

# Effects of growth factors during *in vitro* culture of mouse and rat embryos

E.Yu. Brusentsev, T.N. Igonina, I.N. Rozhkova, D.S. Ragaeva, S.Ya. Amstislavsky

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

*In vitro* culture of preimplantation embryos of ICR, HT1AN/Icgn, HT1AC/Icgn and C57BL/6J-A<sup>y</sup> mouse strains as well as in OXYS/Icgn rat strain in media containing granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) or epidermal growth factor (EGF) has been studied. Both mouse and rat embryos were first frozen in a programmable freezer after a standard protocol using a mixture of glycerol and sucrose as cryoprotectants, thawed and cultured *in vitro* in R1ECM (rat one-cell embryo culture medium) for 24 hours (mice) and 72 hours (rats). For the *in vitro* culture experiments with these growth factors, 8-cell frozen-thawed mouse embryos and 2–4-cell frozen-thawed rat embryos were used. Supplementation of the culture medium with GM-CSF improved the rate of embryonic development in HT1AC/Icgn and C57BL/6J-A<sup>y</sup> strain mice, while EGF had no effect. The reverse was true of the rats. Supplementation of the culture medium with EGF increased the percentage of developing blastocysts in OXYS/Icgn rat strain, while GM-CSF had no effect. Co-culture of four-cell embryos of HT1AN/Icgn strain mice with more advanced embryonic stages (morulas) of a different strain ICR led to the facilitation preimplantation embryo development. Experimental results presented here reveal the species-specific effects of growth factors on mouse and rat embryos and indicate that co-culture of different stages of embryo development have stimulatory effects on earlier stages.

Key words: preimplantation embryos; *in vitro* culture; growth factors; mice; rats; co-culture.

## Эффекты воздействия факторов роста при культивировании *in vitro* эмбрионов мышей и крыс

Е.Ю. Брусенцев, Т.Н. Игонина, И.Н. Рожкова, Д.С. Рагаева, С.Я. Амстиславский

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

В работе исследовано развитие в культуре *in vitro* эмбрионов мышей линий ICR, HT1AN/Icgn, HT1AC/Icgn и C57BL/6J-A<sup>y</sup>, а также крыс линии OXYS/Icgn при воздействии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и эпидермального фактора роста (EGF). Зародыши как мышей, так и крыс вначале замораживали, согласно стандартному протоколу программного замораживания с использованием глицерина и сахарозы в качестве криопротекторов, а после размораживания культивировали в среде R1ECM (rat 1-cell embryo culture medium) в течение либо 24 ч (мыши), либо 72 ч (крысы). Эффекты факторов роста на мышах изучали на 8-клеточных, а на крысах – на 2-, 4-клеточных зародышах. Воздействие GM-CSF приводило к возрастанию процента развивающихся эмбрионов у мышей обеих линий (HT1AC/Icgn и C57BL/6J-A<sup>y</sup>); в то же время какого-либо эффекта воздействия EGF на зародыши мышей обнаружено не было. На крысах ситуация была обратной. Воздействие EGF приводило к ускорению развития до стадии бластоцисты у крыс линии OXYS/Icgn, но какого-либо эффекта воздействия GM-CSF на зародыши крыс не было. При совместном культивировании 4-клеточных эмбрионов мышей линии HT1AN/Icgn с более поздними стадиями развития (зародышами на стадии морулы) линии ICR, наблюдается ускорение развития. Результаты представленных экспериментов свидетельствуют о видовой специфике воздействия факторов роста на эмбрионы мышей и крыс, а также демонстрируют, что совместное культивирование эмбрионов более поздних стадий (морулы) мышей с более ранними (4-клеточные зародыши) оказывает стимулирующее влияние на последние.

Ключевые слова: преимплантационные эмбрионы; культивирование *in vitro*; факторы роста; мыши; крысы; сокультивирование.

### HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Brusentsev E.Yu., Igonina T.N., Rozhkova I.N., Ragaeva D.S., Amstislavsky S.Ya. Effects of growth factors during *in vitro* culture of mouse and rat embryos. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):372-377. DOI 10.18699/VJ15.046

### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

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;19(4):372-377. DOI 10.18699/VJ15.046

DOI 10.18699/VJ15.046

УДК 573.7:575:591.3

Received 23.06.2015 r.

Accepted for publication 10.07.2015 r.

© АВТОРЫ, 2015

 e-mail: amstis@bionet.nsc.ru

Культивирование *in vitro* преимплантационных эмбрионов млекопитающих является основой современных репродуктивных технологий (Брусенцев и др., 2014). Относительно недавно в отечественных и зарубежных клиниках экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) стали активно использовать гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) с целью увеличения доли успешно имплантировавшихся зародышей и снижения числа абортос (Ziebe et al., 2013).

В настоящее время доступна среда EmbryoGen, содержащая GM-CSF в дозе 2 нг/мл, применяемая в клиниках ЭКО по всему миру. Ранее было показано, что добавление в культуральную среду этого фактора существенно ускоряет развитие эмбрионов и у некоторых видов грызунов, в частности у мышей (Robertson et al., 2001; Sjöblom et al., 2005) и хомячков Кэмпбелла (Amstislavsky et al., 2015).

Другим перспективным фактором, ускоряющим развитие эмбрионов и повышающим вероятность их имплантации, является эпидермальный фактор роста (EGF). Экспериментально показано, что воздействие EGF при культивировании эмбрионов *in vitro* повышает долю имплантирующихся зародышей как у мышей (Morita et al., 1994), так и у крыс (Aflalo et al., 2007).

Следует, однако, отметить, что при естественном развитии зародышей *in utero* на них действует комплекс паракринных и аутокринных ростовых факторов (Brigstock et al., 1989). Более того, известно, что в группе эмбрионы мышей развиваются намного лучше, чем поодиночке (Paria, Dey, 1990). Относительно недавно этот эффект был подтвержден и на эмбрионах кошек (Spindler, Wildt, 2002), в том числе и при совместном культивировании их с эмбрионами мышей (Spindler et al., 2006).

Целями данной работы было: 1) изучить эффект применения двух различных факторов роста (GM-CSF и EGF) на двух линиях мышей (HT1AC/Icgn, C57BL/6J-A<sup>y</sup>) и крысах линии OXYS/Icgn; 2) проверить эффективность сокультивирования различных стадий развития преимплантационных зародышей мышей линий ICR и HT1AN/Icgn.

## Материалы и методы

### Экспериментальные животные

В качестве доноров эмбрионов использовали половозрелых самок мышей C57BL/6J-A<sup>y</sup> (возраст 8–10 нед,  $n = 12$ ), HT1AC/Icgn (возраст 8–10 нед,  $n = 15$ ), ICR (возраст 8–10 нед,  $n = 8$ ) и HT1AN/Icgn (возраст 8–10 нед,  $n = 8$ ), а также половозрелых самок крыс линии OXYS/Icgn (возраст 10–14 нед,  $n = 12$ ). Для получения эмбрионов самок мышей и крыс спаривали с самцами тех же линий и того же возраста. Животных содержали в стандартных условиях конвенционального вивария Института цитологии и генетики (Новосибирск, Россия).

Все эксперименты на животных одобрены комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 5 от 13.05.2011) и соответствуют Европейской конвенции о защите позвоночных животных.

### Получение преимплантационных эмбрионов мышей и крыс

**Мыши.** У самок мышей линий C57BL/6J-A<sup>y</sup>, HT1AC/Icgn,

ICR и HT1AN/Icgn вызывали суперовуляцию по стандартной схеме, описанной ранее (Амстиславский и др., 2013). Каждую суперовулированную самку затем ссаживали на ночь с самцом той же линии. День обнаружения вагинальной пробки считали первым днем беременности.

**Крысы.** Самок крыс линии OXYS/Icgn в состоянии эструса, определенного путем исследования влажных мазков, ссаживали на ночь с самцами той же линии. День обнаружения сперматозоидов во влажном мазке считали первым днем беременности.

Самок мышей подвергали эвтаназии путем дислокации шейных позвонков вечером второго дня (для получения ранних стадий развития) или утром третьего дня (для получения более поздних стадий развития) беременности. Самок крыс подобным же образом подвергали эвтаназии на утро третьего дня беременности. Яйцеводы и матку извлекали и промывали средой EMCARE Complete Ultra Flushing Solution (ICPBio Reproduction, США), как описано ранее (Амстиславский и др., 2013). Эмбрионы подсчитывали и оценивали с использованием стереомикроскопа Leica S8 APO с увеличением до  $\times 80$  (Leica Microsystems, Германия). Качество зародышей оценивали с учетом стадии эмбрионального развития и числа жизнеспособных клеток (Emiliani et al., 2000). Некачественные эмбрионы были отбракованы; зародыши хорошего качества промывали в трех каплях той же среды и замораживали.

### Замораживание эмбрионов

Для замораживания преимплантационных зародышей мышей и крыс всех линий использовали 10 %-й v/v глицерин (EMCARE, ICPBio Reproduction, США) с добавлением 0,1 М сахарозы (Sigma, США).

После насыщения криопротектором 10–15 эмбрионов помещали в 0,25 мл-е пластиковые соломины (Cryo Bio System, Франция), каждая из которых была заполнена тремя порциями криопротектора, разделенными двумя воздушными пузырьками (10–20 мкл каждого). Первый сектор: EMCARE™ Complete Ultra Flushing Solution (ICPBio Reproduction, США). Второй сектор: раствор, полученный путем растворения 0,1 М сахарозы (Sigma, США) в EMCARE™ Ethylene Glycol 1,5 М (ICPBio Reproduction, США). Третий сектор: раствор, полученный путем растворения 0,3 М сахарозы (Sigma, США) в EMCARE™ Complete Ultra Flushing Solution (ICPBio Reproduction, США). Эмбрионы помещали в центральную часть (второй сектор) соломины.

Соломины с эмбрионами помещали в программный замораживатель CL 8 800 (CryoLogic, Австралия) и охлаждали в соответствии со следующей программой: от 18 °C до –7 °C со скоростью –1 °C/мин; 10 мин при –7 °C, сидинг (путем прикосновения к соломине охлажденным пинцетом) через 1 мин; от –7 °C до –35 °C со скоростью –0,3 °C/мин; 10 мин при –35 °C и погружали в жидкий азот при этой температуре.

### Оттаивание эмбрионов

Соломины доставали из резервуара с жидким азотом, выдерживали в течение 40 с при комнатной температуре, а затем помещали на 40 с в водяную баню при 30,0 °C. Ранее было показано, что скорость оттаивания с использо-

ванием этого метода составляет около 300 °С/мин (Renard, Babinet, 1984).

### Отмывание и культивирование эмбрионов

После размораживания эмбрионов содержимое соломины выдавливали на чашку Петри (Corning, США) и выдерживали в этой смешанной капле в течение 15 мин при комнатной температуре. Криопротектор удаляли при помощи промывания размороженных эмбрионов в трех каплях (50 мкл) среды Holding Solution (EMCARE, ICPBio Reproduction, США).

После удаления криопротектора, как описано выше, эмбрионы, независимо от их качества, последовательно промывали в 10 каплях стерильного Holding Solution (200 мкл EMCARE, ICPBio Reproduction, США) со сменой стеклянных капилляров для стерильного переноса между каплями и оценивали визуально с помощью микроскопа M DM IL LED (Leica Microsystems, Германия) при увеличении  $\times 50$  и  $\times 100$ . Зародыши, у которых было разрушено более 25 % бластомеров, были отбракованы, остальные поставлены на культивирование *in vitro*. Эмбрионы мышей (C57BL/6J-A<sup>y</sup> и HT1AC/Icgn) и крыс линии OXYS/Icgn переносили в 50 мкл среды R1ECM (Amstislavsky et al., 2015).

Сформировали по три тестовые группы для контрольных экспериментов (без сокультивирования) для каждой из двух исследуемых линий мышей и одной линии крыс: 1) без добавления факторов роста (контроль); 2) с добавлением EGF и 3) с добавлением GM-CSF.

При сокультивировании эмбрионов мышей (ICR и HT1AN/Icgn) были сформированы две тестовые группы: 1) 4-клеточные эмбрионы HT1AN/Icgn в качестве контроля (HT1AN/Icgn); 2) 4-клеточные эмбрионы HT1AN/Icgn совместно с морулами линии ICR (ICR + HT1AN/Icgn).

Культивирование производили под минеральным маслом (Sigma, США) в течение 24 ч (для мышей) и 72 ч (для крыс) при 37 °С в 5 % CO<sub>2</sub> и влажности 90 % в CO<sub>2</sub> инкубаторе BINDER 150-UL (Германия). Жизнеспособность эмбрионов оценивали на микроскопе DM IL LED (Leica Microsystems, Германия) с увеличением  $\times 50$  и  $\times 100$  и производили фотосъемку.

### Статистический анализ

Результаты культивирования *in vitro*, а также сокультивирования сравнивали с использованием теста  $\chi^2$ . Результаты при  $p < 0,05$  считали статистически значимыми. Данные были проанализированы с использованием стандартного пакета программного обеспечения STATISTICA V 8.0 (StatSoft, Inc).

### Результаты

В ходе проделанной работы было установлено, что при культивировании *in vitro* преимплантационных зародышей мышей линии C57BL/6J-A<sup>y</sup> в течение 24 ч наблюдается ускорение развития эмбрионов в группе с добавлением фактора роста GM-CSF (табл. 1). По общему числу развивающихся эмбрионов, т. е. достигших стадии морулы и бластоцисты, имеется достоверное отличие данной группы (94,4 %) от контроля (где развилось 28,6 % зародышей) и от группы с EGF (33,3 %). Следует отметить, что лишь

в группе, в которой эмбрионы мышей культивировали с GM-CSF, сформировались ранние бластоцисты (13 %); в двух других группах стадии бластоцисты не достиг ни один из эмбрионов.

Сходные результаты были получены при культивировании *in vitro* преимплантационных зародышей мышей линии HT1AC/Icgn (табл. 2). Все эмбрионы этой линии, культивировавшиеся с GM-CSF, развились (100 %), хотя бластоцист, так же как в других группах, не сформировалось. По общему числу развившихся эмбрионов имеется достоверное отличие данной группы от контроля.

Результаты длительного культивирования *in vitro* преимплантационных зародышей крыс линии OXYS/Icgn представлены в табл. 3. Стимулирующее действие на развитие эмбрионов оказывал EGF. В данной группе до стадии бластоцисты развилось 82,4 % эмбрионов. Имеется достоверное отличие данной группы от контроля, где до стадии бластоцисты развилось лишь 33,3 % всех зародышей.

При совместном культивировании 4-клеточных эмбрионов мышей линии HT1AN/Icgn с более поздними стадиями линии ICR наблюдается ускорение развития в экспериментальной группе по сравнению с контролем (табл. 4). Всего в группе по сокультивированию за 24 ч развилось 100 % всех эмбрионов до стадии морулы, но бластоцист ни в одной из групп не сформировалось. По общему числу развившихся эмбрионов имеется достоверное отличие экспериментальной группы от контроля.

### Обсуждение

В данном исследовании был подтвержден стимулирующий эффект гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора по отношению к эмбрионам мышей, обнаруженный ранее (Robertson et al., 2001; Desai et al., 2007). При этом, однако, не было обнаружено стимулирующего эффекта эпидермального ростового фактора по отношению к эмбрионам мышей. В более ранних работах (Paria, Dey, 1990; Morita et al., 1994; Desai et al., 2007) было показано, что EGF влияет на скорость развития преимплантационных эмбрионов мышей в культуре *in vitro*, способствует формированию и росту внутренней клеточной массы (ВКМ) в бластоцисте, а также хэтчингу и имплантации эмбрионов. Отсутствие стимулирующего эффекта при применении EGF в нашей работе можно объяснить методическими различиями, такими как выбор дозы, длительность культивирования, а также среда, в которой культивировали зародыши.

Эффекты воздействия GM-CSF на преимплантационные эмбрионы крыс до нашей работы не изучались. В данном исследовании не обнаружено стимулирующего эффекта GM-CSF на эмбрионы крыс. Однако был обнаружен эффект ускорения образования бластоцист при воздействии другого фактора – EGF. Ранее было продемонстрировано, что добавление в среду культивирования этого фактора в той же дозе позитивно влияет на имплантацию эмбрионов крыс (Aflalo et al., 2007).

Известно, что у разных видов млекопитающих имеются различия в скорости формирования рецепторов к разным факторам роста (Hardy, Spanos, 2002). Именно с этим обстоятельством можно связать то, что в случае крыс

**Table 1.** *In vitro* growth of C57BL/6J-A<sup>y</sup> mouse embryos at the 8-cell blastomere stage with growth factors EGF or GM-CSF<sup>a</sup>

Medium	Number of embryos		Growing embryos, %		
	frozen-thawed (number of tests)	taken for culturing	morulae	blastocysts	total
R1ECM (control) <sup>b</sup>	15 (3)	14	4 (28.6)	0 (0)	4 (28.6)
R1ECM + EGF <sup>c</sup>	14 (3)	9	3 (33.3)	0 (0)	3 (33.3)
R1ECM + GM-CSF <sup>d</sup>	56 (3)	54	44 (81.5)*	7 (13.0)	51 (94.4)**

\*  $p < 0.01$ ; \*\*  $p < 0.001$ : The R1ECM + GM-CS group in comparison with two other groups of the class (total number of growing embryos). <sup>a</sup> The overall duration of *in vitro* growth of embryos was 24 h. <sup>b</sup> R1ECM (control): Embryos grew in Rat 1-cell Embryo Culture Medium (R1ECM) without growth factors. <sup>c</sup> R1ECM + EGF: Embryos grew in R1ECM with epidermal growth factor (EGF). <sup>d</sup> R1ECM + GM-CSF: Embryos grew in R1ECM with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF).

**Table 2.** *In vitro* growth of HT1AC/lcgn mouse embryos at the 8-cell blastomere stage with growth factors EGF or GM-CSF<sup>a</sup>

Medium	Number of embryos		Growing embryos, %		
	frozen-thawed (number of tests)	taken for culturing	morulae	blastocysts	total
R1ECM (control) <sup>b</sup>	22 (3)	18	13 (72.2)	0 (0)	13 (72.2)
R1ECM + EGF <sup>c</sup>	52 (3)	25	23 (92)	0 (0)	23 (92)
R1ECM + GM-CSF <sup>d</sup>	57 (3)	23	23 (100)*	0 (0)	23 (100)*

\*  $p < 0.05$ : The R1ECM + GM-CS group in comparison with two other groups of the class (total number of growing embryos). Designations <sup>a-d</sup> follow Table 1.

**Table 3.** *In vitro* culturing of OXYS/lcgn mouse embryos at the 2-4-cell blastomere stage with growth factors EGF or GM-CSF<sup>a</sup>

Medium	Number of embryos		Growing embryos, %		
	frozen-thawed (number of tests)	taken for culturing	morulae	blastocysts	total
R1ECM (control) <sup>b</sup>	18 (4)	15	5 (33.3)	5 (33.3)	10 (66.7)
R1ECM + EGF <sup>c</sup>	18 (4)	17	2 (11.8)	14 (82.4)*	16 (94.1)
R1ECM + GM-CSF <sup>d</sup>	17 (4)	15	2 (13.3)	10 (66.7)	12 (80.0)

\*  $p < 0.01$ : The R1ECM + EGF group in comparison with two other groups of the class (number of embryos that reached the blastocyst stage). <sup>a</sup> The overall duration of *in vitro* growth of embryos was 72 h. <sup>b</sup> R1ECM (control): Embryos grew in Rat 1-cell Embryo Culture Medium (R1ECM) without growth factors. <sup>c</sup> R1ECM + EGF: Embryos grew in R1ECM with epidermal growth factor (EGF). <sup>d</sup> R1ECM + GM-CSF: Embryos grew in R1ECM with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF).

**Table 4.** *In vitro* coculturing of ICR and HT1AN/lcgn mouse embryos<sup>a</sup>

Group	Number of embryos		Growing embryos, %		
	frozen-thawed (number of tests)	taken for culturing	morulae	blastocysts	total
HT1AN/lcgn (control) <sup>b</sup>	15 (3)	13	8 (62.0)	0 (0)	8 (62.0)
ICR + HT1AN/lcgn <sup>c</sup>	15 (3)	12	12 (100)*	0 (0)	12 (100)*

\*  $p < 0.05$ : Significance of differences from the HT1AN/lcgn, control in the group (number of morulae; total number of growing embryos); <sup>a</sup> The overall duration of *in vitro* growth of embryos was 24 h. <sup>b</sup> HT1AN/lcgn (control): Four-cell HT1AN/lcgn mouse embryos grew in Rat 1-cell Embryo Culture Medium (R1ECM); <sup>c</sup> ICR + HT1AN/lcgn: four-cell HT1AN/lcgn mouse embryos cocultivated with ICR morulae in R1ECM.

стимулирующий эффект был показан при добавлении в культуральную среду EGF, а в случае мышей – при добавлении GM-CSF. Другим объяснением могут быть различия оптимальной дозировки по каждому из изученных факторов для изучаемых видов грызунов. Известно, что GM-CSF в оптимальной дозе стимулирует развитие эмбрионов мышей, однако при пониженной или повышенной концентрации данного фактора стимулирующего эффекта не наблюдали (Elaimi et al., 2012).

В клиниках ВРТ (вспомогательных репродуктивных технологий) современным трендом является культивирование полученных в результате ЭКО эмбрионов до blastocysts перед их трансплантацией реципиентам (Blake et al., 2007). Показано, что условия культивирования сильно влияют на процент развития зародышей до blastocysts, формирование ВКМ, хэтчинг и другие аспекты развития (Sjöblom et al., 1999). Продемонстрированный нами эффект и сама модель могут быть в перспективе полезными для усовершенствования системы культивирования в клиниках ЭКО. Ранее было показано, что скорость развития эмбрионов в культуре *in vitro* зависит от числа эмбрионов в группе (Paria, Dey, 1990). Однако при числе эмбрионов в группе не менее 5 дальнейшее его возрастание не приводило к увеличению скорости их развития. В нашем исследовании группы состояли из 4–5 культивируемых зародышей (т. е. являлись оптимальными). При этом был показан дополнительный стимулирующий эффект по отношению к ранним стадиям дробления мышинных зародышей при их сокультивировании с более поздними стадиями (морулы). Таким образом, данная модель может иметь практическую ценность как инструмент в работе с эмбрионами млекопитающих для оптимизации их развития в культуре.

В исследованиях на мышах обнаружено, что после культивирования эмбрионов *in vitro* и последующей трансплантации эмбрионов меняются поведение (Ecker et al., 2004), а также некоторые физиологические характеристики, такие как вес (Sjöblom et al., 2005) и кровяное давление (Watkins et al., 2007). Можно предположить, что путем совместного культивирования эмбрионов разных линий или видов можно не только улучшать эффективность культуральных работ, но и влиять на характеристики потомков.

## Acknowledgments

This work was conducted as part of Budgeted Project VI.53.2.1. Experiments were conducted in ICG vivaria and supported by the Ministry of Education and Science of Russia (Agreement 14.621.21.0010 of December 4, 2014, RFMEFI62114X0010, and Agreement 14.619.21.0005 of August 22, 2014, RFMEFI61914X0005) and by the Russian Foundation for Basic Research, project 15-04-05509.

The authors acknowledge E.A. Galustyan's assistance in manipulations with embryos. They are also grateful to the Shared Access Centers *Vivarium for Conventional Animals* and *SPF Vivarium*.

## Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

## References

- Aflalo E.D., Sod-Moriah U.A., Potashnik G., Har-Vardi I. EGF increases expression and activity of PAs in preimplantation rat embryos and their implantation rate. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2007;5:4. DOI: 10.1186/1477-7827-5-4
- Amstislavsky S., Brusentsev E., Kizilova E., Igonina T., Abramova T., Rozhkova I. Embryo cryopreservation and *in vitro* culture of preimplantation embryos in Campbell's hamster (*Phodopus campbelli*). *Theriogenology*. 2015;82:1056-1063. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.12.013
- Amstislavsky S.Ya., Igonina T.N., Rozhkova I.N., Brusentsev E.Yu., Rogovaya A.A., Ragaeva D.S., Naprimerov V.A., Litvinova E.A., Plyusnina I.Z., Markel A.L. Rederivation by embryo transfer in strains of laboratory mice and rats. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2013;17(1): 147-161.
- Blake D., Farquhar C. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2007;4:1-61. DOI: 10.1002/14651858.CD002118.pub3
- Brigstock D.R., Heap R.B., Brown K.D. Polypeptide growth factors in uterine tissues and secretions. *J. Reprod. Fertil.* 1989;85:747-758. DOI: 10.1530/jrf.0.0850747
- Brusentsev E.Yu., Igonina T.N., Amstislavsky S.Ya. Traditional and modern approaches to the culturing of preimplantation mammalian embryos *in vitro*. *Ontogenez – Ontogeny*. 2014;45(2):73-88.
- Desai N., Kattal N., AbdelHafez F.F., Szeptycki-Lawson J., Goldfarb J. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and co-culture can affect post-thaw development and apoptosis in cryopreserved embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2007;24(6):215-222. DOI: 10.1007/s10815-007-9119-8
- Ecker D.J., Stein P., Xu Z., Williams C.J., Kopf G.S., Bilker W.B., Abel T., Schultz R.M. Long-term effects of culture of preimplantation mouse embryos on behavior. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004;101(6):1595-1600. DOI: 10.1073/pnas.0306846101
- Elaimi A., Gardner K., Kistnareddy K., Harper J. The effect of GM-CSF on development and aneuploidy in murine blastocysts. *Hum. Reprod.* 2012;27(6):1590-1595. DOI: 10.1093/humrep/des108
- Emiliani S., Van den Bergh M., Vannin A.S., Biramanel J., Englert Y. Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. *Hum. Reprod.* 2000;4:905-910. DOI: 10.1093/humrep/15.4.905
- Hardy K., Spanos S. Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. *J. Endocrinol.* 2002;172(2):221-236. DOI: 10.1677/joe.0.1720221
- Morita Y., Tsutsumi O., Taketani Y. *In vitro* treatment of embryos with epidermal growth factor improves viability and increases the implantation rate of blastocysts transferred to recipient mice. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1994;171(2):406-409.
- Paria B.C., Dey S.K. Preimplantation embryo development *in vitro*: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1990;87(12):4756-4760.
- Renard J.P., Babinet C. High survival of mouse embryos after rapid freezing and thawing inside plastic straws with 1-2 propanediol as cryoprotectant. *J. Exp. Zool.* 1984;230:443-448. DOI: 10.1002/jez.1402300313
- Robertson S.A., Sjöblom C., Jasper M.J., Norman R.J., Seamark R.F. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes glucose transport and blastomere viability in murine preimplantation embryos. *Biol. Reprod.* 2001;64(4):1206-1215. DOI: 10.1095/biol-reprod64.4.1206

- Sjöblom C., Roberts C.T., Wikland M., Robertson S.A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor alleviates adverse consequences of embryo culture on fetal growth trajectory and placental morphogenesis. *Endocrinology*. 2005;146(5):2142-2153. DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/en.2004-1260>
- Sjöblom C., Wikland M., Robertson S.A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes human blastocyst development *in vitro*. *Hum. Reprod.* 1999;14(12):3069-3076. DOI: 10.1093/hum-rep/14.12.3069
- Spindler R.E., Crichton E.G., Agca Y., Loskutoff N., Critser J., Gardner D.K., Wildt D.E. Improved felid embryo development by group culture is maintained with heterospecific companions. *Theriogenology*. 2006;66(1):82-92. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.03.021
- Spindler R.E., Wildt D.E. Quality and age of companion felid embryos modulate enhanced development by group culture. *Biol. Reprod.* 2002;66(1):167-173. DOI: 10.1095/biolreprod66.1.167
- Watkins A., Platt D. Mouse embryo culture induces changes in post-natal phenotype including raised systolic blood pressure. *PNAS*. 2007;104(13):5449-5454. DOI: 10.1073/pnas.0610317104
- Ziebe S., Loft A., Povlsen B.B., Erb K., Agerholm I., Aasted M., Gabrielsen A., Hnida C., Zobel D.P., Munding B., Bendz S.H., Robertson S.A. 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;99(6):1600-1609. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.12.043