

**ЭФФЕКТЫ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ
НА СОЦИАЛЬНОЕ ПОВЕДЕНИЕ МЫШЕЙ ЛИНИИ ВТВР – МОДЕЛИ
РАССТРОЙСТВ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА**

© 2023 г. И. Н. Рожкова¹, С. В. Окотруб¹, Е. Ю. Брусенцев¹, Т. Н. Игонина¹,
Т. А. Рахманова^{1, 2}, Д. А. Лебедева^{1, 2}, Т. А. Яцук¹, В. С. Козенева^{1, 2},
В. А. Напримеров¹, С. Я. Амстиславский^{1, *}

¹Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, Россия

²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия

*E-mail: amstis@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.10.2022 г.

После доработки 22.12.2022 г.

Принята к публикации 03.02.2023 г.

Работа является первым исследованием влияния такой вспомогательной репродуктивной технологии (ВРТ), как культивирование *in vitro* преимплантационных эмбрионов на социальное поведение потомков мышей линии ВТВР (ВТВР T + Itpr3tf/J), которая представляет собой идиопатическую модель аутизма. В качестве контроля были использованы мыши C57BL/6J. У взрослых потомков мышей, полученных в результате естественного спаривания (группы C57BL/6J и ВТВР), либо после культивирования *in vitro* и переноса эмбрионов соответствующих линий мышей псевдобеременным самкам C57BL/6J (группы ВРТ-C57BL/6J и ВРТ-ВТВР), было изучено социальное поведение. При межлинейном сравнении было показано, что мыши ВТВР имеют сниженные уровни социального распознавания и мотивации по сравнению с мышами C57BL/6J. У самок ВРТ-C57BL/6J и ВРТ-ВТВР было установлено снижение интереса к новому партнеру в сессии на социальное распознавание по сравнению с естественно зачатыми животными того же пола. Результаты поведенческого теста свидетельствуют о влиянии культивирования *in vitro* на социальное распознавание у потомков мышей линий C57BL/6J и ВТВР, но только у самок.

Ключевые слова: C57BL/6J, ВТВР, преимплантационные эмбрионы, вспомогательные репродуктивные технологии, культивирование *in vitro*, расстройства аутистического спектра, социальное поведение

DOI: 10.31857/S0869813923030044, **EDN:** FSRFDJ

ВВЕДЕНИЕ

Расстройства аутистического спектра (РАС) в настоящее время являются неизлечимыми и характеризуются снижением интереса к сверстникам, стереотипным поведением, трудностями в поддержании социальных контактов и нарушением коммуникации [1]. Детально объяснить их патологические механизмы и, следовательно, применить соответствующие профилактические методы лечения пока невозможно. Несмотря на интерес исследователей к РАС, этиологические причины и патогенетические механизмы возникновения этих расстройств изучены лишь ча-

стично, каких-либо методов превентивной терапии РАС на сегодняшний день нет, а существующие стратегии направлены лишь на смягчение симптомов [2]. Сложности в понимании этиологии аутизма и механизмов, лежащих в основе РАС связаны, в частности, с тем, что в патогенез этих расстройств вовлечено множество генетических и средовых факторов в их сложном взаимодействии, а также эпигенетические модификации [3, 4]. Между тем, большинство исследователей согласны, что РАС могут возникать в результате нарушений развития нервной системы в раннем онтогенезе [2, 5, 6].

Культивирование ранних эмбрионов *in vitro* является одной из основных вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), широко применяемых как в медицине, так и в исследованиях на животных [7, 8]. Несмотря на более чем 40-летнее использование ВРТ в репродуктивной медицине, накапливаются противоречивые данные по поводу отдаленных эффектов применения этих методов по отношению к потомкам. Одни исследователи обнаруживают влияние этих процедур на здоровье людей, другие нет, что может быть обусловлено применением различных протоколов. Наряду с анализом медицинской литературы, при обсуждении последствий применения репродуктивных технологий следует учитывать результаты экспериментов на животных, выполненных в стандартизированных условиях на разных лабораторных моделях [7, 8].

В последнее десятилетие активно обсуждают возможную связь между применением ВРТ и повышением частоты РАС [9–12] и отклонениями в развитии нервной системы [13, 14] у детей после применения ВРТ. Проблема таких исследований, основанных на мета-анализе клинических данных, заключается в том, что ВРТ характеризуются многочисленными и сложными терапевтическими процедурами, которые до сих пор не унифицированы [15]. Хотя некоторые исследования выявили влияние ВРТ на частоту возникновения РАС у детей [9–11], потенциальный биологический механизм этой связи до сих пор не ясен, что осложнено малой величиной исследованных выборок, отсутствием адекватной контрольной группы, а также тем, что процедуры ВРТ могут различаться в разных клиниках, и объединение данных не всегда корректно. Более того, до сих пор неясно, вызваны ли наблюдаемые нарушения в развитии индивидуумов, рожденных с применением ВРТ именно применением репродуктивных технологий как таковых, или они обусловлены характерными особенностями субфертильности пар, в отношении которых применяли ВРТ, в частности наличием у них хронических заболеваний [16–18]. В недавней обзорной статье был проведен анализ соответствующих исследований по наблюдению за детьми, рожденными после применения ВРТ и сделано заключение о том, что данные достаточно противоречивы и пока их недостаточно для того, чтобы сделать окончательный вывод о возможных последствиях этих процедур на здоровье потомков [19].

В связи с этим более предпочтительным является использование животных моделей для изучения РАС, в частности влияния ВРТ на проявление характерных для этих расстройств особенностей поведения. Различные линии мышей, несущие модифицированные гены, ассоциированные с РАС, моделируют определенные эндотипы, характерные для аутизма [20–22]. Между тем мыши линии ВТВВ, которые характеризуются выраженной гиперактивностью, стереотипией, нарушением социального поведения, дефицитом пространственного обучения и памяти, признаны в качестве идиопатической модели аутизма, их часто исследуют с целью изучения причин возникновения и последствий РАС, а также механизмов, лежащих в основе этих заболеваний [23–27].

Исследования, выполненные на различных линиях мышей, показали, что применение репродуктивных технологий сопровождается нарушением различных форм поведения у потомков [28–31]. Несмотря на то, что ВРТ применяли по отно-

шению к мышам линии ВТВР ранее [32], исследования влияния этих процедур на поведение рожденных после применения ВРТ потомков до сих пор проведено не было. Целью данной работы было изучение эффектов применения такой ключевой репродуктивной технологии, как культивирование *in vitro* на социальное поведение потомков мышей линий С57ВL/6J и ВТВР Т+Itr3tf/J.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные и дизайн эксперимента

В эксперименте были использованы две линии мышей: С57ВL/6J (39 самцов и 47 самок) и ВТВР Т+Itr3tf/J (ВТВР: 35 самцов и 44 самки), которых содержали в SPF-виварии Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия) в индивидуально вентилируемых клетках (OptiMice, Animal Care, США): 34.3 см × 29.2 см × 15.5 см, при температуре 22–24°C и влажности 40–50%, с инвертированным 12:12-часовым циклом дня:ночи (рассвет в 3 ч утра); в качестве подстилки использовали березовую щепу, фракционную для содержания лабораторных животных (ТУ 16.10.23-001-0084157135-2019). Животные имели постоянный доступ к автоклавированному стандартизированному комбикорму для лабораторных крыс и мышей “Дельта Фидс” ЛБК 120 Р-22, ГОСТ 34566-2019 (БиоПро, Россия) и очищенной воде “Северянка”, обогащенной минеральными добавками (Экопроект, Россия). Животных содержали в группах по три–пять особей одного пола. Для получения потомства самок отбирали по стадиям эстрального цикла, которые определяли цитологическим исследованием мазков из влагалища. Самок, находящихся в проэструсе либо эструсе, подсаживали индивидуально к фертильным самцам той же линии. Матерей с потомством содержали в отдельных клетках. Для создания гнезда самки использовали подстил; дополнительные материалы в клетку не вносили. Отсадку потомства от матери проводили в возрасте 21-го дня.

Были сформированы четыре экспериментальные группы из потомков мышей двух линий, полученных как путем естественного спаривания, так и после культивирования *in vitro* и переноса эмбрионов самкам-реципиентам. Дизайн эксперимента представлен на рис. 1:

1) группа С57ВL/6J – самцы и самки линии С57ВL/6J, полученные путем естественного спаривания. Было рождено 12 выводков от 12 самок из которых по 1–3 особи каждого пола были случайным образом выбраны для исследования социального поведения (24 самца и 28 самок);

2) группа ВРТ-С57ВL/6J – самцы и самки линии С57ВL/6J, полученные после культивирования *in vitro* и переноса эмбрионов линии С57ВL/6J самкам-реципиентам С57ВL/6J. Было рождено 8 выводков от 8 самок-реципиентов из которых по 1–3 особи каждого пола были случайным образом выбраны для исследования социального поведения (15 самцов и 19 самок);

3) группа ВТВР – самцы и самки линии ВТВР, полученные после естественного спаривания. Было рождено 11 выводков от 11 самок, из которых по 1–3 особи каждого пола были случайным образом выбраны для исследования социального поведения (20 самцов и 20 самок);

4) группа ВРТ-ВТВР – самцы и самки линии ВТВР, полученные после культивирования *in vitro* и переноса эмбрионов линии ВТВР самкам-реципиентам С57ВL/6J. Было рождено 12 выводков от 12 самок-реципиентов, из которых по 1–3 особи каждого пола были случайным образом выбраны для исследования социального поведения (15 самцов и 24 самки).

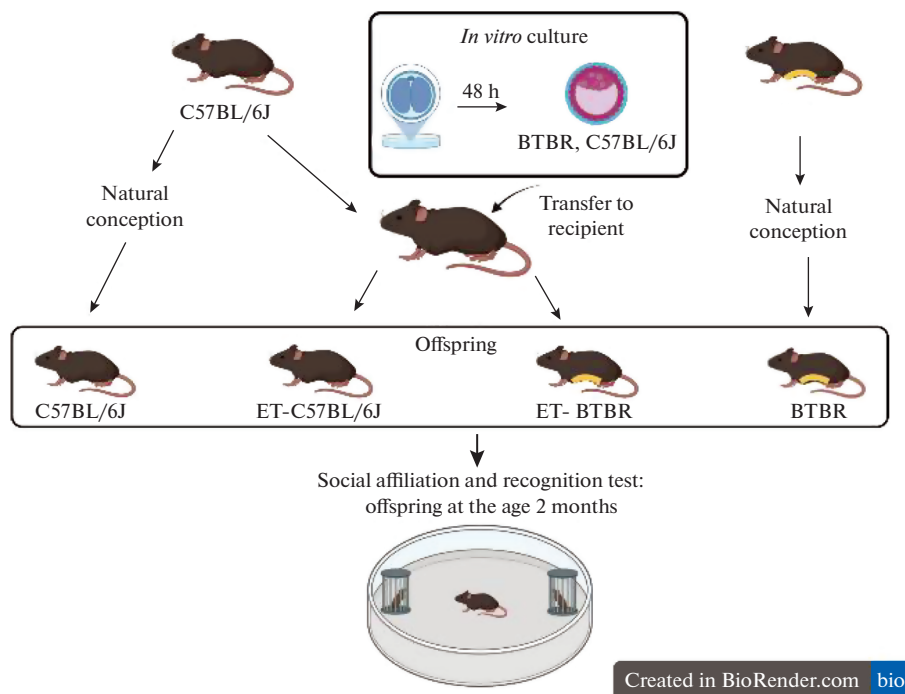


Рис. 1. Дизайн эксперимента.

ET – потомки мышей, полученные после культивирования *in vitro* и переноса преимплантационных эмбрионов самкам-реципиентам.

Получение и культивирование преимплантационных эмбрионов

Самкам мышей линии C57BL/6J ($n = 8$) и BTBR ($n = 12$) в возрасте 2–3 мес. вводили 5 МЕ хорионического гонадотропина лошади (Фоллигон; Intervet international, B.V., Нидерланды) и через 45–48 ч 5 МЕ хорионического гонадотропина человека (Хорулон; Intervet international, B.V., Нидерланды), затем их ссаживали с фертильными самцами тех же линий ($n = 7$ и $n = 7$ соответственно). Подтверждали спаривание наличием влажной пробки, а день ее обнаружения считали первым днем беременности.

Для получения эмбрионов на стадии двух клеток самок-доноров эмбрионов подвергали эвтаназии путем ингаляции углекислого газа на следующий день после обнаружения влажной пробки. Брюшную полость самки-донора вскрывали, извлекали репродуктивные органы, яйцеводы отделяли от яичника и матки, затем матку и выделенные яйцеводы помещали на 90-миллиметровую чашку Петри (Corning, США) в 100 мкл капли предварительно прогретой до 37°C среды FertiCult™ Flushing (FertiPro, Бельгия). Яйцеводы промывали этой же средой, эмбрионы отмывали от дебриса, проводя по трем 50-микромиллиметровым каплям среды FertiCult™ Flushing, а затем оценивали их качество при помощи стереомикроскопа S8 APO (Leica Microsystems, Германия) по критериям, описанным ранее [33]. Эмбрионы низкого качества: с поврежденными прозрачными оболочками (*zonae pellucidae*), с неравномерным дроблением blastomeres и/или с фрагментациями (более 25%) отбраковывали [33]. Эмбрионы высокого качества: с неповрежденными прозрачными оболочками и без видимых дефектов (не более 25% поврежденных blastomeres)

помещали в среду для культивирования KSOM (EmbryoMax; Merck, Германия) в CO₂-инкубатор Galaxy 48R NewBrunswick (Eppendorf, Германия). Эмбрионы культивировали в группах по 6–10 в чашках Петри диаметром 35 мм (Corning, США) в течение 48 ч. Непосредственно перед переносом в матку самки-реципиента развитие эмбрионов оценивали визуально с помощью стереомикроскопа S8 APO.

Подготовка суррогатных матерей и перенос эмбрионов

За две недели до начала эксперимента проводили операцию вазэктомии у гибридных самцов CD1×C57BL/6J ($n = 7$) в возрасте 5 нед. Операцию проводили стандартным способом, как описано ранее [31, 34]. Для получения псевдобеременных самок проводили стерильное спаривание между вазэктомизированными гибридными самцами и самками-реципиентами линии C57BL/6J ($n = 20$) в возрасте 2.5–3 мес. на стадии проэструс/эструс, которые определяли цитологическим исследованием мазков из влагалища. День обнаружения влагалищной пробки у реципиентов считали первым днем псевдобеременности.

Бластоцисты после культивирования *in vitro* переносили в матку самки-реципиента на третий день псевдобеременности (в среднем по 10 эмбрионов на животное). Таким образом, имел место асинхронный перенос эмбрионов (стадия развития эмбрионов на 1.5–2 сут опережала стадию развития эндометрия). Как показано ранее, это обеспечивает достаточную эффективность при переносе эмбрионов у грызунов [34, 35].

Операцию по переносу эмбрионов в матку проводили согласно стандартной методике [35]. Для анестезии самке-реципиенту внутрибрюшинно вводили 0.01 мг на мышшь медетомидина гидрохлорида (Медитин, 1 мг/мл; Апи-Сан, Россия) и через 10 мин вводили внутримышечно 5 мг на мышшь кетамина гидрохлорида (Кетамин, 50 мг/мл; Апи-Сан, Россия). Затем подкожно делали инъекцию антибиотика – 0.01 мл амоксициллина (тригидрат амоксициллина, 150 мг/мл). Готовили операционное поле согласно правилам асептики: шерсть в области операционного поля сбривали, а кожу обрабатывали 70%-ным раствором этанола. Накрывали операционное поле стерильной салфеткой с отверстием для доступа. Применяли правосторонний вертикальный оперативный доступ: кожу и лежащий под ней мышечный слой в области матки разрезали дорзовентрально, 3 мм от нижних ребер в каудальном направлении. Висцеральный жир вместе с яичником, яйцеводом и верхней частью матки захватывали пинцетом и доставали наружу. В правом роге матки делали прокол с помощью стерильной иглы 27 G, затем 6–10 эмбрионов переносили стеклянным капилляром в матку через проделанное отверстие в 2 мкл среды FertiCult™ Flushing. Разрез зашивали и обрабатывали антибиотиком (амоксициллина тригидрат) и антисептиком (ацербин).

Тест “социальная мотивация и распознавание”

Исследование социального поведения животных четырех групп C57BL/6J, BPT-C57BL/6J, BTBR, BPT-BTBR проводили в возрасте двух месяцев. Каждое животное помещали в чистую индивидуально вентилируемую клетку за 2 дня до оценки поведения. Поверхности оборудования для тестирования протирали после каждого животного 70%-ным раствором этанола для удаления запаховых меток. Время проведения испытания с 16:00 до 18:00, что совпадало с началом темного времени суток в комнате содержания животных (16:00), то есть в период наибольшей активности животных. Использовали установку, предназначенную для проведения теста “открытое поле” (OpenScience, Россия), которая представляет собой круглую арену диаметром 60 см из белого поливинилхлорида, огороженную стен-

кой высотой 30 см, на полу которой были размещены металлические контейнеры с отверстиями. Расстояние между контейнерами составляло 42 см. Помещение для проведения экспериментов было освещено лампой накаливания 100 Вт; при этом свет был направлен в сторону от поверхности арены, для уменьшения тревожности, испытываемого животным. Регистрацию поведения проводили два исследователя вручную.

В тесте “социальная мотивация и распознавание” было исследовано: C57BL/6J (24 ♂ и 28 ♀); BPT-C57BL/6J (14 ♂ и 15 ♀); ВТВР (20 ♂ и 20 ♀); BPT-ВТВР (15 ♂ и 23 ♀). Данный тест является одним из способов оценки социального поведения у лабораторных животных. Исследование было выполнено в соответствии с описанным ранее протоколом [36] и состояло из трех этапов:

1) “адаптация” – для того, чтобы животное привыкло к условиям тестирования, его за хвост плавно помещали в центр арены на 5 мин; при этом располагали тело так, чтобы передняя его часть не была направлена ни на один из контейнеров. Никакого поведения за этот период не фиксировали;

2) “сессия 1” (социальная мотивация) – в “контейнер 1” помещали незнакомую мышь той же линии, пола, возраста и массы тела, что и исследуемое животное (“партнер 1”), в “контейнер 2” – нейтральный объект (черный металлический зажим высотой 4.5 см и шириной 2.5 см, что соответствует среднему размеру мыши в положении сидя, который не должен был иметь для животного сильного запаха). В качестве контейнеров были использованы металлические сетчатые емкости прямоугольной формы высотой 11 см и шириной 8 см. Животное могло видеть и даже частично обнюхать находящийся в контейнере объект, но не имело прямого контакта с ним. Тестируемое животное помещали в центр установки. В течение 10 мин регистрировали продолжительность и число контактов исследуемой мыши с незнакомым партнером и нейтральным объектом (нахождение животного не более чем в 7 см от контейнера, что, как правило, сопровождалось его обнюхиванием), а также время, проведенное в одиночестве (передвижение тестируемого по открытому полю вне контакта с контейнерами, содержащими партнера 1 или нейтральный объект). Рассчитывали “индекс социальной мотивации” по следующей формуле:

$$1 - \left(\frac{\text{Время рядом с нейтральным объектом}}{\text{Время рядом с нейтральным объектом} + \text{время рядом с партнером 1}} + \frac{\text{Число подходов к нейтральному объекту}}{\text{Число подходов к нейтральному объекту} + \text{число подходов к партнеру 1}} \right) / 2.$$

В качестве основы была использована формула для вычисления индекса тревожности [37], где были произведены следующие замены: 1) “время в открытых рукавах” на “время рядом с нейтральным объектом”; 2) “общее время в лабиринте” на “суммарное время рядом с нейтральным объектом и партнером 1”; 3) “число заходов в открытые рукава” на “число подходов к нейтральному объекту”; 4) “общее число заходов во все рукава” на “суммарное число подходов к нейтральному объекту и партнеру 1”.

3) “сессия 2” (социальное распознавание) – в “контейнере 2” нейтральный предмет заменяли незнакомой мышью (“партнер 2”). Соответственно в “сессии 2”, тестируемому животному предлагали уже знакомого “партнера 1” и нового “партнера 2”, которых помещали в два контейнера. В течение 10 мин регистрировали продолжительность и число контактов исследуемой мыши со знакомым “партнером 1” и с новым “партнером 2”, а также время, проведенное в одиночестве (передвижение тестируемого по открытому полю вне контакта с контейнерами, содержащими первого либо второго партнера). Рассчитывали “индекс социального распознавания” по следующей формуле:

$$1 - \left(\frac{\text{Время рядом с партнером 1}}{\text{Время рядом с партнером 1} + \text{время рядом с партнером 2}} + \frac{\text{Число подходов к партнеру 1}}{\text{Число подходов к партнеру 1} + \text{число подходов к партнеру 2}} \right) / 2.$$

Также в качестве основы была использована формула для вычисления индекса тревожности [37], где были произведены следующие замены: 1) “время в открытых рукавах” на “время рядом с партнером 1”; 2) “общее время в лабиринте” на “суммарное время рядом с первым и вторым партнером”; 3) “число заходов в открытые рукава” на “число подходов к партнеру 1”; 4) “общее число заходов во все рукава” на “суммарное число подходов к первому и второму партнеру”.

Статистический анализ

Анализ результатов проводили с использованием программного пакета STATISTICA v. 12.0 (StatSoft, Inc., США) и PAST program (Норвегия). Данные по поведенческим параметрам, таким как время, проведенное с партнером 1, нейтральным объектом, партнером 2 и в одиночестве, а также число подходов к партнерам/объекту представлены в виде ящика с усами, с обозначением медианы (Me) с первым (Q1) и третьим (Q3) квартилями. По этим отдельным поведенческим параметрам в тесте “социальная мотивация и распознавание” внутри каждой из исследуемых групп (C57BL/6J, BPT-C57BL/6J, BTBR и BPT-BTBR) проводили соответствующие попарные сравнения с использованием бутстрепа (bootstrap) с многократной генерацией выборок ($N_{\text{bootstrap}} = 9999$). Для статистического анализа использовали *t*-критерий Стьюдента в сочетании с применением бутстрепа. Данные по индексам социальной мотивации и распознавания были проверены на нормальность с помощью критерия Колмогорова–Смирнова и представлены в виде средней с ошибкой средней. Сравнение между группами по индексу социальной мотивации в сессии 1 и по индексу социального распознавания в сессии 2 проводили с помощью многофакторного дисперсионного анализа (Factorial ANOVA) по трем факторам: “линия” (C57BL/6J и BTBR), “тип развития” – т.е. условия преимплантационного развития эмбриона (*in vivo/in vitro*) (без BPT и после BPT) и “пол” (самцы и самки), а также последующего *post-hoc* Fisher LSD. Дополнительно к дисперсионному анализу для обоих индексов были вычислены главные компоненты и рассчитаны корреляции с ними всех исходных признаков. Уровень значимости принимали при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты тестирования на “социальную мотивацию и распознавание” представлены на рис. 2–5. Статистический анализ показал, что в “сессии 1” самцы группы C57BL/6J проводили больше времени с “партнером 1”, чем с предметом ($p < 0.001$) и чем в одиночестве ($p < 0.001$) (рис. 2а). Также в “сессии 1” самцы C57BL/6J делали больше подходов к “партнеру 1”, чем к предмету ($p < 0.05$) (рис. 4а). В “сессии 2” самцы C57BL/6J проводили больше времени с “партнером 2”, чем с “партнером 1” ($p < 0.05$) (рис. 2а). По числу подходов к “партнеру 1 или 2” в “сессии 2” не было отличий (рис. 4б). Сходное поведение демонстрировали и самки этой группы. В “сессии 1” самки C57BL/6J проводили больше времени с “партнером 1”, чем с предметом ($p < 0.05$) и чем в одиночестве ($p < 0.001$), а также больше времени с предметом, чем в одиночестве ($p < 0.05$) (рис. 3а). В “сессии 2” самки C57BL/6J проводили больше времени с “партнером 2”, чем с “партнером 1” ($p < 0.05$) и чем в одиночестве ($p < 0.01$) (рис. 3а). Число подходов в обеих сессиях к “партнеру 1” или “предмету/партнеру 2” не отличалось (рис. 4с, 4д).

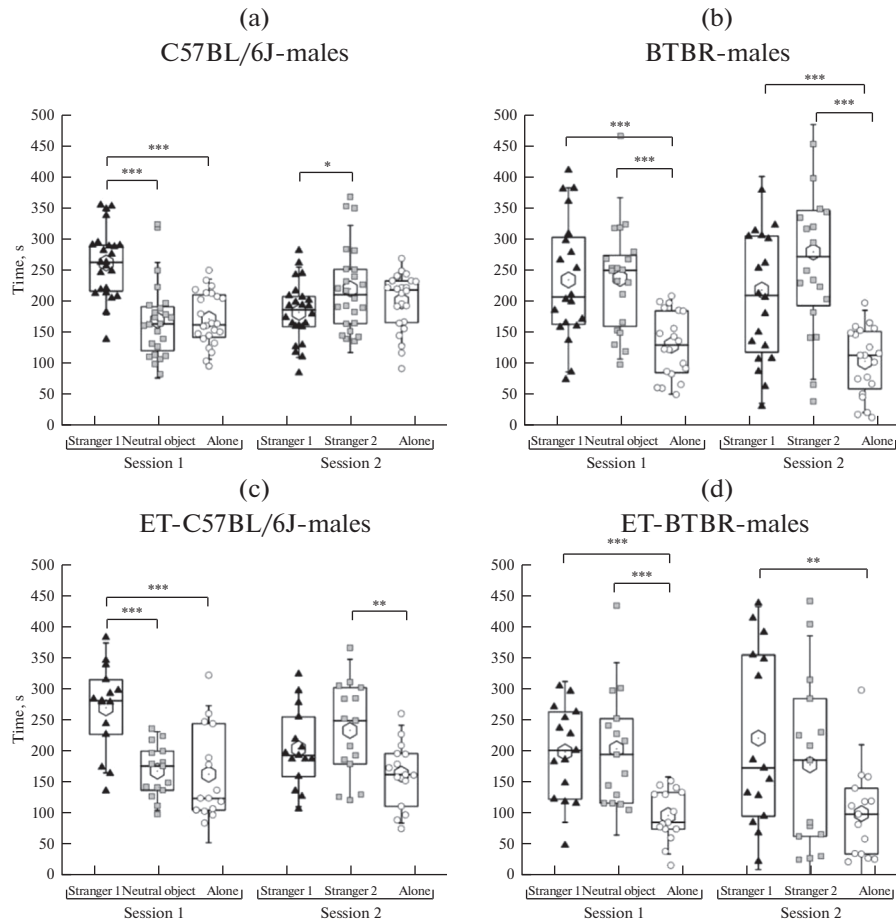


Рис. 2. Социальная мотивация и распознавание самцов линий C57BL/6J и BTBR, полученных естественным спариванием либо с применением репродуктивных технологий (группы C57BL/6J (а), BTBR (b), ET-C57BL/6J (c) и ET-BTBR(d)). ET – потомки мышей, полученные после культивирования *in vitro* и переноса преимплантационных эмбрионов самкам-реципиентам. В сессии 1 и 2 показано время, проведенное с партнером 1; с предметом/партнером 2; в одиночестве (передвижение тестируемого по открытому полю вне контакта с контейнерами, содержащими партнера 1 или 2 или предмет). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

В “сессии 1” самцы ВРТ-C57BL/6J проводили больше времени с “партнером 1” ($p < 0.001$), чем с предметом и чем в одиночестве (рис. 2с). В “сессии 2” самцы группы ВРТ-C57BL/6J проводили больше времени с “партнером 2” ($p < 0.01$), чем в одиночестве, однако время, проведенное с “партнером 1” и с “партнером 2”, не отличалось (рис. 2с). Число подходов в обеих сессиях к “партнеру 1” или “предмету/партнеру 2” не отличалось (рис. 4а, 4б). В “сессии 1” самки группы ВРТ-C57BL/6J проводили больше времени с “партнером 1” ($p < 0.001$), чем с предметом и чем в одиночестве, а также больше времени с предметом ($p < 0.01$), чем в одиночестве (рис. 3с). В “сессии 2” самки группы ВРТ-C57BL/6J проводили больше времени с “партнером 2”, чем в одиночестве ($p < 0.01$), однако время, проведенное с “партне-

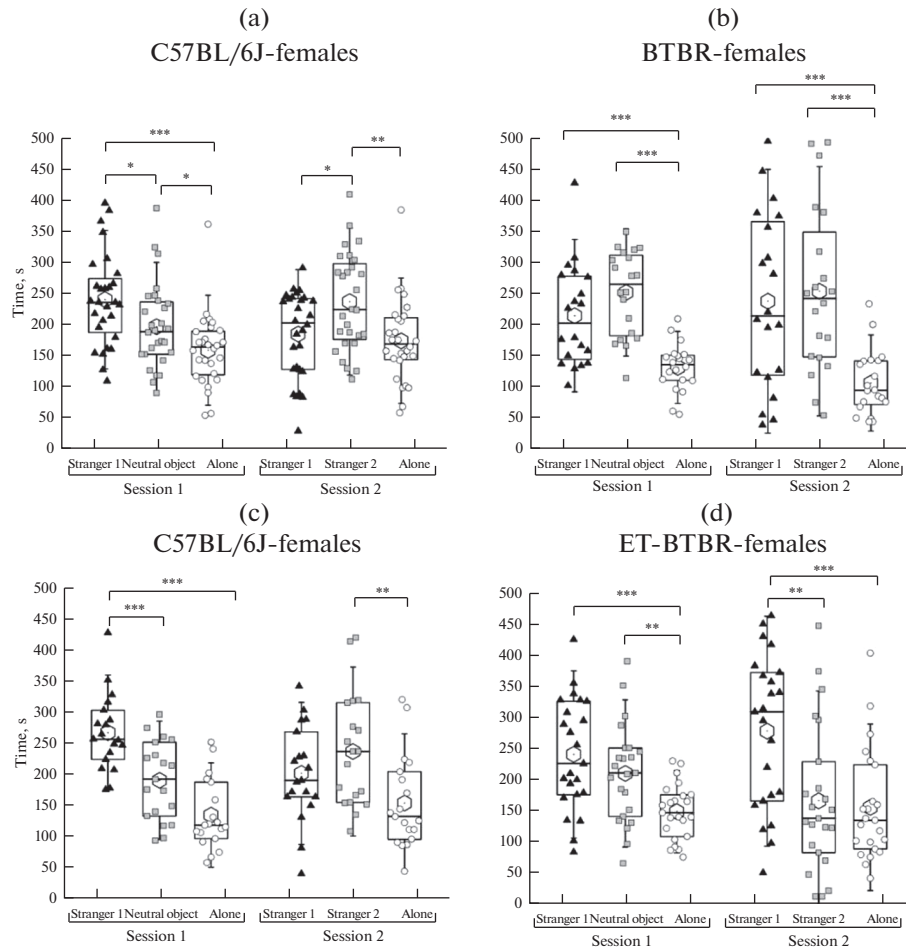


Рис. 3. Социальная мотивация и распознавание самок линий C57BL/6J и BTBR полученных естественным спариванием либо с применением репродуктивных технологий (группы C57BL/6J (a), BTBR (b), ET-C57BL/6J (c) и ET-BTBR(d)). ET – потомки мышей, полученные после культивирования *in vitro* и переноса преимплантационных эмбрионов самкам-реципиентам. В сессии 1 и 2 показаны время, проведенное с партнером 1; с предметом/партнером 2; в одиночестве (передвижение тестируемого по открытому полю вне контакта с контейнерами, содержащими партнера 1 или 2 или предмет). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

ром 1” и с “партнером 2” не отличалось (рис. 3c). Число подходов в обеих сессиях к “партнеру 1” или “предмету/партнеру 2” не отличалось (рис. 4c, d).

В “сессии 1” самцы и самки BTBR проводили равное время с “партнером 1” и с предметом, причем в одиночестве они проводили меньше времени ($p < 0.001$), чем с “партнером 1” и чем с предметом (рис. 2b, рис. 3b). В “сессии 2” самцы и самки BTBR проводили равное время с “партнером 1” и с “партнером 2”, причем в одиночестве они проводили меньше времени ($p < 0.001$), чем с “партнером 1” и “партнером 2” (рис. 2b, рис. 3b). Число подходов в обеих сессиях к “партнеру 1” или “предмету/партнеру 2” не отличалось (рис. 4a–4d).

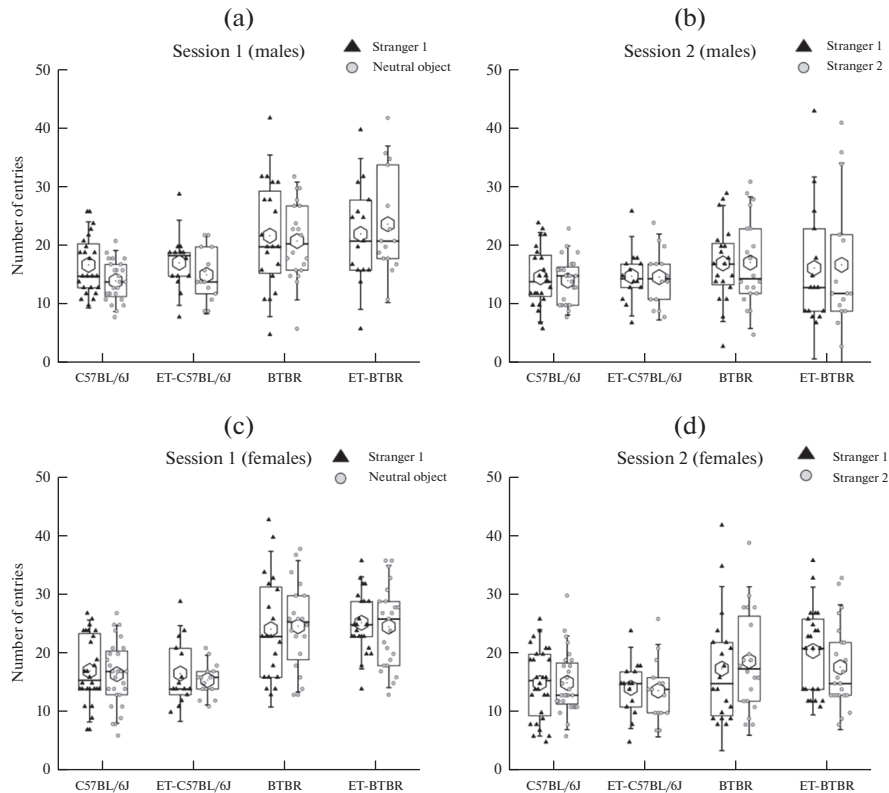


Рис. 4. Социальная мотивация и распознавание самцов и самок линий C57BL/6J и BTBR, полученных естественным спариванием либо с применением репродуктивных технологий (группы C57BL/6J, ET-C57BL/6J, BTBR и ET-BTBR). ET – потомки мышей, полученные после культивирования *in vitro* и переноса преимплантационных эмбрионов самкам-реципиентам. Показаны параметры: число подходов к партнеру 1, число подходов к предмету в сессии 1, а также число подходов к партнеру 1 и число подходов к партнеру 2 в сессии 2. * $p < 0.05$ по сравнению с партнером 1 (Stranger 1) в пределах одной сессии.

В “сессии 1” самцы группы ВРТ-ВТВР проводили равное время с “партнером 1” и с предметом, причем в одиночестве они проводили меньше времени ($p < 0.001$), чем с “партнером 1” и предметом (рис. 2d). В “сессии 2” самцы группы ВРТ-ВТВР проводили равное время с “партнером 1” и с “партнером 2”. При этом они проводили больше времени с “партнером 1” ($p < 0.001$), чем в одиночестве, а время, проведенное с “партнером 2”, не отличалось от времени, проведенного в одиночестве (рис. 2d). Число подходов в обеих сессиях к “партнеру 1” или “предмету/партнеру 2” не отличалось (рис. 4a, 4b). В “сессии 1” самки группы ВРТ-ВТВР проводили равное время с “партнером 1” и с предметом, причем в одиночестве они проводили меньше времени, чем с “партнером 1” ($p < 0.001$) и предметом ($p < 0.01$) (рис. 3d). В “сессии 2” самки группы ВРТ-ВТВР проводили больше времени с “партнером 1”, чем с “партнером 2” ($p < 0.01$). При этом они проводили больше времени с “партнером 1” ($p < 0.001$), чем в одиночестве, а время, проведенное с “партнером 2”, не отличалось от времени, проведенного в одиночестве (рис. 3d). Число подходов в обеих сессиях к “партнеру 1” или “предмету/партнеру 2” не отличалось (рис. 4c, 4d).

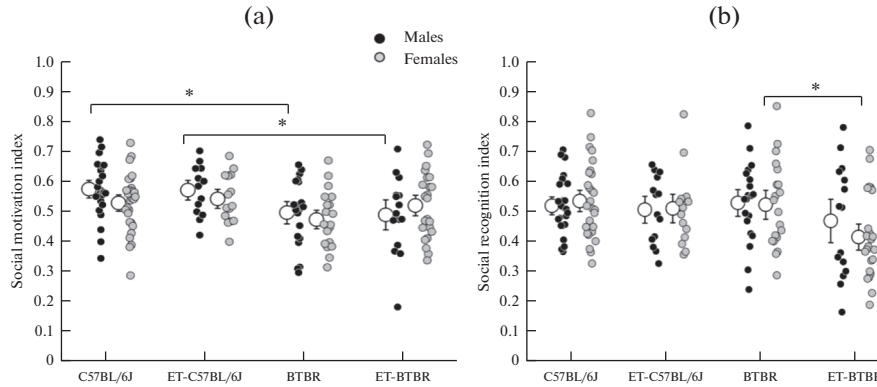


Рис. 5. Индекс социальной мотивации (а) и социального распознавания (б) у самцов и самок линий C57BL/6J и BTBR, полученных в результате естественного спаривания, либо с применением репродуктивных технологий (группы C57BL/6J, ET-C57BL/6J, BTBR и ET-BTBR). ET – потомки мышей, полученные после культивирования *in vitro* и переноса преимплантационных эмбрионов самкам-реципиентам. * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$.

Однофакторный дисперсионный анализ выявил достоверное влияние фактора “линия” на индекс социальной мотивации для $F_{(1,157)} = 12.23$; $p < 0.001$. Однофакторный дисперсионный анализ выявил достоверное влияние фактора “тип развития” на индекс социального распознавания $F_{(1,157)} = 7.75$; $p < 0.01$.

Многофакторный дисперсионный анализ выявил эффекты влияния “линии” на “индекс социальной мотивации” в “сессии 1” и “тип развития” на “индекс социального распознавания” в “сессии 2” (табл. 1). По фактору “пол”, а также взаимодействию между факторами достоверных отличий обнаружено не было ($p > 0.05$). *Post-hoc* Fisher LSD показал, что самцы группы C57BL/6J имели больший “индекс социальной мотивации” ($p < 0.05$) по сравнению с линией BTBR. Самки C57BL/6J имели тенденцию ($p = 0.065$) к увеличению “индекса социальной мотивации” по сравнению с линией BTBR. Самцы группы BPT-C57BL/6J также имели более высокий индекс социальной мотивации ($p < 0.05$) по сравнению с самцами BPT-BTBR (рис. 5a). *Post-hoc* Fisher LSD показал, что у самцов четырех групп “индекс социального распознавания” не отличался, в то время как самки BPT-BTBR имели более низкий “индекс социального распознавания” ($p < 0.01$), чем особи того же пола из группы BTBR (рис. 5b).

Таблица 1. Данные многофакторного дисперсионного анализа

Фактор влияния	Индекс социальной мотивации	Индекс социального распознавания
Линия	$F_{(1,151)} = 12.99$; $p = 0.0004$	$F_{(1,151)} = 2.47$; $p = 0.12$
Тип развития	$F_{(1,151)} = 0.58$; $p = 0.45$	$F_{(1,151)} = 5.62$; $p = 0.02$
Пол	$F_{(1,151)} = 1.03$; $p = 0.31$	$F_{(1,151)} = 0.21$; $p = 0.64$
Линия × Тип развития	$F_{(1,151)} = 0.2$; $p = 0.65$	$F_{(1,151)} = 2.24$; $p = 0.14$
Линия × Пол	$F_{(1,151)} = 1.59$; $p = 0.21$	$F_{(1,151)} = 0.84$; $p = 0.36$
Тип развития × Пол	$F_{(1,151)} = 1.16$; $p = 0.28$	$F_{(1,151)} = 0.48$; $p = 0.49$
Линия × Тип развития × Пол	$F_{(1,151)} = 0.3$; $p = 0.58$	$F_{(1,151)} = 0.17$; $p = 0.68$

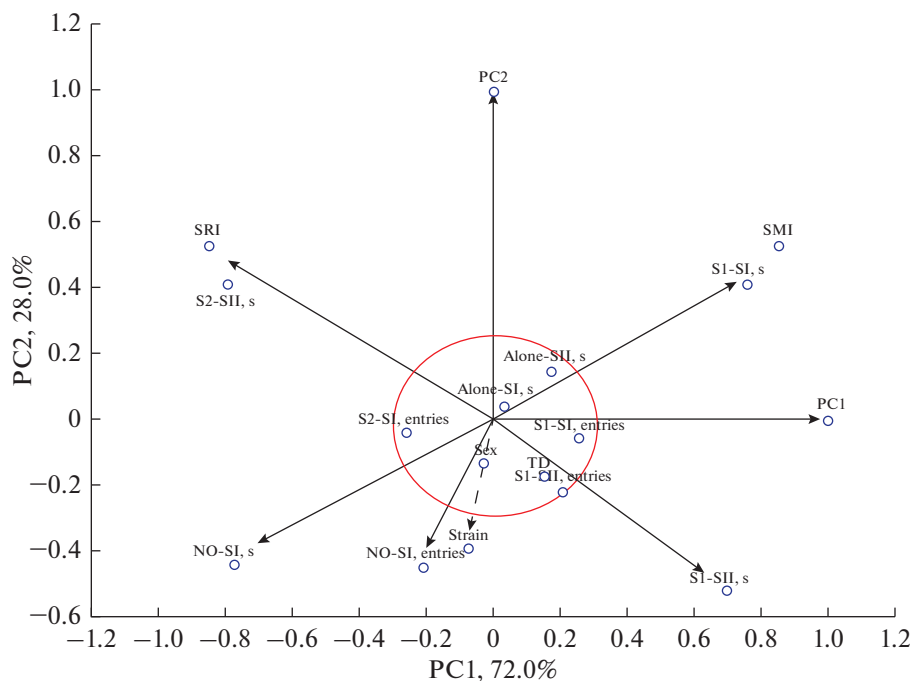


Рис. 6. Проекция признаков на плоскость первых двух главных компонент (PC1, PC2).

За пределами окружности показаны признаки, для которых корреляция с факторами достоверна при $p < 0.001$. TD – тип развития; S1-SI (sec) – время (с), проведенное рядом с партнером 1 (stranger1) в сессии 1; NO-SI, (sec) – время (с), проведенное рядом с предметом в сессии 1; SMI – индекс социальной мотивации; Alone-SI, (sec) – время (с), проведенное в одиночестве в сессии 1; S1-SII, (sec) – время (с), проведенное рядом с партнером 1 (stranger1) в сессии 2; S2-SII, (sec) – время (с), проведенное рядом с партнером 2 (stranger2) в сессии 2; SRI – индекс социального распознавания; Alone-SII, (sec) – время (с), проведенное в одиночестве в сессии 1; S1-SI, entries – число подходов к партнеру 1 (stranger1) в сессии 1; NO-SI, entries – число подходов к предмету в сессии 1; S1-SII, entries – число подходов к партнеру 1 (stranger 1) в сессии 2; S2-SII, entries – число подходов к партнеру 2 (stranger 2) в сессии 2.

Признаки, отвечающие за время, проведенное рядом с партнерами и нейтральным объектом (S1-SI, (sec); NO-SI, (sec); S1-SII, (sec); S2-SII, (sec)), число подходов к нейтральному объекту в сессии I (NO-SI, entries), а также фактор “линия” (“strain”) значительно сильнее коррелировали с индексами и полученными из них главными компонентами, чем признаки, отвечающие за число подходов (S1-SI, entries; S1-SII, entries; S2-SII, entries), время, проведенное в одиночестве в обеих сессиях (Alone-SI, (sec); Alone-SII, (sec)) и факторы “пол” (“sex”), и “тип развития” (“TD”) (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Различные нервно-психические заболевания, в том числе расстройства аутистического спектра, характеризуются нарушением социального поведения. Для оценки социального поведения у животных были разработаны тесты, подобные описанному в настоящем исследовании [36, 38]. Используемый нами вариант теста позволяет оценить два важных аспекта социального поведения, такие как социальная мотивация, а также социальное распознавание/новизна. Социальная мотива-

ция определяется как предпочтение проводить время с другой мышью по сравнению со временем, проведенным с нейтральным объектом. Социальное распознавание/новизна определяется как склонность проводить время с ранее незнакомой мышью по сравнению с уже известной тестируемому животному [38]. Нарушение в социальном взаимодействии является ключевым дефицитом при РАС у людей [1], причем одним из компонентов этого нарушения может являться отсутствие предпочтения социальных контактов с новыми людьми по сравнению со знакомыми, т.е. дефицит социального распознавания/новизны [39].

В нашем исследовании было проведено сравнение социального взаимодействия у мышей двух линий: C57BL/6J и BTBR, последняя является признанной идиопатической моделью РАС [40]. В отличие от мышей C57BL/6J, и самцы, и самки линии BTBR уделяли одинаковое время и партнеру, и нейтральному предмету в “сессии 1” теста, а в “сессии 2” эти мыши равное время уделяли новому и знакомому партнеру. Более того, самцы BTBR имели низкий индекс социальной мотивации по сравнению с мышами C57BL/6J. Наши данные согласуются с результатами недавнего исследования, в котором было показано, что индекс социального взаимодействия был снижен и у самцов, и у самок BTBR по сравнению с мышами линии C57BL/6J [27]. Более ранние исследования также указывают на то, что мыши линии BTBR менее социальны в сравнении с мышами C57BL/6J [24–26]. Таким образом, наши результаты, как и данные предыдущих исследований свидетельствуют о снижении социальных взаимодействий у мышей BTBR, это согласуется с мнением о том, что эта линия является адекватной моделью РАС человека [40].

Исследования на различных линиях мышей показали, что применение ВРТ может сопровождаться изменением различных форм поведения у потомков. В частности, у таких потомков изменяется уровень тревожности и социальное поведение, а также нарушается пространственная память [28–31]. В настоящем исследовании тест на социальное поведение показал, что в “сессии 1” самцы и самки группы ВРТ-C57BL/6J, как и естественно зачатые, уделяли больше времени “партнеру 1”, чем нейтральному предмету, что свидетельствует о высокой социальной мотивации. Однако в “сессии 2” самцы и самки ВРТ-C57BL/6J, стали уделять равное время новому и знакомому партнеру по сравнению с естественно зачатыми животными, служащими контролем, что может свидетельствовать о снижении у них социального распознавания. Ранее проведенное исследование показало, что самки линии C57BL/6N, полученные после переноса эмбрионов без культивирования *in vitro*, также имели изменения в социальном поведении, однако они, наоборот, уделяли больше внимания новому партнеру [31]. Возможно, такого рода противоречие обусловлено дополнительным эффектом, который оказала процедура культивирования *in vitro*, этой процедуры не было произведено в цитируемой выше в работе [31]. Другой причиной может являться то, что в цитируемой работе трансплантация зародышей была осуществлена в яйцевод [31], а в нашем исследовании – в рог матки. Как было показано ранее на мышах линии CD1, поведение потомков, полученных после переноса эмбрионов в яйцевод либо в рог матки, может различаться [30]. В частности, перенос эмбрионов в рог матки самкам-реципиентам вызывал повышение уровня тревожности у рожденных потомков, тогда как подсаживание эмбрионов в яйцевод таких изменений в поведении не вызывало [30]. Между тем, как в нашем исследовании, так и в цитированной выше работе [31], применение ВРТ повлияло преимущественно на поведение потомков-самок. Это может быть связано с тем, что уровень транскрипции большого числа генов различается у преимплантационных эмбрионов мышей разного пола [41, 42]. Кроме того, на этапе преимплантационного развития возникают эпигенетические различия между полами, в частности, сообщалось о том, что эмбрионы мыши разного пола отличаются по скорости развития и метаболическим особенностям; это может обуслови-

вать различия в проявлении отдаленных эффектов у потомков разного пола, вызываемые культивированием *in vitro* [43–46].

Изменения в социальном поведении были обнаружены и у потомков линии ВТВР, однако проявление этих эффектов было отличным от такового у мышей C57BL/6J. В “сессии 1” самцы и самки группы ВРТ-ВТВР уделяли одинаковое время и партнеру, и нейтральному предмету. Однако в “сессии 2” самцы ВТВР равное время уделяли новому и знакомому партнеру, а самки – больше знакомому “партнеру 1”, чем новому. Кроме того, в отличие от эффектов ВРТ на мышей C57BL/6J, индекс социального распознавания был меньше у самок ВРТ-ВТВР по сравнению с естественно рожденным животными, что может свидетельствовать о снижении у них интереса к новому партнеру и социального взаимодействия в целом. Наши результаты хорошо согласуются с результатами более раннего исследования, показавшего, что поведение может по-разному меняться у потомков, полученных после применения ВРТ, в зависимости от линии мышей [29]. В частности, было показано, что потомки мышей DBA/2J, рожденные после культивирования *in vitro* эмбрионов, менее тревожные, чем линии СЗН/HeN [29].

Изменения в социальном поведении мышей, обнаруженные в нашей работе, могут быть связаны с нарушениями эпигенетического характера при развитии эмбрионов в условиях *in vitro*. В частности, некоторые исследования показали, что существуют изменения уровня метилирования и экспрессии некоторых генов у преимплантационных эмбрионов мышей, культивированных *in vitro* на различных питательных средах, по сравнению с эмбрионами, развивающимися *in vivo* [47, 48]. Такого рода нарушения могут иметь отдаленные последствия, в том числе для развития нервной системы. В головном мозге потомков мышей, рожденных после применения ВРТ, было обнаружено снижение синтеза некоторых белков, в частности Tuba1c, Crk и Psma3, что, как полагают авторы, связано с эпигенетическими изменениями [48]. Также у самцов мышей, полученных после культивирования *in vitro* эмбрионов, выявлено снижение некоторых нейротрофинов (BDNF, GDNF и NGF) в префронтальной коре и гиппокампе [49]. По нашим неопубликованным данным, у мышей с нокаутом по кальсингенину-2 (Cstn2-KO), которых можно рассматривать как модельный объект для изучения РАС, было выявлено, что такие процедуры, как культивирование *in vitro* эмбрионов, оказывают влияние на плотность нейронов в префронтальной коре и гиппокампе, а также на нейрогенез в зубчатой извилине гиппокампа. Можно предположить, что описанные нарушения в головном мозге, вызванные эпигенетическими изменениями после применения процедур ВРТ, связанных с культивированием *in vitro* эмбрионов, могут отразиться на развитии головного мозга в целом и на поведении потомков, в частности на социальном взаимодействии.

В настоящем исследовании мы показали, что культивирование *in vitro* преимплантационных эмбрионов может влиять на социальное распознавание у самок мышей обеих линий, рожденных после применения этих процедур, причем у мышей ВТВР (модели РАС) эти нарушения были более выражены. Подобные половые различия были также обнаружены в исследованиях на людях, рожденных после применения ВРТ, где девочки имели более высокий риск возникновения РАС по сравнению с мальчиками [50, 51]. Полученный результат имеет важное значение для медицины, поскольку до сих пор нет четких подтверждений, оказывают ли процедуры ВРТ негативное влияние на развитие заболеваний нервной системы, в частности РАС. Несмотря на то, что существуют мета-анализы, где описаны отклонения в развитии нервной системы [13, 14] у детей, рожденных после применения ВРТ, и в том числе частоты возникновения РАС [9–11], сложно сделать однозначный вывод о влиянии данных процедур [12]. Поэтому эксперименты, направленные на изучение поведения потомков, полученных после различных процедур ВРТ

на животных, с продуманным дизайном и однородной выборкой, вносят важный вклад в изучение отдаленных последствий ВРТ на здоровье потомства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе было выявлено, что как у самцов, так и у самок ВТВР нарушено социальное поведение по сравнению с мышами линии C57BL/6J. Кроме того, в нашем исследовании показано, что культивирование преимплантационных эмбрионов *in vitro*, приводит к характерным изменениям социального поведения мышей линий C57BL/6J и ВТВР, а именно – к снижению социального распознавания у самок обеих линий. Эпигенетические нарушения развития при культивировании преимплантационных эмбрионов *in vitro* могут быть основным механизмом, приводящим к наблюдаемым поведенческим изменениям у потомков. Эта гипотеза нуждается в дальнейшей экспериментальной проверке.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования соответствовали Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (ETS № 123).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была частично профинансирована из бюджетного проекта № FWNR-2022-0002 Института цитологии и генетики (Новосибирск, Россия) и Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 20-015-00162). Исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП “Центр генетических ресурсов лабораторных животных” Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI62119X0023).

Авторы выражают благодарность В.М. Ефимову за консультации и помощь в статистической обработке результатов

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента – С.Я.А., И.Н.Р., Т.Н.И., Е.Ю.Б., В.А.Н., получение, культивирование *in vitro* и перенос эмбрионов, проведение поведенческих экспериментов – И.Н.Р., С.В.О., Т.Н.И., Т.А.Р., Д.А.Л., В.С.К., Я.Т.А., обработка результатов – С.В.О., Е.Ю.Б., Т.А.Р., С.Я.А., написание и редактирование рукописи – С.Я.А, С.В.О., Е.Ю.Б., Т.Н.И.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *American Psychiatric Association (APA)* (2013) Autism spectrum disorder, diagnostic and statistical manual of mental disorders. Fifth ed. Am Psychiatric Publ. Arlington. VA. 50–59.
2. *Kodak T, Bergmann S* (2020) Autism spectrum disorder: characteristics, associated behaviors, and early intervention. *Pediatr Clin North Am* 67: 525–535. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2020.02.007>
3. *Ivanov HY, Stoyanova VK, Popov NT, Vachev TI* (2015) Autism spectrum disorder – a complex genetic disorder. *Folia Med (Plovdiv)* 57: 19–28. <https://doi.org/10.1515/folmed-2015-0015>
4. *Waye MMY, Cheng HY* (2017) Genetics and epigenetics of autism: a review. *Psychiatry Clin Neurosci* 72: 228–244. <https://doi.org/10.1111/pcn.12606>

5. Yang G, Shcheglovitov A (2020) Probing disrupted neurodevelopment in autism using human stem cell-derived neurons and organoids: An outlook into future diagnostics and drug development. *Dev Dyn* 249: 6–33.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.100>
6. Girault JB, Piven J (2020) The Neurodevelopment of autism from infancy through toddlerhood. *Neuroimaging Clin N Am* 30: 97–114.
<https://doi.org/10.1016/j.nic.2019.09.009>
7. Ramos-Ibeas P, Heras S, Gomez-Redondo I, Planells B, Fernandez-Gonzalez R, Pericuesta E, Laguna-Barraza R, Perez-Cereales S, Gutierrez-Adan A (2019) Embryo responses to stress induced by assisted reproductive technologies. *Mol Reprod Dev* 86: 1292–1306.
<https://doi.org/10.1002/mrd.23119>
8. Berntsen S, Soderstrom-Anttila V, Wennerholm U-B, Laivuori H, Loft A, Oldereid NB, Romundstad LB, Bergh C, Pinborg A (2019) The health of children conceived by ART: “the chicken or the egg?” *Hum Reprod Update* 25: 137–158.
9. Sandin S, Nygren KG, Iliadou A, Hultman CM, Reichenberg A (2013) Autism and mental retardation among offspring born after in vitro fertilization. *JAMA* 310: 75–84.
<https://doi.org/10.1001/jama.2013.7222>
10. Kissin DM, Zhang Y, Boulet SL, Fountain C, Bearman P, Schieve L, Yeargin-Allsopp M, Jamieson DJ (2015) Association of assisted reproductive technology (ART) treatment and parental infertility diagnosis with autism in ART-conceived children. *Hum Reprod* 30: 454–465.
<https://doi.org/10.1093/humrep/deu338>
11. Liu L, Gao J, He X, Cai Y, Wang L, Fan X (2017) Association between assisted reproductive technology and the risk of autism spectrum disorders in the offspring: a meta-analysis. *Sci Rep* 7: 46207.
<https://doi.org/10.1038/srep46207>
12. Andreadou MT, Katsaras GN, Talimtzj P, Doxani C, Zintzaras E, Stefanidis I (2021) Association of assisted reproductive technology with autism spectrum disorder in the offspring: an updated systematic review and meta-analysis. *Eur J Pediatr* 180: 2741–2755.
<https://doi.org/10.1007/s00431-021-04187-9>
13. Rumbold AR, Moore VM, Whitrow MJ, Oswald TK, Moran LJ, Fernandez RC, Barnhart KT, Davies MJ (2017) The impact of specific fertility treatments on cognitive development in childhood and adolescence: a systematic review. *Hum Reprod* 32: 1489–1507.
<https://doi.org/10.1093/humrep/dex085>
14. La Rovere M, Franzago M, Stuppia L (2019) Epigenetics and neurological disorders in ART. *Int J Mol Sci* 20: 4169.
<https://doi.org/10.3390/ijms20174169>
15. Sunde A (2019) Embryo culture and phenotype of the offspring. *In Vitro Fertilization*: 877–889.
16. Gleicher N, Kushnir VA, Barad DH (2014) Preimplantation genetic screening (PGS) still in search of a clinical application: a systematic review. *Reprod Biol Endocrinol* 12: 22.
<https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-22>
17. Pontesilli M, Painter RC, Grooten IJ, van der Post JA, Mol BW, Vrijkotte TG, Repping S, Roseboom TJ (2015) Subfertility and assisted reproduction techniques are associated with poorer cardiometabolic profiles in childhood. *Reprod Biomed Online* 30: 258–267.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.11.006>
18. Dayan N, Lanes A, Walker MC, Spitzer KA, Laskin CA (2016) Effect of chronic hypertension on assisted pregnancy outcomes: a population-based study in Ontario, Canada. *Fertil Steril* 105: 1003–1009.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.11.039>
19. Bergh C, Wennerholm UB (2020) Long-term health of children conceived after assisted reproductive technology. *Ups J Med Sci* 125: 152–157.
<https://doi.org/10.1080/03009734.2020.1729904>
20. Banerjee S, Riordan M, Bhat MA (2014) Genetic aspects of autism spectrum disorders: insights from animal models. *Front Cell Neurosci* 8: 58.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00058>
21. Kazdoba TM, Leach PT, Crawley JN (2016) Behavioral phenotypes of genetic mouse models of autism. *Genes Brain Behav* 15: 7–26.
<https://doi.org/10.1111/gbb.12256>
22. Varghese M, Keshav N, Jacot-Descombes S, Warda T, Wicinski B, Dickstein DL, Harony-Nicolas H, De Rubeis S, Drapeau E, Buxbaum JD, Hof PR (2017) Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models. *Acta Neuropathol* 134: 537–566.
<https://doi.org/10.1007/s00401-017-1736-4>
23. Pobbe RL, Defensor EB, Pearson BL, Bolivar VJ, Blanchard DC, Blanchard RJ (2011) General and social anxiety I the BTBR T+ tf/J mouse strain. *Behav Brain Res* 216: 446–451.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.08.039>

24. Langley EA, Krykbaeva M, Blusztajn JK, Mellott TJ (2015) High maternal choline consumption during pregnancy and nursing alleviates deficits in social interaction and improves anxiety-like behaviors in the BTBR T+Itpr3tf/J mouse model of autism. *Behav Brain Res* 278: 210–220. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.09.043>
25. Amodeo DA, Pahua AE, Zarate M, Taylor JA, Peterson S, Posadas R, Oliver BL, Amodeo LR (2019) Differences in the expression of restricted repetitive behaviors in female and male BTBR T + tf/J mice. *Behav Brain Res* 372: 112028. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112028>
26. Ahmad SF, Ansari MA, Nadeem A, Bakheet SA, Alqahtani F, Alhoshani AR, Alasmari F, Alsaleh NB, Attia SM (2020) 5-aminoisoquinolinone attenuates social behavior deficits and immune abnormalities in the BTBR T+ Itpr3tf/J mouse model for autism. *Pharmacol Biochem Behav* 189: 172859. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.172859>
27. Reshetnikov VV, Ayriyants KA, Ryabushkina YA, Sozonov NG, Bondar NP (2021) Sex-specific behavioral and structural alterations caused by early-life stress in C57BL/6 and BTBR mice. *Behav Brain Res* 414: 113489. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113489>
28. Ecker DJ, Stein P, Xu Z, Williams CJ, Kopf GS, Bilker WB, Abel T, Schultz RM (2004) Long-term effects of culture of preimplantation mouse embryos on behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 1595–1600. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306846101>
29. Rose C, Schwegler H, Hanke J, Rohl FW, Yilmazer-Hanke DM (2006) Differential effects of embryo transfer and maternal factors on anxiety-related behavior and numbers of neuropeptide Y (NPY) and parvalbumin (PARV) containing neurons in the amygdala of inbred C3H/HeN and DBA/2J mice. *Behav Brain Res* 173: 163–168.
30. Lopez-Cardona AP, Fernandez-Gonzalez R, Perez-Crespo M, Alen F, de Fonseca FR, Orío L, Gutierrez-Adan A (2015) Effects of synchronous and asynchronous embryo transfer on postnatal development, adult health, and behavior in mice. *Biol Reprod* 93: 85. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.130385>
31. Lerch S, Tolksdorf G, Schutz P, Brandwein C, Dormann C, Gass P, Chourbaji S (2016) Effects of embryo transfer on emotional behaviors in C57BL/6 mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 55: 510–519.
32. Baan M, Krentz KJ, Fontaine DA, Davis DB (2016) Successful in vitro fertilization and generation of transgenics in Black and Tan Brachyury (BTBR) mice. *Transgenic Res* 25: 847–854. <https://doi.org/10.1007/s11248-016-9974-0>
33. Emiliani S, Van den Bergh M, Vannin AS, Biramanel J, Englert Y (2000) Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. *Hum Reprod* 4: 905–910. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.4.905>
34. Hogan B, Constantiny F, Lacy E (1986) Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. N.Y. Spring Harbor Lab.
35. Амстиславский СЯ, Игонина ТН, Рожкова ИИ, Брусенцев ЕЮ, Роговая АА, Рагаева ДС, Напримеров ВА, Литвинова ЕА, Плюснина ИЗ, Маркель АЛ (2013) Редеривация путем трансплантации эмбрионов линий лабораторных мышей и крыс. Вавиловск журн генетики и селекции 17: 147–161. [Amstislavsky SIA, Igonina TN, Rozhkova IN, Brusentsev IM, Rogovaya AA, Ragaeva DS, Naprimerov VA, Litvinova EA, Plusnina IZ, Markel AL (2013) Rederivation by transplantation of embryo lines of laboratory mice and rats. *Vavilov J Genetics and Breeding* 17: 147–161. (In Russ)].
36. Ranneva S, Pavlov K, Gromova A, Amstislavskaya T, Lipina T (2017) Features of emotional and social behavioral phenotypes of calyntenin2 knockout mice. *Behav Brain Res* 332: 343–354. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.06.029>
37. Lee B, Sur B, Cho SG, Yeom M, Shim I, Lee H, Hahm DH (2016) Ginsenoside Rb1 rescues anxiety-like responses in a rat model of post-traumatic stress disorder. *J Nat Med* 70: 133–144. <https://doi.org/10.1007/s11418-015-0943-3>
38. Kaidanovich-Beilin O, Lipina T, Vukobradovic I, Roder J, Woodgett JR (2011) Assessment of social interaction behaviors. *J Vis Exp*: 2473. <https://doi.org/10.3791/2473>
39. Carter MD, Shah CR, Muller CL, Crawley JN, Carneiro AM, Veenstra-VanderWeele J (2011) Absence of preference for social novelty and increased grooming in integrin $\beta 3$ knockout mice: initial studies and future directions. *Autism Res* 4: 57–67. <https://doi.org/10.1002/aur.180>
40. Meyza KZ, Blanchard DC (2017) The BTBR mouse model of idiopathic autism - Current view on mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* 76: 99–110. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.12.037>

41. Peaston AE, Evsikov AV, Graber JH, de Vries WN, Holbrook AE, Solter D, Knowles BB (2004) Retrotransposons regulate host genes in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Dev Cell* 7: 597–606.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.09.004>
42. Fernandez-Gonzalez R, Ramirez MA, Pericuesta E, Calle A, Gutierrez-Adan A (2010) Histone modifications at the blastocyst Axin1(Fu) locus mark the heritability of *in vitro* culture-induced epigenetic alterations in mice. *Biol Reprod* 83: 720–727.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.084715>
43. Peippo J, Bredbacka P (1995) Sex-related growth rate differences in mouse preimplantation embryos *in vivo* and *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 40: 56–61.
<https://doi.org/10.1002/mrd.1080400108>
44. Perez-Crespo M, Ramirez MA, Fernandez-Gonzalez R, Rizos D, Lonergan P, Pintado B, Gutierrez-Adan A (2005) Differential sensitivity of male and female mouse embryos to oxidative induced heat-stress is mediated by glucose-6-phosphate dehydrogenase gene expression. *Mol Reprod Dev* 72: 502–510.
<https://doi.org/10.1002/mrd.20366>
45. Gutierrez-Adan A, Perez-Crespo M, Fernandez-Gonzalez R, Ramirez MA, Moreira P, Pintado B, Lonergan P, Rizos D (2006) Developmental consequences of sexual dimorphism during pre-implantation embryonic development. *Reprod Domest Anim* 41(2): 54–62.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00769.x>
46. Bermejo-Alvarez P, Rizos D, Lonergan P, Gutierrez-Adan A (2011) Transcriptional sexual dimorphism during preimplantation embryo development and its consequences for developmental competence and adult health and disease. *Reproduction* 141: 563–570.
<https://doi.org/10.1530/REP-10-0482>
47. de Waal E, Mak W, Calhoun S, Stein P, Ord T, Krapp C, Coutifaris C, Schultz RM, Bartolomei MS (2014) 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* 90: 22.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.114785>
48. Zhu W, Zheng J, Wen Y, Li Y, Zhou C, Wang Z (2020) Effect of embryo vitrification on the expression of brain tissue proteins in mouse offspring. *Gynecol Endocrinol* 36: 973–977.
<https://doi.org/10.1080/09513590.2020.1734785>
49. Qin NX, Zhao YR, Shi WH, Zhou ZY, Zou KX, Yu CJ, Liu X, Dong ZH, Mao YT, Zhou CL, Yu JL, Liu XM, Sheng JZ, Ding GL, Zhao WL, Wu YT, Huang HF (2021) Anxiety and depression-like behaviours are more frequent in aged male mice conceived by ART compared with natural conception. *Reproduction* 162: 437–448.
<https://doi.org/10.1530/REP-21-0175>
50. Hvidtjorn D, Grove J, Schendel D, Schieve LA, Svarke C, Ernst E, Thorsen P (2011) Risk of autism spectrum disorders in children born after assisted conception: a population-based follow-up study. *J Epidemiol Community Health* 65: 497–502.
<https://doi.org/10.1136/jech.2009.093823>
51. Davidovitch M, Chodick G, Shalev V, Eisenberg VH, Dan U, Reichenberg A, Sandin S, Levine SZ (2018) Infertility treatments during pregnancy and the risk of autism spectrum disorder in the offspring. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 86: 175–179.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.05.022>

Effects of Assisted Reproductive Technologies on Social Behavior of BTBR Mice – A Model of Autism Spectrum Disorder

**I. N. Rozhkova^a, S. V. Okotrub^a, E. Yu. Brusentsev^a, T. N. Igonina^a, T. A. Rakhmanova^{a, b},
D. A. Lebedeva^{a, b}, T. A. Yatsuk^a, V. S. Kozeneva^{a, b},
V. A. Naprimerov^a, and S. Ya. Amstislavsky^{a, *}**

^a*Institute of Cytology and Genetics Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk, Russia*

^b*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

*e-mail: amstis@yandex.ru

The present work is the first attempt to study the effect of such assisted reproductive technologies (ARTs), as *in vitro* culture of preimplantation embryos on the social behavior of offspring, using BTBR mice (BTBR T+Itr3tf/J) as an idiopathic model of autism. The C57BL/6J mice were used as controls. Social behavior was studied in adult

offspring mice obtained after *in vitro* culture and embryo transfer (ET) (groups ET-C57BL/6J and ET-BTBR). The BTBR mice demonstrated the reduced levels of social recognition and affiliation compared to C57BL/6J mice. The social affiliation and recognition test revealed that ET-C57BL/6J males had a high level of social interaction, which was of similar magnitude as in naturally conceived C57BL/6J males. However, ET-C57BL/6J and ET-BTBR females demonstrated a decrease in interest to a new stranger compared to naturally conceived controls of the same sex, which was revealed in a social recognition session of this test. Thus, the *in vitro* culture affected the social recognition in the offspring of C57BL/6J and BTBR mice, but only in females.

Keywords: C57BL/6J, BTBR, preimplantation embryos, assisted reproductive technologies, *in vitro* culture, autism spectrum disorder, social behavior