

Влияние IGF-1 на апоптоз и число клеток в преимплантационных эмбрионах мышей, подвергнутых хроническому психосоциальному стрессу

Игонина Т.Н.^{1*}, Лебедева Д.А.¹, Шавшаева Н.А.^{1, 2}, Амстиславский С.Я.¹

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

* egik_00@mail.ru

Ключевые слова: инсулиноподобный фактор роста I типа (IGF-1); хронический психосоциальный стресс; апоптоз; преимплантационные эмбрионы

Мотивация и цель: На сегодняшний день известно, что психосоциальный стресс может оказывать негативное влияние на женскую репродуктивную систему, однако механизмы, лежащие в основе этих эффектов, мало изучены. Фолликулогенез в яичниках регулируется как гонадотропинами гипофиза, так и внутриовариальными регуляторными факторами [1–4]. Одним из важных местных регуляторных факторов яичника является инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1), он участвует на всех этапах фолликулогенеза, а именно на стадии рекрутирования фолликулов, отбора и доминирования [5, 6]. В предыдущих исследованиях мы показали, что хронический психосоциальный стресс ухудшает качество ооцитов у мышей, а также усиливает накопление активных форм кислорода и увеличивает процент апоптотических клеток в кумулюс-ооцитных комплексах. Кроме того, нами было показано снижение общего содержания IGF-1 в ткани яичника и снижение экспрессии генов *Igf-1* и *Igf-1r* в кумулюс-ооцитных комплексах при стрессе. В результате мы выдвинули гипотезу о том, что IGF-1 может участвовать в стресс-опосредованной реакции гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы. Целью данной работы было исследование влияния введения IGF-1 *in vivo* на фоне хронического психосоциального стресса на общее число клеток и уровень апоптоза в эмбрионах мышей на стадии бластоцисты.

Методы и алгоритмы: Исследования проводили на мышах линии CD1. Животных содержали в стандартных условиях SPF-вивария ИЦиГ СО РАН. Все исследования были одобрены Комитетом по биоэтике ИЦиГ СО РАН (Протокол № 143 от 15.03.2023). Самки мышей в возрасте 8–12 недель были случайным образом распределены на две группы: Контроль (без стрессирующего воздействия) и Стресс (подвергнутые воздействию стрессирующих факторов). Хронический психосоциальный стресс был вызван следующим образом: самок мышей содержали в изоляции (по одной самке в клетке) в течение 11 дней, затем в последующие 10 дней помещали в условия скученности (по 11 самок в клетке). Животных контрольной группы содержали в стандартных условиях в группах по 5 самок на клетку. Эффективность применяемой процедуры для вызывания стрессовой реакции была подтверждена, поскольку уровень кортикостерона в сыворотке крови стрессированных мышей был повышен; определение проводили методом иммуноферментного анализа с использованием набора Elisa (Cloud-Clone Corp., США).

Для исследования получали преимплантационные эмбрионы от самок: 1) с естественным эстральным циклом, 2) после стимуляции яичников экзогенными гонадотропинами, 3) после введения IGF-1 на фоне введения гонадотропинов (группа Стресс) или 4) физиологического раствора на фоне введения гонадотропинов (группа Контроль). У самок мышей определяли стадию цикла по вагинальным мазкам, как описано ранее [7]. Для получения эмбрионов от мышей с естественным эстральным циклом самки на стадии эструса были ссажены с фертильными самцами. Для получения эмбрионов от мышей после стимуляции яичников самкам мышей на стадии диэструса вводили внутримышечно 10 МЕ гонадотропина сыворотки жеребых кобыл (ГСЖК, фоллигон, Intervet, Нидерланды), затем через 46 ч внутримышечно вводили 5 МЕ хорионического гонадотропина человека (ХГЧ, хорулон, Intervet, Нидерланды), что является общепринятым протоколом стимуляции яичников мышей [8]. После этого самки были ссажены с фертильными самцами. Для получения эмбрионов от мышей после введения IGF-1/физ. раствора, самкам мышей на стадии диэструса вводили внутримышечно IGF-1 (1 мкг в 0.1 мл физ. раствора)/физ. раствор (0.1 мл), через 48 ч повторно вводили IGF-1/физ. раствор и проводили гонадотропную стимуляцию яичников по вышеописанной схеме, затем ссаживали с фертильными самцами. День обнаружения вагинальной пробки считали первым днем беременности. На четвертый день беременности самок мышей подвергали эвтаназии с помощью CO₂, затем собирали эмбрионы для последующих исследований.

Исследование апоптоза в преимплантационных эмбрионах производили при помощи набора TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) FITC Apoptosis Detection Kit (Vazyme, Китай), согласно протоколу производителя. Анализ проводили с помощью микроскопа AxioImager.M2 (Carl Zeiss, Германия) с фильтрами, подходящими для DAPI и FITC. Подсчет общего числа ядер и апоптотических клеток в эмбрионах осуществляли путем визуальной оценки препаратов с использованием программы ImageJ, как описано ранее [9].

Статистический анализ данных проводили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с последующим апостериорным сравнением с использованием критерия Фишера LSD. Различия при значении $p < 0.05$ считали статистически значимыми.

Результаты: Анализ данных показал статистически значимое влияние хронического психосоциального стресса ($F(2, 437) = 9.3, p < 0.001$), а также введения гонадотропинов и IGF-1/физ. раствора ($F(4, 874) = 35.0, p < 0.001$) и взаимодействие этих факторов ($F(4, 874) = 7.6, p < 0.001$) на число клеток и уровень апоптоза в эмбрионах (см. рисунок). При естественном цикле на фоне хронического стресса наблюдалось сниженное число клеток ($p < 0.001$) и повышенное число апоптотических клеток ($p < 0.01$) в эмбрионах мышей по сравнению с контролем. Введение гонадотропинов приводило к снижению общего числа клеток в эмбрионах как в контрольной ($p < 0.001$), так и в стрессовой ($p < 0.001$) группах. При этом уровень апоптоза в контрольной группе оставался неизменным, тогда как у стрессированных самок на фоне гонадотропной стимуляции яичников происходило снижение процента апоптотических клеток в эмбрионах ($p < 0.01$). На фоне гонадотропной стимуляции яичников введение фактора роста IGF-1 самкам мышей, подвергнутых хроническому стрессу, приводило к увеличению числа клеток в эмбрионах ($p < 0.001$). Кроме того, после

введения IGF-1 у стрессированных самок общее число клеток ($p < 0.05$) и процент апоптотических клеток ($p < 0.05$) в эмбрионах были выше, чем у контрольных самок после гормональной стимуляции в сочетании с введением физ. раствора.

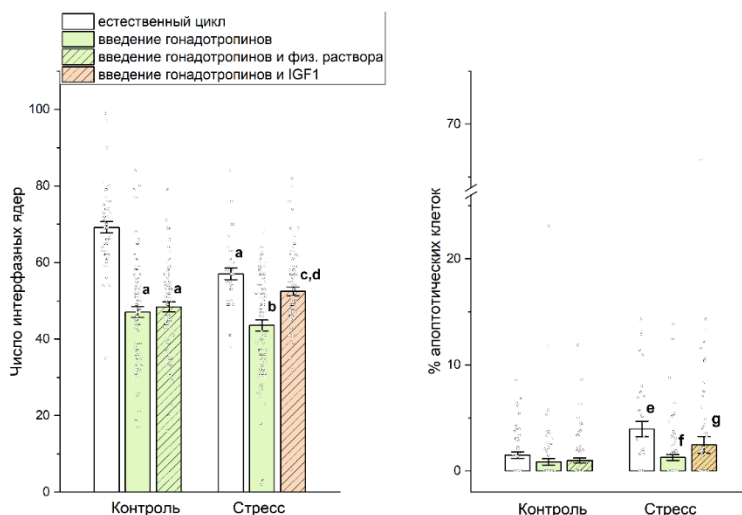


Рис. 1. Число клеток и уровень апоптоза в эмбрионах стрессированных и нестрессированных мышей. ^a $p < 0.001$, ^e $p < 0.01$ по сравнению с группой Контроль, естественный цикл; ^b $p < 0.001$, ^f $p < 0.01$ по сравнению с группой Стресс, естественный цикл; ^c $p < 0.001$ по сравнению с группой Стресс, стимуляция гонадотропинами; ^{d,g} $p < 0.05$ по сравнению с группой Контроль, стимуляция гонадотропинами и введение физиологического раствора

Выводы: Наше исследование показало, что хронический психосоциальный стресс ухудшает качество эмбрионов на стадии бластоцисты, выражающееся в сниженном числе клеток и повышенном уровне апоптоза. Стимуляция яичников гонадотропинами приводит к снижению числа клеток в эмбрионах как в контроле, так и при стрессе. При этом введение гонадотропинов на фоне стресса вызывало снижение процента апоптотических клеток в эмбрионах. Введение IGF-1 на фоне гонадотропной стимуляции яичников приводило к увеличению числа клеток в эмбрионах мышей, однако несколько повышало уровень апоптоза. В целом сочетание гонадотропной стимуляции с IGF-1 оказывает положительное влияние на качество эмбрионов мышей, подвергнутых психосоциальному стрессу.

Финансирование: Исследование поддержано Российским научным фондом (проект № 23-25-00139).

Effect of IGF-1 on apoptosis and cell number in preimplantation embryos of mice exposed to chronic psychosocial stress

Igonina T.N.^{1*}, Lebedeva D.A.¹, Shavshaeva N.A.^{1,2}, Amstislavsky S.Ya.¹

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

* egik_00@mail.ru

Key words: insulin-like growth factor type I (IGF-1); chronic psychosocial stress; apoptosis; preimplantation embryos

Motivation and Aim: It is now known that psychosocial stress negatively affect the female reproductive system, but the mechanisms underlying these effects are poorly understood. Folliculogenesis in the ovaries is regulated by pituitary gonadotropins and intraovarian regulatory factors [1–4]. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) is one of the local regulatory factors important for all the stages of folliculogenesis, i. e. the recruitment, selection and dominance [5, 6]. In our previous studies, we have shown that chronic psychosocial stress causes low quality of oocytes in mice, as well as increases the accumulation of reactive oxygen species and elevates the percentage of apoptotic cells in cumulus-oocyte complexes. In addition, we demonstrated a decrease in the total IGF-1 content in ovarian tissue and a decrease in the expression of the *Igf-1* and *Igf-1r* genes in cumulus-oocyte complexes under stress condition. As a result, we hypothesized that IGF-1 may be involved in the stress-mediated response of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. The purpose of this work was to study the effect of IGF-1 *in vivo* administration under chronic psychosocial stress condition on the total number of cells and the level of apoptosis in mouse embryos at the stage of blastocyst.

Methods and Algorithms: The studies were carried out on CD1 mice. Animals were kept under standard conditions of SPF-Vivarium of the ICG SB RAS. All studies were approved by the Bioethics Committee of the Institute of Cytology and Genetics SB RAS (Protocol No. 143 of March 15, 2023). Female mice aged 8–12 weeks were randomly assigned to two groups: Control (no stressors) and Stress (exposed to stressors). Chronic psychosocial stress was induced as follows: female mice were kept in isolation (one female per cage) for 11 days, thereafter placed in overcrowded conditions (11 females per cage) for the next 10 days. Animals of the control group were kept under standard conditions in groups of five females per cage. The effectiveness of the procedure used to induce a stress response was confirmed by the enhanced level of corticosterone in the blood serum; measurement was done using an enzyme immunoassay using the Elisa kit (Cloud-Clone Corp., USA).

For the study, preimplantation embryos were obtained from females (1) with a natural estrous cycle, (2) after ovarian stimulation with exogenous gonadotropins, (3) after administration of IGF-1 alongside with the gonadotropin stimulation (Stress group) or (4) saline (Control group) alongside with the gonadotropin stimulation. In female mice, the cycle stage was determined by vaginal smears, as described previously [7]. To obtain embryos from mice within a natural estrous cycle, females at the estrus stage were mated with fertile males. To obtain embryos from mice after ovarian stimulation, female mice at the diestrus stage were injected intramuscularly with 10 IU of pregnant mares serum gonadotropin (PMSG, Folligon, Intervet, the Netherlands); 5 IU of human chorionic gonadotropin (hCG, Chorulon, Intervet, the Netherlands) was injected intramuscularly 46 h later, i. e. a standard protocol for ovarian stimulation in mice [8]. Thereafter, the females were mated with fertile males. To test effect of IGF-1, female mice at the diestrus stage were injected intramuscularly either with IGF-1 (1 µg of IGF-1 dissolved in 0.1 ml saline) or saline (0.1 ml); thereafter IGF-1/saline was repeated 48 h later, and standard ovarian stimulation with gonadotropins was applied as described above, as well as mating with fertile males. The day the vaginal plug was discovered was considered the first day of pregnancy. On the fourth day of pregnancy, female mice were euthanized

using CO₂, and then the embryos at the blastocyst stage were collected for the subsequent analysis.

Apoptosis in preimplantation embryos was studied using the TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) FITC Apoptosis Detection Kit (Vazyme, China), according to the manufacturer's protocol. The analysis was carried out using an AxioImager.M2 microscope (Carl Zeiss, Germany) with filters suitable for DAPI and FITC. The total number of nuclei and apoptotic cells in embryos was counted by visual assessment using the ImageJ program, as described previously [9].

Statistical analysis of the data was performed using two-way analysis of variance followed by post hoc comparison using Fisher's LSD test. Differences with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results: Data analysis showed a statistically significant effect of chronic psychosocial stress ($F(2, 437) = 9.3, p < 0.001$), as well as the administration of gonadotropins and IGF-1/saline ($F(4, 874) = 35.0, p < 0.001$) and the interaction of these factors ($F(4, 874) = 7.6, p < 0.001$) on the number of cells and the level of apoptosis in embryos (Fig. 1).

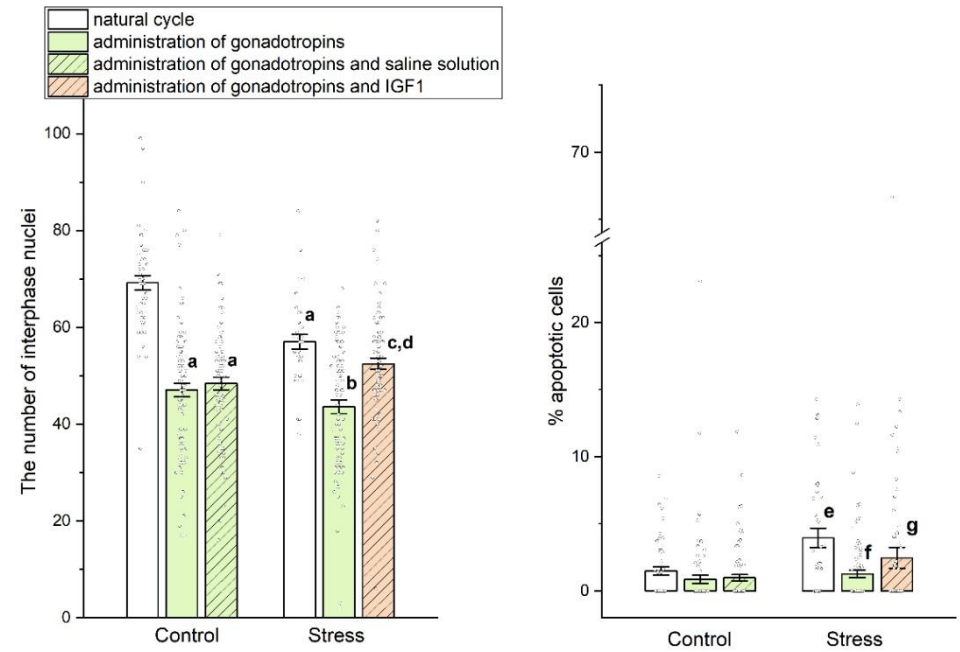


Fig. 1. Cell number and level of apoptosis in embryos of stressed and non-stressed mice.

^a $p < 0.001$, ^e $p < 0.01$ compared to the Control group, natural cycle; ^b $p < 0.001$, ^f $p < 0.01$ compared with the Stress group, natural cycle; ^c $p < 0.001$ compared to the Stress group, stimulation with gonadotropins; ^{d, g} $p < 0.05$ compared with the Control group, stimulation with gonadotropins and administration of saline solution

During the natural cycle, in the conditions of chronic stress, a reduced total cell number ($p < 0.001$) and an increased number of apoptotic cells ($p < 0.01$) were observed in mouse embryos compared to the non-stressed controls. The administration of gonadotropins led to a decrease in the total number of cells in embryos of both non-stressed ($p < 0.001$) and stressed ($p < 0.001$) groups. The level of apoptosis in the control non-stressed group remained unchanged after treatment with gonadotropins, while in the stressed females, ovarian stimulation with gonadotropins caused a decrease of the percentage of apoptotic cells in the embryos ($p < 0.01$). Administration of the growth factor IGF-1 to female mice exposed to chronic stress alongside with gonadotropin treatment led to an increase in the number of cells in the embryos ($p < 0.001$). In addition, after the administration of IGF-1 to stressed females stimulated with gonadotropins, the total number of cells ($p < 0.05$) and the percentage of apoptotic cells ($p < 0.05$) in embryos were higher than in control females after hormonal stimulation in combination with saline administration. **Conclusion:** Our study showed that chronic psychosocial stress in mice resulted in the low quality of embryos, indicated by the reduced number of cells and an increased level of apoptosis. Stimulation of the ovaries with gonadotropins leads to a decrease in the number of cells in embryos, both in non-stressed and stressed groups. Moreover, the administration of gonadotropins to stressed females caused a decrease in the percentage of apoptotic cells in embryos. Administration of IGF-1 together with ovarian stimulation with gonadotropins led to an increase in the number of cells in mouse embryos, but slightly increased the level of apoptosis. In general, the combination of gonadotropic stimulation with IGF-1 has a positive effect on the quality of embryos in mice exposed to psychosocial stress.

Funding: The study was supported by the Russian Science Foundation (project No. 23-25-00139).

Список литературы/References

1. di Clemente N., Racine C., Pierre A., Taieb J. Anti-Müllerian Hormone in Female Reproduction. *Endocr Rev.* 2021;42(6):753-782. doi 10.1210/endrev/bnab012
2. Chang C.W., Sung Y.W., Hsueh Y.W. et al. Growth hormone in fertility and infertility: Mechanisms of action and clinical applications. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:1040503. doi 10.3389/fendo.2022.1040503
3. Wu L.M., Hu M.H., Tong X.H. et al. Chronic unpredictable stress decreases expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in mouse ovaries: relationship to oocytes developmental potential. *PLoS One.* 2012;7(12):e52331. doi 10.1371/journal.pone.0052331
4. Wu L.M., Liu Y.S., Tong X.H. et al. Inhibition of follicular development induced by chronic unpredictable stress is associated with growth and differentiation factor 9 and gonadotropin in mice. *Biol Reprod.* 2012;86(4):121. doi 10.1095/biolreprod.111.093468
5. Hsueh A.J., Kawamura K., Cheng Y., Fauser B.C. Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocr Rev.* 2015;36(1):1-24. doi 10.1210/er.2014-1020
6. Costermans N.G.J., Keijer J., van Schothorst E.M. et al. In ovaries with high or low variation in follicle size, granulosa cells of antral follicles exhibit distinct size-related processes. *Mol Hum Reprod.* 2019;25(10):614-624. doi 10.1093/molehr/gaz042
7. Caligioni C.S. Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr Protoc Neurosci.* 2009;Appendix 4:Appendix 4I. doi 10.1002/0471142301.nsa04is48
8. Shindo M., Miyado K., Kang W., Fukami M., Miyado M. Efficient Superovulation and Egg Collection from Mice. *Bio Protoc.* 2022;12(11):e4439. doi 10.21769/BioProtoc.4439
9. Mirzayans R., Murray D. Do TUNEL and Other Apoptosis Assays Detect Cell Death in Preclinical Studies? *Int J Mol Sci.* 2020;21(23):9090. doi 10.3390/ijms21239090