

На правах рукописи

РАГАЕВА ДИАНА СЕРГЕЕВНА

**ВЛИЯНИЕ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ
ТЕХНОЛОГИЙ НА ПОСТНАТАЛЬНЫЙ ОНТОГЕНЕЗ
ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС ЛИНИИ НИСАГ**

03.03.01 – Физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск, 2021

Работа выполнена в секторе криоконсервации и репродуктивных технологий Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН (г. Новосибирск).

Научный руководитель – Сергей Яковлевич Амтиславский, д-р биол. наук, заведующий сектором криоконсервации и репродуктивных технологий ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (г. Новосибирск).

Официальные оппоненты:

Ольга Павловна Черкасова, д-р биол. наук, заведующая лабораторией лазерной биофизики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института лазерной физики СО РАН (г. Новосибирск);

Татьяна Ивановна Кузьмина, д-р биол. наук, заведующая лабораторией биологии развития Всероссийского научно-исследовательского института генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста» (ВНИИГРЖ, г. Санкт-Петербург- Пушкин).

Ведущая организация – научно-исследовательский институт кардиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН».

Защита диссертации состоится ____ _____ 2021 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.014.02 при ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины» по адресу: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4. Адреса для корреспонденции: 630117, г. Новосибирск, а/я 237; тел. (383)335-98-01, факс (383) 335-97-54, эл. почта: dissovvet@physiol.ru/.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИНМ и на сайте <http://www.physiol.ru/>.

Автореферат разослан ____ _____ 2021 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
д-р биол. наук

В.Н. Мельников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Разработка вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) привела на сегодняшний день к рождению более 8 миллионов детей (De Mouzon et al., 2020). ВРТ включают в себя любые манипуляции с гаметам и/или эмбрионами с целью реализации репродуктивной функции и широко применяются в медицине. Однако, применение ВРТ может быть ассоциировано с повышением рисков развития неблагоприятных перинатальных исходов (Sunkara et al., 2019). Являются ли такие эффекты следствием бесплодия родителей, и они обусловлены генетическими факторами, или же опосредованы влиянием ВРТ остается дискуссионным вопросом. Моделирование ВРТ на лабораторных животных является уникальным инструментом для выявления причины эффектов. В современном мире супружеские пары все чаще откладывают рождение детей на поздний репродуктивный период (Gleicher et al., 2014). С возрастом частота проявлений хронических заболеваний, таких как, например, гипертоническая болезнь (ГБ), возрастает. ГБ является полигенным мультифакторным заболеванием человека и главным фактором риска развития ишемической болезни сердца (ИБС) и инсульта (Карпов, 2016).

Линия крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией (НИСАГ) была выведена с целью исследования связи генетических факторов и таких факторов окружающей среды, как эмоциональный стресс, на развитие гипертензии (Markel et al., 1992). На крысах линии НИСАГ ранее проводились эксперименты, в которых было показано замедление развития артериальной гипертензии (АГ) и ее смягчение при переносе эмбрионов от гипертензивной линии реципиенту с нормальным артериальным давлением (АД) (Амстиславский, 2006). Однако, отдаленные эффекты культивирования эмбрионов до сих пор на генетических моделях гипертензии исследованы не были.

Цель исследования: изучить влияние культивирования эмбрионов *in vitro* и эмбриотрансфера на физиологические и поведенческие признаки

потомков гипертензивных крыс линии НИСАГ с наследственной стресс-индуцированной артериальной гипертензией.

Задачи исследования:

1. Исследовать динамику артериального давления в течение беременности и ранний постнатальный период развития у интактных гипертензивных крыс линии НИСАГ.
2. Разработать технологию получения живого потомства гипертензивных крыс линии НИСАГ в результате культивирования *in vitro* эмбрионов и их последующего эмбриотрансфера;
3. Провести сравнительный анализ раннего постнатального развития, величин АД, поведения и когнитивных функций, а также плотности нейронов в головном мозге у крыс НИСАГ, рожденных после применения ВРТ.

Научная новизна

- Впервые была исследована динамика АД во время беременности у крыс НИСАГ, при этом было обнаружено снижение систолического АД (сАД) ближе к окончанию срока беременности.
- Впервые было исследовано созревание неонатальных рефлексов и динамика массы тела в раннем постнатальном онтогенезе: было обнаружено отставание в формировании рефлекса переворота и опережение в формировании реакции избегания края у крыс НИСАГ по сравнению с WAG; масса тела новорожденных крысят НИСАГ и на протяжении всего периода вскармливания была снижена по сравнению с WAG; но по достижении возраста трех месяцев их масса тела превышала таковую у WAG.
- Впервые было получено живое потомство крыс линии НИСАГ после культивирования эмбрионов *in vitro* и последующего эмбриотрансфера и исследовано влияние этих процедур на физиологические и поведенческие признаки потомков. После переноса эмбрионов суррогатной матери независимо от наличия или отсутствия культивирования у потомков наблюдалась увеличенная масса тела в раннем постнатальном онтогенезе по сравнению с потомками, воспитанными биологической матерью; при этом по достижении потомками зрелости, масса тела не

отличалась между группами; формирование неонатальных рефлексов и реакций было модифицировано незначительно; локомоторная и исследовательская активность потомков, воспитанных суррогатной матерью, была снижена.

- Были получены данные по плотности нейронов в гиппокампе и префронтальной коре: плотность нейронов в коре не отличалась между группами потомков; плотность нейронов в областях СА2 и DG гиппокампа была снижена у крыс, рожденных из культивированных *in vitro* эмбрионов. Уровень нейрогенеза в гиппокампе не отличался между группами крыс.
- Исследовано влияние культивирования эмбрионов на гипертензивный статус потомков: культивирование эмбрионов *in vitro* в течение 24 часов от стадии морулы до стадии бластоцисты достоверно снижало величины сАД у самцов крыс линии НИСАГ в возрасте трех месяцев; эффект сохранялся и в возрасте пяти месяцев: при этом медианная величина сАД у самцов НИСАГ оказалась ниже гипертензивного порога (150 мм рт.ст.).

Теоретическая и практическая значимость исследования

В работе получено новое экспериментально обоснованное знание о вкладе эмбриогенеза и раннего постнатального онтогенеза на формирование гипертензивного фенотипа на примере крыс линии НИСАГ. Выявление феномена снижения систолического АД у крыс, которых на преимплантационной стадии культивировали *in vitro*, создает предпосылки к дальнейшему исследованию механизмов регуляции АД в раннем онтогенезе и может послужить разработке новых подходов к лечению и профилактике развития гипертонической болезни с использованием современных методов ВРТ. Результаты исследования могут быть использованы в лекционных курсах, в частности, они включены в спецкурс «Репродуктивная биология и репродуктивные технологии», который читается для студентов бакалавриата факультета естественных наук Новосибирского государственного университета.

Положения, выносимые на защиту

1. Артериальная гипертензия у крыс линии НИСАГ сохраняется на протяжении гестационного периода, однако в конце беременности наблюдается снижение систолического артериального давления.
2. Культивирование эмбрионов *in vitro* перед эмбриотрансфером приводит к смягчению артериальной гипертензии у крыс линии НИСАГ, что свидетельствует о потенциальной возможности влиять на проявление генетически обусловленной гипертензии путем использования вспомогательных репродуктивных технологий.

Апробация работы

Материалы диссертации обсуждены на конференции специалистов Ассоциации по работе с лабораторными животными Scand-LAS 2015 (г. Турку, Финляндия, 2015), на международном симпозиуме «Современные достижения в популяционной, эволюционной и экологической генетике-2015» (г. Владивосток, 2015), на конференции «Беляевские чтения-2017» (г. Новосибирск, 2017).

Публикации

По теме диссертации опубликовано три научных статьи в рецензируемых зарубежных изданиях и три научных статьи в рецензируемых российских изданиях, а также три тезиса в сборниках трудов конференций.

Структура диссертации

Диссертационная работа состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 102 страницах печатного текста, содержит 18 рисунков и 3 таблицы. Библиографический указатель литературы включает 293 источника, из них 38 отечественных и 255 зарубежных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные и экспериментальные группы

Объектом исследования были гипертензивные крысы линии НИСАГ и нормотензивные - линии WAG. В качестве суррогатных матерей использовались межлинейные F1 гибриды крыс линий SD и ручных крыс-пасюков (Plyusnina, Oskina, 1997). Было поставлено два эксперимента. В первом из них сравнивали крыс линии НИСАГ и WAG, рожденных естественным путем. Во втором эксперименте использовались группы: 1) крысы линии НИСАГ, рожденные в результате эмбриотрансфера полученных *in vivo* эмбрионов (ET); 2) крысы линии НИСАГ, рожденные в результате эмбриотрансфера культивированных *in vitro* эмбрионов (ET-IVC); 3) крысы линии НИСАГ, рожденные естественным путем с сокращенным размером помета (*in vivo*). Исследование было выполнено с использованием ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» на базе SPF-вивария ИЦиГ СО РАН, а также ЦКП «Генофонды лабораторных животных» на базе конвенционального вивария ИЦиГ СО РАН. Все экспериментальные процедуры были одобрены комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН (протокол № 12 от 6 декабря 2012 г.) и соответствуют российским и международным рекомендациям по работе с экспериментальными животными.

Спаривание доноров и получение эмбрионов

На стадии проэструса самок НИСАГ ссаживали с самцами той же линии с проверенной фертильностью. Спаривание подтверждалось на следующее утро по наличию сперматозоидов в вагинальных мазках. Покрытые самки были подвергнуты эвтаназии при помощи ингаляции углекислым газом на 4.5 день *post coitum* (*pc*) с целью получения эмбрионов на стадии дробления, либо на 5 день *pc* с целью получения бластоцист.

Культивирование эмбрионов *in vitro* и эмбриотрансфер

Извлеченные из яйцеводов эмбрионы на стадии дробления/морулы переносили в предварительно подготовленные чашки с каплями среды

mR1EEM и культивировали в CO₂ инкубаторе в условиях: 5% CO₂, 37°C и 80% влажности в течение 24 часов. Развитие эмбрионов оценивали визуально с помощью инвертированного светового микроскопа DM IL LED (Leica Microsystems, Германия) с увеличением 50x и 100x перед переносом в матку реципиента. Хирургическая операция по переносу эмбрионов в матку реципиента осуществлялась по стандартной методике (Igonina et al., 2019). Эмбрионы переносили по 8-10 бластоцист на одного реципиента на 3.5 сутки псевдобеременности.

Исследование раннего постнатального онтогенеза

Для оценки физического развития крысят, проводили еженедельное взвешивание до отсадки от матери (25 день). Для оценки созревания неонатальных рефлексов и реакций ежедневно, начиная с шестого дня жизни, проводили тесты: рефлекс переворота на поверхности, реакция отрицательного геотаксиса, реакция избегания края поверхности и исследование формирования ходьбы.

Измерение артериального давления

Мониторинг АД у взрослых животных в возрасте трех и пяти месяцев, а также у беременных крыс, проводили с использованием системы для неинвазивного многоканального измерения АД CODA™ (Kent Scientific, USA) непрямым методом с использованием хвостовой манжеты без анестезии; для получения истинных значений, сначала проводили адаптационные циклы измерений.

Поведение

Фенотипирование поведения взрослых животных в возрасте трех месяцев проводили с использованием следующих тестов: «открытое поле», «распознавание нового объекта», «приподнятый крестообразный лабиринт». Поведение крыс документировали при помощи сенсорного контроллера Kinect 3-D с видеокамерой с использованием программного обеспечения EthoStudio (Kulikov et al., 2008; Kulikov et al., 2014).

Гистологическое исследование и морфометрический анализ

В качестве исследуемых признаков, на которые могли повлиять процедуры ВРТ на стадии раннего развития эмбрионов и хирургический стресс, испытанный самкой-реципиентом во время эмбриотрансфера, были выбраны плотность нейронов в коре головного мозга и в гиппокампе, а также уровень нейрогенеза в зубчатой извилине гиппокампа. Ранее было показано, что некоторые виды ВРТ, а именно гормональная индукция овуляции, сопровождается изменением плотности нейронов в коре головного мозга мышей (Mainigi et al., 2016). С другой стороны, известно, что при стрессе в раннем пренатальном онтогенезе, гиппокампальный нейрогенез у взрослых животных подавляется (Kogosi и др., 2012; Loi и др., 2014).

Для проведения гистологического исследования головного мозга крысам проводили транскардиальную перфузию, мозг выделяли и фиксировали в фосфатном буфере с 30% сахарозы, погружали в заливочную среду Tissue-Tek O.C.T. compound (Sakura Finetek, США), замораживали и хранили при температуре -70°C . Изготовление криосрезов и окраска в области CA1, CA2, CA3 и зубчатой извилине (DG) гиппокампа, а также префронтальной коры и анализ этих срезов проводили как описано нами ранее (Ragaeva et al., 2017).

Исследование уровня нейрогенеза

Нейрогенез в субгранулярной зоне (СГЗ) гиппокампа исследовали при помощи непрямого иммуногистохимического метода анализа с использованием первичных антител – rabbit polyclonal anti-doublecortin (DCX) antibodies (ab18723, 1:1000 dilution, Abcam, Великобритания) и вторичных антител с флуоресцентными метками AlexaFluor 488 – goat anti-rabbit IgG (ab150077, 1:400 dilution, Abcam, Великобритания), как описано нами ранее (Рожкова и др., 2018).

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку проводили с использованием программного пакета Statistica v.12 (StatSoft Inc., США). Критическое значение уровня значимости при проверке нулевых гипотез принималось равным 0.05.

Для сравнения центральных параметров групп использовали параметрические и непараметрические критерии: t-критерий Стьюдента, U-критерий Манна-Уитни; дисперсионный анализ, в том числе с повторными измерениями, и апостериорным критерием Тьюки для межгруппового сравнения; критерий Краскелла-Уоллиса с апостериорным критерием Данна для межгруппового сравнения. Анализ качественных признаков проводился с использованием критерия согласия χ^2 и точного критерия Фишера. Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения ($M \pm SD$); медианы и квартилей [$Me(Q1-Q3)$] и индивидуальных точек.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Динамика артериального давления в ходе беременности у крыс НИСАГ

Динамика сАД и дАД в ходе беременности и динамика массы тела у крыс НИСАГ и WAG. представлены на рисунке 1. Дисперсионный анализ уровня сАД в ходе беременности у крыс НИСАГ и WAG с учетом повторных измерений выявил достоверные различия, обусловленные влиянием фактора генотипа ($F_{1, 24} = 415.75, p < 0.001$) и фактора «день беременности» ($F_{5, 120} = 6.63, p < 0.001$). Апостериорный критерий Тьюки подтвердил межлинейные различия на каждый день исследуемого периода ($p < 0.001$). (Рис.1, А). Было обнаружено достоверное снижение сАД к окончанию гестационного периода (20-22 дни) по сравнению с Д0 у обеих линий (WAG: $p < 0.05$; НИСАГ: $p < 0.01$). Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями выявил влияние фактора генотипа на величины дАД ($F_{1, 23} = 213.05; p < 0.001$), но не фактора «день беременности» ($F_{5, 115} = 2.1; p = 0.07$). Апостериорный критерий Тьюки выявил межлинейные различия на каждый день исследуемого периода ($p < 0.001$) (Рис. 1, Б). Масса тела у самок НИСАГ была выше, чем у крыс WAG как до (Д0), так и на всем протяжении беременности ($p < 0.001$) (Рис. 1, В).

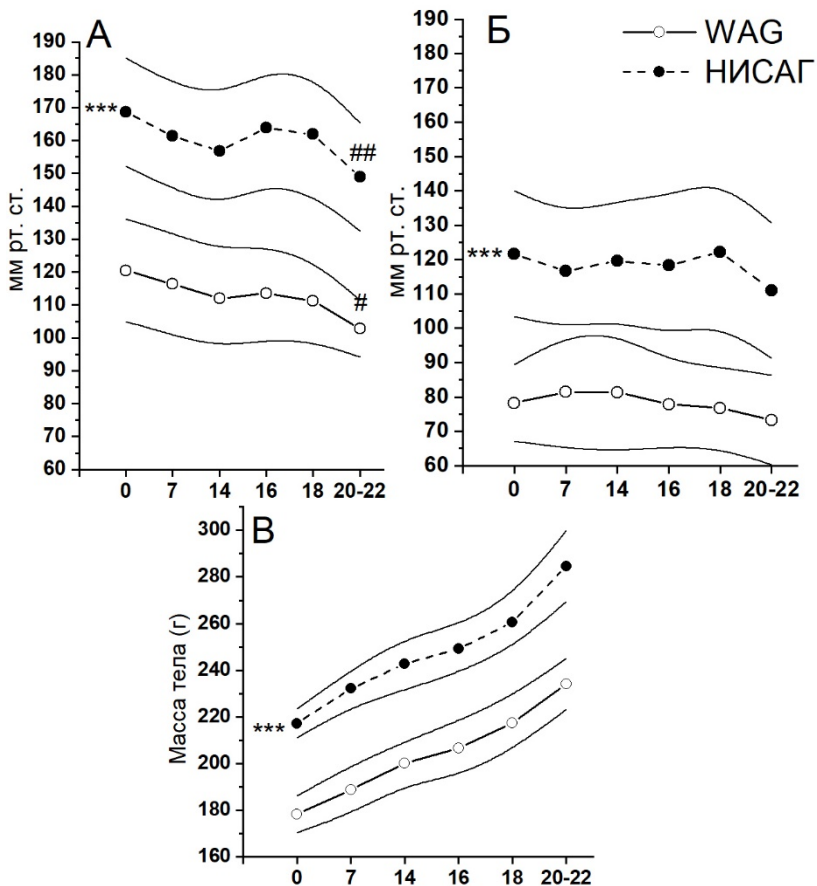


Рисунок 1. Динамика АД и набор массы тела во время беременности у самок крыс НИСАГ и WAG. А, систолическое АД; Б, диастолическое АД; В, масса тела.

*** $p < 0.001$ по сравнению с контролем WAG в каждый из дней исследования.

$p < 0.05$, ## $p < 0.01$ по сравнению с днем 0 внутри одной линии соответственно (А).

Репродуктивные характеристики и ранний постнатальный онтогенез крыс линий НИСАГ и WAG

Репродуктивные параметры у крыс НИСАГ представлены в Таблице 1. Было обнаружено, что размер помета достоверно выше у крыс НИСАГ в сравнении с крысами WAG. Динамика массы тела крыс двух линий в период вскармливания представлена на Рис. 2. Масса тела крыс НИСАГ была снижена в сравнении с WAG, начиная со дня рождения, и в течение всего периода вскармливания. Было показано, что крысы НИСАГ демонстрируют увеличение латентного периода времени выполнения рефлекса переворота в сравнении с WAG на протяжении 7-10 дня после рождения (Рис. 3, А). В то же время, процент крыс НИСАГ, выполняющих реакцию избегания края, был выше, чем у WAG, на 12,13 и 15 дни после рождения (Рис. 3, Б). По формированию реакции отрицательного геотаксиса и становлению ходьбы межлинейных различий обнаружено не было (Рис. 3, В, Г).

Таблица 1. Репродуктивные параметры крыс линий НИСАГ и WAG.

Линия	WAG	НИСАГ
Живорожденные особи (n)	7.8 ± 1.3	13.4 ± 1.8 ***
Мертворожденные особи (%)	1 (2.56 %)	0
Перинатальная смертность (%)	2 (2.63 %)	2 (2.98 %)
Гестационный возраст (дни)	22.0 (22.0 – 22.0)	22.0 (22.0 – 23.0)
Соотношение полов в помете (м/ж)	1.14	0.63

*** $p < 0.001$ по сравнению с WAG

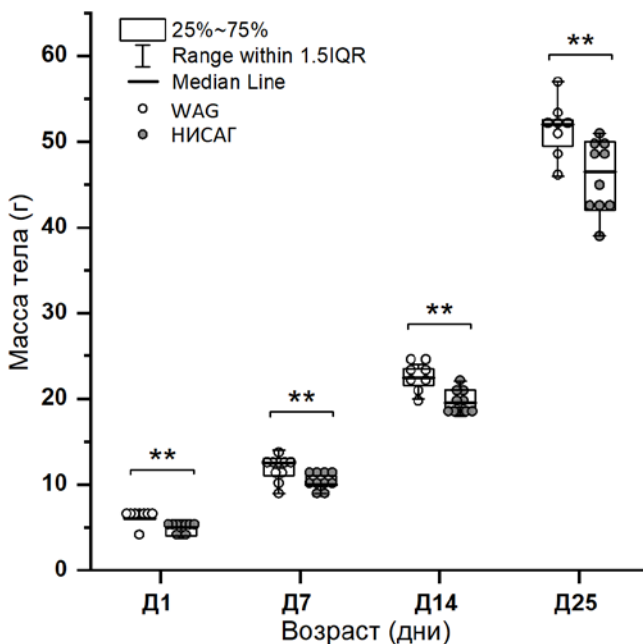


Рисунок 2. Возрастная динамика массы тела у крыс линий НИСАГ и WAG. ** $p < 0.01$

Поведение крыс линий НИСАГ и WAG

Было обнаружено, что как самцы, так и самки крыс линии НИСАГ, проявляют большую исследовательскую и локомоторную активность в тесте открытого поля по сравнению с крысами линии WAG, о чем свидетельствуют повышение доли исследованной области арены ($p < 0.001$), величины пройденного пути ($p < 0.01$), а также повышение частоты и продолжительности вертикальных стоек ($p < 0.001$) (данные не представлены).

Согласно результатам теста приподнятый крестообразный лабиринт как самцы, так и самки, крыс линии НИСАГ менее тревожны по сравнению с крысам WAG того же пола, о чем свидетельствует большее время нахождения в открытых рукавах ($p < 0.001$) и большая частота входов в открытые рукава ($p < 0.01$). Индекс тревожности, как интегральный показатель, также был снижен у крыс НИСАГ ($p < 0.001$) (данные не представлены).

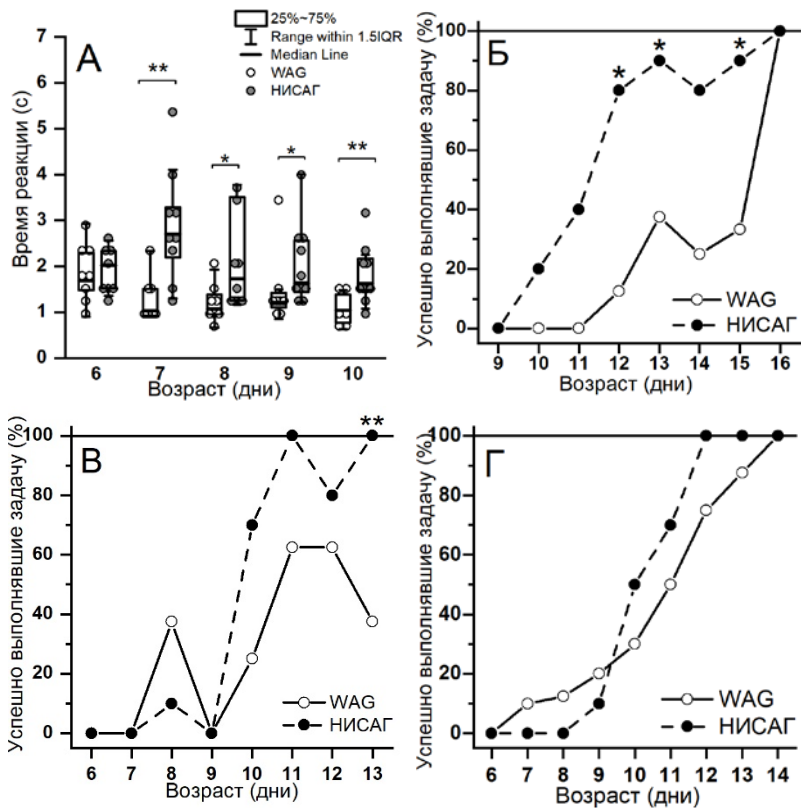


Рисунок 1. Возрастная зависимость неонатальных рефлексов и реакций у крыс линий НИСАГ и WAG.

А – рефлекс переворота на поверхности;

Б – реакция избегания края;

В – формирование ходьбы;

Г – реакция отрицательного геотаксиса.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с WAG в том же возрасте

Влияние ВРТ на репродуктивные исходы у крыс НИСАГ

Результаты экспериментов по эмбриотрансферу представлены в Табл. 2. Продолжительность беременности сравнивалась между всеми тремя группами: фактор «ВРТ» не оказал существенного влияния на данный параметр, согласно однофакторному дисперсионному анализу ($F_{2,13} = 0.3$, $p = 0.71$). В группе ET-IVC наблюдалось несколько случаев перинатальной смертности (16.7 %) (см. Табл. 2), однако достоверных различий по этому показателю обнаружено не было ($p = 0.17$).

Таблица 2. Репродуктивные исходы в группах с культивированием эмбрионов крыс линии НИСАГ и их эмбриотрансфером суррогатным матерям в сравнении с рожденными естественным путем (*in vivo*).

Экспериментальная группа	<i>In vivo</i>	ET	ET-IVC
Число реципиентов	-	6	6
Число перенесенных эмбрионов	-	55	52
Число родивших самок	6	4	5
Длительность беременности, дни	22.0	22.3 ± 1.26	21.8 ± 0.75
Размер выводка (после сокращения)	12.7 ± 1.21 (5.0 ± 1.41)	5.0 ± 1.83	4.8 ± 2.28
Перинатальная смертность, n (%)	0	0	4 (16.7)
Общее число потомков, n (%)	30	20 (36.4)	24 (46.2)

Влияние ВРТ на ранний постнатальный онтогенез крыс НИСАГ

Дисперсионный анализ массы тела потомков в раннем постнатальном онтогенезе выявил достоверные отличия, обусловленные влиянием фактора «ВРТ», на каждый из исследованных дней: Д7 ($H_{2,32} = 15.88$, $p < 0.001$), Д14 ($H_{2,32} = 23.62$, $p < 0.001$) и Д25 ($H_{2,32} = 22.26$, $p < 0.001$) (Рис. 4, А). Уже в возрасте семи дней самцы в группе ET обладали большей массой тела, чем в группе *in vivo* ($p < 0.001$); к концу второй недели у самцов в обеих группах с применением ВРТ масса тела была выше, чем в группе *in vivo* (ET: $p < 0.001$; ET-IVC: $p < 0.05$). На момент достижения потомками возраста 25-ти дней масса тела потомков в группах с использованием ВРТ сохранялась стабильно повышенной по сравнению с группой потомков, выношенных биологическими матерями (ET: $p < 0.001$; ET-IVC: $p < 0.01$).

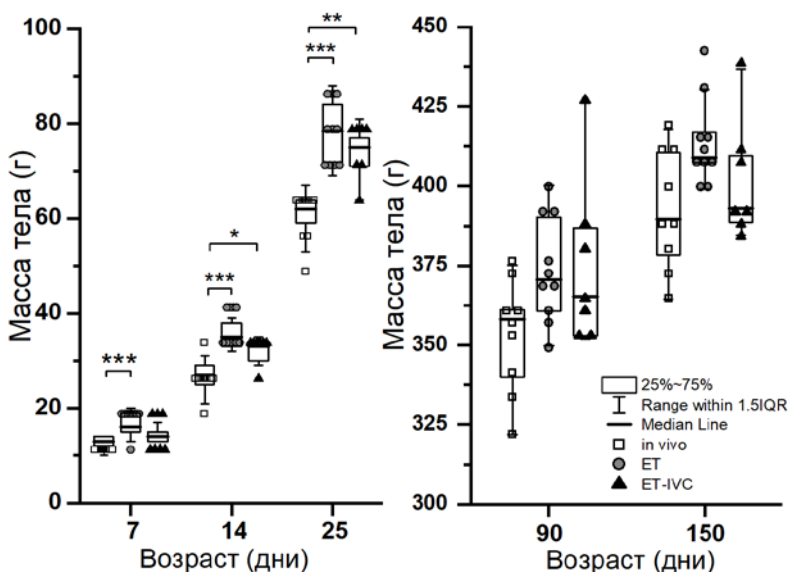


Рисунок 4. Сравнение массы тела самцов крыс НИСАГ, рожденных с использованием ВРТ.

А – ранний постнатальный период (Д7-14-25);

Б – взрослые животные (Д90-150);

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Оценка развития неонатальных рефлексов и реакций у крыс НИСАГ, рожденных с применением ВРТ, показала незначительную модификацию созревания таких навыков, как рефлекс переворачивания на поверхности, реакция отрицательного геотаксиса и реакция избегания края (данные не представлены); были выявлены некоторые межгрупповые отличия в отдельные дни теста, но в целом ранее моторное развитие крысят не отличалось между группами.

Влияние ВРТ на АД крыс НИСАГ

Были выявлены достоверные различия сАД между группами крыс НИСАГ, обусловленные влиянием фактора «ВРТ» ($F_{2,23} = 7.19$, $p = 0.004$), а также фактором возраста ($F_{2,23} = 26.06$, $p < 0.001$). Величины сАД были снижены у крыс НИСАГ, рожденных после переноса культивированных *in vitro* эмбрионов, по сравнению с крысами НИСАГ, рожденными естественным путем ($p < 0.05$), а также по сравнению с крысами НИСАГ, рожденными после эмбриотрансфера ($p < 0.05$) в возрасте как трех, так и пяти месяцев (Рис. 5). Дисперсионный анализ величин дАД у крыс НИСАГ разных групп аналогичного возраста с учетом повторных измерений не выявил различий, обусловленных фактором ВРТ ($F_{2,23} = 2.22$, $p = 0.13$).

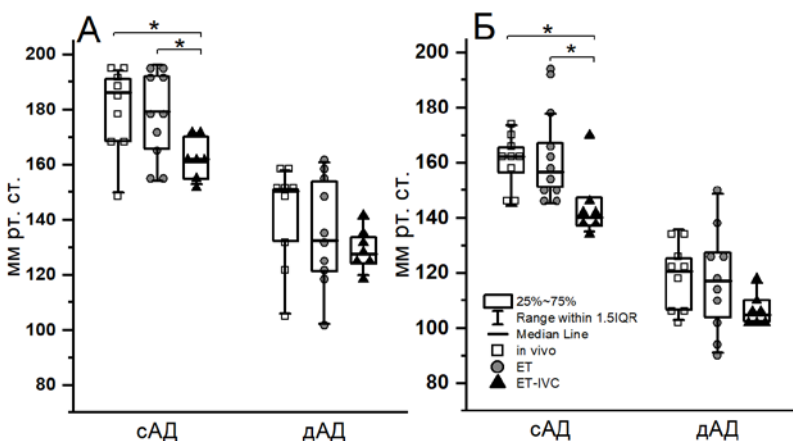


Рисунок 5. Величины сАД и дАД крыс НИСАГ, рожденных с использованием ВРТ. А – в возрасте 3 месяца, Б – в возрасте 5 месяцев. * $p < 0.05$ по сравнению с крысами НИСАГ, рожденными естественным путем.

Влияние ВРТ на поведение крыс НИСАГ

Дисперсионный анализ параметров поведения в ТОП (Рис. 6) выявил достоверные различия между группами крыс НИСАГ, обусловленные фактором ВРТ, по времени, проведенному в центре арены ($H_{2,24} = 9.00$; $p = 0.011$); пройденному пути ($H_{2,24} = 13.14$, $p = 0.001$) и исследованной области арены ($H_{2,24} = 6.08$, $p < 0.05$). Крысы НИСАГ, рожденные в результате эмбриотрансфера, проводят меньше времени в центре арены ($p < 0.01$), проходят меньшее расстояние ($p < 0.01$) и меньше исследуют область арены ($p < 0.05$).

Дисперсионный анализ параметров поведения в тесте ПКЛ (Рис. 7) выявил достоверные различия между группами крыс НИСАГ, обусловленные фактором ВРТ, по величине пройденного пути ($H_{2,25} = 15.32$, $p < 0.001$) и длительности вытягиваний туловища ($H_{2,25} = 8.03$, $p < 0.05$). Вытягивание туловища по направлению к открытым рукавам (оценка риска) относится к категории этологических показателей тревожности в ПКЛ наряду с такими показателями, как время и число входов в открытые рукава лабиринта (Rodgers et al., 1995; Calatayud et al., 2004). Крысы, рожденные в результате переноса эмбрионов, независимо от наличия культивирования, демонстрировали сниженную локомоторную активность, которая проявлялась в снижении величины пройденного пути ($p < 0.01$). Кроме того, крысы НИСАГ, рожденные в результате прямого эмбриотрансфера без культивирования, дольше находились в позиции вытягивания туловища, чем крысы НИСАГ, рожденные естественным путем ($p < 0.05$), что свидетельствует о повышенной тревожности.

Дисперсионный анализ параметров поведения в тесте РНО не выявил достоверных различий между группами крыс НИСАГ, обусловленные фактором ВРТ, по общему времени исследования объектов ($H_{2,26} = 2.75$, $p = 0.253$) и по индексу распознавания ($H_{2,26} = 0.1$, $p = 0.95$) (данные не представлены). Таким образом, способности к распознаванию нового объекта у крыс НИСАГ не изменились в результате применения к ним ВРТ.

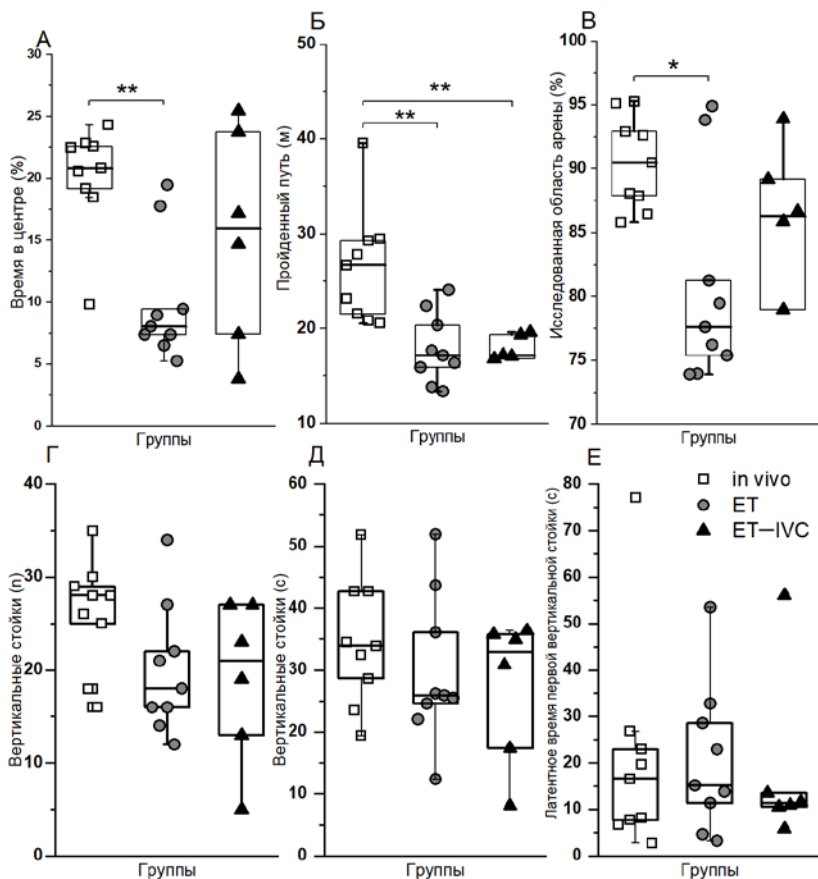


Рисунок 6. Параметры поведения в тесте открытого поля у самцов крыс НИСАГ, рожденных с использованием ВРТ.

А – время в центре;

Б – пройденный путь;

В – исследованная область арены;

Г – число вертикальных стоек;

Д – длительность вертикальных стоек;

Е – латентное время первой вертикальной стойки.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

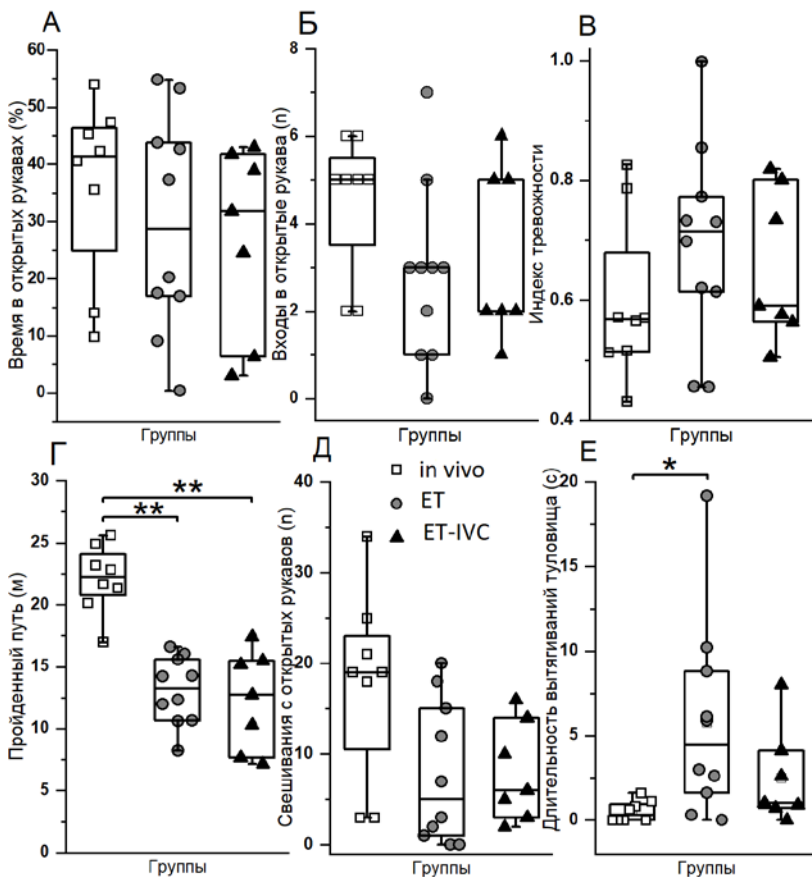


Рисунок 7. Параметры поведения в приподнятом крестообразном лабиринте самцов НИСАГ, рожденных с использованием ВРТ.

А – время, проведенное в открытых рукавах;

Б – число входов в открытые рукава;

В – индекс тревожности;

Г – пройденный путь;

Д – число свешиваний с открытых рукавов;

Е – длительность вытягиваний туловища.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Влияние ВРТ на морфометрию префронтальной коры и гиппокампа крыс линии НИСАГ

Дисперсионный анализ плотности нейронов в гиппокампе у крыс НИСАГ разных групп выявил достоверные различия, обусловленные фактором «ВРТ», по плотности нейронов в области СА2 гиппокампа ($H_{2,11} = 7.85$, $p = 0.02$) и зубчатой извилине гиппокампа ($H_{2,11} = 6.41$, $p = 0.04$). У крыс НИСАГ, рожденных в результате переноса культивированных *in vitro* эмбрионов, нейрональная плотность была снижена в областях СА2 и зубчатой извилине гиппокампа ($p < 0.05$) (Рис. 8).

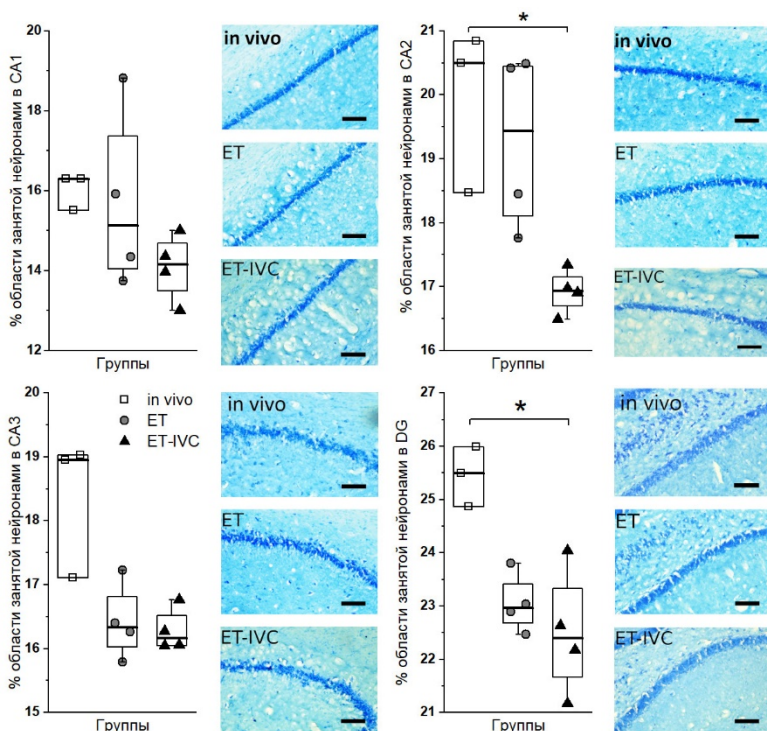


Рисунок 8. Плотность нейронов в областях гиппокампа у самцов крыс НИСАГ, рожденных с использованием ВРТ. А – СА1; Б – СА2; В – СА3; Г – зубчатая извилина. Увеличение: 100х; масштабная полоска = 100 мкм. * $p < 0.05$ согласно апостериорному тесту Данна.

Влияние ВРТ на гиппокампальный нейрогенез крыс НИСАГ

Дисперсионный анализ числа DCX-позитивных клеток в субгранулярной области зубчатой извилины гиппокампа у крыс НИСАГ разных групп не выявил достоверных различий, обусловленных фактором ВРТ, по этому параметру ($F_{2,9} = 2.12$, $p = 0.18$) (данные не представлены).

ОБСУЖДЕНИЕ

У крыс НИСАГ величины сАД и дАД сохранялись повышенными в течение всей беременности. Однако, линия крыс НИСАГ не может выступать моделью гестационной АГ у людей, так как дополнительного повышения сАД на фоне беременности у них не наблюдается, напротив, имеет место снижение сАД ближе к окончанию срока гестации, обусловленное подготовкой организма к родам. Для некоторых гипертензивных линий, в частности SHR, также характерно снижение АД ближе к концу периода беременности (Lorenz et al., 1984); но не для крыс линии Dahl, у которых состояние беременности спровоцировало гестационную АГ и признаки преэклампсии (Gillis et al., 2015).

В нашей работе впервые применен метод культивирования эмбрионов *in vitro* в сочетании с эмбриотрансфером в отношении крыс НИСАГ и вообще – в отношении гипертензивных крыс. Эффективность процедур составила 36-46%, что согласуется с результатами других исследований на крысах (Kato et al., 2004; Tran et al., 2014). Крысы НИСАГ, которые были выношены суррогатной матерью, безотносительно наличия культивирования эмбрионов, обладали большей массой тела по сравнению с аналогичными по возрасту крысятами НИСАГ, выращенными биологической матерью, в течение всего периода вскармливания до момента отсадки от матери, но к возрасту трех месяцев различия исчезали. Можно предположить, что основной вклад в повышение массы тела внесло изменение материнской среды, вследствие вынашивания эмбрионов НИСАГ гибридными суррогатными матерями.

Ранее в работах на мышах было показано, что перенос эмбрионов в сочетании с их длительным культивированием может влиять на уровень

тревожности у потомства (Ecker et al., 2004). В нашей работе уровень тревожности крыс НИСАГ не изменился в результате применения ВРТ, но отмечено снижение локомоторной и исследовательской активности в тестах ТОП и ПКЛ. Крысы НИСАГ рожденные без применения ВРТ характеризуются высокой активностью в подобных тестах (Маркель, 1986; Ragaeva et al., 2017). Вероятнее всего, наблюдаемое после применения ВРТ снижение активности обусловлено влиянием материнской среды. Известно, что материнское поведение обуславливает многие черты поведения взрослых потомков; при переносе эмбрионов/кросс-фостеринге самкам мышей другой линии, у потомков наблюдается «имитация» поведения приемной матери (Meaney et al., 2001). Другая гипотеза состоит в том, что приемная мать испытывает стресс в связи с воспитанием чужеродного потомства, а также в связи с перенесенной на ранних сроках беременности операцией по переносу эмбрионов. Нами было показано, что у беременных крыс линии WAG уровень кортикостерона в крови был существенно повышен спустя сутки после проведения ложной хирургической операции, имитирующей перенос эмбрионов (Rozkova et al., 2020).

Отсутствие различий в способностях к распознаванию нового объекта между группами свидетельствует об отсутствии нарушений эпизодической памяти у потомков, рожденных вследствие применения ВРТ. Однако, было обнаружено снижение плотности нейронов в гиппокампе у крыс, рожденных после переноса культивированных эмбрионов. Уровень нейрогенеза в гиппокампе крыс НИСАГ, рожденных после ВРТ, не был изменен, хотя неблагоприятные события в перинатальном периоде развития эмбриона часто приводят к его подавлению (Loi et al., 2014). Отсутствие изменений может указывать на то, что стресс, испытываемый матерью, не достиг порогового значения. Это предположение согласуется с нашими данными об отсутствии каких-либо изменений в уровне нейрогенеза у потомков, матери которых подвергались хирургическому стрессу во время беременности (Rozkova et al., 2020).

Уровень сАД у самцов крыс НИСАГ, рожденных после переноса культивированных в искусственной среде эмбрионов, был достоверно

снижен в возрасте трех и пяти месяцев как по сравнению с таковым у крыс НИСАГ, рожденных после переноса бластоцист без культивирования, так и по сравнению с группой интактных крыс. Следует отметить, что эффект наблюдали только в группе с культивированием, т.е. он опосредован влиянием культуральной среды и манипуляций с эмбрионами *in vitro*. Подобный эффект снижения АД обнаружен только в одной работе, где эмбрионы мышей не только были культивированы *in vitro*, но и были получены из оплодотворенных *in vitro* ооцитов (Donjacour et al., 2014). В других работах на нормотензивных мышах было обнаружено увеличение АД после применения различных ВРТ: ЭКО, длительного культивирования (72/96 ч), гормональной индукции овуляции (Watkins et al., 2007; Rexhaj et al., 2013). Следует отметить, что в отличие от цитированных работ мы получали эмбрионы на стадии дробления либо морулы, использовали краткосрочное культивирование (24 ч), не использовали гормональную индукцию овуляции, и использовали специальную среду, предназначенную для культивирования крысиных эмбрионов. Мы предполагаем, что снижение сАД у самцов НИСАГ опосредовано составом культуральной среды и эпигенетическими эффектами.

ВЫВОДЫ

1. У крыс линии НИСАГ как диастолическое, так и систолическое артериальное давление, выше, чем у нормотензивных крыс линии WAG на всем протяжении беременности, однако к ее окончанию систолическое артериальное давление у крыс обеих линий снижается.
2. Взрослые крысы линии НИСАГ отличаются по поведению от крыс линии WAG того же возраста: они характеризуются повышенной локомоторной и исследовательской активностью, а также сниженной тревожностью в условиях новой обстановки.
3. Перенос эмбрионов крыс НИСАГ реципиентам приводит к проявлению признаков неофобии у потомства: снижению локомоторной и исследовательской активности в условиях новой обстановки.
4. Культивирование эмбрионов крыс линии НИСАГ перед эмбриотрансфером:
 - приводит к восстановлению повышенного уровня исследовательской активности потомков в новой обстановке;
 - приводит к снижению плотности нейронов в областях CA2 и DG гиппокампа;
 - имеет эффектом смягчение артериальной гипертензии, выраженное в понижении величины систолического артериального давления у взрослых крыс линии НИСАГ.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Раннева С. В., Брусенцев Е. Ю., Игонина Т. Н., **Рагаева Д. С.**, Рожкова И. Н., Ершов Н. И., Левинсон А. Л., Амстиславский С. Я. Влияние культивирования эмбрионов на онтогенез потомства у млекопитающих // Онтогенез. – 2020. – Т. 51., - № 6. – С. 417-439.
2. Rozhkova I. N., Brusentsev E. Yu., Igonina T. N., **Ragaeva D. S.**, Petrova O. M., Tikhonova M. A., Akopyan A. A., Amstislavskaya T. G., Antonov Ye. V., Amstislavsky S. Ya. Sham surgical embryo transfer affects offspring neurodevelopment and manifestation of hypertensive phenotype in ISIAH rats // Hypertension in Pregnancy. – 2020. – V. 39. - № 3. – P. 283-294.
3. Igonina T. N., **Ragaeva D. S.**, Petrova O. M., Rozhkova I. N., Brusentsev E. Yu., Amstislavsky S. Ya. Effects of *in vitro* culture at the preimplantation embryo stage on early development and hypertension in ISIAH rats // Hypertension in Pregnancy. – 2019. – V. 38. - № 4. – P. 208-216.
4. **Рагаева Д. С.**, Игонина Т. Н., Брусенцев Е. Ю., Рожкова И. Н., Амстиславский С. Я. Отдаленные последствия ранних пренатальных воздействий на физиологические и поведенческие характеристики потомков // Успехи физиологических наук. – 2018. – Т. 49. – № 4. – С. 1-15.
5. **Ragaeva D. S.**, Tikhonova M. A., Petrova O. M., Igonina T. N., Rozhkova I. N., Brusentsev E. Yu., Amstislavskaya T. G., Amstislavsky S. Ya. Neonatal reflexes and behavior in hypertensive rats of ISIAH strain // Physiology & Behavior. – 2017. – V. 175. – P. 22-30.
6. **Рагаева Д. С.**, Брусенцев Е. Ю., Амстиславский С. Я. Вспомогательные репродуктивные технологии и артериальная гипертензия // Онтогенез. – 2014. – Т. 45. – № 5. – С. 299-313.

Тезисы:

1. **Рагаева Д.С.**, Тихонова, М.А., Петрова О.М., Игонина Т.Н., Рожкова И.Н., Брусенцев Е.Ю., Амстиславская Т.Г., Амстиславский С.Я. Неонатальные рефлексы и поведение гипертензивных крыс линии НИСАГ // Беляевские чтения: Международная конференция, посвященная 100-летию со дня рождения академика АН СССР Д.К. Беляева. – Новосибирск. – 2017. – С. 81.
2. **Ragaeva D.**, Abramova T., Igonina T., Rozhkova I., Brusentsev E., Naprimerov V. & Amstislavsky S. Effects of SPF status and reproductive technologies on the body weight, blood pressure and Fkbp5 gene expression in kidneys of hypertensive rats of the ISIAH strain // 45th Annual Meeting and Educational Days of Scand-LAS 2015. - Turku, Finland. – 2015. – С. 71.
3. **Ragaeva D. S.**, Abramova T. O., Igonina T. N., Rozhkova I. N., Brusentsev E. Yu., Kalinichenko E. V., Amstislavsky S. Ya. Effects of embryo transfer and in vitro culture on the development of hypertensive phenotype in rats genetically predisposed to hypertension (ISIAH strain) // Modern Achievements in Population, Evolutionary, and Ecological Genetics: International Symposium. – Vladivostok. – 2015. – С. 59.