
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ
НА ПОВЕДЕНИЕ И РАЗВИТИЕ МОЗГА У МЫШЕЙ
С МОДЕЛЬЮ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА**

© 2025 г. И. Н. Рожкова¹, В. С. Козенева^{1,2}, Е. Ю. Брусенцев¹, Т. А. Рахманова^{1,2},
Н. А. Шавшаева^{1,2}, С. Г. Афанасова^{1,2}, Т. Н. Игонина¹, С. В. Окотруб¹,
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 22.01.2025 г.

После доработки 10.02.2025 г.

Принята к публикации 10.02.2025 г.

В настоящей работе исследованы долгосрочные эффекты вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), таких как культивирование эмбрионов *in vitro* и эмбриотрансфер, на поведение и развитие мозга у мышей линии В6.Сg-Tg, моделирующей болезнь Паркинсона (БП), и у мышей дикого типа C57BL/6. Потомки мужского пола, полученные с использованием ВРТ, сравнивались с потомками, зачатыми естественным путем. В возрасте шести месяцев у мышей оценивали уровень тревожности в тесте “Приподнятый крестообразный лабиринт”, а также измеряли массу тела и мозга. Результаты показали, что мыши В6.Сg-Tg, полученные естественным путем, демонстрировали более низкий уровень тревожности и большую массу мозга по сравнению с мышами дикого типа. Применение ВРТ привело к снижению массы мозга у потомков В6.Сg-Tg, а также к значительному снижению уровня тревожности по сравнению с контрольными группами. У мышей дикого типа C57BL/6 применение ВРТ не вызвало значительных изменений в массе мозга или уровне тревожности. Полученные данные свидетельствуют о влиянии ВРТ на поведение и развитие мозга у потомков, особенно у генетически предрасположенных к нейродегенеративным заболеваниям. Эти результаты подчеркивают необходимость дальнейшего изучения долгосрочных эффектов ВРТ, особенно в контексте их влияния на нейро-развитие и поведение, что имеет важное значение для медицины.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, трансгенные мыши, преимплантационные эмбрионы, культивирование *in vitro*, эмбриотрансфер, отдаленные эффекты

DOI: 10.31857/S0869813925050052, EDN: TNTKVO

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) – одна из самых распространенных нейродегенеративных патологий человека [1–3]. Характерными признаками БП являются нарушение моторики и накопление белка альфа-синуклеина в нейронах головного мозга с образова-

нием телец Леви [2]. Частота встречаемости БП составляет 60–140 человек на 100 000 населения, из которых около 5–10% всех случаев приходится на наследственные формы [4, 5]. Одной из причин БП могут быть мутации в гене *SNCA* (A53T и/или A30P), которые приводят к нарушению сборки альфа-синуклеина и агрегации его мономеров [6, 7]. При этом достаточно большой процент наследственных форм БП связан с мутацией A53T [5].

Для исследований БП используют различные модели, созданные на мышах [8–10]. Линия мышей B6.Cg-Tg(PrNp-SNCA*A53T)23Mkle (далее – B6.Cg-Tg) была создана в Джексонской лаборатории (США) на основе линии C57BL/6 путем трансгенеза (встроен ген *SNCA* альфа-синуклеина человека с мутацией A53T, <https://www.jax.org/strain/006823>) [10]. Ген *SNCA* с мутацией A53T является полулетальным и есть не у всех потомков [11], поэтому среди сибсов могут быть особи как с БП (гемизиготы), так и без патологии (дикий тип). При изучении поведения мышей, моделирующих БП, часто оценивают уровень тревожности [12–14]. Ранее было установлено, что мыши B6.Cg-Tg в возрасте шести месяцев отличаются низким уровнем тревожности [14], что можно считать поведенческим маркером данной линии.

Культивирование *in vitro* преимплантационных эмбрионов является одной из ключевых вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), применяемых в медицине, животноводстве и в биомедицинских исследованиях [15–18]. В настоящее время около 10 млн детей рождено в результате применения ВРТ [19]. Представляется крайне сложным проанализировать медицинские данные и оценить эффекты отдельных репродуктивных технологий. Изменения в развитии детей, рожденных после применения ВРТ, могут быть вызваны не только используемыми процедурами, но и быть связаны с особенностями здоровья их родителей, а также предрасположенностью к различным хроническим заболеваниям [15–17, 20]. Между тем исследования на различных линиях мышей показали, что применение ЭКО и/или культивирования эмбрионов *in vitro* в сочетании с последующим их эмбриотрансфером может сопровождаться изменением поведения у потомков, в частности, социального поведения, уровня тревожности и пространственной памяти [18, 21–26].

Масса головного мозга является генетически обусловленным признаком не только для отдельных видов животных [27], но даже для разных линий мышей [28]. В силу таксономических различий масса мозга и ее соотношение с массой тела, а также коэффициент энцефализации существенно отличаются у разных видов млекопитающих [27]. Между тем в пределах вида имеется положительная корреляция между массой мозга и числом нейронов [29], что достаточно хорошо прослеживается и на уровне отдельных таксонов [30]. Это делает массу мозга достаточно информативным показателем нейроразвития, хотя данная характеристика до сих пор крайне редко используется при сравнении отдаленных эффектов различных репродуктивных технологий [31].

Целью данного исследования было изучение эффектов культивирования *in vitro* и переноса эмбрионов в репродуктивные пути самок-реципиентов на формирование фенотипа, характерного для мышей линий B6.Cg-Tg (модель БП) и C57BL/6 (дикий тип). Задачами настоящей работы было оценить возможное влияние культивирования эмбрионов *in vitro* на 1) поведение и 2) массу тела и мозга, в том числе соотношение масс мозг/тело у взрослых потомков.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

Исследования проводили на потомках мышей линии B6.Cg-Tg(PrNp-SNCA*A53T)23Mkle (далее – B6.Cg-Tg). Линия мышей B6.Cg-Tg была создана в результате трансгенеза для моделирования болезни Паркинсона [10]; эти мыши

имеют мутацию A53T в гене *SNCA* альфа-синуклеина человека. В качестве контроля использовали мышей C57BL/6 (далее – дикий тип (WT), или C57BL), на основе которых была создана линия B6.Cg-Tg. В эксперименте были исследованы самцы-сибсы дикого типа и B6.Cg-Tg, полученные как после естественного спаривания самок C57BL/6 (7 самок) с гемизиготными самцами B6.Cg-Tg (7 самцов), так и после применения репродуктивных технологий, а именно культивирования *in vitro* эмбрионов, полученных от 24 самок-доноров, и их переноса в репродуктивные пути самок-реципиентов (16 самок). В результате было получено 7 и 16 пометов для соответствующего “способа размножения”. Полученных потомков генотипировали. 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). Графический дизайн эксперимента представлен на рис. 1.

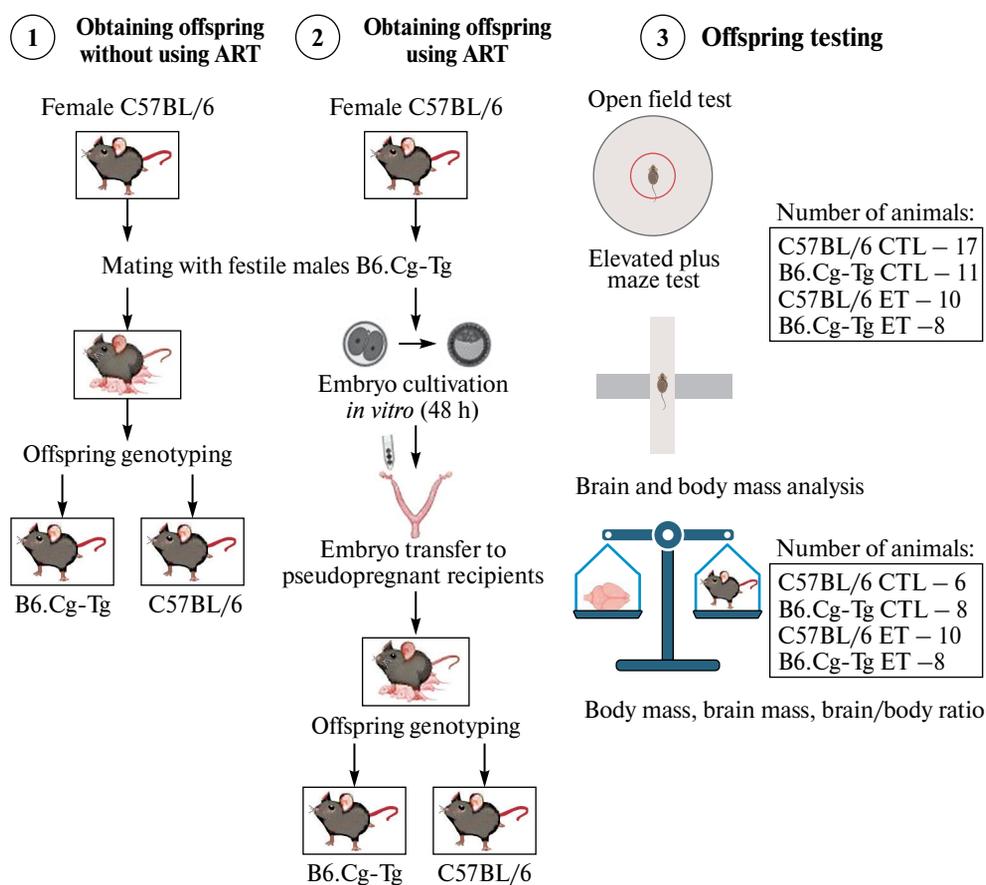


Рис. 1. Экспериментальный дизайн. ART – assisted reproductive technologies (BPT – вспомогательные репродуктивные технологии); мыши B6.Cg-Tg – трансгенная модель болезни Паркинсона; мыши C57BL/6 – линия C57BL/6, или дикий тип; группа C57BL CTL – самцы C57BL/6, полученные естественным путем; группа B6.Cg-Tg CTL – самцы B6.Cg-Tg, полученные естественным путем; группа C57BL ET – самцы C57BL/6, полученные с применением BPT; группа B6.Cg-Tg ET – самцы B6.Cg-Tg, полученные с применением BPT.

Животных содержали в SPF-виварии Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия) в индивидуально вентилируемых клетках OptiMice (Animal Care, США) размером $34.3 \times 29.2 \times 15.5$ см при температуре 22–24 °С и влажности 40–50% с инвертированным 12-часовым циклом день–ночь (рассвет в 3 ч утра); в качестве подстила 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” (“БиоПро”, Россия) и очищенной воде “Северянка” (“Экопроект”, Россия), обогащенной минеральными добавками.

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

Получение эмбрионов требуемой стадии развития

Самкам мышей линии C57BL/6 ($n = 24$) 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. По наличию вагинальной пробки на следующее утро оценивали фертильное спаривание. День обнаружения вагинальной пробки считали первым днем беременности (первый день после спаривания; *day post coitum* 1, *dpc* 1). Беременных самок подвергали эвтаназии погружением в сосуд с CO₂ на третий день после спаривания (*dpc* 3). Яйцеводы и рога матки промывали средой FertiCult™ Flushing (FertiPro, Бельгия), чтобы получить эмбрионы на стадии 8 клеток. Полученные эмбрионы оценивали под стереомикроскопом S8 APO (Leica Microsystems, Германия) при увеличении $\times 80$. Эмбрионы без видимых дефектов, соответствующие ожидаемой стадии развития и с целыми прозрачными оболочками (*zonae pellucidae*), отбирали для культивирования *in vitro*, а некачественные эмбрионы (у которых поврежденных бластомеров более 25% и/или имеется несоответствие ожидаемой стадии развития) 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 лабораторных животных [32–34]. Выбор среды KSOMaa (обогащенной аминокислотами) был обоснован стремлением свести к минимуму нарушение экспрессии генов в ходе культивирования эмбрионов *in vitro* [35]. Дробящиеся эмбрионы мышей ($n = 301$) на стадии 8 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 CO₂-инкубаторе New Brunswick™ Galaxy 48R (Eppendorf, Германия) в стандартных условиях (5% CO₂, 37 °С и влажности 90%) в течение 48 ч. Развитие эмбрионов оценивали под стереомикроскопом S8 APO (Leica Microsystems, Германия). Через 48 ч нормально развивающиеся бластоцисты были перенесены в правый рог матки самок-реципиентов, которые были предварительно спарены со стерильными самцами и находились на стадии третьего дня псевдобеременности. Каждой самке было пересажено 10–18 бластоцист (в среднем 13.9 ± 0.6 эмбриона на самку). Всего трансплантировали 223 бластоцисты.

В качестве самок-реципиентов для переноса эмбрионов использовали межлинейных гибридов мышей CD1 × C57BL/6 ($n = 16$). Самок в проэструсе или эструсе ссаживали с вазэктомированными 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 внутривенно 50 мг/кг золетила (Zoletil; Virbac, Франция). Затем подкожно вводили 0.01 мл амоксициллина (амоксициллина тригидрат, 150 мг/мл; “Апи-Сан”). Шерсть в месте разреза сбрасывали на правой стороне спины на 1 см от нижнего ребра в вентральном направлении, кожу обрабатывали 70%-ным этиловым спиртом. Кожу и подлежащий мышечный слой в области над маткой разрезали дорсовентрально на расстоянии 5 мм от нижнего ребра в каудальном направлении. Висцеральный жировой слой, соединенный с яичником, яйцеводом и верхней частью матки, захватывали пинцетом и приподнимали. Эмбрионы переносили стеклянным капилляром в правый рог матки в 5 мкл среды FertiCult™ Flushing (FertiPro, Бельгия). Разрез зашивали рассасывающейся хирургической нитью (Vicryl; Johnson & Johnson, США) и присыпали антибиотиком (амоксициллина тригидрат; “Апи-Сан”).

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 °С со встряхиванием на центрифуге-вортке FVL-2400N Combi-spin (BioSan, Латвия) в течение 1.5 ч до полного растворения. Пробирку с лизатом помещали в холодильник при 4 °С на 10–15 мин. Затем к раствору добавляли 120 мкл 6 М NaCl с последующим встряхиванием на центрифуге-вортке и центрифугировали в течение 15 мин при 13 000 об/мин на центрифуге Sigma 4-16K (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Германия). Супернатант повторно центрифугировали в течение 10 мин при 13 000 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 °С.

Для проведения ПЦР на льду в ПЦР-пробирки добавляли по 9 мкл MasterMix (ди-стиллированная вода, PCR-буфер x10/5/2, соответствующие праймеры, а также dNTP, Mg²⁺ 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 п. н. (трансген – 500 п. н., внутренний положительный контроль – 324 п. н.). Результат амплификации был оценен при помощи системы гель-документирования Gel Doc XR+ (BioRad, США).

Тест “Приподнятый крестообразный лабиринт”

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 (группы B6.Cg-Tg ET и C57BL/6 ET). Наряду с этим исследовали потомков мышей, полученных в ходе естественного спаривания без применения репродуктивных технологий: линии B6.Cg-Tg и дикого типа C57BL/6 (группы B6.Cg-Tg CTL и C57BL/6 CTL). 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.

Лабиринт, использованный в данном исследовании, состоял из двух открытых ($25 \times 5/30 \times 5.5$ см) и двух закрытых ($25 \times 5 \times 30/30 \times 5.5 \times 14.5$ см) рукавов, разделенных центральной ареной (5×5 см). Установка располагалась на высоте 50 см над поверхностью пола и освещалась лампой накаливания (40 Вт), расположенной сверху на высоте 130 см. Продолжительность теста составляла 5 мин. Поведение регистрировали с помощью вертикальных видеокамер и анализировали с помощью программно-аппаратного комплекса EthoVision^{XT} и EthoStudio (Noldus, Нидерланды) [14, 36]. Регистрировали стандартные параметры: 1) пройденный путь, 2) доля времени нахождения в центре, открытых и закрытых рукавах, 3) число и общее время свешиваний с рукавов, 4) число и общее время вытягиваний. Рассчитывали индекс тревожности [37] по модифицированной формуле: время в открытых рукавах / общее время тестирования.

Измерение массы мозга и тела потомков

В возрасте шести месяцев, после проведения поведенческого теста, потомков всех групп взвешивали с помощью портативных цифровых весов (с точностью до 0.1 г; Scout-Pro SPS2001 F, Ohaus Corporation, США), после чего наркотизировали путем введения внутрибрюшинно медетомидина гидрохлорида (Медитин, 0.01 мг/кг; “Апи-Сан”) и через 10 мин внутрибрюшинно вводимого золетила (Zoletil, 50 мг/кг; Virbac). После этого животным проводили перфузию мозга, вводя в кровеносную систему сначала 15 мл фосфатно-солевого буфера (PBS), а затем 15 мл 10%-ного раствора формалина, как описано ранее [14]. Мозг извлекали, после чего взвешивали с помощью портативных цифровых весов (с точностью до 0.0001 г; Pioneer PA64, Ohaus Corporation).

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. Развитие эмбрионов в течение 24 и 48 ч культивирования *in vitro* представлено как процент blastocист от общего числа культивированных эмбрионов. Процент рожденных потомков от общего числа трансплантированных эмбрионов представлен как среднее \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Результаты поведенческих тестов, а также массы тела, мозга и их соотношения оценивали с помощью двухфакторного ANOVA: “линия” и “способ размножения” с последующим апостериорным сравнением с использованием критерия Дункана (Duncan *post-hoc* test). Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Уровень значимости считали при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При культивировании *in vitro* в течение 24 ч на среде KSOMaa 72.0% эмбрионов развились до стадии blastocисты. Дальнейшее культивирование *in vitro* в течение 24–48 ч в общей сложности повысило этот показатель до 89.7%. В среднем родилось по 3.0 ± 0.3 потомка на самку-реципиента. Для эмбриотрансфера было отобрано 223 blastocисты. В результате переноса эмбрионов 16 псевдобеременным самкам-реципиентам было по-

лучено 48 потомков (всего 22 самца и 26 самок). Эффективность в среднем составила $22.0 \pm 2.2\%$. Генотипирование показало, что после культивирования *in vitro* и переноса эмбрионов было получено 11 гемизиготных самцов мышей В6.Сg-Tg (группа В6.Сg-Tg ЕТ), моделирующих БП, и 11 самцов дикого типа (группа С57BL ЕТ), у которых гена *SNCA* с мутацией А53Т обнаружено не было. Кроме того, по результатам генотипирования было выявлено, что из потомков, полученных путем естественного спаривания, т.е. без применения репродуктивных технологий, 11 самцов являются мышами линии В6.Сg-Tg (группа В6.Сg-Tg СТL), а 17 самцов представляют дикого типа (группа С57BL СТL). Все животные, полученные после естественного спаривания, а также 10 самцов из группы С57BL ЕТ и 8 самцов из группы В6.Сg-Tg ЕТ были протестированы в тесте “Приподнятый крестообразный лабиринт” (рис. 1). Для исследования мозга были взяты все животные обеих линий, полученные с применением репродуктивных технологий (группы С57BL ЕТ и В6.Сg-Tg ЕТ), а также 8 из 11 самцов группы В6.Сg-Tg СТL и 6 из 17 самцов дикого типа – группа С57BL СТL (рис. 1).

Данные по тесту “Приподнятый крестообразный лабиринт” представлены в табл. 1. Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA выявил значимое влияние фактора “линия” на время, проведенное самцами в разных отделах лабиринта: центральном отсеке [$F(1,42) = 14.26, p < 0.001$], закрытых [$F(1,42) = 14.55, p < 0.001$] и открытых [$F(1,42) = 32.98, p < 0.001$] рукавах. Кроме того, двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA выявил значимое влияние фактора “линия” на число [$F(1,42) = 28.73, p < 0.001$] и общее время [$F(1,42) = 43.03, p < 0.001$] выглядываний, а также на число [$F(1,42) = 20.99, p < 0.001$] и общее время [$F(1,42) = 17.55, p < 0.001$] вытягиваний тела. Апостериорное сравнение подтвердило различия по этим параметрам между группами. Самцы группы В6.Сg-Tg ЕТ проводили меньше времени в закрытых рукавах по сравнению с самцами групп В6.Сg-Tg СТL ($p < 0.05$) и С57BL ЕТ ($p < 0.001$). Кроме того, самцы группы В6.Сg-Tg ЕТ проводили меньше времени в центре платформы ($p < 0.05$), чем самцы группы С57BL ЕТ. Также самцы группы В6.Сg-Tg СТL проводили меньше времени в центре платформы ($p < 0.05$), чем самцы группы С57BL СТL. Самцы группы В6.Сg-Tg ЕТ проводили больше времени в открытых рукавах по сравнению с самцами групп В6.Сg-Tg СТL ($p < 0.05$) и С57BL ЕТ ($p < 0.001$). Также самцы группы В6.Сg-Tg СТL проводили больше времени в открытых рукавах ($p < 0.05$), чем самцы группы С57BL СТL. Самцы группы В6.Сg-Tg ЕТ выглядывали чаще ($p < 0.001$) с более продолжительным временем выглядывания ($p < 0.05$) по сравнению с самцами группы С57BL ЕТ. Также самцы В6.Сg-Tg СТL выглядывали чаще ($p < 0.001$) с более продолжительным временем выглядывания ($p < 0.05$) по сравнению с группой С57BL СТL. Самцы С57BL ЕТ чаще вытягивали свое тело ($p < 0.05$), чем самцы группы С57BL СТL. Однако самцы группы В6.Сg-Tg ЕТ реже вытягивали свое тело ($p < 0.05$) с меньшей продолжительностью вытягивания ($p < 0.05$) по сравнению с самцами группы С57BL ЕТ. Также самцы В6.Сg-Tg СТL реже вытягивали свое тело ($p < 0.05$) с меньшей продолжительностью вытягивания ($p < 0.05$), чем самцы группы С57BL СТL.

Данные по индексу тревожности в тесте “Приподнятый крестообразный лабиринт” представлены в табл. 1. Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA выявил значимое влияние факторов “линия” [$F(1,42) = 32.98, p < 0.001$] и “способ размножения” [$F(1,42) = 6.20, p < 0.05$] на индекс тревожности. Апостериорное сравнение подтвердило различия по этому параметру между группами. У самцов группы В6.Сg-Tg СТL индекс тревожности был достоверно ниже ($p < 0.05$), чем у самцов группы С57BL СТL. У самцов группы В6.Сg-Tg ЕТ индекс тревожности был ниже по сравнению с самцами групп В6.Сg-Tg СТL ($p < 0.05$) и С57BL ЕТ ($p < 0.001$).

Данные по массе тела и массе мозга, а также их соотношения у взрослых потомков представлены на рис. 2. Двухфакторный дисперсионный анализ выявил значимое влияние “линия” на массу мозга [$F(1,28) = 9.096, p < 0.001$] и на соотношение масса мозга/масса тела [$F(1,28) = 8.920, p < 0.001$], но не выявил влияние на массу тела у сам-

цов мышей. Апостериорное сравнение подтвердило значительную разницу по массе мозга и соотношению масс мозг/тело между группами. Масса мозга самцов из группы B6.Cg-Tg CTL была достоверно больше ($p < 0.05$) по сравнению с самцами групп C57BL CTL и B6.Cg-Tg ET. Соотношение масс мозг/тело самцов из группы B6.Cg-Tg ET было достоверно больше ($p < 0.05$) по сравнению с самцами группы C57BL ET.

Таблица 1. Поведение в тесте “Приподнятый крестообразный лабиринт” потомков мышей, полученных с применением и без применения репродуктивных технологий

Параметр	Группа			
	C57BL CTL (n = 17)	C57BL ET (n = 10)	B6.Cg-Tg CTL (n = 11)	B6.Cg-Tg ET (n = 8)
Пройденный путь, см	1397.0 ± 95.6	1218.4 ± 90.8	1370.9 ± 142.2	1590.6 ± 212.1
Время в закрытых рукавах, % от общего	70.0 ± 3.2	69.7 ± 5.1	58.0 ± 6.8	41.0 ± 6.7 ^{###,+}
Время в центре, % от общего	16.5 ± 1.4	13.4 ± 1.8	9.9 ± 1.8*	7.3 ± 1.0 [#]
Время в открытых рукавах, % от общего	13.5 ± 2.1	17.0 ± 3.8	32.1 ± 6.4*	51.7 ± 6.9 ^{###,+}
Число выглядываний	13.8 ± 2.3	16.3 ± 3.0	41.0 ± 8.7 ^{***}	43.6 ± 4.1 ^{###}
Общее время выглядывания, с	8.1 ± 1.3	14.8 ± 3.5	33.1 ± 8.5*	36.2 ± 4.4 [#]
Число вытягиваний	2.5 ± 0.7	10.1 ± 2.0*	4.5 ± 1.0*	2.5 ± 0.7 ^{##}
Общее время вытягиваний, с	9.1 ± 1.6	8.9 ± 2.2	2.6 ± 0.6*	1.8 ± 0.6 [#]
Индекс тревожности	0.86 ± 0.02	0.83 ± 0.04	0.68 ± 0.06*	0.48 ± 0.07 ^{###,+}

Примечания. * – $p < 0.05$ по сравнению с группой C57BL CTL, *** – $p < 0.001$ по сравнению с группой C57BL CTL, # – $p < 0.05$ по сравнению с группой C57BL ET, ### – $p < 0.001$ по сравнению с группой C57BL ET, + – $p < 0.05$ по сравнению с группой B6.Cg-Tg CTL.

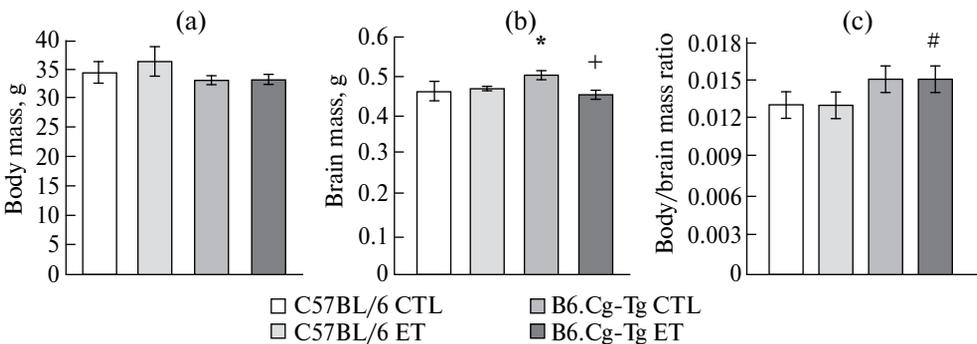


Рис. 2. Масса тела и мозга потомков, полученных с применением и без применения репродуктивных технологий. * – $p < 0.05$ по сравнению с группой C57BL CTL, # – $p < 0.05$ по сравнению с группой C57BL ET, + – $p < 0.05$ по сравнению с группой B6.Cg-Tg CTL.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании мы показали, что мыши В6.Сg-Тg в возрасте шести месяцев имеют сниженный уровень тревожности по сравнению с мышами дикого типа С57BL/6, что согласуется с результатами ранее выполненной работы по исследованию этой трансгенной модели БП [14]. При этом нами обнаружено, что масса мозга мышей В6.Сg-Тg, полученных без применения репродуктивных технологий, больше по сравнению с контрольными мышами дикого типа С57BL/6. Масса мозга является важной характеристикой линии и детерминирована генетически [26], но также определяется условиями развития отдельной особи [38]. Наше дальнейшее исследование было направлено на выяснение того, как эти характеристики развития ЦНС у потомков могут быть изменены под влиянием процедур ВРТ.

Исследования, проведенные ранее на мышах разных линий, показали, что применение процедур ВРТ, таких как ЭКО, культивирование эмбрионов *in vitro* и эмбриотрансфер, могут сопровождаться изменением уровня тревожности у потомков, причем на характер и выраженность эффекта влияют такие факторы, как генетические характеристики мышей, отдел репродуктивного тракта самки-реципиента, в который производят подсадку эмбрионов после их культивирования *in vitro*, диета рожденных потомков, а также их возраст [21–24, 26, 39]. Между тем в нашей работе впервые показано влияние процедур ВРТ на поведение потомков с использованием мышей, генетически предрасположенных к нейродегенеративной патологии. Следует отметить, что в нашей работе снижение тревожности при применении ВРТ имело место только у потомков линии В6.Сg-Тg, моделирующих БП, но отсутствовало у мышей дикого типа С57BL.

В нашей работе у потомков линии В6.Сg-Тg, полученных после культивирования *in vitro* и эмбриотрансфера, наряду со снижением индекса тревожности было обнаружено уменьшение массы мозга по сравнению с мышами В6.Сg-Тg, полученными без применения ВРТ. На мышах дикого типа С57BL/6 применение процедур культивирования эмбрионов *in vitro* и эмбриотрансфера, напротив, не сопровождалось изменением массы мозга и индекса тревожности. Масса тела не различалась у потомков В6.Сg-Тg и дикого типа С57BL/6, рожденных как с применением, так и без применения репродуктивных технологий. Рождение детей со сниженной массой тела является одним из наиболее частых осложнений при применении ВРТ в медицине, но эти различия с возрастом нивелируются [40–42]. Следует, однако, отметить, что клинические данные сложно анализировать и сравнивать с полученными нами в работе на мышах как в связи с применением различных протоколов в клиниках, так и из-за отсутствия адекватной контрольной группы [16, 20]. В экспериментах на мышах после применения ВРТ масса тела потомков либо не отличалась по сравнению с естественно зачатыми животными [21], либо изменялась [25, 43], но массу мозга взрослых потомков при этом не анализировали. Такой анализ был проведен лишь в одной работе на мышах С57BL/6J, в которой не было обнаружено различий массы мозга потомков, полученных с помощью разных комбинаций ВРТ, хотя в этом исследовании отсутствовала контрольная группа потомков, рожденных без применения ВРТ [31].

Причиной изменения массы мозга плода могут быть структурные и функциональные изменения плаценты в ходе пренатального развития [44, 45]. Такого рода изменения плаценты могут возникать в том числе после применения ВРТ [46–48]. Было показано, что у зародышей мышей, полученных с применением ВРТ, соотношение массы плода и плаценты снижено в течение всего периода пренатального развития [46, 48]. Это может быть связано с эпигенетическими модификациями в ходе манипуляций *in vitro*, а также с изменением экспрессии различных генов [47, 49, 50]. Такого рода изменения пренатального развития могут отразиться в дальнейшем на постнатальном онтогенезе, в том числе могут сопровождаться снижением уровня нейротрофических факторов мозга у потомков, полученных из этих эмбрионов [26].

Снижение нейротропного фактора мозга (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) у мышей приводит к уменьшению массы мозга и различным поведенческим отклонениям [51]. Вальдман с соавт. [52] изучали межлинейные различия по восстановлению уровня BDNF после стрессового воздействия на разных линиях мышей, причем мыши C57BL/6 характеризовались быстрым восстановлением данного нейротрофина в структурах головного мозга.

Наблюдаемые нами эффекты изменения уровня тревожности и массы мозга у потомков, полученных с применением ВРТ, были обнаружены лишь на мышах B6.Cg-Tg, что может быть обусловлено мутацией A53T в гене *SNCA*, имеющейся у мышей этой линии. На культуре глиальных и PC12 клеточных линий было показано, что сверхэкспрессия альфа-синуклеина, а также образование его мутантных форм (A30P и A53T) могут приводить к снижению синтеза BDNF [53, 54]. Можно предположить, что у потомков B6.Cg-Tg, полученных после применения ВРТ, может иметь место снижение уровней нейротрофических факторов мозга, что и приводит к снижению массы мозга и изменению поведения.

Культивирование *in vitro* преимплантационных эмбрионов широко применяют в циклах ВРТ на человеке [16, 41] и на различных лабораторных животных [18]. Влияние этой и других процедур ВРТ на здоровье потомства, в том числе на частоту и характер проявления неврологических заболеваний человека, до сих пор активно обсуждают в медицинской литературе [16, 55–59]. Экспериментальных исследований влияния ВРТ на потомков на лабораторных моделях неврологических заболеваний немного [32, 60]. Недавно нами было показано, что для потомков мышей линии B6.Cg-Tg, моделирующих БП, полученных в результате культивирования *in vitro* ранних эмбрионов и их последующей трансплантации самкам-реципиентам, происходит усиление симптомов, характерных для этой нейродегенеративной патологии, а именно еще более выраженное возрастание накопления альфа-синуклеина в nigrostriарной системе головного мозга [32]. Настоящее исследование показывает, что при этом также наблюдается снижение индекса тревожности и уменьшение массы мозга. Результаты данного исследования, как и прошлой работы [32], указывают на то, что признаки, характерные для этой модели болезни Паркинсона, меняются существенным образом при применении репродуктивных технологий, что может иметь трансляционное значение для медицины.

Следует особо подчеркнуть, что в нашей работе культивирование *in vitro* эмбрионов проводили со стадии дробления до достижения стадии бластоцисты. В исследовании Vrooman с соавт. было показано, что даже относительно короткое по времени культивирование эмбрионов мышей со стадии морулы до бластоцисты перед эмбриотрансфером приводит к существенному изменению пренатального развития и снижению соотношения массы плода и плаценты [48]. Наши данные подтверждают и расширяют выводы Vrooman с соавт. и демонстрируют, что такого рода культивирование эмбрионов *in vitro* до стадии бластоцисты могут приводить к существенным изменениям у потомков, затрагивающим их поведение и массу мозга [48]. Это имеет прямое отношение к применению репродуктивных технологий в медицине, поскольку современным трендом является длительное культивирование *in vitro* эмбрионов человека до стадии бластоцисты перед их эмбриотрансфером [16, 41].

БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП “Центр генетических ресурсов лабораторных животных” Института цитологии и генетики СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62119X0023). Микроскопические работы выполнены в ЦКП “Микроскопического анализа биологических объектов” Института цитологии и генетики СО РАН.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (С. Я. А., И. Н. Р., Е. Ю. Б., В. А. Н.), применение репродуктивных технологий и проведение поведенческих экспериментов (И. Н. Р., Т. А. Р., В. С. К., Н. А. Ш., С. Г. А., С. В. О.), обработка результатов (Т. Н. И., Е. Ю. Б., Т. А. Р., С. Я. А.), написание и редактирование рукописи (С. Я. А., В. А. Н., И. Н. Р., В. С. К., Е. Ю. Б.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа финансировалась за счет средств бюджета Российского научного фонда № 23-25-00123. Содержание животных осуществляли за счет бюджетного проекта Института цитологии и генетики СО РАН (FWNR-2022-0023).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все экспериментальные процедуры и обращение с лабораторными животными соответствовали Директиве ЕС 2010/63/EU об экспериментах на животных (ETS № 123) и были одобрены Комитетом по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 145 от 29.03.2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *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.
2. *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)
3. *Tanner CM, Ostrom JL* (2024) Parkinson's disease. *N Engl J Med* 391: 442–452.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra2401857>
4. *Торган ТИ, Байдина ТВ* (2012) Немоторные симптомы болезни Паркинсона. Саратовск научно-мед журн 8: 535–538. [*Torgan TI, Baidina TV* (2012) Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Saratov J Med Sci Res* 8: 535–538. (In Russ)].
5. *Мугинова РЧ, Белодурина АД* (2019) Изменение в серотонинергической системе как начальное проявление болезни Паркинсона. Вестн совета молод ученых и специалист Челябинск обл 1: 37–42. [*Muginova RC, Belodurina AD* (2019) The change in the serotoninergic system as an initial manifestation of Parkinson's disease. *Bull Council Young Scientists and Specialists Chelyabinsk Region* 1: 37–42. (In Russ)].
6. *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>
7. *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>
8. *Zhang Y, Wu Q, Zhang L, Wang Q, Yang Z, Liu J, Feng L* (2019) Caffeic acid reduces A53T α -synuclein by activating JNK/Bcl-2-mediated autophagy in vitro and improves behaviour and protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *Pharmacol Res* 150: 104538.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104538>
9. *Park HJ, Zhao TT, Kim SH, Lee CK, Hwang BY, Lee KE, Lee MK* (2020) Ethanol extract from *Gynostemma pentaphyllum* ameliorates dopaminergic neuronal cell death in transgenic mice expressing mutant A53T human alpha-synuclein. *Neural Regen Res* 15: 361–368.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.265557>
<https://www.jax.org/strain/006823>

10. 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>
11. 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>
12. 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>
13. 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>
14. Ahmadi H, Aghebati-Maleki L, Rashidani S, Csabai T, Nnaemeka OB, Szekeres-Bartho J (2023) Long-Term Effects of ART on the Health of the Offspring. *Int J Mol Sci* 24: 13564.
<https://doi.org/10.3390/ijms241713564>
15. 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>
16. 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>
17. Beilby KH, Kneebone E, Roseboom TJ, van Marrewijk IM, Thompson JG, Norman RJ, Robker RL, Mol BWJ, Wang R (2023) Offspring physiology following the use of IVM, IVF and ICSI: A systematic review and meta-analysis of animal studies. *Hum Reprod Update* 29: 272–290.
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmac043>
https://www.eshre.eu/ESHRE_ARTFactSheet_Nov_2023
18. Graham ME, Jelin A, Hoon AH Jr, Wilms Floet AM, Levey E, Graham EM (2023) Assisted reproductive technology: Short- and long-term outcomes. *Dev Med Child Neurol* 65: 38–49.
<https://doi.org/10.1111/dmcn.15332>
19. 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>
20. 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>
21. 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>
22. 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>
23. 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.
24. 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>
25. Roth G, Dicke U (2005) Evolution of the brain and intelligence. *Trends Cogn Sci* 9: 250–257.
<https://doi.org/10.1016/j.tics.2005.03.005>

26. *Roderick TH, Wimer RE, Wimer CC, Schwartzkroin PA* (1973) Genetic and phenotypic variation in weight of brain and spinal cord between inbred strains of mice. *Brain Res* 64: 345–353. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(73\)90188-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(73)90188-1)
27. *Marhounova L, Kotrschal A, Kverkova K, Kolm N, Nemeč P* (2019) Artificial selection on brain size leads to matching changes in overall number of neurons. *Evolution* 73: 2003–2012. <https://doi.org/10.1111/evo.13805>
28. *Olkowicz S, Kocourek M, Lucan RK, Portes M, Fitch WT, Herculano-Houzel S, Nemeč P* (2016) Birds have primate-like numbers of neurons in the forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 7255–7260. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517131113>
29. *Le F, Lou HY, Wang QJ, Wang N, Wang LY, Li LJ, Yang XY, Zhan QT, Lou YY, Jin F* (2019) Increased hepatic INSIG-SCAP-SREBP expression is associated with cholesterol metabolism disorder in assisted reproductive technology-conceived aged mice. *Reprod Toxicol* 84: 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.12.003>
30. *Козенева ВС, Рожкова ИИ, Брусенцев ЕЮ, Рахманова ТА, Шавшаева НА, Афанасова СГ, Лебедева ДА, Окотруб СВ, Игонина ТН, Амстиславский СЯ* (2024) Репродуктивные технологии и болезнь Паркинсона: экспериментальное исследование черной субстанции мозга и моторных функций на мышах C57BL/6 И B6.Cg-Tg. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 110. [*Kozeneva VS, Rozhkova IN, Brusentsev EYu, Rakhmanova TA, Shavshaeva NA, Afanasyova SG, Lebedeva DA, Okotrub SV, Igonina TN, Amstislavsky SYA* (2024) 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. *Russ J Physiol* 110. (In Russ)].
31. *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>
32. *Amstislavsky S, Okotrub S, Rozhkova I, Rakhmanova T, Igonina T, Brusentsev E, Kozeneva V, Lebedeva D, Omelchenko A, Okotrub K* (2024) Program freezing of diapausing embryos in the mouse. *Theriogenology* 217: 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.01.006>
33. *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>
34. *Khoitskin NV, Plyusnina AV, Kulikova EA, Bazhenova EY, Fursenko DV, Sorokin IE, Kolotygin I, Mormede P, Terenina EE, Shevelev OB, Kulikov AV* (2019) On association of the lethal yellow (AY) mutation in the agouti gene with the alterations in mouse brain and behavior. *Behav Brain Res* 359: 446–456. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.11.013>
35. *Lee B, Sur B, Cho SG, Yeom M, Shim I, Lee H, Hahm DH* (2015) 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>
36. *Williams RW* (2000) Mapping genes that modulate mouse brain development: A quantitative genetic approach. *Results Probl Cell Differ* 30: 21–49. https://doi.org/10.1007/978-3-540-48002-0_2
37. *Strata F, Giritharan G, Sebastiano FD, Piane LD, Kao CN, Donjacour A, Rinaudo P* (2015) Behavior and brain gene expression changes in mice exposed to preimplantation and prenatal stress. *Reprod Sci* 22: 23–30. <https://doi.org/10.1177/1933719114557900>
38. *Davies MJ, Rumbold AR, Moore VM* (2018) Assisted reproductive technologies: A hierarchy of risks for conception, pregnancy outcomes and treatment decisions. *J Dev Orig Health Dis* 9: 241–246. <https://doi.org/10.1017/S2040174417000757>
39. *Reig A, Seli E* (2019) The association between assisted reproductive technologies and low birth weight. *Curr Opin Obstet Gynecol* 31: 183–187. <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000535>
40. *Faa G, Manchia M, Fanos V* (2024) Assisted Reproductive Technologies: A new player in the foetal programming of childhood and adult diseases? *Pediatr Rep* 16: 329–338. <https://doi.org/10.3390/pediatric16020029>

41. Qin N, Zhou Z, Zhao W, Zou K, Shi W, Yu C, Liu X, Dong Z, Mao Y, Liu X, Sheng J, Ding G, Wu Y, Huang H (2021) Abnormal glucose metabolism in male mice offspring conceived by in vitro fertilization and frozen-thawed embryo transfer. *Front Cell Dev Biol* 9: 637781. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.637781>
42. Lopez-Tello J, Sferruzzi-Perri AN (2023) Characterization of placental endocrine function and fetal brain development in a mouse model of small for gestational age. *Front Endocrinol (Lausanne)* 14: 1116770. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1116770>
43. Powell TL, Barentsen K, Vaughan O, Uhlson C, Zemski Berry K, Erickson K, Faer K, Chassen SS, Jansson T (2023) Knockdown of placental major facilitator superfamily domain containing 2a in pregnant mice reduces fetal brain growth and phospholipid docosahexaenoic acid content. *Nutrients* 15: 4956. <https://doi.org/10.3390/nu15234956>
44. Bloise E, Feuer SK, Rinaudo PF (2014) Comparative intrauterine development and placental function of ART concepti: Implications for human reproductive medicine and animal breeding. *Hum Reprod Update* 20: 822–839. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmu032>
45. Manna C, Lacconi V, Rizzo G, De Lorenzo A, Massimiani M (2022) Placental Dysfunction in Assisted Reproductive Pregnancies: Perinatal, Neonatal and Adult Life Outcomes. *Int J Mol Sci* 23: 659. <https://doi.org/10.3390/ijms23020659>
46. Vrooman LA, Rhon-Calderon EA, Suri KV, Dahiya AK, Lan Y, Schultz RM, Bartolomei MS (2022) Placental abnormalities are associated with specific windows of embryo culture in a mouse model. *Front Cell Dev Biol* 10: 884088. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.884088>
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. Kleijkers SH, Eijssen LM, Coonen E, Derhaag JG, Mantikou E, Jonker MJ, Mastenbroek S, Reping 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>
49. Voigt MW, Schepers J, Haas J, von Bohlen Und Halbach O (2024) Reduced levels of brain-derived neurotrophic factor affect body weight, brain weight and behavior. *Biology (Basel)* 13: 159. <https://doi.org/10.3390/biology13030159>
50. Вальдман ЕА, Мелкумян ДС, Середенина ТС, Яркова МА, Середенин СБ (2005) Изменения уровня BDNF в структурах головного мозга мышей C57BL/6 и BALB/c при стрессовых воздействиях. *Психофармакол и биол наркол* 5: 974–978. [Waldman EA, Melkumyan DS, Seredenina TS, Yarkova MA, Seredenin SB (2005) Changes in BDNF levels in the brain structures of C57BL/6 and BALB/c mice under stressful influences. *Psychopharmacol and Biol Narcol* 5: 974–978. (In Russ)].
51. Kohno R, Sawada H, Kawamoto Y, Uemura K, Shibasaki H, Shimohama S (2004) BDNF is induced by wild-type alpha-synuclein but not by the two mutants, A30P or A53T, in glioma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 318: 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.04.012>
52. Yuan Y, Sun J, Zhao M, Hu J, Wang X, Du G, Chen NH (2010) Overexpression of alpha-synuclein down-regulates BDNF expression. *Cell Mol Neurobiol* 30: 939–946. <https://doi.org/10.1007/s10571-010-9523-y>
53. 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>
54. 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>
55. Andreadou MT, Katsaras GN, Talimtzis 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>

56. 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>
57. 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>
58. Рожкова ИИ, Окотруб СВ, Брусенцев ЕЮ, Игонина ТН, Рахманова ТА, Лебедева ДА, Яцук ТА, Козенева ВС, Напримеров ВА, Амстиславский СЯ (2023) Эффекты вспомогательных репродуктивных технологий на социальное поведение мышей линии BTBR – модели расстройств аутистического спектра. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 109: 315–333. [Rozhkova IN, Okotrub SV, Brusentsev EY, Igonina TN, Rakhmanova TA, Lebedeva DA, Yatsuk TA, Kozeneva VS, Naprimerov VA, Amstislavsky SYa (2023) Effects of assisted reproductive technologies on social behavior of BTBR mice, a model of autism spectrum disorders. *J Evol Biochem Phys* 59: 458–472. (In Russ)]. <https://doi.org/10.1134/S0022093023020138>

Effects of Assisted Reproductive Technologies on the Behavior and Brain Development in the Mouse Model of Parkinson's Disease

I. N. Rozhkova^a, V. S. Kozeneva^{a, b}, E. Yu. Brusentsev^a, T. A. Rakhmanova^{a, b},
N. A. Shavshaeva^{a, b}, S. G. Afanasova^{a, b}, T. N. Igonina^a, S. V. Okotrub^a,
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

This study investigated the long-term effects of assisted reproductive technologies (ART), i.e. *in vitro* embryo culture and embryo transfer, on behavior and brain development in B6.Cg-Tg mice, a model of Parkinson's disease (PD), and wild-type C57BL/6 mice. Male offspring obtained using ART were compared with naturally conceived offspring. At six months of age, mice were assessed for anxiety in the elevated plus maze test; body and brain weights were measured as well. The results of the study demonstrated that naturally conceived B6.Cg-Tg mice exhibited lower anxiety levels and larger brain weights compared to wild-type mice. Using ART resulted in a decreased brain weight in B6.Cg-Tg offspring, as well as significantly decreased anxiety levels compared to the control groups. In wild-type C57BL/6 mice, ART did not cause significant changes in brain weight or anxiety levels. The results demonstrate effects of ART on behavior and brain development in offspring, particularly in those genetically predisposed to neurodegenerative diseases. These results demonstrate that further studies of the long-term effects of ART are warrant, particularly in the context of its impact on neurodevelopment and behavior, which has important medical implications.

Keywords: Parkinson's disease, transgenic mice, preimplantation embryos, *in vitro* culture, embryo transfer, long-term effects