

DOI: 10.7868/S2658655X26040047
УДК 591.3:57.089

Экспериментальная статья

Влияние обогащения питательной среды аминокислотами на результаты культивирования *in vitro* и трансплантации эмбрионов мышей

Е.Ю. Брусенцев¹, И.Н. Рожкова¹, Т.А. Рахманова^{1,2}, В.С. Козенева^{1,2},
С.С. Соловьева¹, С.Я. Амстиславский^{1,*}

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Российская Федерация
²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет (НГУ),
Новосибирск, Российская Федерация

*E-mail: amstis@yandex.ru

Аннотация. Широкое применение современных репродуктивных технологий в медицине стимулирует совершенствование систем культивирования *in vitro* преимплантационных эмбрионов. Вопрос о том, выбирать ли для культивирования эмбрионов относительно бедные по составу среды или среды, обогащенные аминокислотами, витаминами и другими компонентами, не только имеет практическое значение для репродуктивной медицины, но и важен для постановки адекватных экспериментов на мышах. В настоящем исследовании было проведено сравнение эффектов краткосрочного культивирования *in vitro* эмбрионов мышей линии C57BL/6 на простой (KSOM) и обогащенной аминокислотами (KSOMaa) средах на темпы развития *in vitro* и частоту имплантации после эмбриотрансфера, а также массу тела потомков в ходе периода вскармливания. При культивировании в течение 27 ч дробящихся эмбрионов мышей в двух средах не было обнаружено различий по темпам их развития *in vitro*, что, возможно, обусловлено краткосрочностью проведения данной процедуры. После 27 ч культивирования *in vitro* в обеих средах большинство эмбрионов достигли стадии бластоцисты. При этом некоторые из них отставали в развитии и находились на стадии компактной морулы, а часть деградировала. Между тем различия были установлены при последующем развитии таких эмбрионов *in vivo*. После эмбриотрансфера имплантация наступала чаще у эмбрионов, культивированных *in vitro* на обогащенной аминокислотами среде KSOMaa. В период вскармливания масса тела потомков не различалась между группами. Таким образом, обогащение аминокислотами питательной среды в ходе относительно короткого по времени культивирования *in vitro* дробящихся эмбрионов мышей повышает частоту имплантации после эмбриотрансфера.

Ключевые слова: мыши, преимплантационные эмбрионы, культивирование *in vitro*, эмбриотрансфер, частота имплантации

Финансирование. Данная работа финансировалась за счет средств Российской государственной программы «Наука и университеты» на 2025–2026 гг. (грант № 25-24-00153).

Соблюдение этических стандартов. Все экспериментальные процедуры и обращение с лабораторными животными соответствовали Директиве ЕС 2010/63/EU об экспериментах на животных (ETS № 123) и были одобрены Комитетом по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 215 от 25.02.2025 г.).

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

Вклад авторов в публикацию. АСЯ, БЕЮ, РИН – идея работы и планирование эксперимента; КВС, РТА, РИН – применение репродуктивных технологий и проведение экспериментов с животными; АСЯ, БЕЮ, РТА – обработка результатов; АСЯ, БЕЮ, КВС, ССС, РИН – написание и редактирование рукописи.

Благодарности. Авторы выражают благодарность ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия).

Ссылка для цитирования: Брусенцев Е.Ю., Рожкова И.Н., Рахманова Т.А., Козенева В.С., Соловьева С.С., Амстиславский С.Я. Влияние обогащения питательной среды аминокислотами на результаты культивирования *in vitro* и трансплантации эмбрионов мышей. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова / Russian Journal of Physiology*. 2026. Т. 112. № 4. С. 887–904. <https://doi.org/10.7868/S2658655X26040047>

DOI: 10.7868/S2658655X26040047

Experimental Article

Effects of Medium Enrichment with Amino Acids on the Results of *in vitro* Embryo Culture and Embryo Transfer in Mice

E.Yu. Brusentsev¹, I.N. Rozhkova¹, T.A. Rakhmanova^{1,2}, V.S. Koseneva^{1,2},
S.S. Solovieva¹, S.Ya. Amstislavsky^{1,*}

¹*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation*

²*Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russian Federation*

*E-mail: amstis@yandex.ru

Abstract. The use of modern reproductive technologies in medicine stimulates the improvement of *in vitro* culture systems for preimplantation embryos. The question of whether to choose relatively poor media for culturing embryos or media enriched with amino acids, vitamins, and other components is important not only for reproductive medicine, but also has practical significance for designing adequate experiments on mice. In the present study, the effects of short-term *in vitro* culture of C57BL/6 mice embryos on the simple medium (KSOM) and on the medium supplemented with amino acids (KSOMaa) were compared on the developmental rate *in vitro* and the frequency of implantation after embryo transfer, as well as the body

weight of offspring during the lactation period. When cleavage stage embryos were cultured *in vitro* for 27 hours on both medium, no differences in their development rates were observed, which may be due to the short duration of this procedure. After 27 hours of *in vitro* culture in both environments, the majority of embryos reached the blastocyst stage. However, some were developmentally delayed and remained at the compact morula stage, while others degraded. Meanwhile, differences were observed during the subsequent *in vivo* development of such embryos. Implantation rates after embryo transfer were higher for the embryos cultured *in vitro* on the KSOMaa medium enriched with amino acids. The body weight of the offspring during the suckling period did not differ between the groups. Thus, the enrichment of KSOM with amino acids during a relatively short *in vitro* culture period of cleavage stage mouse embryos resulted in a higher implantation rate after embryo transfer.

Keywords: mice, preimplantation embryos, *in vitro* culture, embryo transfer, implantation rate

Funding. This work was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 25-24-00153).

Ethics declarations. All experimental procedures and handling of laboratory animals complied with EU Directive 2010/63/EU on animal experiments (ETS No. 123) and were approved by the Bioethics Committee of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Protocol No. 215 dated February 25, 2025).

Conflict of interests. The authors declare that they have no conflict of interest.

Authors contribution. ASYa, BEYu, RIN – concept of the work and design of the experiment; KVS, RTA, RIN – the use of reproductive technologies and animal experiments; ASYa, BEYu, RTA – processing of the results was; ASYa, BEYu, KVS, SSS, RIN – writing and editing of the manuscript.

Acknowledgements. The authors thank the Center for Collective Use “Center for Genetic Resources of Laboratory Animals” of the Institute of Cytology and Genetics SB RAS (Novosibirsk, Russia).

For Citation: Brusentsev E.Yu., Rozhkova I.N., Rakhmanova T.A., Koseneva V.S., Solovieva S.S., Amstislavsky S.Ya. Effects of medium enrichment with amino acids on the results of *in vitro* embryo culture and embryo transfer in mice. *Rossiiskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova / Russian Journal of Physiology*. 2026;112(4):887–904. (In Russ.) <https://doi.org/10.7868/S2658655X26040047>

ВВЕДЕНИЕ

Культивирование эмбрионов *in vitro* (*in vitro* culture – IVC) и эмбриотрансфер (embryo transfer – ET) являются ключевыми вспомогательными репродуктивными технологиями (ВРТ) [1]. При культивировании *in vitro* эмбрионов млекопитающих и человека в различных по составу питательных средах были обнаружены различия в скорости и характере их развития, а также долгосрочные изменения экспрессии генов [2–6]. Вопрос о том, выбирать ли для культивирования эмбрионов относительно бедные по составу среды или среды, обогащенные аминокислотами,

витаминами и другими компонентами, важен не только для постановки адекватных экспериментов на мышах [2, 3, 7–9], но и имеет практическое значение для репродуктивной медицины [10].

Достаточно хорошо документировано, что обогащение простой среды аминокислотами при длительном культивировании эмбрионов мышей с одноклеточной стадии способствует ускорению развития эмбрионов до стадии бластоцисты, повышая число клеток, в том числе во внутренней клеточной массе [2, 8, 11]. При этом характер экспрессии генов при развитии на обогащенной среде приближен к таковому при развитии *in vivo* [11, 12]. Обогащение среды аминокислотами при культивировании эмбрионов мышей способствует возрастанию уровня имплантации и увеличению размера плодов [8]. Несмотря на то что влияние длительного (с одноклеточной стадии до бластоцисты) и короткого (6 ч) культивирования в бедной и обогащенной аминокислотами/витаминами среде на уровень имплантации изучено в ранних работах [8, 9], эффектов обогащения среды на результаты среднего по длительности культивирования эмбрионов мышей, начиная со стадии 8-клеточного дробящегося зародыша до бластоцисты, когда происходит активный метаболизм аминокислот [13], на этот показатель изучено не было.

Процедуры ЭКО и культивирования *in vitro* — это разные элементы комплекса ВРТ, которые могут по-разному отразиться на траектории развития эмбрионов [5]. Более того, добавление одних и тех же аминокислот на разных этапах культивирования эмбрионов мышей *in vitro* по-разному отражается на их развитии [8]. Было показано, что даже относительно короткое по времени культивирование эмбрионов мышей со стадии морулы до бластоцисты перед эмбриотрансфером имеет эффекты на постнатальное развитие, приводя к существенному снижению соотношения масс плода и плаценты [14]. Целью данного исследования было сравнить эффекты культивирования *in vitro* эмбрионов мышей линии C57BL/6 на простой среде (KSOM) и обогащенной аминокислотами среде (KSOMaa) со стадии 8 клеток до бластоцисты на: 1) темпы развития *in vitro* и частоту имплантации после эмбриотрансфера; 2) массу тела потомков в период вскармливания.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные

В эксперименте использовали животных SPF- (specific pathogen free) статуса: 21 фертильную самку и 10 фертильных самцов мышей линии C57BL/6. Для проведения эмбриотрансфера дополнительно подготовили 11 гибридных (CD1 × C57BL/6) самок, которых использовали в качестве реципиентов и 10 вазэктомированных самцов линии CD1 для вызывания псевдобеременности у самок-реципиентов. Животных содержали в SPF-виварии Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия) в индивидуально вентилируемых клетках OptiMice (Animal Care, США) размером 34,3 × 29,2 × 15,5 см при температуре 22–24 °C и влажности 40–50% с инвертированным 12:12-часовым циклом день–ночь (рассвет в 3 ч утра); в качестве подстилки использовали стерильную березовую щепу фракционную для лабораторных животных (ТУ 16.10.23-001-0084157135-2019). Все животные имели свободный доступ к стандартизированному автоклавированному комбикорму для лабораторных мышей и крыс «Дельта Фидс» (БиоПро, Россия) и очищенной воде «Северянка» (Экопроект, Россия), обогащенной минеральными добавками. Самок с детенышами содержали совместно до 21-го дня после рождения потомков.

Дизайн эксперимента

Были сформированы следующие группы для исследования (рис. 1).

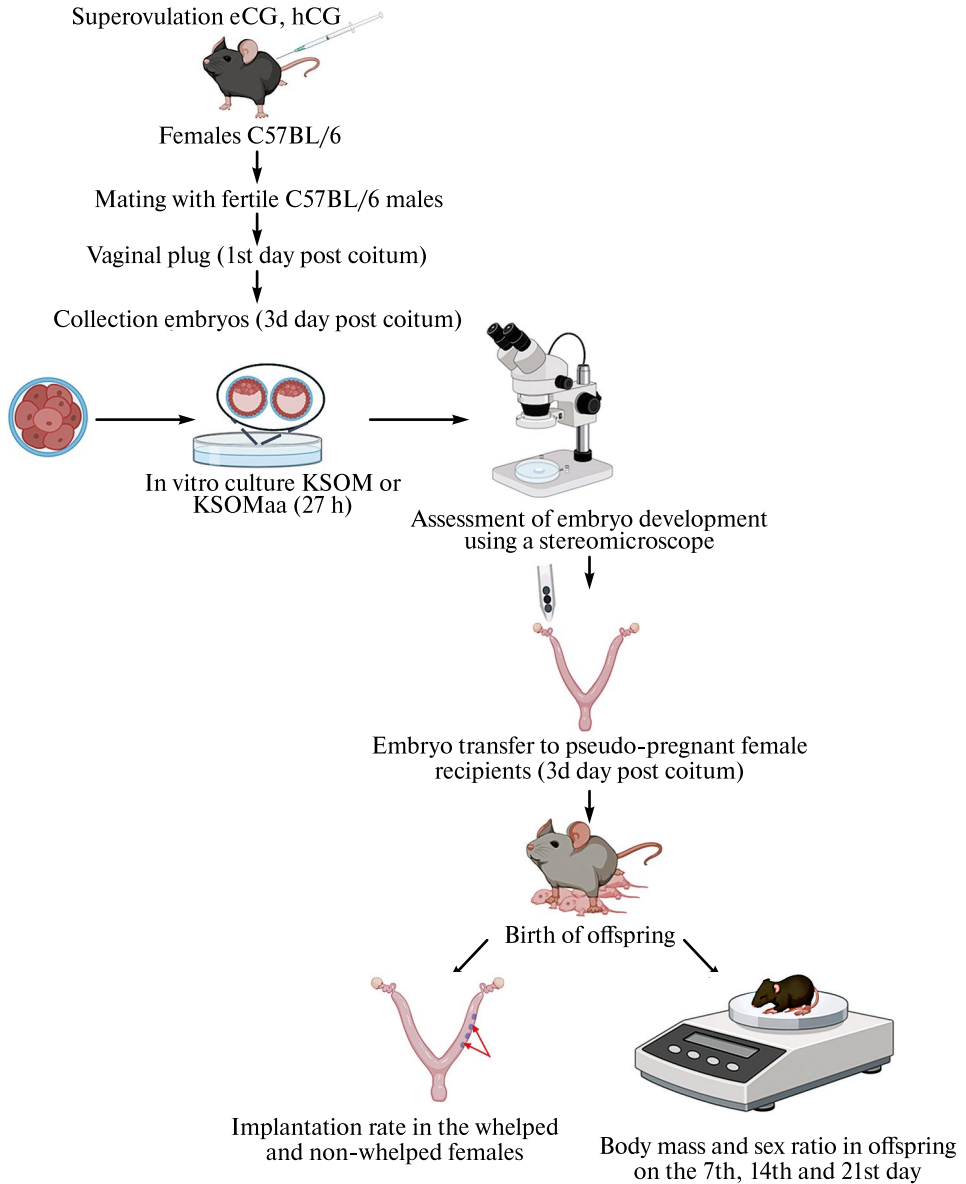


Рис. 1. Дизайн эксперимента

Fig. 1. Experimental design

Эксперимент 1:

1) группа KSOM (контроль) – эмбрионы мышей линии C57BL/6 после культивирования *in vitro* на среде KSOM – IVC (27 ч);

2) группа KSOM_{Маа} – эмбрионы мышей линии C57BL/6 после культивирования *in vitro* на среде KSOM_{Маа} – IVC (27 ч);

Эксперимент 2:

3) группа ET-C57BL-1 (контроль) – мыши линии C57BL/6, рожденные после культивирования *in vitro* на среде KSOM – IVC (27 ч) и переноса эмбрионов – ET псевдобеременным самкам-реципиентам (*dpc* 3);

4) группа ET-C57BL-2 – мыши линии C57BL/6, рожденные после культивирования *in vitro* на среде KSOM_{Маа} – IVC (27 ч) и переноса эмбрионов – ET псевдобеременным самкам-реципиентам (*dpc* 3).

Получение эмбрионов требуемой стадии развития

Самкам мышей линии C57BL/6 в возрасте 2–4 месяцев проводили гормональную стимуляцию яичников с использованием стандартного (конвенционального) протокола для получения суперовуляции [15]. Вначале им вводили внутримышечно 7 МЕ гонадотропина сыворотки жеребых кобыл (Фоллигон, Intervet, Нидерланды) и через 48 ч 5 МЕ хорионического гонадотропина человека (Хорулон, Intervet, Нидерланды). Самок ссаживали на ночь с фертильными самцами линии C57BL/6. По наличию вагинальной пробки в 9 : 00 на следующее утро оценивали фертильное спаривание. День обнаружения вагинальной пробки считали первым днем беременности (первый день после спаривания; *day post coitum* 1, *dpc* 1). Беременных самок подвергали эвтаназии погружением в сосуд с CO₂ на третий день после спаривания (*dpc* 3, 65 ч после инъекции ХГЧ). Хирургическим путем извлекали яйцеводы и рога матки, после чего промывали их средой FertiCult™ Flushing (FertiPro, Бельгия). Полученные эмбрионы на стадии 8-ми клеток оценивали под стереомикроскопом S8 APO (Leica Microsystems, Германия) при увеличении 80×. Эмбрионы без видимых дефектов, соответствующие ожидаемой стадии развития и с целыми прозрачными оболочками (*zonae pellucidae*), отбирали для культивирования *in vitro*, а некачественные (у которых поврежденных blastomeres более 25% и/или имеется несоответствие ожидаемой стадии развития), либо с повреждением прозрачной оболочки – отбраковывали.

Культивирование in vitro и оценка развития эмбрионов

Среда KSOM (K-modified simplex optimized medium) является одной из самых популярных в экспериментах с эмбрионами мышей и других лабораторных животных [1]. Это достаточно простая среда, состоящая лишь из 12 компонентов [1]. Среда KSOM_{Маа}, обогащенная аминокислотами и витаминами, обладает существенно более сложным составом [16]. При приготовлении среды KSOM_{Маа} использовали протокол, описанный ранее [16]. В среду KSOM добавляли 1% незаменимых аминокислот (ПанЭко, Россия), 0,5% заменимых аминокислот (Thermo Fisher Scientific, США), 0,5% витаминов (Gibco, США), 5% фетальной сыворотки – FCS (Thermo Fisher Scientific, США). Дробящиеся эмбрионы мышей (*n* = 345): на стадии 8-ми клеток без видимых дефектов помещали на чашки Петри (35 мм; Corning, США)

в капли объемом 20 мкл среды KSOM (Merck, Германия) либо обогащенной среды KSOMaa, по 5–12 эмбрионов и культивировали под минеральным маслом (Merck, Германия) в CO₂-инкубаторе New Brunswick™ Galaxy 48R (Eppendorf, Германия) в стандартных условиях (5% CO₂, 37 °C и влажности 90%). Через 27 ч культивирования *in vitro* эмбрионы оценивали при помощи стереомикроскопа S8 APO (Leica Microsystems, Германия). Подсчитывали процент морул, бластоцист и деградировавших (не развивающихся) зародышей.

Эмбриотрансфер

Бластоцисты в количестве 163 из пула развивающихся *in vitro* эмбрионов в каждой из двух сред были взяты случайным образом для проведения эксперимента по их развитию *in vivo* после эмбриотрансфера из расчета 9–18 на самку-реципиента. Для вызывания псевдобеременности самок CD1×C57BL/6 в проэструсе или эструсе ссаживали на ночь с вазэктомированными самцами CD1, проверенными на стерильность. По наличию вагинальной пробки на следующее утро оценивали стерильное спаривание. День обнаружения вагинальной пробки считали первым днем псевдобеременности (*dpc* 1). На третий день после спаривания (*dpc* 3) псевдобеременным самкам-реципиентам проводили трансплантацию эмбрионов. В качестве наркоза внутривенно вводили 0,01 мг/кг медетомидина гидрохлорида (Медитин, 1 мг/мл; Апи-Сан, Россия) и через 10 мин 50 мг/кг золетила (Zoletil; Virbac, Франция). Затем подкожно вводили 0,01 мл амоксициллина (амоксициллина тригидрат, 150 мг/мл; Апи-Сан, Россия). Шерсть в месте разреза сбрасывали на правой стороне спины на 1 см от нижнего ребра в вентральном направлении, кожу обрабатывали 70%-ным этиловым спиртом. Кожу и подлежащий мышечный слой в области над маткой разрезали дорсовентрально на расстоянии 5 мм от нижнего ребра в каудальном направлении. Висцеральный жировой слой, соединенный с яичником, яйцеводом и верхней частью матки, захватывали пинцетом и приподнимали. Эмбрионы переносили стеклянным капилляром в правый рог матки псевдобеременных самок-реципиентов в 5 мкл среды FertiCult™ Flushing (FertiPro, Бельгия). После завершения эмбриотрансфера репродуктивный тракт возвращали в полость тела, разрез зашивали рассасывающейся хирургической нитью (Vicryl; Johnson & Johnson, США) и присыпали антибиотиком (амоксициллина тригидрат; Апи-Сан, Россия), после чего операционный шов обрабатывали антисептиком (Ацербин, Montavit Pharmazeutische Fabrik GmbH, Австрия).

Оценка развития эмбрионов in vivo

Не родившие реципиенты в обеих группах были подвергнуты эвтаназии через 3–7 дней после предполагаемого дня родов, родившие – через 1–2 дня после отсадки потомства, путем погружения в емкость с CO₂. У подвергнутых эвтаназии животных извлекали матку и подсчитывали сайты имплантации.

Рожденных мышат всех групп взвешивали на портативных цифровых весах (ScoutPro SPS2001 F, Ohaus Corporation, США) на 7-й, 14-й и 21-й день после рождения. Учитывали неонатальную смертность, подсчитывая процент погибших мышат в каждой из групп в течение первой недели жизни (в дальнейшем гибели мышат до окончания эксперимента не наблюдалось). Определяли пол мышат в каждом из выводков в каждой из групп в возрасте 7 и 14 дней.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием программы STATISTICA v. 12.0 (StatSoft, Inc., США). Нормальность распределения в выборках проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Результаты по развитию эмбрионов в культуре *in vitro*, частоту имплантации после эмбриотрансфера в выводках представлены как доля от общего значения. Достоверность различий оценивали по критерию χ^2 . Результаты по размеру помета представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Достоверность различий между группами определяли с использованием *t*-критерия Стьюдента. Данные по массе тела потомков представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). В данном случае для статистических сравнений применяли двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим апостериорным сравнением LSD-методом Фишера. За уровень значимости принимали $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

От 21 самки линии C57BL/6, стимулированных гонадотропинами, было получено 318 эмбрионов: 8-клеточных – 272 (85,5%), ранних морул с началом компактизации бластомеров – 46 (14,5%) (рис. 2). При культивировании этих эмбрионов *in vitro* в течение 27 ч в среде KSOM либо KSOMaa не было обнаружено различий по темпам их развития. После 27 ч культивирования *in vitro* в обеих средах большинство эмбрионов достигли стадии бластоцисты: 81,0 и 75,5% соответственно. При этом некоторые из них отставали в развитии и находились на стадии компактной морулы (12,0 и 14,4% соответственно), а часть деградировала (7,0 и 10,1% соответственно) (рис. 3).

Между тем развитие *in vivo* было несколько более успешным при применении среды KSOMaa (табл. 1). Имплантация трансплантированных эмбрионов наступала чаще ($p < 0,05$) после культивирования *in vitro* на среде KSOMaa, несмотря на то, что число пересаженных зародышей в группах не различалось. После трансплантации эмбрионов, культивированных в простой среде KSOM, было рождено три помета, по 4–5 мышей в помете, в общей сложности 14 мышат (в среднем $4,7 \pm 0,3$ мышонка в выводке). В течение первой недели жизни погибло 2 мышонка, остальные выжили. В результате переноса эмбрионов, культивированных в среде KSOMaa, также было рождено три помета, 4–11 мышат в помете, в общей сложности 19 мышат (в среднем $6,3 \pm 2,3$ мышонка в выводке). В течение первой недели жизни один мышенок погиб. Размеры выводков и неонатальная смертность между группами не отличались (табл. 1). Между тем самый крупный выводок (11 мышат) был рожден после культивирования эмбрионов в среде KSOMaa.

Данные по массе тела потомков, полученных после культивирования *in vitro* и эмбриотрансфера, представлены в табл. 2. Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями не выявил значимого влияния факторов «пол» ($F_{1,26} < 1$) и «среда культивирования *in vitro*» ($F_{1,26} < 1$), а также взаимодействия между ними ($F_{1,26} < 1$) на массу тела потомства в раннем постнатальном периоде. Масса тела потомства в период кормления матерью во всех изучаемых группах увеличивалась равномерно. Последующее апостериорное сравнение не выявило различий по массе тела потомства в раннем постнатальном периоде.

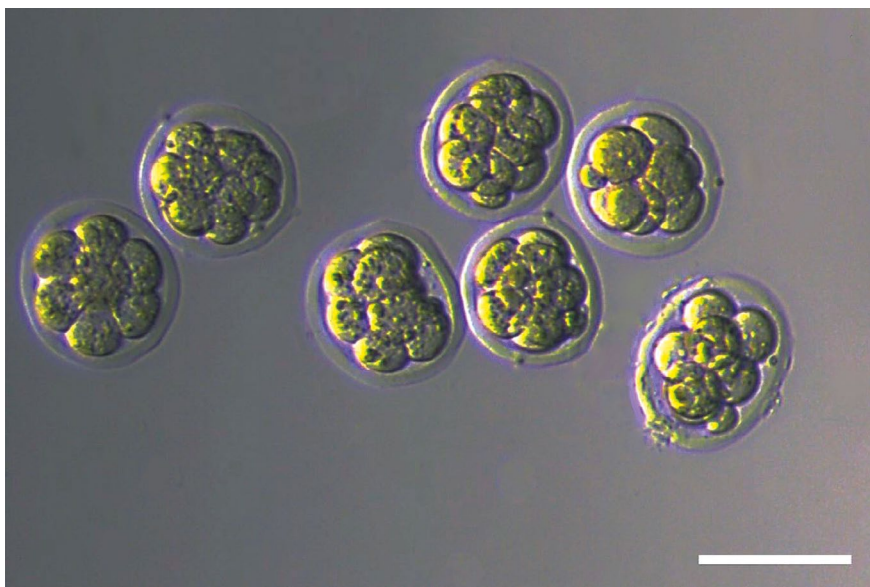


Рис. 2. Эмбрионы мышей, на момент их получения на 3 *dpc*. Шкала – 100 мкм.

Fig. 2. Mouse embryos at 3 *dpc*. Scale bar – 100 μ m

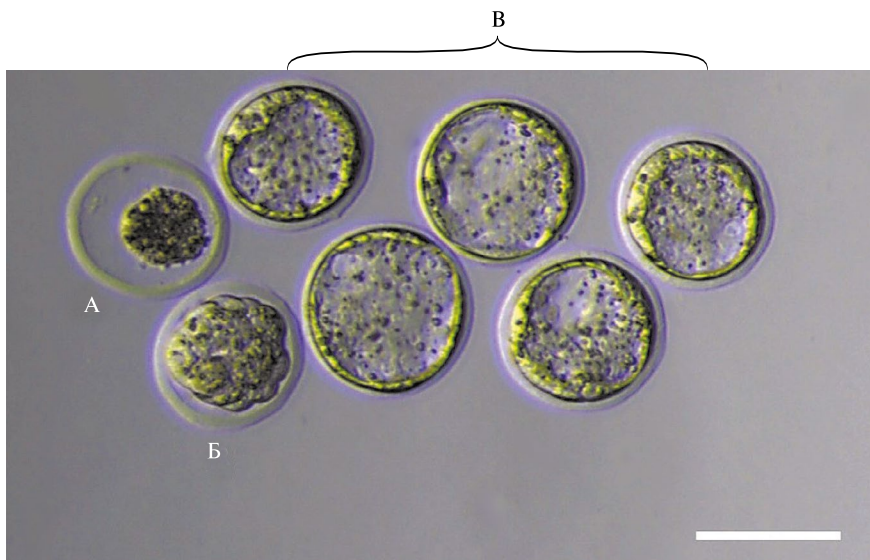


Рис. 3. Эмбрионы мышей через 27 ч культивирования *in vitro* в среде KSOM: А – деградировавший эмбрион, Б – компактная морула, В – бластоцисты. Шкала – 100 мкм

Fig. 3. Mouse embryos after 27 hours of *in vitro* culture in KSOM medium: А – degraded embryo, Б – compact morula, В – blastocysts. Scale bar – 100 μ m

Таблица 1. Репродуктивные данные**Table 1.** Reproductive data

Экспериментальная группа	ET-C57BL-1 KSOM	ET-C57BL-2 KSOM _{Маа}
Общее число самок-реципиентов	6	5
Число самок-реципиентов, родивших потомство	3	3
Продолжительность беременности (дни)	20	20
Число перенесенных бластоцист (в среднем реципиенту)	85 (14,2 ± 1,3)	78 (15,6 ± 1,3)
Имплантация эмбрионов, %	30,1	56,4*
Общее число живорожденных/выживших потомков	14/12	19/18
Размер выводка при рождении (разброс, в среднем на самку)	(4–5) 4,7 ± 0,4	(4–11) 6,3 ± 3,1

* $p < 0,05$ по сравнению со средой KSOM.

* $p < 0.05$ compared with KSOM.

Таблица 2. Масса тела (г) потомков мышей линии C57BL/6, рожденных после культивирования *in vitro* в средах KSOM и KSOM_{Маа} в течение 27 ч и последующего эмбриотрансфера**Table 2.** Body mass (g) of C57BL/6 mouse offspring born after *in vitro* culture in KSOM and KSOM_{Маа} media for 27 hours and subsequent embryo transfer

День постнатального развития	Среда KSOM		Среда KSOM _{Маа}	
	Самцы ($n = 4$)	Самки ($n = 8$)	Самцы ($n = 6$)	Самки ($n = 12$)
7	4,03 ± 0,43	4,46 ± 0,17	4,60 ± 0,32	4,38 ± 0,22
14	8,58 ± 0,45	9,31 ± 0,16	8,73 ± 0,73	8,38 ± 0,40
21	11,13 ± 1,29	12,45 ± 0,31	11,57 ± 0,91	10,90 ± 0,54

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обогащение питательной среды различными компонентами, а также длительность культивирования *in vitro* может влиять на характер развития зародышей мышей *in vitro* [2, 3, 7–9, 11]. Эти исследования показали, что в ходе развития от одноклеточной стадии до бластоцисты значение различных аминокислот, в частности, метионина меняется [17]. Добавление в среду заменимых аминокислот и глутамина существенно ускоряло развитие в ходе первых циклов дробления до достижения стадии 8 клеток, в то время как после 8-ми клеточной стадии наличие в культуральной среде незаменимых аминокислот оказывало наиболее существенное стимулирующее влияние на темп развития зародышей [8].

При этом было установлено, что при длительном культивировании эмбрионов мышей в среде KSOM_{aa} экспрессия ряда генов, важных для развития зародышей, не отличается от такового при развитии в условиях *in vivo*, в то время, как при развитии в простой среде без аминокислот, экспрессия этих генов была снижена [11]. Результаты нашего исследования показали, что темп развития дробящихся зародышей мышей до бластоцисты при их культивировании *in vitro* (27 ч) на простой и обогащенной аминокислотами средах KSOM и KSOM_{aa} не отличался. Это отсутствие различий обусловлено, по всей вероятности, краткосрочностью периода культивирования. Действительно, ранее было показано, что при длительном (более 96 ч) культивировании с одноклеточной стадии до бластоцисты, наличие аминокислот в культуральной среде способствует ускорению развития зародышей мышей [2, 3, 8, 11, 18] и крупного рогатого скота [16]. Однако результаты исследования Но с соавт. свидетельствуют о том, что при менее длительном культивировании *in vitro* на средах KSOM и KSOM_{aa} процент образовавшихся бластоцист мышей и число клеток в них не различались [11], что соответствует полученным нами результатам. В другой работе на мышах было установлено, что при схожем проценте развития до стадии бластоцисты, на этих средах наличие аминокислот повышало частоту хэтчинга [18].

Исследования по длительному культивированию *in vitro* эмбрионов мышей, начиная с одноклеточной стадии до стадии бластоцисты, показали, что имплантация в результате эмбриотрансфера наступала чаще после их длительного культивирования в среде, обогащенной аминокислотами [7, 8]. Наши результаты находятся в полном соответствии с выводами цитированных выше работ. Проведенные нами эксперименты показали, что добавление в культуральную среду аминокислот сопровождалось повышением частоты имплантации эмбрионов даже в условиях относительно короткого периода культивирования (27 ч). Следует также отметить, что наиболее многочисленный выводок – 11 мышат был рожден самкой, которой трансплантировали эмбрионы, культивировавшиеся в среде, KSOM_{aa}. Добавление аминокислот при культивировании *in vitro* преимплантационных эмбрионов поддерживает экспрессию генов на оптимальном уровне [11], что, возможно, могло привести к последующему повышению частоты имплантации после их эмбриотрансфера. Сходный результат был обнаружен и на других видах млекопитающих. В частности, добавление в культуральную среду аминокислот способствовало повышению частоты имплантаций, полученных путем ЭКО, и последующего длительного культивирования эмбрионов человека [4].

В настоящем исследовании масса тела потомства, полученного после относительно кратковременного периода культивирования *in vitro* эмбрионов на простой и обогащенной аминокислотами средах с последующим их эмбриотрансфером, увеличивалась равномерно в ходе периода вскармливания, что соответствует нормальному физическому развитию. При этом обогащение культуральной среды аминокислотами не сказывалось на массе тела потомков. Ранее было показано, что существенно более длительное культивирование *in vitro* эмбрионов мышей на обогащенной аминокислотами среде приводило к увеличению массы плодов в антенатальный период [8], хотя в более поздней работе это подтверждено не было [19]. Различия между выводами нашей работы и работы Lane и Gardner могут быть обусловлены различием в длительности культивирования эмбрионов перед их эмбриотрансфером [8]. Кроме того, ранее было показано, что потомки мышей, полученные в результате эмбриотрансфера, с низкой массой тела при рождении

отличаются ускоренным ростом в неонатальный период [20], и это может нивелировать различия, даже если таковые имели место в плодный период.

Ранее было показано, что экспрессия достаточно большого числа генов, в том числе важных для раннего развития, существенно различается при культивировании ранних эмбрионов человека в разных коммерчески доступных средах [21, 22]. То, что оптимизация культуральной системы, состава питательных сред в особенности, крайне важна для применения репродуктивных технологий в современной медицине и сельскохозяйственной индустрии неоднократно указывалось [10, 23–25]. Между тем детальный состав коммерчески доступных сред для проведения ЭКО и последующего культивирования *in vitro* эмбрионов человека далеко не всегда известен, так как фирмы, производящие эти среды, предпочитают не разглашать их состав полностью [26]. Было проведено несколько лабораторных исследований, направленных на восполнение этого пробела [26–28]. В наиболее полном из них изучен состав 56 сред для культивирования эмбрионов человека [26]. Авторы отмечают, что среды достаточно сильно различаются по составу, при этом использование некоторых из компонентов не в полной мере обосновано проведенными исследованиями на лабораторных моделях. Несмотря на большой прогресс в оптимизации сред для культивирования эмбрионов млекопитающих и человека, эксперты в области культивирования зародышей млекопитающих отмечают потребность в дальнейших фундаментальных исследованиях [3, 6, 26]. Наша работа показала, что после культивирования эмбрионов в среде KSOMaa повышается частота их имплантации в ходе эмбриотрансфера. Результаты данного исследования могут иметь значение для оптимизации состава культуральных сред в эксперименте на лабораторных мышах и представлять интерес для репродуктивной медицины.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Раннева С.В., Брусенцев Е.Ю., Игонина Т.Н. и др. Влияние культивирования эмбрионов на онтогенез потомства у млекопитающих. *Онтогенез*. 2020. Т. 51. № 6. С. 417–439. <https://doi.org/10.31857/S0475145020060075>
2. Summers M.C., McGinnis L.K., Lawitts J.A. et al. IVF of mouse ova in a simplex optimized medium supplemented with amino acids. *Hum. Reprod.* 2000. Vol. 15. No. 8. Pp. 1791–1801. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.8.1791>
3. Biggers J.D. Thoughts on embryo culture conditions. *Reprod. Biomed. Online*. 2002. Vol. 4. Pp. 30–38. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(12\)60009-1](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(12)60009-1)
4. Xella S., Marsella T., Tagliasacchi D. et al. Embryo quality and implantation rate in two different culture media: ISM1 versus Universal IVF Medium. *Fertil. Steril.* 2010. Vol. 93. Pp. 1859–1863. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.12.030>
5. 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 concepti produced through assisted reproductive technologies. *Biol. Reprod.* 2014. Vol. 90. 22. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.114785>
6. Guldager T., Gabrielsen A., Iversen L.H., Kirkegaard K. Culture media affect sex after IVF treatment – a detailed analysis of explanatory variables. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2024. Vol. 41. Pp. 1181–1191. <https://doi.org/10.1007/s10815-024-03081-1>

7. Lane M., Gardner D.K. Increase in postimplantation development of cultured mouse embryos by amino acids and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions. *J. Reprod. Fertil.* 1994. Vol. 102. Pp. 305–312.
<https://doi.org/10.1530/jrf.0.1020305>
8. Lane M., Gardner D.K. Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *J. Reprod. Fertil.* 1997. Vol. 109. Pp. 153–164.
<https://doi.org/10.1530/jrf.0.1090153>
9. Lane M., Gardner D.K. Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. *Hum. Reprod.* 1998. Vol. 13. No. 4. Pp. 991–997. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.4.991>
10. Sunde A., Brison D., Dumoulin J. et al. Time to take human embryo culture seriously. *Hum. Reprod.* 2016. Vol. 31. No. 11. Pp. 2174–2182.
<https://doi.org/10.1093/humrep/dew157>
11. Ho Y., Wigglesworth K., Eppig J.J., Schultz R.M. Preimplantation development of mouse embryos in KSOM: augmentation by amino acids and analysis of gene expression. *Mol. Reprod. Dev.* 1995. Vol. 41. No. 2. Pp. 232–238.
<https://doi.org/10.1002/mrd.1080410214>
12. Rinaudo P., Schultz R.M. Effects of embryo culture on global pattern of gene expression in preimplantation mouse embryos. *Reproduction.* 2004. Vol. 128. No. 3. Pp. 301–311. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00297>
13. Li J., Zhang J., Hou W. et al. Metabolic control of histone acetylation for precise and timely regulation of minor ZGA in early mammalian embryos. *Cell Discov.* 2022. Vol. 8. 96. <https://doi.org/10.1038/s41421-022-00440-z>
14. Vrooman L.A., Rhon-Calderon E.A., Suri K.V. et al. Placental abnormalities are associated with specific windows of embryo culture in a mouse model. *Front. Cell Dev. Biol.* 2022. Vol. 10. 884088. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.884088>
15. Shindo M., Miyado K., Kang W. et al. Efficient superovulation and egg collection from mice. *Bio Protoc.* 2022. Vol. 12. e4439.
<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4439>
16. Sagirkaya H., Misirlioglu M., Kaya A. et al. Developmental and molecular correlates of bovine preimplantation embryos. *Reproduction.* 2006. Vol. 131. No. 6. Pp. 895–904. <https://doi.org/10.1530/rep.1.01021>
17. Zhao J., Yao K., Yu H. et al. Metabolic remodelling during early mouse embryo development. *Nat. Metab.* 2021. Vol. 3. Pp. 1372–1384.
<https://doi.org/10.1038/s42255-021-00464-x>
18. Bagis H., Odaman Mercan H. Effect of chemically defined culture medium supplemented with beta-mercaptoethanol and amino acids on implantation and development of different stage in vivo- or in vitro-derived mouse embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 2004. Vol. 69. No. 1. Pp. 52–59. <https://doi.org/10.1002/mrd.20120>
19. Hemkemeyer S.A., Schwarzer C., Boiani M. et al. Effects of embryo culture media do not persist after implantation: a histological study in mice. *Hum. Reprod.* 2014. Vol. 29. No. 2. Pp. 220–233. <https://doi.org/10.1093/humrep/det411>

20. Robertson S.A. GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007. Vol. 18. No. 3–4. Pp. 287–298. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2007.04.008>
21. 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. Vol. 30. No. 10. Pp. 2303–2311. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev179>
22. Ducreux B., Barberet J., Guilleman M. et al. Assessing the influence of distinct culture media on human pre-implantation development using single-embryo transcriptomics. *Front. Cell Dev. Biol.* 2023. Vol. 11. 1155634. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1155634>
23. Simopoulou M., Sfakianoudis K., Rapani A. et al. Considerations regarding embryo culture conditions: from media to epigenetics. *In Vivo.* 2018. Vol. 32. No. 3. Pp. 451–460. <https://doi.org/10.21873/invivo.11261>
24. Mestres E., García-Jiménez M., Casals A. et al. Factors of the human embryo culture system that may affect media evaporation and osmolality. *Hum. Reprod.* 2021. Vol. 36. No. 3. Pp. 605–613. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa370>
25. Sciorio R., Rinaudo P. Culture conditions in the IVF laboratory: state of the ART and possible new directions. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2023. Vol. 40. No. 10. Pp. 2591–2607. <https://doi.org/10.1007/s10815-023-02934-5>
26. Zagers M.S., Laverde M., Goddijn M. et al. The composition of commercially available human embryo culture media. *Hum. Reprod.* 2025. Vol. 40. Pp. 30–40. <https://doi.org/10.1093/humrep/deae248>
27. Morbeck D.E., Krisher R.L., Herrick J.R. et al. Composition of commercial media used for human embryo culture. *Fertil. Steril.* 2014. Vol. 102. No. 3. Pp. 759–766.e9. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.05.043>
28. 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. Vol. 34. No. 8. Pp. 1450–1461. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez102>

REFERENCES

1. Ranneva S.V., Brusentsev E.Yu., Igonina T.N. et al. Vliyaniye kul'tivirovaniya embrionov na ontogenez potomstva u mlekopitayushchikh [The effect of embryo culture on ontogenesis of mammalian offspring. *Ontogenez = Russian Journal of Developmental Biology.* 2020;**51**(6): 356–376. (In Russ.) <https://doi.org/10.31857/S0475145020060075>
2. Summers M.C., McGinnis L.K., Lawitts J.A. et al. IVF of mouse ova in a simplex optimized medium supplemented with amino acids. *Hum. Reprod.* 2000;**15**(8):1791–1801. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.8.1791>
3. Biggers J.D. Thoughts on embryo culture conditions. *Reprod. Biomed. Online.* 2002;**4**:30–38. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(12\)60009-1](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(12)60009-1)

4. Xella S., Marsella T., Tagliasacchi D. et al. Embryo quality and implantation rate in two different culture media: ISM1 versus Universal IVF Medium. *Fertil. Steril.* 2010;**93**:1859–1863. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.12.030>
5. 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 concepti produced through assisted reproductive technologies. *Biol. Reprod.* 2014;**90**:22. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.114785>
6. Guldager T., Gabrielsen A., Iversen L.H., Kirkegaard K. Culture media affect sex after IVF treatment – a detailed analysis of explanatory variables. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2024;**41**:1181–1191. <https://doi.org/10.1007/s10815-024-03081-1>
7. Lane M., Gardner D.K. Increase in postimplantation development of cultured mouse embryos by amino acids and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions. *J. Reprod. Fertil.* 1994;**102**:305–312. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1020305>
8. Lane M., Gardner D.K. Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *J. Reprod. Fertil.* 1997;**109**:153–164. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1090153>
9. Lane M., Gardner D.K. Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. *Hum. Reprod.* 1998;**13**(4):991–997. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.4.991>
10. Sunde A., Brison D., Dumoulin J. et al. Time to take human embryo culture seriously. *Hum. Reprod.* 2016;**31**(11):2174–2182. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew157>
11. Ho Y., Wigglesworth K., Eppig J.J., Schultz R.M. Preimplantation development of mouse embryos in KSOM: augmentation by amino acids and analysis of gene expression. *Mol. Reprod. Dev.* 1995;**41**(2):232–238. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080410214>
12. Rinaudo P., Schultz R.M. Effects of embryo culture on global pattern of gene expression in preimplantation mouse embryos. *Reproduction.* 2004;**128**(3):301–311. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00297>
13. Li J., Zhang J., Hou W. et al. Metabolic control of histone acetylation for precise and timely regulation of minor ZGA in early mammalian embryos. *Cell Discov.* 2022;**8**:96. <https://doi.org/10.1038/s41421-022-00440-z>
14. Vrooman L.A., Rhon-Calderon E.A., Suri K.V. et al. Placental abnormalities are associated with specific windows of embryo culture in a mouse model. *Front. Cell Dev. Biol.* 2022;**10**:884088. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.884088>
15. Shindo M., Miyado K., Kang W. et al. Efficient superovulation and egg collection from mice. *Bio Protoc.* 2022;**12**:e4439. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4439>
16. Sagirkaya H., Misirlioglu M., Kaya A. et al. Developmental and molecular correlates of bovine preimplantation embryos. *Reproduction.* 2006;**131**(6):895–904. <https://doi.org/10.1530/rep.1.01021>

17. Zhao J., Yao K., Yu H. et al. Metabolic remodelling during early mouse embryo development. *Nat. Metab.* 2021;**3**:1372–1384. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00464-x>
18. Bagis H., Odaman Mercan H. Effect of chemically defined culture medium supplemented with beta-mercaptoethanol and amino acids on implantation and development of different stage *in vivo*- or *in vitro*-derived mouse embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 2004;**69**(1):52–59. <https://doi.org/10.1002/mrd.20120>
19. Hemkemeyer S.A., Schwarzer C., Boiani M. et al. Effects of embryo culture media do not persist after implantation: a histological study in mice. *Hum. Reprod.* 2014;**29**(2):220–233. <https://doi.org/10.1093/humrep/det411>
20. Robertson S.A. GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007;**18**(3–4):287–298. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2007.04.008>
21. 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;**30**(10):2303–2311. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev179>
22. Ducreux B., Barberet J., Guilleman M. et al. Assessing the influence of distinct culture media on human pre-implantation development using single-embryo transcriptomics. *Front. Cell Dev. Biol.* 2023;**11**:1155634. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1155634>
23. Simopoulou M., Sfakianoudis K., Rapani A. et al. Considerations regarding embryo culture conditions: from media to epigenetics. *In Vivo.* 2018;**32**(3):451–460. <https://doi.org/10.21873/invivo.11261>
24. Mestres E., García-Jimenez M., Casals A. et al. Factors of the human embryo culture system that may affect media evaporation and osmolality. *Hum. Reprod.* 2021;**36**(3):605–613. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa370>
25. Sciorio R., Rinaudo P. Culture conditions in the IVF laboratory: state of the ART and possible new directions. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2023;**40**(10):2591–2607. <https://doi.org/10.1007/s10815-023-02934-5>
26. Zagers M.S., Laverde M., Goddijn M. et al. The composition of commercially available human embryo culture media. *Hum. Reprod.* 2025;**40**:30–40. <https://doi.org/10.1093/humrep/deae248>
27. Morbeck D.E., Krisher R.L., Herrick J.R. et al. Composition of commercial media used for human embryo culture. *Fertil. Steril.* 2014;**102**(3):759–766.e9. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.05.043>
28. 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;**34**(8):1450–1461. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez102>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Брусенцев Евгений Юрьевич – канд. биол. наук; науч. сотр.,
Институт цитологии и генетики СО РАН (ИЦиГ СО РАН),
Новосибирск, Российская Федерация
E-mail: zerall@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1360-9080>

Рожкова Ирина Николаевна – канд. биол. наук; науч. сотр.,
Институт цитологии и генетики СО РАН (ИЦиГ СО РАН),
Новосибирск, Российская Федерация
E-mail: rozhkova23@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1130-5489>

Рахманова Тамара Александровна – аспирант,
Новосибирский национальный исследовательский государственный университет (НГУ),
Новосибирск, Российская Федерация
E-mail: tamara1599@icloud.com

Козенева Варвара Семеновна – аспирант,
Новосибирский национальный исследовательский государственный университет (НГУ),
Новосибирск, Российская Федерация
E-mail: v.kozeneva@g.nsu.ru
<https://orcid.org/0009-0002-1052-357X>

Соловьева Софья Сергеевна – аспирант,
Институт цитологии и генетики СО РАН (ИЦиГ СО РАН),
Новосибирск, Российская Федерация
E-mail: sonya.soloveva.01@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0007-9473-7351>

Амтиславский Сергей Яковлевич – д-р биол. наук; гл. науч. сотр.,
Институт цитологии и генетики СО РАН (ИЦиГ СО РАН),
Новосибирск, Российская Федерация
E-mail: amstis@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7119-0356>

Поступила в редакцию 11.11.2025
После доработки 05.12.2025
Принята к публикации 10.12.2025

ABOUT THE AUTHORS

Brusentsev, Eugeny Yu. – Cand. Sc. (Biology); Research Officer,
Institute of Cytology and Genetics SB RAS (ICG SB RAS),
Novosibirsk, Russian Federation
E-mail: zerall@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1360-9080>

Rozhkova, Irina N. – Cand. Sc. (Biology); Research Officer,
Institute of Cytology and Genetics SB RAS (ICG SB RAS),
Novosibirsk, Russian Federation
E-mail: rozhkova23@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1130-5489>

Rakhmanova, Tamara A. – Postgraduate, Novosibirsk National Research State University
(NSU), Novosibirsk, Russian Federation
E-mail: tamara1599@icloud.com

Kozeneva, Varvara S. – Postgraduate, Novosibirsk National Research State University (NSU),
Novosibirsk, Russian Federation
E-mail: v.kozeneva@g.nsu.ru
<https://orcid.org/0009-0002-1052-357X>

Solovieva, Sofia S. – Postgraduate, Institute of Cytology and Genetics SB RAS (ICG SB RAS),
Novosibirsk, Russian Federation
E-mail: sonya.soloveva.01@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0007-9473-7351>

Amstislavsky, Sergei Ya. – Ph.D. (Biology); Chief Researcher,
Institute of Cytology and Genetics SB RAS (ICG SB RAS),
Novosibirsk, Russian Federation
E-mail: amstis@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7119-0356>

Received November 11, 2025
Revised December 05, 2025
Accepted December 10, 2025