

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И
ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

Рагаева Диана Сергеевна

Влияние вспомогательных репродуктивных технологий на
постнатальный онтогенез гипертензивных крыс линии НИСАГ

03.03.01 – физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата

кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.б.н., С.Я. Амстиславский

Новосибирск 2021

Оглавление	
Оглавление	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
Актуальность работы	6
Научная новизна	9
Теоретическая и научно-практическая ценность работы	10
Положения, выносимые на защиту	11
Апробация результатов	11
Публикации	11
Объем и структура диссертации	11
Благодарности	11
ГЛАВА 1: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Артериальная гипертензия	12
1.1.1 Эпидемиология и патогенез артериальной гипертензии	12
1.1.2 Теории патогенеза гипертонической болезни	15
1.1.3 Модели артериальной гипертензии	17
1.1.4 Характеристика линии крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией (НИСАГ)	23
1.2. Применение ВРТ для лечения бесплодия человека	26
1.2.1 Экстракорпоральное оплодотворение	27
1.2.2 Интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида	28
1.2.3 Отдаленные эффекты применения ВРТ на потомство	29
1.3 Модификация материнской среды как инструмент изучения генетически обусловленных признаков на лабораторных животных	32

1.3.1. Репродуктивные технологии	33
1.3.2. Кросс-фостеринг и перекрестный перенос эмбрионов как фактор модификации гипертензивного статуса.....	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	40
2.1. Экспериментальные животные.....	40
2.2 Экспериментальные группы	40
2.3. Методы репродуктивной биологии.....	41
2.3.1. Вазэктомия.....	41
2.3.2 Получение преимплантационных эмбрионов.....	41
2.3.3 Подготовка суррогатных матерей	42
2.3.4 Культивирование эмбрионов <i>in vitro</i>	42
2.3.5 Перенос эмбрионов в матку	42
2.4 Физиологические и поведенческие методы	43
2.4.1. Исследование динамики артериального давления во время беременности	43
2.4.2 Репродуктивные характеристики самок и исследование неонатального онтогенеза потомков	44
2.4.3. Измерение артериального давления и массы тела взрослых потомков.....	45
2.4.4 Поведение у взрослых животных.....	45
2.4.5 Гистологический анализ.....	47
2.4.6. Исследование нейрогенеза в гиппокампе.....	48
2.5. Статистический анализ данных	49
ГЛАВА 3: РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	50
3.1. Формирование гипертензивного фенотипа крыс линии НИСАГ	50

3.1.1. Репродуктивные характеристики и неонатальное развитие крыс линий НИСАГ и WAG	50
3.1.2. Морфометрический анализ гиппокампа крыс линий НИСАГ и WAG в неонатальном периоде.....	52
3.1.3 Артериальное давление и поведение взрослых крыс линий НИСАГ и WAG	54
3.2. Исследование влияния повышенного артериального давления у крыс линии НИСАГ во время беременности на репродукцию.....	58
3.2.1. Артериальное давление крыс НИСАГ и WAG во время беременности	58
3.2.2. Репродуктивные характеристики у беременных самок НИСАГ и WAG	59
3.3. Влияние применения репродуктивных технологий на формирование гипертензивного фенотипа крыс линии НИСАГ	60
3.3.1. Влияние культивирования эмбрионов и эмбриотрансфера на пре- и постнатальное развитие крыс НИСАГ.....	60
3.2.2. Влияние культивирования эмбрионов и эмбриотрансфера на фенотип взрослых потомков крыс НИСАГ: артериальное давление, поведение и морфометрия гиппокампа и префронтальной коры	64
ГЛАВА 4: обсуждение результатов исследования	72
ВЫВОДЫ	82
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	82

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- DCX – doublecortin (даблкортин)
- DG – dental gyrus (зубчатая извилина гиппокампа)
- IVC – *in vitro* culture
- LOS – large offspring syndrome (синдром больших новорожденных)
- SHR – spontaneously hypertensive rats (линия крыс со спонтанной гипертензией)
- WAG – Wistar Albino Glaxo
- АГ – артериальная гипертензия
- АД – артериальное давление
- АКТГ - адренотропный гормон
- ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии
- ГБ – гипертоническая болезнь
- ГГНС – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система
- дАД – диастолическое артериальное давление
- ЗВУР - задержка внутриутробного развития
- ИКСИ (ICSI) – интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (intracytoplasmic sperm injection)
- НИСАГ (ISIAN) – наследственная индуцированная стрессом артериальная гипертензия (Inherited Stress-Induced Arterial Hypertension)
- ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт
- РААС – ренин-ангиотензин-альдостероновая система
- РАС – расстройства аутистического спектра
- РНО – распознавание нового объекта
- сАД – систолическое артериальное давление
- САС – симпатoadренолавая система
- ТОП – тест открытого поля
- ЦНС – центральная нервная система
- ЧНБ – частота наступления беременности
- ЧР – частота родов
- ЭГ - эссенциальная гипертензия
- ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Под вспомогательными репродуктивными технологиями (ВРТ) подразумеваются любые манипуляции с гаметам и/или эмбрионами с целью репродукции, в том числе искусственная инсеминация; экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО); культивирование *in vitro*; криоконсервация, в том числе и многие другие. В последние десятилетия ВРТ широко используют как на лабораторных животных для создания криобанков гамет и эмбрионов, трансгенных линий, получения эмбриональных стволовых клеток и других экспериментальных целей, так и в медицине для лечения бесплодия у человека. Однако, исследований последствий применения таких технологий на формирование фенотипа потомства, что особенно важно для медицины, недостаточно. Что касается исследований ВРТ на проявление гипертензивного фенотипа, то таких работ еще меньше. Неоптимальные условия оплодотворения и культивирования вне материнского организма могут привести к нарушению процессов эпигенетического программирования и привести к стойким изменениям фенотипа потомков.

В связи с относительно недавним началом активного использования ВРТ в клинике, возраст подавляющего большинства людей, рожденных с их применением, не превышает 40 лет, что накладывает ограничение на изучение отдаленных последствий их применения. На протяжении всего этого времени вспомогательные репродуктивные технологии активно развивались и протоколы модифицировались, причем в каждой клинике по-разному, и до сих пор не выработан единый стандарт, что создает сложности в интерпретации и метаанализе клинических данных. Однако, в настоящий момент в клинических исследованиях показано повышение риска проявления расстройств аутистического спектра (РАС) и умственной отсталости у детей, зачатых в программе ВРТ с использованием ИКСИ как метода оплодотворения [Sandin и др., 2013], а также незначительное, но достоверное повышение артериального давления (АД) и нарушения функционирования работы сердечно-системы у подростков и молодых людей [Ceelen и др., 2009; Scherrer и др., 2015; Meister и др., 2018]. Следует отметить, что клинические данные собраны на людях с нарушением фертильности, в том числе и в силу генетических причин. Высказываются предположения о том, что именно эти нарушения у родителей, а не применение ВРТ, являются причиной указанных выше эффектов. Однако, в модельных экспериментах на фертильных лабораторных животных, исследователи столкнулись с такими же отдаленными эффектами этих технологий. В частности, после применения ВРТ на мышах было показано изменение массы тела новорожденных плодов, динамики роста и развития, а также расстройства поведения у

потомков [Ecker и др., 2004; Fernández-Gonzalez и др., 2004; Lerch и др., 2016], повышению у них АД [Watkins и др., 2007] и проявление эндотелиальной дисфункции [Rexhaj и др., 2013]. В современном мире все более ярко проявляется тенденция к откладыванию материнства на более поздние сроки [Gleicher и др., 2014]. С возрастом возрастает частота проявлений хронических заболеваний у одного или обоих будущих родителей, в частности, гипертонической болезни (ГБ). Согласно приказу Минздрава РФ от 31 июля 2020 г. № 803н гипертоническая болезнь II-III степени при отсутствии эффекта от терапии является противопоказанием для проведения программ ВРТ у людей. Однако, контролируемая ГБ у пациентов не может быть основанием для отказа в медицинской помощи. Современные протоколы лечения ГБ являются симптоматическими, направленными на снижение высокого АД, а не на устранение причин, вызывающих болезнь.

ГБ является полигенным мультифакторным заболеванием человека и главным фактором риска развития ишемической болезни сердца и инсульта [Fudim, Vemulapalli, 2016]. Модели ГБ, созданные на крысах, наиболее широко используются для изучения вклада как генетических, так и средовых факторов, лежащих в основе этого заболевания. Существует множество гипертонивных линий крыс, полученных естественной селекцией или с применением технологий трансгенеза/нокаута, при этом линия крыс SHR (Spontaneously Hypertensive Rats) является наиболее известной моделью эссенциальной гипертонии человека [Okamoto, Aoki, 1963]. Однако, исследований, посвященных влиянию ВРТ на потомков в долгосрочной перспективе с использованием лабораторных моделей ГБ до сих пор не было проведено. Линия крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией (НИСАГ) была выведена с целью исследования связи генетических факторов и факторов окружающей среды, в особенности эмоционального стресса, в связи с развитием гипертензии [Markel, 1992]. Некоторые функциональные изменения сердечно-сосудистой системы были выявлены у крыс линии НИСАГ [Федосеева и др., 2009], а также морфологические и физиологические особенности почек, надпочечников и всей адренокортикальной системы были тщательно исследованы у крыс данной линии [Amstislavsky и др., 2006; Vuzueva и др., 2006; Redina и др., 2014; Antonov и др., 2016]. Имеется несколько работ, посвященных поведенческому фенотипированию крыс линии НИСАГ [Амстиславский, Попова, Томилова, 1998; Мешков и др., 2012; Мешков, Алехина, Морева, 2014; Markel, 1986; Redina и др., 2009]. Среди разветвленной сети современных ВРТ центральным звеном является культивирование эмбрионов *in vitro* до 5-х суток развития, начиная со стадии зиготы и завершая на стадии бластоцисты, когда происходит перенос либо криоконсервация эмбриона. Пролонгированное культивирование (до 5-х суток развития) сыграло огромную роль в клинической практике, так это позволило проводить отбор одного наиболее перспективного эмбриона для переноса

вместо переноса нескольких, и соответственно, существенно снизить частоту наступления многоплодной беременности практически до такой, которая наблюдается в естественной популяции [Hardy и др., 2002; Blake, Farquhar, 2007]. Однако, именно процедуру культивирования эмбрионов в искусственной среде, наряду с гормональной стимуляцией яичников, прежде всего, ассоциируют с негативными долгосрочными эффектами применения ВРТ у потомков. Предпосылкой к проявлению отдаленных последствий является феномен эпигенетического перепрограммирования, который заключается в закономерном чередовании волн метилирования и деметилирования ДНК в половых клетках и на начальных стадиях развития эмбрионов [Reik, Dean, Walter, 2001; Hajj el, Naaf, 2013]. Исследования на лабораторных мышах показали влияние культивирования на массу тела потомков, их поведение, а также функционирование их сердечно-сосудистой системы, в том числе - повышение артериального давления [Young и др., 2001; Ecker и др., 2004; Watkins и др., 2007; Calle и др., 2012; Mani, Mainigi, 2018]. Тем не менее, применение ВРТ оказывается все более востребованным в клинической практике, и будут ли подобные эффекты возникать у людей, которые еще и страдают хроническими заболеваниями, такими, как ГБ, остается под вопросом. В ранних работах исследовалось влияние переноса эмбрионов от гипертензивных крыс реципиентам с нормальными показателями АД с целью выяснения патогенеза артериальной гипертензии (АГ) у данных линий [Рагаева, Брусенцев, Амстиславский, 2014]. Оказалось, что при переносе эмбрионов от гипертензивных доноров нормотензивным реципиентам у первых можно было наблюдать существенное замедление развития АГ и ее смягчение [Kubisch, Gómez-Sánchez, 1999; Nicolantonio Di и др., 2006; Lee, Azar, 2010]. Таким образом, целью нашего исследования является установление отдаленных эффектов культивирования эмбрионов *in vitro* в ходе постнатального онтогенеза на модели гипертензивных крыс линии НИСАГ.

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 артериального давления, поведения и когнитивных функций, а также плотности нейронов в головном мозге у крыс НИСАГ, рожденных после применения ВРТ.

Научная новизна

- Была исследована динамика показателей роста крыс линии НИСАГ: у новорожденных крысят масса тела была снижена по сравнению с WAG, которая сохранялась низкой на протяжении всего периода вскармливания.
- Исследовано созревание неонатальных рефлексов крыс линии НИСАГ в сравнении с крысами линии WAG; обнаружено отставание в формировании рефлекса переворота и опережение в формировании реакции избегания края у крыс линии НИСАГ по сравнению с WAG.
- Получены гистологические срезы гиппокампа крыс линии НИСАГ в неонатальном периоде и проведен их морфометрический анализ; обнаружено, что у крыс линии НИСАГ плотность нейронов в области зубчатой извилины (DG) повышена по сравнению с WAG.
- Исследовано поведение взрослых самцов и самок крыс линии НИСАГ SPF-статуса в тестах «открытое поле», распознавание нового объекта и «приподнятый крестообразный лабиринт» в сравнении с крысами линии WAG. Индекс распознавания крыс линии НИСАГ, как самцов, так и самок, был сходен с таковым у крыс линии WAG. Крысы линии НИСАГ, как самцы, так и самки, демонстрировали меньшую тревожность, большую исследовательскую и повышенную общую локомоторную активность в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт» по сравнению с крысами линии WAG.
- Исследована динамика систолического и диастолического АД у самок линии НИСАГ в течение беременности. На всем протяжении беременности величины АД самок НИСАГ достоверно превышали величины АД самок WAG. К концу беременности (20-22 дни) величина систолического АД достоверно снижалась у обеих линий, однако, величины дАД не изменялись. Масса тела во время беременности закономерно увеличивалась у самок крыс обеих линий, при этом масса тела крыс НИСАГ изначально и на всем протяжении беременности была достоверно выше, чем у WAG.
- Впервые было получено живое потомство крыс линии НИСАГ после культивирования эмбрионов *in vitro* и последующего эмбриотрансфера.
- Исследовано влияние переноса эмбрионов крыс линии НИСАГ на физиологические и поведенческие признаки у потомков: у потомков после переноса в обеих группах наблюдалась повышенная масса тела на протяжении всего раннего постнатального

периода по сравнению с потомками, воспитанными биологической матерью, при этом по достижении взрослого состояния, масса тела потомков во всех трех группах выравнивалась; формирование неонатальных рефлексов и реакций у крысят после переноса эмбрионов было модифицировано незначительно; локомоторная и исследовательская активность крыс, рожденных в результате переноса эмбрионов, в поведенческих тестах была снижена.

- Исследовано влияние культивирования эмбрионов *in vitro* крыс НИСАГ на проявление гипертензивного фенотипа потомков. Было обнаружено, что культивирование эмбрионов в искусственной среде со стадии морулы до бластоцисты в течение 24 часов привело к достоверному снижению величины систолического АД у самцов крыс линии НИСАГ в возрасте трех месяцев; эффект снижения систолического АД сохранялся и в возрасте пяти месяцев, при этом медианная величина систолического АД у самцов оказалась ниже условного гипертензивного порога (150 мм рт. ст.).

Теоретическая и научно-практическая ценность работы

Теоретическая значимость работы состоит в расширении представлений о вкладе внутриутробного и неонатального периода на формирование гипертензивного фенотипа на примере крыс линии НИСАГ со стресс-зависимой формой АГ. Впервые получено потомство после сочетанного применения эмбриотрансфера и культивирования *in vitro* эмбрионов крыс НИСАГ и исследовано влияние культивирования эмбрионов на потомков у гипертензивных животных, что может иметь практическое значение для медицины. Выявление феномена снижения систолического АД у крыс, которые будучи в эмбриональном периоде, культивировались в искусственной среде, создает предпосылки к исследованию механизмов эпигенетической регуляции АД в раннем онтогенезе. Идентификация процессов формирования регулирующих АД систем может послужить разработке новых подходов к снижению рисков развития гипертонической болезни. Результаты исследования могут быть использованы в соответствующих лекционных курсах, в частности, они включены в спецкурс «Репродуктивная биология и репродуктивные технологии», который читается для бакалавров факультета естественных наук Новосибирского госуниверситета.

Практическая ценность работы также и в том, что были исследованы те аспекты и периоды онтогенеза крыс НИСАГ, которые ранее практически не исследовались. В частности, ранее не исследовали динамику АД в течение беременности у крыс НИСАГ, кроме того, довольно слабо было исследовано созревание рефлексов в раннем онтогенезе. Таким образом, практическая ценность работы состоит в более полной характеристике крыс НИСАГ как модели артериальной гипертензии.

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 результатов

Материалы диссертации обсуждены на конференции «Беляевские чтения-2017» (г. Новосибирск, 2017), 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).

Публикации

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

Объем и 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.

Благодарности

Автор выражает особую благодарность научному руководителю д.б.н. Амстиславскому Сергею Яковлевичу, к.б.н. Игониной Татьяне Николаевне, Петровой Ольге Михайловне, к.б.н. Рожковой Ирине Николаевне, Кайль Марии Владимировне, Юрлонгиной Александре Николаевне, Галустян Елене Алексеевне, а также всем сотрудникам сектора криоконсервации и репродуктивных технологий за неоценимую помощь на всех этапах работы над диссертацией.

ГЛАВА 1: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Артериальная гипертензия

1.1.1 Эпидемиология и патогенез артериальной гипертензии

Артериальная гипертензия является одним из самых распространенных в мире хронических заболеваний, согласно последним данным, распространенность АГ в мире среди взрослого населения по состоянию на 2010 г. составляет 31.1% (1.39 млрд) [Mills и др., 2016]; при этом уровень распространения различен в странах с разным экономическим положением: выше в странах с низким и средним уровнями дохода (31.5%) и ниже в странах с высоким уровнем дохода (28.5%) [Mills и др., 2016]. Чем старше возрастная группа, тем выше частота заболевания - у пожилых людей в некоторых странах достигает 50–60% [Babatsikou, Zavitsanou, 2010]. Представители негроидной расы страдают АГ чаще по сравнению с европеоидами [Соорег и др., 2005]; среди женщин эта патология распространена чуть больше, чем среди мужчин в возрасте от 50 лет как в США [Hajjar, Kotchen, Kotchen, 2006], так и в РФ [Оганов и др., 2011], однако по глобальным мировым данным среди женщин распространенность АГ чуть ниже как в странах с низким, так и с высоким уровнями дохода [Mills и др., 2016]. Осложнения АГ ответственны за 9.4 миллионов случаев смертей в год во всем мире, и по прогнозам Всемирной организации здравоохранения это число увеличится [Lim и др., 2012]. Было предсказано, что к 2030 году почти четверть всех смертей в мире будет вызвана сердечно-сосудистыми заболеваниями [Lim и др., 2012].

В РФ начиная с 2000-х годов распространенность АГ среди взрослого населения составляла 39.7% [Оганов и др., 2011; Бойцов и др., 2014], однако в 2013 году этот показатель увеличился до 43% [Шальнова и др., 2018]. В связи с широкой распространенностью, недостаточным контролем АД [Бойцов и др., 2014; Шальнова и др., 2018] и наличием тяжелых осложнений, нередко являющихся причиной инвалидности и преждевременной смертности, таких как хроническая сердечная недостаточность, инфаркт миокарда, инсульт головного мозга, прогрессирующая почечная недостаточность [Оганов, 2008], данная патология является не только медицинской, но и серьезной социальной проблемой здравоохранения.

Согласно последним клиническим рекомендациям по профилактике, обнаружению и контролю высокого уровня АД у взрослых [Whelton и др., 2017], существует разделение на четыре категории по уровню АД:

- 1) нормальное – сАД <120 мм рт. ст., дАД <80 мм рт. ст.
- 2) повышенное – сАД 120 – 129 мм рт. ст., дАД <80 мм рт. ст.
- 3) первая стадия гипертензии – сАД 130-139 мм рт. ст., дАД 80-89 мм рт. ст.
- 4) вторая стадия гипертензии – сАД \geq 140 мм рт. ст., дАД \geq 90 мм рт. ст.

Достижение целевых величин АД <130/80 считается оптимальным для гипертензивных больных на сегодняшний день [Vaduganathan и др., 2018; Sakima и др., 2019]. Согласно последним клиническим рекомендациям Американской кардиологической ассоциации [Whelton и др., 2017], нормальными величинам АД для человека следует считать 60-79 мм рт. ст., сАД – 90-119 мм рт. ст. При гипертонической болезни различной степени тяжести величины АД достигают 80-120 мм рт. ст. Повышение величин АД, но не сАД, является важнейшим прогностическим критерием развития ишемической болезни сердца у людей моложе 50 лет, однако у людей старше 50 лет, напротив, именно повышение сАД выступает таким критерием [Li и др., 2014].

В большинстве случаев (около 95%) именно эссенциальная гипертензия (в другой терминологии - первичная АГ, гипертоническая болезнь неизвестной этиологии) является причиной стойкого повышения АД, то есть артериальной гипертензии. Остальные случаи (около 5%) приходятся на так называемые вторичные гипертензивные состояния, причиной которых являются заболевания других систем и органов, такие как хронические заболевания почек (хронический гломерулонефрит, пиелонефрит, диабетическая нефропатия) (1% - 2% случаев) [Hirsch и др., 2006], вазоренальная АГ (атеросклероз почечных артерий, фибромышечная дисплазия почечных артерий) (5% - 34% случаев) [Levey и др., 2011], первичный альдостеронизм (8% - 20% случаев) [Funder и др., 2016], обструктивное апноэ во сне (25% - 50% случаев) [Rodrigo и др., 2016] и АГ, индуцированная приемом медикаментов или алкоголя (2% - 4% случаев) [Grossman, Messerli, Grossman, 2015]. В таких случаях АГ является лишь симптомом заболевания или состояния, которое при правильной диагностике поддается лечению.

Гипертоническая болезнь – это мультифакторное полигенное заболевание, обусловленное действием как генетических, так и средовых факторов, при этом вклад генетических факторов составляет около 30-50% [Garcia и др., 2003; Fudim, Vemulapalli, 2016]. Генетическая предрасположенность реализуется при действии определенных факторов окружающей среды: образ жизни и питания, социальные и производственные факторы. Известно, что эмоциональный стресс является одним из факторов, провоцирующих развитие артериальной гипертензии [Gasperin, Netuveli, Pattussi, 2009].

Основные механизмы регуляции АД, согласно Гайтону [Guyton и др., 1972], подразделяются на кратковременные (включающиеся в первые секунды и минуты после отклонения величин АД от нормы) и долговременные (интегральные) (Рис. 1). К кратковременным механизмам поддержания АД относят барорецепторный рефлекс [Korner, 1980], хеморецепторный рефлекс, симпатoadреналовую систему, а также почечный (плазменный) контур. Главным образом, такие буферные системы работают в узких диапазонах изменения АД (65-125 мм рт. ст.) и

направлены на поддержание уровня АД при влиянии внешних факторов, прежде всего вызывающих гипотензию [Guyton, 1975].

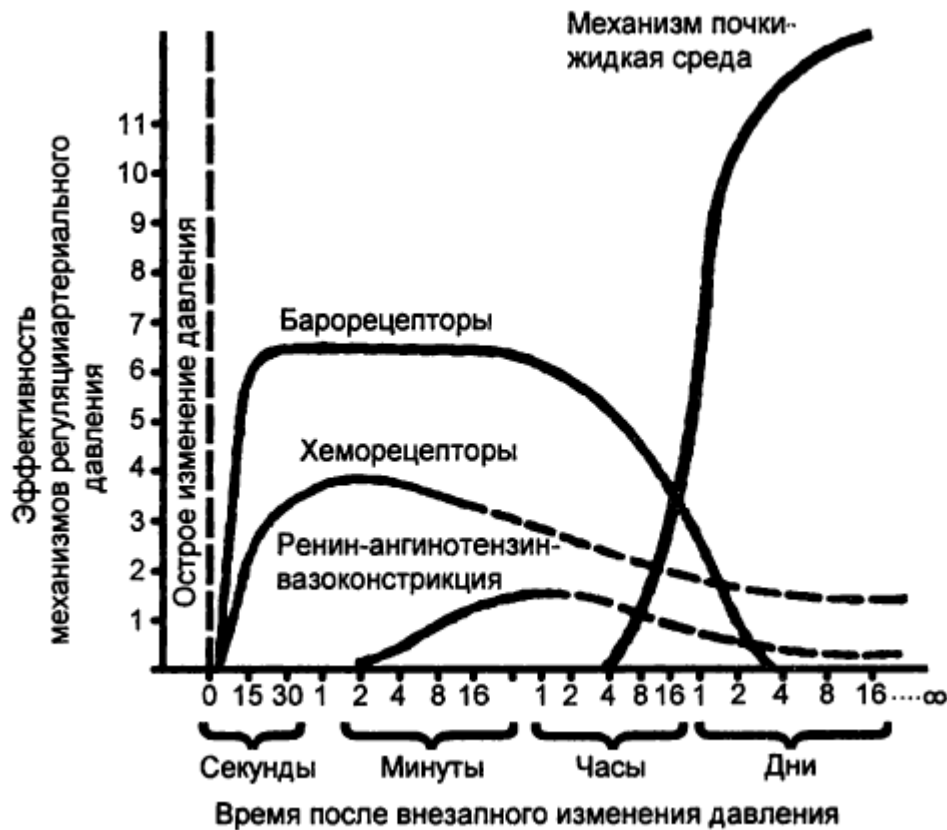


Рисунок 1. Последовательность включения и сравнительная эффективность (в условных единицах) различных механизмов регуляции АД. По А. Guyton et al., 1972.

Интегральные системы регуляции могут быть условно разделены на два контура: прессорный и депрессорный. Основными элементами прессорного контура являются тканевые ренин-ангиотензин-альдостероновые системы (РААС) в сосудах, сердце и мозге; симпатoadrenalовая система, а также вазоконстрикторные вещества, образующиеся непосредственно в эндотелии сосудов – эндотелины I, II и III типов [Бойцов, 2004]. В депрессорном контуре можно выделить следующие блоки: депрессорная система стенки сосудов (оксид азота, эндотелины, натрийуретический пептид С-типа), мозгового слоя почки (простагландины и калликреин-кининовая система), центральная нервная система (ЦНС) (имидазолиновые, дофаминергические, серотониновые и α -адренорецепторы 2 типа, мозговые натрийуретические пептиды) [Кушаковский, 2002; Бойцов, 2004].

Таким образом, уровень АД в организме здоровых людей поддерживается сложным и многообразным комплексом систем регуляции. ГБ возникает, когда происходит нарушение баланса имеющихся прессорных и депрессорных механизмов [Кушаковский, 2002]. Если изменение АД происходит, например, вследствие генетической мутации, то другие факторы будут действовать компенсаторно с целью привести АД к изначальной величине. В том случае, когда баланс факторов, повышающих АД, и факторов, его снижающих, нарушен,

компенсаторные механизмы перестают действовать и развивается ГБ [Mullins, Bailey, Mullins, 2006].

1.1.2 Теории патогенеза гипертонической болезни

Классические теории патогенеза ГБ включают в себя две основные группы, одна из которых рассматривает ГБ как болезнь регуляции, а другая – как болезнь адаптации. К первой группе можно отнести длительное время доминировавшую нейрогенную теорию Ланга [Ланг, 1950], согласно которой повышенное АД возникает вследствие повышения симпатического тонуса нервной системы. В подтверждение данной теории говорят данные об успешности применения β -адреноблокаторов, доказавших свою эффективность в лечении ГБ. Однако повышенное содержание катехоламинов в крови наблюдается лишь у 40% больных ГБ [Goldstein, 1981]. В микронейрографических исследованиях, где регистрировали потенциалы действия симпатических нервов кожи и мышц людей, больных ГБ и здоровых, не было выявлено значимых отличий в симпатограммах [Wallin, Delius, Hagbarth, 1973].

Другая теория связана с нарушением чувствительности барорефлекса [Цырлин, 1970]. Существуют данные, подтверждающие наличие такового у пожилых больных АГ [Harrington, Murray, Ford, 2000]. Следует отметить, что и симпатoadреналовая система (САС), и барорефлекс являются краткосрочными механизмами регуляции АД, следовательно, нарушения в них могут приводить лишь к преходящей (лабильной) АГ. Для развития стойкой АГ нарушения в интегральных системах регуляции, таких как РААС и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система (ГГНС), кажутся более значимыми.

Объемно-солевая теория Гайтона [Guyton и др., 1972] предполагает ведущим механизмом АГ нарушение водно-солевого обмена, а именно уменьшение выделения натрия и воды почками вследствие нефросклероза различного генеза, и следовательно, наступления гиперволемии и гипертензии. Повышение АД рассматривается как адаптация к новому состоянию, так как разработана зависимость объема выведенной жидкости от величины АД. Соответственно у больных АГ для увеличения выделения Na происходит повышение АД и соответственно наблюдается сдвиг кривой «выделение Na – уровень АД» вправо (Рис. 2). Таким образом, данную теорию следует относить ко второй группе. Доказательствами служат эффективность назначения ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента, а также диуретиков. Однако, такой механизм не может считаться основным в формировании АГ, т.к. хотя у пожилых гипертензивных больных нефросклероз встречается практически у всех, но не более чем у 30% молодых больных [Бойцов, 2004].

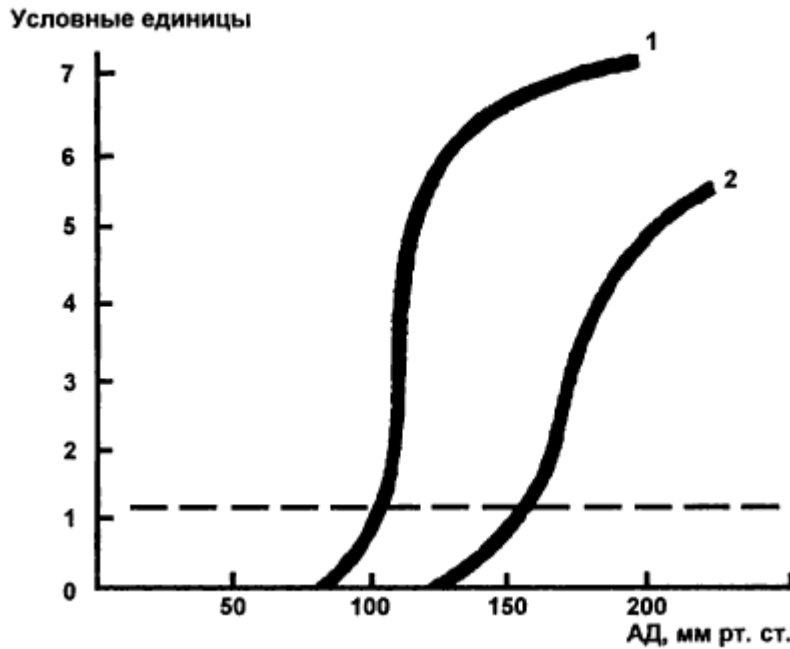


Рисунок 2. Кривые почечной функции у здоровых (1) и больных АГ (2) людей. По Guyton et al., 1972. Зависимость выделения Na и воды (в условных единицах) от уровня АД.

В 40-х годах прошлого века Ирвином Пэйджем была предложена “мозаичная” теория первичной АГ, согласно которой патогенез ГБ сравнивается со сложной мозаикой из восьми основных факторов, влияющих на уровень АД, которые тесно взаимосвязаны друг с другом и взаимодействуют (Рис. 3). Ключевым элементом системы, ведущим к повышению АД, является недостаточность перфузии тканей [Page, 1949].

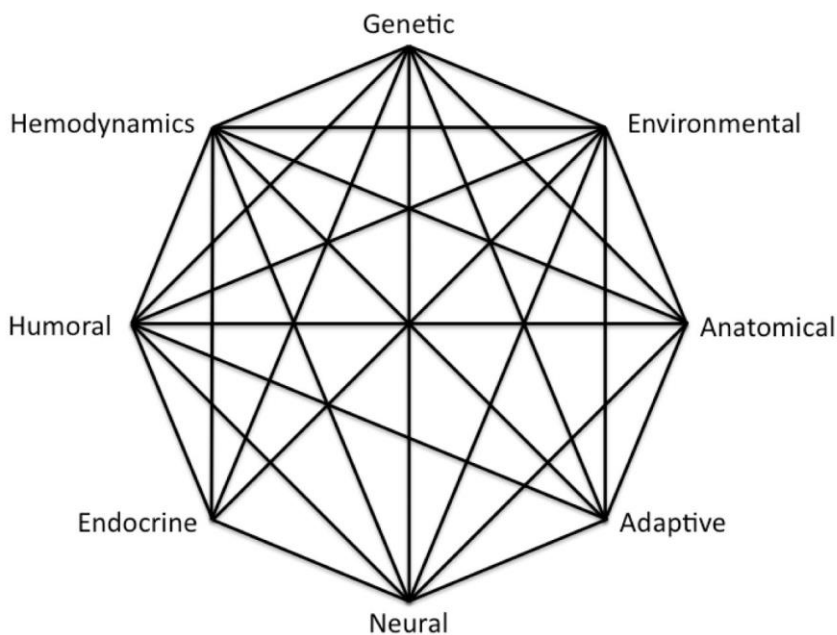


Рис. 3. Мозаичная теория ГБ. По Harrison, 2013.

Разработка и внедрение в широкую клиническую практику таких препаратов, как антагонисты кальция, а также их выраженный гипотензивный эффект, послужило основанием к более интенсивному изучению регуляции кальциевого обмена как возможного механизма возникновения первичной АГ. Наиболее полная концепция была предложена Постновым и Орловым [Постнов, Орлов, 1987], которые предположили, что АГ возникает вследствие патологии клеточных мембран, а именно нарушения механизма трансмембранного транспорта кальция в результате генетического дефекта. Накопление кальция в цитозоле гладкомышечных клеток ведет к повышению сократительной способности миокарда и сосудов, активации симпатoadреналовой системы, что в совокупности приводит к повышению АД и связанных с ним морфологических изменений сердца и сосудов.

В настоящее время вопрос о патогенезе ГБ до сих пор остается до конца не разрешенным. Еще Г.Ф. Ланг в своей работе указывал на неоднородность гипертонической болезни в силу разнообразия и сложности механизмов регуляции АД, и как следствие ее следует рассматривать как группу заболеваний, для которых характерна сходная симптоматика. Некоторые исследователи склоняются к тому, что ГБ следует рассматривать и как болезнь регуляции, и как болезнь адаптации [Кушаковский, 2002].

1.1.3 Модели артериальной гипертензии

Использование доклинических моделей АГ на лабораторных животных привело к значительному расширению представления о механизмах возникновения и процессах заболевания, так как это позволяло контролировать вклад различных факторов [Lin и др., 2016]. Одна из первых моделей АГ была разработана на собаках Гольдблаттом [Goldblatt и др.,

МОДЕЛИ ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

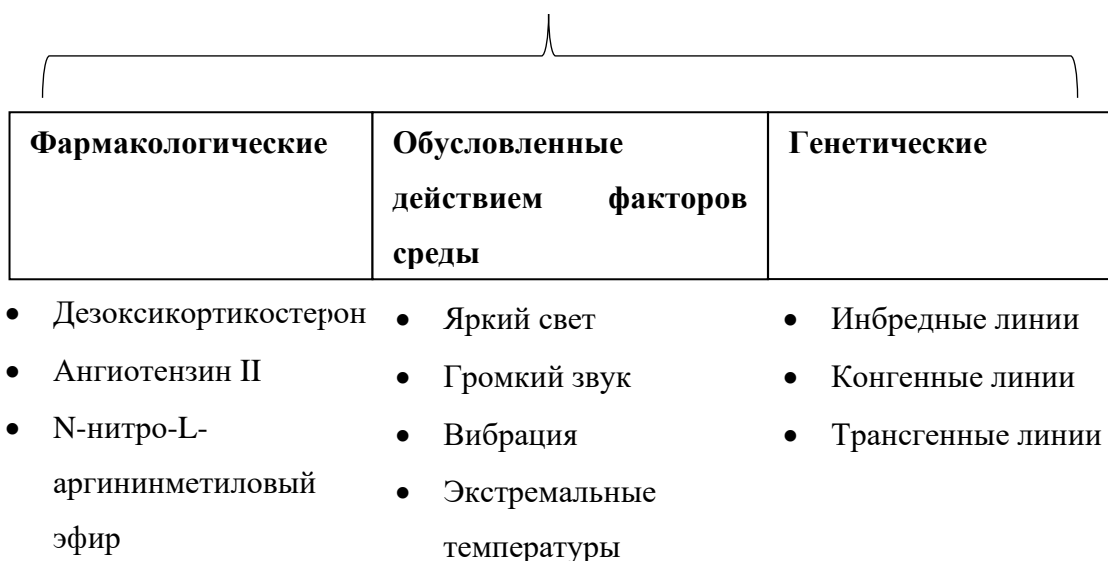


Рисунок 4. Модели эссенциальной гипертензии. По Lin с соавт., 2016 с модификациями.

1934] и требовала хирургического вмешательства: АГ развивалась после операции, вызывавшей одностороннее сужение почечной артерии (модель 2К1С). Впоследствии модель 2К1С успешно применили к кроликам, крысам, а также к козам и овцам [Pinto, Paul, Ganten, 1998]. У крыс и кроликов 2К1С механизм приводит к постепенному и хроническому повышению артериального давления, которое выходит на постоянный уровень через 2 недели, но впоследствии может снизиться у 10-20% животных [Leenen, Jong de, 1971].

В настоящее время все экспериментальные модели АГ могут быть разделены на три группы: фармакологические, обусловленные действием факторов среды и генетические модели (Рис. 4). Первые две группы используются в основном для изучения вторичных гипертензивных состояний с известными причинами возникновения, в то время как последняя группа, в частности, инбредные линии, находят широкое применение в исследовании эссенциальной гипертонии.

Наиболее популярным среди других животных для изучения ГБ на сегодняшний день является крыса, к чему имеются важная предпосылка: патогенез и клинические проявления заболевания у крыс во многом сходны с таковыми у человека. Как у человека, так и у крысы, при эссенциальной гипертонии имеет место нарушение регуляции артериального давления с раннего возраста и реакция на неблагоприятные факторы окружающей среды, а также вовлечены гемодинамические факторы, механизмы, регулирующие вазоконстрикцию, нервную регуляцию и гуморальные влияния со стороны РААС [Trippodo, Frohlich, 1981]. К настоящему времени в базе данных Rat Genome Database (<http://rgd.mcw.edu/rgd>) зарегистрировано свыше 600 генов, участвующих в развитии гипертонии. Кроме всего перечисленного, широкому распространению моделей гипертонии на крысах способствуют такие факторы, как небольшие затраты на содержание животных, относительное легкое разведение и поддержание колоний, в сравнении с более крупными организмами [Lin и др., 2016].

В настоящее время существует 11 хорошо охарактеризованных инбредных линий крыс – генетических моделей артериальной гипертонии (Табл. 1). Со временем стало очевидно, что человеческая патология имеет разнородную этиологическую основу, и каждая из существующих в настоящее время моделей (гипертензивных линий) отражает какую-то из разновидностей гипертонии [Corvol и др., 1999].

Таблица 1. Инбредные линии крыс – генетические модели АГ.

Линия (контроль)	Фенотип	Ссылки
SHR (WKY)	Спонтанная гипертензия	Okamoto, Aoki, 1963
GH (N)		Smirk, Hall, 1958
PHR (PNR)		Heller et al., 1993
FHH (BN)		Kuijpers, Gruys, 1984
SHR-SP (WKY)	Тяжелая гипертензия, инсульты	Okamoto et al., 1973
DS/Jr (DR/Jr)	Солечувствительная гипертензия	Dahl et al., 1962; Rapp, Dene, 1985
SBH/y (SBN/y)		Ben-Ishay et al., 1972
SJH-Rs (MW)		Rodríguez-Sargent et al., 1988
MHS (MNS)	Спонтанная гипертензия	Cusi et al. 1993
LH (LN, LL)	(легкая форма)	Sassard et al. 2003
НИСАГ/ISIAH (WAG)	Стресс-индуцированная гипертензия	Маркель, 1985; Markel, 1992; Ragaeva et al., 2017

Примечание: BN = Brown Norway rat; DSjr = Dahl salt-sensitive; DRjr = Dahl salt-resistant; FHH = Fawn hooded hypertensive; GH = genetically hypertensive; НИСАГ = наследственная индуцированная стрессом артериальная гипертензия (ISIAH = inherited stress induced hypertension); LH = Lyon hypertensive; LN = Lyon normotensive; LL = Lyon low blood pressure; SHR = spontaneously hypertensive rat; WKY = Wistar-Kyoto rat; MHS = Milan hypertensive strain; MNS = Milan normotensive strain; MW = Munich-Wistar rats; PHR = Prague hypertensive rat; PNR = Prague normotensive rat; SBH/y = Sabra hypertension prone; SBN/y = Sabra hypertension resistant; SHR = spontaneously hypertensive rat; SHR-SP = spontaneously hypertensive rat–stroke prone; SJH-Rs = San Juan hypertensive; WAG = Wistar albino Glaxo; WKY = Wistar-Kyoto rat. По Sarikonda с соавт., 2009 с модификациями.

1.1.3.1 Линии крыс со спонтанной гипертензией

Линия крыс SHR (Spontaneous Hypertensive Rats) [Okamoto, Aoki, 1963] является наиболее распространенной в мире генетической моделью для исследования гипертензии, и число экспериментальных работ, выполненных с использованием крыс этой линии, весьма велико [Pinto, Paul, Ganten, 1998]. Линия SHR имеет сходные проявления с эссенциальной гипертензией человека: гипертрофию сердца, склероз коронарных артерий, коронарную недостаточность. Эта генетическая модель используется для изучения патогенеза АГ и ее эффектов на сердечно-сосудистую систему. Впоследствии, из SHR была получена линия SHRSP (stroke prone SHR) со спонтанной гипертензией и склонностью к инсультам [Okamoto и др., 1973].

Линия SHR характеризуется гиперкинетическим фенотипом и используется в том числе в качестве модели синдрома дефицита внимания и гиперактивности у детей [Adriani и др., 2003; Meneses и др., 2011]. Однако, было установлено, что гиперактивность крыс данной линии не связана с гипертензией [Hendley, Ohlsson, 1991]. Кроме того, беременные крысы линии SHR были предложены для моделирования задержки внутриутробного развития (ЗВУР), вызванной АГ во время беременности у людей, так как на этих крысах была продемонстрирована схожая симптоматика с ЗВУР: низкая масса тела при рождении; микроцефалия; низкая скорость развития нейромоторных рефлексов и реакций, таких как рефлекс переворота, реакция отрицательного геотаксиса, рефлекс размещения в сравнении с крысами контрольной линии Wistar-Kyoto (WKY) [Bassan и др., 2005]. Следует, однако, отметить, что скорость формирования рефлексов была снижена только до 10-го дня жизни, в дальнейшем крысы линии SHR догоняли в развитии сверстников контрольной линии [Bassan и др., 2005].

Предпосылки к моделированию ЗВУР на линии SHR были сделаны вследствие обнаружения у них повышенного АД в том числе и во время беременности, однако к концу периода беременности и родам систолическое АД снижалось до нормальных величин [Aoi и др., 1976]. Оказалось, что такая динамика АД во время беременности является показателем нормально протекающей беременности у крыс, и наблюдается не только у гипертензивных SHR, но и нормотензивных WKY и Sprague-Dawley и связана с изменением параметров гемодинамики в ходе гестации и, в том числе, с NO-зависимой вазодилатацией [Deng, Engels, Baylis, 1996; Sladek, Magness, Conrad, 1997; Iacono и др., 2009]. Линия SHR, была предложена и в качестве модели метаболического синдрома [Aleixandre de Artiñano, Miguel Castro, 2009].

Интересно отметить, что у крыс другой гипертензивной линии Dahl с спровоцированной гипертензией на фоне повышенного потребления соли, которая будет подробно описана ниже, к концу беременности АД не только не снижается, но даже немного повышается [Gillis и др., 2015]. Такое ненормальное изменение АД во время беременности у крыс Dahl и другие

факторы позволили использовать её не только в качестве модели эссенциальной гипертензии, но и для моделирования наложенной (на хроническую гипертензию) преэклампсии [Gillis и др., 2015].

Другими, менее известными, линиями крыс с генетически обусловленной артериальной гипертензией, полученными путем традиционной селекции, являются Новозеландская линия (GH – genetically hypertensive) [Smirk, Hall, 1958] - в этой модели гипертензии ренин-ангиотензиновая система, задержка натрия и жидкости наряду с высокой солечувствительностью, по-видимому не играют ключевой роли [Simpson и др., 1994]; Лионская линия (LH, Lyon Hypertensive) - модель низкорениновой гипертензии, у которой имеется повышенная чувствительность прегломерулярных почечных сосудов к ангиотензину-II (Ang II) [Sassard, Lo, Liu, 2003]; Миланская линия (MHS, Milan Hypertensive Strain), у которой имеется мутация в гене, кодирующем аддуцин – белок, участвующий в транспорте натрия [Cusil и др., 1993]. Миланская линия крыс хорошо имитирует человеческую низкорениновую форму АГ [Bianchi и др., 1986].

Особое значение имеют модели гипертензии, имеющие различные сопутствующие заболевания, как это часто наблюдается в клинической практике. Следует отметить, что повышенный уровень холестерина в плазме наблюдается у модели Лионских крыс (LH), как это часто наблюдается при гипертензивной болезни человека [Vincent и др., 1996]. Другие линии могут сочетать гипертензию с ожирением, а часто и диабетом II типа, в том числе линия крыс Sprague-Dawley, склонных к ожирению («obesity prone Sprague-Dawley») [Dobrian и др., 2003], крысы линии Цукер с избыточным весом за счет ожирения («obese Zucker») [Alonso-Galicia и др., 1996] и другие им подобные [Imai и др., 2003; Silva da и др., 2004].

1.1.3.2 Линии крыс с спровоцированной гипертензией

Помимо линий крыс, у которых артериальная гипертензия возникает практически всегда, а условия среды либо отягощают, либо смягчают ее проявление, существуют и такие, у которых артериальная гипертензия возникает лишь при наличии провоцирующего фактора. Примером могут служить линии Dahl (США) и Sabra (Израиль), у которых важную роль играет локус, находящийся на половых хромосомах, и отвечающий за повышенную солечувствительность [Yagil и др., 2003]. Существует соль-чувствительная (Dahl Salt-Sensitive, DS) и соль-резистентная линии (Dahl Salt-Resistant, DR) – гипертензивная и нормотензивная соответственно. Развитие гипертензии у линии DS идет на фоне диеты с повышенным содержанием поваренной соли (8% NaCl) [Dahl, 1962]. Линии DS и DR не являлись инбредными изначально, каковыми они были ошибочно названы в литературе, только позже усилиями исследователей Rapp и Dene обе линии были доведены до инбредного состояния и получили названия SS/Jr и SR/Jr соответственно [Dene, Rapp, 1985].

Линия Dahl широко используется для моделирования соль-чувствительной гипертензии и хронического заболевания почек [Rapp, 2000]. Хорошо известно, что крысы линии DS устойчивы к инсультам, сердечной и почечной недостаточности [Dahl, 1962; Dene, Rapp, 1985], при этом они уязвимы к таким нарушениям, как гломерулосклероз и протеинурия [Rapp, 2000]. Кроме того, крысы линии Dahl характеризуются нарушением продукции оксида азота [Chen, Sanders, 1993; Szentiványi и др., 2002], усиленным оксидативным стрессом [Meng и др., 2002] и постоянной иммунной активацией [Mattson и др., 2006; Miguel De и др., 2010]. Все перечисленные факторы играют роль в патогенезе преэклампсии [Phipps и др., 2016], благодаря чему, после дополнительных исследований беременных самок крыс линии Dahl, как уже было сказано выше, они были признаны также моделью преэклампсии, наложенной на хроническую гипертензию [Gillis и др., 2015]. Было установлено, что крысы линии Dahl характеризуются аномальной динамикой АД, а также усиливающейся протеинурией во время беременности [Gillis и др., 2015].

Линии Sabra, так же, как и линии Dahl, бывают чувствительными и резистентными: Sabra hypertension-prone (SBH/y) и Sabra hypertension-resistant (SBN/y). Крысы чувствительной линии были получены введением дезоксикортикостерона на фоне повышенного содержания NaCl (1%) в воде для питья [Ben-Ishay, Saliternik, Welner, 1972]. Исследования демонстрируют признаки протеинурии и гломерулосклероза у соль-чувствительных крыс данной линии, которые, по-видимому, регулируются генами на хромосомах 1 и 17 [Yagil и др., 2002]. Кроме того, оксидативный стресс и воспаление у крыс линии Sabra предшествуют началу гипертонии и сопровождают ее [Sela и др., 2004]. Было обнаружено, что истощение запаса лейкоцитов с использованием антител приводит к значительному ослаблению развития гипертензии у крыс линии Sabra [Mazor и др., 2007]. Однако, подобные эксперименты на линии Dahl не приводили к улучшению АД, но ослабляли морфологические и функциональные повреждения в почке, вызванные гипертензией [Takahashi и др., 2017].

1.1.3.3. Трансгенные гипертензивные линии

Относительно недавно были получены и трансгенные гипертензивные линии, как крыс, так и мышей [Pinto, Paul, Ganten, 1998; Caron и др., 2002; Bader, 2010; Lee и др., 2017]. Исследования на трансгенных моделях позволяют установить, какую роль играют различные гены в регуляции АД [Lin и др., 2016]. Существуют конгенные линии, которые получают с помощью введения определенного сегмента хромосомы от другой линии путем обратного скрещивания [Lagrange, Fournié, 2010] и нокаутные. Примером служат крысы линии Tg53, полученные из соль-чувствительных крыс Dahl, которые подвержены ишемической болезни сердца, а также имеют повышенную экспрессию белка переносчика холестерина эфир в печени [Negreira и др., 2003]. Этот фермент является регулятором обмена липопротеинов, а его повышенную

экспрессию связывают с патогенезом артериальной гипертензии и увеличением риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний при метаболическом синдроме [Frühbeck, Salvador, 2004].

Особо следует остановиться на генетической линии крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией (НИСАГ/ в зарубежной литературе ISIAN) – единственной линии, у которой повышенное АД не является спонтанным или солечувствительным, а вызвано действием эмоционального стресса.

1.1.4 Характеристика линии крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией (НИСАГ)

Линия крыс НИСАГ была получена в Институте Цитологии и Генетики СО РАН д.б.н., профессором Аркадием Львовичем Маркелем из аутбредной популяции крыс Wistar ($n = 283$), в которой средняя величина АД составляла 118 мм рт. ст. у самцов и самок [Маркель, 1985; Loskutova, Dubrovina, Markel', 2007]. В исходной группе только пять самцов (1.7%) имели базальное АД, превышающее условный гипертензивный порог в 150 мм рт. ст. Мягкий эмоциональный стресс, вызванный рестрикцией животного в течение 30 минут, повысил средние величины АД до 127 мм рт. ст., при этом уже 54 крысы (19.1%), как самцы, так и самки, имели АД, превышающее 150 мм рт. ст., что позволило провести отбор животных с повышенной реакцией на стресс и начать селекцию. На первом этапе селекции на протяжении 17 поколений близкородственных скрещиваний избегали, в дальнейшем был осуществлен инбридинг на протяжении более 30 поколений [Redina, Markel, 2018]. В результате была получена высоко инбредная линия НИСАГ [Адаричев и др., 1996], которая была зарегистрирована в международной базе Rat Genome Database (RGD), ID 2292168. Линия прошла через процедуру редеривации, получила SPF-статус и поддерживается в коллекции SPF-вивария ИЦиГ СО РАН [Амстиславский и др., 2013; Ragaeva и др., 2017]. Уровень среднего базального АД крыс линии НИСАГ, измеренного за последние три года, составляет 165-175 мм рт. ст., средние величины при рестрикционном стрессе - 190-200 мм рт. ст. [Redina, Markel, 2018].

НИСАГ является единственной линией крыс, у которой наряду с эндогенными генетическими предпосылками, дополнительным фактором, инициирующим повышение АД, является эмоциональный стресс. Изучение патогенетических механизмов формирования гипертензивного статуса у крыс линии НИСАГ может дать важные сведения для вынесения суждения о возможной роли гормонов стресса в патогенезе гипертонической болезни.

Формирование гипертензии в онтогенезе крыс линии НИСАГ происходит постепенно. В возрасте трех недель крысы линии НИСАГ имеют такой же уровень базального АД, как и крысы линии Wistar (102 ± 4.3 и 103 ± 3.2 мм рт. ст. соответственно), но они уже отвечают на

стресс значительным повышением АД, в отличие от крыс линии Wistar [Markel и др., 1999]. К четырем неделям жизни у крыс линии НИСАГ достоверно повышено не только стресс-индуцированное, но и базальное АД, обнаруженные различия увеличиваются с возрастом [Маханова и др., 1997].

Крысы линии НИСАГ характеризуются рядом физиологических признаков, которые могут являться как следствием наличия у них гипертензии, так и быть причиной развития патологии. В первую очередь, необходимо рассмотреть состояние органов-мишеней АГ, то есть сердца, почек, а также надпочечников. Морфометрический анализ сердечной мышцы крыс линии НИСАГ свидетельствует о выраженной гипертрофии миокарда и умеренном кардиосклерозе у взрослых крыс данной линии [Шмерлинг, Филюшина, Коростышевская, 1996]. Помимо этого, ультраструктурный анализ выявил повышенную секреторную активность предсердных кардиомиоцитов и избыточное накопление в них секреторных гранул на разных этапах онтогенеза крыс линии НИСАГ [Коростышевская, Максимов, 2013]. Нарушения функционирования сердца у взрослых крыс линии НИСАГ были отражены на ЭКГ [Якобсон, Сахаров, Маркель, 1994]. Были выявлены признаки структурного ремоделирования миокарда уже в периоде раннего постнатального онтогенеза (с 14 дня после рождения) [Суслонова, Рощевская, Распутина, 2016].

Ультраструктурное исследование почек крыс линии НИСАГ выявило морфологические признаки гипертрофии почечных клубочков, нарушение в них гемоциркуляции и функциональное напряжение подоцитов, а также признаки гломерулосклероза [Шмерлинг и др., 2001a; Шмерлинг и др., 2001b]. Однако, дальнейшие исследования, проведенные у крыс линий НИСАГ и WAG не подтвердили обнаруженных ранее морфологических различий в почке [Amstislavsky и др., 2006]. Морфологические исследования мозгового вещества надпочечников крыс НИСАГ выявили структурные изменения, которые свидетельствуют о повышенной активности хромоаффинных клеток уже в препубертатном периоде онтогенеза [Бузуева и др., 2006].

Что касается структурных исследований мозга крыс НИСАГ в сравнении с Wistar, они были проведены с использованием метода магнитно-резонансной томографии (МРТ); было обнаружено, что относительные размеры коры больших полушарий, гиппокампа, гипоталамуса, нейро- и аденогипофиза не имели достоверных межлинейных различий, однако абсолютный объем 3-го желудочка у крыс линии НИСАГ ($2,52 \pm 0,11$ мм³) значительно уступал объему 3-го желудочка крыс Wistar ($4,31 \pm 0,29$ мм³), что свидетельствует об изменении условий циркуляции спинномозговой жидкости при артериальной гипертензии [Серяпина и др., 2015].

Как известно, стрессовая реакция, как и АД, регулируется нейроэндокринной системой, включая САС и ГГНС. Реакция АД на стрессорные стимулы являются частью общей реакции на стресс. Как же реализуется стрессовая реакция у крыс НИСАГ? Наблюдается повышенная реактивность САС, выражающаяся в увеличении содержания адреналина в надпочечниках интактных крыс НИСАГ, так и повышения концентрации адреналина и норадреналина в плазме крови при эмоциональном стрессе, связанном с забором проб крови [Markel и др., 2007; Antonov и др., 2016]. Также отмечено повышение стресс-реактивности ключевых гормонов ГГНС: экспрессия мРНК кортикотропин рилизинг гормона в гипоталамусе как в покое, так и при стрессе; экспрессия мРНК проопиомеланокортина в гипофизе, секреция адренотропного гормона (АКТГ) гипофизом и кортикостерона корой надпочечника при разных видах стресса, в том числе социального [Markel и др., 2007]. Масса надпочечников у взрослых крыс НИСАГ увеличена [Amstislavsky и др., 2006]. Усиленный эффект стресса и АКТГ на секрецию основного минералокортикоида – альдостерона был обнаружен у крыс НИСАГ [Antonov и др., 2016]. Однако, ренин-ангиотензиновая система ингибирована в почках крыс НИСАГ [Amstislavsky и др., 2006]. В плазме крови концентрация ренина и ангиотензин-конвертирующего фермента не изменена, однако концентрация ангиотензина II и альдостерона немного повышена по сравнению с нормотензивным контролем. Более того, было показано, что юкстагломерулярный ренин почки у крыс НИСАГ понижен, а также понижена экспрессия соответствующей мРНК в плотном пятне (*macula densa*) [Amstislavsky и др., 2006]. Было обнаружено, что базальная активность локальной ренин-ангиотензиновой системы в мозговых структурах крыс НИСАГ повышена и может быть задействована в формирование их гипертензивного статуса [Климов и др., 2012]. Это предположение было подтверждено в эксперименте, где проводилась хроническая блокада центральной (мозговой) РАС, которая приводила к снижению уровня АД у крыс НИСАГ [Klimov и др., 2017].

Особенности поведения крыс линии НИСАГ были изучены в нескольких работах [Маркель, 1986; Маркель, Галактионов, Ефимов, 1988; Мешков и др., 2012; Redina и др., 2009]. Были получены данные по сравнительному анализу поведения гипертензивных крыс линий SHR, НИСАГ и нормотензивных крыс линии Wistar в тесте открытого поля (ТОП). В то время как у крыс линии SHR сохранялась высокая локомоторная активность на протяжении всей серии тестов, у крыс линии НИСАГ она снижалась по мере привыкания к площадке от первого теста к последнему, а в последнем показатели подвижности не отличались от нормотензивных крыс Wistar. Это позволяет сделать вывод о том, что крысы линии НИСАГ обладают поведенческой реактивностью, то есть их активность вызвана именно новыми условиями, в отличие от крыс линии SHR, которые спонтанно активны, независимо от окружения [Маркель, 1986].

Поведенческие особенности крыс НИСАГ в ТОП имеют свое отражение в геноме. Поведенческие показатели, характеризующие двигательную активность крысы за первую минуту тестирования и двигательную активность на периферии ТОП, достоверно выше у НИСАГ по сравнению с WAG. Более того, методом QTL анализа (Quantitative Trait Locus analysis) было показано, что участки генома, ответственные за данные признаки находятся на 2-й и 16-й хромосомах соответственно [Redina и др., 2009].

В исследованиях способности крыс линии НИСАГ к обучению путем изучения условных реакций активного и пассивного избегания было обнаружено, что задержка приобретения крысами линии НИСАГ условного навыка активного избегания происходит только при многократном повторении аверсивных стимулов, которые вызывают у них панический страх и неадекватное поведение [Лоскутова, Дубровина, Маркель, 2006]. В приобретении реакции пассивного избегания в ответ на однократный болевой стимул крысы линии НИСАГ ничем не отличались от нормотензивных контролей – Вистар и WAG [Лоскутова и др., 2006]. В то же время крысы со спонтанной гипертензией SHR демонстрировали противоположные результаты в обеих поведенческих задачах [Лоскутова и др., 2006; Лоскутова, Дубровина, Маркель, 2006]. Обнаруженные различия в способностях к обучению у крыс с разными формами артериальной гипертензии позволяют сделать предположение о независимости процессов памяти от повышенного АД. Данное предположение подтвердилось позже, когда в аналогичном эксперименте уровень тревожности крыс линии НИСАГ начали подавлять диазепамом. Системное введение препарата значительно ускорило реакцию избегания болевого раздражителя по сравнению с НИСАГ контролем [Лоскутова, Филатов, 2007].

Известно, что гипертензивный статус матери может оказывать влияние на развитие потомства в раннем постнатальном онтогенезе, однако раннее развитие крысят линии НИСАГ изучено слабо. Лишь некоторые показатели моторного развития рассмотрены в единственной работе [Мешков, Алехина, Морева, 2014]. В этой работе было показано, что крысята линии НИСАГ отстают по показателям моторного развития от крысят линии WAG в первую неделю жизни, однако на протяжении второй недели развития показатели выравнивались, а по некоторым крысята линии НИСАГ даже опережали крысят линии WAG. Не было обнаружено различий по показателям соматического развития, а именно по росту вибрисс и образованию шерстного покрова [Мешков, Алехина, Морева, 2014].

1.2. Применение ВРТ для лечения бесплодия человека

В настоящее время все большее количество пар репродуктивного возраста при планировании семьи сталкивается с диагнозом “бесплодие” (по оценкам 8%-12% в мире) [Inhorn, Patrizio, 2015]. Согласно критериям ВОЗ бесплодие диагностируется при не наступлении беременности у молодой пары (прежде всего, важен возраст женщины – 19-35 лет) при

активной половой жизни в течение одного года [Rowe и др., 1993]. При этом мужской фактор (нарушение подвижности и морфологии сперматозоидов) ответственен примерно в 40% случаев заболевания, женский фактор (непроходимость маточных труб, гормональные нарушения, нарушения овуляции) примерно в 40% случаев заболевания, и около 20% случаев приходится на сочетанное действие мужского и женского фактора [Brazdova и др., 2016]. Помимо этого, обсуждается возможность идиопатических случаев бесплодия, первопричины которых остаются под вопросом [Siristatidis, Bhattacharya, 2007].

В современном мире вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) широко применяются в клинической практике, в мире уже более семи миллионов детей, рожденных таким образом [Adamson и др., 2018]. Современный комплекс ВРТ включает: экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) [Steptoe, Edwards, 1978; Chronopoulou, Harper, 2015]; интрацитоплазматическую инъекцию сперматозоида (ИКСИ) (Intracytoplasmic Sperm Injection, ICSI) [Palermo и др., 1992; Rubino и др., 2016]; криоконсервацию ооцитов [Cobo и др., 2010] /сперматозоидов[O’Neil, 2019] и преимплантационных эмбрионов [Mohr, Trounson, 1985; Pereira и др., 2019]; преимплантационную генетическую диагностику [Handyside и др., 1990; Schoolcraft и др., 2011]. Далее каждый из методов будет описан подробно.

1.2.1 Экстракорпоральное оплодотворение

Первоначальный вариант ЭКО, разработанный исследователем Робертом Эдвардсом и его коллегой врачом Патриком Стептоу был направлен, главным образом, на преодоление женского бесплодия [Steptoe, Edwards, 1978]. Суть этого метода состоит в том, чтобы получить ооцит из яичника с использованием лапароскопии (в настоящее время используют трансвагинальную пункцию ооцитов [Saxena и др., 2018]), экстракорпорально (*in vitro*) оплодотворить его путем смешивания с суспензией сперматозоидов, а затем ввести полученный эмбрион обратно в полость матки для дальнейшего развития [Steptoe, Edwards, 1978]. Известно, что в естественном цикле у женщин овулирует один, реже два ооцита, однако для того, чтобы повысить эффективность ВРТ, перед пункцией и забором содержимого фолликула используют протоколы стимуляции суперовуляции у пациентки [Polat, Bozdog, Yagali, 2014]. Для этого используются гонадотропные препараты – фолликулостимулирующий и лютеинизирующий гормоны и/или хорионический гонадотропин человека и другие гормональные препараты. Более подробно о протоколах суперовуляции в обзоре Лехерт с соавторами [Lehert и др., 2014]. Для получения сперматозоидов используют следующие методы: их могут получать непосредственно от пациента (эякулят), либо хирургическим путем из эпидидимисов и семенников, в зависимости от того, наблюдаются ли нарушения сперматогенеза и соответствует ли спермограмма (т.е. количественная и качественная оценка параметров эякулята) норме [Jamal и др., 2012].

В некоторых ранних протоколах ЭКО перенос эмбриона в репродуктивные пути осуществлялся на стадии зиготы [Scott, Smith, 1998], позднее, когда в эмбриологических лабораториях появились условия для культивирования эмбрионов *in vitro* (IVC – *in vitro* culture), перенос эмбриона на стадии дробления (2-3 день после оплодотворения) стал рутинной процедурой в клинике до тех пор, пока Гарднер с соавторами не предложил еще более длительное культивирование перед переносом – до стадии бластоцисты (5, редко 6 день после оплодотворения) [Gardner и др., 1998]. Такой подход позволяет отобрать лучшие по качеству эмбрионы, оценивая скорость их развития и морфологию, а также избежать многоплодной беременности путем переноса лишь одного эмбриона, поскольку при длительном культивировании эмбрионы, содержащие генетические аномалии, останавливаются в развитии и погибают и, таким образом, становится возможным отобрать только качественные эмбрионы для трансплантации [Blake, Farquhar, 2007].

1.2.2 Интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида

Тем не менее, ЭКО лишь частично позволяет преодолеть мужской фактор бесплодия, который как уже было указано выше, встречается примерно в таком же проценте случаев, как и женский (около 40%) [Brazdova и др., 2016]. Мета-анализ по результатам 185 работ, включающих образцы от 42 935 мужчин с 6 континентов и 50 стран, свидетельствует о значительном снижении (на 50-60%) общего числа и концентрации сперматозоидов в образцах мужчин с неизвестной фертильностью из Северной Америки, Европы, Австралии и Новой Зеландии за последние четыре декады [Levine и др., 2017]. Устойчивая тенденция к возрастанию мужского фактора бесплодия выразилась в изменении критериев ВОЗ по оценке характеристик спермы человека [Cooper и др., 2010]. Согласно этих современных критериев, «нормой» считаются следующие показатели (не ниже): 32% прогрессивно подвижных сперматозоидов, 4% морфологически нормальных, при этом концентрация сперматозоидов должна составлять не менее 15 млн в мл эякулята. В силу того, что показатели по спермограмме человека существенно снизились в большинстве стран, в современных клиниках все чаще прибегают к использованию не традиционного ЭКО, а относительно нового метода – ИКСИ, при котором единственный сперматозоид вводится под мембрану ооцита для оплодотворения [Palermo и др., 1992; Rubino и др., 2016]. Согласно данным национальных и региональных реестров по всему миру, использование ИКСИ возросло с 39,6% циклов в 1997 году до 58,9% в 2004 году [Nyboe Andersen, Carlsen, A., 2008]. В отличие от традиционного ЭКО, при ИКСИ, ооциты, полученные при пункции, подвергаются денудации (освобождение от фолликулярных клеток); источник сперматозоидов, как и при ЭКО, может быть разным (эякулят, эпидидимисы, семенник) [Jamal и др., 2012].

Несмотря на постоянное улучшение технологических этапов циклов ЭКО/ИКСИ, условий культивирования, протоколов стимуляции, эффективность современных протоколов остается довольно низкой. Согласно данным международного комитета по мониторингу репродуктивных технологий в 2011 году глобальная частота наступления беременности (ЧНБ) и частота родов (ЧР) в расчете на пункцию в «свежих» циклах ЭКО составила 24.0% и 17.6% соответственно; для ИКСИ – 26.2% и 19.0% [Adamson и др., 2018]. ЧР в расчете на пункцию в комбинированных «свежих» циклах ЭКО/ИКСИ варьировала от 7.9% (в Японии) до 59.4% (в Мали) по 65 странам [Adamson и др., 2018]. Число и доля циклов, в которых используются размороженные эмбрионы, неуклонно растет и влияет на общую эффективность ВРТ [Pereira и др., 2019]. Поэтому для оценки эффективности программ ВРТ прибегают к так называемым суммарным показателям по результатам переноса как размороженных эмбрионов, так и эмбрионов, полученных из «свежих» циклов. ЧР по суммарным данным от размороженных и «свежих» циклов составила 28% в 2011 году, в сравнении с 25.2% в 2006 году [Adamson и др., 2018].

1.2.3 Отдаленные эффекты применения ВРТ на потомство

Несмотря на длительное применение (более 40 лет) ВРТ в клинической практике, отдаленные эффекты этих технологий на потомство до сих пор остаются не изученными в полной мере. Отчасти это связано с относительно молодым возрастом пациентов, рожденных с использованием ВРТ, а также с разнообразием протоколов, применяемых в разных клиниках. Помимо этого, существуют и этические ограничения.

1.2.3.1. Перинатальные осложнения и осложнения беременности

Хорошо документировано, что беременность, вызванная ВРТ, подвержена более высокому риску неблагоприятных исходов, но это связано главным образом с более высокой частотой многоплодной беременности при применении ВРТ [Qin и др., 2015]. Перенос двух или более эмбрионов достаточно часто применяется в центрах ЭКО, т.к. это повышает ЧНБ, а, следовательно, успех ВРТ [Reynolds и др., 2003], однако при многоплодной беременности наблюдается высокий процент (80%) осложнений, таких как преждевременные роды, внутриутробная задержка развития, внутриутробная гибель плода, гестационный сахарный диабет и преэклампсия [Norwitz, Edusa, Park, 2005]. В естественной популяции частота многоплодной беременности не превышает 2%, в то же время она поднимается до 40-50% среди беременностей, вызванных ВРТ [Reynolds и др., 2003]. Реализация подхода, при котором осуществляют перенос лишь одного эмбриона, позволяет практически избежать риска возникновения многоплодной беременности, а, следовательно, и связанных с ней осложнений. Но даже при одноплодной беременности, наступившей в результате ВРТ, наблюдается повышенный риск возникновения различных отклонений по сравнению со спонтанной

одноплодной беременностью: гипертензия беременных; гестационный сахарный диабет; предлежание и отслоение плаценты; преждевременные роды; низкий вес при рождении; перинатальная смертность и врожденные пороки развития, как было показано в недавнем мета-анализе 50-ти когортных исследований [Qin и др., 2016].

1.2.3.2. Сердечно-сосудистые и метаболические заболевания

Согласно гипотезе DOHAD (Developmental Origins of Health and Disease), сформулированной Дэвидом Баркером, здоровье и болезни взрослого человека программируются в раннем онтогенезе, включая пренатальный период [Bateson и др., 2004; Barker, 2007]. Изначально данная гипотеза была сформулирована для гипертонии и сердечно-сосудистой системы, но в дальнейшем получила точки приложения для других органов и функциональных систем организма. Ранние исследования показали, что у детей, рожденных в результате ВРТ, в препубертантном периоде наблюдается небольшое, но достоверное повышение САД (109 ± 11 vs. 105 ± 10 мм рт. ст.) и ДАД (61 ± 7 vs. 59 ± 7 мм рт. ст.) [Ceelen и др., 2008]. Были предприняты попытки объяснения данного феномена, таким образом, было установлено, что у таких детей имеет место дисфункция эндотелия и снижение эластичности сосудов [Scherrer и др., 2012; Scherrer и др., 2015]. В последние годы было накоплено достаточно когортных исследований для проведения первого исчерпывающего мета-анализа по кардиометаболическим профилям детей, рожденных в результате ВРТ [Guo и др., 2017]. По результатам мета-анализа 19 исследований было обнаружено, что величины сАД и дАД достоверно повышены у детей и молодых людей, рожденных в циклах ЭКО-ИКСИ, однако следует отметить, что величина различия зависела от года, в который были рождены дети, таким образом, рожденные в течение 1990-1999 гг. имели повышенные величины сАД в среднем на 4 мм рт. ст., а у рожденных в более поздние годы (2000-2009) величины сАД у детей были сравнимы с естественно зачатыми сверстниками [Guo и др., 2017]. Возможным объяснением такого разделения является постоянный прогресс и развитие ВРТ, в частности, совершенствование сред для культивирования эмбрионов *in vitro* [Раннева и др., 2020]. Что касается метаболических показателей, у детей, рожденных в циклах ЭКО-ИКСИ, наблюдались сравнимые величины индекса массы тела, более низкое содержание липопротеинов низкой плотности и более высокий уровень инсулина по сравнению со сверстниками, зачатыми естественным путем [Guo и др., 2017]. Guo с соавторами (2017) выделяет четыре основных фактора, лежащих в основе наблюдаемых различий в величинах АД: субфертильность пары; влияние процедуры ВРТ; внутриутробная среда и образ жизни потомства.

1.2.3.3. Онкологические заболевания

В литературе обсуждается вероятность повышенного риска развития рака у детей, рожденных с применением ВРТ, однако результаты немногочисленных мета-анализов противоречивы [Raimondi, Pedotti, Taioli, 2005; Hargreave и др., 2013; Wang и др., 2019]. В раннем исследовании Раймонди с соавт. (2005) не было обнаружено взаимосвязи между применением ВРТ и частотой возникновения онкологических заболеваний. В недавно опубликованном мета-анализе, как и в мета-анализе 2013 года [Hargreave и др., 2013], было обнаружено достоверное повышение риска возникновения онкологических заболеваний у детей рожденных после применения ВРТ (ОР=1.16, 95% ДИ: 1.01 – 1.32) [Wang и др., 2019]. Однако, в обеих работах невозможно установить, какой фактор лежал в основе обнаруженных различий – изначальная субфертильность пары или непосредственно лечение с использованием ВРТ. Данные Людвиг с соавторами свидетельствуют о том, что эпигенетические изменения, которые могут приводить к возникновению опухолей, более вероятно являются следствием бесплодия пары, нежели влиянием самой процедуры [Ludwig и др., 2005]. В исследованиях последних лет для сравнения все чаще используют наиболее адекватную контрольную группу, состоящую из субфертильных пар, которым, несмотря на поставленный диагноз, удавалось зачать ребенка естественным путем. Одна из последних работ на достаточно большой выборке (почти 50 000 детей) и с длительным периодом наблюдения до 21 года, в среднем, после рождения не выявила достоверного повышения риска возникновения раковых опухолей у молодых людей, рожденных в результате ВРТ, по сравнению с людьми, рожденными в субфертильных парах [Spraan и др., 2019]. Тем не менее, несмотря на обнадеживающие результаты, для всестороннего изучения данного вопроса требуются дальнейшие исследования.

1.2.3.4 Когнитивные нарушения

Одно из первых глобальных исследований, вызвавших значительный общественный резонанс, на выборке из более 2.5 миллионов детей в Швеции показало, что проведение ИКСИ с последующим переносом эмбрионов, не подвергавшихся криоконсервации, повышает риск развития заболеваний аутистического спектра и умственной отсталости у детей в сравнении с традиционным ЭКО и естественно рожденными [Sandin и др., 2013]. Впоследствии обнаруженный результат был подтвержден в работе Киссин с соавторами на выборке из США [Kissin и др., 2015]. В первом мета-анализе, включающем три когортных исследования и восемь исследований типа «случай-контроль» и общим числом выборки более восьми миллионов детей, было выявлено, что использование ВРТ (объединенная группа, включающая

как ЭКО, так и ИКСИ) ассоциируется с достоверным повышением риска развития заболеваний аутистического спектра [Liu и др., 2017].

1.3 Модификация материнской среды как инструмент изучения генетически обусловленных признаков на лабораторных животных

В этой главе рассмотрены следующие инструменты для изучения модификации пре-и постнатальной материнской среды:

- Кросс-фостеринг
- Диета матерей (во время беременности и вскармливания)
- Пренатальный стресс
- Пренатальное введение глюкокортикоидов
- Репродуктивные технологии

Первые эксперименты по изменению постнатальной материнской среды путем кросс-фостеринга лабораторных животных по влиянию на агрессивное поведение животных начались задолго до разработки репродуктивных технологий [Rasmussen, 1939]. Кросс-фостеринг (перекрестное воспитание) заключается в обмене потомством на ранней стадии неонатального онтогенеза (обычно в течение 1-2 дней после рождения) между матерями разных генотипов, экспериментальных групп либо видов [McCarty, 2017]. Существует несколько разных вариантов кросс-фостеринга: в первом варианте происходит полный обмен потомством полностью между целевыми самками; во втором варианте обменивают лишь одного потомка; в третьем варианте выводки делят на две равные части и обменивают одну часть таким образом, чтобы общее число потомков в выводке оставалось постоянным [McCarty, 2017]. Идеальным контролем к кросс-фостерингу выступает ин-фостеринг, т.е. обмен потомством между матерями одного генотипа, экспериментальной группы или вида. В большинстве работ не находили признаков какого-либо влияния ин-фостеринга на потомков в сравнении с потомками, выращенными их биологическими матерями, хотя в некоторых работах на мышах показано, что воспитание мышат приёмными матерями той же линии усиливало проявления агрессивного поведения [Cox, So, Rissman, 2013] и изменяло некоторые кардиометаболические показатели [Matthews и др., 2011]. В работе, выполненной на крысах, было показано, что как кросс-фостеринг между гипертензивными крысами НИСАГ и нормотензивными Вистар, так и ин-фостеринг приводил к повышению АД у матерей Вистар [Амстиславский, Маркель, Якобсон, 1999]. В работах на таких млекопитающих, как овцы, козы и обезьяны, характеризующихся сложным социальным поведением и иерархией, было продемонстрировано что изменение материнской среды путем кросс-фостеринга оказывает мощное влияние на такие важные характеристики, как социальный статус в иерархии и предпочтения в выборе полового партнера [Suomi, 1997; Kendrick и др., 2001]. Помимо кросс-

фостеринга, для модификации материнской среды использовались такие инструменты, как диета (недостаточное либо избыточное питание матери) и пре- и неонатальный стресс, а также пренатальное введение глюкокортикоидов [Weinstock, 2008; Harrison, Langley-evans, 2009; Solano и др., 2016]. Применение последних и их последствия были подробно описаны в нашем обзоре [Рагаева и др., 2018].

В дальнейшем с разработкой репродуктивных технологий, наряду с кросс-фостерингом, начали использовать такие инструменты, как перекрестный перенос эмбрионов [Kubisch, Mathialagan, Gomez-Sanchez, 1998] и длительное культивирование *in vitro* эмбрионов перед переносом [Ecker и др., 2004; Watkins и др., 2007]. Однако, следует отметить, что работы по влиянию IVC на развитие потомков были проведены в основном на мышах. На гипертензивных моделях, созданных на крысах, влияние IVC на потомство до нашей работы вообще не изучали.

Огромное число исследований накопилось за последние 80 лет в этом направлении, основные результаты, полученные с применением этих методов, были проанализированы и структурированы в обзоре Ричарда Маккарти [McCarty, 2017]. В этой главе будут подробно рассмотрены отдаленные эффекты кросс-фостеринга, а также эмбриотрансфера и культивирования эмбрионов млекопитающих, в том числе на развитие гипертензивного фенотипа на генетических моделях гипертензии, созданных на крысах.

1.3.1. Репродуктивные технологии

Культивирование эмбрионов *in vitro* является, вероятно, самым важным фактором, приводящим к изменению эпигенетического перепрограммирования и влияющим на развитие эмбрионов животных. Для оценки долговременных эффектов ВРТ на потомство, культивирование эмбрионов и эмбриотрансфер чаще всего проводят в комплексе [Watkins et al., 2007]. Такой комплекс (IVC + эмбриотрансфер) может осложняться суперовуляцией, а также оплодотворением *in vitro*. Относительно недавно был обнаружен синергический эффект между IVC и типом рациона, назначаемого пре- и постнатально, в отношении его влияния на тревожность и поведение потомства мышей [Strata и др., 2015].

Первым по времени обнаружения и наиболее значимым изменением фенотипа у животных, вызванным IVC, является синдром больших новорожденных, обнаруженный у крупного рогатого скота и овец (large offspring syndrome - LOS) [Young, 1998]. Он характеризуется большими размерами плода при рождении, грубыми нарушениями в различных органах, главным образом, висцеромегалией, и метаболическими изменениями, гипогликемией, пупочной грыжей и макроглоссией [Walker, Hartwich, Seamark, 1996; Farin, Crosier, Farin, 2001; Li, Donnelly, Rivera, 2019] с частотой встречаемости порядка 10% среди всех рожденных с использованием ВРТ телят [Li, Donnelly, Rivera, 2019]. Следует отметить, что признаки LOS

сходны с теми, которые обнаруживаются при у людей, который является достаточно частым осложнением при применении ВРТ у людей [Chen и др., 2013]. Особый интерес представляет то, что эпигенетические изменения при LOS очень похожи на те, которые обнаружены при синдроме Беквита-Видемана [Hogí и др., 2010]. Многочисленные клинические исследования на людях подтверждают взаимосвязь между применением ВРТ и возникновением синдрома Беквита-Видемана [DeAngelis, Martini, Owen, 2018], при этом абсолютный риск возникновения этого синдрома ($<1:1.000$) существенно превышает риск в обычной популяции ($1:10.000$) [Brioude и др., 2018].

В исследованиях на мышах были получены разноплановые результаты по эффектам культивирования и переноса эмбрионов (ПЭ): в некоторых работах сообщается об отсутствии негативных эффектов культивирования и эмбриотрансфера на перинатальный период развития полученных потомков [Hemkemeyer и др., 2014], однако другие работы, где использовалась комбинация IVC и эмбриотрансфер, демонстрировали специфические изменения в тревожном поведении и пространственной памяти взрослых животных [Ecker и др., 2004]. Исследователи предполагают, что причиной таких изменений могут служить нарушения в гиппокампе и миндалевидном теле [Ecker и др., 2004]. Непосредственно перенос эмбрионов без IVC приводил к изменениям в социальном, исследовательском и тревожном типах поведения [Lerch и др., 2016]. А именно, самки мышей, рожденных после эмбриотрансфера, имели повышенную тревожность, но вместе с тем повышенную социальную активность по сравнению с контролем. Помимо этого, эффекты переноса эмбрионов на поведение потомства были разными в зависимости от генотипа реципиента [Lerch и др., 2016]. При этом самки показали себя более восприимчивыми к эффектам переноса, чем самцы. Кроме того, в данном исследовании было обнаружено влияние самой хирургической процедуры, ассоциированной с переносом эмбрионов, на материнское поведение [Lerch и др., 2016].

Помимо эффектов ВРТ на поведение, были обнаружены эффекты IVC, независимо от ТЭ, на повышение сАД у мышей в возрасте 21 недели [Watkins и др., 2007]. В этой же работе было обнаружено повышение активности некоторых ферментов, участвующих в контроле глюконеогенеза [Watkins и др., 2007]. В работе Донжакур с соавт. (2014) величины сАД и дАД у самцов мышей, рожденных после ЭКО и культивирования в субоптимальных условиях, не были повышены, несмотря на гипертрофию левой половины сердца [Donjasour и др., 2014]. Тем не менее, в последующих работах, в которых изучали эффекты непосредственно IVC, не было обнаружено значительного влияния IVC на АД [Ramirez-Perez и др., 2014; Schenewerk и др., 2014]. Однако, в условиях диеты с высоким содержанием жиров у мышей, полученных в результате суперовуляции и последующего культивирования эмбрионов, которые были

оплодотворены *in vivo*, наблюдалась нарушенная эндотелиально-зависимая вазодилатация артерий и структурные изменения сосудистой системы [Ramirez-Perez и др., 2014].

Причины, вызывающие настолько значительные фенотипические изменения у потомков, рожденных в результате применения ВРТ, до сих пор остаются не до конца изученными. Однако, исследователи выдвигают различные гипотезы: некоторые из них связаны с изначальным состоянием бесплодия у будущих родителей, и, как следствие, ухудшение качества гамет и преимплантационных эмбрионов [Torrealday, 2014]. Однако, моделирование на животных, не страдающих бесплодием, позволило выявить нарушения, подобные тем, которые возникают при ВРТ у людей, что позволяет предположить, что именно ВРТ вызывают такого рода нарушения [Chen и др., 2015]. Известно, что основные события по эпигенетическому программированию и репрограммированию генома происходят в период созревания гамет и сразу после оплодотворения [Cantone, Fisher, 2013]. Манипуляции с гаметами и эмбрионами в данный период их развития приводит к изменению их эпигенетического профиля [Rivera и др., 2008]. Более всего затрагиваются гены импринтинга *H19* и другие, которые как известно являются основными регуляторами роста и развития плода [Doherty и др., 2000]. Таким образом, это приводит к различным нарушениям, в частности, к существенному повышению частоты импринтинговых заболеваний у потомства – синдрома BWS и Ангельмана [DeAngelis, Martini, Owen, 2018].

Как известно, применение ВРТ вызывает эпигенетические изменения не только в эмбрионе, но и в плаценте [Bloise, Feuer, Rinaudo, 2014; Chen и др., 2015]. В последние годы изучение изменений в плаценте, связанных с применением ВРТ, таких как изменение массы и морфологии плаценты, а также изменения экспрессии генов, и соответственно нарушение ее нормально функционирования в связи с изменением структуры, изучается более тщательно [Bloise, Feuer, Rinaudo, 2014; Vrooman, Xin, Bartolomei, 2016]. Для млекопитающих плацента является важным органом, через который опосредуется связь матери и плода, таким образом любая ее дисфункция, в частности, вызванная применением ВРТ, может вызвать нарушения и у плода, а в дальнейшем в соответствии с гипотезой DONaD у взрослого организма.

Другим подходом к объяснению возникновения нарушений у потомков вследствие применения различных ВРТ может быть отсутствие взаимодействия между матерью и эмбрионом в виде сигнальных молекул на преимплантационных стадиях развития [Fazeli, Holt, 2016]. Присутствие эмбриона распознается репродуктивным трактом через эти сигналы, и таким образом происходит подготовка к имплантации. Таким образом, *in vivo* происходит синхронизация между жизнеспособным эмбрионом и рецептивным эндометрием [Robertson и др., 2011].

В достаточно обширной литературе, посвященной влиянию изменения материнской среды (кросс-фостеринг, перенос эмбрионов), отсутствуют работы, в которых бы исследовали долгосрочные эффекты культивирования эмбрионов по отношению к гипертензивным моделям, созданным на лабораторных животных [Рагаева, Брусенцев, Амстиславский, 2014]. В следующем разделе обзора проанализирована соответствующая литература, касающаяся результатов применения перекрестного воспитания и (или) переноса эмбрионов по отношению к гипертензивным моделям.

1.3.2. Кросс-фостеринг и перекрестный перенос эмбрионов как фактор модификации гипертензивного статуса

Влияние ранней материнской среды на проявление гипертензии систематически изучалось на крысах линии со спонтанной гипертензией (SHR) и контрольных крысах линии WKY. В одном из ранних исследований [Cierpial, McCarty, 1987a], в котором выводки этих контрастных линий подвергали кросс- или ин-фостерингу (то есть, их воспитывали приемные матери альтернативной линии, либо своей собственной линии), было продемонстрировано, что гипертензия у 3-х месячных крыс SHR не развивается, если крысят этой линии вскармливали приемные матери линии WKY. Ин-фостеринг, однако, не отменял развитие гипертензии у крыс SHR. В случае же с нормотензивными крысами линии WKY, ни ин-фостеринг, ни вскармливание крысят приемными матерями SHR не приводили к достоверному изменению АД и развитию гипертензии. Интересно отметить, что, хотя АД крыс SHR, воспитанных WKY, было существенно ниже, чем у крыс SHR, не подвергавшихся приемному воспитанию, однако воспитанные нормотензивными матерями WKY крысята SHR сохраняли высокую стресс-реактивность [Cierpial, Konarska, McCarty, 1990]. Более поздние исследования на этой модели были направлены на то, чтобы понять биологическую основу существенного смягчения и замедления развития АГ у крыс линии SHR при воспитании их приемными матерями нормотензивной линии WKY.

Было установлено, что материнское поведение крыс SHR и WKY существенным образом различается [Myers и др., 1989a], но при этом во многом зависит от генотипа воспитуемых крысят [Myers и др., 1989b; Cierpial, Murphy, McCarty, 1990]. При воспитании крысят альтернативной линии материнское поведение сдвигается в сторону, характерную для этой линии. С учетом этих новых фактов были проведены эксперименты, при которых в выводки SHR или WKY подсаживали единственного крысенка альтернативной линии [McCarty, Lee, 1996]. Данное исследование подтвердило то, что у крыс SHR, воспитанных WKY, АД существенно ниже, чем у крыс SHR, воспитанных их биологическими матерями. При этом на АД крыс WKY ин- и кросс-фостеринг влияния не оказывали. Более поздние исследования пытались дифференцировать эффекты изменения материнской среды в пре- и постнатальном

онтогенезе крыс SHR, с этой целью меняли не только кормящую мать, но и проводили трансплантацию эмбрионов между контрастными линиями крыс [Nicolantonio Di и др., 2006; Lee, Azar, 2010]. В целом, результаты этих исследований подтвердили и расширили представления, заложенные в более ранних работах.

Работы по перекрестному воспитанию между крысами SHR и WKY [Cierpial, McCarty, 1987b; McCarty, Lee, 1996; Nicolantonio Di и др., 2006; Lee, Azar, 2010; Lee и др., 2011], несмотря на различия в экспериментальном дизайне, имели вполне воспроизводимый результат. АД у животных с генотипом SHR, воспитанных приемными матерями нормотензивной линии, было ниже, чем в случае воспитания биологическими родителями. В то же время крысы WKY, воспитанные приемными матерями SHR, не становились гипертензивными, и их АД не отличалось от контроля. Наряду с влиянием на АД, перекрестное воспитание оказывало воздействие на массу тела животных и другие физиологические характеристики [McCarty, Lee, 1996; Lee, Azar, 2010; Lee и др., 2011].

В качестве возможных причин того, что полное развитие АГ у крыс SHR требовало наличия гипертензивной матери, было выдвинуто две основные гипотезы: ключевым фактором являются либо особенности материнского поведения крыс SHR, либо количественные или качественные особенности молока матери и характера вскармливания [McCarty, 1999; Ashton, 2000]. Первая гипотеза, несмотря на свою привлекательность, подтверждения не получила [McCarty, 1999; Ashton, 2000]. Для кормящих самок SHR было показано изменение количественных показателей выработки молока [Gouldsbrough и др., 1998; Ashton, 2000; Lee и др., 2011]. Кроме того, молоко крыс SHR и WKY отличалось по составу: у крыс SHR в молоке было обнаружено повышенное содержание хлористого натрия, а также уменьшение калия, кальция и белка [McCarty, Tong, 1995]. Однако наиболее существенным фактором считается то, что в течение первых двух первых недель периода вскармливания самки SHR выделяют существенно меньше молока, чем самки WKY [Gouldsbrough и др., 1998; Ashton, 2000; Lee и др., 2011]. В дальнейших исследованиях было показано, что у лактирующих самок SHR наблюдаются нарушения в развитии молочных желез, которые были ассоциированы с уменьшением содержания паратиреоидного гормон-родственного белка (ПТГрП) в эпителии желез, а также в молоке крыс SHR [Wlodek и др., 2003]. ПТГрП играет ключевую роль в период лактации, стимулируя рост молочных желез у матери, а также рост и метаболизм кальция у крысят [Philbrick и др., 1996]. Эти факты подтверждают гипотезу о том, что роль постнатальной материнской среды в развитии гипертензии опосредована, главным образом, через количество и качество молока.

В исследованиях на некоторых других гипертензивных линиях крыс были получены сходные результаты. Так, при перекрестном воспитании гипертензивных крыс линии НИСАГ и

нормотензивным контролем Wistar развитие гипертензии у генетически предрасположенных к ней крыс не прекращалось полностью, но существенно замедлялось. Лишь у стареющих животных (8 месяцев) гипертензия, в конце концов, развивалась, однако в более мягкой форме, чем у крыс НИСАГ, воспитанных собственными матерями. Следует отметить, что на всем протяжении эксперимента, то есть с возраста 1,5 мес и до 8 мес, АД у крыс НИСАГ, воспитанных приемными матерями Wistar, было на 20-25 мм рт. ст. ниже, чем у животных этой линии, не подвергавшихся перекрестному воспитанию [Амстиславский, 2006].

Однако эксперименты по перекрестному воспитанию крыс линий GH и Wistar показали, что имеет место не только смягчение гипертензии у генетически предрасположенных к гипертензии крысят GH после вскармливания их приемными матерями нормотензивной линии Wistar, но и повышение АД у крыс Wistar при вскармливании их приемными матерями GH [Ledingham, Ashton, 2005]. Еще более необычным были результаты перекрестного воспитания, проведенные на линиях Dahl [Dene, Rapp, 1985]. После вскармливания крысят гипертензивной соль-чувствительной линии Dahl (SS/Jr) приемными матерями нормотензивной соль-резистентной линии Dahl (SR/Jr) наблюдалось резкое повышение АД у самцов в возрасте одного месяца, после чего происходило его снижение до прежнего уровня [Dene, Rapp, 1985]. В более поздних исследованиях изменений АД после кросс-фостеринга этих линий обнаружено не было [Kubisch, Mathialagan, Gomez-Sanchez, 1998]. Такие расхождения результатов, полученных на GH и Dahl, в сравнении с результатами, полученными на НИСАГ и SHR, могут быть связаны с межлинейными различиями и генетическими особенностями каждой из перечисленных линий, поскольку механизмы, лежащие в основе развития гипертензии у этих линий различны [Rapp, 2000; Bader, 2010].

Особый интерес представляют работы, в которых изучали отдаленные эффекты применения переноса эмбрионов по отношению к АД у рожденных в результате применения этих технологий потомков. Изучение отдаленных эффектов изменения пренатальной материнской среды в связи с изменениями АД у потомков и гипертензией производят с использованием метода перекрестного переноса эмбрионов у нормотензивных и гипертензивных линий крыс. В наиболее полных работах наряду с переносом эмбрионов применяют также метод перекрестного воспитания с целью оценить вклад постнатального влияния матери в ходе периода вскармливания [Dene, Rapp, 1985; Kubisch, Mathialagan, Gomez-Sanchez, 1998; Kubisch, Gómez-Sánchez, 1999; Nicolantonio Di и др., 2006; Lee, Azar, 2010].

В работах по трансплантации эмбрионов между крысами линий SHR и WKY было получено подтверждение того, что гипертензивный фенотип крыс SHR проявляется позже в онтогенезе и в более мягкой форме, если эмбрионы этой линии развиваются в репродуктивном тракте нормотензивных крыс WKY [Nicolantonio Di и др., 2006; Lee, Azar, 2010], хотя в более ранних

исследованиях этого эффекта обнаружено не было [Mizuno и др., 1986; Gray, 1991]. В исследовании Di Nicolantonio с соавторами (2006) было продемонстрировано, что АД у крыс SHR, рожденных в результате трансплантации эмбрионов реципиентам нормотензивной линии WKY, не достигает гипертензивных значений в течение первых пяти месяцев жизни, независимо от того, вскармливают ли таких крысят родившие их самки-реципиенты линии WKY или же их передают на вскармливание приемным матерям SHR [Nicolantonio Di и др., 2006].

В работах на соль-чувствительной и соль-резистентной линиях Даля были сделаны сходные наблюдения о том, что гипертензия у первых существенно смягчается при трансплантации их эмбрионов нормотензивным реципиентам соль-резистентной линии [Kubisch, Mathialagan, Gomez-Sanchez, 1998], хотя в более раннем исследовании не было обнаружено никаких эффектов [Dene, Rapp, 1985].

Подытоживая, следует подчеркнуть, что в современном мире, как уже было описано выше, тенденция к откладыванию материнства до «лучших времен», а соответственно более позднего возраста, проявляется все более ярко [Gleicher и др., 2014]. Таким образом, женщины, которые становятся матерями в первый раз в продвинутом возрасте, могут иметь «багаж» накопленных хронических заболеваний, в том числе, артериальную гипертензию. Первые исследования по влиянию хронических заболеваний матери на ребенка, рожденного в результате применения ВРТ, только начинают появляться [Dayan и др., 2016]. Однако, в эксперименте такую ситуацию можно промоделировать уже сейчас, взяв существующие гипертензивные модели на крысах.

В результате приведенного анализа литературы, можно сделать такие заключения. При вынашивании и (или) вскармливании потомков крыс линий с генетически обусловленной гипертензией приемными (суррогатными) матерями нормотензивных линий у этих потомков, как правило, происходит существенное смягчение развития гипертензии. В случае же когда эмбрионы крыс, не предрасположенных к гипертензии, трансплантируют самкам-реципиентам гипертензивных линий, либо крысят нормотензивных линий отдают на вскармливание приемным матерям гипертензивных линий, лишь в исключительных случаях у потомков подвергнутых такого рода воздействиям повышается АД; в подавляющем же большинстве случаев при таком направлении переноса гипертензии не возникает. Между тем, результат анализа показал, что во всех этих работах эмбрионы трансплантировали самкам-реципиентам либо сразу после вымывания, минуя этап их культивирования, либо культивировали (или передерживали) их до трансплантации лишь в течение короткого интервала времени и условия, в которых они находились между вымыванием и

трансплантацией, подробно не описаны. Таким образом, актуальным является исследование влияние культивирования эмбрионов на формирование гипертензивного фенотипа потомков.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Экспериментальные животные

Работа была проведена на крысах инбредных линий НИСАГ и WAG. Кроме того, в работе в качестве суррогатных матерей для потомства крыс НИСАГ были использованы межлинейные F1 гибриды крыс аутбредной линии Sprague-Dawley и ручных крыс-пасюков [Plyusnina, Oskina, 1997].

Крысы всех экспериментальных групп, за исключением доноров эмбрионов были рождены в SPF-виварии Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия) и содержались в индивидуально вентилируемых клетках (ИБК) (OptiRAT, Animal Care, USA) 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 использовались древесные опилки. Животные имели постоянный доступ к автоклавируемому стандартизированному корму (V1534-300, Sniff, Soest, Germany) и очищенной воде, обогащенной минеральными добавками (Северянка, Экопроект, Россия). Животные содержались в группах по две-три особи. Самки с потомством содержались отдельно, отсадка потомства от матери проводилась в возрасте 25 дней. Крысы линии НИСАГ, используемые в качестве доноров эмбрионов, содержались в стандартных условиях конвенционального вивария ИЦиГ СО РАН при естественном освещении и доступе в корму и воде *ad libitum*, в качестве подстилки использовались опилки. 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 («Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными Министерством здравоохранения в 1977 г) и международным («Хельсинская декларация Всемирной медицинской ассоциации» пересмотра 2013 г.) рекомендациям по работе с экспериментальными животными.

2.2 Экспериментальные группы

В первой части экспериментальной работы использовались следующие группы животных: 1) крысы линии WAG, рожденные естественным путем (WAG) – контрольная линия; 2) крысы линии НИСАГ, рожденные естественным путем (НИСАГ). Во второй части использовались такие группы: 1) крысы линии НИСАГ, рожденные в результате эмбриотрансфера полученных *in vivo* эмбрионов (ЕТ); 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*).

2.3. Методы репродуктивной биологии

2.3.1. Вазэктомия

За две недели до начала эксперимента было необходимо подготовить стерильных самцов для спаривания с реципиентами эмбрионов с целью достижения у них псевдобеременности.

Для вазэктомии использовали гибридных самцов (SD x Plus) ($n = 7$) в возрасте не старше пяти недель. Крыс наркотизировали по следующей схеме: вводили внутривентриально 0.1 мг/кг медетомидина гидрохлорид (Domitor, 1 мг/мл, Orion Corporation, Финляндия), затем через 10 минут 12.5 мг/кг смеси тилетамин гидрохлорид + золазепам гидрохлорид (Zoletil, Virbac Sante Animale, Франция). Крысу помещали спиной вниз на подогреваемую платформу (Leica Microsystems, Германия) с установленной температурой 37°C в целях избегания переохлаждения во время операции. В области семенников сбрасывали шерсть с использованием электрической бритвы и обрабатывали операционное поле 70% раствором этанола. В нижней трети семенника выполняли поперечный разрез кожи и подлежащего мышечного слоя. Осторожно извлекали придаток семенника, находили и выделяли семявыносящий проток. Далее семявыносящий каналец прижигали в двух местах, используя раскаленные на спиртовке бранши хирургического пинцета. Такую же последовательности действий выполняли на другом семеннике. После этого, операционные раны зашивали послойно и припудривали антибиотиком (амоксциллина тригидрат). Операционные швы обрабатывали антисептиком (Acerbin, Montavit Pharmazeutische Fabrik GmbH, Австрия).

2.3.2. Получение преимплантационных эмбрионов

Проводилось контролируемое спаривание самок крыс линии НИСАГ (доноры эмбрионов) ($n = 20$) в возрасте 3-5 месяцев самцами той же линии. Для спаривания использовались животные в естественном эстральном цикле, без применения стимуляции овуляции. При наличии сперматозоидов во влагалищных мазках и/или влагалищной пробки спаривание считалось фертильным, а день их обнаружения считался первым днем эмбрионального развития.

Доноров умерщвляли при помощи ингаляции углекислым газом через 4.5 дня после коитуса (для получения эмбрионов на стадии 8кл/морулы), либо через 5 дней после коитуса (для получения эмбрионов на стадии бластоцисты). Брюшную полость вскрывали, извлекали репродуктивные органы и помещали их на чистую салфетку. Яйцеводы отделяли от яичника и матки, затем матку и выделенные яйцеводы помещали на 60-мм чашку Петри в капли предварительно прогретой до 37°C среды FertiCult™ Flushing (Ferti Pro, Бельгия). Яйцеводы и рога матки промывали с использованием шприца объемом 1 мл и предварительно сточенной иглы 27 G. Эмбрионы сразу после вымывания отмывали от дебриса, проводя по трем каплям

среды с использованием стеклянного капилляра, подсчитывали и оценивали при помощи стереомикроскопа S8 APO (Leica Microsystems, Germany) с увеличением ($\times 80$). Эмбрионы низкого качества (с фрагментациями) отбраковывали; эмбрионы хорошего качества без видимых дефектов и с неповрежденными прозрачными оболочками (*zonae pellucidae*) помещали в соломины объемом 0.25 мл (Cryo Bio System, Франция) и либо сразу переносили в матку подготовленных гибридных реципиентов, либо культивировали *in vitro* в течение 24 ч перед переносом. Вымывание эмбрионов для эксперимента проводилось в период с октября по февраль.

2.3.3 Подготовка суррогатных матерей

В параллель со спариванием доноров проводилось спаривание самок гибридных крыс (SD x Plus) ($n = 12$) в возрасте 2.5-3 месяцев с вазэктомизированными самцами для достижения у них псевдобеременности (реципиенты эмбрионов). День обнаружения влагалищной пробки у реципиентов считался первым днем псевдобеременности. Для увеличения вероятности коитуса, реципиентов для спаривания выбирали по стадиям эстрального цикла, которые определяли цитологическим исследованием мазков из влагалища. Для спаривания использовались самки, у которых был обнаружен проэструс либо эструс.

2.3.4 Культивирование эмбрионов *in vitro*

За сутки до предполагаемого вымывания готовили 35-мм чашку Петри (Corning, США) с каплями среды mR1ECM (modified rat 1-cell embryo culture medium) объемом 50 мкл, которую покрывали минеральным маслом (Sigma, США) и помещали в CO₂-инкубатор (Binder, Германия) для насыщения среды углекислым газом минимум на 12 часов. Эмбрионы из конвенционального вивария на стадии от дробления/морулы переносили в предварительно подготовленные и уравновешенные в условиях 5% CO₂, 37°C и 80% влажности капли со средой для культивирования и помещали в CO₂-инкубатор. Эмбрионы культивировали в группах по 8-10 в течение 20-24 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.

2.3.5 Перенос эмбрионов в матку

Для получения первой экспериментальной группы ET-IVC (эмбриотрансфер+культивирование) нормально развивающиеся бластоцисты (dpc = 4.5 + IVC) после культивирования переносили в матку реципиентов. Для получения второй экспериментальной группы ET (эмбриотрансфер) эмбрионы на стадии бластоцисты (dpc = 5.0) сразу после транспортировки в SPF-виварий переносили в матку подготовленной самки-реципиента. В обоих случаях перенос осуществлялся на 3.5 день псевдобеременности реципиента. Таким образом, в обоих случаях имел место асинхронный перенос эмбрионов

(стадия развития эмбрионов на 1.5 – 2 суток опережала стадию развития эндометрия). Метод асинхронного переноса обладает преимуществом перед синхронным переносом эмбрионов, так как у эмбрионов есть возможность увеличить число клеток перед процессом имплантации. Подробное описание методики по эмбриотрансферу приведено ниже.

Операция по трансферу эмбрионов в матку проводилась согласно стандартной методике [Behringer и др., 2014; Igonina и др., 2019]. Для анестезии самке-реципиенту вводили медетомидина гидрохлорид (Медитин, 1 мг/мл, Ari-San, Россия) внутривенно (0.02 мг на крысу) и через 10 минут кетамина гидрохлорид (Кетамин, 50 мг/мл) (10 мг на крысу). Затем подкожно вводили антибиотик – 0.02 мл амоксициллина (тригидрат амоксициллина, 150 мг/мл). Готовили операционное поле согласно правилам асептики: шерсть в области операционного поля сбривали, а кожу обрабатывали 70% раствором этанола. Накрывали операционное поле стерильной салфеткой с отверстием для доступа. Применяли правосторонний вертикальный оперативный доступ: кожу и лежащий под ней мышечный слой в области матки разрезали дорзовентрально, 5 мм от нижних ребер в каудальном направлении. Висцеральный жир вместе с яичником, яйцеводом и верхней частью матки захватывали пинцетом и доставали наружу. Фиксировали органокомплекс снаружи с помощью шовного материала. В правом роге матки делали прокол с помощью стерильной иглы 27 G, затем эмбрионы в 2 мкл среды Flushing переносили стеклянным капилляром в матку через отверстие по 8-10 на самку. Разрез зашивали и припудривали антибиотиком (амоксициллина тригидрат), затем обрабатывали операционный шов антисептиком (Ацербин, Montavit Pharmazeutische Fabrik GmbH, Austria).

2.4 Физиологические и поведенческие методы

2.4.1. Исследование динамики артериального давления во время беременности

За неделю до начала спаривания было измерено контрольное сАД и дАД у интактных крыс НИСАГ (n = 23; 16 самок, 7 самцов) и WAG (n = 24; 16 самок и 8 самцов). У интактных животных было проведено три цикла измерения, затем данные были усреднены для каждого животного. В эксперимент были отобраны только самцы НИСАГ, у которых контрольное сАД превышало 170 мм рт. ст. Измерения АД параллельно с измерением массы тела проводились на 7-й, 14-й, 16-й, 18-й и 20-й дни беременности. У беременных самок в каждый из исследованных дней был проведен один цикл измерения (от 3 до 20 измерений в цикле), затем данные были усреднены по каждому животному. Подробное описание методики измерения АД приведено ниже.

2.4.2 Репродуктивные характеристики самок и исследование неонатального онтогенеза потомков

На 21-й день беременности проводили вскрытие беременных самок НИСАГ (n = 11) и WAG (n = 11). Было подсчитано число плодов, измерена масса тела каждого плода и масса его плаценты. У каждого плода был выделен мозг и измерена его масса. Остальных беременных самок (n=5 каждой линии) оставляли до естественного родоразрешения.

Репродуктивные характеристики самок были проанализированы в экспериментальных группах ET (n=6), ET-IVC (n=6), *in vivo* (n=7). Оценивали срок гестации, размер помета, перинатальную смертность. Кроме того, в группах, где крысята были рождены в результате трансфера эмбрионов (ET, ET-IVC), дополнительно описывались такие параметры, как число реципиентов, родивших потомство; число перенесенных эмбрионов и эффективность процедуры переноса эмбрионов, которая подсчитывалась как процент рожденных потомков из всех перенесенных реципиенту эмбрионов. После рождения потомков оставляли с матерью до 25-го дня.

Начиная с шестого дня, у потомков исследовали ранний постнатальный онтогенез. В панель тестов входило формирование неонатальных рефлексов и реакций, набор массы тела и открытие глаз. В группах без применения репродуктивных технологий было исследовано 62 потомка (24 самца и 38 самок из 5 пометов) у НИСАГ и 37 потомков (18 самцов и 19 самок из 5 пометов) у WAG; в группах с применением репродуктивных технологий было исследовано 20 потомков (10 самцов и 10 самок) в группе ET, 20 потомков (7 самцов и 13 самок) в группе ET-IVC и 30 потомков (15 самцов, 15 самок) в группе *in vivo*.

День родов считался первым днем постнатального периода у крысят (Д1). Крысят взвешивали на Д1 (только группы НИСАГ и WAG), Д7, Д14 и Д25 при помощи цифровых весов ScoutPro SPS2001F (Ohaus Corporation, USA) с точностью 0.1 г. Оценка развития рефлексов проводилась согласно стандартной методике, рекомендованной ранее [Altman, Sudarshan, 1975; Bassan и др., 2005; Nguyen, Armstrong, Yager, 2017]. Крысята тестировались ежедневно, начиная с Д6, при этом были выбраны следующие тесты:

- 1) Рефлекс переворота проводился следующим образом: крысят переворачивали и помещали спиной на плоскую поверхность. Фиксировали время, необходимое им для возвращения в правильное положение (на четыре лапы). Если в течение 30 секунд крысята не успевали перевернуться, тест считался проваленным.
- 2) Реакцию отрицательного геотаксиса оценивали, помещая крысят вниз головой на наклонную под углом 45° поверхность, покрытую металлической проволочной сеткой. Тест на данную реакцию считался выполненным при двух условиях – если крысята

разворачивались на 180° и ползли вверх по поверхности в течение 180 секунд тестирования. В любом другом случае тест считался проваленным.

3) Реакция избегания края – крысят помещают на край площадки так, чтобы их передние лапы и морда свешивались над обрывом. Тест считался выполненным при двух условиях, если крысята разворачивались на 180° и ползли в противоположную сторону от края в течение 180 секунд тестирования. В любом другом случае, тест считался проваленным.

4) Тест на формирование ходьбы (выход из круга) – крысят помещали в центр круга диаметром 15 см, их задачей было пересечь границу круга обеими передними лапами в течение 30 секунд тестирования. В случае невыполнения задачи за отведенное время, тест считался проваленным.

Рефлексы и реакции в данных группах оценивались до тех пор, пока не наблюдали положительную реакцию закрепления. Это означает, что крысята демонстрировали рефлекс или реакцию в течение двух последовательных дней. Таким образом, для каждого рефлекса или реакции время окончания тестирования варьировалось [Nguyen, Armstrong, Yager, 2017].

2.4.3. Измерение артериального давления и массы тела взрослых потомков

В возрасте 12-14 и 20-22 недели были измерены величины систолического и диастолического артериального давления, а также масса тела у потомков во всех группах. Для регистрации был использован непрямой метод измерения на хвостовой артерии (tail-cuff метод) на системе CODA Standard (Kent Scientific, Torrington, USA). Данный метод широко используется в современных исследованиях и результаты, полученные данным методом, имеют 99% корреляцию с результатами прямого измерения артериального давления при канюлировании хвостовой артерии и радиотелеметрии [Feng и др., 2008]. Перед измерением животным позволяли войти в рестриктор и взвешивали их на цифровых весах ScoutPro SPS2001F (Ohaus Corporation, USA) с точностью 0.1 г. Не менее пяти минут предоставлялось животным для привыкания к условиям эксперимента. В процессе измерения рестрикторы с крысами помещались на подогретую платформу (37° C). Делали по 1 циклу измерений, включавшему в себя 20 повторов (10 подготовительных и 10 экспериментальных) в день для каждого животного в течение трех дней. По всем трем дням подсчитывали среднее значение АД и массы тела, которое использовали для статистического анализа.

2.4.4 Поведение у взрослых животных

В возрасте 12-14 недель у крыс всех групп была проведена панель поведенческих тестов, включающая тест открытого поля (ТОП), тест на распознавание нового объекта (РНО), приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ) в порядке их следования. За час до начала тестирования животных помещали в транспортировочную клетку и перемещали в комнату для наблюдений с красным освещением (20 W). Начало тестов совпадало с началом темного

времени суток в комнате содержания животных (16:00), то есть в период наибольшей активности животных. Следующий тест начинался через 24 ч после предыдущего. Установки, используемые в тестах, обрабатывали дезинфицирующим раствором 0.5% Combidez, либо 70% этанолом, после каждого животного для устранения запаховых меток. Поведение крыс документировалось при помощи расположенного над установкой сенсорного контроллера Kinect 3-D с видеокамерой, при этом было использовано программное обеспечение EthoStudio [Kulikov, Tikhonova, Kulikov, 2008; Kulikov и др., 2014].

2.4.4.1. Тест открытого поля

ТОП является классическим тестом, применяемым для изучения поведения у грызунов [Hall, 1934; Markel, 1986]. В данной работе ТОП представлен в модификации, которая используется в нашей лаборатории [Ragaeva и др., 2017]. Установка представляет собой круглую арену диаметром 97 см из белого поливинилхлорида (ПВХ), разделенную на секторы и имеющую отверстия в полу диаметром 2 см (OpenScience, Россия). Арена огорожена стенкой высотой 42 см и освещена лампой накаливания с красным светом (20 W) для уменьшения стресса, испытываемого животным. Каждое животное помещали у стенки арены, а не в центре, во избежание реакции замирания, хвостом к экспериментатору. Длительность тестирования составляла 5 минут. В тесте регистрировались общепринятые параметры: время, проведенное в центре арены, пройденный путь в метрах, исследованную площадь арены, общая продолжительность и частота актов груминга, общая продолжительность и частота вертикальных стоек [Amstislavsky и др., 2001; Ragaeva и др., 2017]. Проводилась видеодокументация материала, который затем обрабатывался при помощи программного обеспечения EthoStudio, как описано ранее [Kulikov, Tikhonova, Kulikov, 2008; Ragaeva и др., 2017].

2.4.4.2. Тест на распознавание нового объекта

Тест РНО широко используется для оценки декларативной памяти и когнитивных функций у грызунов [Ennaceur, Delacour, 1988; Antunes, Biala, 2012]. Тест основан на разном времени исследования нового и знакомого объекта. Мы использовали следующую модификацию данного теста: фаза габитуации (привыкание к арене) совпадала с ТОП (см. выше); фаза ознакомления проводилась через 24 ч после габитуации с использованием двух одинаковых (А+А) объектов (прозрачные пластиковые контейнеры в форме усеченного конуса с крышкой объемом 300 мл, наполненные водой); фаза тестирования (А+В) проводилась через 24 ч после фазы ознакомления, при этом один из знакомых объектов (А) заменялся на новый (В), которым служила цветная металлическая коробка в форме параллелепипеда с крышкой, объемом 400 мл, наполненная водой. Для того, чтобы избежать предпочтения крысами правой/левой стороны, расположение нового объекта менялось на противоположное после каждого

животного. Длительность каждой фазы составляла пять минут. Предпочтение животным нового объекта оценивалось с использованием индекса распознавания (Recognition index = RI [RI = $T_N / (T_N + T_F)$]), который отражает долю времени исследования нового объекта (T_N) от общего времени исследования обоих объектов ($T_N + T_F$). Данный индекс является одним из основных индексов – показателей успешности в тесте на распознавание объектов, то есть позволяет судить о том, может ли животное различать новый объект и знакомый [Broadbent и др., 2010; Antunes, Biala, 2012].

2.4.4.3. Приподнятый крестообразный лабиринт

Тестирование в ПКЛ часто используется для оценки тревожности у животных в фармакологических исследованиях при испытании анксиолитиков [Carobrez, Kincheski, Bertoglio, 2014], а также для оценки общей активности животных, в сочетании с ТОП [Amstislavsky и др., 2001]. Установка представляла собой классический крестообразный лабиринт, состоящий из двух закрытых и двух открытых рукавов, сделанных из серого ПВХ, и приподнятый на высоту 55 см с помощью вспомогательной тележки. Для затемнения закрытых рукавов и яркого освещения открытых использовались два светильника (40 W), расположенных напротив открытых рукавов. Продолжительность тестирования составляла пять минут. В тесте регистрировались общепринятые параметры, такие как: время, проведенное в открытых и закрытых рукавах, число заходов в открытые рукава, общее число заходов в рукава [Rodgers, Cole, 1994]. Помимо этого, мы оценивали пройденный путь в метрах, частоту и общую продолжительность свешиваний с открытых рукавов (head dipping), частоту и общую продолжительность вытягиваний туловища (stretch attend postures – SAP) как дополнительные поведенческие параметры [Cruz, Frei, Graeff, 1994; Carobrez, Kincheski, Bertoglio, 2014]. Индекс тревожности подсчитывали по формуле [Lee и др., 2016]:

$$1 - \left[\frac{X1 - X2}{2} \right]$$

где X1 – доля пребывания животного в открытых рукавах от общего времени теста, X2 – доля заходов животного в открытые рукава от общего числа заходов во все рукава.

2.4.5 Гистологический анализ

В возрасте пяти месяцев по четыре животных было случайно выбрано из групп ET, ET-IVC и *in vivo* для проведения гистологического анализа мозга. Для этого животным проводили транскардиальную перфузию 4% раствором параформальдегида на фосфатно-солевом буфере (PBS). Мозг незамедлительно выделяли целиком и переносили в 30%-ный раствор сахарозы на PBS, содержащий 4% параформальдегида при температуре +4°C для дегидратации и последующей фиксации в течение 3-4-х недель. Затем образцы мозга замораживали с

использованием Tissue-Tek O.C.T. (Sakura, США) и хранили при температуре - 70°C до начала изготовления срезов.

Замороженные срезы в области префронтальной коры и гиппокампа толщиной 30 мкм получали с использованием криостата Microcut-SADV (Histosafe, Китай) и монтировали на предметные стекла, предварительно обработанные желатином. Стереотаксические координаты для срезов определяли согласно стандартному атласу мозга крысы [Paxinos, Watson, 2013]. Они составляли 5.64 мм относительно брегмы в переднезаднем направлении для префронтальной коры и -2.92 мм относительно брегмы в переднезаднем направлении для гиппокампа. Для дальнейшего анализа было использовано по шесть срезов в каждой области на животное.

Для идентификации нейронов в гиппокампе срезы окрашивали по Нисслю, как было описано ранее [Ragaeva и др., 2017]. Проводили оценку плотности нейронов в областях CA1, CA2, CA3 и зубчатой извилине (dentate gyrus - DG) гиппокампа, а также в префронтальной коре. Плотность нейронов в гиппокампе оценивалась при помощи полуколичественного метода, включающего подсчет процента области интереса ($S = 89098.5 \mu\text{m}^2$), занятой окрашенными по Нисслю нейронами [Но и др., 2014; Ragaeva и др., 2017]. Изображения идентичных полей зрения были сделаны для каждой области гиппокампа и префронтальной коры с использованием микроскопа Eclipse Ci-L (Nikon, Japan) с камерой DS-Fi2 (Nikon, Japan) при увеличении $\times 100$. Плотность нейронов подсчитывалась в программе Image Pro Plus Software 6.0 (Media Cybernetics, CA, USA).

2.4.6. Исследование нейрогенеза в гиппокампе

Нейрогенез в гиппокампе у крыс в группах ET, ET-IVC и *in vivo* исследовали непрямым иммуногистохимическим методом, как было описано ранее [Rozkova и др., 2020]. Срезы мозга крыс были изготовлены, как описано в предыдущем разделе. Для рандомизации эксперимента срезы для исследования нейрогенеза и подсчета плотности нейронов были случайным образом выбраны у одних и тех же животных.

Для регидратации и демаскировки антигена криосрезы инкубировали в растворе Trilogy solution при температуре +65°C в течение одного часа (Sigma-Aldrich Co., Германия). Для устранения неспецифического фона срезы обрабатывали раствором Protein Block (Spring Bioscience, США) при комнатной температуре перед окрашиванием. Раствор первичных антител (rabbit polyclonal anti-doublecortin (DCX) antibodies; ab18723, разведение 1: 1000, Abcam, Великобритания) наносили на срезы и инкубировали при 4 ° C в течение ночи для идентификации незрелых нейронов. На следующий день срезы отмывали от несвязанных антител в PBS и инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 488 (goat anti-rabbit IgG antibodies; ab150077, разведение

1: 400, Abcam, Великобритания) в течение 2-х часов при комнатной температуре. После окончания окраски срезы отмывали в PBS и заключали под покровные стекла с помощью водной среды Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium.

Флуоресцентные изображения были получены с использованием микроскопа AxioPlan 2 (Carl Zeiss) при увеличении $\times 200$. Нейробласты на изображениях были идентифицированы как DCX-положительные клетки, проявляющие зеленую флуоресценцию. Всего было получено по 54 среза от каждого животного, из них проанализировано по девять срезов. DCX-положительные клетки были подсчитаны в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа на каждом шестом срезе с использованием программного обеспечения ImageJ (НИН, США). Количество клеток затем умножали на шесть, чтобы оценить общее количество DCX-положительных клеток.

2.5. Статистический анализ данных

Статистическая обработка и визуализация данных проводилась с использованием программных пакетов Statistica v.12 (StatSoft Inc., США) и OriginPro 2018 (OriginLab Corp., США). Критическое значение уровня значимости при проверке нулевых гипотез принималось равным 0.05. Превышение порогового уровня значимости означало принятие нулевой гипотезы, в противном случае – отвержение нулевой гипотезы. Проверка нормальности распределения количественных признаков в сравниваемых группах проводилась по критерию Шапиро-Уилка. Однородность дисперсий оценивали по критерию Левена.

Для сравнения центральных параметров групп использовались параметрические и непараметрические критерии: t-критерий Стьюдента, U-критерий Манна-Уитни; дисперсионный анализ с апостериорным критерием Тьюки для межгруппового сравнения; критерий Краскелла-Уоллиса с последующим апостериорным критерием Данна для межгруппового сравнения. Анализ качественных признаков проводился через исследование их частот посредством таблиц сопряженности с использованием критерия согласия χ^2 (критерия Пирсона). При работе с малыми выборками применяли точный критерий Фишера. Описательные статистики представлены в таблицах и графиках в виде средних арифметических (M) и стандартных отклонений (SD) при нормальном распределении признака в группах, иначе представлены в виде медиан (Me) и 25% и 75% перцентилей. На графиках, где число элементов выборки в одной группе не превышало 30, каждое значение представлено в виде отдельной точки.

ГЛАВА 3: РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Формирование гипертензивного фенотипа крыс линии НИСАГ

3.1.1. Репродуктивные характеристики и неонатальное развитие крыс линий НИСАГ и WAG

Репродуктивные характеристики самок крыс линий НИСАГ и WAG показаны в Табл. 1. Было обнаружено, что у крыс линии НИСАГ размер помета достоверно больше, чем у крыс линии WAG ($p < 0.001$). Число мертворожденных особей и уровень постнатальной смертности не отличался между линиями, как и гестационный возраст новорожденных особей ($p = 0.55$). Соотношение полов в помете также не отличалось между линиями ($p = 0.17$).

Таблица 1. Репродуктивные параметры самок крыс линии НИСАГ и WAG. Данные по числу живорожденных особей и соотношению полов представлены в виде среднего и стандартного отклонения ($M \pm S.D.$); данные по гестационному возрасту новорожденных представлены в виде $Me (Q1-Q3)$; данные по числу мертворожденных особей и уровню постнатальной смертности представлены в виде абсолютных значений и доли от общего числа крысят у всех исследованных самок

Линия	WAG (n = 5)	НИСАГ (n = 5)
Число живорожденных особей (n)	7.8 \pm 1.3	13.4 \pm 1.8***
Число мертворожденных особей (%)	1 (2.56 %)	0
Постнатальная 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	1.28 \pm 0.93	0.64 \pm 0.17

*** $p < 0.001$ по сравнению с аналогичными показателями у WAG

Динамика массы тела в период вскармливания оценивались у потомков крыс линии WAG (n = 5) и НИСАГ (n = 5). Для анализа из каждого помета случайным образом отбирали по одному потомку каждого пола. Массу тела измеряли у новорожденных крысят (Д1), через одну неделю (Д7), через две недели (Д14) и при отсадке от матери (Д25). В связи с тем, что гендерные отличия по массе тела не были обнаружены ни в один из дней тестирования, данные потомков разного пола были объединены. Данные по МТ крысят двух линий в период вскармливания представлен на Рис. 1 масса тела крысят НИСАГ была достоверно снижена по сравнению с массой тела крысят WAG во все дни измерения: Д1 ($p < 0.01$), Д7 ($p = 0.01$), Д14 ($p = 0.01$), Д25 ($p = 0.01$). Таким образом, крысята НИСАГ на всем протяжении всего периода вскармливания отставали по массе тела от крысят WAG аналогичного возраста. Вероятно, это связано с более многочисленными пометами у крыс НИСАГ и соответственно большей конкуренцией за ресурсы.

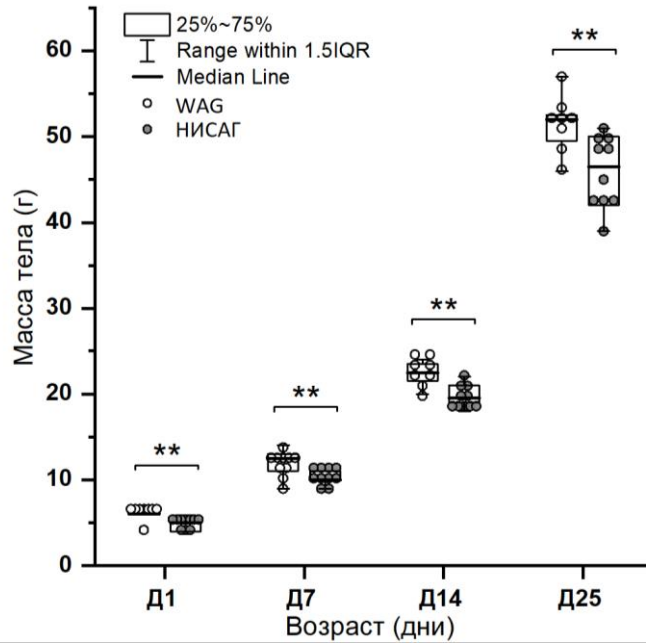


Рисунок 1. Динамика показателей массы тела у крыс линий НИСАГ и WAG. Данные представлены в виде индивидуальных значений и диаграммы размаха, срединная линия – медиана, границы ящика – верхний и нижний квартили (25-75%), усы – 1.5 межквартильного размаха. ** $p < 0.05$ по сравнению с крысами линии WAG

Данные по сравнению неврологического развития особей НИСАГ и WAG представлены на Рис. 2. Было обнаружено, что у крысят НИСАГ развитие рефлекса переворота на поверхности задерживается по сравнению с WAG, это обусловлено тем, что время выполнения рефлекса было выше, чем у крысят WAG во все дни исследуемого периода, кроме шестого дня (Рис. 2, А). Данный рефлекс является спинномозговым рефлексом и тесно связан с физическим развитием особей. Вероятнее всего, задержка в развитии данного рефлекса у крыс НИСАГ связана с низким весом при рождении и более низкой скоростью набора веса тела. Доля особей, выполнявших реакцию отрицательного геотаксиса, повышалась с возрастом и не отличалась между линиями ни в один из дней тестирования (Рис. 2, Г). Интересные данные были получены по выполнению реакции избегания края, большая доля крысят НИСАГ выполняла реакцию на 12, 13 и 15 дни жизни, по сравнению с WAG (Рис. 2, Б). В тесте на становление ходьбы доля крысят, выполнявших задачу, не отличалась между линиями по всем исследованным дням, кроме Д13 ($p < 0.01$, Рис. 2, В). Несмотря на то, что на 7-10 день крысята НИСАГ отставали в развитии по некоторым тестам, в дальнейшем, начиная примерно с 12-13 дня они не только догоняли, но и обгоняли крысят WAG того же возраста в других тестах. Похожая картина наблюдалась при сравнении неврологического развития крысят SHR и WKY, крысята SHR отставали в развитии рефлекса переворота, но при этом лучше выполняли реакцию избегания края [Cierpial, McCarty, 1987b]. Помимо представленных на рисунке

данных, у крысят был исследован рефлекс захвата, успешность выполнения которого не отличалась между линиями ни в один из дней тестирования, так как они выполняли его, начиная с первого дня тестирования, при этом никакой динамики не наблюдалось. Выполнение рефлекса переворота в воздухе и скорость открытия глаз не отличалась между линиями (данные не представлены).

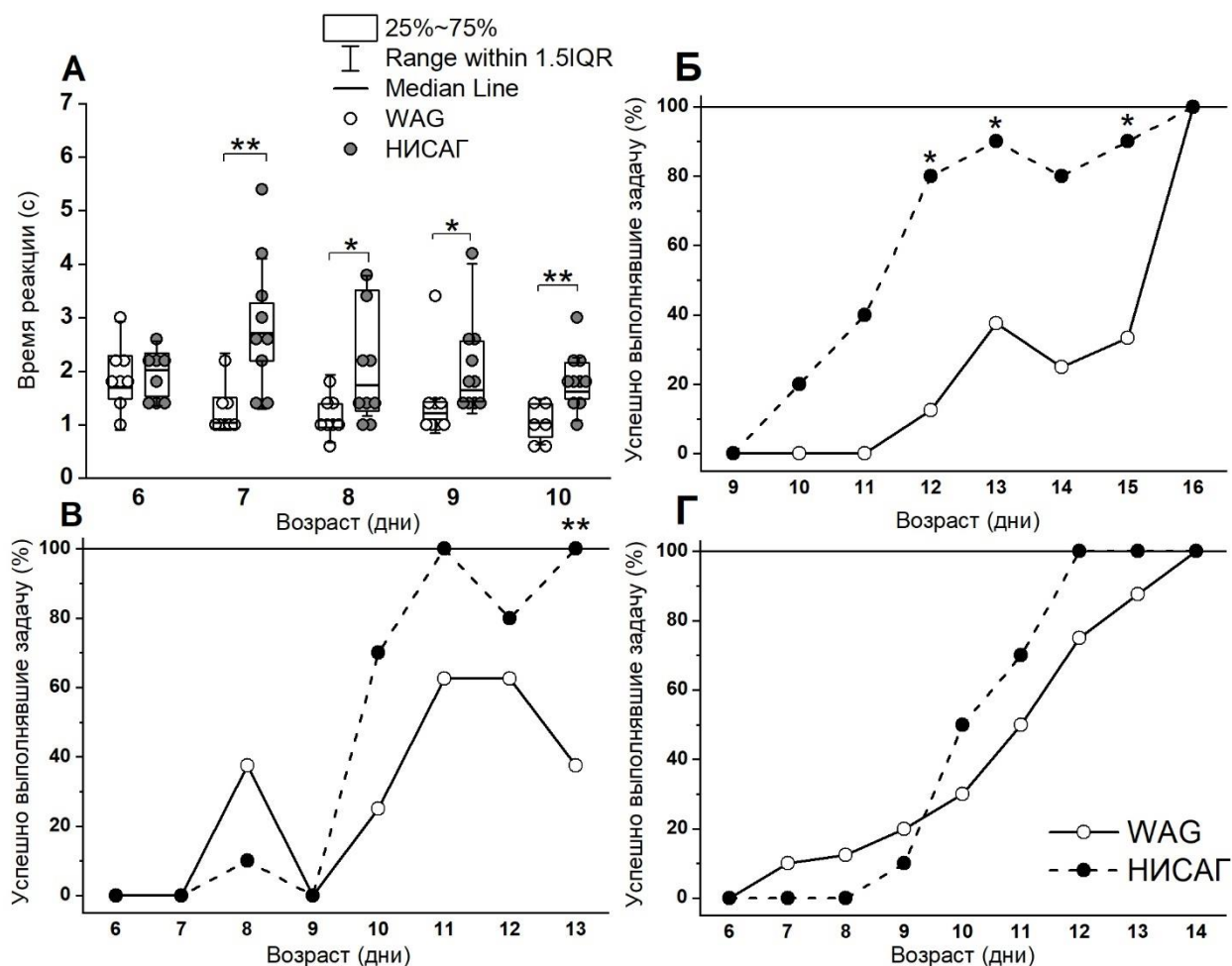


Рисунок 2. Неонатальные рефлексы и реакции у крыс линий НИСАГ и WAG. А, рефлекс переворота на поверхности; данные представлены в виде диаграммы размаха, срединная линия – медиана, границы представляют собой верхний и нижний квартили, усы – 1.5 межквартильного размаха. Б, реакция избегания края; В, тест на формирование ходьбы; Г, реакция отрицательного геотаксиса. Данные по последним трем параметрам представлены в виде доли крысят, выполнявших задачу, на каждый день исследования. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с WAG того же возраста.

3.1.2. Морфометрический анализ гиппокампа крыс линий НИСАГ и WAG в неонатальном периоде

Крысята из других пометов были использованы для гистологического исследования и морфометрического анализа гиппокампа. Они были проведены у крысят линий НИСАГ (2 помета, по 2 самца из каждого помета, $n = 4$) и WAG (3 помета, по 1 самцу из двух пометов и два из одного, $n = 4$). Была посчитана плотность нейронов в областях гиппокампа СА1, СА2, СА3 и зубчатой извилине (DG) у крыс в неонатальном периоде (Д6) в гиппокампе левого и

правого полушария мозга. Не было выявлено влияния полушария мозга на плотность нейронов в разных областях, вследствие чего данные по разным полушариям для одной особи были усреднены и затем использованы для дальнейшего анализа.

Данные морфометрического анализа областей CA1, CA2, CA3 и DG гиппокампа у крыс в возрасте шести дней представлены на Рис. 3. Межлинейных различий по плотности нейронов не было выявлено в областях CA1 ($p = 0.085$), CA2 ($p = 0.686$), CA3 ($p = 0.055$). В области DG было выявлено повышение плотности нейронов у крыс НИСАГ ($p = 0.029$).

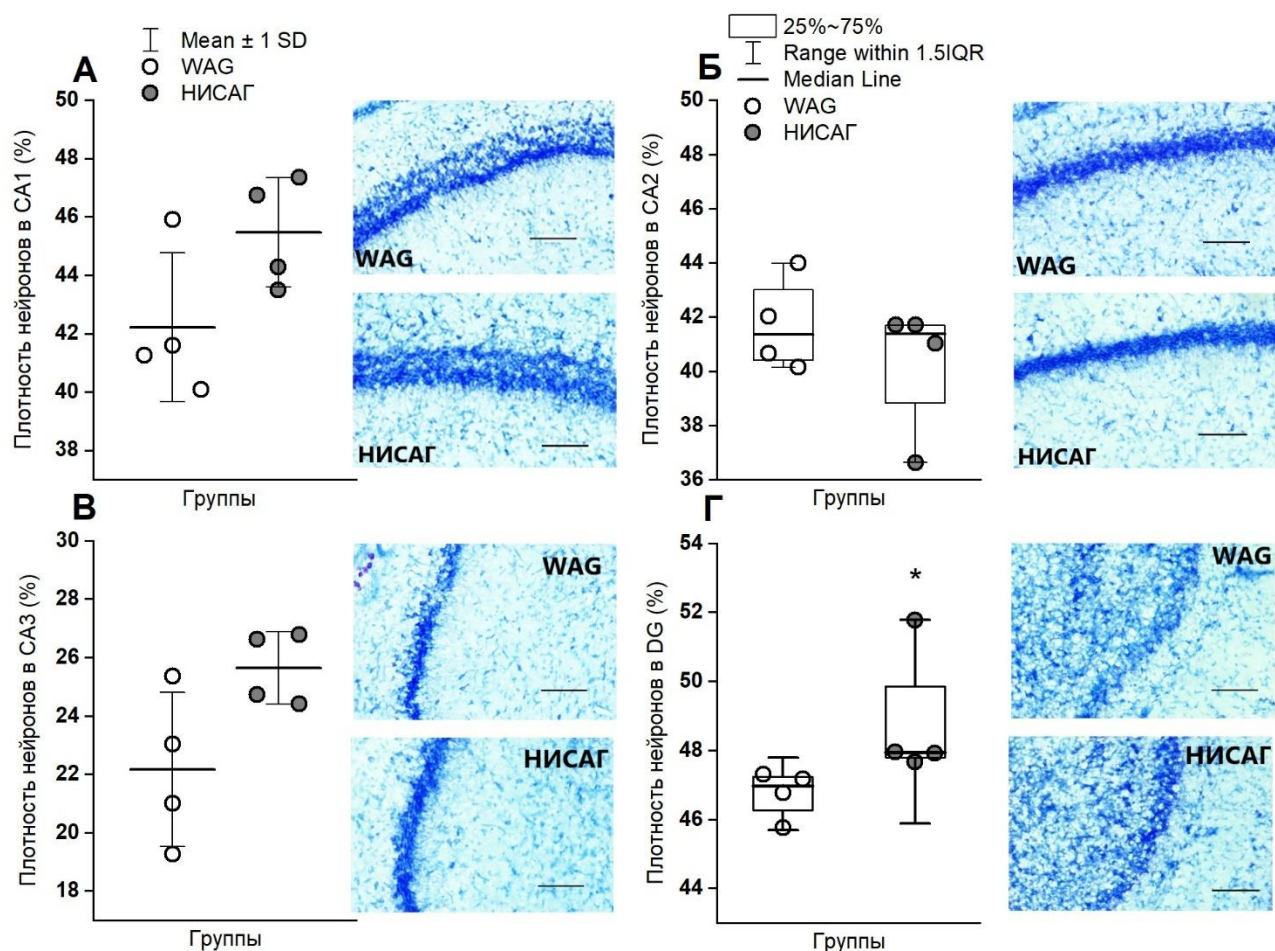


Рисунок 3. Плотность нейронов в гиппокампе у крысят линий НИСАГ и WAG в возрасте 6 дней. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с WAG. А – область CA1; Б – область CA2, В – область CA3, Г – зубчатая извилина (DG). Данные в областях CA1 и CA3 представлены в виде $M \pm S.D.$ Данные в областях CA2 и DG представлены в виде диаграммы размаха, срединная линия – медиана, границы – верхний и нижний квантили, усы – 1.5 межквартильного интервала. На микрофотографиях представлены окрашенные по Нисслю нейроны в областях CA1, CA2, CA3 и DG (зубчатая извилина) гиппокампа. Увеличение 100 \times , масштабная полоска 100 μm . * $p < 0.05$ по сравнению с WAG.

3.1.3 Артериальное давление и поведение взрослых крыс линий НИСАГ и WAG

3.1.3.1 Артериальное давление

В возрасте трех месяцев у самцов и самок крыс обеих линий были измерены величины сАД и дАД, а также величины массы тела. В каждом из пяти пометов разных линий было случайно выбрано по два самца и две самки для измерения АД и оценки поведенческих параметров. Данные представлены на Рис. 4. Как у самцов, так и у самок крыс НИСАГ величины сАД достоверны превышали величины таковых у самцов ($p < 0.01$) и самок WAG ($p < 0.001$) соответственно. Величины дАД были достоверны выше только у самок НИСАГ по сравнению с самками WAG ($p < 0.001$), в то время как у самцов межлинейных отличий по этому показателю не наблюдалось ($p = 0.1$).

Было обнаружено влияние как фактора «генотип» ($F_{1, 32} = 192.62$, $p < 0.001$), так и фактора «пол» ($F_{1, 32} = 1918.6$, $p < 0.001$) на массу тела крыс в исследуемых группах. Взаимодействия между факторами обнаружено не было ($F_{1, 32} = 0.0036$, $p = 0.95$). Апостериорный критерий Тьюки выявил достоверные отличия между группами, как межлинейные между крысами одного пола ($p < 0.001$), так и гендерные внутри одной линии ($p < 0.001$) (Рис. 4, Б).

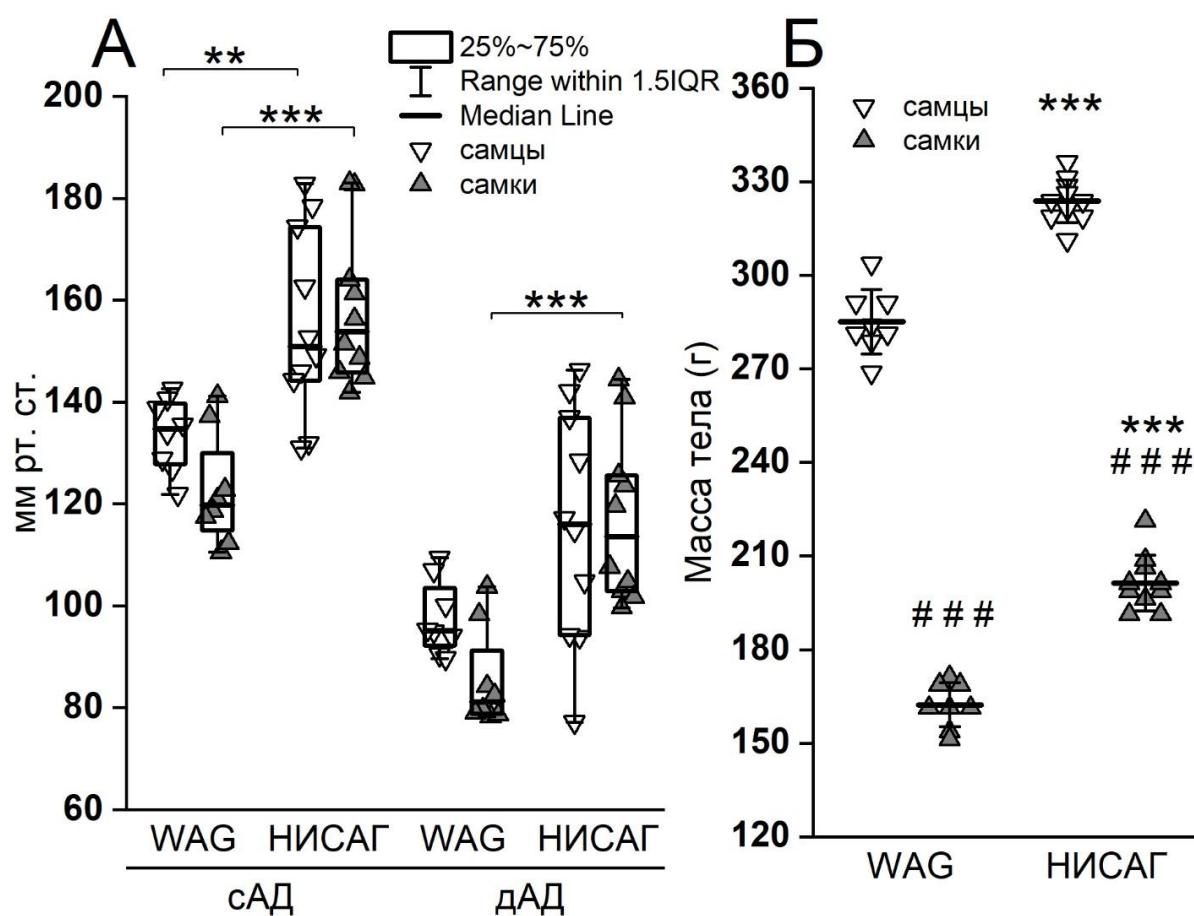


Рисунок 4. АД и масса тела крыс линии НИСАГ и WAG в возрасте 3-х месяцев. А, величины сАД и дАД; Б, масса тела, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ межлинейные различия, один пол; #### $p < 0.001$ гендерные различия.

3.1.3.2 Тест открытого поля

Параметры поведения в ТОП крыс двух линий в возрасте трех месяцев представлены на Рис. 5. Было обнаружено, что как самцы, так и самки крыс линии НИСАГ, проявляют большую исследовательскую и локомоторную активность в новых условиях по сравнению с крысами линии WAG, о чем свидетельствуют повышение доли исследованной области арены (Рис. 5, Б), величины пройденного пути (Рис. 5, В), а также повышение частоты и продолжительности вертикальных стоек (Рис. 5, Г-Д). Также, повышение времени, проведенного в центре арены у крыс НИСАГ характеризует их, как менее тревожных по сравнению с WAG (Рис. 5, А). Частота и продолжительность актов груминга в ТОП не отличалась у крыс НИСАГ по сравнению с WAG, таким образом, уровень смещенной активности оставался неизменным у крыс разных линий. Латентное время первой вертикальной стойки, так и первого груминга, также не отличались между линиями.

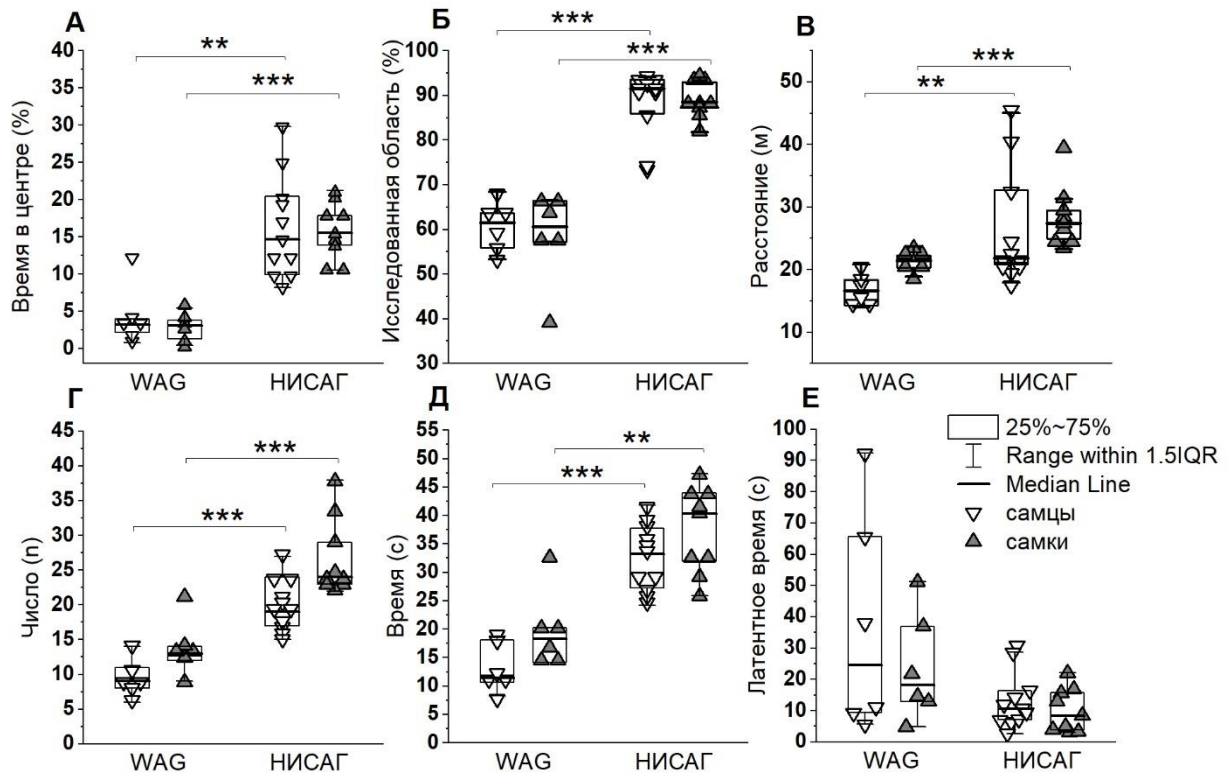


Рисунок 5. Параметры поведения в ТОП у крыс линий НИСАГ и WAG. А. Время, проведенное в центре арены, процент от общего времени теста. Б, процент исследованной территории от всей области арены. В, пройденный путь. Г, частота вертикальных стоек. Д, время, проведенное в вертикальных стойках. Е, латентное время первой вертикальной стойки. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по сравнению с потомками WAG того же пола.

3.1.3.3 Приподнятый крестообразный лабиринт

Параметры поведения крыс линий НИСАГ и WAG в тесте ПКЛ представлены на Рис. 6. Было обнаружено, что 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 ($p < 0.001$, Рис. 6, А) и большая частота входов в открытые рукава ($p < 0.01$, Рис. 6, Б). Индекс тревожности, как интегральный показатель, также был снижен у крыс НИСАГ ($p < 0.001$, Рис. 6, В). Частота свешиваний с открытых рукавов была повышена ($p < 0.001$, Рис. 6, Д), в то время как продолжительность вытягиваний туловища (SAP) снижена ($p < 0.001$, Рис. 6, Е) у крыс НИСАГ. Расстояние пройденного пути было больше у самок крыс НИСАГ по сравнению с WAG ($p < 0.001$, Рис. 6, Г), в то время как у самцов оно не отличалось.

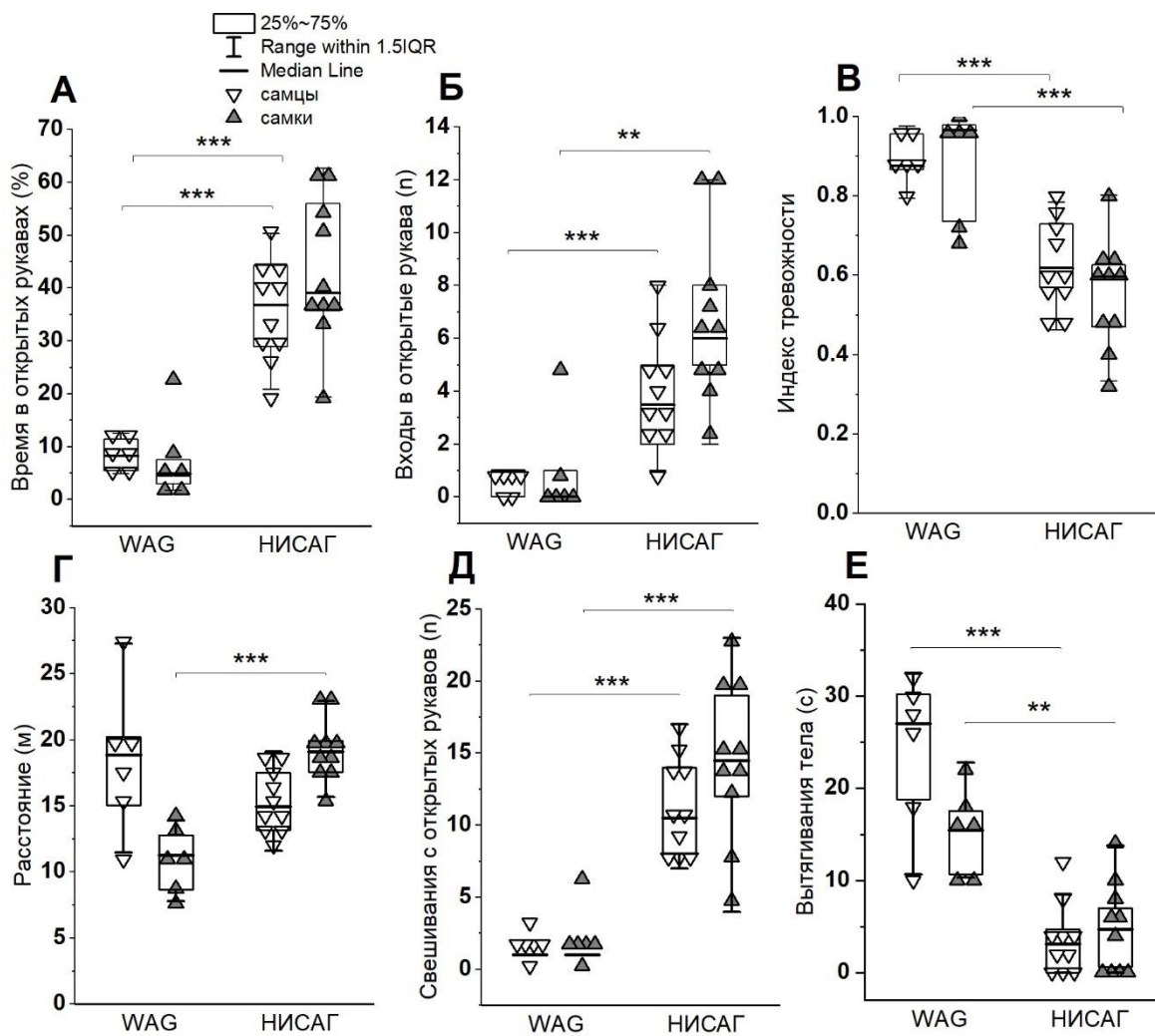


Рисунок 6. Параметры поведения в ПКЛ у крыс НИСАГ и WAG. А, время, проведенное в открытых рукавах, процент от общего времени теста. Б, частота входов в открытые рукава. В, индекс тревожности. Г, пройденный путь. Д, частота свешиваний с открытых рукавов. Е, время, проведенное в вытягиваниях. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по сравнению с потомками WAG.

3.1.3.4 Тест на распознавание нового объекта

В первой фазе теста (ознакомительная фаза) на распознавание нового объекта было проанализировано влияние факторов «расположение объекта» (слева/справа) и «пол» (самец/самка) на время исследования двух одинаковых объектов крысами линий НИСАГ и WAG. Двухфакторный дисперсионный анализ выявил, что ни фактор «расположение объекта» ($F_{1,20} = 2.89, p = 0.10473$), ни фактор пола ($F_{1,20} = 0.01, p = 0.90$) не повлияли на время исследования крыс WAG. Таким же образом было проанализировано время исследования крыс НИСАГ, фактор «расположение объекта» ($F_{1,36} = 1.71, p = 0.2$), как и фактор пола ($F_{1,36} = 0.02, p = 0.88$) не оказали влияния на данный показатель.

Во второй фазе теста (фаза выбора) были проанализированы общее время исследования двух объектов и индекс распознавания нового объекта (RI). Непараметрический критерий Манна-Уитни выявил достоверные отличия по общему времени исследования объектов как между самцами ($p = 0.020$), так и между самками ($p = 0.0028$) НИСАГ и WAG (Рис. 7, А). Однако, индекс распознавания не отличался между линиями, как между самцами ($p = 0.88$), так и между самками ($p = 0.86$, рис. 7, Б).

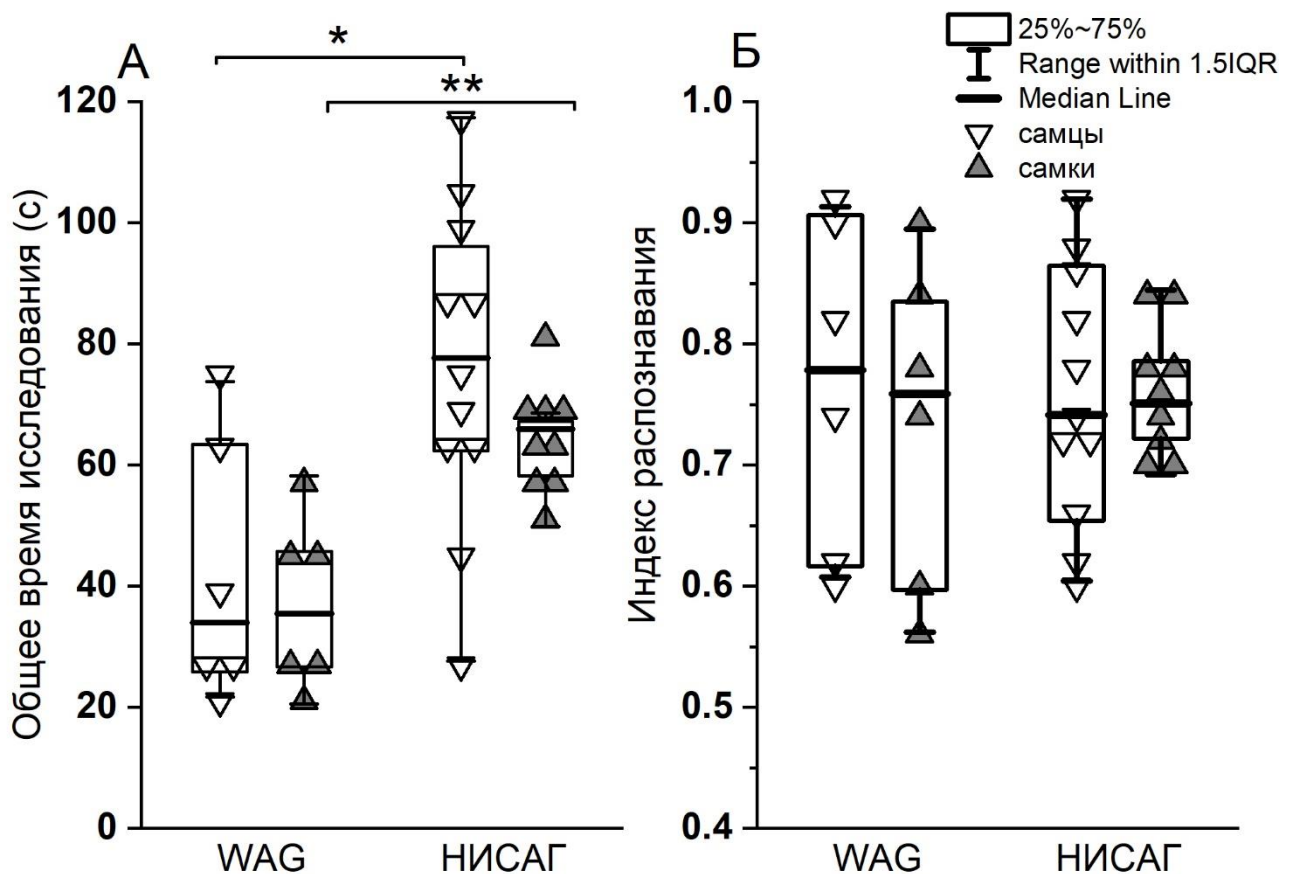


Рисунок 7. Параметры теста на распознавание нового объекта у крыс НИСАГ и WAG. А, общее время исследования двух разных объектов; Б, индекс распознавания. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с WAG того же пола

3.2. Исследование влияния повышенного артериального давления у крыс линии НИСАГ во время беременности на репродукцию

3.2.1. Артериальное давление крыс НИСАГ и WAG во время беременности

Было проведено измерение величин дАД и сАД у беременных самок крыс линий НИСАГ ($n = 8$) и WAG ($n = 9$) на 7, 14, 16, 18 и 20 дни беременности (Рис. 8). Было обнаружено, что все группы данных соответствуют критериям применимости параметрических критериев. Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями выявил влияние фактора генотипа ($F_{1, 24} = 415.75, p < 0.001$), а также фактора «день беременности» ($F_{5, 120} = 6.63, p < 0.001$) на величины систолического АД, при этом взаимодействие факторов не было достоверным ($F_{5, 120} = 0.36, p = 0.88$). Апостериорный критерий Тьюки выявил межлинейные различия на каждый день исследуемого периода ($p < 0.001$). (Рис. 8, А). Кроме того, было обнаружено достоверное снижение сАД в наиболее поздний период беременности (20-22 дни) у обеих линий (WAG: $p < 0.05$ по сравнению с Д0; НИСАГ: $p < 0.01$ по сравнению с Д0; Tukey HSD) (Рис 8, А).

Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями выявил влияние фактора генотипа на величины диастолического артериального давления ($F_{1, 23} = 213.05; p < 0.001$), при этом влияние фактора «день беременности» не было обнаружено ($F_{5, 115} = 2.102; p = 0.07$). Взаимодействие факторов не было достоверным ($F_{5, 115} = 0.770, p = 0.57$). Апостериорный критерий Тьюки выявил межлинейные различия на каждый день исследуемого периода ($p < 0.001$) (Рис. 8, Б). Нами не было обнаружено корреляции между числом плодов 21-го дня гестации и степенью снижения сАД ни на крысах НИСАГ ($r = 0.24, p = 0.57$), ни на крысах WAG ($r = -0.26, p = 0.49$). Также, нами не было обнаружено корреляции между числом живорожденных потомков и уровнем снижения сАД ни у гипертензивной ($r = 0.84, p = 0.16$) ни у нормотензивной линиях ($r = 0.7, p = 0.45$).

Анализ динамики массы тела показал, что набор массы тела во время беременности происходил примерно одинаковым образом у крыс обеих линий (Рис. 8, В). У крыс НИСАГ масса тела была выше, чем у крыс WAG изначально, то есть до беременности, и в дальнейшем на всем протяжении исследуемого периода это сохранялось ($p < 0.001$). В каждой следующей точке измерения масса тела превышала таковую в предыдущей точке у крыс обеих линий, кроме Д16. До 14-го дня беременности самки активно набирали массу тела – Д7 vs. Д0: $p < 0.01$ у WAG, $p < 0.001$ у НИСАГ; Д14 vs. Д7: $p < 0.001$ у WAG, $p < 0.01$ у НИСАГ. Масса тела на 16 день беременности не отличалась от массы тела на Д14 у крыс обеих линий ($p > 0.05$). Начиная с Д18 активный набор массы тела возобновлялся: Д18 vs. Д16: $p < 0.01$ у WAG и НИСАГ; Д20-21 vs. Д18: $p < 0.001$ у WAG и НИСАГ. В среднем, масса тела у крыс НИСАГ увеличилась на

66.2 ± 11.6 (30.5%); у WAG масса тела увеличилась на 58.4 ± 14.3 (33.1%). Достоверных различий по набору массы тела обнаружено не было ($p = 0.1$).

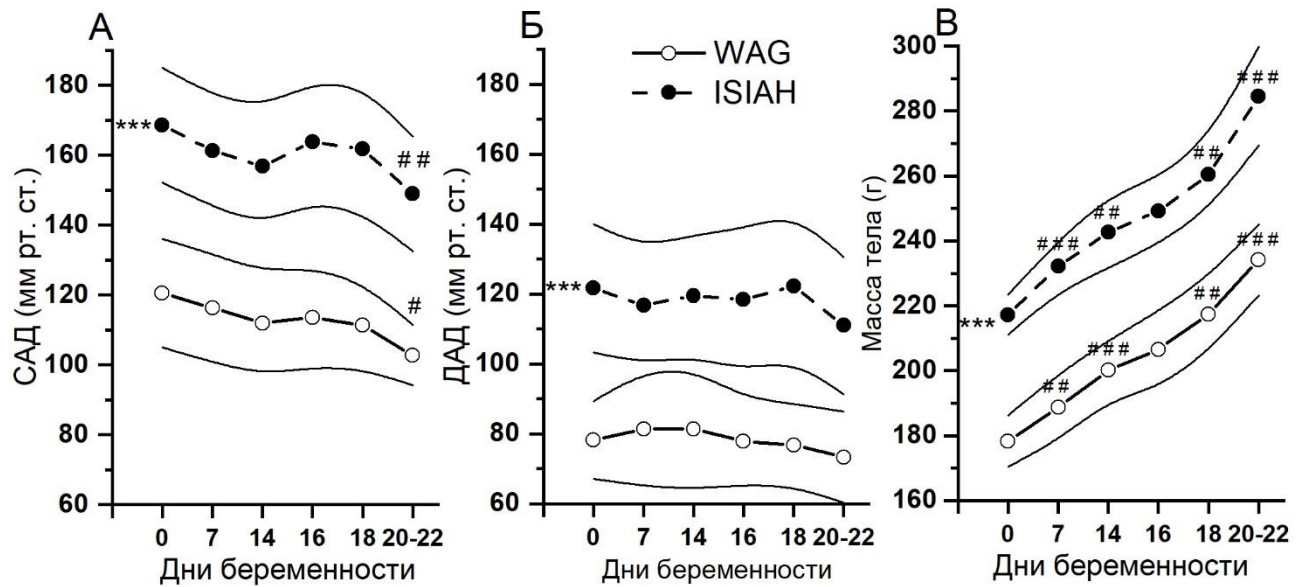


Рисунок 8. Динамика АД и набор массы тела во время беременности у самок крыс НИСАГ ($n=13$) и WAG ($n=13$). А, систолическое АД; Б, диастолическое АД. Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения (сплайн-кривая). *** $p < 0.001$ по сравнению с контролем WAG в каждый из дней исследования. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ по сравнению с днем 0 внутри одной линии соответственно (А), ### $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ по сравнению с предыдущим днем (В).

3.2.2. Репродуктивные характеристики у беременных самок НИСАГ и WAG

Репродуктивные характеристики представлены в Таблице 2. Общее число плодов достоверно отличалось у самок крыс НИСАГ и WAG ($p = 0.001$), преобладали более многочисленные пометы у крыс НИСАГ. Число плодов как мужского ($p = 0.03$), так и женского пола ($p = 0.02$) преобладали у крыс НИСАГ. Соотношение полов у плодов не отличалось между линиями ($p = 0.74$).

Таблица 2. Репродуктивные характеристики беременных самок НИСАГ и WAG. Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения (число плодов, самцов и соотношение полов) и медианы и первого и третьего квартилей (число неразвитых плодов, число самок). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с WAG.

Репродуктивные параметры	WAG (n = 11)	НИСАГ (n = 10)
Число плодов (общее)	8.36 ± 1.96	11.45 ± 1.63 **
Число неразвитых плодов	0.0 (0.0 – 1.0)	0
Число плодов мужского пола	4.09 ± 1.45	5.60 ± 1.43 *
Число плодов женского пола	4.0 (4.0 – 5.0)	6.0 (5.0 – 7.0) *
Соотношение полов (число самцов / число самок)	1.14	0.63

Биометрические характеристики плодов представлены на Рис. 9. Для сравнения биометрических характеристик из каждого помета в анализ было случайно (с использованием функции по выбору случайных чисел) выбрано по одному плоду мужского пола и одному плоду женского пола, всего было проанализировано 14 плодов из семи пометов крыс линии НИСАГ и 22 плода из 11 пометов WAG. Данные по плодам разного пола были объединены вследствие отсутствия влияния фактора пола на исследуемые характеристики плода ($F_{4, 29} = 0.45, p = 0.77$). Были выявлены достоверные межлинейные различия по всем исследуемым характеристикам: масса тела плода ($p < 0.001$), масса плаценты ($p < 0.001$), масса мозга ($p < 0.001$) и коэффициент энцефализации (отношение массы мозга к массе тела) ($p < 0.01$)

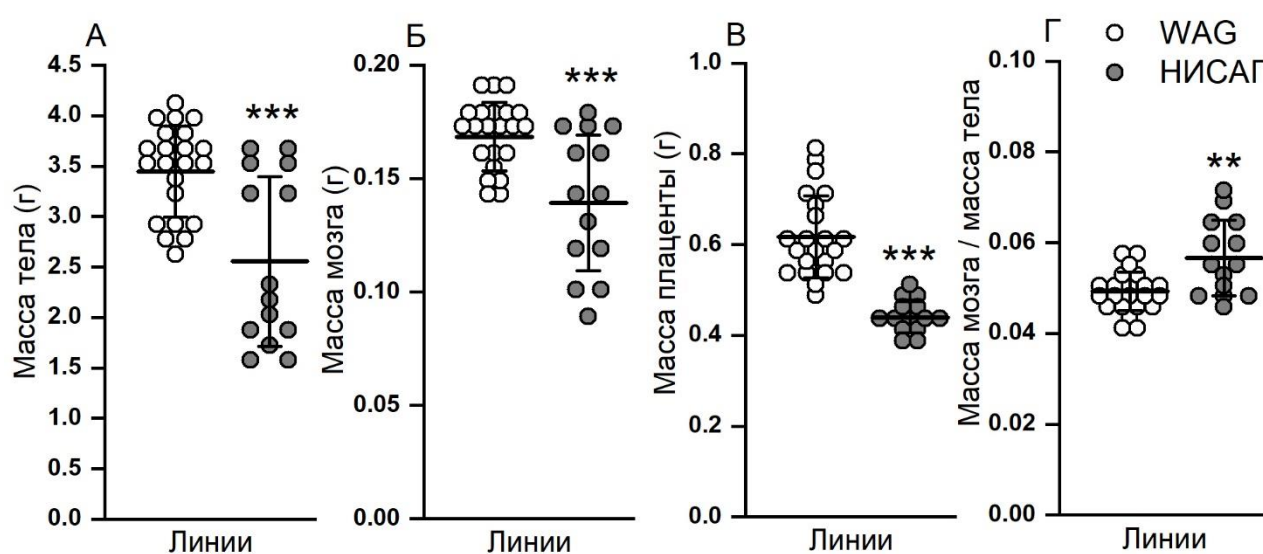


Рисунок 9. Сравнение биометрических характеристик плодов НИСАГ и WAG (гестационный возраст плода = 21 день). А, масса тела плодов, Б, масса мозга плодов, В, масса плаценты, Г, коэффициент энцефализации (отношение массы мозга к массе тела) плодов. Данные представлены в виде индивидуальных значений, среднего и стандартного отклонения ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по сравнению с WAG.

3.3. Влияние применения репродуктивных технологий на формирование гипертензивного фенотипа крыс линии НИСАГ

3.3.1. Влияние культивирования эмбрионов и эмбриотрансфера на пре- и постнатальное развитие крыс НИСАГ

3.3.1.1. Результаты экспериментов по эмбриотрансферу

Результаты экспериментов по эмбриотрансферу крыс НИСАГ представлены в Таблице 3. Всего было проведено 12 трансплантаций эмбрионов, из них 9 завершились родами. Было трансплантировано 107 преимплантационных эмбрионов (104 на стадии бластоцисты и 3 на стадии компактной морулы), в среднем по 8.9 ± 1.08 эмбриона на перенос. Было рождено 44 живых потомка [20 в группе ET (36.4 %); 24 в группе ET-IVC (46.2 %)], размеры выводков в

обеих группах составили 3-7 потомка на самку. Согласно критерию χ^2 различия между экспериментальными группами по доле живорожденных потомков от числа трансплантированных эмбрионов не были обнаружены ($p = 0.3$). Экспериментальные группы не отличались по размерам выводков ($p = 0.7$). Известно, что размер выводков является важной характеристикой, влияющей на онтогенез потомства, в частности, на скорость набора массы тела [Agnish, Keller, 1997]. В контрольной группе (*in vivo*) исходные размеры выводков были сокращены таким образом, чтобы повторить распределение данной характеристики в экспериментальных группах. 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 наблюдались несколько случаев перинатальной смертности (16.7 %) (см. Табл. 3), однако согласно критерию χ^2 с поправкой Йетса достоверных различий между экспериментальными группами по этому показателю обнаружено не было ($p = 0.17$).

Таблица 3. Результаты эксперимента по трансплантации эмбрионов НИСАГ и их длительного культивирования *in vitro*. Данные по продолжительности беременности и числу потомков представлены в виде $M \pm S.D.$

Экспериментальная группа	<i>In vivo</i>	ЕТ	ЕТ-IVC
Число реципиентов/трансплантаций	-	6	6
Число трансплантированных эмбрионов	-	55	52
Число реципиентов/самок, родивших потомство	6	4	5
Продолжительность беременности (дни)	22.0	22.3 \pm 1.26	21.8 \pm 0.75
Размер выводка (после сокращения)	12.7 \pm 1.21 (5.0 \pm 1.41)	5.0 \pm 1.83	4.8 \pm 2.28
Перинатальная смертность (n) (% от общего числа потомков)	0	0	4 (16.7)
Общее число живорожденных потомков (% рожденных от числа эмбрионов)	30	20 (36.4)	24 (46.2)

3.2.1.2. Масса тела потомков

Масса тела потомков в период вскармливания (до отсадки) представлена на Рис. 10 (А). Дисперсионный анализ Краскелла-Уоллиса выявил значимое влияние фактора «ВРТ» на массу тела потомков во все три исследованных дня: Д7 ($H_{2,32} = 15.88, p < 0.001$), Д14 ($H_{2,32} = 23.62, p < 0.001$) и Д25 ($H_{2,32} = 22.26, p < 0.001$). Уже в возрасте семи дней самцы в группе ЕТ обладали большей массой тела, чем в контроле ($p < 0.001$). В конце второй недели самцы в обеих экспериментальных группах были тяжелее, чем в контрольной группе

($p < 0.001$ в ET, $p < 0.05$ в ET-IVC). На момент достижения возраста, в котором проводилась отсадка потомства от матери (Д 25), масса тела самцов в обеих экспериментальных группах превышала таковую у контрольной группы ($p < 0.001$ vs. ET, $p < 0.01$ vs. ET-IVC). По-видимому, такие результаты были обусловлены не применением компонентов ВРТ, а изменением материнской среды – внутриутробно и после рождения. Для получения экспериментальных групп были использованы гибридные реципиенты, в то время как потомки из контрольной группы были рождены и воспитаны биологической матерью – самкой НИСАГ. Результаты динамики массы тела взрослых самцов представлены на Рисунке 10 (Б). Двухфакторный ДА с повторными измерениями выявил, что фактор «ВРТ» оказал значимое влияние на массу тела потомков ($F_{2,23} = 3.49$, $p < 0.05$). Фактор «возраст» также оказал достоверное влияние на массу тела потомков ($F_{1,23} = 350.12$, $p < 0.001$). Кроме того, было обнаружено взаимодействие между этими двумя факторами ($F_{2,23} = 5.46$, $p < 0.05$). Таким образом, применение репродуктивных технологий по-разному влияло на массу тела потомков в зависимости от их возраста. Масса тела самцов во всех трех группах достоверно увеличивалась с возрастом ($p < 0.001$). При этом межгрупповых отличий не было выявлено ни в одном, ни в другом возрастах.

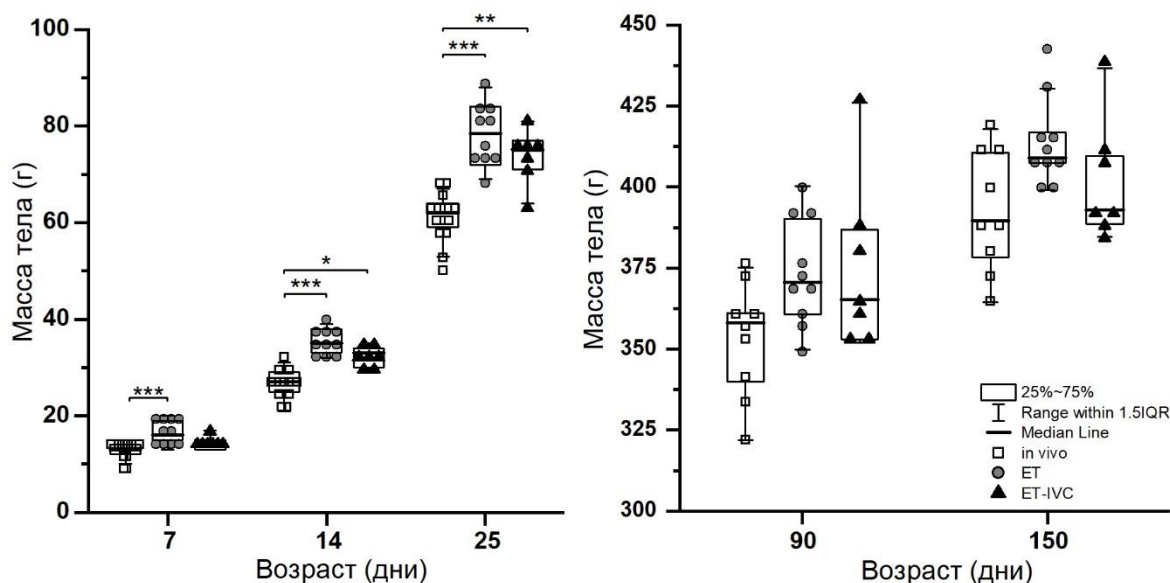


Рисунок 10. Сравнение массы тела самцов крыс НИСАГ, рожденных с использованием ВРТ. А, ранний постнатальный период (Д7-14-25); Б, взрослые животные (Д90-150); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.2.1.3. Развитие неонатальных рефлексов

Для оценки раннего постнатального развития использовалась панель тестов, оценивающих развитие неонатальных рефлексов. Данные по созреванию неонатальных рефлексов и реакций представлены на Рисунке 11. В силу отсутствия гендерных различий данные по крысам разного пола объединены. Дисперсионный анализ латентного периода выполнения рефлекса

переворачивания на плоскости между группами крыс НИСАГ выявил достоверное различие, обусловленное фактором «ВРТ» в возрасте шести ($H_{2,70} = 11.8, p < 0.01$) и восьми дней ($H_{2,70} = 9.58, p < 0.01$). Не было выявлено различий в возрасте семи ($H_{2,70} = 0.88; p = 0.64$) и девяти дней ($H_{2,70} = 3.36, p = 0.19$). Апостериорный тест Данна выявил межгрупповые различия в возрасте шести дней: между группами ЕТ и *in vivo* ($p < 0.001$) и между группами ЕТ-IVC и *in vivo* ($p < 0.01$), а также в возрасте восьми дней: между группами ЕТ и *in vivo* ($p < 0.01$). Следует отметить, что рефлекс переворота считается сформированным при условии, если время реакции в тесте не превышает пять секунд [Markus, Petit, 1987]. Значительная часть крысят как в экспериментальных группах (90.91% в группе ЕТ, 71.43% в ЕТ-IVC), так и в контрольной группе (66.67%) имела уже сформированный рефлекс в первый день исследуемого периода. При сравнении выборок с использованием точного критерия Фишера с учетом поправки Бонферрони на множественные сравнения ($\alpha = 0.05/3 = 0.017$) было обнаружено, что доля крысят, имевших сформированный рефлекс на шестой день жизни, не отличалась между группами.

Во всех трех исследуемых группах процент крысят, выполнявших реакцию отрицательного геотаксиса, постепенно повышался (Рис. 11, Б). Сравнение долей крысят, полностью выполнявших задачу, проводили с использованием точного критерия Фишера с учетом поправки Бонферрони на множественные сравнения ($\alpha = 0.05/3 = 0.017$) для каждого дня исследования. Было обнаружено, что на Д10 доля крысят, выполнявших задачу, в группе ЕТ была достоверно выше, чем в контроле ($p < 0.01$) и в сравнении с группой ЕТ-IVC ($p < 0.01$). По другим дням тестирования достоверных отличий по выполнению реакции обнаружено не было. Аналогично, процент крысят, выполнявших реакцию избегания края, постепенно увеличивался во всех группах в течение исследуемого периода (Рис. 11, В). Сравнение долей крысят, полностью выполнявших задачу, проводили с использованием точного критерия Фишера с учетом поправки Бонферрони на множественные сравнения ($\alpha = 0.05/3 = 0.017$) для каждого дня исследования. Было обнаружено, что доля крысят, выполнявших задачу, в группе ЕТ-IVC существенно выше на Д7 ($p < 0.01$), но существенно ниже на Д12 ($p < 0.05$) и Д13 ($p < 0.05$) по сравнению с контрольной группой. В группе ЕТ доля крысят, выполнявших задачу, не отличалась от контрольной группы ни в один из дней тестирования. Между экспериментальными группами также не было обнаружено различий по этому показателю ни в один из дней тестирования. Таким образом, принимая во внимание результаты всех трех тестов, можно заключить, что крысята из экспериментальных групп, рожденные с использованием ВРТ, в целом не отличались по развитию неонатальных рефлексов от крысят в контрольной группе).

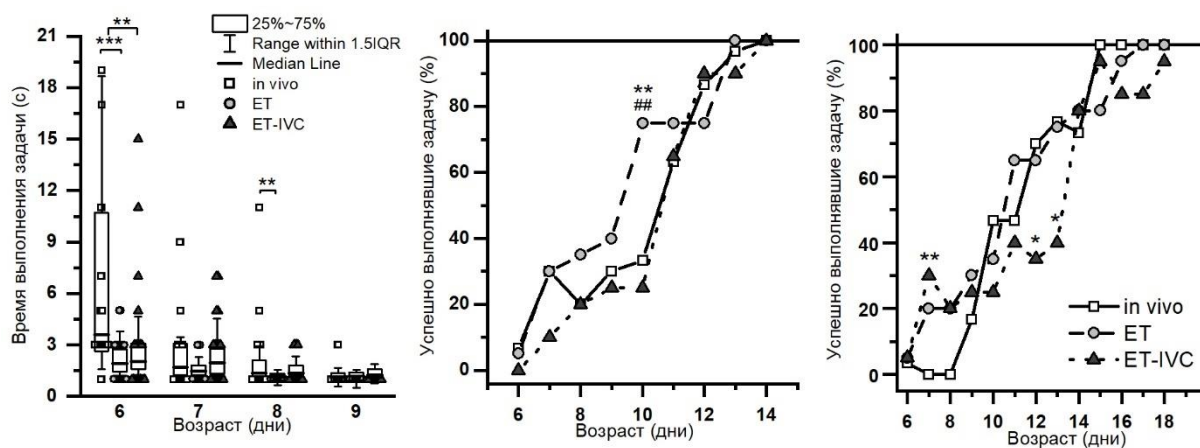


Рисунок 11. Развитие неонатальных рефлексов у крыс НИСАГ в группах: крысята, рожденные естественным путем (*in vivo*), эмбриотрансфер (ET) и эмбриотрансфер+культивирование *in vitro* (ET-IVC). А, рефлекс переворота; Б, реакция отрицательного геотаксиса; В, реакция избегания края. Данные по реакциям представлены в виде процента крысят, успешно выполнявших задачу, на каждый день теста. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ по сравнению с *in vivo*; ## $p < 0.01$ по сравнению с ET-IVC.

3.2.2. Влияние культивирования эмбрионов и эмбриотрансфера на фенотип взрослых потомков крыс НИСАГ: артериальное давление, поведение и морфометрия гиппокампа и префронтальной коры

3.2.2.1. Артериальное давление взрослых потомков

Артериальное давление и масса тела у взрослых самцов крыс линии НИСАГ во всех исследуемых группах: контроль ($n = 9$), ET ($n = 10$) и ET-IVC ($n = 7$) были измерены в двух разных возрастах: 3 мес. и 5 мес. Результаты анализа АД представлены на Рисунке 12. Было обнаружено, что фактор «ВРТ» оказывал значимое влияние на величины систолического АД ($F_{2, 23} = 3.77, p < 0.05$), но не диастолического АД ($H_{2, 26} = 2.29, p = 0.32$) у крыс в возрасте трех месяцев. Апостериорные межгрупповые сравнения выявили достоверные отличия по уровню сАД между группой ET-IVC и ET ($p < 0.05$), а также между ET-IVC и *in vivo* ($p < 0.05$).

В возрасте пяти месяцев фактор «ВРТ» также оказывал значимое влияние на величины сАД ($H_{2, 26} = 7.55, p = 0.02$), но не дАД ($H_{2, 26} = 4.7, p = 0.1$). Апостериорные межгрупповые сравнения выявили достоверные различия по уровню САД между группой ET-IVC и ET ($p < 0.05$), а также между ET-IVC и контролем ($p < 0.05$). В то время как различий между группами ЭТ и контроль не наблюдалось. Таким образом, можно предположить, что именно культивирование эмбрионов *in vitro* на стадии преимплантационного развития повлияло на изменение уровня систолического АД у взрослых потомков.

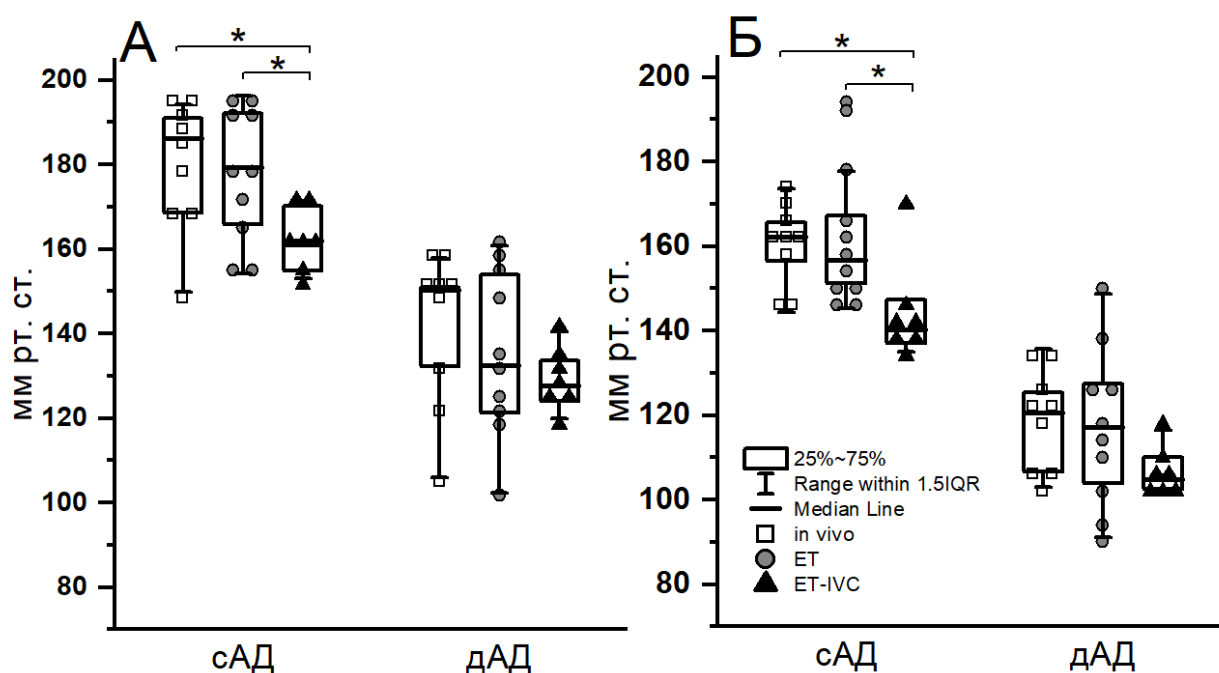


Рисунок 12. Величины сАД и дАД крыс НИСАГ, рожденных с использованием ВРТ. * $p < 0.05$ по сравнению с крысами НИСАГ, рожденными естественным путем.

3.2.2.2. Поведение взрослых потомков

3.2.2.2.1. Тест открытого поля

Поведение в тестах открытого поля, приподнятый крестообразный лабиринт и тест на распознавание нового объекта было исследовано у самцов в возрасте 12-14 недель в контрольной группе ($n = 9$), ET ($n = 10$) и ET-IVC ($n = 7$).

Результаты анализа параметров в ТОП представлены на Рисунке 13. Непараметрический дисперсионный анализ Краскелла-Уоллиса выявил значимое влияние фактора «ВРТ» на такие параметры, как время, проведенное в центре арены ($H_{2, 24} = 9.00$; $p < 0.05$), пройденный путь ($H_{2, 24} = 13.14$, $p < 0.01$) и исследованная область арены ($H_{2, 24} = 6.08$, $p < 0.05$). Апостериорный тест Данна подтвердил, что самцы в группе ET проводят меньше времени в центре арены, чем в контроле ($p < 0.01$) (Рис. 13, А). Пройденный путь у самцов в группах ET ($p < 0.01$) и ET-IVC ($p < 0.01$) был короче, чем у самцов в контрольной группе (Рис. 13, Б). Самцы в группе ET исследовали меньшую площадь арены, чем в контрольной группе ($p < 0.05$) (Рис. 13, В). Однако, не было выявлено влияние фактора «ВРТ» на такие дополнительные параметры, как число вертикальных стоек ($H_{2, 24} = 4.89$, $p = 0.09$), длительность вертикальных стоек ($H_{2, 24} = 0.76$, $p = 0.69$), латентность первой вертикальной стойки ($H_{2, 24} = 0.42$, $p = 0.81$) (Рис. 13, Г-Е); число актов груминга ($H_{2, 24} = 0.48$, $p = 0.79$); длительность актов груминга ($H_{2, 24} = 0.36$, $p = 0.83$) и латентное время первого акта груминга ($H_{2, 24} = 0.15$, $p = 0.93$) (данные не представлены). В целом, анализ параметров в ТОП показал, что самцы обеих экспериментальных групп (ET и ET-IVC), полученных с использованием

ВРТ, демонстрировали меньшую локомоторную и исследовательскую активность по сравнению с самцами в контрольной группе.

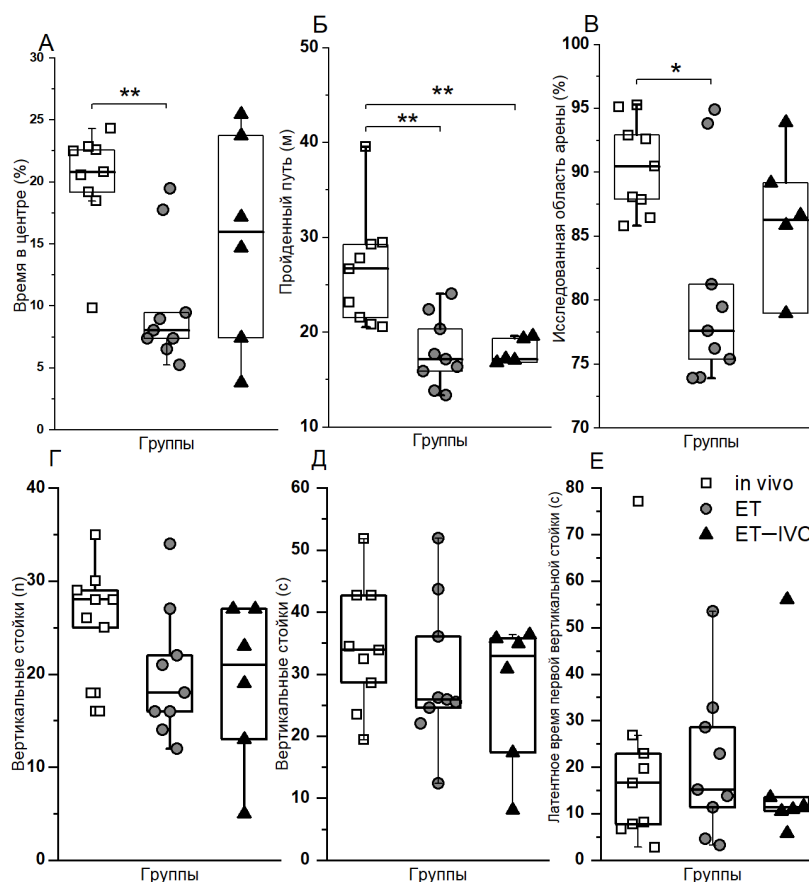


Рисунок 13. Параметры поведения в ТОП самцов крыс НИСАГ, рожденных с использованием ВРТ. А, время в центре; Б, пройденный путь; В, исследованная область арены; Г, число вертикальных стоек; Д, длительность вертикальных стоек; Е, латентное время первой вертикальной стойки. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

3.2.2.2.2. Приподнятый крестообразный лабиринт

Результаты анализа параметров в тесте приподнятый крестообразный лабиринт представлены на Рис. 14. Непараметрический дисперсионный анализ Краскелла-Уоллиса выявил значимое влияние фактора «ВРТ» на следующие параметры теста: пройденный путь ($H_{2, 25} = 15.32, p < 0.001$); длительность вытягиваний туловища ($H_{2, 25} = 8.03, p < 0.05$) и частота свешиваний с открытых рукавов ($H_{2, 25} = 6.25, p < 0.05$), однако, не было обнаружено достоверного влияния этого фактора на время, проведенное в открытых рукавах ($H_{2, 25} = 1.43, p = 0.49$); входы в открытые рукава ($H_{2, 25} = 3.12, p = 0.21$) и индекс тревожности ($H_{2, 25} = 1.76, p = 0.42$). Апостериорные сравнения между группами выявили, что пройденный путь у самцов в группе ET-IVC был короче, чем в группах ET ($p < 0.01$) и *in vivo* ($p < 0.01$) (Рис. 14, Г); длительность вытягиваний туловища была больше в группе ET по сравнению с контролем ($p < 0.05$) (Рис. 14, Е). При этом, влияние фактора «ВРТ» на частоту свешиваний было обусловлено главным образом различиями по этому параметру групп ET и контроль

($p = 0.054$), в то время как между группами ET-IVC и контроль данные не отличались ($p = 0.18$) (Рис. 14, Д). Кроме того, не было обнаружено влияния фактора «BPT» на дополнительные параметры оценки риска: длительность свешиваний крыс с открытых рукавов ($H_{2, 25} = 5.45$, $p = 0.07$) и латентное время первого свешивания ($H_{2, 25} = 0.42$, $p = 0.81$); частота вытягиваний туловища ($H_{2, 25} = 4.55$, $p = 0.1$) и латентное время первого вытягивания ($H_{2, 25} = 3.22$, $p = 0.2$) (данные не представлены).

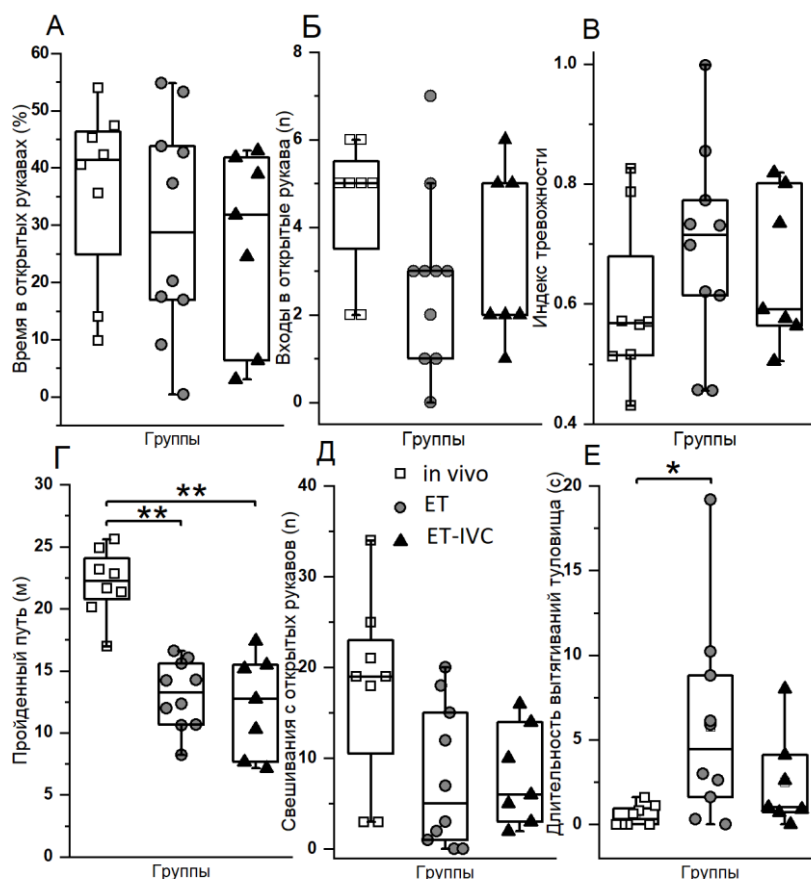


Рисунок 14. Параметры поведения в ПКЛ самцов НИСАГ, рожденных с использованием BPT. А, время, проведенное в открытых рукавах; Б, число входов в открытые рукава; В, индекс тревожности; Г, пройденный путь; Д, число свешиваний с открытых рукавов; Е, длительность вытягиваний туловища. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

В целом, результаты тестирования в ПКЛ подтвердили сниженную локомоторную активность у крыс экспериментальных групп по сравнению с контрольной, выявленную при тестировании в ТОП. В то время как тревожность крыс экспериментальных групп была на одном уровне с крысами контрольной группы, некоторые параметры поведения «оценка риска» (свешивания и вытягивания туловища) были изменены у крыс в группе ET, но не ET-IVC, по сравнению с контролем.

3.2.2.2.3. Тест на распознавание нового объекта

Данные теста на распознавание нового объекта представлены на Рис. 15. В первой фазе теста (два одинаковых объекта) не было выявлено различий во времени исследования объектов

между группами, независимо от расположения объектов согласно критерию Манна-Уитни (данные не представлены). Во второй фазе (новый и знакомый объект) данного теста проводились сравнения средних между группами с использованием критерия Манна-Уитни с поправкой по методу Бенджамини-Хохберга на множественные сравнения. Было обнаружено, что время исследования нового объекта по сравнению со знакомым объектом было больше лишь у контрольной группы ($p = 0.005 < \alpha_{\text{corr}} = 0.006$). Не было выявлено различий во времени исследования нового и знакомого объектов в группах ET ($p = 0.015 > \alpha_{\text{corr}} = 0.011$) и ET-IVC ($p = 0.16 > \alpha_{\text{corr}} = 0.02$).

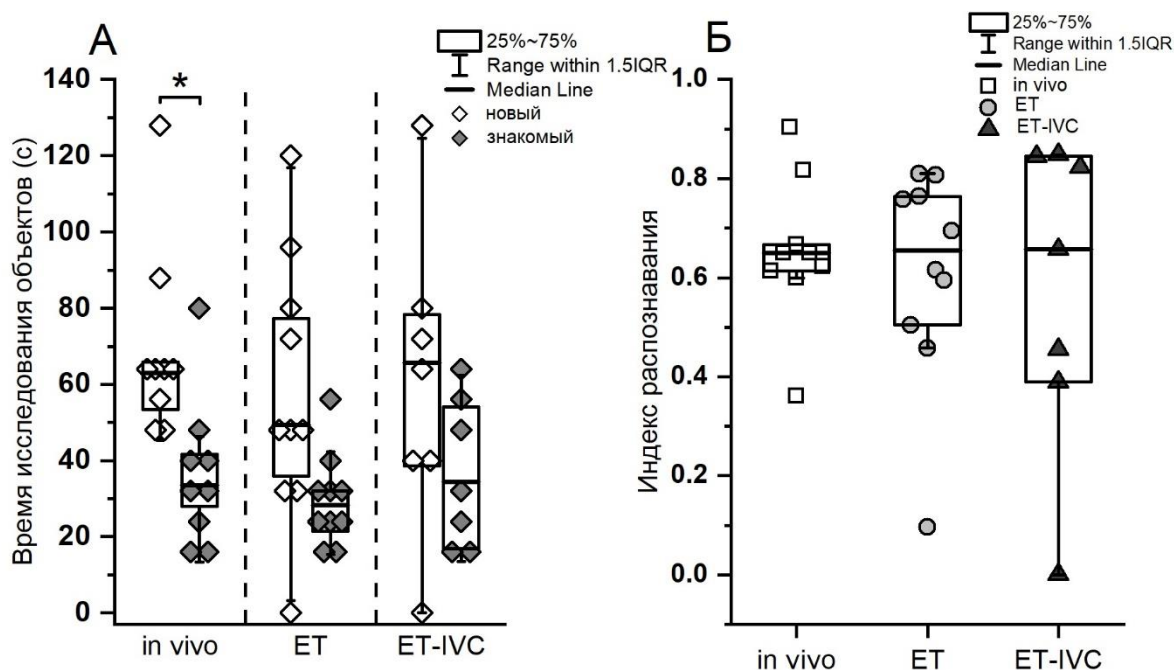


Рисунок 15. Параметры поведения в тесте на распознавание нового объекта самцов в группах крыс НИСАГ контроль (*in vivo*, $n = 9$), эмбриотрансфер (ET, $n = 10$) и эмбриотрансфер+культивирование *in vitro* (ET-IVC, $n = 7$). А, время исследования объектов во второй фазе теста (новый/знакомый); Б, индекс распознавания. * $p = 0.005 < \alpha_{\text{corr}} = 0.006$ согласно тесту Манна-Уитни с поправкой

Общее время исследования двух объектов и индекс распознавания были рассчитаны как рекомендовано [Lueptow, 2017]. Непараметрический ДА Краскелла-Уоллиса не выявил достоверного влияния фактора «ВРТ» на индекс распознавания ($H_{2,26} = 0.1$, $p = 0.95$) (Рис. 15, Б). Несмотря на различия во времени исследования двух объектов, интегральный показатель распознавания нового объекта не отличался между группами. Таким образом, уровень распознавания объектов у крыс экспериментальных групп был сравним с крысами контрольной группы.

3.2.2.3 Морфометрия префронтальной коры и гиппокампа у взрослых потомков

Данные по плотности пирамидальных нейронов в префронтальной коре крыс НИСАГ во всех группах представлены на Рис. 16. Непараметрический анализ Краскелла-Уоллиса не выявил

значимого влияния фактора «ВРТ» на число пирамидальных нейронов в префронтальной коре ($H_{2, 11} = 5.67, p = 0.059$).

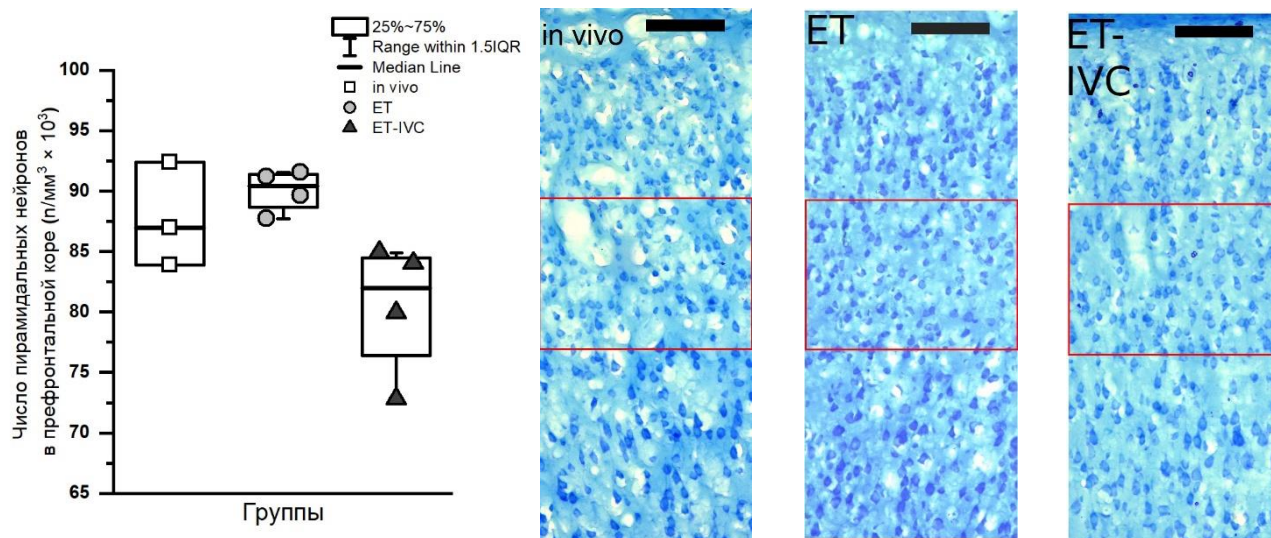


Рисунок 16. Плотность нейронов в III-IV слоях префронтальной коры (красный прямоугольник) у самцов крыс НИСАГ в группах: контроль (*in vivo*, $n = 4$), эмбриотрансфер (ET, $n = 4$) и эмбриотрансфер+культивирование *in vitro* (ET-IVC, $n = 4$) в возрасте 5 мес. (окрашивание по Нисслю). Увеличение 100х; масштабная полоска = 100 мкм.

Морфометрический анализ всех зон гиппокампа представлен на Рис. 17. Непараметрический ДА Краскелла-Уоллиса выявил значимое влияние фактора «ВРТ» на плотность нейронов в области СА2 ($H_{2, 11} = 7.85, p < 0.05$) и зубчатой извилине ($H_{2, 11} = 6.41, p < 0.05$), но не на СА1 ($H_{2, 12} = 4.65, p = 0.1$) (Рис. 17, А) и СА3 ($H_{2, 11} = 5.14, p = 0.08$) (Рис. 17, В). Апостериорный тест Данна подтвердил, что нейрональная плотность в СА2 ($p < 0.05$) и зубчатой извилине ($p < 0.05$) у крыс в группе ET-IVC снижена по сравнению с естественно рожденным контролем (Рис. 17, Б и Г), но не отличается от группы ET. Группы ET и *in vivo* также не отличаются между собой по этому показателю. Таким образом, можно сделать предположение о том, что именно культивирование эмбрионов на ранней стадии развития повлияло на изменение плотности нейронов в гиппокампе потомков, а не изменение материнской среды.

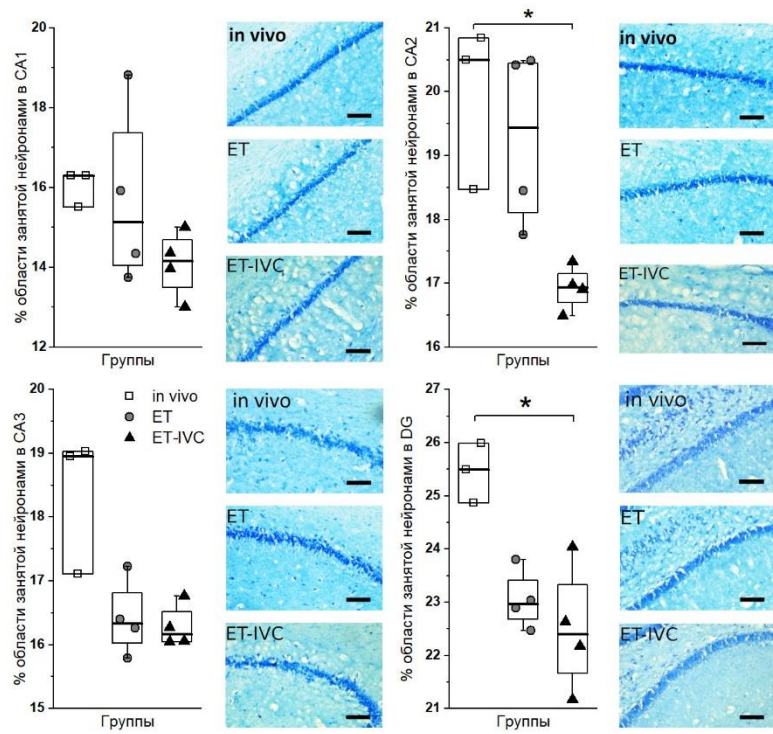


Рисунок 17. Плотность нейронов в областях гиппокампа у самцов крыс НИСАГ в группах: контроль (*in vivo*, $n = 4$), эмбриотрансфер (ET, $n = 4$) и эмбриотрансфер+культивирование *in vitro* (ET-IVC, $n = 4$) в возрасте 5 мес. (окрашивание по Нислю). А, СА1; Б, СА2; В, СА3; Г, зубчатая извилина. Увеличение, 100х; масштабная полоска = 100 мкм. Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха (25-75%). Усы представляют 1.5 межквартильного размаха. * $p < 0.05$ согласно апостериорному тесту Данна

3.2.2.4. Исследование нейрогенеза в гиппокампе

Иммуногистохимический анализ нейрогенеза в субгранулярной области зубчатой извилины гиппокампа представлен на Рис. 18. Однофакторный ДА не выявил значимого влияния фактора «ВРТ» на число DCX-полоитивных клеток ($F_{2,9} = 2.12, p = 0.18$).

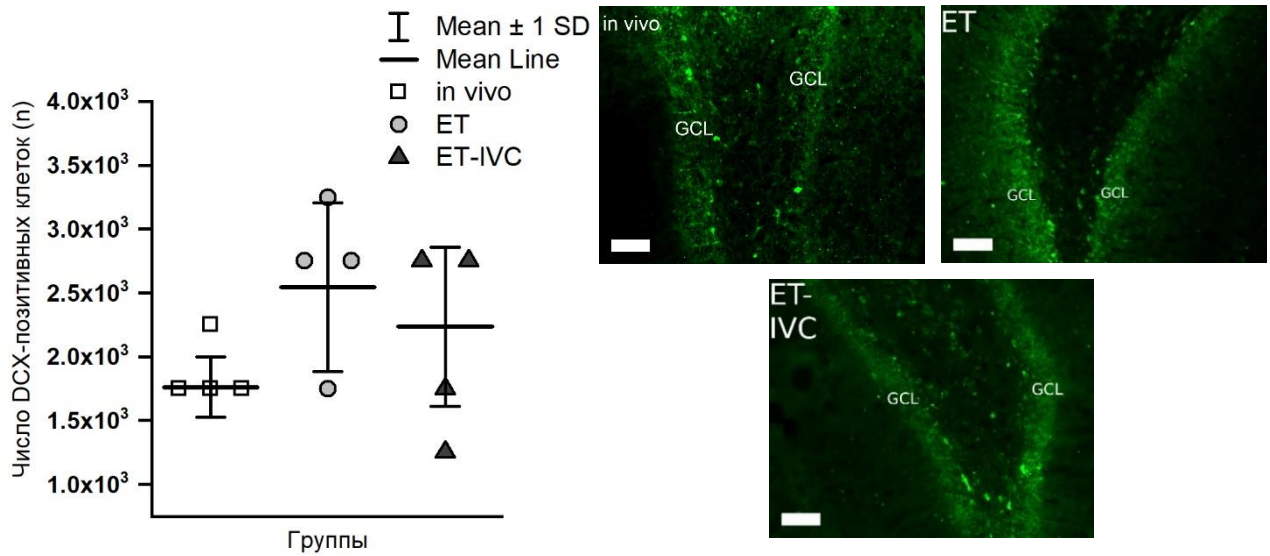


Рисунок 18. Число DCX-полоитивных клеток в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа у самцов крыс НИСАГ в группах: контроль (*in vivo*, $n = 4$), эмбриотрансфер (ET, $n = 4$) и эмбриотрансфер+культивирование *in vitro* (ET-IVC, $n = 4$) в возрасте 5 мес. Увеличение, 200x; масштабная полоска = 100 мкм. GCL – granular cell layer (гранулярный слой клеток).

ГЛАВА 4: ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Впервые исследована динамика систолического и диастолического АД во время беременности, согласно которой крысы линии НИСАГ, как и крысы линии WAG, характеризуются нормальным, а не патологическим течением беременности, в отличие от крыс линии Dahl S [Gillis и др., 2015]. Под нормальным протеканием беременности подразумевается снижение уровня сАД в наиболее позднем периоде перед родами (20-22 дни у крыс), при этом у крыс НИСАГ степень снижения достигала пороговых значений (<150 мм рт. ст). До наступления 20 дня беременности беременные крысы НИСАГ характеризовались повышенным уровнем как сАД, так и дАД, по сравнению с нормотензивными WAG. При этом нами не было обнаружено снижение уровня дАД, у обеих рассматриваемых нами линий крыс. Гипотензивный эффект, обусловленный беременностью, продемонстрирован на разных видах млекопитающих, таких как собаки, кролики и крысы, в том числе и у крыс SHR [Aoi и др., 1976; Lorenz и др., 1984; Iacono и др., 2009]. Сходный эффект был обнаружен и у человека [Макаров, Николаев, Волкова, 2006]. Для здоровой беременности у человека характерно системное снижение общего периферического сопротивления сосудов, а также физиологическая гипотония [Макаров, Николаев, Волкова, 2006]. Точный механизм данного явления остается неизвестным, однако некоторые авторы связывают снижение прессорной реакции на вазоконстрикторные агенты (ангиотензин II, норадреналин и вазопрессин), что связано с увеличением секреции эндотелиальными клетками сосудорасширяющих веществ, таких как простагландины [Coelho, Ballejo, Salgado, 1997] и оксид азота (NO) [Sladek, Magness, Congrad, 1997]. Интересно отметить, что при гестационной артериальной гипертензии (ГАГ) человека уровень синтеза простагландинов снижен; это послужило основой гипотезы о патогенезе ГАГ как состояния дефицита синтеза простагландинов [Pedersen и др., 1983]. Гипертензивные расстройства у беременных, в том числе ГАГ и преэклампсия, наблюдаются у 5-15% женщин и являются лидирующей причиной материнской и перинатальной смертности, а также внутриутробной задержки роста плода и преждевременных родов [Макаров, Николаев, Волкова, 2006]. Многочисленные клинические данные свидетельствуют о плацентарной недостаточности у матерей, страдающих гестационной артериальной гипертензией [Risnes и др., 2009].

Для крыс со спонтанной гипертензией линии SHR, также как и для линии НИСАГ, характерно снижение АД ближе к концу периода беременности [Lorenz и др., 1984]. Однако, у линий крыс, которые являются моделями экспериментальной гипертензии, индуцированной повышенной солевой нагрузкой либо введением дезоксикортикостерона ацетата (DOCA), соответственно Dahl S и DOCA [Page, Glendening, 1953; Gillis и др., 2015]. Для таких моделей не характерно снижение сАД во время беременности, напротив, у соль-чувствительной линии

Dahl S было выявлено повышение среднего артериального давления в позднем периоде беременности (Gillis et al., 2015). Именно данная линия используется для моделирования гестационной АГ у человека.

Степень снижения АД во время беременности у гипертензивных линий крыс SHR позитивно коррелирует с числом живорожденных потомков [Lorenz и др., 1984; Ahokas, Sibai, 1990]. Данное явление было продемонстрировано как для естественной беременности [Lorenz и др., 1984], так и для экспериментальной экстирпации некоторого числа потомков хирургическим путем [Ahokas, Sibai, 1990]. В то же время у нормотензивных крыс WKY подобной корреляции между числом потомков и АД обнаружено не было [Lorenz и др., 1984]. Авторами данных работ было сделано предположение о наличии циркулирующего в крови антигипертензивного фактора. В нашей работе подобной корреляции между приведенными признаками не было обнаружено ни по числу плодов 21-го дня гестации, ни по числу живорожденных потомков у гипертензивных крыс НИСАГ, как и у нормотензивных крыс WAG.

Исследование раннего развития крыс НИСАГ ранее не проводилось, за исключением одной работы [Мешков, Алехина, Морева, 2014], в которой было показано отставание крыс НИСАГ по показателям моторного развития, в частности, выполнению рефлекса переворота, в первую неделю жизни по сравнению с контрольными крысами WAG. Результаты нашей работы частично согласуются с данной работой Мешкова, нами было также показано отставание в развитии рефлекса переворота у крыс НИСАГ, однако, в предыдущей работе задержка во времени выполнения рефлекса сохранялась до четвертого дня, в дальнейшем периоде межлинейные различия исчезали [Мешков, Алехина, Морева, 2014]. В нашей работе отставание сохранялось на протяжении всего периода исследования - с шестого по десятый дни жизни. Развитие других неонатальных рефлексов, таких как реакция избегания края и реакция отрицательного геотаксиса были впервые исследованы у крыс НИСАГ. Было обнаружено опережение в развитии реакции избегания края у крыс НИСАГ, при этом развитие реакции отрицательного геотаксиса не отличалось у крыс WAG. В тесте на двигательную активность результаты крыс НИСАГ и WAG были сравнимы на протяжении всего периода исследования, однако на 13-й день жизни крысы НИСАГ демонстрировали лучшие показатели теста по сравнению с WAG. Ранее на гипертензивной линии SHR было показана задержка в развитии таких неонатальных рефлексов, как рефлекс переворота, реакция отрицательного геотаксиса и реакция опоры [Bassan и др., 2005].

Хроническая гипертензия во время беременности является главным фактором риска для развития сочетанной преэклампсии и неблагоприятных перинатальных исходов [Ankumah, Sibai, 2017]. Было показано, что женщины, страдающие хронической гипертензией, имеют

повышенный риск отслоения плаценты, развития сочетанной протеинурии и преэклампсии во время беременности. Осложнения во время беременности и родов могут приводить к неблагоприятным перинатальным исходам: у новорожденных чаще наблюдаются сопутствующие заболевания почек и коллагеноз сосудов, а также внутриутробная задержка роста [Ankumah, Sibai, 2017]. Последующее наблюдение показало, что гипертензия матерей ассоциировалась с умственной отсталостью умеренной степени у детей [Langridge и др., 2013]. В целом, данные, показывающие связь между материнской гипертензией и интеллектуальными нарушениями у детей достаточно противоречивы: некоторые авторы находят взаимосвязь [Taylor и др., 1985], а другие нет [Martikainen, 1989].

Систолическое АД взрослых крыс НИСАГ в покое находится в пределах 165-175 мм рт. ст. у самцов и 140-150 мм рт. ст. у самок [Seryapina и др., 2017; Redina, Markel, 2018]. В нашей работе показатели САД как самцов, так и самок у крыс НИСАГ превышали гипертензивный порог (150 мм рт. ст.) и достоверно отличались от соответствующих показателей у крыс WAG. Медианные значения САД в нашей работе составили 156 мм рт. ст. у самцов НИСАГ, и 158 мм рт. ст. у самок НИСАГ, при этом достоверных отличий между группами крыс разного пола обнаружено не было. Ранее статистического анализа данных по сравнению величин САД у самцов и самок крыс НИСАГ не проводилось. Медианные значения ДАД составили около 120 мм рт. ст. как у самцов, так и у самок крыс НИСАГ, при этом величины ДАД крыс WAG были на уровне 80 мм рт. ст. у самок и 90 мм рт. ст. у самцов. Наши результаты по величинам ДАД самцов согласуются с предыдущими работами [Seryapina и др., 2017]. В предыдущих работах измерение величин ДАД у самок НИСАГ не проводилось. Следует отметить, что достоверное повышение уровня ДАД между линиями отмечалось только у самок, но не у самцов. Мы предполагаем, что это различие было связано преимущественно с тем, что у самок WAG уровень ДАД был ниже, чем у самцов. У самцов крыс линии SHR со спонтанной гипертензией величины ДАД достоверно повышены в сравнении с нормотензивным контролем – линией Wistar-Kyoto и составляют 120-130 мм рт. ст. и около 100 мм рт. ст. соответственно [Isabelle и др., 2016; Perassa и др., 2016]. У крыс линии Sabra с соль-чувствительной гипертензией показатели систолического, диастолического и среднего АД у самок были ниже, чем у самцов, но этот результат был достигнут только при измерении АД радиотелеметрическим методом [Yagil и др., 2003]. Неинвазивное измерение при помощи хвостовой манжеты не выявляло межполовых различий гемодинамических показателей у данной линии [Yagil и др., 1998].

Ранние исследования показывают, что самцы крыс НИСАГ характеризуются более активным поведением, как локомоторным, так и исследовательским, в условиях новой обстановки по сравнению с контрольными крысами линий WAG и Wistar [Амстиславский, 2006; Мешков и

др., 2012; Redina и др., 2009]. Между тем, в этих ранних исследованиях поведение изучали лишь у самцов, но не у самок НИСАГ. Наши результаты подтверждают и расширяют выводы ранних работ, так как мы изучали поведение не только самцов, но и самок крыс НИСАГ в сравнении с крысами инбредной нормотензивной линии WAG. В частности, наши результаты свидетельствуют о том, что у самок крыс НИСАГ в тесте ОП наблюдается повышение исследовательской и локомоторной активности, подобно тому, как ведут себя самцы НИСАГ. Крысы гипертензивной линии SHR характеризуются гиперактивным типом поведения [Langen, Dost, 2011]. Было предложено использовать эту линию не только в качестве модели эссенциальной гипертензии, но и как модель синдрома гиперактивности и недостатка внимания у детей [Meneses и др., 2011]. Возникает вопрос, не являются ли две характерные черты крыс SHR взаимосвязанными? Исследователями была предпринята успешная попытка селекции двух разных линий, путем скрещивания SHR и WKY, одна из которых характеризовалась гиперактивностью (WKHA), а другая – артериальной гипертензией (WKHT) [Hendley, Ohlsson, 1991]. Однако, в дальнейшем было показано, что гиперактивность не определяется единообразно у гипертензивных крыс SHR и полученной нормотензивной гиперактивной линии WKHA, таким образом гиперреактивное поведение гипертензивных крыс имеет специфические черты, которых нет у нормотензивных крыс [Sagvolden, Hendley, Knardahl, 1992]. Авторы пишут, что гиперактивность нормотензивных крыс носит не настолько «всеобъемлющий» характер, как гиперактивность крыс гипертоников [Sagvolden, Hendley, Knardahl, 1992]. Однако, генетические исследования показывают, что, по-видимому, признаки повышенной двигательной активности и артериального давления у крыс НИСАГ контролируются разными генами [Redina и др., 2009]. Крысы с соль-чувствительной гипертензией Dahl DS демонстрировали сниженную активность в тесте ОП по сравнению с контрольной резистентной линией Dahl DR, что также свидетельствует об отсутствии взаимосвязи между этими признаками [Ernsberger, Azar, Iwai, 1983].

При сравнении трех линий – Wistar, НИСАГ и SHR, был сделан вывод о гиперактивности крыс SHR как в условиях новой обстановки, так и в домашней клетке [Маркель, 1986]. При этом крысы НИСАГ обладали большей локомоторной активностью в ответ на стимулы в новых условиях, то есть обладали гиперреактивностью по сравнению с крысами Wistar [Маркель, 1986]. Позднее данный вывод был подтвержден и с инбредным контролем WAG [Мешков и др., 2012]. В нашей работе впервые показано, что самки НИСАГ так же, как и самцы НИСАГ, характеризуются более активным поведением в тесте открытого поля по сравнению с самками нормотензивной линии WAG. Данные результаты согласуются с результатами исследований

на самках гипертензивной линии SHR, которые показывают повышенную активность по сравнению с самками WKY в тесте открытого поля [Ferguson, Cada, 2003].

Крысы НИСАГ обоих полов демонстрировали сниженную тревожность в тесте приподнятый крестообразный лабиринт по сравнению с крысами WAG. Исследование, проведенное на крысах SHR, также выявило сниженную тревожность в данном тесте по сравнению с нормотензивным контролем WKY, которую авторы интерпретировали как признак импульсивности [Ferguson, Gray, 2005]. Однако, как и в наших данных по сравнению НИСАГ и WAG, не было выявлено изменения длительности латентного периода до первого входа в открытые рукава между линиями SHR и WKY [Langen, Dost, 2011]. Увеличение латентного периода до первого входа в открытые рукава лабиринта считается признаком контролируемого поведения и снижения импульсивности [Almeida, Tonkiss, Galler, 1996].

В тесте на распознавание нового объекта крысы НИСАГ не обнаруживали различий по выполнению задачи на распознавание по сравнению с крысами WAG. До нашего исследования, не было сообщений о поведении крыс НИСАГ в данном тесте. Согласно исследованию Langen and Dost (2011), крысы SHR выполняют задачу на распознавание нового объекта лучше, чем их нормотензивный контроль. Однако, общее время исследования объектов у крыс SHR снижено [Langen, Dost, 2011]. Стоит отметить, что общее время исследования объектов у крыс НИСАГ было, напротив, значительно выше, чем у крыс WAG. В данном тесте такой показатель может свидетельствовать о меньшей склонности к отвлечению внимания. Способности крыс НИСАГ к обучению исследовались ранее путем изучения условных реакций активного и пассивного избегания, при этом различий в приобретении реакции не было обнаружено между тремя линиями - НИСАГ, Wistar и WAG [Лоскутова и др., 2006; Лоскутова, Филатов, 2007]. Таким образом, можно сделать вывод о независимости процессов памяти, внимания и обучения от повышенного АД у крыс НИСАГ, по крайней мере, по данным тестам. Результаты наших исследований самцов и самок НИСАГ в ходе выполнения тестов ОП, ПКЛ и РНО, свидетельствуют о том, что крысы этой линии по поведению похожи, в целом, на крыс линии SHR по характеристикам активности и тревожности, отличаясь от последних отсутствием гиперактивности, но наличием гиперреактивности.

В нашей работе был впервые применен метод культивирования эмбрионов *in vitro* в сочетании с эмбриотрансфером по отношению с гипертензивным крысам линии НИСАГ. При этом было получено живое потомство как в группе с прямой трансплантацией эмбрионов, так и в группе, где эмбрионы были культивированы в течение суток *in vitro* перед переносом. Эффективность процедур в группах с эмбриотрансфером составила 36-46% в расчете на число перенесенных

эмбрионов, такая эффективность находится в пределах, указанных в других подобных работах на крысах [Kato и др., 2004; Borjeson и др., 2014; Tran и др., 2014]. В ранних работах на крысах НИСАГ были получены только потомки после прямой трансплантации бластоцист без предварительного культивирования перед переносом [Амстиславский, 2006]. Потомки крыс НИСАГ, которых вынашивала самка-реципиент, как в группе с культивированием, так и в группе без культивирования, обладали большей массой тела, начиная со второй недели жизни (Д7) и до момента отсадки от матери (Д25) по сравнению с группой *in vivo*. При этом, скорость роста крысят не отличалась по крайней мере в рассматриваемых периодах (вторая и третья неделя жизни). Было бы более информативно, если бы мы обладали данными о массе тела крысят при рождении, но мы не измеряли данный параметр, чтобы не тревожить мать-реципиента и гнездо и таким образом не спровоцировать поедание потомства матерью. Можно сделать несколько предположений относительно массы тела потомства при рождении. Во-первых, можно сделать предположение, что потомки, рожденные в результате трансплантаций эмбрионов, сразу родились с большей массой тела по сравнению с контролем. Вторым и наиболее подходящим вариантом будет такой: масса тела при рождении таких потомков была снижена вследствие задержки внутриутробного развития, так как хорошо известно, что эмбрионы из-за субоптимальных условий вне материнского организма имеют меньше клеток и развиваются более медленно, но в первую неделю жизни у них проявился так называемый «catch-up growth», в результате которого в первую неделю жизни они ускоренно набирали массу тела, которая превысила таковую потомков в группе *in vivo*. Интересно отметить, что эффекты культивирования на постнатальный рост противоречивы и зависят, по-видимому, от условий культивирования, в частности, состава культуральной среды и длительности процесса культивирования [Bowman, McLaren, 1970; Young и др., 2001; Sjöblom и др., 2005].

Другим вариантом объяснения такого эффекта будет не применение ВРТ к этим группам, а изменение материнской среды, как внутриутробной, так и постнатальной. В связи с тем, что размер пометов в экспериментальных группах был небольшим (3-7 потомков на самку), мы искусственно сократили размеры пометов в контрольной группе таким образом, чтобы они соответствовали таковым в экспериментальных группах. Изначально размеры пометов в контрольной группе составляли 13-15 потомков на самку. Известно, что размер выводков является важной характеристикой, влияющей на онтогенез потомства, в частности, на скорость набора массы тела [Agnish, Keller, 1997]. Однако, более современные данные свидетельствуют о том, что искусственное сокращение пометов после рождения ведет к нарушению запрограммированной лактации и изменению характера питания потомства, которое приводит не только к ускоренному набору массы тела в раннем постнатальном периоде и соответствующим изменениям метаболизма у взрослых животных, но и к

отклонениям к поведению и повышению артериального давления [Wlodek и др., 2003; O'Dowd и др., 2008; Briffa и др., 2019]. Наши данные свидетельствуют о том, что скорость набора массы тела в двух экспериментальных группах и контрольной группе в исследуемых периодах (D7-D14; D14-D25) не отличалась. Мы предварительно сравнили данные по двум контрольным группам НИСАГ с сокращением помета и без сокращения помета, при этом было получено, что в неонатальном периоде масса тела между группами не отличалась, при этом масса тела у крыс с сокращением помета при отсадке от матери, как и в возрасте трех месяцев была выше, чем крысят, которые выросли в пометах без сокращения. По мере наступления возраста 3-х месяцев у крыс во всех группах масса тела выравнивалась, этот эффект сохранялся также и в возрасте пяти месяцев.

В ранних работах, посвященных исследованию потомства, полученного в результате трансплантации эмбрионов и/или кросс-фостеринга между линиями гипертензивных и нормотензивных крыс, не исследовалось поведение потомков [Kubisch, Gómez-Sánchez, 1999; Nicolantonio Di и др., 2006; Lee, Azar, 2010; McCarty, 2017]. В нескольких работах на мышах было обнаружено, что трансплантация эмбрионов в сочетании с их культивированием *in vitro* может влиять на тревожность у потомства, при этом такой эффект проявлялся не у всех линий мышей и не у обоих полов [Ecker и др., 2004; Lerch и др., 2016]. В нашей работе группа крыс, рожденных из эмбрионов, которые культивировались *in vitro*, не отличалась по уровню тревожности от группы крыс, полученных из эмбрионов после эмбриотрансфера без культивирования. Ранее было показано, что культивирование эмбрионов мышей со стадии двухклеточного зародыша до бластоцисты, снижает тревожность полученных из таких эмбрионов потомков [Ecker и др., 2004]. В нашей работе снижения тревожности у таких крыс не наблюдалось, данные различия можно объяснить различной видовой принадлежностью и генотипом объекта исследования, а также методическими различиями: длительностью культивирования, культуральной средой, наличием/отсутствием гормональной стимуляции самок. Следует обратить внимание на то, что на этапе созревания гамет, а также на ранних стадиях развития эмбриона, происходит эпигенетическое перепрограммирование генома [Reik, Dean, Walter, 2001]. Таким образом, гормональная гиперстимуляция яичников может приводить к созреванию «эпигенетически дефектных» ооцитов, из которых впоследствии могут развиваться потомки с измененным фенотипом [Лебедев, Пузырев, 2007]. В нашей работе мы получали эмбрионы на стадии восьми клеток либо морулы без гормональной индукции овуляции, а также длительность культивирования *in vitro* была относительно короткой (24 часа). Кроме того, нами была использована специальная среда для культивирования эмбрионов крыс mR1ЕСM. Однако, обе группы крыс, родившихся в результате переноса эмбрионов, характеризовались низким уровнем локомоторной активности в тестах открытого

поля и приподнятого крестообразного лабиринта по сравнению с контрольной группой крыс НИСАГ, зачатых естественным путем. Крысы НИСАГ характеризуются высокой активностью в данных тестах по сравнению с нормотензивными крысами WAG [Ragaeva и др., 2017]. Вероятно, такое снижение активности у потомков обусловлено изменением материнской среды, как внутриутробной, так и постнатальной, для крыс обеих групп. Хорошо известно, что материнское поведение обуславливает многие черты поведения взрослых потомков, в частности, при переносе эмбрионов/кросс-фостеринге самкам мышей другой линии, у потомков наблюдается «имитация» поведения приемной матери [Meaney, 2001]. Однако, мы не можем проверить данную гипотезу в связи с тем, что поведение гибридных крыс нами не изучалось. С другой стороны, приемная мать может испытывать стресс вследствие воспитания чужеродного ей потомства, а также в связи с перенесенной на ранней стадии беременности хирургической операции. Нами было показано, что у беременных крыс линии WAG уровень кортикостерона в крови был повышен более чем в три раза спустя сутки после проведения ложной хирургической операции, имитирующей перенос эмбрионов [Rozkova и др., 2020]. Негативное влияние повышенного уровня глюкокортикоидных гормонов на эмбрион во время беременности может иметь долгосрочные последствия на фенотип потомства, даже на преимплантационной стадии его развития [Burkuš и др., 2015]. Следует, однако, отметить, что у людей – пациентов клиник, использующих ВРТ для лечения бесплодия, процедура переноса эмбрионов не сопровождается хирургическим вмешательством, так как перенос осуществляется трансвагинально и является относительно безопасной процедурой, не несущей никаких рисков для здоровья женщины. В отличие от грызунов, где процедура переноса проводится хирургическим путем. Однако, в работах последних лет встречаются и неинвазивные методы переноса эмбрионов у грызунов с помощью специальных приборов nSET.

Мы не обнаружили влияния переноса эмбрионов и культивирования эмбрионов *in vitro* на когнитивные способности взрослых потомков, в частности, в тесте РНО индекс распознавания объектов у крыс был сравним с контрольной группой. Это свидетельствует об отсутствии нарушений эпизодической памяти у потомков. Наши результаты коррелируют с работой Маниги с соавторами (2016), в которой сравнивались когнитивные способности потомков мышей, эмбрионы которых были трансплантированы приемным матерям с гормональной индукцией овуляции [Mainigi и др., 2016]. Однако, нами было отмечено, что культивирование эмбрионов, но не перенос эмбрионов, оказало влияние на плотность нейронов в гиппокампе взрослых потомков. При этом негативного влияния эмбрионального культивирования на плотность нейронов в префронтальной коре взрослых крыс не наблюдали. В работе Маниги было обнаружено снижение плотности нейронов в коре потомков несмотря на то, что уровень

их когнитивных способностей был сравним с контрольной группой [Mainigi и др., 2016]. Культивирование эмбрионов, как и гормональная стимуляция матери перед наступлением беременности, приводят к изменению пери-имплантационной материнской среды и, как следствие, к эпигенетическим изменениям в эмбрионе и плаценте [Mainigi и др., 2014; Mani, Mainigi, 2018].

В нашей работе культивирование и перенос эмбрионов не повлияли на уровень нейрогенеза в гиппокампе взрослых потомков. Однако, большое количество данных указывает на то, что вмешательство в пренатальную среду, например, стрессирование беременных самок или изменение материнской заботы постнатально может приводить к нарушению гиппокампального нейрогенеза у грызунов [Korosi и др., 2012; Loi и др., 2014]. Неблагоприятные события в перинатальном периоде обычно приводят к подавлению нейрогенеза во взрослом возрасте; однако это зависит от возраста и пола изучаемого потомства [Loi и др., 2014]. Отсутствие изменений в уровне нейрогенеза в гиппокампе у крыс НИСАГ, рожденных в результате переноса эмбрионов, независимо от того, проводилось ли культивирование до переноса или нет, может указывать на то, что стресс от процедур у матери оказался недостаточно сильным, чтобы оказать влияние. Это предположение хорошо согласуется с нашими недавно опубликованными результатами, показывающими, что хирургическая операция, имитирующая перенос эмбрионов, проведенная на беременных крысах НИСАГ, не вызывала каких-либо изменений в нейрогенезе гиппокампа у взрослых потомков мужского пола [Rozkova и др., 2020]. По-видимому, хирургическое вмешательство, сопровождающее перенос эмбрионов у грызунов, является недостаточно стрессующим событием для того, чтобы вызвать изменения уровня нейрогенеза у потомков на этой модели.

Необходимо отметить, что уровень систолического АД у крыс НИСАГ, которые были культивированы в эмбриональном периоде, был снижен как по сравнению с крысами НИСАГ, которые были перенесены самке реципиенту без культивирования, так и по сравнению с контрольной группой. Этот эффект мы наблюдали у потомков как в возрасте трех месяцев, так и в возрасте пяти месяцев, при этом в последнем случае уровень сАД у потомков снижался до порогового значения (медианное значение < 150 мм рт. ст.). Подобный эффект был отмечен в работе на мышах, которые не только культивировались на эмбриональном этапе развития, но и были зачаты *in vitro* [Donjacour и др., 2014]. Однако, другим литературным данным он противоречит, в частности, ранее было обнаружено, что после переноса эмбрионов, культивированных со стадии двух клеток до бластоцисты, у потомков в возрасте 21 недели систолическое АД было повышено как у самцов, так и самок [Watkins и др., 2007]. В другой работе у самцов мышей, зачатых *in vitro* было повышенное САД в возрасте 14 недель [Rexhaj

и др., 2013]. Наиболее вероятные причины таких противоречий находятся в видовом различии объектов исследования, а также длительности культивирования и используемых культуральных сред. Известно, что состав культуральной среды может влиять на фенотип потомства вследствие эпигенетических эффектов. Для культивирования эмбрионов крыс мы использовали среду mR1ECM (modified rat 1-cell embryo culture medium) без фосфатов и с повышенным содержанием глюкозы, а также относительно короткую длительность культивирования (24 ч) по сравнению с другими работами (72 либо 96 ч). Не так давно было обнаружено изменение экспрессии генов РААС у зачатых *in vitro* мышей [Wang и др., 2018]. РААС играет ключевую роль в патогенезе гипертензии у крыс НИСАГ [Amstislavsky и др., 2006; Redina, Markel, 2018]. Особенность линии заключается в том, что экспрессия отдельных генов РААС в ткани сердца изменена в сравнении с другими гипертензивными линиями (SHR и Dahl) [Fedoseeva и др., 2009]. Можно сделать предположение, что именно культивирование эмбрионов крыс НИСАГ вызвало изменения в экспрессии генов тканей РААС сердца, которые в результате привели к наблюдаемому смягчению гипертензии у взрослых крыс НИСАГ.

Наши результаты, полученные на модели гипертензии, является обнадеживающим для использования ВРТ в клинической практике на людях, так как отклонения в поведении, когнитивных способностях и раннем постнатальном развитии потомков крыс в группах с культивированием и эмбриотрансфером и контрольной минимальны. Однако, наши результаты показывают, что краткосрочное культивирование эмбрионов оказало позитивное влияние на работу сердечно-сосудистой системы потомков крыс НИСАГ, в результате чего их систолическое АД снизилось и такой эффект сохранялся в течение по крайней мере двух месяцев.

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 неophobia 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адаричев В. А. и др. Характеристика линий крыс с нормотензивным и гипертензивным статусом методом геномного фингерпринтинга // Генетика. 1996. Т. 32. № 10. С. 1–4.
2. Амстиславский С. Я. Эмбриотехнологические подходы к сохранению исчезающих видов млекопитающих // 2006.
3. Амстиславский С. Я. и др. Редеривация путем трансплантации эмбрионов линий лабораторных мышей и крыс // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17. № 1. С. 147–161.
4. Амстиславский С. Я., Маркель А. Л., Якобсон Г. С. Повышение артериального давления у приемных матерей крыс НИСАГ и Вистар: эффект перекрестного воспитания потомства // Российский физиологический журнал им. ИМ Сеченова. 1999. Т. 85. С. 1496–1502.
5. Амстиславский С. Я., Попова Н. К., Томилова Ю. Э. Влияние материнской среды на артериальное давление и рефлекс испуга у крыс с наследственной артериальной гипертензией // Российский физиологический журнал им. ИМ Сеченова. 1998. Т. 84. № 8. С. 783–790.
6. Бойцов С. А. Что мы знаем о патогенезе артериальной гипертензии // Cons. Medicum. 2004. № 5. С. 315–319.
7. Бойцов С. А. и др. Артериальная гипертония среди лиц 25 – 64 лет : распространенность, осведомленность, лечение и контроль. По материалам исследования ЭССЕ // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2014. Т. 13. № 4. С. 4–14.
8. Бузуева И. И. и др. Возрастные особенности структурной организации мозгового вещества надпочечника у крыс гипертензивной линии НИСАГ // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2006. Т. 142. № 12. С. 604–606.
9. Климов Л. О. и др. Экспрессия генов ренин-ангиотензиновой системы в структурах мозга крыс линии нисаг со стрессчувствительной артериальной гипертензией // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012. Т. 154. № 9. С. 342–345.
10. Коростышевская И. М., Максимов В. Ф. Возрастные структурно-функциональные особенности миоэндокринных клеток сердца у крыс в норме и при наследственной гипертензии // Онтогенез. 2013. Т. 44. № 2. С. 77–90.
11. Кушаковский М. С. Эссенциальная гипертензия (гипертоническая болезнь). Причины, механизмы, клиника, лечение. Спб.: ООО «Издательство Фолиант», 2002. 416 с.
12. Ланг Г. Ф. Гипертоническая болезнь. : Медгиз. Ленингр. отд-ние, 1950.
13. Лебедев И. Н., Пузырев В. П. Эпигенетические аспекты безопасности вспомогательных репродуктивных технологий // Генетика. 2007. Т. 43. № 9. С. 1157–1171.
14. Лоскутова Л. и др. Особенности выработки условной реакции активного избегания у крыс с разными формами наследственной артериальной гипертензии // Бюллетень

экспериментальной биологии и медицины. 2006. Т. 142. № 10. С. 386–388.

15. Лоскутова Л. В., Филатов А. В. Облегчение обучения активному избеганию гипертензивных крыс НИСАГ при введении диазепама // Бюллетень СО РАМН. 2007. Т. 3. № 125. С. 30–33.

16. Лоскутова Л., Дубровина Н., Маркель А. Сравнительный анализ сохранения условной реакции пассивного избегания у крыс с разными формами наследственной артериальной гипертензии // Российский физиологический журнал им. ИМ Сеченова. 2006. Т. 92. № 4. С. 440–448.

17. Макаров О. В., Николаев Н. Н., Волкова Е. В. Артериальная гипертензия у беременных. Только ли гестоз? : ГЭОТАР-Медиа, 2006. 176 с.

18. Маркель А. Генетическая модель индуцированной стрессом артериальной гипертензии // Изв. Ан. СССР. Сер. биол. 1985. № 3. С. 466–469.

19. Маркель А. Особенности поведения крыс с наследственно обусловленной артериальной гипертензией // Журн. высш. нервн. деят-сти им. ИП Павлова. 1986. Т. 36. № 5. С. 956–962.

20. Маркель А., Галактионов Ю., Ефимов В. Факторный анализ поведения крыс в тесте открытого поля // Журн. высш. нервн. деят-сти им. ИП Павлова. 1988. Т. 38. № 5. С. 855–863.

21. Маханова Н. и др. Онтогенетическая динамика артериального давления и характеристик ЭКГ у крыс линии НИСАГ с наследственной артериальной гипертензией // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1997. Т. 123. № 6. С. 709–713.

22. Мешков И. О. и др. Характеристика поведения гипертензивных крыс линии НИСАГ // Журн. высш. нервн. деят-сти им. ИП Павлова. 2012. Т. 62. № 2. С. 233–242.

23. Мешков И. О., Алехина Т. А., Морева Т. А. Характеристика поведения крыс с наследственной индуцируемой стрессом артериальной гипертензией (НИСАГ) в раннем онтогенезе // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014. Т. 18. № 2. С. 363–372.

24. Оганов Р. Г. Артериальная гипертензия // Школа здоровья: руководство для врачей. : М. ГЭОТАР-Медиа, 2008.

25. Оганов Р. Г. и др. Эпидемиология артериальной гипертензии в России. Результаты федерального мониторинга 2003–2010 гг. // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2011. Т. 10. № 1. С. 9–13.

26. Постнов Ю. В., Орлов С. Н. Первичная артериальная гипертензия как патология клеточных мембран // М. Медицина. 1987.

27. Рагаева Д. С. и др. Отдаленные последствия ранних пренатальных воздействий на физиологические и поведенческие характеристики потомков // Успехи физиологических наук. 2018. Т. 49. № 4. С. 1–15.

28. Рагаева Д. С., Брусенцев Е. Ю., Амстиславский С. Я. Вспомогательные репродуктивные технологии и артериальная гипертензия // *Онтогенез*. 2014. Т. 45. № 5. С. 299–313.
29. Раннева С. В. и др. Влияние культивирования эмбрионов на онтогенез потомства у млекопитающих // *Онтогенез*. 2020. Т. 51. № 6. С. 417–439.
30. Серяпина А. А. и др. Артериальная гипертония и морфология мозга у крыс линии нисаг: исследование с применением метода магнитно-резонансной томографии // XII международная конференция студентов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук». Томск: , 2015. С. 2–4.
31. Суслонова О. В., Рощевская И. М., Распутина А. А. Морфометрия желудочков сердца крыс в период раннего постнатального развития // *Известия Коми научного центра УрО РАН*. 2016. Т. 1. № 25. С. 45–50.
32. Федосеева Л. А. и др. Характеристика рениновой системы почки у крыс линии нисаг со стрессчувствительной артериальной гипертензией // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2009. Т. 147. № 2. С. 134–138.
33. Цырлин В. А. *Физиол. журн* // СССР. 1970; 10 1466. 1970. Т. 73.
34. Шальнова С. А. и др. Какие факторы влияют на контроль артериальной гипертонии в России // *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2018. Т. 17. № 4. С. 53–60.
35. Шмерлинг М. Д. и др. Ультраструктурные особенности почечных телец у крыс с наследственной индуцируемой стрессом артериальной гипертензией // *Морфология*. 2001а. Т. 120. № 6. С. 70–74.
36. Шмерлинг М. Д. и др. Структурная характеристика почечных клубочков крыс гипертензивной линии НИСАГ в условиях вскармливания их нормотензивными самками // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2001б. Т. 131. № 6. С. 713–716.
37. Шмерлинг М., Филюшина Е., Коростышевская И. М. Состояние миокарда у крыс новой гипертензивной линии // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1996. Т. 122. № 9. С. 271–273.
38. Якобсон Г. С., Сахаров Д. Г., Маркель А. Л. Характеристика функции сердца у гипертензивных крыс линии НИСАГ (ЭКГ-исследование) // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1994. № 7. С. 17–18.
39. Adamson G. D. и др. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology: world report on assisted reproductive technology, 2011 // *Fertil. Steril.* 2018. Т. 110. № 6. С. 1067–1080.
40. Adriani W. и др. The spontaneously hypertensive-rat as an animal model of ADHD: Evidence for impulsive and non-impulsive subpopulations // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2003. Т. 27. №

7. С. 639–651.

41. Agnish N. D., Keller K. A. The Rationale for Culling of Rodent Litters // *Fundam. Appl. Toxicol.* 1997. Т. 38. № 1. С. 2–6.

42. Ahokas R. A., Sibai B. M. The relationship between experimentally determined litter size and maternal blood pressure in spontaneously hypertensive rats // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1990. Т. 162. № 3. С. 841–847.

43. Aleixandre de Artiñano A., Miguel Castro M. Experimental rat models to study the metabolic syndrome. // *Br. J. Nutr.* 2009. Т. 102. № 9. С. 1246–53.

44. Almeida S. S., Tonkiss J., Galler J. R. Prenatal protein malnutrition affects exploratory behavior of female rats in the elevated plus-maze test // *Physiol. Behav.* 1996. Т. 60. № 2. С. 675–680.

45. Alonso-Galicia M. и др. Hypertension in Obese Zucker Rats // *Hypertension.* 1996. Т. 28. № 6. С. 1047–1054.

46. Altman J., Sudarshan K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat // *Anim. Behav.* 1975. Т. 23. № PART 4. С. 896–920.

47. Amstislavsky S. и др. Renal and endocrine changes in rats with inherited stress-induced arterial hypertension (ISIAH) // *Histochem. Cell Biol.* 2006. Т. 125. № 6. С. 651–659.

48. Amstislavsky S. Y. и др. Effects of change of maternal environment during early postnatal development on behaviour in cataleptic rats // *Behav. Processes.* 2001. Т. 56. № 1. С. 41–47.

49. Ankumah N. A. E., Sibai B. M. Chronic Hypertension in Pregnancy: Diagnosis, Management, and Outcomes // *Clin. Obstet. Gynecol.* 2017. Т. 60. № 1. С. 206–214.

50. Antonov Y. V. и др. Stress and hypertensive disease: adrenals as a link. Experimental study on hypertensive ISIAH rat strain // *Clin. Exp. Hypertens.* 2016. Т. 38. № 5. С. 415–423.

51. Antunes M., Biala G. The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications // *Cogn. Process.* 2012. Т. 13. № 2. С. 93–110.

52. Aoi W. и др. The Anti hypertensive Effect of Pregnancy in Spontaneously Hypertensive Rats // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1976. Т. 153. С. 13–15.

53. Ashton N. Perinatal development and adult blood pressure. // *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2000. Т. 33. № 7. С. 731–40.

54. Babatsikou F., Zavitsanou A. Epidemiology of hypertension in the elderly // *Heal. Sci. J.* 2010. Т. 4. № 1. С. 24–30.

55. Bader M. Rat Models of Cardiovascular Diseases // *Rat Genomics: Methods and Protocols* / под ред. I. Anegon. : Humana Press, 2010. С. 403–414.

56. Barker D. J. P. The origins of the developmental origins theory // *J. Intern. Med.* 2007. Т. 261. № 5. С. 412–417.

57. Bassan H. и др. The pregnant spontaneously hypertensive rat as a model of asymmetric

intrauterine growth retardation and neurodevelopmental delay // *Hypertens. Pregnancy*. 2005. Т. 24. № 3. С. 201–211.

58. Bateson P. и др. Developmental plasticity and human health. // *Nature*. 2004. Т. 430. № 6998. С. 419–21.

59. Behringer R. и др. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Fourth Edition*. New York, NY: , 2014. 814 с.

60. Ben-Ishay D., Saliternik R., Welner A. Separation of Two Strains of Rats with Inbred Dissimilar Sensitivity to Doca-Salt Hypertension // *Experientia*. 1972. Т. 28. № 11. С. 1321–1322.

61. Bianchi G. и др. A renal abnormality in the Milan hypertensive strain of rats and in humans predisposed to essential hypertension // *J. Hypertens. Suppl*. 1986. Т. 4. № 3. С. S33-6.

62. Blake D., Farquhar C. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology // ... *Syst. Rev*. 2007. № 4.

63. Bloise E., Feuer S. K., Rinaudo P. F. Comparative intrauterine development and placental function of ART concepti: Implications for human reproductive medicine and animal breeding // *Hum. Reprod. Update*. 2014. Т. 20. № 6. С. 822–839.

64. Borjeson T. M. и др. Administration of luteinizing hormone releasing hormone agonist for synchronization of estrus and generation of pseudopregnancy for embryo transfer in rats // *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci*. 2014. Т. 53. № 3. С. 232–237.

65. Bowman P., McLaren A. Viability and growth of mouse embryos after in vitro culture and fusion. // *J. Embryol. Exp. Morphol*. 1970. Т. 23. № 3. С. 693–704.

66. Brazdova A. и др. Immune aspects of female infertility // *Int. J. Fertil. Steril*. 2016. Т. 10. № 1. С. 1–10.

67. Briffa J. F. и др. Reducing pup litter size alters early postnatal calcium homeostasis and programs adverse adult cardiovascular and bone health in male rats // *Nutrients*. 2019. Т. 11. № 1.

68. Brioude F. и др. Clinical and molecular diagnosis, screening and management of Beckwith-Wiedemann syndrome: An international consensus statement // *Nat. Rev. Endocrinol*. 2018. Т. 14. № 4. С. 229–249.

69. Broadbent N. J. и др. Object recognition memory and the rodent hippocampus // *Learn. Mem*. 2010. Т. 17. С. 5–11.

70. Burkuš J. и др. Stress exposure during the preimplantation period affects blastocyst lineages and offspring development // *J. Reprod. Dev*. 2015. Т. 61. № 4. С. 325–331.

71. Buzueva I. I. и др. Age-related structural characteristics of the adrenal medulla in hypertensive NISAG rats // *Bull. Exp. Biol. Med*. 2006. Т. 142. № 6. С. 651–653.

72. Calle A. и др. Long-term and transgenerational effects of in vitro culture on mouse embryos. // *Theriogenology*. 2012. Т. 77. № 4. С. 785–93.

73. Cantone I., Fisher A. G. Epigenetic programming and reprogramming during development // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013. T. 20. № 3. С. 282–289.
74. Carobrez A., Kincheski G., Bertoglio L. Elevated plus maze // *Encycl Psychopharmacol.* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2014. С. 603– 606.
75. Caron K. M. I. и др. A genetically clamped renin transgene for the induction of hypertension. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002. T. 99. № 12. С. 8248–52.
76. Ceelen M. и др. Cardiometabolic differences in children born after in vitro fertilization: follow-up study. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008. T. 93. № 5. С. 1682–8.
77. Ceelen M. и др. Growth during infancy and early childhood in relation to blood pressure and body fat measures at age 8-18 years of IVF children and spontaneously conceived controls born to subfertile parents. // *Hum. Reprod.* 2009. T. 24. № 11. С. 2788–95.
78. Chen P. Y., Sanders P. W. Role of nitric oxide synthesis in salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats // *Hypertension.* 1993. T. 22. С. 812–818.
79. Chen S. и др. Assisted reproduction causes placental maldevelopment and dysfunction linked to reduced fetal weight in mice // *Sci. Rep.* 2015. T. 5. № April. С. 1–15.
80. Chen Z. и др. Large offspring syndrome: A bovine model for the human loss-of-imprinting overgrowth syndrome Beckwith-Wiedemann // *Epigenetics.* 2013. T. 8. № 6.
81. Chronopoulou E., Harper J. C. IVF culture media: Past, present and future // *Hum. Reprod. Update.* 2015. T. 21. № 1. С. 39–55.
82. Cierpial M. A., Konarska M., McCarty R. Maternal influences on sympathetic-adrenal medullary system in spontaneously hypertensive rats // *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 1990. T. 258. С. H1312–H1316.
83. Cierpial M. A., McCarty R. Hypertension in SHR rats: contribution of maternal environment // *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 1987a. T. 253. № 4. С. H980–H984.
84. Cierpial M. A., McCarty R. Preweanling behavioral development in spontaneously hypertensive, borderline hypertensive, and wistar-kyoto normotensive rats // *Dev. Psychobiol.* 1987b. T. 20. № 1. С. 57–69.
85. Cierpial M. A., Murphy C. A., McCarty R. Maternal behavior of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto normotensive rats: Effects of reciprocal cross-fostering of litters // *Behav. Neural Biol.* 1990. T. 54. С. 90–96.
86. Cobo A. и др. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: A prospective, randomized, controlled, clinical trial // *Hum. Reprod.* 2010. T. 25. № 9. С. 2239–2246.
87. Coelho E. B., Ballejo G., Salgado M. C. O. Nitric Oxide Blunts Sympathetic Response of Pregnant Normotensive and Hypertensive Rat Arteries // *Hypertension.* 1997. T. 30. № 3. С. 585–588.
88. Cooper R. S. и др. An international comparative study of blood pressure in populations of

European vs. African descent. // *BMC Med.* 2005. Т. 3. С. 2.

89. Cooper T. G. и др. World Health Organization reference values for human semen characteristics // *Hum. Reprod. Update.* 2010. Т. 16. № 3. С. 231–245.

90. Corvol P. и др. Seven Lessons From Two Candidate Genes in Human Essential Hypertension : Angiotensinogen and Epithelial Sodium Channel // *Hypertension.* 1999. Т. 33. № 6. С. 1324–1331.

91. Cox K. H., So N. L. T., Rissman E. F. Foster dams rear fighters: strain-specific effects of within-strain fostering on aggressive behavior in male mice. // *PLoS One.* 2013. Т. 8. № 9. С. e75037.

92. Cruz A. P. M., Frei F., Graeff F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1994. Т. 49. № 1. С. 171–176.

93. Cusil D. и др. Genetic models of arterial hypertension - role of tubular ion transport // *Pediatr. Nephrol.* 1993. Т. 7. С. 865–870.

94. Dahl L. K. Effects of Chronic Excess Salt Ingestion: Evidence That Genetic Factors Play an Important Role in Susceptibility To Experimental Hypertension // *J. Exp. Med.* 1962. Т. 115. № 6. С. 1173–1190.

95. Dayan N. и др. Effect of chronic hypertension on assisted pregnancy outcomes: A population-based study in Ontario, Canada // *Fertil. Steril.* 2016. Т. 105. № 4. С. 1003–1009.

96. DeAngelis A. M., Martini A. E., Owen C. M. Assisted Reproductive Technology and Epigenetics // *Semin. Reprod. Med.* 2018. Т. 36. № 3/4. С. 221–232.

97. Dene H., Rapp J. P. Maternal effects on blood pressure and survivability in inbred Dahl salt-sensitive rats // *Hypertension.* 1985. Т. 7. № 5. С. 767–774.

98. Deng A., Engels K., Baylis C. Impact of nitric oxide deficiency on blood pressure and glomerular hemodynamic adaptations to pregnancy in the rat // *Kidney Int.* 1996. Т. 50. № 4. С. 1132–1138.

99. Dobrian A. D. и др. Effect of salt on hypertension and oxidative stress in a rat model of diet-induced obesity // *Am. J. Physiol. Physiol.* 2003. Т. 285. № 4. С. F619–F628.

100. Doherty A. S. и др. Differential Effects of Culture on Imprinted H19 Expression in the Preimplantation Mouse Embryo // *Biol. Reprod.* 2000. Т. 62. № 6. С. 1526–1535.

101. Donjacour A. и др. In Vitro Fertilization Affects Growth and Glucose Metabolism in a Sex-Specific Manner in an Outbred Mouse Model // *Biol. Reprod.* 2014. Т. 90. № 4. С. 1–10.

102. Ecker D. J. и др. Long-term effects of culture of preimplantation mouse embryos on behavior // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004. Т. 101. № 6. С. 1595–1600.

103. Ennaceur A., Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data // *Behav. Brain Res.* 1988. Т. 31. № 1. С. 47–59.

104. Ernsberger P., Azar S., Iwai J. Open-field behavior in two models of genetic hypertension

and the behavioral effects of salt excess // *Behav. Neural Biol.* 1983. T. 37. № 1. С. 46–60.

105. Farin P. W., Crosier A. E., Farin C. E. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle // *Theriogenology*. 2001. T. 55. № 1. С. 151–170.

106. Fazeli A., Holt W. V. Cross talk during the periconception period // *Theriogenology*. 2016. T. 86. № 1. С. 438–442.

107. Fedoseeva L. A. и др. Gene expression for the renin system in the myocardium of hypertensive ISIAH rats // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2009. T. 148. № 4. С. 627–630.

108. Feng M. и др. Validation of Volume-Pressure Recording Tail-Cuff Blood Pressure Measurements // *Am. J. Hypertens.* 2008. T. 21. № 12. С. 1288–1291.

109. Ferguson S. A., Cada A. M. A longitudinal study of short- and long-term activity levels in male and female spontaneously hypertensive, Wistar-Kyoto, and Sprague-Dawley rats // *Behav. Neurosci.* 2003. T. 117. № 2. С. 271–282.

110. Ferguson S. A., Gray E. P. Aging effects on elevated plus maze behavior in spontaneously hypertensive, Wistar-Kyoto and Sprague-Dawley male and female rats // *Physiol. Behav.* 2005. T. 85. № 5. С. 621–628.

111. Fernández-Gonzalez R. и др. Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004. T. 101. № 16. С. 5880–5.

112. Frühbeck G., Salvador J. Role of adipocytokines in metabolism and disease // *Nutr. Res.* 2004.

113. Fudim M., Vemulapalli S. No Time to Waste: in Support of Aggressive and Immediate Management of Hypertension // *Curr. Hypertens. Rep.* 2016. T. 18. № 4.

114. Funder J. W. и др. The management of primary aldosteronism: Case detection, diagnosis, and treatment: An endocrine society clinical practice guideline // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2016. T. 101. № 5. С. 1889–1916.

115. Garcia E. A. и др. Genes and hypertension. // *Curr. Pharm. Des.* 2003. T. 9. № 21. С. 1679–89.

116. Gardner K. D. и др. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers // *Fertil. Steril.* 1998. T. 69. № 1. С. 84–88.

117. Gasperin D., Netuveli G., Pattussi M. P. Effect of psychological stress on blood pressure increase: a meta-analysis of cohort studies Efeito do estresse psicológico no aumento da pressão arterial: uma metanálise de estudos de coorte // *Prim. Care.* 2009. T. 25. № 4. С. 715–726.

118. Gillis E. E. и др. The Dahl salt-sensitive rat is a spontaneous model of superimposed preeclampsia // *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 2015. T. 309. № 1. С. R62–R70.

119. Gleicher N. и др. The «graying» of infertility services: An impending revolution nobody is

ready for // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2014. T. 12. № 1. С. 1–12.

120. Goldblatt B. Y. H. и др. Studies on experimental hypertension. I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia // *J. Exp. Med.* 1934. Т. 59. № 3. С. 347–379.

121. Goldstein D. S. Plasma Norepinephrine in Essential Hypertension. A study of the Studies // *Hypertension.* 1981. Т. 3. № 1. С. 48–52.

122. Gouldsbrough I. и др. Maternal nursing behaviour and the delivery of milk to the neonatal spontaneously hypertensive rat // *Acta Physiol. Scand.* 1998. Т. 162. № 1. С. 107–114.

123. Gray S. D. Reciprocal Embryo Transfer Between SHR and WKY II. Effect on Cardiovascular Development // *Clin. Exp. Hypertens. Part A Theory Pract.* 1991. Т. 13. № 5. С. 963–969.

124. Grossman A., Messerli F. H., Grossman E. Drug induced hypertension - An unappreciated cause of secondary hypertension // *Eur. J. Pharmacol.* 2015. Т. 763. С. 15–22.

125. Guo X.-Y. и др. Cardiovascular and metabolic profiles of offspring conceived by assisted reproductive technologies: a systematic review and meta-analysis // *Fertil. Steril.* 2017. Т. 107. № 3. С. 622- 631.e5.

126. Guyton A. Dynamics and control of the body fluids // *Circ. Physiol.* 1975.

127. Guyton A. С. и др. Arterial pressure regulation // *Am. J. Med.* 1972. Т. 52. № 5. С. 584–594.

128. Hajj N. el, Haaf T. Epigenetic disturbances in in vitro cultured gametes and embryos: implications for human assisted reproduction // *Fertil. Steril.* 2013. Т. 99. № 3. С. 632–641.

129. Hajjar I., Kotchen J. M., Kotchen T. A. HYPERTENSION: Trends in Prevalence, Incidence, and Control // *Annu. Rev. Public Health.* 2006. Т. 27. № 1. С. 465–490.

130. Hall C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality // *J. Comp. Psychol.* 1934. Т. 18. № 3. С. 385–403.

131. Handyside A. и др. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification // *Nature.* 1990. Т. 344. С. 768–770.

132. Hardy K. и др. Future developments in assisted reproduction in humans // *Reproduction.* 2002. Т. 123. № 2. С. 171–183.

133. Hargreave M. и др. Fertility treatment and childhood cancer risk: A systematic meta-analysis // *Fertil. Steril.* 2013. Т. 100. № 1. С. 150–161.

134. Harrington F., Murray A., Ford G. A. Relationship of baroreflex sensitivity and blood pressure in an older population // *J. Hypertens.* 2000. Т. 18. № 11. С. 1629–1633.

135. Harrison M., Langley-evans S. C. Europe PMC Funders Group Intergenerational programming of impaired nephrogenesis and hypertension in rats following maternal protein restriction

during pregnancy // 2009. Т. 101. № 7. С. 1020–1030.

136. Hemkemeyer S. A. и др. Effects of embryo culture media do not persist after implantation: A histological study in mice // *Hum. Reprod.* 2014. Т. 29. № 2. С. 220–233.

137. Hendley E. D., Ohlsson W. G. Two new inbred rat strains derived from SHR: WKHA, hyperactive, and WKHT, hypertensive, rats // *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 1991. Т. 261. № 2. С. H583–H589.

138. Herrera V. L. M. и др. Chlamydia pneumoniae Accelerates Coronary Artery Disease Progression in Transgenic Hyperlipidemia-Genetic Hypertension Rat Model // *Mol. Med.* 2003. Т. 9. № 5–8. С. 135–142.

139. Hirsch A. T. и др. ACC/AHA 2005 practice guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): Executive summary // *Circulation.* 2006. Т. 113. № 11. С. 1474–1547.

140. Ho S. C. и др. Effects of ceftriaxone on the behavioral and neuronal changes in an MPTP-induced Parkinson's disease rat model // *Behav. Brain Res.* 2014. Т. 268. С. 177–184.

141. Hori N. и др. Aberrant CpG methylation of the imprinting control region KvDMR1 detected in assisted reproductive technology-produced calves and pathogenesis of large offspring syndrome // *Anim. Reprod. Sci.* 2010. Т. 122. № 3–4. С. 303–312.

142. Iacono A. и др. Maternal adaptation in pregnant hypertensive rats: Improvement of vascular and inflammatory variables and oxidative damage in the Kidney // *Am. J. Hypertens.* 2009. Т. 22. № 7. С. 777–783.

143. Igonina T. N. и др. Effects of in vitro culture at the preimplantation embryo stage on early development and hypertension in ISIAH rats // *Hypertens. Pregnancy.* 2019. Т. 38. № 4. С. 208–216.

144. Imai G. и др. Hypertension Accelerates Diabetic Nephropathy in Wistar Fatty Rats, a Model of Type 2 Diabetes Mellitus, via Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades and Transforming Growth Factor- β 1 // *Hypertens. Res.* 2003. Т. 26. № 4. С. 339–347.

145. Inhorn M. C., Patrizio P. Infertility around the globe: New thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century // *Hum. Reprod. Update.* 2015. Т. 21. № 4. С. 411–426.

146. Isabelle M. и др. SBP, DBP, and pulse blood pressure variability are temporally associated with the increase in pulse wave velocity in a model of aortic stiffness // *J. Hypertens.* 2016. Т. 34. № 4. С. 666–675.

147. Jamal W. и др. Surgically retrieved spermatozoa versus ejaculated spermatozoa in modified natural IVF-ICSI cycles // *Reprod. Biomed. Online.* 2012. Т. 25. № 3. С. 242–247.

148. Kato M. и др. Donor and recipient rat strains affect full-term development of one-cell zygotes cultured to morulae/blastocysts. // *J. Reprod. Dev.* 2004. Т. 50. № 2. С. 191–5.

149. Kendrick K. M. и др. Sex differences in the influence of mothers on the sociosexual preferences of their offspring // *Horm. Behav.* 2001. Т. 40. № 2. С. 322–338.
150. Kissin D. M. и др. Association of assisted reproductive technology (ART) treatment and parental infertility diagnosis with autism in ART-conceived children // *Hum. Reprod.* 2015. Т. 30. № 2. С. 454–465.
151. Klimov L. O. и др. Effects of brain renin- angiotensin system inhibition in ISIAH rats with inherited stress-induced arterial hypertension // *Vavilov J. Genet. Breed.* 2017. Т. 21. № 6. С. 735–741.
152. Korner P. I. The present status of the autoregulation theory of the pathogenesis of hypertension // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1980. Т. 7. № 5. С. 521–526.
153. Korosi A. и др. Early-life stress mediated modulation of adult neurogenesis and behavior // *Behav. Brain Res.* 2012. Т. 227. № 2. С. 400–409.
154. Kubisch H. M., Gómez-Sánchez E. P. Embryo transfer in the rat as a tool to determine genetic components of the gestational environment // *Lab. Anim. Sci.* 1999. Т. 49. № 1. С. 90–94.
155. Kubisch H. M., Mathialagan S., Gomez-Sanchez E. P. Modulation of Blood Pressure in the Dahl SS/jr Rat by Embryo Transfer // *Hypertension.* 1998. Т. 31. № 1. С. 540–545.
156. Kulikov A. V., Tikhonova M. A., Kulikov V. A. Automated measurement of spatial preference in the open field test with transmitted lighting // *J. Neurosci. Methods.* 2008. Т. 170. № 2. С. 345–351.
157. Kulikov V. A. и др. Application of 3-D imaging sensor for tracking minipigs in the open field test // *J. Neurosci. Methods.* 2014. Т. 235. С. 219–225.
158. Lagrange D., Fournié G. J. Generation of Congenic and Consomic Rat Strains // *Rat Genomics: Methods and Protocols* / под ред. I. Anegon. , 2010. Вып. Humana Pre. С. 243–266.
159. Langen B., Dost R. Comparison of SHR, WKY and Wistar rats in different behavioural animal models: Effect of dopamine D1 and alpha2 agonists // *ADHD Atten. Deficit Hyperact. Disord.* 2011. Т. 3. № 1. С. 1–12.
160. Langridge A. T. и др. Maternal Conditions and Perinatal Characteristics Associated with Autism Spectrum Disorder and Intellectual Disability // *PLoS One.* 2013. Т. 8. № 1. С. e50963.
161. Ledingham J. M., Ashton N. Remodelling of mesenteric arteries in genetically hypertensive rats cross-fostered from birth to normotensive Wistar rats. // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2005. Т. 32. № 10. С. 859–864.
162. Lee B. и др. Ginsenoside Rb1 rescues anxiety-like responses in a rat model of post-traumatic stress disorder // *J. Nat. Med.* 2016. Т. 70. № 2. С. 133–144.
163. Lee J. Y., Azar S. H. Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rat blood pressure after embryo transfer into different wombs and cross-suckling // *Exp. Biol. Med.* 2010. Т. 235. № 11. С. 1375–1384.

164. Lee M. A. и др. Physiological characterization of the hypertensive transgenic rat TGR(mREN2)27 // *Am. J. Physiol. Metab.* 2017. Т. 270. № 6. С. E919–E929.
165. Lee S. K. и др. Effect of cross-fostering on renal anti-oxidant/oxidant status and development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2011. Т. 38. № 12. С. 854–859.
166. Leenen F. H. H., Jong W. de. A solid silver clip for induction of predictable levels of renal hypertension in the rat // *J. Appl. Physiol.* 1971. Т. 31. № 1. С. 142–144.
167. Leher P. и др. Recombinant human follicle-stimulating hormone (r-hFSH) plus recombinant luteinizing hormone versus r-hFSH alone for ovarian stimulation during assisted reproductive technology: Systematic review and meta-analysis // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2014. Т. 12. № 1. С. 17.
168. Lerch S. и др. Effects of Embryo Transfer on Emotional Behaviors in C57BL/6 Mice // *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 2016. Т. 55. № 5. С. 510–9.
169. Levey A. S. и др. *Annals of Internal Medicine, Philadelphia* // *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 2011. Т. 182. № 3. С. 211.
170. Levine H. и др. Temporal trends in sperm count: A systematic review and meta-regression analysis // *Hum. Reprod. Update.* 2017. Т. 23. № 6. С. 646–659.
171. Li Y. и др. Cardiovascular Risks Associated With Diastolic Blood Pressure and Isolated Diastolic Hypertension // *Curr. Hypertens. Rep.* 2014. Т. 16. № 11. С. 1–6.
172. Li Y., Donnelly C. G., Rivera R. M. Overgrowth Syndrome // *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* 2019. Т. 35. № 2. С. 265–276.
173. Lim S. S. и др. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 // *Lancet.* 2012. Т. 380. № 9859. С. 2224–2260.
174. Lin H. Y. и др. Animal models for the study of primary and secondary hypertension in humans // *Biomed. Reports.* 2016. Т. 5. № 6. С. 653–659.
175. Liu L. и др. Association between assisted reproductive technology and the risk of autism spectrum disorders in the offspring: A meta-analysis // *Sci. Rep.* 2017. Т. 7. № April. С. 1–8.
176. Loi M. и др. Age- and Sex-Dependent Effects of Early Life Stress on Hippocampal Neurogenesis // *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2014. Т. 5. № FEB. С. 13.
177. Lorenz R. P. и др. The relationship between reproductive performance and blood pressure in the spontaneously hypertensive rat // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1984. Т. 150. № 5. С. 519–523.
178. Loskutova L. V., Dubrovina N. I., Markel' A. L. Comparative analysis of the persistence of a conditioned passive avoidance reflex in rats with different forms of inherited hypertension // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2007. Т. 37. № 6. С. 577–582.

179. Ludwig M. и др. Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples. // *J. Med. Genet.* 2005. Т. 42. № 4. С. 289–91.
180. Lueptow L. M. Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice // *J. Vis. Exp.* 2017. № 126. С. 1–9.
181. Mainigi M. и др. Peri-Implantation Hormonal Milieu: Elucidating Mechanisms of Adverse Neurodevelopmental Outcomes // *Reprod. Sci.* 2016. Т. 23. № 6. С. 785–794.
182. Mainigi M. A. и др. Peri-implantation hormonal milieu: Elucidating mechanisms of abnormal placentation and fetal growth // *Biol. Reprod.* 2014. Т. 90. № 2. С. 1–9.
183. Mani S., Mainigi M. Embryo Culture Conditions and the Epigenome // *Semin. Reprod. Med.* 2018. Т. 36. № 3–4. С. 211–220.
184. Markel A. L. Features of the behavior of the rat with hereditarily determined arterial hypertension // *IP Pavlov. J. High. Nerv. Act.* 1986. Т. 36. № 5. С. 956–962.
185. Markel A. L. Development of a new strain of rats with inherited stress-induced arterial hypertension // *Genet. Hypertens.* 1992. Т. 218. С. 405–407.
186. Markel A. L. и др. Developmental influences on blood pressure regulation in ISIAH rats // *Handbook of Hypertension* / под ред. R. McCarty, D. A. Blizard, R. L. Chevalier. : Elsevier Science, 1999. С. 493–526.
187. Markel A. L. и др. Neuroendocrine profiling in inherited stress-induced arterial hypertension rat strain with stress-sensitive arterial hypertension // *J. Endocrinol.* 2007. Т. 195. № 3. С. 439–450.
188. Markus E. J., Petit T. L. Neocortical synaptogenesis, aging, and behavior: Lifespan development in the motor-sensory system of the rat // *Exp. Neurol.* 1987. Т. 96. № 2. С. 262–278.
189. Martikainen A. Growth and development at the age of 1.5 years in children with maternal hypertension // *J. Perinat. Med.* 1989. Т. 17. № 4. С. 259–270.
190. Matthews P. A. и др. Fostering in mice induces cardiovascular and metabolic dysfunction in adulthood // *J. Physiol.* 2011. Т. 589. № 16. С. 3969–3981.
191. Mattson D. L. и др. Immune suppression attenuates hypertension and renal disease in the Dahl salt-sensitive rat // *Hypertension.* 2006. Т. 48. № 1. С. 149–156.
192. Mazor R. и др. The polymorphonuclear leukocyte contributes to the development of hypertension in the Sabra rat // *J. Hypertens.* 2007. Т. 25. № 11. С. 2249–2256.
193. McCarty R. Development of the hypertensive phenotype: role of the maternal environment // *Handbook of Hypertension* / под ред. R. McCarty, D. A. Blizard, R. L. Chevalier. : Elsevier Science, 1999. С. 413–428.
194. McCarty R. Cross-fostering: Elucidating the effects of gene×environment interactions on phenotypic development // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2017. Т. 73. С. 219–254.

195. Mccarty R., Lee J. H. Maternal influences on adult blood pressure of SHRs: A single pup cross-fostering study // *Physiol. Behav.* 1996. Т. 59. № 1. С. 71–75.
196. McCarty R., Tong H. Development of Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats: Role of Milk Electrolytes // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1995. Т. 22. № July. С. S215–S217.
197. Meaney M. J. Maternal Care, Gene Expression, and the Transmission of Individual Differences in Stress Reactivity Across Generations // *Annu. Rev. Neurosci.* 2001. Т. 24. № 1. С. 1161–1192.
198. Meister T. A. и др. Association of Assisted Reproductive Technologies With Arterial Hypertension During Adolescence // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2018. Т. 72. № 11. С. 1267–1274.
199. Meneses A. и др. Spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model for ADHD: A short overview // *Rev. Neurosci.* 2011. Т. 22. № 3. С. 365–371.
200. Meng S. и др. Superoxide dismutase and oxidative stress in Dahl salt-sensitive and -resistant rats // *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 2002. Т. 283. № 3. С. R732–R738.
201. Miguel C. De и др. T lymphocytes mediate hypertension and kidney damage in Dahl salt-sensitive rats // *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 2010. Т. 298. № 4. С. R1136–R1142.
202. Mills K. T. и др. Global Disparities of Hypertension Prevalence and Control // *Circulation.* 2016. Т. 134. № 6. С. 441–450.
203. Mizuno A. и др. Development of hypertension in spontaneously hypertensive rats from cryopreserved embryos transferred to normotensive Wistar rats // *J. Hypertens.* 1986. Т. 4. С. S373–S374.
204. Mohr L. R., Trounson a O. Cryopreservation of human embryos. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1985. Т. 442. С. 536–43.
205. Mullins L. J., Bailey M. A., Mullins J. J. Hypertension, Kidney, and Transgenics: A Fresh Perspective // *Physiol. Rev.* 2006. Т. 86. № 2. С. 709–746.
206. Myers M. M. и др. Maternal behavior of SHR rats and its relationship to offspring blood pressures // *Dev. Psychobiol.* 1989a. Т. 22. № 1. С. 29–53.
207. Myers M. M. и др. Relationships between maternal behavior of SHR and WKY dams and adult blood pressures of cross-fostered F1 pups // *Dev. Psychobiol.* 1989b. Т. 22. № 1. С. 55–67.
208. Nguyen A. T., Armstrong E. A., Yager J. Y. Neurodevelopmental Reflex Testing in Neonatal Rat Pups // *J. Vis. Exp.* 2017. № 122.
209. Nicolantonio R. Di и др. Relative contribution of the prenatal versus postnatal period on development of hypertension and growth rate of the spontaneously hypertensive rat. // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2006. Т. 33. № 1–2. С. 9–16.
210. Norwitz E. R., Edusa V., Park J. S. Maternal physiology and complications of multiple pregnancy. // *Semin. Perinatol.* 2005. Т. 29. № 5. С. 338–48.

211. Nyboe Andersen A., Carlsen E., A. L. Trends in the use of intracytoplasmic sperm injection marked variability between countries // *Hum. Reprod. Update*. 2008. T. 14. № 6. С. 593–604.
212. O’Dowd R. и др. Effects of uteroplacental insufficiency and reducing litter size on maternal mammary function and postnatal offspring growth // *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2008. T. 294. № 2.
213. O’Neil H. C. O. Improved cryopreservation of spermatozoa using vitrification : comparison of cryoprotectants and a novel device for long-term storage // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2019.
214. Okamoto K. и др. Studies on Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats // *Clin. Sci. Mol. Med.* 1973. T. 45. № s1. С. 11s-14s.
215. Okamoto K., Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats // *Jpn. Circ. J.* 1963. T. 27. С. 282–293.
216. Page E. W., Glendening M. B. Influence of Pregnancy upon Hypertension Induced in Rats by Sodium Chloride and Desoxycorticosterone. // *Exp. Biol. Med.* 1953. T. 82. № 3. С. 466–468.
217. Page I. H. Pathogenesis of arterial hypertension // 1949. T. 140. № 5. С. 451–458.
218. Palermo G. и др. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. // *Lancet (London, England)*. 1992. T. 340. № 8810. С. 17–8.
219. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxis coordinates. : Academic Press, 2013. Вып. 7.
220. Pedersen E. B. и др. Preeclampsia -- a state of prostaglandin deficiency? Urinary prostaglandin excretion, the renin-aldosterone system, and circulating catecholamines in preeclampsia. // *Hypertension*. 1983. T. 5. № 1. С. 105–111.
221. Perassa L. A. и др. Apocynin reduces blood pressure and restores the proper function of vascular endothelium in SHR // *Vascul. Pharmacol.* 2016. T. 87. С. 38–48.
222. Pereira N. и др. Fresh or Frozen Embryo Transfer in In Vitro Fertilization // *Clin. Obstet. Gynecol.* 2019. T. 62. № 2. С. 293–299.
223. Philbrick W. M. и др. Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology // *Physiol. Rev.* 1996. T. 76. № 1. С. 127–173.
224. Phipps E. и др. Preeclampsia: Updates in pathogenesis, definitions, and guidelines // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2016. T. 11. № 6. С. 1102–1113.
225. Pinto Y. M., Paul M., Ganten D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. // *Cardiovasc. Res.* 1998. T. 39. № 1. С. 77–88.
226. Plyusnina I., Oskina I. Behavioral and Adrenocortical Responses to Open-Field Test in Rats Selected for Reduced Aggressiveness Toward Humans // *Physiol. Behav.* 1997. T. 61. № 3. С. 381–385.
227. Polat M., Bozdog G., Yarali H. Best protocol for controlled ovarian hyperstimulation in assisted reproductive technologies: Fact or opinion? // *Semin. Reprod. Med.* 2014. T. 32. № 4. С. 262–

271.

228. Qin J. и др. Pregnancy-related complications and adverse pregnancy outcomes in multiple pregnancies resulting from assisted reproductive technology: A meta-analysis of cohort studies // *Fertil. Steril.* 2015. Т. 103. № 6. С. 1492- 1508.e7.

229. Qin J. и др. Assisted reproductive technology and the risk of pregnancy-related complications and adverse pregnancy outcomes in singleton pregnancies: A meta-analysis of cohort studies // *Fertil. Steril.* 2016. Т. 105. № 1. С. 73- 85.e6.

230. Ragaeva D. S. и др. Neonatal reflexes and behavior in hypertensive rats of ISIAH strain // *Physiol. Behav.* 2017. Т. 175. С. 22–30.

231. Raimondi S., Pedotti P., Taioli E. Meta-analysis of cancer incidence in children born after assisted reproductive technologies // *Br. J. Cancer.* 2005. Т. 93. № 9. С. 1053–1056.

232. Ramirez-Perez F. I. и др. Effects of the use of assisted reproductive technologies and an obesogenic environment on resistance artery function and diabetes biomarkers in mice offspring // *PLoS One.* 2014. Т. 9. № 11.

233. Rapp J. P. Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. // *Physiol. Rev.* 2000. Т. 80. № 1. С. 135–72.

234. Rasmussen E. W. Wildness in rats. Heredity or environment? // *Acta Psychol. (Amst).* 1939. Т. 4. С. 295–304.

235. Redina O. E. и др. The characteristics of motor activity in ISIAH rats in an open field test are controlled by genes on chromosomes 2 and 16 // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2009. Т. 39. № 1. С. 57–64.

236. Redina O. E. и др. Differential transcriptional activity of kidney genes in hypertensive ISIAH and normotensive WAG rats // *Clin. Exp. Hypertens.* 2014. Т. 37. № 3. С. 249–259.

237. Redina O. E., Markel A. L. Stress, Genes, and Hypertension. Contribution of the ISIAH Rat Strain Study // *Curr. Hypertens. Rep.* 2018. Т. 20. № 8. С. 66.

238. Reik W., Dean W., Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development // *Science (80-.).* 2001. Т. 293. № 5532. С. 1089–1093.

239. Rexhaj E. и др. Mice generated by in vitro fertilization exhibit vascular dysfunction and shortened life span // *J. Clin. Invest.* 2013. Т. 123. № 12. С. 5052–5060.

240. Reynolds M. A. и др. Trends in multiple births conceived using assisted reproductive technology, United States, 1997-2000. // *Pediatrics.* 2003. Т. 111. № 5 Pt 2. С. 1159–62.

241. Risnes K. R. и др. Placental Weight Relative to Birth Weight and Long-term Cardiovascular Mortality: Findings From a Cohort of 31,307 Men and Women // *Am. J. Epidemiol.* 2009. Т. 170. № 5. С. 622–631.

242. Rivera R. M. и др. Manipulations of mouse embryos prior to implantation result in aberrant

expression of imprinted genes on day 9.5 of development // *Hum. Mol. Genet.* 2008. Т. 17. № 1. С. 1–14.

243. Robertson S. A. и др. Peri-conceptual cytokines - Setting the trajectory for embryo implantation, pregnancy and Beyond // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2011. Т. 66. № SUPPL. 1. С. 2–10.

244. Rodgers R. J., Cole J. C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology // *Ethol. Psychopharmacol.* 1994. Т. 1994. С. 9–43.

245. Rodrigo P. P. и др. Obstructive Sleep Apnea // *Int. Encycl. Public Heal.* 2016. С. 308–314.

246. Rowe P. J. и др. WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple // 1993.

247. Rozkova I. и др. Sham surgical embryo transfer affects offspring neurodevelopment and manifestation of hypertensive phenotype in ISIAH rats // *Hypertens. Pregnancy.* 2020. Т. 39. № 3. С. 283–294.

248. Rubino P. и др. The ICSI procedure from past to future: A systematic review of the more controversial aspects // *Hum. Reprod. Update.* 2016. Т. 22. № 2. С. 194–227.

249. Sagvolden T., Hendley E. D., Knardahl S. Behavior of hypertensive and hyperactive rat strains: Hyperactivity is not unitarily determined // *Physiol. Behav.* 1992. Т. 52. № 1. С. 49–57.

250. Sakima A. и др. Optimal blood pressure targets for patients with hypertension: a systematic review and meta-analysis // *Hypertens. Res.* 2019. Т. 42. № 4. С. 483–495.

251. Sandin S. и др. Autism and mental retardation among offspring born after in vitro fertilization. // *JAMA.* 2013. Т. 310. № 1. С. 75–84.

252. Sassard J., Lo M., Liu K.-L. Lyon genetically hypertensive rats: an animal model of «low renin hypertension» // *Acta Pharmacol. Sin.* 2003. Т. 24. № 1. С. 1–6.

253. Saxena D. и др. Effect of Body Mass Index on the Efficacy of Paracervical Block for Ultrasound-Guided Transvaginal Oocyte Retrieval as assessed by Requirement of Rescue Propofol. // *J. Hum. Reprod. Sci.* 2018. Т. 11. № 4. С. 365–369.

254. Schenewerk A. L. и др. Effects of the use of assisted reproduction and high-caloric diet consumption on body weight and cardiovascular health of juvenile mouse offspring // *Reproduction.* 2014. Т. 147. № 1. С. 111–123.

255. Scherrer U. и др. Systemic and pulmonary vascular dysfunction in children conceived by assisted reproductive technologies // *Circulation.* 2012. Т. 125. № 15. С. 1890–1896.

256. Scherrer U. и др. Cardiovascular dysfunction in children conceived by assisted reproductive technologies // *Eur. Heart J.* 2015. Т. 36. № 25. С. 1583–1589.

257. Schoolcraft W. B. и др. Live birth outcome with trophoctoderm biopsy, blastocyst vitrification, and single-nucleotide polymorphism microarray-based comprehensive chromosome screening in infertile patients // *Fertil. Steril.* 2011. Т. 96. № 3. С. 638–640.

258. Scott L. A., Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval // *Hum. Reprod.* 1998. Т. 13. № 4. С. 1003–1013.
259. Sela S. и др. Primed polymorphonuclear leukocytes, oxidative stress, and inflammation antecede hypertension in the Sabra rat // *Hypertension.* 2004. Т. 44. № 5. С. 764–769.
260. Seryapina A. A. и др. Stress-sensitive arterial hypertension, haemodynamic changes and brain metabolites in hypertensive ISIAH rats: MRI investigation // *Exp. Physiol.* 2017. Т. 102. № 5. С. 523–532.
261. Silva A. A. da и др. Role of Endothelin-1 in Blood Pressure Regulation in a Rat Model of Visceral Obesity and Hypertension // *Hypertension.* 2004. Т. 43. № 2. С. 383–387.
262. Simpson F. O. и др. Hypertension in the genetically hypertensive strain // *Handbook of hypertension: experimental and genetic models of hypertension* / под ред. D. Ganten, W. de Jong. Amsterdam: Elsevier Science, 1994. С. 228–271.
263. Siristatidis C., Bhattacharya S. Unexplained infertility: Does it really exist? Does it matter? // *Hum. Reprod.* 2007. Т. 22. № 8. С. 2084–2087.
264. Sjöblom C. и др. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor alleviates adverse consequences of embryo culture on fetal growth trajectory and placental morphogenesis. // *Endocrinology.* 2005. Т. 146. № 5. С. 2142–53.
265. Sladek S. M., Magness R. R., Conrad K. P. Nitric oxide and pregnancy // *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 1997. Т. 272. № 2. С. R441–R463.
266. Smirk F. H., Hall W. H. Inherited hypertension in rats // *Nature.* 1958.
267. Solano M. E. и др. Antenatal endogenous and exogenous glucocorticoids and their impact on immune ontogeny and long-term immunity // *Semin. Immunopathol.* 2016. Т. 38. № 6. С. 739–763.
268. Spaan M. и др. Risk of cancer in children and young adults conceived by assisted reproductive technology // 2019. Т. 34. № 4. С. 740–750.
269. Steptoe P. C., Edwards R. G. Birth after the reimplantation of a human embryo. // *Lancet* (London, England). 1978. Т. 2. № 8085. С. 366.
270. Strata F. и др. Behavior and brain gene expression changes in mice exposed to preimplantation and prenatal stress // *Reprod. Sci.* 2015. Т. 22. № 1. С. 23–30.
271. Suomi S. J. Early determinants of behaviour: Evidence from primate studies // *Br. Med. Bull.* 1997. Т. 53. № 1. С. 170–184.
272. Szentiványi M. и др. Renal medullary nitric oxide deficit of Dahl S rats enhances hypertensive actions of angiotensin II // *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 2002. Т. 283. № 1. С. R266–R272.
273. Takahashi H. и др. A high-salt diet enhances leukocyte adhesion in association with kidney injury in young Dahl salt-sensitive rats // *Hypertens. Res.* 2017. Т. 40. № 11. С. 912–920.

274. Taylor D. J. и др. Do pregnancy complications contribute to neurodevelopmental disability? // *Lancet*. 1985. Т. 325. № 8431. С. 713–716.
275. Torrealday S. Is the fertility treatment itself a risk factor for early pregnancy loss? // *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 2014. Т. 26. № 3. С. 174–180.
276. Tran M. и др. Embryo transfer cannot delineate between the maternal pregnancy environment and germ line effects in the transgenerational transmission of disease in rats // *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2014. Т. 306. № 8. С. 607–618.
277. Trippodo N. C., Frohlich E. D. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat // *Circ. Res.* 1981. Т. 48. № 3. С. 309–319.
278. Vaduganathan M. и др. Baseline Blood Pressure, the 2017 ACC/AHA High Blood Pressure Guidelines, and Long-Term Cardiovascular Risk in SPRINT // *Am. J. Med.* 2018. Т. 131. № 8. С. 956–960.
279. Vincent M. и др. Major cardiovascular risk factors in Lyon hypertensive rats. A correlation analysis in a segregating population. // *J. Hypertens.* 1996. Т. 14. № 4. С. 469–474.
280. Vrooman L. A., Xin F., Bartolomei M. S. Morphologic and molecular changes in the placenta: what we can learn from environmental exposures // *Fertil. Steril.* 2016. Т. 106. № 4. С. 930–940.
281. Walker S. K., Hartwich K. M., Seamark R. F. The production of unusually large offspring following embryo manipulation: Concepts and challenges // *Theriogenology*. 1996. Т. 45. № 1. С. 111–120.
282. Wallin B. G., Delius W., Hagbarth K.-E. Comparison of sympathetic nerve activity in normotensive and hypertensive subjects // *Circ. Res.* 1973. Т. 33. № 1. С. 9–21.
283. Wang Q. и др. Alteration in the expression of the renin-angiotensin system in the myocardium of mice conceived by in vitro fertilization // *Biol. Reprod.* 2018. Т. 99. № 6. С. 1276–1288.
284. Wang T. и др. Cancer risk among children conceived by fertility treatment // *Int. J. Cancer.* 2019. Т. 144. № 12. С. 3001–3013.
285. Watkins A. J. и др. Mouse embryo culture induces changes in postnatal phenotype including raised systolic blood pressure // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007. Т. 104. № 13. С. 5449–5454.
286. Weinstock M. The long-term behavioural consequences of prenatal stress // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2008. Т. 32. № 6. С. 1073–1086.
287. Whelton P. K. и др. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force // *Hypertension.* 2017. Т. 71. № 6. С. 1269–1324.

288. Wlodek M. E. и др. Impaired mammary function and parathyroid hormone-related protein during lactation in growth-restricted spontaneously hypertensive rats // *J. Endocrinol.* 2003. Т. 178. № 2. С. 233–245.

289. Yagil С. и др. Salt Susceptibility Maps to Chromosomes 1 and 17 With Sex Specificity in the Sabra Rat Model of Hypertension // *Hypertension.* 1998. Т. 31. № 1. С. 119–124.

290. Yagil С. и др. Proteinuria and glomerulosclerosis in the Sabra genetic rat model of salt susceptibility // *Physiol. Genomics.* 2002. Т. 9. № 3. С. 167–178.

291. Yagil С. и др. Congenic strains confirm the presence of salt-sensitivity QTLs on chromosome 1 in the Sabra rat model of hypertension // *Physiol. Genomics.* 2003. Т. 12. № 2. С. 85–95.

292. Young L. Large offspring syndrome in cattle and sheep // *Rev. Reprod.* 1998. Т. 3. № 3. С. 155–163.

293. Young L. E. и др. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture // *Nat. Genet.* 2001. Т. 27. № 2. С. 153–154.