

**РЕПРОДУКТИВНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И БОЛЕЗНЬ ПАРКИНСОНА:  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЧЕРНОЙ СУБСТАНЦИИ  
МОЗГА И МОТОРНЫХ ФУНКЦИЙ НА МЫШАХ C57BL/6 И B6.CG-TG**

© 2025 г. В. С. Козенева<sup>1,2</sup>, И. Н. Рожкова<sup>1</sup>, Е. Ю. Брусенцев<sup>1</sup>, Т. А. Рахманова<sup>1,2</sup>,  
Н. А. Шавшаева<sup>1,2</sup>, С. Г. Афанасова<sup>1,2</sup>, Д. А. Лебедева<sup>1</sup>, С. В. Окотруб<sup>1</sup>,  
Т. Н. Игонина<sup>1</sup>, С. Я. Амстиславский<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,  
Новосибирск, Россия

<sup>2</sup>Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,  
Новосибирск, Россия

\*E-mail: amstis@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.07.2024 г.

После доработки 03.10.2024 г.

Принята к публикации 04.10.2024 г.

Болезнь Паркинсона (БП) является возрастной нейродегенеративной патологией, которая характеризуется аномалиями дофаминергической системы мозга, альфа-синуклеинопатией и двигательными расстройствами. В медицинской литературе широко обсуждается связь вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) с возможной предрасположенностью к патологиям центральной нервной системы, однако экспериментальных работ на эту тему практически нет. В настоящем исследовании изучали влияние ВРТ (культивирование *in vitro* преимплантационных эмбрионов и эмбриотрансфер (embryo transfer – ET)) на проявление признаков, характерных для БП: нарушение координации движений, снижение плотности нейронов, в том числе дофаминергических, а также накопление альфа-синуклеина в компактной части черной субстанции (КЧС). Потомков-самцов линии B6.Cg-Tg (трансгенная модель БП) и линии C57BL/6 (далее по тексту – дикий тип, WT), полученных с применением ВРТ (группы B6.Cg-Tg ET и WT ET) либо путем естественного спаривания (группы B6.Cg-Tg CTL и WT CTL), исследовали в возрасте шести месяцев. Координацию движений и баланс тела изучали с помощью теста ротород; плотность нейронов, а также накопление альфа-синуклеина в КЧС оценивали иммуногистохимически. Было показано, что для мышей B6.Cg-Tg, полученных без применения ВРТ (B6.Cg-Tg CTL), характерно снижение плотности нейронов, в том числе дофаминергических, а также накопление альфа-синуклеина в КЧС по сравнению с диким типом (WT CTL). Потомки дикого типа, полученные с применением ВРТ (WT ET), характеризовались ухудшением координации движений и баланса тела, а также снижением плотности нейронов в КЧС, в том числе дофаминергических. У потомков линии B6.Cg-Tg, полученных с применением ВРТ (группа B6.Cg-Tg ET), в КЧС было обнаружено повышенное накопление альфа-синуклеина. Результаты исследования указывают на возможную связь применения современных репродуктивных технологий с повышением предрасположенности к развитию нейродегенеративного процесса и появлению признаков, характерных для БП.

*Ключевые слова:* болезнь Паркинсона, репродуктивные технологии, культивирование *in vitro*, отдаленные эффекты, черная субстанция, дофаминовые нейроны, альфа-синуклеин

## ВВЕДЕНИЕ

Согласно онтогенетической гипотезе здоровья и болезней Дэвида Баркера “The Developmental Origins of Health and Disease” (DOHaD), определенные события в ходе пренатального и раннего постнатального онтогенеза могут вызывать адаптивные изменения развивающегося организма, что может приводить к повышенному риску возникновения различных патологий в более позднем возрасте [1]. Развивая эти представления, Мотренко предложила гипотезу “эмбриофетального происхождения болезней”, в которой указывается важнейшая роль наиболее ранних этапов развития [2]. Huang и Sheng, анализируя результаты исследований, связанных с применением вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), сформулировали гипотезу “гаметного и эмбриофетального происхождения заболеваний” [3].

В соответствии с упомянутыми гипотезами было подтверждено, что воздействия в пренатальном онтогенезе могут иметь большое значение для таких характеристик головного мозга, как нейропластичность [4]. Кроме того, существует достаточно много мета-анализов и когортных исследований, которые направлены на выявление возможной связи применения репродуктивных технологий с патологиями центральной нервной системы [5–12], причем выводы этих работ достаточно противоречивы. Между тем на основе большой проверенной базы данных было обнаружено, что культивирование *in vitro* на некоторых питательных средах может быть связано с повышенным риском рождения крупных для гестационного возраста младенцев [13–15]. В другой работе было установлено, что размер некоторых областей головного мозга у детей, рожденных после применения процедур ВРТ, в том числе с использованием культивирования *in vitro* преимплантационных эмбрионов, увеличивается к 11-й неделе гестационного срока [16]. Полученные результаты подтверждают, что культивирование *in vitro* может оказывать серьезное воздействие на дальнейший онтогенез [11, 13, 17].

Влияние культивирования ранних эмбрионов *in vitro* на проявление определенных фенотипических черт потомков исследуют на различных экспериментальных моделях, созданных на животных [18–24]. У потомков мышей, рожденных после культивирования *in vitro* и переноса эмбрионов, было обнаружено изменение двигательной активности, уровня тревожности и пространственной памяти, причем характер этих изменений может быть обусловлен особенностями выбранной линии и другими факторами [18–20, 25]. Было показано, что в головном мозге мышей, рожденных после применения ВРТ, отмечается снижение синтеза некоторых белков и нейротрофинов, а также изменен уровень нейрогенеза [22–24].

Болезнь Паркинсона (БП) занимает второе место в мире среди нейродегенеративных заболеваний человека [26–28]. Несмотря на сложную природу заболевания, исследователи уделяют достаточно много внимания онтогенетическим и наследственным факторам при раннем проявлении БП [29]. Нигростриарная система головного мозга играет важнейшую роль в регуляции движений [28, 30, 31]. При БП происходят дегенеративные изменения в nigростриарной системе, в частности, в компактной части черной субстанции (КЧС) среднего мозга [26, 31]. По мере развития БП в головном мозге наблюдается потеря нейронов, сопровождающаяся образованием телец Леви [32, 33]. Эти дегенеративные изменения в наибольшей мере характерны для КЧС, в которой происходит уменьшение числа дофаминергических нейронов, имеющих проекцию в стриатуме [30]. Снижение же стимуляции нейронов стриатума, ответственных за активацию мышц агонистов и антагонистов, приводит к нарушению моторных функций [28, 30].

Альфа-синуклеин является белком, который принимает участие во многих процессах, в том числе в регуляции биосинтеза, транспорта и хранения дофамина [28, 34]. При БП установлены две мутации (A53T и A30P) в гене *SNCA* альфа-синуклеина человека, которые приводят к нарушению сборки белка и агрегации его мономеров [35, 36],

следствием чего являются накопление альфа-синуклеина в нейронах головного мозга, в частности в КЧС, и расстройства, характерные для данной патологии [33, 34, 37]. Таким образом, в качестве маркеров БП выступают уменьшение числа дофаминовых нейронов в нигростриарном пути и накопление альфа-синуклеина в различных структурах головного мозга, в частности в КЧС [33, 38].

Исследования, проведенные на мышах, показали, что отдаленные последствия применения репродуктивных технологий могут проявиться не только в раннем, но и более позднем постнатальном онтогенезе [39], причем эти последствия могут иметь провоцирующий характер для определенных связанных с возрастом негативных изменений [23, 40]. Можно предположить, что культивирование *in vitro* эмбрионов может повлиять на проявление признаков, характерных для БП. Влияние процедур ВРТ на развитие нервной системы, а также на проявление и частоту нейропатологий раннего возраста широко обсуждается [7, 9, 10, 12, 41]. В работе, основанной на анализе клинических данных, было выявлено, что при применении ВРТ в отношении условно здоровых людей возрастает процент рожденных детей с расстройствами аутистического спектра [7]. Между тем другое исследование, также основанное на анализе клинических данных, показало, что данная тенденция сохраняется при применении лишь некоторых репродуктивных технологий, а именно интрацитоплазматической инъекции сперматозоида – ИКСИ [41]. Если же исключить множественные роды и анализировать лишь случаи, когда рождается один ребенок, то тенденция исчезает [9]. В настоящее время какие-либо клинические данные о влиянии ВРТ на проявление возрастных нейродегенеративных патологий человека отсутствуют в силу того, что потомки, полученные с применением этих технологий, еще не достигли возраста, когда эти заболевания проявляются. В связи со сложностью анализа клинических данных и этическими ограничениями при работе с эмбрионами человека исследование влияния ВРТ на нервную систему потомства с использованием животных моделей является перспективным, однако таких работ на данный момент крайне мало [18–22]. Более того, на сегодняшний день нет экспериментальных работ на животных моделях, в которых бы анализировали влияние ВРТ на проявление у потомков нейродегенеративных заболеваний.

Линия мышей B6.Cg-Tg(*Prnp-SNCA*\*A53T)23Mkle (далее по тексту B6.Cg-Tg) с мутацией A53T в гене *SNCA* альфа-синуклеина человека была создана в Джексонской лаборатории (США) посредством трансгенеза (<https://www.jax.org/strain/006823>) [42]. Полулетальный ген *SNCA* с мутацией A53T есть не у всех потомков [43], поэтому среди сибсов могут быть особи как с БП (гемизиготы), так и без патологии (дикий тип). Для данной модели характерны возрастная нейродегенерация и симптомы синуклеинопатии [44–47], что дает основание использовать данную линию в качестве модели БП человека. Для изучения БП на трансгенных мышинных моделях используют тест ротарод (РР), с помощью которого исследуют координацию движений и баланс тела [46, 48], а также применяют иммуногистохимические методы для оценки различных структур головного мозга [44, 48, 49]. Особый интерес для такого рода исследований представляет КЧС, в которой происходят существенные изменения при БП [34, 37]. Ранее мы подтвердили характеристики этой линии в том же возрасте для последующей оценки эффектов ВРТ [51].

Существует достаточно много клинических наблюдений и экспериментальных работ, указывающих на возможность изменения важных характеристик у потомков, полученных с применением репродуктивных технологий [5–11; 39–41]. Культивирование *in vitro* преимплантационных эмбрионов мышей при различных условиях с последующим их переносом самкам-реципиентам может вызвать долгосрочные изменения экспрессии генов и белков, а также уровней метилирования ДНК некоторых генов в ткани головного мозга у рожденных после применения этих процедур потомков [21]. Ранее было показано, что животные, полученные после применения ВРТ, могут иметь отличия по числу нейронов в различных структурах головного мозга, а также иметь

нарушения поведения по сравнению с естественно зачатыми, причем результаты этих исследований зависят от различных факторов, в частности от линии мышей, используемых в качестве доноров и реципиентов, и от характера применяемых репродуктивных технологий [18–20, 24, 25]. Исследования такого рода по отношению к моделям возрастных нейродегенеративных заболеваний отсутствуют, в частности, до нашего исследования не проводили работ по влиянию репродуктивных технологий на проявление характерных признаков у мышей, моделирующих БП. В нашей работе впервые сделана попытка изучить эффекты ВРТ на потомков мышей с признаками БП в сравнении с эффектами, оказываемыми на мышью дикого типа.

Ранее нами было установлено снижение плотности нейронов в КЧС у мышей линии B6.Cg-Tg [51]. Целью данной работы было изучение эффектов культивирования эмбрионов *in vitro* с последующим эмбриотрансфером на формирование фенотипа, характерного для БП, у мышей линии B6.Cg-Tg с использованием мышей C57BL/6 (дикий тип) в качестве контроля. Задачей настоящего исследования было оценить возможное влияние на потомков культивирования эмбрионов *in vitro*, в частности, на: 1) координацию движений и баланс тела; 2) общее число нейронов в КЧС, в том числе дофаминовых; 3) накопление альфа-синуклеина в КЧС.

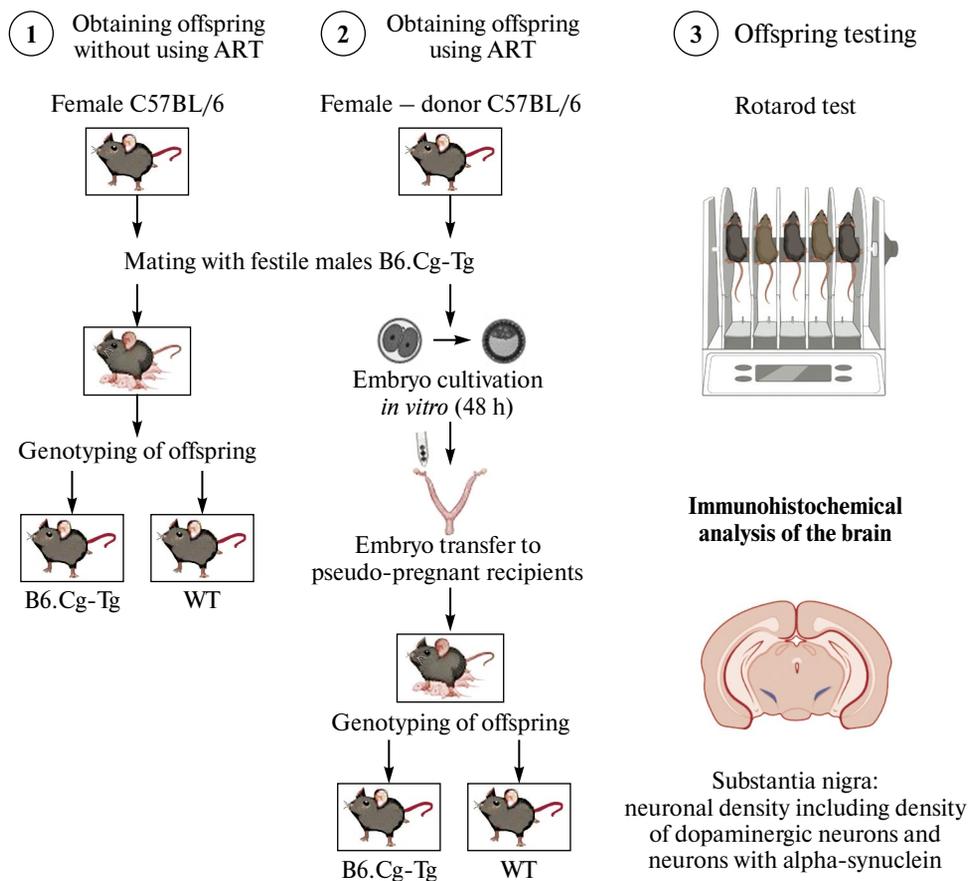
## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Животные*

Исследования проводили на потомках мышей линии B6.Cg-Tg(PrN<sup>Pr</sup>-SNCA\**A53T*)23Mkle (далее в тексте B6.Cg-Tg). Мыши B6.Cg-Tg, моделирующие БП, были получены в результате трансгенеза и имеют мутацию *A53T* в гене *SNCA* альфа-синуклеина человека. В качестве контроля использовали мышей C57BL/6 (дикий тип – wild type; далее в тексте WT), на основе которых была создана линия B6.Cg-Tg. В эксперименте были исследованы самцы-сисбы двух линий мышей (C57BL/6, B6.Cg-Tg), полученные как после естественного спаривания самок C57BL/6 (5 самок) с гемизиготными самцами B6.Cg-Tg (5 самцов), так и после применения репродуктивных технологий, а именно культивирования *in vitro* и переноса эмбрионов в репродуктивные пути самок-реципиентов (5 самок). В результате было получено по пять пометов для каждого “способа размножения”. У полученных потомков мышей проводили генотипирование. В опытную группу выбирали тех животных, у которых был обнаружен ген *SNCA* с мутацией *A53T* (B6.Cg-Tg), остальных (мыши C57BL/6, у которых ген *SNCA* с мутацией *A53T* отсутствовал) использовали в качестве контроля (дикий тип). Графически дизайн эксперимента представлен на рис. 1.

Животных содержали в SPF-виварии Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия) в индивидуально вентилируемых клетках OptiMice (Animal Care, США) размером 34.3 × 29.2 × 15.5 см при температуре 22–24°C и влажности 40–50% с инвертированным 12 : 12-часовым циклом дня-ночи (рассвет в 3 ч утра); в качестве подстилки использовали березовую щепу фракционную для лабораторных животных (ТУ 16.10.23-001-0084157135-2019). Все животные имели свободный доступ к стандартизированному комбикорму для лабораторных мышей и крыс “Дельта Фидс” ЛБК 120 Р-22, ГОСТ 34566-2019 (БиоПро, Россия) и очищенной воде “Северянка” (Экопроект, Россия), обогащенной минеральными добавками.

Были сформированы следующие группы (рис. 1): (1) самцы C57BL/6, рожденные естественным путем (группа WT CTL); (2) самцы B6.Cg-Tg, рожденные естественным путем (группа B6.Cg-Tg CTL); (3) самцы C57BL/6, рожденные с применением ВРТ (группа WT ET – embryo transfer); (4) самцы B6.Cg-Tg, рожденные с применением ВРТ (группа B6.Cg-Tg ET).



**Рис. 1.** Дизайн эксперимента. ART – assisted reproductive technologies (вспомогательные репродуктивные технологии); B6.Cg-Tg – трансгенная модель болезни Паркинсона; WT – wild type (дикий тип, C57BL/6); группа WT CTL – самцы C57BL/6, рожденные естественным путем: число животных, взятых для исследования в тесте ротарод  $n = 14$ , на оценку мозга  $n = 9$ ; группа B6.Cg-Tg CTL – самцы B6.Cg-Tg, рожденные естественным путем: число животных, взятых для исследования в тесте ротарод и на оценку мозга  $n = 9$ ; группа WT ET – самцы C57BL/6, рожденные с применением ВРТ: число животных, взятых для исследования в тесте ротарод и на оценку мозга  $n = 4$ ; группа B6.Cg-Tg ET – самцы B6.Cg-Tg, рожденные с применением ВРТ: число животных, взятых для исследования в тесте ротарод и на оценку мозга  $n = 4$ .

### Получение эмбрионов требуемой стадии развития

Самкам мышей линии C57BL/6 ( $n = 5$ ) в возрасте 8–16 недель проводили стандартную гормональную стимуляцию яичников: делали внутримышечно инъекции 5 МЕ гонадотропина сыворотки жеребых кобыл (Фоллигон, Intervet, Нидерланды) и через 48 ч 5 МЕ хорионического гонадотропина человека (Хорулон, Intervet, Нидерланды). Самок на ночь ссаживали с фертильными самцами линии B6.Cg-Tg. Спаривание проверяли по наличию вагинальной пробки на следующее утро (первый день после спаривания; *day post coitum* 1, *dpc* 1). Беременных самок подвергали эвтаназии при помощи CO<sub>2</sub> на третий день после спаривания (*dpc* 3). Яйцеводы и рога матки промывали средой FertiCult™ Flushing (FertiPro, Бельгия), чтобы получить эмбрионы на стадии 8 клеток. Полученные эмбрионы оценивали под стереомикроскопом S8 АРО

(Leica Microsystems, Германия) при увеличении  $\times 80$ . Эмбрионы без видимых дефектов и с целыми прозрачными оболочками (*zonae pellucidae*) отбирали для культивирования *in vitro*, а некачественные эмбрионы (поврежденных blastomeres более 25%) либо с повреждением прозрачной оболочки – отбраковывали.

#### *Культивирование in vitro и перенос эмбрионов*

Среда KSOM (K-modified simplex optimized medium) является одной из самых популярных в экспериментах с эмбрионами мышей и других экспериментальных животных [52]. Выбор нами среды KSOMaa был обоснован стремлением свести к минимуму нарушение экспрессии генов в ходе культивирования эмбрионов *in vitro* [53]. Дробящиеся эмбрионы мышей на стадии 8-ми клеток без видимых дефектов помещали на чашки Петри (35 мм; Corning, США) в капли среды KSOMaa (Merck, Германия) объемом 20 мкл по 5–11 штук на каплю и культивировали под минеральным маслом (Merck, Германия) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе New Brunswick™ Galaxy 48R (Eppendorf, Германия) в стандартных условиях (5% CO<sub>2</sub>, 37°C и влажности 90%) в течение 48 ч. Развитие эмбрионов оценивали под стереомикроскопом S8 APO (Leica Microsystems, Германия). Через 48 ч нормально развивающиеся blastocysts были перенесены в правый рог матки самок-реципиентов (в общей сложности пять самок; 10–15 blastocysts на самку), которые были предварительно спарены со стерильными самцами и находились на стадии третьего дня псевдобеременности. Всего трансплантировали 66 blastocysts.

В качестве самок-реципиентов для переноса эмбрионов использовали межлинейных гибридов мышей CD1  $\times$  C57BL/6 ( $n = 5$ ). Самок в проэструсе или эструсе ссаживали с вазэктомизированными самцами линии CD1, проверенными на стерильность. Через 8–12 ч после спаривания самок проверяли на наличие вагинальных пробок. День, когда была обнаружена вагинальная пробка, считали первым днем псевдобеременности.

При подготовке к хирургической операции по переносу эмбрионов самкам-реципиентам вводили внутривенно 0.01 мг/кг медетомидина гидрохлорида (Медитин, 1 мг/мл; Апи-Сан, Россия) и через 10 мин 50 мг/кг золетила (Zoletil; Virbac, Франция). Затем подкожно вводили 0.01 мл амоксициллина (амоксициллина тригидрат, 150 мг/мл; Апи-Сан, Россия). Шерсть в месте разреза сбрасывали на правой стороне спины на 1 см от нижнего ребра в вентральном направлении, кожу обрабатывали 70%-ным этиловым спиртом. Кожу и подлежащий мышечный слой в области над маткой разрезали дорсо-вентрально на расстоянии 5 мм от нижнего ребра в каудальном направлении. Висцеральный жировой слой, соединенный с яичником, яйцеводом и верхней частью матки, захватывали пинцетом и приподнимали. Эмбрионы переносили стеклянным капилляром в правый рог матки в 5 мкл среды FertiCult™ Flushing (FertiPro, Бельгия). Разрез зашивали рассасывающейся хирургической нитью (Vicryl; Johnson & Johnson, США) и присыпали антибиотиком (амоксициллина тригидрат; Апи-Сан, Россия), после чего операционный шов обрабатывали антисептиком (Ацербин, Montavit Pharmazeutische Fabrik GmbH, Австрия).

#### *Генотипирование потомков мышей*

По достижении месячного возраста у потомков мышей, полученных в результате естественного спаривания либо после применения ВРТ, был взят кусочек уха для генотипирования. Его помещали в пробирку с 400 мкл лизирующего буфера (10% SDS и 20 мг/мл протеиназы К) и инкубировали при 52°C со встряхиванием на центрифуге-ворткексе FVL-2400N Combi-spin (BioSan, Латвия) в течение 1.5 ч до полного растворения. Пробирку с лизатом помещали в холодильник при 4°C на 10–15 мин. Затем к раствору добавляли 120 мкл 6M NaCl с последующим встряхиванием на центрифуге-ворткексе и центрифугировали в течение 15 мин при 13000 об/мин на центрифуге Sigma 4-16K (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Германия). Супернатант повторно цент-

рифугировали в течение 10 мин при 13000 об/мин. Собирали 100 мкл супернатанта, добавляли 200 мкл холодного 96%-ного этанола и перемешивали. После серии циклов охлаждения, перемешивания, центрифугирования, растворения в этаноле и высушивания общее содержание ДНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, США). Образцы хранили в морозильной камере при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Для проведения ПЦР на льду в ПЦР-пробирки добавляли по 9 мкл MasterMix (дистиллированная вода, PCR-буфер  $\times 10/5/2$ , соответствующие праймеры, а также dNTP,  $\text{Mg}^{2+}$  и TaqPol), амплификацию проводили с использованием амплификатора T100 Thermal Cycler (BioRad, США). После амплификации в ПЦР-пробирки добавляли по 3 мкл Green буфера для окрашивания. В каждую первую лунку в ряду было добавлено 3.5 мкл маркера, в остальные лунки добавлялось по 10 мкл окрашенной пробы. После этого источник тока выставляли на 60 мин на 130 В. Электрофорез был проведен с маркером 100 пн (трансген – 500 пн, внутренний положительный контроль – 324 пн). Результат амплификации был оценен при помощи системы гель-документирования Gel Doc XR+ (BioRad, США).

### *Исследование координации движений и баланса тела*

В возрасте шести месяцев исследовали потомков мышей, полученных после культивирования *in vitro* и переноса эмбрионов: линии B6.Cg-Tg, у которых было подтверждено наличие гена *SNCA* с мутацией A53T и линии C57BL/6 дикого типа из тех же пометов, у которых по результатам генотипирования данного трансгена обнаружено не было (рис. 1). Наряду с этим исследовали потомков мышей, полученных в ходе естественного спаривания без применения репродуктивных технологий: линии B6.Cg-Tg и линии C57BL/6 (дикий тип). Оценивали координацию движений и баланс тела с помощью теста РР. За два дня до начала тестирования животные были изолированы друг от друга и помещены в чистую индивидуальную клетку OptiMice размером  $34.3 \times 29.2 \times 15.5$  см. Перед тестированием каждого животного оборудование обрабатывали 6%-ным раствором перекиси водорода.

Тест РР с ускорением используют для оценки координации движений и баланса тела; в частности, его применяют при изучении генетических моделей БП, созданных на мышах [46]. Устройство Ugo Basile 47600 (Ugo Basile, Италия) представляет собой пять дорожек шириной 5.7 см с барабанами диаметром 3 см, расположенных на высоте 16 см и разделенных плоскими круглыми деталями. Прибор имеет размеры  $27.94 \times 43.18 \times 38.10$  см, вес 6.4 кг и может давать ускорение 2–80 об/мин. Ротород был запрограммирован на вращение с линейно возрастающей скоростью от 5 до 40 об/мин за 300 с. Для повышения надежности результатов теста проводили три сессии для каждого тестируемого животного с перерывами в одну минуту. Оценивали время до падения мыши с барабана, а также скорость его вращения, при котором оно произошло для каждой сессии.

### *Интракардиальная перфузия*

В возрасте шести месяцев у мышей линии B6.Cg-Tg и контрольных животных дикого типа (C57BL/6) из тех же пометов, полученных после культивирования *in vitro* и переноса эмбрионов в репродуктивные пути самок-реципиентов, а также мышей этих линий, полученных после естественного спаривания, производили интракардиальную перфузию для фиксации ткани головного мозга, как описано ранее [51]. Мышей наркотизировали путем введения внутривенно медетомидина гидрохлорида (Медитин, 0.01 мг/кг; Апи-Сан, Россия) и через 10 мин золетила (Zoletil, 50 мг/кг; Virbac, Франция). После этого животным проводили перфузию, вводя в кровеносную систему сначала 15 мл фосфатно-солевого буфера (PBS), а затем 15 мл 10%-ного раствора формалина. Мозг извлекали, помещали в 30%-ный раствор сахарозы в PBS с до-

бавлением 5 мл 10%-ного формалина для обезвоживания и последующей фиксации и хранили при 4°C в течение следующих 2 недель, пока материал не опустится на дно пробирки. Затем образцы мозга погружали в O.C.T Tissue-Tek (Sakura Finetek, США), после чего замораживали и хранили при -70°C в горизонтальном низкотемпературном морозильнике MDF-594 (Sanyo, Япония).

#### *Приготовление замороженных срезов мозга*

Были изготовлены замороженные срезы КЧС (*substantia nigra pars compacta* – SNpc). Данная структура была идентифицирована согласно атласу Паксиноса и Франклина [54] на расстоянии 3.08–3.52 мм от брегмы. Срезы толщиной 10 мкм готовили на криотоме HM550 OP (Thermo Scientific, США) при -25°C и помещали на предметные стекла с адгезивным покрытием PCI, со шлифованной кромкой и с колорированным краем (CITOTEST, Китай) для последующего иммуногистохимического анализа.

#### *Иммуногистохимический анализ и подсчет плотности нейронов*

Окрашивание образцов проводили в соответствии с протоколами производителей наборов антител. Перед процедурой окрашивания срезы обезвоживали с последующей регидратацией в течение пяти минут в PBS. После этого проводили демаскировку антигенов, индуцированную нагреванием, в 10 мМ щелочном цитратном буфере (pH 9) при 95°C на водяной бане TW-2.02 (Elmi, Латвия) в течение 15 мин. Затем срезы извлекали из буфера и охлаждали до комнатной температуры. После этого образцы трижды промывали в буферном растворе PBS-Tween: PBS с добавлением 0.1% Tween-20 (P9416-100 мл; Sigma-Aldrich, США) в течение 15 мин. Далее каждый срез покрывали буфером Protein Block (ab64226; Abcam, Великобритания) на 30 мин с последующим удалением избытка жидкости в соответствии с рекомендациями производителя.

После процедуры промывания и воздействия буфером Protein Block добавляли 50 мкл первичного антитела и оставляли на ночь при температуре 4°C во влажной темной камере. Используемые концентрации антител составляли 1 : 800 для anti-NeuN (ab177487, Abcam, Великобритания) и 1 : 450 для анти-тирозингидроксилазы (Tyrosine Hydroxylase – TH) anti-TH (ab6211; Abcam, Великобритания). Для определения альфа-синуклеина добавляли 50 мкл первичного антитела alpha-Synuclein Antibody (NB110-61645, Novus Biologicals, Littleton, CO, США) в концентрации 1 : 600 и оставляли на 36 ч при температуре 4°C во влажной темной камере. После воздействия первичным антителом срезы промывали в буфере PBS-Tween в течение 15 мин, удаляли избыток жидкости, добавляли 50 мкл вторичного антитела Goat Anti-Rabbit IgG H&L AF488 (ab150077; Abcam, Великобритания) в концентрации 1 : 700, а затем оставляли во влажной темной камере на два часа при температуре 4°C. Далее образцы промывали в буферном растворе PBS-Tween в течение 15 мин, удаляли избыток жидкости и помещали образцы в среду ProLong, Glass AntifadeMountant (Thermo P36982; Thermo Fisher Scientific, США). При оценке плотности альфа-синуклеина в нейронах мы модифицировали опубликованные ранее протоколы [55, 56]. В частности, с целью идентификации ядер клеток в черной субстанции к срезам дополнительно добавляли 80 мкл DAPI, оставляли в темной влажной камере в течение 15 мин и затем дважды промывали в PBS в течение 3 мин.

Оценку плотности нейронов, меченных различными антителами, проводили слепым методом два независимых исследователя с использованием микроскопа Axio Imager.M2 (Carl Zeiss, Германия) с камерой Zeiss AxioCam 506 mono (Carl Zeiss, Германия) при увеличении  $\times 200$ . Число меченых нейронов подсчитывали вручную минимум в четырех срезах на животное, в поле зрения 5000 мкм<sup>2</sup> (длина 50 мкм, ширина 100 мкм; одно поле зрения на один срез). Для создания поля зрения использовали программу ImageJ (National Institutes of Health, США). Плотность нейронов рассчитывали

как число нейронов на объем ( $\text{мм}^3$ ), как было описано ранее [51]. Вычисляли число клеток, меченных антителами в интересующей области, усредненное с четырех срезов для каждого животного, и рассчитывали среднюю плотность (миллионов клеток,  $n \times 10^6$ ) в объеме ( $\text{мм}^3$ ): среднее число нейронов на  $\text{мм}^2$  при толщине среза 10  $\mu\text{м}$  умножали на  $\times 10^5$ , чтобы рассчитать, сколько миллионов клеток в  $\text{мм}^3$ . Работы проводили с использованием оборудования ЦКП “Центр генетических ресурсов лабораторных животных” Института цитологии и генетики СО РАН, а также ЦКП “Микроскопический анализ биологических объектов” Института цитологии и генетики СО РАН.

### Статистический анализ

Анализ результатов поведенческих тестов проводили с использованием программного пакета STATISTICA v. 12.0 (StatSoft, Inc., США). Данные были проверены на нормальность с помощью теста Шапиро–Уилка. Результаты поведенческого теста и плотности нейронов (общей, дофаминовых и с альфа-синуклеином) оценивали с помощью двухфакторного ANOVA: “линия” и “способ размножения” с последующим апостериорным сравнением с использованием критерия Ньюмена–Кейлса (Newman–Keuls *post-hoc* test). Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $M \pm SEM$ ). Уровень значимости рассматривался как  $p < 0.05$ .

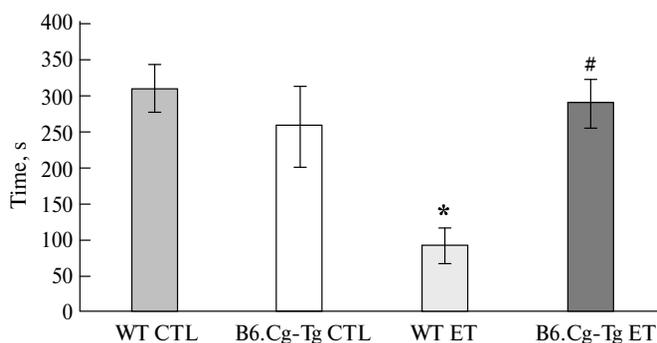
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате культивирования *in vitro* в среде KSOMaа в течение 48 ч в среднем по пяти самкам  $88.0 \pm 3.9\%$  эмбрионов достигли стадии бластоцисты. После трансплантации бластоцист пяти самкам-реципиентам все они принесли потомство. В среднем родилось  $3.2 \pm 0.6$  потомка на самку-реципиента. В общей сложности было получено 16 рожденных потомков (всего восемь самцов и восемь самок) из 66 трансплантированных зародышей (эффективность в среднем составила  $25.9 \pm 4.3\%$ ).

Генотипирование показало, что после культивирования *in vitro* и переноса эмбрионов было получено четыре гемизиготных самца мышей B6.Cg-Tg, моделирующих БП, и четыре самца дикого типа, у которых гена *SNCA* с мутацией A53T обнаружено не было. Кроме того, по результатам генотипирования было выявлено, что из потомков, полученных путем естественного спаривания, т. е. без применения репродуктивных технологий, 9 самцов являются мышами линии B6.Cg-Tg, а 14 самцов представляют дикий тип (C57BL/6), у которых гена *SNCA* с мутацией A53T обнаружено не было. Все животные были протестированы в тесте РР. Для исследования мозга были взяты все животные обеих линий, полученные с применением репродуктивных технологий, а также все 9 самцов B6.Cg-Tg, полученных без применения репродуктивных технологий. Из 14 самцов дикого типа (C57BL/6), полученных без применения репродуктивных технологий, для исследования мозга было случайным образом взято 9 животных.

Различия по латентному времени до падения животного в тесте РР представлены на рис. 2. Двухфакторный анализ ANOVA не показал влияния факторов “линия” [ $F_{(1,27)} < 1$ ] и “способ размножения” [ $F_{(1,27)} < 1$ ] на латентное время до падения животного, однако выявил взаимодействие между этими факторами [ $F_{(1,27)} = 5.66; p < 0.05$ ]. Апостериорное сравнение *post hoc* показало, что у самцов мышей линии C57BL/6, полученных из эмбрионов, которые развивались в культуре *in vitro* (группа WT ET), латентное время до падения животного было достоверно меньше ( $p < 0.05$ ), чем у самцов этой линии, полученных без применения репродуктивных технологий (группа WT CTL), и меньше ( $p < 0.05$ ), чем у мышей, моделирующих БП (группа B6.Cg-Tg-ET), рожденных после применения репродуктивных технологий (рис. 2).

Различия по общей плотности нейронов в КЧС представлены на рис. 3. Двухфакторный ANOVA показал влияние факторов “линия” [ $F_{(1,22)} = 17.23; p < 0.001$ ] и “способ

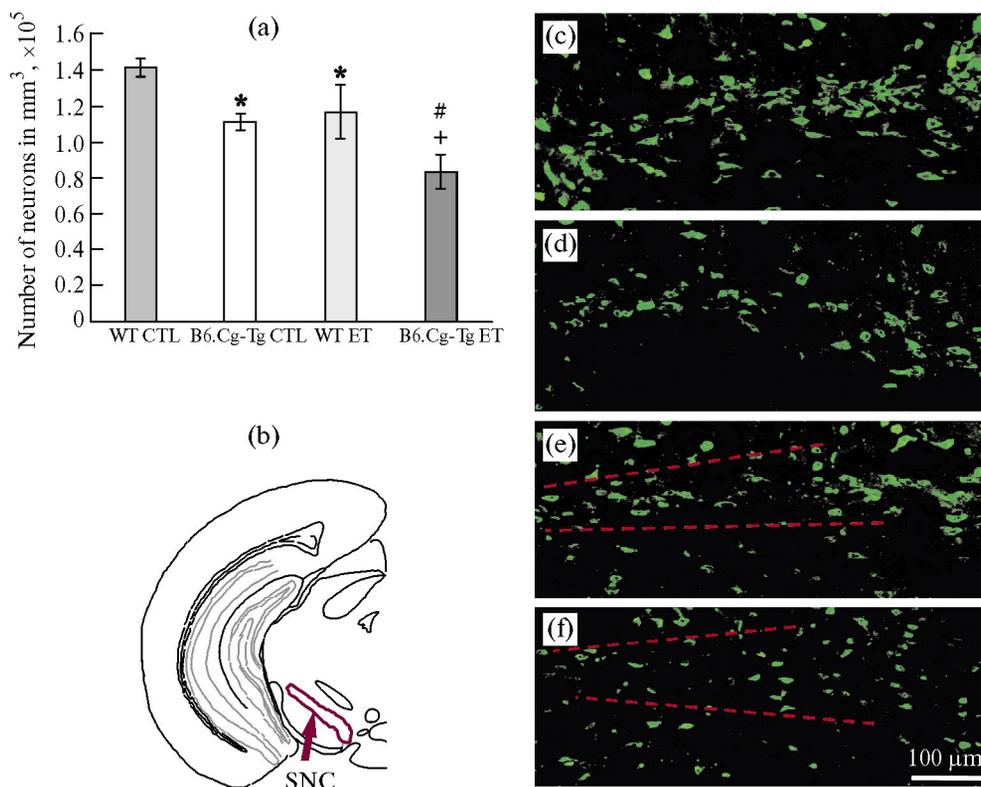


**Рис. 2.** Ротарод тест. Латентное время до падения животного. WT CTL – потомки дикого типа C57BL/6, полученные путем естественного спаривания без применения вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ); B6.Cg-Tg CTL – потомки B6.Cg-Tg, полученные без применения ВРТ; WT ET – потомки дикого типа C57BL/6, полученные с применением ВРТ; B6.Cg-Tg ET – потомки B6.Cg-Tg, полученные с применением ВРТ. \*  $p < 0.05$  между WT ET и WT CTL; #  $p < 0.05$  между B6.Cg-Tg ET и WT ET.

размножения” [ $F_{(1,22)} = 11.98; p < 0.01$ ] на общее число нейронов в КЧС, однако взаимодействия между этими факторами обнаружено не было [ $F_{(1,22)} < 1$ ]. Апостериорное сравнение выявило различие плотности нейронов в КЧС у потомков мышей разных линий, рожденных без применения репродуктивных технологий: в группе B6.Cg-Tg CTL она была меньше ( $p < 0.05$ ) по сравнению с группой WT CTL (рис. 3). Кроме того, было установлено уменьшение ( $p < 0.05$ ) плотности нейронов в КЧС у потомков мышей группы WT ET по сравнению с WT CTL и B6.Cg-Tg ET (рис. 3). У потомков мышей B6.Cg-Tg, полученных с применением репродуктивных технологий (группа B6.Cg-Tg ET), было обнаружено уменьшение ( $p < 0.05$ ) плотности нейронов в КЧС по сравнению с потомками мышей группы B6.Cg-Tg CTL (рис. 3).

Различия по плотности дофаминовых нейронов в КЧС представлены на рис. 4. Двухфакторный ANOVA не показал влияния факторов “линия” [ $F_{(1,22)} < 1$ ] и взаимодействия между факторами “линия” и “способ размножения” [ $F_{(1,22)} < 1$ ], однако выявил влияние фактора “способ размножения” [ $F_{(1,22)} = 8.06; p < 0.01$ ] на число дофаминовых нейронов в КЧС. Апостериорное сравнение *post hoc* показало различие по плотности дофаминовых нейронов в КЧС у потомков мышей разных линий, рожденных без применения репродуктивных технологий: в группе B6.Cg-Tg CTL она была меньше ( $p < 0.05$ ) по сравнению с группой WT CTL (рис. 4). Кроме того, было установлено уменьшение ( $p < 0.05$ ) числа дофаминовых нейронов в КЧС у потомков мышей C57BL/6, полученных с применением репродуктивных технологий (группа WT ET), по сравнению с потомками этой же линии (группа WT CTL), полученными без применения репродуктивных технологий (рис. 4).

Различия по плотности нейронов с альфа-синуклеином в КЧС представлены на рис. 5. Двухфакторный ANOVA показал влияние фактора “линия” [ $F_{(1,22)} = 145.10; p < 0.001$ ] на данный показатель, но отсутствие влияния фактора “способ размножения” [ $F_{(1,22)} < 1$ ]; при этом было выявлено взаимодействие между факторами “линия” и “способ размножения” [ $F_{(1,22)} = 9.34; p < 0.01$ ] на число нейронов с альфа-синуклеином в КЧС. Апостериорное сравнение *post hoc* показало межлинейные различия по этому показателю. У потомков мышей C57BL/6, рожденных без применения репродуктивных технологий (группа WT CTL), плотность нейронов с альфа-синуклеином в КЧС была меньше ( $p < 0.001$ ) по сравнению с мышами группы B6.Cg-Tg CTL, моделирующими БП (рис. 5). У потомков мышей группы B6.Cg-Tg ET плотность нейронов с альфа-синуклеином в КЧС была больше ( $p < 0.01$  и  $p < 0.001$ ) по сравнению с таковой у потомков мышей групп B6.Cg-Tg CTL и WT ET (рис. 5).

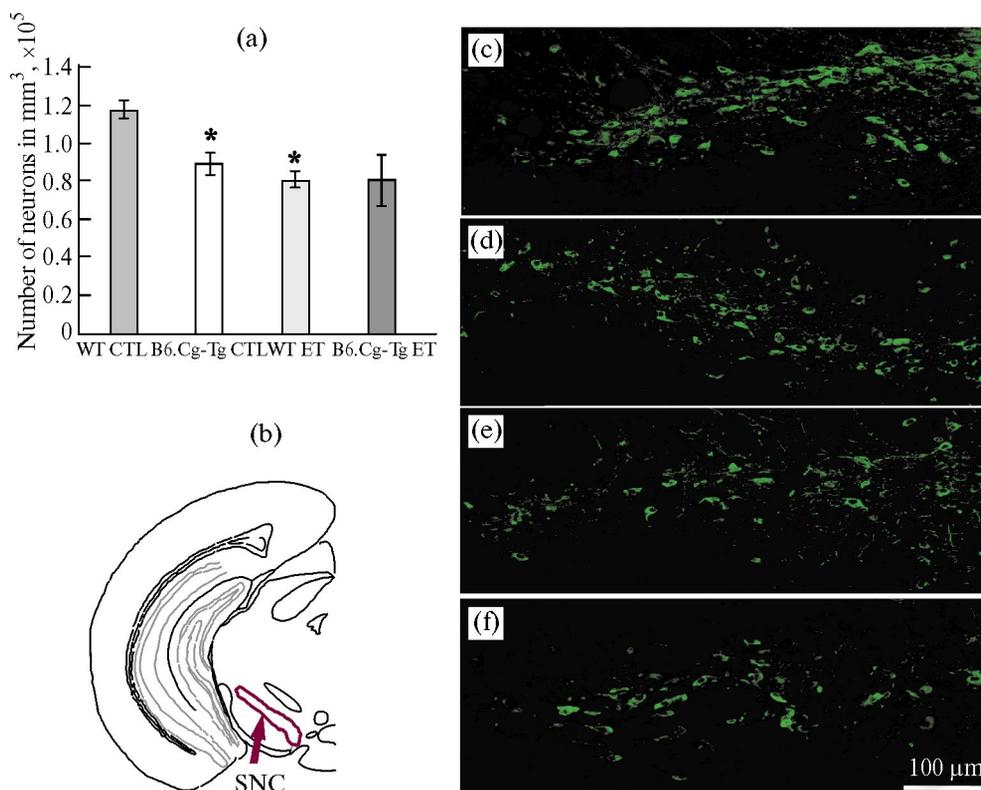


**Рис. 3.** Плотность нейронов в компактной части черной субстанции (*substantia nigra pars compacta* – SNpc), нейроны мечены антителами против нейронального маркера (neuronal marker – NeuN). (a) – число нейронов в мм<sup>3</sup>; (b) – схематическое обозначение исследуемой области в головном мозге. (c–f) – микрофотографии срезов в компактной части черной субстанции; (c) – потомки дикого типа C57BL/6, полученные без применения ВРТ (WT CTL); (d) – потомки В6.Сg-Тg, полученные без применения ВРТ (В6.Сg-Тg CTL); (e) – потомки дикого типа C57BL/6, полученные с применением ВРТ (WT ET); (f) – потомки В6.Сg-Тg, полученные с применением ВРТ (В6.Сg-Тg ET). Пунктирные линии обозначают границы черной субстанции (*substantia nigra*). \*  $p < 0.05$  между В6.Сg-Тg CTL и WT CTL, а также между WT ET и WT CTL; †  $p < 0.05$  между В6.Сg-Тg ET и В6.Сg-Тg CTL; #  $p < 0.05$  между В6.Сg-Тg ET и WT ET.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для болезни Паркинсона характерны нарушения в нигростриарном пути, в частности, избирательная потеря дофаминергических нейронов и наличие специфических включений (тельца Леви) в связи с накоплением альфа-синуклеина [26, 31, 33, 58]. В нашей работе было установлено снижение общей плотности нейронов в КЧС у самцов линии В6.Сg-Тg, рожденных без применения ВРТ (группа В6.Сg-Тg CTL), по сравнению с самцами дикого типа, также рожденными естественным путем (группа WT CTL), что подтверждает более ранние наблюдения [51]. Обнаруженное снижение плотности нейронов может быть связано с окислительным стрессом, которому подвергаются нейроны КЧС при БП [58], либо обусловлено низким уровнем аутофагии в данной области головного мозга [44].

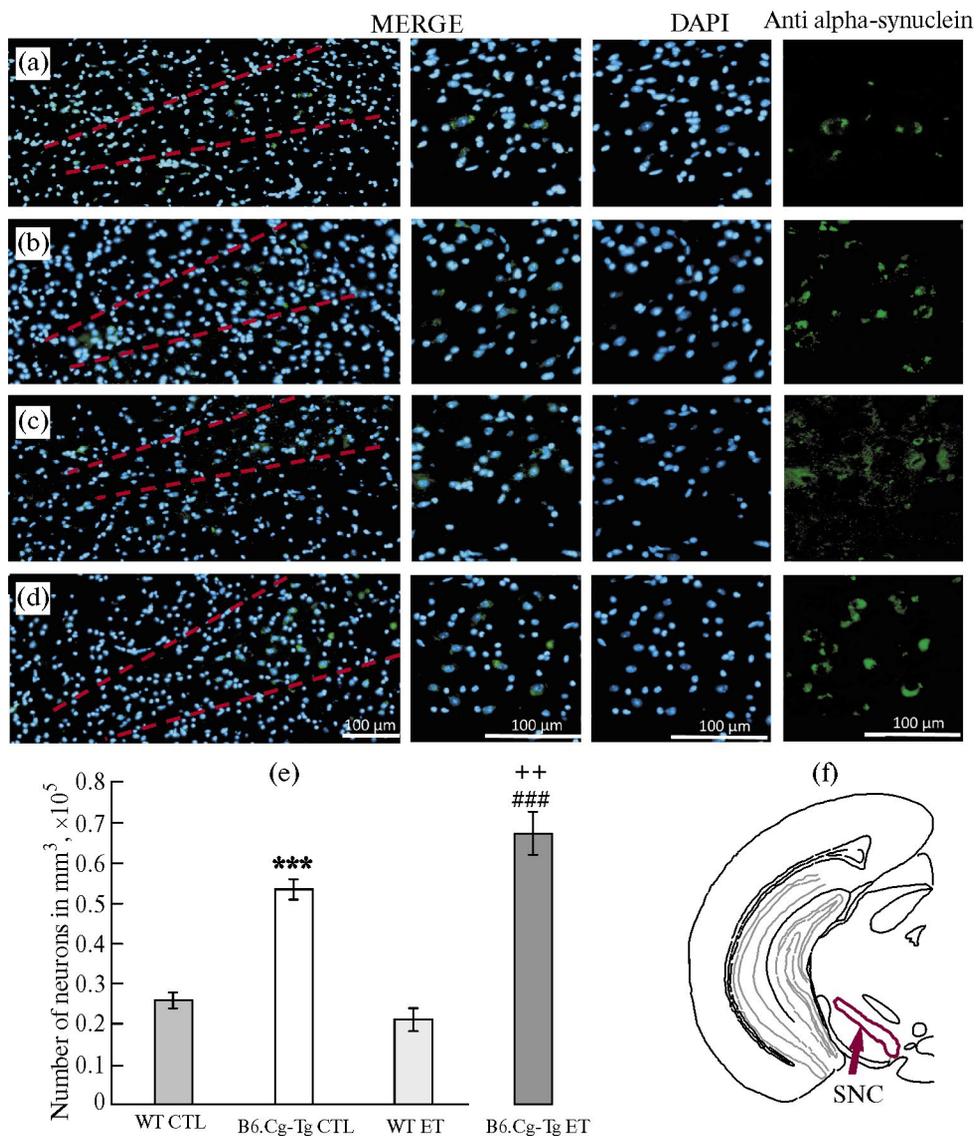
Дофаминовые нейроны КЧС участвуют в регуляции двигательной активности [59]. В нашем исследовании у мышей В6.Сg-Тg было обнаружено снижение плотности до-



**Рис. 4.** Плотность дофаминергических нейронов в компактной части черной субстанции (*substantia nigra pars compacta* – SNC), нейроны мечены антителами против тирозингидроксилазы (tyrosine hydroxylase – TH). (a) – число нейронов в мм<sup>3</sup>; (b) – схематическое обозначение исследуемой области в головном мозге. (c–f) – микрофотографии срезов в данной области; (c) – потомки дикого типа C57BL/6, полученные без применения ВРТ (WT CTL); (d) – потомки B6.Cg-Tg, полученные без применения ВРТ (B6.Cg-Tg CTL); (e) – потомки дикого типа C57BL/6, полученные с применением ВРТ (WT ET); (f) – потомки B6.Cg-Tg, полученные с применением ВРТ (B6.Cg-Tg ET). \*  $p < 0.05$  между B6.Cg-Tg CTL и WT CTL, а также между WT ET и WT CTL.

фаминовых нейронов в КЧС по сравнению с сибсами дикого типа. Ранее было установлено, что такого рода нарушения в КЧС могут приводить к нарушениям двигательной активности при БП [60]. Наряду с этим в нашей работе было обнаружено большее число нейронов с альфа-синуклеином в КЧС у мышей B6.Cg-Tg по сравнению с сибсами дикого типа, что характерно для различных линий мышей с трансгеном *SNCA* с мутацией A53T, которых используют в качестве моделей БП [61, 62]. Ранее была установлена связь между наличием включений альфа-синуклеина в нейронах с их гибелью [63], что соответствует результатам нашей работы. Накопление нерастворимых фибрилл альфа-синуклеина повреждает синаптические везикулы и различные органеллы нейронов, нарушая их функционирование [64], что приводит к неконтролируемому тремору, ригидности, моторным и когнитивным расстройствам, дисфункции вегетативной нервной системы и нарушению сна по мере развития БП [65].

Первые проявления нарушений двигательной активности у мышей с трансгеном *SNCA* с мутацией A53T происходят уже в возрасте шести месяцев, что связано с повышением накопления альфа-синуклеина в нейронах различных структур головного



**Рис. 5.** Плотность нейронов с альфа-синуклеином в компактной части черной субстанции (*substantia nigra pars compacta* – SNc), нейроны мечены антителами против альфа-синуклеина, ядра нейронов окрашены DAPI; (a–d) – микрофотографии срезов в данной области (SNpc целиком; соответствующий фрагмент); (a) – потомки дикого типа C57BL/6, полученные без применения ВРТ (WT CTL); (b) – потомки B6.Cg-Tg, полученные без применения ВРТ (B6.Cg-Tg CTL); (c) – потомки дикого типа C57BL/6, полученные с применением ВРТ (WT ET); (d) – потомки B6.Cg-Tg, полученные с применением ВРТ (B6.Cg-Tg ET); (e) – число нейронов в мм<sup>3</sup>. (f) – схематическое обозначение исследуемой области в головном мозге. Пунктирные линии обозначают границы черной субстанции (*substantia nigra*). \*\*\*  $p < 0.001$  между B6.Cg-Tg CTL и WT CTL; ++  $p < 0.01$  между B6.Cg-Tg ET и B6.Cg-Tg CTL; ###  $p < 0.001$  между B6.Cg-Tg ET и WT ET.

мозга [43, 48, 62]. Однако патологические изменения нарастают постепенно; разные отделы мозга поражаются по мере развития заболевания каждый в свою очередь [66]. Координация движений и баланс тела у мышей, моделирующих БП, изменяются в разном возрасте в зависимости от среды обитания и других факторов [46, 67]. В настоящем исследовании не было обнаружено отличий по этим параметрам между мышами В6.Сg-Tg и сибсами дикого типа в тесте РР с ускорением в возрасте 6 месяцев. Наши наблюдения согласуются с результатами более ранних работ, в которых в возрасте 8 месяцев не было обнаружено отличий по времени до падения в тесте РР у мышей линии В6.Сg-Tg от контрольных животных дикого типа [46, 67], хотя были выявлены отличия в других возрастах [67] или на фоне определенных воздействий [46].

ВРТ, в частности культивирование преимплантационных эмбрионов, используют в репродуктивной медицине, и влияние их на здоровье потомства широко обсуждается [3–17]. Однако экспериментальных работ, посвященных влиянию ВРТ на развитие нервной системы потомков, крайне мало [21–24]. Это обстоятельство повышает актуальность проведенного нами исследования, в котором впервые были изучены отдаленные последствия культивирования эмбрионов на моторные функции потомков и особенности строения мозга не только у мышей дикого типа C57BL/6, но и у мышей В6.Сg-Tg, моделирующих БП.

Весьма интересным, на наш взгляд, эффектом репродуктивных технологий было ухудшение координации движений и баланса тела, сопряженное со снижением общей плотности нейронов и плотности дофаминовых нейронов в КЧС у мышей дикого типа C57BL/6, рожденных после культивирования преимплантационных эмбрионов *in vitro* (группа WT ET). Ранее было показано, что применение таких репродуктивных технологий, как ЭКО и культивирование эмбрионов *in vitro*, приводит к снижению уровней нейротрофических факторов, в том числе нейротрофического фактора мозга (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), нейротрофического фактора глиального происхождения (glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF) и фактора роста нервов (nerve growth factor, NGF) в некоторых отделах мозга мышей [23]. Установлено, что BDNF оказывает положительное влияние на дофаминовые нейроны в некоторых областях головного мозга мышей, в частности в КЧС [71]. Таким образом, у потомков дикого типа C57BL/6, полученных после применения ВРТ, может иметь место снижение уровней нейротрофических факторов мозга. Именно этим может быть обусловлено обнаруженное нами снижение плотности дофаминовых нейронов в КЧС у потомков этой группы, а также общей плотности нейронов, поскольку дофаминовые нейроны являются преобладающими в КЧС [33, 38].

Между тем не было обнаружено аналогичного снижения общей плотности нейронов у потомков В6.Сg-Tg, рожденных с применением ВРТ, по сравнению с потомками этой линии, полученными в результате естественного спаривания. Наиболее вероятным объяснением этому может быть исходно сниженная плотность нейронов, в частности дофаминергических, у мышей В6.Сg-Tg по сравнению с диким типом C57BL/6. Очевидно, что если число нейронов уже снижено, эффект от каких-либо процедур, который приводит к дальнейшему снижению, может оказаться менее заметным или даже неощутимым.

У мышей группы В6.Сg-Tg ET, полученных с применением репродуктивных технологий, было обнаружено больше нейронов с альфа-синуклеином в КЧС, чем у потомков той же линии, рожденных после естественного зачатия. Это может быть связано с изменением статуса метилирования репарационных ДНК тканей головного мозга вследствие влияния физических факторов при развитии ранних эмбрионов *in vitro* [13]. В дальнейшем это может повлиять на репарацию ДНК на более поздних этапах онтогенеза и увеличить экспрессию альфа-синуклеина в нейронах [22]. В ряде работ изучено, как характер питательной среды и другие условия культивирования *in vitro* могут повлиять на экспрессию генов в эмбрионах [68–70], что также может отразиться на фенотипе взрослых потомков, полученных из этих эмбрионов [13].

В нашей работе не обнаружено достоверных отличий в тесте ротарод у потомков B6Cg-Tg ET с выявленным усилением нейродегенеративного процесса и накоплением альфа-синуклеина. Возможно, это связано с компенсаторными механизмами ЦНС как в самой дофаминергической системе, так и в других структурах мозга [72]. Так, при потере дофаминовых нейронов при БП происходят компенсаторные изменения в nigrostriарной системе, связанные с увеличением синтеза и высвобождения дофамина оставшимися клетками, возрастанием эффективности его поглощения [72–74]. У людей с БП двигательные дисфункции проявляются на поздних стадиях болезни, когда нарушения в головном мозге весьма выражены [75–77], что показано в концепции «моторного резерва» [78].

В недавнем исследовании было подтверждено, что воздействия в пренатальном онтогенезе могут иметь большое значение для таких характеристик головного мозга, как нейропластичность [4]. Кроме того, существует достаточно много клинических исследований, которые направлены на выявление возможной связи применения репродуктивных технологий с возможными патологиями ЦНС [5–11]. В связи с объективными сложностями анализа клинических данных авторы этих работ приходят к различным, зачастую противоречащим друг другу выводам. В представленной нами работе было показано, что у потомков мышей дикого типа C57BL/6, рожденных после применения ВРТ, по достижении возраста 6 месяцев появились признаки, характерные для БП: снижение общей плотности нейронов, а также плотности дофаминовых нейронов в КЧС, что сопряжено с ухудшением баланса тела в тесте РР. У потомков мышей B6.Cg-Tg (модель БП), рожденных после применения ВРТ, наблюдали усиление признака БП: повышенную плотность нейронов с альфа-синуклеином в КЧС по сравнению с естественно зачатыми. Результаты нашего исследования указывают на возможную связь применения современных репродуктивных технологий с повышением предрасположенности к развитию нейродегенеративного процесса и появлению признаков, характерных для БП.

#### БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают благодарность В. В. Рожкову за лингвистическую проверку манускрипта.

#### ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента – С. Я. А., И. Н. Р., Е. Ю. Б., Т. Н. И., проведение поведенческих экспериментов – И. Н. Р., Т. А. Р., В. С. К., Н. А. Ш., иммуногистохимическое исследование – И. Н. Р., С. Г. А., Д. А. Л., В. С. К., обработка результатов – С. В. О., Е. Ю. Б., Т. А. Р., С. Я. А., написание и редактирование рукописи – С. Я. А., И. Н. Р., В. С. К., Е. Ю. Б.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств Российского научного фонда: проект № 23-25-00123. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комитетом по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 145 от 29.03.2023 г.).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Barker DJ* (2007) The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* 261: 412–417. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x>
2. *Motrenko T* (2010) Embryo-fetal origin of diseases – new approach on epigenetic reprogramming. *Arch Perinat Med* 6.
3. *Huang HF, Sheng J-Z* (2014) Gamete and embryo-fetal origins of adult diseases. Dordrecht: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-7772-9>
4. *Margolis ET, Gabard-Durnam LJ* (2024) Prenatal influences on postnatal neuroplasticity: Integrating DOHaD and sensitive/critical period frameworks to understand biological embedding in early development. *Infancy*. <https://doi.org/10.1111/inf.12588>
5. *Pinborg A, Loft A, Ziebe S, Nyboe Andersen A* (2004) What is the most relevant standard of success in assisted reproduction? Is there a single 'parameter of excellence'? *Hum Reprod* 19: 1052–1054. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh228>
6. *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>
7. *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>
8. *Berntsen S, Soderstrom-Anttila V, Wennerholm UB, 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. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmz001>
9. *Andreadou MT, Katsaras GN, Talimtz 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>
10. *Ono M, Kuji N, Ueno K, Kojima J, Nishi H* (2024) The long-term outcome of children conceived through assisted reproductive technology. *Reprod Sci* 31: 583–590. <https://doi.org/10.1007/s43032-023-01339-0>
11. *Sonigo C, Ahdad-Yata N, Pirtea P, Solignac C, Grynberg M, Sermondade N* (2024) Do IVF culture conditions have an impact on neonatal outcomes? A systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 41: 563–580. <https://doi.org/10.1007/s10815-024-03020-0>
12. *Zhang S, Luo Q, Meng R, Yan J, Wu Y, Huang H* (2024) Long-term health risk of offspring born from assisted reproductive technologies. *J Assist Reprod Genet* 41: 527–550. <https://doi.org/10.1007/s10815-023-02988-5>
13. *Ramos-Ibeas P, Heras S, Gomez-Redondo I, Planells B, Fernandez-Gonzalez R, Pericuesta E, Laguna-Barraza R, Perez-Cerezales 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>
14. *Balayla J, Sheehy O, Fraser WD, Seguin JR, Trasler J, Monnier P, MacLeod AA, Simard MN, Muckle G, Berard A* (2017) 3D-study research group from the integrated research network in perinatology of Quebec and Eastern Ontario. Neurodevelopmental outcomes after assisted reproductive technologies. *Obstet Gynecol* 129: 265–272. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000001837>
15. *Sacha CR, Gopal D, Liu CL, Cabral HR, Stern JE, Carusi DA, Racowsky C, Bormann CL* (2022) The impact of single-step and sequential embryo culture systems on obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies: the Massachusetts Outcomes Study of Assisted Reproductive Technology. *Fertil Steril* 117: 1246–1254. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2022.03.005>
16. *Husen SC, Koning IV, Go ATJI, Groenenberg IAL, Willemsen SP, Rousian M, Steegers-Theunissen RPM* (2021) IVF with or without ICSI and the impact on human embryonic brain development: the Rotterdam Periconceptual Cohort. *Hum Reprod* 36: 596–604. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa341>
17. *Sunde A* (2019) Embryo culture and phenotype of the offspring. *In Vitro Fertilization*: 877–889. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-43011-9\\_74](https://doi.org/10.1007/978-3-319-43011-9_74)
18. *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>

19. Rose C, Rohl FW, Schwegler H, Hanke J, Yilmazer-Hanke DM (2006) Maternal and genetic effects on anxiety-related behavior of C3H/HeN, DBA/2J and NMRI mice in a motility-box following blastocyst transfer. *Behav Genet* 36: 745–762.  
<https://doi.org/10.1007/s10519-005-9037-4>
20. Lopez-Cardona AP, Fernandez-Gonzalez R, Perez-Crespo M, Alen F, de Fonseca FR, Orio 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>
21. Hu M, Lou Y, Liu S, Mao Y, Le F, Wang L, Li L, Wang Q, Li H, Lou H, Wang N, Jin F (2020) Altered expression of DNA damage repair genes in the brain tissue of mice conceived by *in vitro* fertilization. *Mol Hum Reprod* 26: 141–153.  
<https://doi.org/10.1093/molehr/gaaa010>
22. 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>
23. 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>
24. Брусенцев ЕЮ, Игонина ТН, Рожкова ИН, Окотруб СВ, Лебедева ДА, Владимирова ЕВ, Козенева ВС, Амстиславский СЯ (2023) Влияние культивирования *in vitro* и переноса эмбрионов на плотность нейронов и нейрогенез в головном мозге мышей линии C57BL/6J. Нейрохимия 40: 223–233. [Brusentsev EYu, Igonina TN, Rozhkova IN, Okotrub SV, Lebedeva DA, Vladimirova EV, Kozeneva VS, Amstislavsky SYa (2023) The effect of *in vitro* culture and embryo transfer on neuronal density and neurogenesis in the brains of C57BL/6J mice. *Neurochem J* 17: 349–358. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.31857/S1027813323030068>
25. 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.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.06.017>
26. Beitz JM (2014) Parkinson's disease: a review. *Front Biosci (Schol Ed)* 6: 65–74.  
<https://doi.org/10.2741/S415>
27. Tran J, Anastacio H, Bardy C (2020) Genetic predispositions of Parkinson's disease revealed in patient-derived brain cells. *NPJ Parkinson's disease*. 6: 8.
28. Bidesi NS, Vang Andersen I, Windhorst AD, Shalgunov V, Herth MM (2021) The role of neuroimaging in Parkinson's disease. *J Neurochem* 159: 660–689.
29. Sellbach AN, Boyle RS, Silburn PA, Mellick GD (2006) Parkinson's disease and family history. *Parkinsonism & Related Disorders* 12(7): 399–409.  
<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2006.03.002>
30. Korchounov A, Meyer MF, Krasnianski M (2010) Postsynaptic nigrostriatal dopamine receptors and their role in movement regulation. *J Neural Transm (Vienna)* 117: 1359–1369.  
<https://doi.org/10.1007/s00702-010-0454-z>
31. Hayes MT (2019) Parkinson's disease and parkinsonism. *Am J Med* 132: 802–807.  
<https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2019.03.001>
32. Halliday GM, Del Tredici K, Braak H (2006) Critical appraisal of brain pathology staging related to presymptomatic and symptomatic cases of sporadic Parkinson's disease. *J Neural Transm (Suppl)* 70: 99.
33. Dickson DW, Braak H, Duda JE, Duyckaerts C, Gasser T, Halliday GM, Hardy J, Leverenz JB, Del Tredici K, Wszolek ZK, Litvan I (2009) Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet Neurol* 8: 1150–1157.
34. Burre J, Sharma M, Sudhof TC (2018) Cell biology and pathophysiology of  $\alpha$ -synuclein. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8: a024091.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024091>
35. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276: 2045–2047.  
<https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2045>

36. *Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M* (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388: 839–840.  
<https://doi.org/10.1038/42166>
37. *Lai TT, Kim YJ, Nguyen PT, Koh YH, Nguyen TT, Ma HI, Kim YE* (2021) Temporal evolution of inflammation and neurodegeneration with alpha-synuclein propagation in Parkinson's disease mouse model. *Fron Int Neurosci* 15: 715190.
38. *Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkman J, Schrag AE, Lang AE* (2017) Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers* 3: 17013.  
<https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>
39. *Feuer SK, Rinaudo PF* (2017) Physiological, metabolic and transcriptional postnatal phenotypes of *in vitro* fertilization (IVF) in the mouse. *J Dev Origin Heal Dis* 8: 403–410.  
<https://doi.org/10.1017/s204017441700023x>
40. *Dulioust E, Toyama K, Busnel MC, Moutier R, Carlier M, Marchaland C, Ducot B, Roubertoux P, Auroux M* (1995) Long-term effects of embryo freezing in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 589–593.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.2.589>
41. *Djuwantono T, Aviani JK, Permadi W, Achmad TH, Halim D* (2020) Risk of neurodevelopmental disorders in children born from different ART treatments: a systematic review and meta-analysis. *J Neurodev Disord* 12: 33.  
<https://doi.org/10.1186/s11689-020-09347-w>  
<https://www.jax.org/strain/006823>
42. *Unger EL, Eve DJ, Perez XA, Reichenbach DK, Xu Y, Lee MK, Andrews AM* (2006) Locomotor hyperactivity and alterations in dopamine neurotransmission are associated with overexpression of A53T mutant human alpha-synuclein in mice. *Neurobiol Dis* 21: 431–443.  
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.08.005>
43. *Pupyshev AB, Korolenko TA, Akopyan AA, Amstislavskaya TG, Tikhonova MA* (2018) Suppression of autophagy in the brain of transgenic mice with overexpression of A53T-mutant  $\alpha$ -synuclein as an early event at synucleinopathy progression. *Neurosci Lett* 672: 140–144.  
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.12.001>
44. *Korolenko TA, Shintyapina AB, Belichenko VM, Pupyshev AB, Akopyan AA, Fedoseeva LA, Russkikh GS, Vavilin VA, Tenditnik MV, Lin C-L, Amstislavskaya TG, Tikhonova MA* (2020) Early Parkinson's disease-like pathology in a transgenic mouse model involves a decreased Cst3 mRNA expression but not neuroinflammatory response in the brain. *Med Univer* 3: 66–78.
45. *Seo JH, Kang SW, Kim K, Wi S, Lee JW, Cho SR* (2020) Environmental enrichment attenuates oxidative stress and alters detoxifying enzymes in an A53T  $\alpha$ -synuclein transgenic mouse model of Parkinson's disease. *Antioxidants (Basel)* 9: 928.  
<https://doi.org/10.3390/antiox9100928>
46. *Zhang Y, Wu Q, Ren Y, Zhang Y, Feng L* (2022) A53T  $\alpha$ -synuclein induces neurogenesis impairment and cognitive dysfunction in line M83 transgenic mice and reduces the proliferation of embryonic neural stem cells. *Brain Res Bull* 182: 118–129.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2022.02.010>
47. *Graham DR, Sidhu A* (2010) Mice expressing the A53T mutant form of human alpha-synuclein exhibit hyperactivity and reduced anxiety-like behavior. *J Neurosci Res* 88: 1777–1183.  
<https://doi.org/10.1002/jnr.22331>
48. *Tang H, Gao Y, Zhang Q, Nie K, Zhu R, Gao L, Feng S, Wang L, Zhao J, Huang Z, Zhang Y, Wang L* (2017) Chronic cerebral hypoperfusion independently exacerbates cognitive impairment within the pathopoiesis of Parkinson's disease via microvascular pathologies. *Behav Brain Res* 333: 286–294.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.05.061>
49. *Langley MR, Ghaisas S, Palanisamy BN, Ay M, Jin H, Anantharam V, Kanthasamy A, Kanthasamy AG* (2021) Characterization of nonmotor behavioral impairments and their neurochemical mechanisms in the MitoPark mouse model of progressive neurodegeneration in Parkinson's disease. *Exp Neurol* 341: 113716.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113716>
50. *Рожкова ИИ, Окотруб СВ, Брусенцев ЕЮ, Рахманова ТА, Лебедева ДА, Козенева ВС, Хоцкин НВ, Амстиславский СЯ* (2023) Анализ поведения и плотности нейронов в головном мозге мышей B6.Cg-Tg(Prnp-SNCA\*A53T)23Mkle/J – модели болезни Паркинсона. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 109: 1199–1216. [*Rozhkova IN, Okotrub SV, Brusentsev EYu, Rakhmanova TA, Lebedeva DA, Kozeneva VS, Khotskin NV, Amstislavsky SYa* (2023) Analysis of behavior and brain neuronal density in B6.Cg-Tg(Prnp-SNCA\*A53T)23Mkle/J mice, a Parkinson's disease model. *Russ J Physiol* 109: 1199–1216. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.31857/S0869813923090091>

51. Раннева СВ, Брусенцева ЕЮ, Игонина ТН, Рагаева ДС, Рожкова ИИ, Ершова НИ, Левинсон АЛ, Амстиславский СЯ (2020) Влияние культивирования эмбрионов на онтогенез потомства у млекопитающих. Онтогенез 51: 417–439. [Ranneva SV, Brusentsev EYu, Igonina TN, Ragaeva DS, Rozhkova IN, Ershov NI, Levinson AL, Amstislavsky SYa (2020) *In vitro* culture of preimplantation embryos and its influence on mammalian ontogenesis. Russ J Dev Biol 51: 417–439. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.31857/S0475145020060075>
52. Rinaudo P, Schultz RM (2004) Effects of embryo culture on global pattern of gene expression in preimplantation mouse embryos. Reproduction 128: 301–311.  
<https://doi.org/10.1530/rep.1.00297>
53. Paxinos G, Franklin K (2012) Mouse brain in stereotaxic coordinates. 4th ed. Acad Press.
54. Carriere CH, Kang NH, Niles LP (2017) Bilateral upregulation of  $\alpha$ -synuclein expression in the mouse substantia nigra by intracranial rotenone treatment. Exp Toxicol Pathol 69: 109–114.  
<https://doi.org/10.1016/j.etp.2016.12.007>
55. Hallett PJ, McLean JR, Kartunen A, Langston JW, Isacson O (2012)  $\alpha$ -Synuclein overexpressing transgenic mice show internal organ pathology and autonomic deficits. Neurobiol Dis. 47: 258–267.  
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.04.009>
56. Kato M, Kimura M (1992) Effects of reversible blockade of basal ganglia on a voluntary arm movement. J Neurophysiol 68: 1516–1534.  
<https://doi.org/10.1152/jn.1992.68.5.1516>
57. Cardoso HD, Passos PP, Lagranha CJ, Ferraz AC, Santos Junior EF, Oliveira RS, Oliveira PE, Santos Rde C, Santana DF, Borba JM, Rocha-de-Melo AP, Guedes RC, Navarro DM, Santos GK, Borner R, Picanco-Diniz CW, Beltrao EI, Silva JF, Rodrigues MC, Andrade da Costa BL (2012) Differential vulnerability of substantia nigra and corpus striatum to oxidative insult induced by reduced dietary levels of essential fatty acids. Front Hum Neurosci 6: 249.  
<https://doi.org/10.3389/fnhum.2012.00249>
58. Schultz W, Ruffieux A, Aebischer P (1983) The activity of pars compacta neurons of the monkey substantia nigra in relation to motor activation. Exp Brain Res 51: 377–387.
59. Chia SJ, Tan EK, Chao YX (2020) Historical perspective: models of Parkinson's disease. Int J Mol Sci 21: 2464.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21072464>
60. Taguchi T, Ikuno M, Hondo M, Parajuli LK, Taguchi K, Ueda J, Sawamura M, Okuda S, Nakanishi E, Hara J, Uemura N, Hatanaka Y, Ayaki T, Matsuzawa S, Tanaka M, El-Agnaf OMA, Koike M, Yanagisawa M, Uemura MT, Yamakado H, Takahashi R (2020)  $\alpha$ -SynucleinBAC transgenic mice exhibit RBD-like behaviour and hyposmia: a prodromal Parkinson's disease model. Brain 143: 249–265.  
<https://doi.org/10.1093/brain/awz380>
61. Wang Y, Sun Z, Du S, Wei H, Li X, Li X, Shen J, Chen X, Cai Z (2022) The increase of  $\alpha$ -synuclein and alterations of dynein in A53T transgenic and aging mouse. J Clin Neurosci 96: 154–162.  
<https://doi.org/10.1016/j.jocn.2021.11.002>
62. Kalia LV, Kalia SK, McLean PJ, Lozano AM, Lang AE (2013)  $\alpha$ -Synuclein oligomers and clinical implications for Parkinson disease. Ann Neurol 73: 155–169.
63. Wong YC, Krainc D (2017)  $\alpha$ -synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and therapeutic strategies. Nat Med 23: 1–13.  
<https://doi.org/10.1038/nm.4269>
64. Albers JA, Chand P, Anch AM (2017) Multifactorial sleep disturbance in Parkinson's disease. Sleep Med 35: 41–48.  
<https://doi.org/10.1016/j.sleep.2017.03.026>
65. Braak H, Rub U, Gai WP, Del Tredici K (2003) Idiopathic Parkinson's disease: Possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. J Neural Transm 110: 517–536.  
<https://doi.org/10.1007/s00702-002-0808-2>
66. Oaks AW, Frankfurt M, Finkelstein DI, Sidhu A (2013) Age-dependent effects of A53T alpha-synuclein on behavior and dopaminergic function. PLoS One 8: e60378.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060378>
67. Kleijkers SH, Eijssen LM, Coonen E, Derhaag JG, Mantikou E, Jonker MJ, Mastenbroek S, Repping S, Evers JL, Dumoulin JC, van Montfoort AP (2015) Differences in gene expression profiles between human preimplantation embryos cultured in two different IVF culture media. Hum Reprod 30: 2303–2311.  
<https://doi.org/10.1093/humrep/dev179>
68. Ducreux B, Patrat C, Trasler J, Fauque P (2024) Transcriptomic integrity of human oocytes used in ARTs: technical and intrinsic factor effects. Hum Reprod Update 30: 26–47.  
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmad025>

69. Lane M, Gardner DK (1998) Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. *Hum Reprod* 13: 991–997. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.4.991>
70. Alonso-Vanegas MA, Fawcett JP, Causing CG, Miller FD, Sadikot AF (1999) Characterization of dopaminergic midbrain neurons in a DBH:BDNF transgenic mouse. *J Comp Neurol* 413: 449–462. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(19991025\)413:3<449::aid-cne7>3.0.co;2-2](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19991025)413:3<449::aid-cne7>3.0.co;2-2)
71. Blesa J, Trigo-Damas I, Dileone M, del Rey NL-G, Hernandez LF, Obeso JA (2017) Compensatory mechanisms in Parkinson's disease: Circuits adaptations and role in disease modification. *Exp Neurol* 298: 148–161. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.10.002>
72. Nakashima A, Ota A, Kaneko YS, Nori K, Nagasaki H, Nagatsu T (2013) A possible pathophysiological role of tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease suggested by postmortem brain biochemistry: a contribution for the special 70th birthday symposium in honor of Prof. Peter Riederer. *J Neural Transm* 120: 49–54. <https://doi.org/10.1007/s00702-012-0828-5>
73. Kozina EA, Khakimova GR, Khaindrava VG, Kucheryanu VG, Vorobyeva NE, Krasnov AN, Georgieva SG, Kerkerian Le-Goff L, Ugrumov MV (2014) Tyrosine hydroxylase expression and activity in nigrostriatal dopaminergic neurons of MPTP-treated mice at the presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism. *J Neurol Sci* 340(1–2): 198–207. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2014.03.028>
74. Calo L, Wegrzynowicz M, Santivañez-Perez J, Grazia Spillantini M (2016) Synaptic failure and  $\alpha$ -synuclein. *Mov Disord*. 31(2): 169–177. <https://doi.org/10.1002/mds.26479>.
75. Morris HR, Spillantini MG, Sue CM, Williams-Gray CH (2024) The pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet* 403(10423): 293–304. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)01478-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01478-2)
76. Salvatore MF (2024) Dopamine Signaling in Substantia Nigra and Its Impact on Locomotor Function – Not a New Concept, but Neglected Reality. *Int J Mol Sci* 25(2): 1131. <https://doi.org/10.3390/ijms25021131>
77. Giustiniani A, Quartarone A (2024) Defining the concept of reserve in the motor domain: a systematic review. *Front Neurosci* 18: 1403065. <https://doi.org/10.3389/fnins.2024.1403065>

---

**Reproductive Technologies and Parkinson's Disease: Experimental Study of Substantia Nigra in the Brain and Motor Functions on C57BL/6 and B6.CG-TG Mice**

**V. S. Kozeneva<sup>a, b</sup>, I. N. Rozhkova<sup>a</sup>, E. Yu. Brusentsev<sup>a</sup>, T. A. Rakhmanova<sup>a, b</sup>,  
N. A. Shavshaeva<sup>a, b</sup>, S. G. Afanasova<sup>a, b</sup>, D. A. Lebedeva<sup>a</sup>, S. V. Okotrub<sup>a</sup>,  
T. N. Igonina<sup>a</sup>, and S. Ya. Amstislavsky<sup>a, \*</sup>**

*<sup>a</sup>Institute of Cytology and Genetics Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,  
Novosibirsk, Russia*

*<sup>b</sup>Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

*\*e-mail: amstis@yandex.ru*

Parkinson's disease (PD) is an age-related neurodegenerative pathology characterized by abnormalities of the brain's dopaminergic system, alpha-synucleinopathy and motor dysfunction. Possible association of assisted reproductive technologies (ARTs) with neuropathologies is discussed in medicine literature, but there is a lack of experimental studies addressing this issue. The current study investigates the effects of ARTs, i.e. *in vitro* culture of preimplantation embryos and embryo transfer (ET) on the features characteristic for PD in offspring: motor dysfunction, decrease of neuronal density, e.g. density of dopaminergic neurons, as well as alpha-synuclein accumulation in *substantia nigra pars compacta* (SNpc). Male offspring of the B6.Cg-Tg strain and C57BL/6 strain (hereinafter referred as wild type, WT) obtained by ART (groups B6.Cg-Tg ET and WT ET) or by natural mating (groups B6.Cg-Tg CTL and WT CTL) were tested at the age of six months. Motor coordination and body balance were studied using the rotarod test; the density of neurons, as well as the accumulation of alpha-synuclein in the SNpc were assessed by immunohistochemical method. It was shown that B6.Cg-Tg mice obtained without ART (B6.Cg-Tg CTL) are characterized by the low density of neurons, including dopaminergic ones, as well as the accumulation of alpha-synuclein in SNpc as compared to wild type mice (WT CTL). Wild-type offspring obtained by ART (WT ET group) were characterized by the impairment in motor coordination and body balance, as well as by the decrease in the density of neurons in the SNpc, including dopaminergic ones. Offspring of the B6.Cg-Tg strain obtained by ART (B6.Cg-Tg ET group) were characterized by an increased accumulation of alpha-synuclein in the SNpc. The results of our study indicate possible association between using of modern reproductive technologies and predisposition to the neurodegenerative process and manifestations of the features characteristic to PD phenotype in offspring.

**Keywords:** Parkinson's disease, reproductive technologies, *in vitro* culture, long-term effects, substantia nigra, dopamine neurons, alpha-synuclein