. № 2. P. 157–162.
- Ludwig A.K., Katalinic A., Thyen U. et al. Physical health at 5.5 years of age of term-born singletons after intracytoplasmic sperm injection: results of a prospective, controlled, single-blinded study // *Fertil. Steril.* 2009a. V. 91. № 1. P. 115–124.
- Ludwig A., Katalinic A., Thyen U. et al. Neuromotor development and mental health at 5.5 years of age of singletons born at term after intracytoplasmic sperm injection ICSI: results of a prospective controlled single-blinded study in Germany // *Fertil. Steril.* 2009b. V. 91. № 1. P. 125–132.
- Ludwig A.K., Katalinic A., Jendrysek J. et al. Spontaneous pregnancy after successful ICSI treatment: evaluation of risk factors in 899 families in Germany // *Reprod. Biomed. Online*. 2008. V. 17. № 3. P. 403–409.
- 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.
- Machaty Z., Day B.N., Prather R.S. Development of early porcine embryos *in vitro* and *in vivo* // *Biol. Reprod.* 1998. V. 59. № 2. P. 451–455.
- Maimburg R.D., Vaeth M. Do children born after assisted conception have less risk of developing infantile autism? // *Hum. Reprod.* 2007. V. 22. № 7. P. 1841–1843.
- Makieva S., Giacomini E., Ottolina J. et al. Inside the endometrial cell signaling subway: Mind the gap (s) // *International Journal of Molecular Sciences*. 2018. V. 19. № 9. P. 2477.
- Mani S., Ghosh J., Coutifaris C. et al. Epigenetic changes and assisted reproductive technologies // *Epigenetics*. 2020. V. 15. № 1–2. P. 12–25.
- Mani S., Mainigi M. Embryo culture conditions and the epigenome // *Semin. Reprod. Med.* 2018. V. 36. P. 211–220.

- Mantikou E., Jonker M.J., Wong K.M. et al.* Factors affecting the gene expression of *in vitro* cultured human preimplantation embryos // *Hum. Reprod.* 2016. V. 31. № 2. P. 298–311.
- Mara L., Sanna D., Casu S., Dattena M., Munoz I.M.* Blastocyst rate of *in vitro* embryo production in sheep is affected by season // *Zygote.* 2014. V. 22. № 3. P. 366–371.
- Market-Velker B.A., Fernandes A.D., Mann M.R.* Side-by-side comparison of five commercial media systems in a mouse model: suboptimal *in vitro* culture interferes with imprint maintenance // *Biol. Reprod.* 2010. V. 83. № 6. P. 938–950.
- Marshall K.L., Rivera R.M.* The effects of superovulation and reproductive aging on the epigenome of the oocyte and embryo // *Mol. Reprod. Dev.* 2018. V. 85. № 2. P. 90–105.
- Meister T.A., Rimoldi S.F., Soria R. et al.* Association of assisted reproductive technologies with arterial hypertension during adolescence // *J. Am. Col. Card.* 2018. V. 72. № 11. P. 1267–1274.
- Men H., Stone B.J., Bryda E.C.* Media optimization to promote rat embryonic development to the blastocyst stage *in vitro* // *Theriogenology.* 2020. V. 151. P. 81–85.
- Menezo Y., Lichtblau I., Elder K.* New insights into human pre-implantation metabolism *in vivo* and *in vitro* // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* 2013. V. 30. № 3. P. 293–303.
- Miles J.R., Farin C.E., Rodriguez K.F., Alexander J.E., Farin P.W.* Effects of embryo culture on angiogenesis and morphometry of bovine placentas during early gestation // *Biol. Reprod.* 2005. V. 73. P. 663–671.
- Miller K.* Optimizing culture conditions. Chapter 17. Published by Cambridge university press. Culture media, solutions, and systems in human ART. ed. Patrick Quinn. Cambridge University Press, 2014.
- 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.
- Miyoshi K., Funahashi H., Okuda K. et al.* Development of rat one-cell embryos in a chemically defined medium: effects of glucose, phosphate and osmolarity // *J. Reprod. Fertil.* 1994. V. 100. P. 21–26.
- Morbeck D.E., Baumann N.A., Oglesbee D.* Composition of single-step media used for human embryo culture // *Fertil. Steril.* 2017. V. 107. № 4. P. 1055–1060. e1.
- Morbeck D.E., Krisher R.L., Herrick J.R. et al.* Composition of commercial media used for human embryo culture // *Fertil. Steril.* 2014. V. 102. № 3. P. 759–766. e9.
- Mussa A., Molinatto C., Cerrato F. et al.* Assisted reproductive techniques and risk of Beckwith-Wiedemann syndrome // *Pediatrics.* 2017. V. 140. № 1. pii: e20164311.
- Nakamura K., Morimoto K., Shima K. et al.* The effect of supplementation of amino acids and taurine to modified KSOM culture medium on rat embryo development // *Theriogenology.* 2016. V. 86. № 8. P. 2083–2090.
- Nedambale T.L., Dinnyes A., Groen W. et al.* Comparison on *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification // *Theriogenology.* 2004. V. 62. № 3–4. P. 437–449.
- Nelissen E.C., Dumoulin J.C., Daunay A. et al.* Placentas from pregnancies conceived by IVF/ICSI have a reduced DNA methylation level at the H19 and MEST differentially methylated regions // *Hum. Reprod.* 2013. V. 28. P. 1117–1126.
- Pandey S., Shetty A., Hamilton M., Bhattacharya S., Maheshwari A.* Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from IVF/ICSI: a systematic review and meta-analysis // *Hum. Reprod. Update.* 2012. V. 18. № 5. P. 485–503.
- Pinborg A., Wennerholm U.B., Romundstad L.B. et al.* Why do singletons conceived after assisted reproduction technology have adverse perinatal outcome? Systematic review and meta-analysis // *Hum. Reprod. Update.* 2013. V. 19. № 2. P. 87–104.
- Pinborg A., Loft A., Schmidt L., Andersen A.N.* Morbidity in a Danish national cohort of 472 IVF/ICSI twins, 1132 non-IVF/ICSI twins and 634 IVF/ICSI singletons: health-related and social implications for the children and their families // *Hum. Reprod.* 2003. V. 18. № 6. P. 1234–1243.
- Pinheiro R.L., Areia A.L., Mota Pinto A., Donato H.* Advanced maternal age: adverse outcomes of pregnancy, a meta-analysis // *Acta. Med. Port.* 2019. V. 32. № 3. P. 219–226.
- Place I., Englert Y.* A prospective longitudinal study of the physical, psychomotor, and intellectual development of singleton children up to 5 years who were conceived by intracytoplasmic sperm injection compared with children conceived spontaneously and by *in vitro* fertilization // *Fertil. Steril.* 2003. V. 80. № 6. P. 1388–1397.
- Pollard J.W., Plante C., Leibo S.P.* Comparison of development of pig zygotes and embryos in simple and complex culture media // *J. Reprod. Fertil.* 1995. V. 103. № 2. P. 331–337.
- Ponjaert-Kristoffersen I., Bonduelle M., Barnes J. et al.* International collaborative study of intracytoplasmic sperm injection-conceived, *in vitro* fertilization-conceived, and naturally conceived 5-year-old child outcomes: cognitive and motor assessments // *Pediatrics.* 2005. V. 115. № 3. e283–289.
- Ponjaert-Kristoffersen I., Tjus T., Nekkebroeck J. et al.* Psychological follow-up study of 5-year-old ICSI children // *Hum. Reprod.* 2004. V. 19. № 12. P. 2791–2797.
- Ramos-Ibeas P., Heras S., Gomez-Redondo I. et al.* Embryo responses to stress induced by assisted reproductive technologies // *Mol. Reprod. Dev.* 2019. V. 86. № 10. P. 1292–1306.
- Raunig J.M., Yamauchi Y., Ward M.A., Collier A.C.* Placental inflammation and oxidative stress in the mouse model of assisted reproduction // *Placenta.* 2011. V. 32. P. 852–858.
- Reik W., Dean W., Walter J.* Epigenetic reprogramming in mammalian development // *Science.* 2001. V. 293. № 5532. P. 1089–1093.
- Rexhaj E., Paoloni-Giacobino A., Rimoldi S.F. et al.* Mice generated by *in vitro* fertilization exhibit vascular dysfunction and shortened life span // *J. Clin. Invest.* 2013. V. 123. № 12. P. 5052–5060.
- Rivera R.M., Stein P., Weaver J.R. et al.* Manipulations of mouse embryos prior to implantation result in aberrant

- expression of imprinted genes on day 9.5 of development // *Hum. Mol. Genet.* 2008. V. 17. № 1. P. 1–14.
- Rodrigues B.A., dos Santos L.C., Rodrigues J.L. Embryonic development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized dog oocytes // *Mol. Reprod. Dev.* 2004. V. 67. № 2. P. 215–223.
- Rumbold A.R., Moore V.M., Whitrow M.J. et al. The impact of specific fertility treatments on cognitive development in childhood and adolescence: A systematic review // *Hum. Reprod.* 2017. V. 32. P. 1489–1507.
- Sagirkaya H., Misirlioglu M., Kaya A. et al. Developmental and molecular correlates of bovine preimplantation embryos // *Reproduction.* 2006. V. 131. № 5. P. 895–904.
- Salilew-Wondim D., Fournier E., Hoelker M. et al. Genome-wide DNA methylation patterns of bovine blastocysts developed *in vivo* from embryos completed different stages of development *in vitro* // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 11. e0140467.
- Sananmuang T., Tharasanit T., Nguyen C., Phutikanit N., Techakumphu M. Culture medium and embryo density influence on developmental competence and gene expression of cat embryos // *Theriogenology.* 2011. V. 75. № 9. P. 1708–1719.
- Sandin S., Nygren K.G., Iliadou A., et al. Autism and mental retardation among offspring born after *in vitro* fertilization // *JAMA.* 2013. V. 310. P. 75–84.
- Santi D., De Vincentis S., Magnani E., Spaggiari G. Impairment of sperm DNA methylation in male infertility: a meta-analytic study // *Andrology.* 2017. V. 5. № 4. P. 695–703.
- Sato A., Otsu E., Negishi H., Utsunomiya T., Arima T. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes // *Hum. Reprod.* 2007. V. 22. № 1. P. 26–35.
- Scherrer U., Rimoldi S.F., Rexhaj E. et al. Systemic and pulmonary vascular dysfunction in children conceived by assisted reproductive technologies // *Circulation.* 2012. V. 125. № 15. P. 1890–1896.
- 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.
- Schwarzer C., Esteves T.C., Arauzo-Bravo M.J. et al. ART culture conditions change the probability of mouse embryo gestation through defined cellular and molecular responses // *Hum. Reprod.* 2012. V. 27. № 9. P. 2627–2640.
- Scott K.A., Yamazaki Y., Yamamoto M. et al. Glucose parameters are altered in mouse offspring produced by assisted reproductive technologies and somatic cell nuclear transfer // *Biol. Reprod.* 2010. V. 83. № 2. P. 220–227.
- Seshagiri P.B., Vani V. Enabling hamster embryo culture system: development of preimplantation embryos // *Methods. Mol. Biol.* 2019. V. 2006. P. 45–61.
- Song S., Ghosh J., Mainigi M. et al. DNA methylation differences between *in vitro*- and *in vivo*-conceived children are associated with ART procedures rather than infertility // *Clin. Epigenetics.* 2015. V. 7. P. 41.
- Steptoe P.C., Edwards R.G. Birth after the reimplantation of a human embryo // *Lancet.* 1978. V. 312. P. 366.
- Swain J.E., Carrell D., Cobo A. et al. Optimizing the culture environment and embryo manipulation to help maintain embryo developmental potential // *Fertil. Steril.* 2016. V. 105. № 3. P. 571–587.
- Swain J.E., Bormann C.L., Krisher R.L. Development and viability of *in vitro* derived porcine blastocysts cultured in NCSU23 and G1.2/G2.2 sequential medium // *Theriogenology.* 2001. V. 56. № 3. P. 459–469.
- 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.
- Summers M.C. A brief history of the development of the KSOM family of media // *Hum. Fertil.* 2014. V. 17. Supl. 1. P. 12–16.
- 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.
- Sunde A. Embryo culture and phenotype of the offspring // *In Vitro Fertilization.* 2019. P. 877–889.
- Sunkara S.K., Chinta P., Kamath M.S. Perinatal outcomes following assisted reproductive technology // *J. Hum. Reprod. Sci.* 2019. V. 12. P. 177–181.
- Tan K., Zhang Z., Miao K., et al. Dynamic integrated analysis of DNA methylation and gene expression profiles in *in vivo* and *in vitro* fertilized mouse post-implantation extraembryonic and placental tissues // *Mol. Hum. Reprod.* 2016. V. 22. № 7. P. 485.
- Tarahomi M., Vaz F.M., van Straalen J.P. et al. The composition of human preimplantation embryo culture media and their stability during storage and culture // *Hum. Reprod.* 2019. V. 34. № 8. P. 1450–1461.
- Tervit H.R., Whittingham D.G., Rowson L.E. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova // *J. Reprod. Fertil.* 1972. V. 30. № 3. P. 493–497.
- Trasorras V., Baca Castex C., Alonso A. et al. First llama (*Lama glama*) pregnancy obtained after *in vitro* fertilization and *in vitro* culture of gametes from live animals // *Anim. Reprod. Sci.* 2014. V. 148. № 1–2. P. 83–89.
- Valenzuela-Alcaraz B., Serafini A., Sepulveda-Martinez A. et al. Postnatal persistence of fetal cardiovascular remodeling associated with assisted reproductive technologies: a cohort study // *BJOG.* 2019. V. 126. № 2. P. 291–298.
- Valenzuela-Alcaraz B., Crispi F., Bijmens B. et al. Assisted reproductive technologies are associated with cardiovascular remodeling in utero that persists postnatally // *Circulation.* 2013. V. 128. № 13. P. 1442–1450.
- Vlachopoulos C., Kosteria I., Sakka S. et al. PCSK9 and Lp(a) levels of children born after assisted reproduction technologies // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2019. V. 36. № 6. P. 1091–1099.
- Von Arx R., Allemann Y., Sartori C. et al. Right ventricular dysfunction in children and adolescents conceived by assisted reproductive technologies // *J. App. Phys.* 2015. V. 118. № 10. P. 1200–1206.
- Wagenaar K., Ceelen M., van Weissenbruch M.M. et al. School functioning in 8- to 18-year-old children born after *in vitro* fertilization // *Eur. J. Pediatr.* 2008. V. 167. № 11. P. 1289–1295.
- Wang Q., Zhang Y., Le F. et al. Alteration in the expression of the renin-angiotensin system in the myocardium of mice conceived by *in vitro* fertilization // *Biol. Reprod.* 2018. V. 99. № 6. P. 1276–1288.
- Watkins A.J., Platt D., Papenbrock T. et al. Mouse embryo culture induces changes in postnatal phenotype includ-

- ing raised systolic blood pressure // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. № 13. P. 5449–5454.
- Wennerholm U.B., Bergh C. Perinatal outcome in children born after assisted reproductive technologies // Ups. J. Med. Sci. 2020. P. 1–9.
- Xie Y., Wang F., Puscheck E.E., Rappolee D.A. Pipetting causes shear stress and elevation of phosphorylated stress-activated protein kinase/jun kinase in preimplantation embryos // Mol. Reprod. Dev. 2007. V. 74. № 10. P. 1287–1294.
- Yaqoob S.H., Saadeldin I.M., Swelum A.A.-A., Alowaimer A.N. Optimizing camel (*Camelus dromedarius*) oocytes in vitro maturation and early embryo culture after parthenogenetic activation // Smal. Rum. Res. 2017. V. 153. P. 81–86.
- Youssef M.M., Mantikou E., van Wely M., et al. Culture media for human pre-implantation embryos in assisted reproductive technology cycles // Cochrane Database Syst. Rev. 2015. № 11. CD007876.
- Zacchini F., Sampino S., Stankiewicz A.M., Haaf T., Ptak G.E. Assessing the epigenetic risks of assisted reproductive technologies: a way forward // Int. J. Dev. Biol. 2019. V. 63. P. 217–222.
- Zandstra H., Van Montfoort A.P., Dumoulin J.C. Does the type of culture medium used influence birthweight of children born after IVF? // Hum. Reprod. 2015. V. 30. № 3. P. 530–542.
- Zegers-Hochschild F., Adamson G. David, Dyer S. et al. The international glossary on infertility and fertility care, 2017 // Human Reproduction. 2017. V. 32. № 9. P. 1786–1801.
- Zhou J., Liu H., Gu H.T. et al. Association of cardiac development with assisted reproductive technology in childhood: a prospective single-blind pilot study // Cell. Physiol. Biochem. 2014. V. 34. № 3. P. 988–1000.
- Zhou Q., Yang S.H., Ding C.H. et al. A comparative approach to somatic cell nuclear transfer in the rhesus monkey // Hum. Reprod. 2006. V. 21. № 10. P. 2564–2571.
- Ziebe S., Loft A., Povlsen B.B. et al. A randomized clinical trial to evaluate the effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in embryo culture medium for in vitro fertilization // Fertil. Steril. 2013. V. 99. P. 1600–1609.

## ***In Vitro* Culture of Preimplantation Embryos and Its Influence on Mammalian Ontogenesis**

**S. V. Ranneva<sup>1,2</sup>, E. Yu. Brusentsev<sup>1</sup>, T. N. Igonina<sup>1</sup>, D. S. Ragaeva<sup>1</sup>, I. N. Rozhkova<sup>1</sup>,  
N. I. Ershov<sup>1</sup>, A. L. Levinson<sup>3</sup>, and S. Ya. Amstislavsky<sup>1,2,\*</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, prosp. Lavrenteva 10, Novosibirsk, 630090 Russia*

<sup>2</sup>*Novosibirsk National Research State University, ul. Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia*

<sup>3</sup>*Novosibirsk Center of Reproductive Medicine, ul. Heroes of the Revolution 3, Novosibirsk, 630037 Russia*

*\*e-mail: amstis@yandex.ru*

Effects of assisted reproductive technologies, *in vitro* culture in particular, on the pre- and postnatal development of mammals are reviewed. The influence of the culture medium on the development of preimplantation embryo and the fetus are considered. A special emphasis is made on the long-term effects of these procedures on the offspring.

**Keywords:** assisted reproductive technologies, *in vitro* culture, preimplantation embryo, fetus, ontogenesis, epigenetics, long-term effects