

ВЛИЯНИЕ ЛИНОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВИТРИФИКАЦИИ ЭМБРИОНОВ МЫШЕЙ

© 2022 г. Е. Ю. Брусенцев^а, Т. Н. Игонина^а, С. В. Окотруб^а,
Э. А. Чуйко^а, С. Я. Амстиславский^а, *

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

*e-mail: amstis@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.06.2021 г.

После доработки 31.08.2021 г.

Принята к публикации 07.09.2021 г.

В исследовании рассматривается влияние культивирования *in vitro* эмбрионов мыши с 200 мкМ линолевой кислоты (ЛК) в течение 48 ч на их жизнеспособность после витрификации. Флуоресцентная микроскопия эмбрионов, окрашенных DAPI, показала усиление фрагментации ядер в группе после воздействия ЛК без криоконсервации, и значительное уменьшение числа клеток у витрифицированных эмбрионов через 24 ч после их отогрева. Таким образом, культивирование *in vitro* с ЛК снижает жизнеспособность эмбрионов мыши после витрификации.

Ключевые слова: мыши, преимплантационные эмбрионы, внутриклеточные липиды, культивирование *in vitro*, линолевая кислота, витрификация

DOI: 10.31857/S0475145022010025

ВВЕДЕНИЕ

Липидные гранулы (ЛГ) являются внутриклеточными хранилищами жирных кислот (ЖК), триацилглицеринов, и других соединений, необходимых для метаболизма, синтеза мембран (Walther, Farese, 2012; Welte, Gould, 2017), а также нормального развития преимплантационных зародышей мышей (Tatsumi et al., 2018). Эти клеточные включения чувствительны к охлаждению и могут влиять на эффективность криоконсервации эмбрионов у некоторых видов млекопитающих (Pereira, Marques, 2008; Amstislavsky et al., 2019). Мышь, наряду с другими млекопитающими, используется в качестве модели для понимания роли внутриклеточных липидов в созревании ооцитов и развитии преимплантационных зародышей (Dunning et al., 2014; Arena et al., 2021).

Ранее было показано, что условия культивирования *in vitro* преимплантационных эмбрионов могут влиять на количественный и качественный состав их внутриклеточных липидов (Lara et al., 2011). В частности, различные ЖК, добавленные в питательную среду, могут приводить к изменению состава ЛГ эмбрионов млекопитающих, что влияет на их развитие *in vitro* (Nonogaki et al., 1994; Nochi et al., 1999). Такой эффект оказывает, например, линолевая кислота (ЛК), которая может

привести к изменению внутриклеточного профиля ЖК ооцитов крупного рогатого скота (КРС) при их созревании *in vitro* (Lara et al., 2011). Также, культивирование *in vitro* эмбрионов КРС в среде, дополненной конъюгированным изомером ЛК, транс-10, цис-12 октадекадиеновой кислотой (КЛК), улучшает их восстановление после витрификации (Pereira, Marques, 2008). Было показано, что во время культивирования *in vitro* КЛК проникает в клетки преимплантационных эмбрионов КРС, вызывает повышенную текучесть их мембран, а также попадает в ЛГ (Pereira, Marques, 2008). Наше предыдущее исследование показало, что культивирование *in vitro* эмбрионов мышей с ЛК вызывает увеличение общего количества внутриклеточных липидов и степени их ненасыщенности, а также вызывает снижение температуры начала фазового перехода липидов (ФПЛ), но не влияет на их жизнеспособность после процедур медленного программного замораживания и последующего оттаивания (Igonina et al., 2021). Целью данной работы являлось изучение влияния ЛК на эффективность витрификации эмбрионов мышей и их последующее развитие *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте было использовано 17 половозрелых самок и шесть самцов мышей линии CD1 в возрасте от двух до трех месяцев. Животных содержали в стандартных условиях конвенционального вивария Института цитологии и генетики (Новосибирск, Россия).

Самок мышей линии CD1 на стадии проэструс-эструс ссаживали на ночь с фертильными самцами этой же линии. День обнаружения вагинальной пробки считали первым днем беременности. Таких самок подвергали эвтаназии путем дислокации шейных позвонков на второй день беременности, в 14 ч. Яйцеводы и матку извлекали и промывали средой Flushing Solution (FertiPro, Бельгия), как описано ранее (Igonina et al., 2021).

Перед витрификацией эмбрионы были разделены на две группы, которые культивировали *in vitro*: 1) контроль ($n = 82$), без добавления ЛК (Merck, Германия) в среду KSOM (Merck, Германия); 2) с добавлением 200 мкМ ЛК ($n = 107$). Данная дозировка выбрана нами исходя из наших предварительных исследований. Согласно нашей предыдущей работы, эта дозировка была оптимальной для развития эмбрионов мышей без криоконсервации (Igonina et al., 2021). Перед добавлением ЛК в среду KSOM его предварительно смешивали с бычьим сывороточным альбумином в соотношении 3 : 1. Культивирование *in vitro* производили на 35 мл чашках Петри (Corning, США) в 20 мкл каплях KSOM в группах по 3–5 эмбрионов под минеральным маслом (Merck, Germany) в течение 48 ч при 37°C, 5% CO₂ и влажности 90% в CO₂-инкубаторе New Brunswick™ Galaxy 48R (Eppendorf, Германия). Эмбриональное развитие контролировали визуально под микроскопом S8 APO (Leica Microsystems, Германия). После культивирования эмбрионы из каждой группы фиксировали в 4% параформальдегиде (ХимМед, Россия) на PBS и окрашивали 2 мкг/мл 4,6-диамидино-2-фенилиндола – DAPI (Merck, Германия): контроль ($n = 35$), группа после ЛК ($n = 39$); оставшиеся эмбрионы криоконсервировали: контроль ($n = 41$), группа после ЛК ($n = 64$).

Для витрификации 2–3 эмбриона помещали в среду FertiCult Flushing (FertiPro, Бельгия), после чего переносили в уравнивающую среду, содержащую 20% фетальной телячьей сыворотки – ФТС (ХимМед, Россия), 7.5% пропиленгликоля – ПГ (ХимМед, Россия) и 7.5% диметилсульфоксида – ДМСО (ХимМед, Россия), на 3 минуты, а затем в среду для витрификации, содержащую 20% ФТС, 16.5% ПГ, 16.5% ДМСО и 0.5 М сахарозы (ХимМед, Россия) на 25 секунд при комнатной температуре. На последнем этапе эмбрионы переносили на Cryotop (Kitazato, Япония) с мини-

мальным количеством среды и сразу же погружали в жидкий азот (LN₂) для хранения.

Для отогрева Cryotop доставали из LN₂ и помещен в среду FertiCult Flushing с добавлением 0.25 М сахарозы при 37°C на одну минуту. После чего, эмбрионы переносили в среду, содержащую 0.15 М сахарозы, на пять минут, а затем промывали средой без криопротекторов и ставили на культуру *in vitro* в 20 мкл каплю среды KSOM в CO₂-инкубатор Galaxy 48R на 24 часа, при тех же условиях, которые были описаны выше. После культивирования эмбрионы из каждой группы фиксировали в 4% параформальдегиде на PBS и окрашивали DAPI (контроль: $n = 39$, группа после ЛК: $n = 54$).

Окрашивание эмбрионов DAPI до и после витрификации проводили по протоколу, описанному нами ранее (Igonina et al., 2021). Подсчет числа интерфазных ядер и их фрагментов в развивающихся морулах и бластоцистах производили путем визуальной оценки препаратов с применением флуоресцентного микроскопа AxioImager A1 (Carl Zeiss, Германия), имеющегося в распоряжении ЦКП МАБО СО РАН, с соответствующим кубическим фильтром для окрашивания DAPI.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе проведенного исследования не было выявлено достоверного влияния ЛК на долю развивающихся морул и бластоцист, а также среднее число клеток на эмбрион (табл. 1). Однако в группе, после воздействия ЛК, наблюдалось значительное увеличение ($p < 0.05$) индекса фрагментации ядер по сравнению с контролем (13.2 ± 2.3 и 7.6 ± 1.2 соответственно).

После процедур витрификации/отогрева не было выявлено достоверных различий по доле развивающихся бластоцист между ЛК и контрольной группами (табл. 1). Тем не менее, значительное снижение ($p < 0.05$) среднего числа клеток на эмбрион было обнаружено в группе ЛК по сравнению с контролем (50.1 ± 3.9 и 65.0 ± 4.7 соответственно). Наши результаты также показывают, что витрификация не повлияла на фрагментацию ядер (табл. 1).

Таблица 1. Развитие эмбрионов мышей в культуре *in vitro* до и после витрификации

Культивирование <i>in vitro</i> эмбрионов с 200 мкМ линолевой кислотой (ЛК) до витрификации						
Группы ¹	Число эмбрионов	Число развивающихся эмбрионов, %			Окрашивание DAPI ³	
		морулы	бластоцисты	поврежденные эмбрионы ²	число клеток на эмбрион	фрагментация ядер, %
Контроль	82	22 (26.8)	60 (73.2)	4 (4.9)	28.9 ± 2.6	7.6 ± 1.2
ЛК	107	27 (25.2)	80 (74.8)	12 (11.2)	28.3 ± 2.5	13.2 ± 2.3*

Развитие эмбрионов в культуре <i>in vitro</i> после витрификации					
Группы	Число эмбрионов	Число развивающихся эмбрионов, %		Окрашивание DAPI ⁵	
		бластоцисты	поврежденные эмбрионы ⁴	число клеток на эмбрион	фрагментация ядер, %
Контроль	41	31 (75.6)	10 (24.4)	65.0 ± 4.7	13.7 ± 2.5
ЛК	64	38 (59.4)	26 (40.6)	50.1 ± 3.9*	16.5 ± 2.9

* $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

¹ Эмбрионы от каждой самки были случайным образом распределены между двумя группами.

² Число эмбрионов, которые имеют 20% или больше мертвых клеток (доля от общего числа развивающихся эмбрионов).

³ Число эмбрионов, взятых для окрашивания DAPI, составляло 39 в группе, после воздействия ЛК, и 35 в контроле.

⁴ Число эмбрионов, которые имеют 40% или больше мертвых клеток (доля от общего числа развивающихся эмбрионов).

⁵ Число эмбрионов, взятых для окрашивания DAPI, составляло 54 в группе, после воздействия ЛК, и 39 в контроле.

ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящее исследование показало, что воздействие ЛК при культивировании *in vitro* не влияло на частоту преимплантационного развития мышей. Однако наблюдалось увеличение фрагментации ядер в группе, после воздействия ЛК, по сравнению с контролем. Скорее всего, этот эффект может быть связан с влиянием ЛК, поскольку наша предыдущая работа подтвердила, что та же доза ЛК, добавленная к эмбрионам мышей при культивировании *in vitro*, вызвала возрастание общего количества внутриклеточных липидов в эмбрионах мыши (Igonina et al., 2021). В более раннем исследовании было показано угнетающее действие ЛК на развитие эмбрионов мышей в дозах 223–319 мкМ (Nonogaki et al., 1994). Однако у КРС наблюдалось положительное влияние ЛК в культуре *in vitro* на развитие эмбрионов (Hochi et al., 1999). Эти исследования показали, что природа этих эффектов может зависеть от видовой принадлежности исследуемых животных и дозы ЛК (Nonogaki et al., 1994; Hochi et al., 1999). В частности, на крупном рогатом скоте показано, что с увеличением дозы доля развивающихся эмбрионов сначала увеличивается, а затем уменьшается (Hochi et al., 1999). В другой работе, также выполненной на крупном рогатом скоте, изучали влияние КЛК на эмбрионы; было показано транзитное угнетение их развития при сопоставимых дозах и последующем ослаблении этого эффекта со временем культивирования (Dias et al., 2020). В целом, наши результаты демонстрируют, что ЛК в дозе 200 мкМ оказывает

лишь незначительное, хотя и достоверное, повышение уровня фрагментации ядер в клетках эмбрионов, но отсутствие влияния на развитие эмбрионов мышей.

Между тем, наши результаты демонстрируют, что воздействие ЛК при культивировании *in vitro* сопровождается угнетением развития эмбрионов после их витрификации и последующего отогрева. Несмотря на то, что доля бластоцист была сходной между группами, среднее число клеток на эмбрион было ниже в группе, которую до витрификации культивировали с ЛК. Эти результаты отличаются от данных нашей предыдущей работы, где ЛК в той же дозировке не вызывал изменения качества эмбрионов мышей после медленного замораживания/оттаивания (Igonina et al., 2021). Этот эффект, вероятно, связан с тем, что при медленном замораживании температура начала ФПЛ была ниже после обработки ЛК (Igonina et al., 2021), однако во время витрификации ФПЛ происходит моментально.

Наше исследование показало, что преимплантационные зародыши мышей, после воздействия ЛК, имеют сниженную криотолерантность; эти выводы разнятся с результатами экспериментов, проведенных ранее на различных видах сельскохозяйственных животных (Hochi et al., 1999; Pereira, Marques, 2008; Dias et al., 2020), что можно объяснить существенно меньшим содержанием внутриклеточных липидов у мыши (Amstislavsky et al., 2019). Расхождение между представленными нами данными и предыдущими результатами, полученными на эмбрионах крупного рогатого

скота и свиней можно объяснить видовой спецификой, а также различиями во времени культивирования и используемых дозах ЛК. Мы полагаем, что увеличение уровня ненасыщенности внутриклеточных липидов может положительно повлиять на эффективность криоконсервации эмбрионов КРС и свиней; при этом общее количество внутриклеточных липидов у этих видов существенно не меняется. С другой стороны, относительное возрастание общего количества внутриклеточных липидов было значительным у эмбрионов мыши, культивированных с той же дозой ЛК (Игонина et al., 2021), что может быть причиной снижения результатов криоконсервации в группе ЛК, наблюдаемой в данной работе.

БЛАГОДАРНОСТИ

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

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке РФФИ № 19-016-00025, бюджетного проекта № 0259-2021-0015 с использованием оборудования ЦКП “Центр генетических ресурсов лабораторных животных” ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI62119X0023).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Авторы Е.Ю. Брусенцев, Т.Н. Игонина и С.Я. Амстиславский придумали и разработали дизайн эксперимента. Авторы Е.Ю. Брусенцев, Т.Н. Игонина и С.В. Окотруб получали преимплантационные эмбрионы, проводили их витрификацию и отогрев, а также их культивирование *in vitro*. Автор Э.А. Чуйко проводил окрашивание DAPI, подсчет числа интерфазных ядер, их фрагментов и метафазных пластинок в развивающихся бластоцистах. Авторы Е.Ю. Брусенцев, Т.Н. Игонина, С.В. Окотруб и С.Я. Амстиславский участвовали в об-

работке данных. Авторы Е.Ю. Брусенцев, Т.Н. Игонина и С.Я. Амстиславский участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Amstislavsky S., Mokrousova V., Brusentsev E., Okotrub K., Comizzoli P.* Influence of cellular lipids on cryopreservation of mammalian oocytes and preimplantation embryos: a review // *Biopreserv. Biobanking.* 2019. V. 17. P. 76–83. <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0039>
- Arena R., Bisogno S., Gasior L., et al.* Lipid droplets in mammalian eggs are utilized during embryonic diapause // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2021. V. 118. e2018362118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2018362118>
- Dias L., Leme L., Spricigo J., Pivato I., Dode M.* Effect of delipidant agents during in vitro culture on the development, lipid content, gene expression and cryotolerance of bovine embryos // *Reprod. Domest. Anim.* 2020. V. 55. P. 11–20. <https://doi.org/10.1111/rda.13579>
- Dunning K., Russell D., Robker R.* Lipids and oocyte developmental competence: The role of fatty acids and β -oxidation // *Reproduction.* 2014. V. 148. P. 15–27. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0251>
- Hochi S., Kimura K., Hanada A.* Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of in vitro-produced bovine morulae // *Theriogenology.* 1999. V. 52. P. 497–504. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00146-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00146-6)
- Igonina T.N., Okotrub K.A., Brusentsev E.Yu. et al.* Alteration of the lipid phase transition during mouse embryos freezing after in vitro culture with linoleic acid // *Cryobiology.* 2021. V. 99. P. 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.01.014>
- Lapa M., Marques C., Alves S. et al.* Effect of trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid on bovine oocyte competence and fatty acid composition // *Reprod. Dom. Anim.* 2011. P. 46. P. 904–910. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01762.x>
- Nonogaki T., Noda Y., Goto Y., Kishi J., Mori T.* Developmental blockage of mouse embryos caused by fatty acids // *J. Assist. Reprod. Genet.* 1994. V. 11. P. 482–488. <https://doi.org/10.1007/BF02215713>
- Pereira R., Marques C.* Animal oocyte and embryo cryopreservation // *Cell. Tissue. Bank.* 2008. V. 9. P. 267–277. <https://doi.org/10.1007/s10561-008-9075-2>
- Tatsumi T., Takayama K., Ishii S. et al.* Forced lipophagy reveals that lipid droplets are required for early embryonic development in mouse // *Development.* 2018. V. 145. dev161893. <https://doi.org/10.1242/dev.161893>
- Walther T., Farese R.* Lipid droplets and cellular lipid metabolism // *Annu. Rev. Biochem.* 2012. V. 81. P. 687–714. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061009-102430>
- Welte M., Gould A.* Lipid droplet functions beyond energy storage // *Biochim. Biophys. Acta.* 2017. V. 1862. P. 1260–1272. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2017.07.006>

Linoleic Acid Exposure *in vitro* Affects Vitrification of Mouse Embryos**E. Yu. Brusentsev¹, T. N. Igonina¹, S. V. Okotrub¹, E. A. Chuyko¹, and S. Ya. Amstislavsky¹, ****¹Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch,
prosp. Lavrentyeva 10, Novosibirsk, 630090 Russia***e-mail: amstis@yandex.ru*

The study addresses the effect of *in vitro* culture (IVC) of mouse embryos with 200 μ M linoleic acid (LA), 48 h, on their viability after vitrification. Fluorescence microscopy of DAPI stained embryos showed an increase of nuclear fragmentation in the non-vitrified LA-treated group, and a significant decrease in the number of cells in vitrified embryos 24 h after their warming. Thus, IVC with LA reduces the viability of mouse embryos after vitrification.

Keywords: mice, preimplantation embryos, intracellular lipids, *in vitro* culture, linoleic acid, vitrification