

Эффекты репродуктивных технологий на поведение и развитие мозга у мышей линии B6.Cg-Tg, моделирующих болезнь Паркинсона

Рожкова И.^{1*}, Козенева В.^{1,2}, Брусенцев Е.¹, Рахманова Т.^{1,2}, Шавшаева Н.^{1,2}, Афанасова С.^{1,2}, Лебедева Д.¹, Окотруб С.¹, Игонина Т.¹, Амстиславский С.¹

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

* sirena23@yandex.ru

Ключевые слова: болезнь Паркинсона; трансгенная модель; эмбриотрансфер; культивирование *in vitro*; отдаленные эффекты

Мотивация и цель: Болезнь Паркинсона (БП) является нейродегенеративным заболеванием человека. Для БП характерна прогрессирующая с возрастом ригидность мышц, тремор, брадикинезия, аномалии в nigrostriарной системе головного мозга и альфа-синуклеинопатия [1–3]. Предпринимаются попытки установления взаимосвязи между применением вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) и возникновением различных нейропатологий путем анализа клинических данных, однако выводы этих работ противоречивы [4–6], что создает мотивацию для постановки экспериментов на лабораторных животных. Трансгенные мыши линии B6.Cg-Tg(PrNp-SNCA*A53T)23Mkle (далее в тексте B6.Cg-Tg) имеют мутацию A53T в гене SNCA альфа-синуклеина человека. Ранее была оценена плотность нейронов в структурах мозга, которые играют ключевую роль в развитии БП, а также охарактеризовано поведение мышей B6.Cg-Tg [7]. Таким образом были выбраны маркеры, характеризующие мышей B6.Cg-Tg в качестве трансгенной модели БП. Влияние репродуктивных технологий на развитие болезни БП до настоящего момента не изучали. Целью данного исследования было изучение эффектов ВРТ на формирование фенотипа, характерного для БП у мышей B6.Cg-Tg. Задачами исследования было изучить, как культивирование *in vitro* и перенос эмбрионов влияют на поведение и развитие головного мозга у потомков.

Методы и алгоритмы: Исследования проводили на мышах, моделирующих БП – линия B6.Cg-Tg(PrNp-SNCA*A53T)23Mkle (далее в тексте B6.Cg-Tg), которые имеют мутацию A53T в гене SNCA альфа-синуклеина человека. В качестве контроля использовали мышей C57BL/6 дикого типа (wild type; далее в тексте WT), на основе которых получена линия B6.Cg-Tg. Животных содержали в стандартных условиях SPF-вивария ИЦиГ СО РАН. Все исследования были одобрены Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН (Протокол № 145 от 29 марта 2023 г). Самок C57BL/6 (WT) в возрасте 8–12 недель спаривали с гемизиготными по мутации A53T самцами мышей B6.Cg-Tg. Либо оставляли самок до родов, либо получали преимплантационные эмбрионы, культивировали их *in vitro* и трансплантировали псевдобеременным реципиентам, как описано нами ранее [8]. Потомков мужского пола, рожденных в результате естественного спаривания или применения репродуктивных технологий, генотипировали на наличие мутации A53T. В результате были сформированы следующие группы: 1) самцы C57BL/6, рожденные естественным путем (группа WT-CTL); 2) самцы B6.Cg-Tg, рожденные естественным

путем (группа B6.Cg-Tg-CTL); 3) самцы C57BL/6, рожденные с применением ВРТ (группа WT-ET – embryo transfer); 4) самцы B6.Cg-Tg, рожденные с применением ВРТ (группа B6.Cg-Tg-ET). У потомков в возрасте 6 месяцев исследовали поведение в тестах «открытое поле» (ОП), «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) и «Рота-род» (РР). Затем проводили интракардиальную перфузию для фиксации ткани головного мозга, изготавливали и окрашивали срезы для исследования черной субстанции (ЧС) согласно методу, описанному ранее [7, 8]. Плотность нейронов, меченных антителами против тирозингидроксилазы и против альфа-синуклеина, оценивали с использованием микроскопа Axio Imager.M2 (Carl Zeiss, Германия) с камерой Zeiss AxioCam 506 mono (Carl Zeiss, Германия). Анализ результатов поведенческих тестов проводили в программном пакете STATISTICA v. 12.0 (StatSoft, Inc., США). Данные были проверены на нормальность с помощью теста Шапиро–Уилка. Результаты поведенческих тестов оценивали при помощи двухфакторного ANOVA. Плотность нейронов оценивали с помощью одностороннего дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса. Уровень значимости рассматривался как $p < 0.05$.

Результаты: Двухфакторный ANOVA выявил эффект «генотипа», но не «способа размножения» (с применением ВРТ или без него) на параметры тестов ОП и ПКЛ. Между тем в тесте РР было выявлено взаимодействие факторов «линии» и «способа размножения» [$F(1,27) = 5.658$; $p < 0.05$] по латентному времени на момент падения животного. У самцов WT-ET, рожденных после применения ВРТ, латентное время на момент падения животного было достоверно меньше, чем у самцов дикого типа в контрольной группе и линии B6.Cg-Tg в группе ET. Различия по плотности дофаминовых нейронов и нейронов с альфа-синуклеином в ЧС представлены на рис. 1 и 2. Статистический анализ выявил у мышей WT-ET более низкую плотность дофаминовых нейронов ($p < 0.01$) по сравнению с группой WT-CTL (0.22×10^5 [0.16×10^5 ; 0.26×10^5] против 0.93×10^5 [0.84×10^5 ; 1.08×10^5] соответственно). Мыши B6.Cg-Tg-ET имели более высокую плотность нейронов с альфа-синуклеином ($p < 0.05$), чем животные из группы WT-ET (0.69×10^5 [0.59×10^5 ; 0.75×10^5] против 0.21×10^5 [0.16×10^5 ; 0.25×10^5] соответственно).

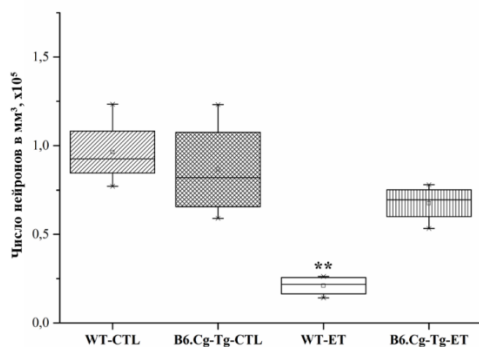


Рис. 1. Плотность дофаминовых нейронов в ЧС (substantia nigra – SN), нейроны мечены антителами против тирозингидроксилазы. ** $p < 0.01$ между группами WT-CTL и WT-ET

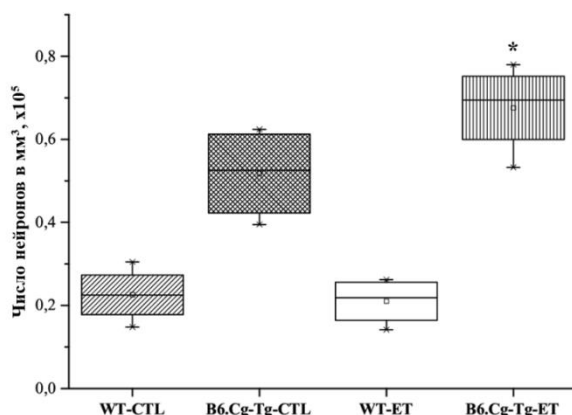


Рис. 2. Плотность нейронов с альфа-синуклеином в ЧС (substantia nigra – SN), нейроны мечены антителами против альфа-синуклеина. * $p < 0.05$ между группами B6.Cg-Tg-ET и WT-ET

Выводы: У потомков мышей дикого типа C57BL/6, полученных с применением ВРТ, наблюдали сниженную плотность дофаминовых нейронов в ЧС, а также снижение латентного времени до падения животного в тесте РР. У потомков мышей B6.Cg-Tg, полученных с применением ВРТ, наблюдали повышенную плотность нейронов с альфа-синуклеином в ЧС. Результаты данного исследования свидетельствуют о том, что репродуктивные технологии могут по-разному влиять на развитие потомков в зависимости от генотипа.

Финансирование: Исследование поддержано РНФ (проект № 23-25-00123).

Effects of reproductive technologies on behavior and brain development in B6.Cg-Tg mice modeling Parkinson's disease

Rozhkova I.^{1*}, Kozenева V.^{1, 2}, Brusentsev E.¹, Rakhmanova T.^{1, 2}, Shavshaeva N.^{1, 2}, Afanasova S.^{1, 2}, Lebedeva D.¹, Okotrub S.¹, Igonina T.¹, Amstislavsky S.¹

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

* sirena23@yandex.ru

Key words: Parkinson disease; transgenic model; embryo transfer; *in vitro* culture; long-term effects

Motivation and Aim: Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative human disease. PD is characterized by age-related muscle rigidity, tremor, bradykinesia, abnormalities in the nigrostriatal system of the brain and alpha-synucleinopathy [1–3]. Attempts to establish a relationship between the use of assisted reproductive technologies (ART) and the frequency and severity of various neuropathologies by analyzing clinical data led to contradictory conclusions [4–6], and motivate for experiments on the laboratory animal models. Transgenic mice of the B6.Cg-Tg(PrNp-SNCA*A53T)23Mkle/J strain (further referred to as B6.Cg-Tg) have the A53T mutation in the human alpha-synuclein SNCA

gene. Previously, the density of neurons in brain structures that play the key role in the development of PD was assessed, and the behavior of B6.Cg-Tg mice was characterized [7]. Thus, markers were selected that characterize B6.Cg-Tg mice as a transgenic model of PD. The effects of reproductive technologies on the development of PD disease have not been studied so far. The purpose of this study was to address the effects of ARTs on the development of PD phenotype in B6.Cg-Tg mice. The objectives of this study were to examine how *in vitro* culture and embryo transfer affect (1) behavior; (2) brain development in offspring.

Methods and Algorithms: Study was carried out on B6.Cg-Tg(PrNp-SNCA*A53T)23Mkle/J mouse strain modeling PD (referred further as B6.Cg-Tg) which has the A53T mutation in the human alpha-synuclein SNCA gene. Wild type C57BL/6 mice (referred further as WT) from which the B6.Cg-Tg strain was derived were used as controls. The animals were kept under standard conditions in the SPF-Vivarium of the Institute of Cytology and Genetics of the SB RAS. Study was approved by the Bioethics Committee of the Institute of Cytology and Genetics SB RAS (Protocol No. 145, March 29, 2023). C57BL/6 females, 8–12 weeks old, were mated to hemizygous A53T male B6.Cg-Tg mice. The mated females were either left until birth, or preimplantation embryos were obtained, cultured *in vitro* and transferred to pseudopregnant recipient as we described previously [8]. Male offspring born as a result of natural breeding or born after the use of reproductive technologies were genotyped for the presence of the A53T mutation. The following experimental groups were formed: (1) born naturally C57BL/6 males (WT-CTL group); (2) naturally born B6.Cg-Tg males (B6.Cg-Tg-CTL group); (3) C57BL/6 males born using ART (WT-ET – embryo transfer group); (4) B6.Cg-Tg males born using ART (group B6.Cg-Tg-ET). In offspring obtained at the age of 6 months, behavior was studied in the “open field” (OF), “elevated plus maze” (EPM), and “Rota-rod” (RR) tests. Thereafter intracardial perfusion was performed, brains were processed, brain slices were done and stained for the study of the substantia nigra (SN) according to the method described earlier [7, 8]. The density of neurons labeled with antibodies was assessed using an Axio Imager.M2 microscope (Carl Zeiss, Germany) with a Zeiss AxioCam 506 mono camera (Carl Zeiss, Germany). The results of behavioural tests were analyzed using the STATISTICA v. 12.0 software (StatSoft, Inc., USA). Data were tested for normality using the Shapiro–Wilk test. Results of behavioral tests were assessed using two-way ANOVA. Neuronal density was assessed using one-way Kruskal–Wallis analysis of variance. The significance level was considered $p < 0.05$.

Results: Two-factor ANOVA revealed the effect of the genotype, but not the method of reproduction (with or without ART) on the parameters of the OF and EPM tests. Meanwhile, the RR test revealed the interaction of the “genotype” and the “method of reproduction” factors [$F(1,27) = 5.658$; $p < 0.05$] for the latent time of the animal’s drop from the rod. This time for the males of the WT-ET males born with the help of ART was significantly less than for the control WT males and for the B6.Cg-Tg males born after ET. The densities of dopamine neurons and of neurons with alpha-synuclein in SN are shown in the Fig. 1, 2. Statistical analysis revealed a lower density of dopamine neurons in WT-ET mice ($p < 0.01$) compared to the WT-CTL mice (0.22×10^5 [0.16×10^5 ; 0.26×10^5] vs. 0.93×10^5 [0.84×10^5 ; 1.08×10^5] respectively). B6.Cg-Tg-ET mice had a higher density of alpha-synuclein neurons ($p < 0.05$) compared with the animals from the WT-ET group (0.69×10^5 [0.59×10^5 ; 0.75×10^5] vs. 0.21×10^5 [0.16×10^5 ; 0.25×10^5] respectively).

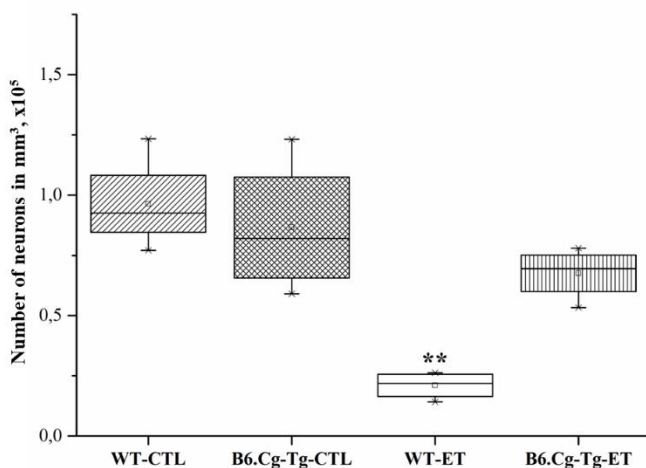


Fig. 1. Density of dopaminergic neurons in the substantia nigra (SN), neurons labeled with antibodies against tyrosine hydroxylase. ** $p < 0.01$ between WT-CTL and WT-ET groups

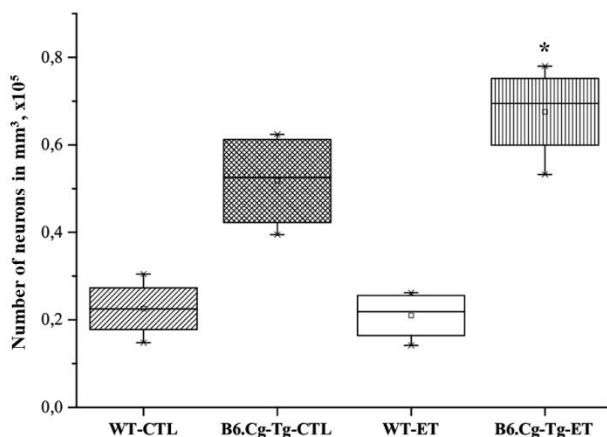


Fig. 2. Density of neurons with alpha-synuclein in substantia nigra (SN), neurons labeled with antibodies against alpha-synuclein. * $p < 0.05$ between B6.Cg-Tg-ET and WT-ET groups

Conclusion: In the offspring of wild-type C57BL/6 mice born with the use of ART, a reduced density of dopamine neurons in the SN was observed, as well as a decrease in the latent time of the animal's drop in the RR test. In the offspring of B6.Cg-Tg mice obtained with the use of ART, an increased density of neurons with alpha-synuclein in the SN was observed. The results of this study indicate that reproductive technologies may have different effects on the development of offspring depending on their genotype.

Funding: The study is supported Russian Science Foundation (No. 23-25-00123).

Список литературы/References

1. Halliday G.M., Del Tredici K., Braak H. Critical appraisal of brain pathology staging related to presymptomatic and symptomatic cases of sporadic Parkinson's disease. *J Neural Transmis Supp.* 2006;70:99
2. Beitz J.M. Parkinson's disease: a review. *Front Biosci.* 2014;6:65-74. doi 10.2741/S415
3. Dickson D.W. Neuropathology of Parkinson disease. *Parkinsonism. Relat Disord.* 2018;46:S30-S33. doi 10.1016/j.parkreldis.2017.07.033
4. Sandin S., Nygren K.G., Iliadou A., Hultman C.M., Reichenberg A. Autism and mental retardation among offspring born after *in vitro* fertilization. *Jama.* 2013;310(1):75-84
5. Andreadou M.T., Katsaras G.N., Talimtz P. et al. Association of assisted reproductive technology with autism spectrum disorder in the offspring: An updated systematic review and meta-analysis. *Eur J Pediatr.* 2021;180(9):2741-2755
6. Smits R.M., Xavier M.J., Oud M.S. et al. *De novo* mutations in children born after medical assisted reproduction. *Hum Reprod.* 2022;37:1360-1369. doi 10.1093/humrep/deac068
7. Рожкова И.Н., Окотруб С.В., Брусенцев Е.Ю., Рахманова Т.А. и др. Анализ поведения и плотности нейронов в головном мозге мышей B6.Cg-Tg(Pnnp-SNCA*A53T)23Mkle/J – модели болезни Паркинсона. *Российский физиологический журнал.* 2023;109:1199-1216 [Rozhkova I.N., Okotrub S.V., Brusentsev E.Y., Rakhmanova T.A. et al. Analysis of behavior and brain neuronal density in B6.Cg-Tg(Pnnp-SNCA*A53T)23Mkle/J mice, a Parkinson's disease model. *J Evol Biochem Phys.* 2023;59:1633-1647. doi 10.1134/S0022093023050149]
8. Рожкова И.Н., Окотруб С.В., Брусенцев Е.Ю., Игонина Т.Н. и др. Эффекты вспомогательных репродуктивных технологий на социальное поведение мышей линии BTBR – модели расстройств аутистического спектра. *Российский физиологический журнал.* 2023;109:315-333 [Rozhkova I.N., Okotrub S.V., Brusentsev E.Y., Igonina T.N. et al. Effects of assisted reproductive technologies on social behavior of BTBR mice, a model of autism spectrum disorders. *J Evol Biochem Phys.* 2023;59:458-472. doi 10.1134/S0022093023020138]