На правах рукописи

ХОЛОВА

Гулрухсор Исхокджоновна

ВЛИЯНИЕ СТРЕССА ОТЦА НА ПОВЕДЕНИЕ И ГОРМОНАЛЬНЫЕ ФУНКЦИИ ПОТОМКОВ: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

1.5.5 – физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург - 2023

Работа выполнена в лаборатории нейроэндокринологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук

Научный руководитель: Ордян Наталья Эдуардовна, доктор биологических наук

Официальные оппоненты:

Раевский Владимир Вячеславович, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук, заведующий лабораторией нейроонтогенеза

Романова Ирина Владимировна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, заведующий лабораторией интегративной нейроэндокринологии

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины»

Защита состоится « » _____ 2023 года в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.137.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук (199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6, тел. (812)328-07-01, электронная почта pavlov.institute@infran.ru, сайт http://infran.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6) и на сайте Института http://infran.ru

Автореферат разослан «____»_____2023 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук Ордян Наталья Эдуардовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В настоящее время накоплено определенное количество экспериментальных и эпидемиологических данных, свидетельствующих о влиянии стресса не только матери, но и отца на поведение и физиологические функции потомков. Эпидемиологические исследования, проведенные в семьях больных посттравматическим стрессовым расстройством (ПТСР), выявили усиление ПТСР-подобных симптомов у их потомков, которые сами по себе воздействию травматического стресса не подвергались (Yehuda et al., 2007; Lehrner et al., 2014). Следует отметить, что такие ПТСР-подобные симптомы, как сниженный уровень секреции кортизола и усиление чувствительности гипофизарно-адренокортикальной системы (ГАС) к сигналам отрицательной обратной связи выявлены у потомков матерей, страдавших ПТСР, тогда как у потомков болеющих отцов, напротив, чувствительность ГАС к сигналам обратной связи снижалась (Yehuda et al., 2014). Эти данные свидетельствуют о дифференцированном влиянии данной психопатологии отца или матери на их потомков.

Экспериментальные исследования также выявили эффекты стресса отцов на развитие, активность ГАС и поведение потомков. Однако результаты таких исследований весьма противоречивы. Так, было установлено, что стрессирование в различных парадигмах взрослых самцов мышей и крыс до спаривания их с самками приводит у их потомков обоего пола к снижению секреции кортикостерона в ответ на 15-мин иммобилизационный стресс, но не изменяет поведенческий фенотип (Rodgers et al., 2013). В других исследованиях, напротив, показано усиление депрессивно-подобного и тревожного поведения, а также повышение базального уровень кортикостерона (Dietz et al., 2011; Franklin et al., 2010). Вероятно, подобные противоречия вызваны использованием разных по длительности и интенсивности стрессорных воздействий, применяемых к самцам.

Тем не менее, ряд авторов высказали предположение, что стрессирование отцов в период сперматогенеза является фактором, увеличивающим предрасположенность их потомков обоего пола к ПТСР и проявляющимся в снижении активности ГАС (Rodgers, Bale, 2015; Yeshurun, Hannan, 2019). В связи с тем, что базальная и стрессорная реактивность ГАС зависит от экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе и медиальной префронтальной коре (McEwen et al., 2016), оценка их содержания в данных структурах мозга у потомков стрессированных отцов может дать представление о клеточных механизмах, обуславливающих изменение активности их ГАС.

В качестве стрессорных воздействий в большинстве экспериментальных работ использовали стрессирующие процедуры, вызывающие у животных депрессивно-подобное состояние, т.е. являющиеся моделью депрессии у человека и сопровождающиеся

длительным повышением уровня глюкокортикоидных гормонов в крови. Моделирование такого состояния путем хронического введения самцам мышей кортикостерона в течение 4 недель и получение в последующем от них потомства выявило существенное влияние повышенного уровня гормона перед спариванием на поведение их потомков и экспрессию гена инсулиноподобного фактора роста 2 (ИФР2) в гиппокампе (Short et al., 2016). Последний факт представляет значительный интерес, поскольку показано, что ИФР2 играет значительную роль в консолидации памяти: мРНК и уровень белка ИФР2 повышается в гиппокампе крыс через 20 ч после первой сессии обучения оборонительной реакции пассивного избегания (РПИ), а нокдаун гена ИФР2 (*Igf2*) в дорсальном гиппокампе с использованием антисмысловых РНК значительно ухудшает длительность сохранения памяти при выработке РПИ (Chen et al., 2011). Помимо гиппокампа, ИФР2 префронтальной коры, по всей видимости, также играет определенную роль в процессах, связанных с памятью. Так, при исследовании *post mortem* головного мозга больных шизофренией, характеризующихся выраженными когнитивными нарушениями, было обнаружено снижение экспрессии *Igf2* в префронтальной коре (Fromer et al., 2016). Показано также, что эффекты ИФР2 на память реализуются посредством взаимодействия этого ростового фактора с катион-независимым маннозо-6-фосфатным рецептором, который также именуют ИФР2 рецептором 2-го типа (Yu et al. 2020).

В отличие от депрессии, которую экспериментально моделировали в приведенных выше работах, и которая сопровождается повышенной базальной активностью ГАС, ПТСР характеризуется преимущественно сниженной активностью этой системы, что проявляется в низком уровне глюкокортикоидных гормонов в крови (Yehuda, 2009). Низкий уровень глюкокортикоидов в крови отцов перед зачатием может оказывать иные специфические эффекты на их потомство. Однако экспериментальных исследований влияния ПТСР отца на физиологические функции потомков не проводили. В связи с этим представляется актуальным проведение сравнения влияние ПТСР-подобного или депрессивно-подобного состояния самцов-отцов на физиологические функции их потомков.

Цель настоящего исследования состояла в изучении влияния экспериментального аналога ПТСР или депрессии самцов крыс до спаривания с интактными самками на поведение, память и гормональные функции их половозрелых потомков обоего пола.

Были поставлены следующие **задачи**:

1. Оценить влияние ПТСР-подобного или депрессивно-подобного состояния самцов-отцов на состояние их репродуктивной системы на момент подсадки к интактным самкам.

2. Изучить влияние ПТСР-подобного или депрессивно-подобного состояния самцов-отцов на соматическое развитие, ориентировочно-исследовательскую активность, уровень тревожности, память, содержание в крови половых стероидных гормонов и активность ГАС потомков обоего пола.
3. Оценить уровень глюкокортикоидных рецепторов в областях гиппокампа и медиальной префрональной коры потомков самцов отцов с ПТСР-подобным или депрессивно-подобным состоянием.
4. Исследовать экспрессию гена инсулиноподобного фактора роста 2 (*Igf2*) и его рецептора 2-го типа (*Igf2r*) в гиппокампе и неокортексе потомков самцов отцов с ПТСР-подобным или депрессивно-подобным состоянием.

Новизна исследования. Впервые установлено более значительное влияние ПТСР-подобного состояния самцов, создаваемое в парадигме «стресс-рестресс», на показатели сперматогенеза на момент подсадки к интактным самкам по сравнению с депрессивно-подобным состоянием, которое вырабатывали в парадигме «выученная беспомощность».

Впервые показано, что выраженность изменений соматического развития, ориентировочно-исследовательской активности, уровня тревожности, нарушения памяти и активности ГАС наиболее значительна у потомков обоего пола, родившихся от самцов-отцов с ПТСР-подобным состоянием. Показано, что у потомков самцов-отцов с депрессивно-подобным состоянием наблюдаются минимальные нарушения соматического развития, поведения и памяти, но выявляется снижение уровня тестостерона, также, как и у потомков самцов-отцов с ПТСР-подобным состоянием. При этом у самок, родившихся от самцов обеих экспериментальных групп изменений в уровне эстрадиола не выявлено. Кроме того, у потомков самцов-отцов с депрессивно-подобным состоянием обнаружены изменения в активности ГАС, зависимые от пола потомков. Нарушения активности ГАС потомков самцов-отцов с ПТСР-подобным или депрессивно-подобным состоянием сопровождаются изменением уровня глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе и медиальной префронтальной коре в зависимости от пола потомков.

Впервые установлено, что моделирование ПТСР у самцов-отцов приводит к ухудшению памяти их потомков и сопровождается снижением экспрессии *Igf2* в гиппокампе и неокортексе, но только у потомков-самцов, а не самок. Вместе с тем экспрессия *Igf2r*, кодирующего ИФР2Р, не изменяется, что свидетельствует о значимости снижения именно ИФР2 в нарушении памяти. Моделирование депрессии у самцов-отцов не влияет ни на память, ни на экспрессию *Igf2* и *Igf2r* в головном мозге потомков.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Данное исследование способствует решению фундаментальной задачи физиологии – изучению действия стресса

отцов на физиологические функции их потомков обоего пола. Результаты исследования важны для развития представлений о молекулярно-клеточных механизмах, обуславливающих последствия стресса отцов в отношении ориентировочно-исследовательской активности, тревожности, памяти и гормональных функций потомков. Выявленные изменения экспрессии гена ИФР2 в мозге потомков самцов вносят вклад в понимание механизмов нарушения памяти, возникающее вследствие воздействия неблагоприятных факторов (стрессоров) на организм их отцов.

Проведенные исследования, учитывающие «фактор отца» для здоровья потомков, имеют практическое значение в связи с широкой распространенностью психических нарушений и снижением фертильности у мужского населения, что следует учитывать при применении в медицинской практике репродуктивных технологий, например, при экстракорпоральном оплодотворении.

Методология и методы исследования. Моделирование ПТСР и депрессии производилось посредством апробированных ранее в лаборатории нейроэндокринологии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН двух парадигм: «стресс-рестресс» (модель ПТСР) и «выученная беспомощность» (модель депрессии). Решение поставленных задач, направленных на выявление эффектов моделирования психопатологий у самцов крыс на физиологические функции потомков, требовало применения широкого спектра поведенческих и гормональный методов исследования, а также ПЦР в режиме реального времени и иммуногистохимического метода.

Положения, выносимые на защиту

1. ПТСР-подобное состояние самцов-отцов оказывает более значительное влияние на состояние репродуктивной системы и показатели сперматогенеза по сравнению с депрессивно-подобным состоянием.
2. Нарушение соматического развития, поведения и памяти потомков обоего пола более выражены у потомков самцов-отцов с ПТСР-подобным состоянием по сравнению с потомками самцов-отцов в депрессивно-подобном состоянии.
3. ПТСР-подобное или депрессивно-подобное состояние самцов-отцов оказывает дифференциальное влияние на активность ГАС потомков самцов и количество глюкокортикоидных рецепторов в мозге, тогда как у потомков самок активность ГАС и количество глюкокортикоидных рецепторов в мозге изменяются сходным образом при моделировании обеих психопатологий у самцов-отцов. Изменения уровня половых стероидных гормонов в крови потомков стрессированных отцов не зависит от использованной стрессорной процедуры (модель психопатологии), но определяется полом потомков.

4. Изменения экспрессии гена инсулиноподобного фактора роста 2 в мозге сопровождается нарушением памяти самцов - потомков отцов с ПТСР-подобным состоянием.

Степень достоверности и апробация работы. Применение комплексного методического подхода с использованием адекватных поставленным задачам поведенческих, гормональных и молекулярно-биологических методов, а также соответствующих методов статистического анализа являются основанием достоверности полученных результатов и обоснованности выводов. Основные результаты работы были представлены на следующих научных мероприятиях: на Международной Конференции «Психофизиология и психонейроэндокринология», Ставрополь, 2018 г., на XVI Всероссийской конференции с международным участием «Совещание по эволюционной физиологии», Санкт-Петербург, 2020 г., на Всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология», посвящённой 95-летию Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, 2020 г. и 2021 г, на Международной научно-практической конференции Хотлонского государственного медицинского университета «Актуальные вопросы медицины и медицинского образования», Дангара, Таджикистан, 2020 г., на XXIX Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2023», Санкт-Петербург, 2023 г.

Публикации по теме диссертации. Опубликовано 5 статей в журналах из списка ВАК и 8 публикаций в иных изданиях и материалах научных конференций.

Личный вклад автора. Все результаты, представленные на защиту, получены лично автором или при его непосредственном участии. Автор осуществляла стрессирование самцов крыс с использованием двух парадигм, получение потомства, изучение соматического развития и поведения потомства, проводила морфометрический анализ семенников, гормональные анализы методом ИФА и оценку оптической плотности при иммуногистохимическом методе выявления глюкокортикоидных рецепторов в мозге потомков. Осуществляла подготовку проб для анализа экспрессии генов. Непосредственное проведение ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени осуществляла к.б.н. Малышева О.В. В исследованиях также принимали участие сотрудники лаборатории нейроэндокринологии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, которые являются соавторами публикаций по теме диссертации.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 151 стр. печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающий 267 источников. Работа содержит 24 рисунка и 4 таблицы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы. Исследование проведено на половозрелых самцах крыс линии Вистар массой 230–250 г и самках той же линии весом 200-220 г из ЦКП “Биоколлекция” Института физиологии им. И.П. Павлова РАН и их потомстве обоего пола. В течение всего периода проведения экспериментов крысы содержались при свободном доступе к воде и пище и режиме свет/темнота 12:12 ч. Все манипуляции с животными были проведены в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями Комиссии по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Моделирование ПТСР или депрессии у самцов – отцов

Для индукции экспериментального ПТСР использовали модель «стресс-рестресс» (Liberzon et al., 1997). Крысам предъявляли тяжелый комбинированный стресс, состоящий из двухчасовой иммобилизации, 20-минутного вынужденного плавания и после 15-минутного перерыва, эфирного стресса до потери сознания и далее на 7 сут 30-мин иммобилизации (рестресс).

В качестве экспериментальной модели депрессии использовали парадигму «выученная беспомощность» (LoLordo, 2001). Крыс подвергали неизбегаемому и неконтролируемому болевому электрокожному раздражению с чередующимися временными интервалами раздражения и отдыха так, чтобы каждая крыса в течение 60 минут получила по 60 ударов током (1мА, 50 Гц) каждый длительностью 15 с. Промежуток между ударами варьировал от 15 до 45 с. Контрольная группа самцов оставалась интактной.

Для контроля развития ПТСР-подобного или депрессивно-подобного состояний у контрольной и подопытных групп самцов на 10 сут после рестресса или электрокожного раздражения из хвостовой вены отбирали пробы крови в покое, в которых определяли уровень кортикостерона. В последующем исследовании принимали участие только те самцы, у которых базальный уровень кортикостерона в крови был ниже (модель ПТСР) или выше (модель депрессии) по сравнению с контрольной группой. Показатели уровня кортикостерона составили: для группы с моделированием ПТСР - 65±8,1 нмоль/л, в группе с моделированием депрессии - 168±10,4 нмоль/л, в группе контроль - 93±13,2 нмоль/л ($p<0,05$ по сравнению с группами стрессированных самцов).

Получение потомства от интактных самок и самцов с ПТСР-подобным или депрессивно-подобным состоянием

Самцов подопытных групп (n=5 в каждой группе) и контрольных крыс (n=5) поодиночке подсаживали к двум регулярно циклирующим самкам, которые находились в стадии проэструс-эструс. Самцов с ПТСР-подобным состоянием подсаживали к самкам

через 48 сут после рестресса, а с депрессивно-подобным состоянием через 48 сут после электрокожного раздражения. Наступление беременности контролировали по наличию сперматозоидов в вагинальном мазке. Беременных самок отсаживали от самцов и до 17 дня беременности содержали в группах по 6 животных, а далее по одной особи в клетке. На следующий день после родов число крысят в пометах выравнивали до 8-10 животных с равным соотношением полов. Полученное потомство содержали совместно с самками до 30-дневного возраста, а затем в группах по 4-5 животных в соответствии с полом и пометом. В эксперименты брали самцов в возрасте 2,5 мес и весом 220-230 г, а также самок того же возраста и весом 200-220 г, формируя группы таким образом, чтобы в каждой группе присутствовало не более 2 животных из каждого помета с целью исключения влияния поведения матери на потомков. В связи с тем, что экспериментальные серии по изучению влияния ПТСР-подобного или депрессивно-подобного состояния самцов–отцов на различные характеристики потомков проводили отдельно, в каждой серии экспериментов использовали потомков контрольных самцов, которых получали одновременно с потомками от самцов с ПТСР-подобным или депрессивно-подобным состоянием.

Оценка репродуктивных функций самцов-отцов

В отдельной серии экспериментов у самцов вырабатывали ПТСР-подобное или депрессивно-подобное состояние. На 48 сут (полный цикл созревания сперматозоидов у крыс) животных декапитировали, собирали туловищную кровь, извлекали надпочечники и семенники, последние подвергали морфометрическому анализу после стандартной гистологической проводки, заливки в парафин, изготовлении чередующихся срезов и окраски гематоксилином-эозином. Оценивали следующие показатели извитых семенных канальцев (ИСК): количество ИСК в одном поле зрения и площадь поперечного сечения ИСК; толщина сперматогенного эпителия ИСК; количество клеток Сертоли в сперматогенном эпителии и их площадь; количество разных видов сперматогенных клеток (сперматогоний, сперматоцитов и сперматид) в сперматогенном эпителии, а также количество и площадь клеток Лейдига в участке интерстиция. Оценивали число аномальных сперматозоидов, выделенных из каудального эпидидимиса и окрашенных 5% раствором эозина. К дегенеративным формам относили сперматозоиды с двумя головками, но с одной шейкой и одним хвостом, без шейки с одним или несколькими хвостами, сперматозоиды с неправильной формой головки. Подсчитывали не менее 400 сперматозоидов от каждого животного. Результаты представлены в виде % аномальных спермиев от общего числа подсчитанных сперматозоидов. В крови, полученной при декапитации определяли уровень тестостерона и кортикостерона.

Методы изучения влияния экспериментальных психопатологий отца на соматическое развитие потомков

Уровень соматического развития потомства контрольных и стрессированных самцов-отцов оценивали по прибавке массы тела. Для этого крысят взвешивали в возрасте 5, 10 и 20 дней. Вес учитывали в соответствие с полом крысят. Данные по каждому помету для самцов и самок усреднялись.

Методы оценки поведенческого фенотипа и памяти потомков

В каждой серии экспериментов потомков контрольных и стрессированных с использованием двух парадигм самцов тестировали в батарее поведенческих тестов, позволяющих оценить уровень тревожности (тест «приподнятый крестообразный лабиринт», ПКЛ), ориентировочно-исследовательскую активность и эмоциональность (тест «открытое поле»), депрессивность поведения (тест «вынужденное плавание»), а также способность к обучению и память в тестах «реакция пассивного избегания» и «распознавание нового объекта». Самок начинали тестировать в стадию диэструс. В этих тестах каждая подгруппа животных каждого пола состояла из 10 особей.

В тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» фиксировали время пребывания в открытых и закрытых рукавах лабиринта в течение 5 минут. В тесте «открытое поле» в течение 5 минут регистрировали количество пересечённых квадратов (локомоторная активность), число вертикальных стоек (исследовательская активность), длительность реакции груминга, время замирания и число дефекаций (проявление эмоционального возбуждения в условиях новый обстановки). Тест «вынужденное плавание» выполняли два дня. В первый день крыс индивидуально помещали в стеклянные цилиндры, заполненные водой на уровне 30 см и постоянной температурой 23-25^{0}С на 5 мин, позволяя свободно плавать. На второй день процедуру повторяли и регистрировали время неподвижности в течение 5 минут.

Тест «распознавание нового объекта» (РНО) проводили в установке открытое поле. В установку помещали два объекта, различающихся по форме, и позволяли крысе их исследовать в течение 5 мин (фаза «ознакомления»). В «тестовую» фазу которую проводили через 24 ч после первой фазы, тот объект, который крыса исследовала меньше, меняли на новый объект, сохраняя позиционное положение объектов. После чего в течение 5 мин регистрировали время исследования знакомого и нового объектов. Для анализа памяти распознавания крыс использовали коэффициент распознавания (Кр), определяющей разницу между временем исследования знакомого и незнакомого объектов по отношению к суммарному времени их исследования. Чем меньше Кр, тем хуже память распознавания животного (Cohen et al., 2013).

$$Кр = \frac{Время\ (Объект\ Новый) - Время\ (Объект\ Знакомый)}{Время\ (Объект\ Новый) + Время\ (Объект\ Знакомый)}$$

Реакцию пассивного избегания (РПИ) вырабатывали в экспериментальной установке, состоящей из двух отсеков: светлого отсека размером 50х50 см и темного отсека размером 15х15 см, разделенных дверцей. Пол темного отсека содержал металлические прутья, подключенные к источнику электрического тока. В первый день проводили обучение РПИ: крысу помещали в светлый отсек, через 10 сек дверцу в темный отсек открывали. После перехода крысы в темный отсек дверцу закрывали, а животное получало электрокожное раздражение 0,9 мА длительностью 2 сек. Через сутки после обучения проводили первое тестирование (тест 1), где животное снова помещали в светлый отсек и повторяли процедуру первой сессии, при этом удар электрическим током не производили. Для исследования угашения РПИ крыс тестировали с разницей в одну неделю (тест 2, 3, 4), повторяя процедуру второй сессии. В каждом тесте фиксировали латентный период входа крысы в темный отсек. Общее время тестирования в каждой сессии составило 180 сек.

Метод изучения экспрессии Igf2 и Igf2r в мозге потомков

Экспрессию *Igf2* (гиппокамп и неокортекс) и *Igf2r* (гиппокамп) изучали методом ПЦР в реальном времени у отдельных групп потомков, рожденных от отцов с моделированием ПТСР или депрессии (n = 6 для каждой группы) или контрольных самцов (n = 6). Крыс декапитировали, собрали туловищную кровь, на льду выделяли из головного мозга гиппокамп и неокортекс (префронтальную и фронтальную кору). Самок декапитировали в стадию диэструс.

Выделение тотальной РНК проводили с использованием набора Pure Link RNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific, США) согласно протоколу фирмы производителя. Обратную транскрипцию проводили с помощью набора High Capacity Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Каждую реакцию проводили в объеме 20 мкл, в присутствии 10 ммоль dNTP, 200 Ед/мл обратной транскриптазы MMLV, рассеянной затравки (3 мг/мл) и с добавлением от 100 до 500 нг тотальной РНК. Полученную кДНК использовали для проведения ПЦР в реальном времени.

Для исследования экспрессии *Igf2* использовали набор зондов и праймеров (Rn01454518_m1, TaqMan® Gene Expression Assays, ThermoFisher Scientific, США). Для анализа экспрессии *Igf2r* была использована технология с интеркалирующим красителем (Eva Green) и олигонуклеотидные праймеры, синтезированные АлкорБио, Россия: прямой TTGCCCTCCAGAAACGGAAG, обратный TACACCACAGTTTCGCTCGT. Предварительно проводили проверку специфичности праймеров с помощью сервиса BLAST и геномных баз данных (Ensemble). Для оценки специфичности продукта после

проведения ПЦР снимали показания кривой плавления. Относительный уровень экспрессии мРНК рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ нормализуя данные на количество мРНК референтного гена *Hprt1* (Rn01527840_m1, TaqMan® Gene Expression Assays, ThermoFisher Scientific, США).

Методы изучения гормональных функций потомков

В крови крыс, которых использовали для изучения экспрессии генов, определяли уровень тестостерона (самцы) и эстрадиола (самки).

Отдельную группу животных – потомков стрессированных и контрольных самцов – использовали для изучения активности ГАС, которую оценивали по уровню кортикостерона в покое (базальный уровень) и по динамике изменения уровня этого гормона в ответ на 20-минутную иммобилизацию. Каждую крысу помещали в пластиковый пенал и в течение не более 3 мин из хвостовой вены отбирали пробы крови (0 мин, базальная активность). Далее через 20 мин повторяли отбор крови (20 мин, стрессорная активность ГАС). Затем крысу из пенала извлекали, помещали в домашнюю клетку, а через 180 мин кровь из хвостовой вены отбирали вновь (торможение ГАС после стрессорной активации). Оценку активности ГАС проводили с 11-00 до 14-00 ч. Каждая группа контрольных и подопытных крыс состояла из 6 животных соответствующего пола.

Кровь, полученную в каждой серии экспериментов центрифугировали, получали плазму, в которой определяли уровни стероидных гормонов методом ИФА с использованием коммерческих наборов производства ХЕМА (Россия).

Иммуногистохимический анализ уровня глюкокортикоидных рецепторов в мозге потомков

Иммуногистохимическое исследование экспрессии ГР в гиппокампе и мПФК самцов и самок – потомков подопытных или контрольных самцов выполняли на отдельных группах животных. Крыс каждой экспериментальной группы (самок в стадию диэструса) декапитировали, мозг извлекали и помещали в 4% раствор параформальдегида в 0,1М фосфатном буфере (pH 7.3) на 1 час, а затем 48 часов при $+4^0$С. Далее осуществляли стандартную гистологическую обработку ткани мозга (промывка, обезвоживание, проведение через порции ксилола) и заливали в парафин. При помощи микротома изготавливали серии срезов мозга во фронтальной плоскости толщиной 6 мкм. С помощью метода немеченых антител (авидин-биотинового) и иммунопероксидазной реакции проводили выявление иммунореактивного вещества.

После стандартных процедур депарафинизации, регидратации и демаскировки антигена (кипячение срезов в 0.01М цитратном буфере (pH 6.0) под давлением в течение 1 мин), срезы инкубировали с первичными поликлональными антителами к

глюкокортикоидным рецепторам (Abcam, ab3578, разведение 1:200) в течение ночи при +4°С. Далее на срезы наносили универсальную систему авидин-биотинового комплекса (rabbit specific HRP/DAB (ABC) detection IHP Kit, Abcam, ab64261) и оставляли инкубироваться 30 мин при комнатной температуре. После инкубации с ABC-комплексом стекла были промыты в фосфатном буфере 3 раза по 5 мин. Для визуализации реакции связывания антитела с антигеном использовали диаминобензидиновый компекс, входящий в состав кита ABC.

Количественную оценку иммунореактивности производили с использованием системы анализа изображения, включающей световой микроскоп Olympus CX31 (Япония), цветную цифровую камеру VideoZavr Standard VZ-C31Sr и программное обеспечение Видеозавр Мультиметр 2.3 ("АТМ-практика", Санкт-Петербург). Проводили оценку средней оптической плотности окраски в иммунопозитивных нейронах гиппокампа и мПФК (1 мм от брегмы). Подсчёт производился на 4-5 срезах от каждого животного, было проанализировано количество клеток на одинаковой площади среза для каждой исследуемой области гиппокампа (поле CA1, зубчатая извилина) и мПФК (2 и 5 клеточные слои). На основании оценки оптической плотности иммунопозитивные клетки разделяли на 3 класса: слабо- (0,05-0,1 ед. оптической плотности, 3-й класс), средне- (0,1-0,25 ед. оптической плотности, 2-й класс) и сильноиммунореактивные (0,25-0,5 ед. оптической плотности, 1-й класс) клетки. Для оценки индекса общей иммунореактивности (ОИр) использовали формулу:

1 x *n(3 кл.) + 2* x *n(2 кл.) + 3* x *n(1 кл.) = ОИр,*

где n - число клеток 1-го, 2-го и 3го касса, соответственно (Boos et al., 2006).

Каждая группа самцов и самок в данном эксперименте состояла из 6 животных.

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов проводили с использованием параметрических критериев ANOVA (одно- и двухфакторынй), *t*-критерия Стьюдента для независимых переменных и пакета программ STATISTICA 12.0 и Exel 2013. Для проверки гипотезы нормальности распределения данных в выборках использовали критерий Шапиро-Уилка ($p>0,05$). В связи с тем, что показатели тестов РПИ не соответствовали нормальному распределению, их приводили к нормальному распределению, логарифмируя по основанию 2. *Post-hoc* сравнения выполняли с использованием теста Тьюки. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Данные представлены в виде $M \pm m$.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение репродуктивных функций самцов крыс в результате моделирования ПТСР или депрессии

Результаты данного исследования, представленные в таблице 1, показали, что использованная для моделирования ПТСР стрессорная процедура в большей мере влияет на репродуктивные функции самцов, чем моделирование депрессии. По всей видимости, основную роль здесь играет характер/длительность стрессорного воздействия.

Таблица 1. Влияние экспериментальных ПТСР и депрессии на морфометрические показатели извитых семенных канальцев (ИСК) семенников и сперматогенез самцов

Показатель	Контрольные самцы (n=5)	Самцы с моделированием ПТСР (n=5)	Самцы с моделированием депрессии (n=5)
Площадь поперечного сечения ИСК, мкм^2	62878±4585,0	48693± 3025,2**	67490±3846,3
Толщина сперматогенного эпителия, мкм	57,7±3,2	44,8± 3,8**	48,4±4,4
Площадь сперматогенного эпителия, мкм^2	41207±3443,9	34223±3163,2**	34963±3784,3
Количество клеток Сертоли в сперматогенном эпителии, n	24,2±0,3	22,2±0,5*	23,4±0,3
Площадь клеток Сертоли, мкм^2	77,6±2,2	72,3±1,3 *	77,0±2,3
Количество клеток Лейдига, n	112±3,9	62,7±3,9**	91,7±4,0*
Площадь клеток Лейдига, мкм^2	36,7±1,5	28,3±1,8**	33,6±1,8
Количество сперматогониев	54,4±2,9	46,1±2,6	48,8±1,9
Количество сперматоцитов	71,7±3,0	56,9±3,4 **	61,3±2,9 *
Количество сперматид	218,5±8,8	175,8±7,6**	184,9±7,4 *
Вес самцов (г)	346,6±7,0	358,2±11,2	332,2±13,4
Вес семенников (г)	3,7±0,1	3,5±0,07*	3,6±0,1
Уровень тестостерона в крови (нмоль/л)	12,4±1,4	5,1±1,0**	6,5±0,8**

Примечание. * - статистически значимые отличия от контрольных самцов ($p<0,05$). ** - $p<0,01$.

Число аномальных спермиев, выделенных из эпидидимиса (в % от общего числа оцененных клеток) у самцов с ПТСР-подобным (3,37±0,2), но не депрессивно-подобным состоянием (1,2±0,3), достоверно превышало соответствующий показатель у контрольных самцов (0,8±0,2, $p<0,01$). Хотя уровень тестостерона снижался в равной мере у самцов двух экспериментальных групп по сравнению с контрольными крысами. Сниженный уровень тестостерона вероятнее всего обусловлен нарушением функций клеток Лейдига,

испытавших воздействие глюкокортикоидов при стрессировании самцов. Известно, что стрессорные воздействия, приводящие к повышению уровня глюкокортикоидов, влияют на продукцию тестостерона клетками Лейдига (Hu et al.,2008; Zou et al.,2019), поскольку эти гормоны, взаимодействуя с классическими рецепторами, напрямую ингибируют транскрипцию генов, кодирующих ферменты биосинтеза тестостерона (Wang et al.,2017).

Влияние ПТСР-подобного или депрессивно-подобного состояния самца-отца на соматическое развитие потомков

Двухфакторный ANOVA выявил эффект отца (контроль или ПТСР-подобное состояние) на вес потомков самцов ($F_{2,59}$=41,3, p<0,001) и самок ($F_{2,59}$=16,5, p<0,0000), а также взаимодействие факторов отец х день жизни на динамику изменения веса тела потомков самцов ($F_{2,59}$=4,2, p<0,05) и самок ($F_{2,59}$=3,1, p<0,05). *Post-hoc* анализ межгрупповых различий в каждый день жизни показал, что потомки обоего пола, родившиеся от отцов с ПТСР-подобным состоянием, имели более низкий вес на 5-е и 10-е сутки жизни по сравнению с контрольными сверстниками. В последующие дни жизни достоверных различий между потомками контрольных и подопытных самцов не обнаружено (рис. 1, А, Б).

Двухфакторный ANOVA выявил эффект отца (контроль или депрессивно-подобное состояние) на вес потомков самцов ($F_{2,59}$=25,4, p<0,01), но не самок ($F_{2,59}$=2,5, p<0,05), а также взаимодействие факторов отец х день жизни на динамику изменения веса тела потомков самцов ($F_{2,59}$=3,8, p<0,05). *Post-hoc* анализ межгрупповых различий в каждый день жизни показал, что потомки самцы, родившиеся от отцов с депрессивно-подобным состоянием, имели более низкий вес на 5-е сутки жизни и лишь тенденцию к снижению веса на 10-е сутки (p=0,07) по сравнению с контрольными сверстниками. В последующие дни жизни достоверных различий между потомками контрольных и подопытных самцов не обнаружено (рис.1, В, Г).

Влияние ПТСР-подобного или депрессивно-подобного состояния самца-отца на поведенческий фенотип потомков

Результаты данных серий экспериментов схематически представлены в таблице 2. Однофакторный ANOVA поведения в тесте «открытое поле» самцов – потомков отцов с моделированием ПТСР - выявил значимое влияние отца на локомоторную активность ($F_{2,19}$=5,7, p<0,01) и продолжительность замирания ($F_{2,19}$=3,9, p<0,05) потомков самцов. Такие потомки имели сниженную локомоторную активность по сравнению с потомками контрольных самцов (p<0,01), а также увеличенное время замирания (p<0,05).

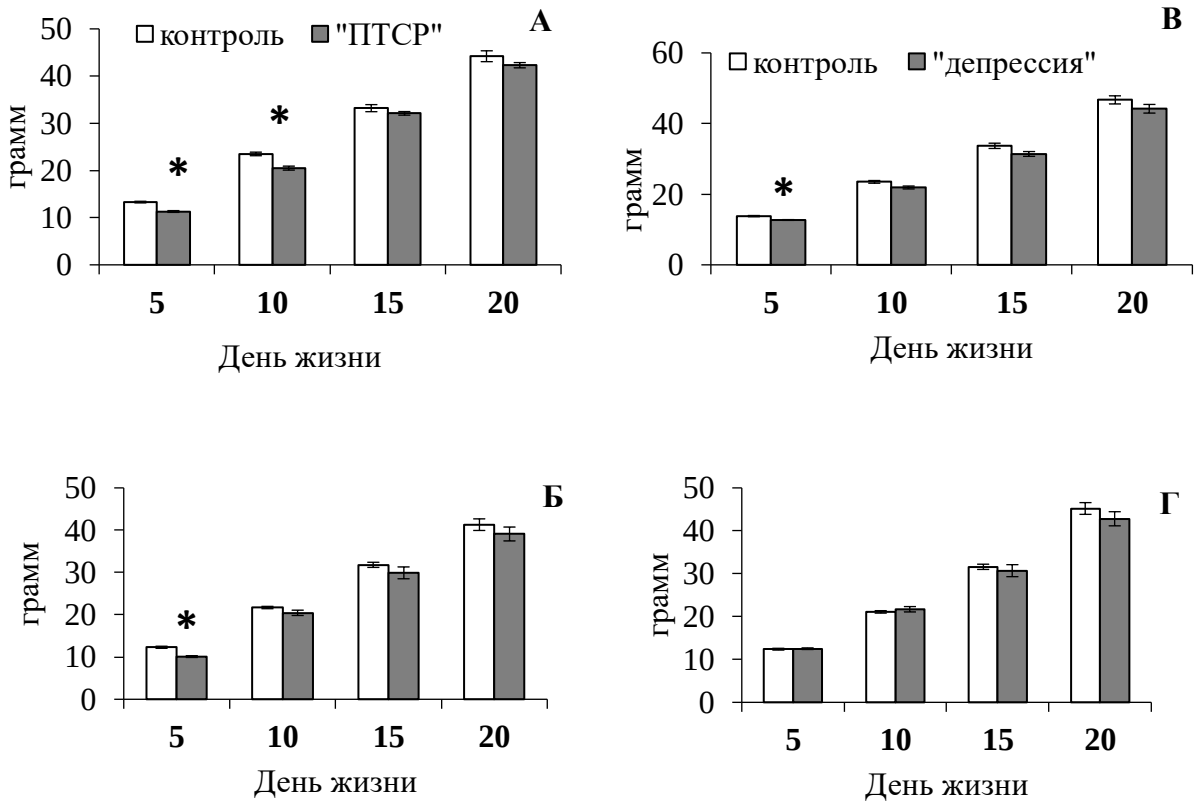

Рис. 1. Динамика изменения веса тела крысят в пометах, родившихся от самцов с ПТСР-подобным (А – самцы, Б – самки) или депрессивно-подобным состоянием (В – самцы, Г – самки). Белые столбики – контрольные самцы, темные столбики – самцы с моделированием депрессии. * - достоверные (p<0,01) различия между потомками подопытных и контрольных самцов.

Анализ поведения в ПКЛ самцов - потомков отцов с моделированием ПТСР -показал статистически значимое влияние фактора отец на время пребывания животных в открытых ($F_{2,19}$=2,9, p<0,05) и закрытых ($F_{2,19}$=3,1, p<0,05) рукавах лабиринта. Снижение времени пребывания в открытых рукавах ПКЛ самцов свидетельствует об увеличении у них уровня тревожности.

Выявлено также влияние фактора отец на время неподвижности в тесте «вынужденное плавание» ($F_{2,19}$=7,8, p<0,01). Самцы, рожденный от отцов с моделированием ПТСР, характеризовались большим временем неподвижности по сравнению с потомками контрольных самцов (p<0,01).

В тоже время у самок – потомков отцов с моделированием ПТСР – существенных изменений поведенческих характеристик практически во всех использованных тестах не обнаружено. Выявлено значимое влияние фактора отец только на время пребывания в открытых рукавах ПКЛ ($F_{2,23}$=3,4, p=0,004), а также снижение времени пребывания таких самок в открытых рукавах ПКЛ и, соответственно, увеличение уровня тревожности по сравнению с самками – потомками контрольных самцов (p<0,05).

Таблица 2**.** Влияние ПТСР-подобного или депрессивно-подобного состояний самцов-отцов на поведенческий фенотип взрослых потомков.

Группа крыс	Пол потомков	Поведенческий фенотип		
		Уровень тревожности Тест «приподнятый крестообразный лабиринт»	Ориентировочно-исследовательская активность Тест «открытое поле»	Депрессивно-подобное поведение Тест «вынужденное плавание»
Потомки самцов с «ПТСР» по сравнению с контрольными крысами	самцы	↑	локомоторная активность ↓	↑
	самки	↑	—	—
Потомки самцов с «депрессией» по сравнению контрольными крысами	самцы	—	исследовательская активность ↓	—
	самки	—	—	—

Депрессивно-подобное состояние самцов-отцов оказывало незначительное влияние на поведение в различных тестах их потомков мужского и женского пола. Однофакторный дисперсионный анализ выявил у потомков самцов только снижение числа вертикальных стоек ($F_{2,19}$=3,7, p<0,05) в тесте «открытое поле» по сравнению с потомками контрольных самцов (p<0,05).

Влияние ПТСР-подобного или депрессивно-подобного состояния самца-отца на память и экспрессию Igf2 и Igf2r в мозге потомков

Результаты экспериментов, где исследовали выработку и угашение РПИ у самцов и самок – потомков отцов с ПТСР-подобным состоянием, представлены на рисунке 2. Двухфакторный анализ результатов теста РПИ методом ANOVA для потомков самцов показал взаимодействие факторов день тестирования/отец ($F_{(3,59)}$ = 9.3, p = 0,00004). *Post-hoc* анализ показателей экспериментальных групп для каждого дня тестирования выявил, что латентный период захода в темный отсек камеры при первом тестировании был снижен у самцов – потомков стрессированных отцов, по сравнению с контрольными крысами. Достоверные различия латентного периода захода в темную камеру между контрольными и подопытными крысами были обнаружены через 3 недели (тест 4) после первой сессии обучения.

У потомков самок также было выявлено взаимодействие факторов отец/день тестирования ($F_{(3,59)}$ = 6.5, p = 0.003). Однако, в отличие от самцов у подопытных самок сниженный латентный период захода в темный отсек камеры был обнаружен через одну и две недели после первого тестирования, что свидетельствует о более быстром угашении РПИ у этих самок по сравнению с самками - потомками контрольных самцов

Анализ способности к выработке РПИ и ее угашения у самцов и самок, родившихся от отцов в депрессивно-подобном состоянии или контрольных отцов, с использованием двухфакторного ANOVA показало отсутствие достоверного влияния фактора отец на выработку РПИ в зависимости от дня тестирования и ее сохранность (данные не представлены).

Исследование памяти распознавания в тесте «распознавание нового объекта» показали, что у самцов и самок – потомков отцов с моделированием ПТСР - Кр статистически значимо различался между потомками контрольных и стрессированных самцов-отцов (потомки-самцы $F_{1,19}$=7.5, p=0.014; потомки-самки $F_{1,19}$=5.3, p=0.035, Рис. 3). *Post-hoc* анализ показателей экспериментальных групп показал снижение Кр у потомков стрессированных отцов. У потомков обоего пола, родившихся от самцов с депрессивно-подобным состоянием Кр не различалась между группами крыс.

Влияние ПТСР-подобного или депрессивно-подобного состояния самца-отца на экспрессию Igf2 и Igf2r в мозге потомков.

Экспрессия *Igf2* у самцов – потомков стрессированных отцов – была достоверно снижена в неокортексе (фронтальная и медиальная префронтальная кора) и гиппокампе по сравнению с потомками контрольных отцов, тогда как у самок статистически значимых различий в экспрессии исследованного гена не выявлено ни в одной из исследованных структур мозга (рис.4). Влияние ПТСР-подобного состояния самца отца на экспрессию *Igf2r* в гиппокампе самцов и самок крыс не выявлено (рис. 5).

Влияние ПТСР-подобного или депрессивно-подобного состояния самца-отца на гормональные функции потомков

Анализ уровня половых стероидов в плазме крови потомков показал статистически значимое снижение уровня гормона у самцов – потомков отцов стрессированных с использованием обеих парадигм (Рис. 6 А). Статистически значимых различий в уровне эстрадиола между самками – потомками контрольных или стрессированных отцов – не выявлено (Рис. 6, Б).

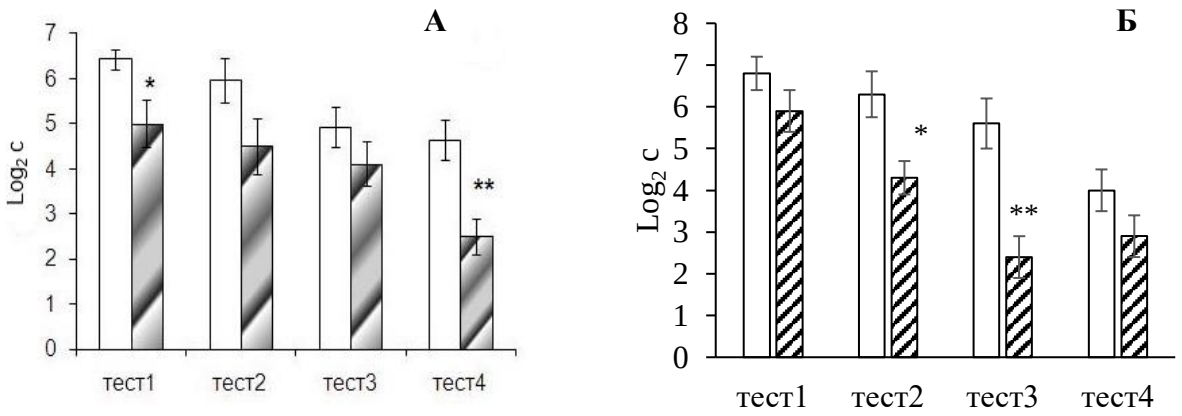

Рис. 2. Влияние ПТСР-подобного состояния самцов на память потомков самцов (А) и самок (Б) в тесте «реакция пассивного избегания. По оси ординат — Log_2 латентного периода захода в темный отсек камеры. Светлые столбики — потомки контрольных самцов. Темные столбики — потомки стрессированных отцов. * — достоверные различия между потомками контрольных и стрессированных отцов (p < 0,05). ** — (p < 0,01).

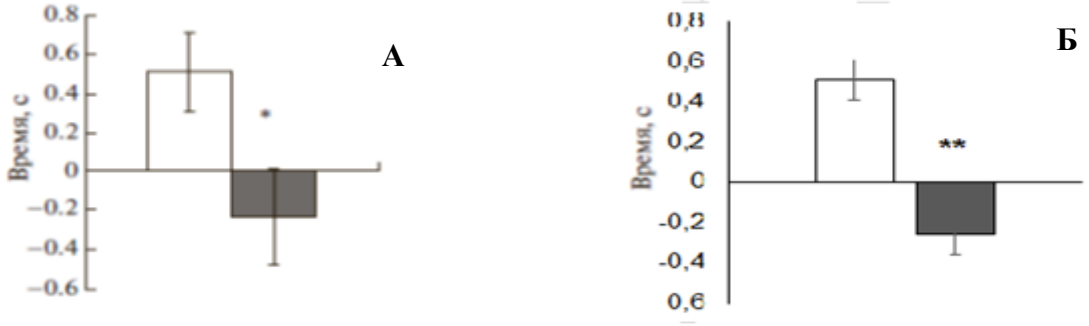

Рис. 3. Влияние ПТСР-подобного состояния отца на коэффициент распознавания (Кр) потомков самцов (А) и самок (Б). Светлые столбики — потомки контрольных самцов. Темные столбики — потомки стрессированных отцов. * — достоверные различия между потомками контрольных и стрессированных отцов (p < 0,05). ** — (p < 0,01).

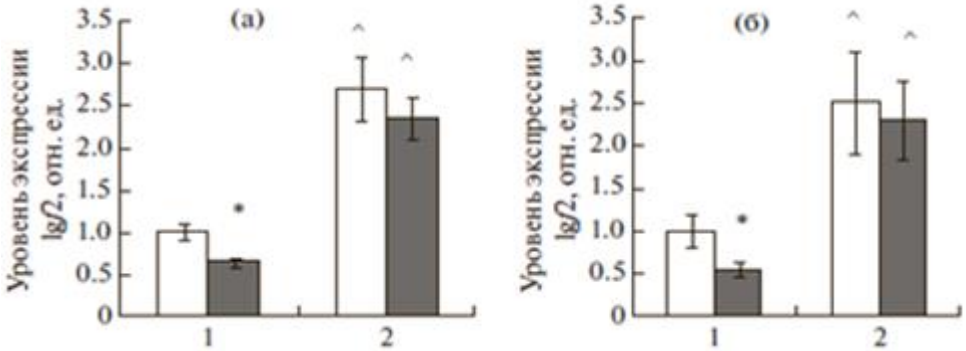

Рис. 4. Влияние стресса отца на уровень экспрессии *Igf2* в мозге потомков. (а) –уровень экспрессии *Igf2* в неокортексе взрослых крыс; (б) – в гиппокампе. По оси абсцисс: 1 – самцы крыс, 2 – самки крыс. Светлые столбики – потомки контрольных самцов. Темные столбики – потомки стрессированных отцов. * – статистически значимые различия между потомками контрольных и стрессированных отцов ($p < 0.05$). ^ – статистически значимые различия между самцами и самками крыс ($p < 0.01$).

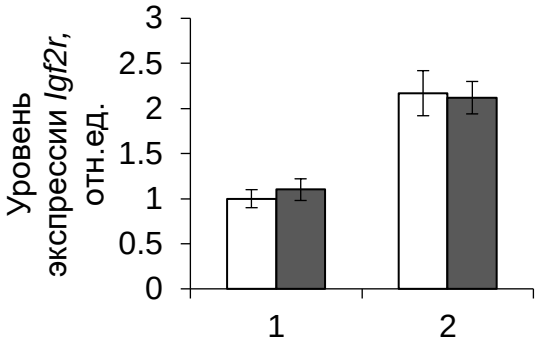

Рис. 5. Влияние стресса отца на уровень экспрессии гена *Igf2r* в гиппокампе потомков. По оси абсцисс: 1 – самцы крыс, 2 – самки крыс. Светлые столбики – потомки контрольных самцов. Темные столбики – потомки стрессированных отцов.

Выявлено достоверное взаимодействие факторов отец и уровень кортикостерона в зависимости от времени начала стрессирования у потомков самцов ($F_{(4,89)}$=6.8, p<0.01) и потомков самок ($F_{(4,89)}$=4.3, p<0.05). *Post-hoc* анализ различий между группами в каждой временной точке показал, что у самок – потомков отцов с ПТСР-подобным или депрессивно-подобным состоянием – наблюдается снижение базальной и стрессорной реактивности ГАС по сравнению с потомками контрольных самцов отцов (Рис. 7, а). Сходный характер активности ГАС был выявлен и у самцов – потомков отцов с ПТСР-подобным состоянием (Рис.7, б). Однако у самцов – потомков отцов с депрессивно-подобным состоянием – изменений в базальной и стрессорной активности ГАС не выявлено, тогда как чувствительность этой гормональной оси к сигналам обратной связи снижалась, о чем свидетельствовал более высокий уровень кортикостерона через 180 мин после начала 30-мин иммобилизации по сравнению с контрольными потомками.

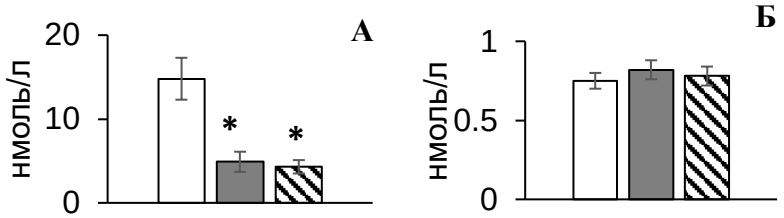

Рис.6. Изменение уровня тестостерона (А) и эстрадиола (Б) в крови потомков. Белые столбики – контрольные потомки, темные столбики – потомки отцов с ПТСР-подобным состоянием, столбики со штриховкой – потомки отцов с депрессивно-подобным состоянием. * - статистически значимые отличия от контрольных самцов отцов (p<0.05).

Результаты иммуногистохимического анализа экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе и мПФК потомков представлены в Таблице 3 и 4.

Самцы и самки – потомки отцов с моделированием ПТСР – характеризовались повышенной экспрессией глюкокортикоидных рецепторов в поле CA1 гиппокампа и зубчатой извилине, а также во 2-ом слое мПФК по сравнению с потомками контрольных самцов. Такие же изменения экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе и мПФК были выявлены и у самок – «потомков отцов с выученной беспомощностью». Напротив, у самцов – потомков отцов с депрессивно-подобным состоянием (парадигма

«выученная беспомощность») обнаружено снижение экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в поле CA1 гиппокамп и тенденцию к снижению в зубчатой извилине (p=0,07), а также статистически значимое снижение этого показателя во 2-ом слое мПФК. Изменений в экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в 5-ом слое мПФК не выявлено ни у одной из групп крыс.

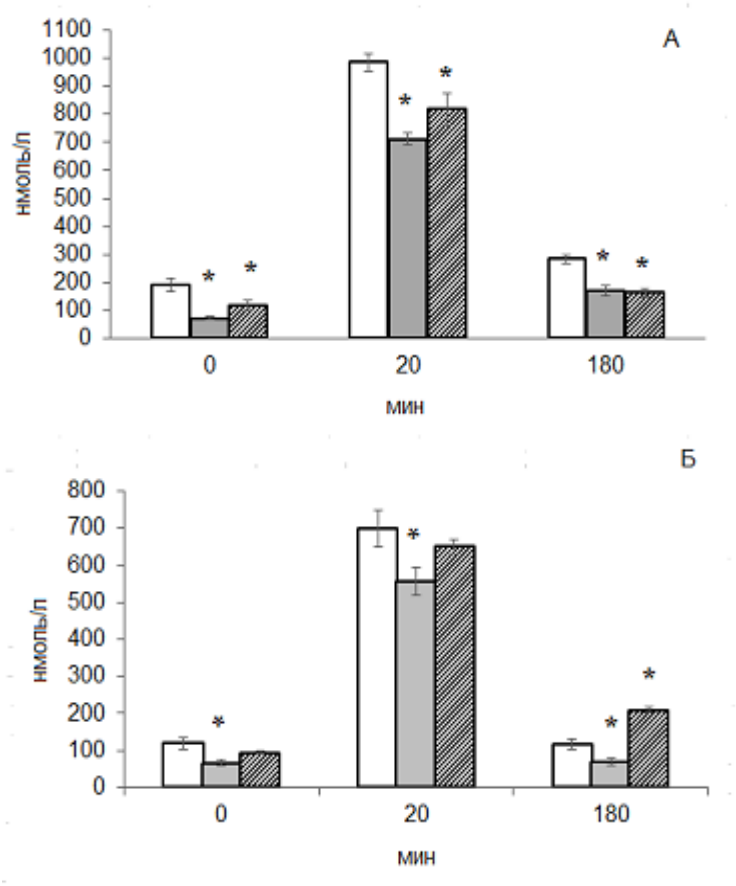

Рис. 7. Характер активности ГАС потомков самцов отцов с ПТСР-подобным или депрессивно-подобным состоянием. А – потомки самки; Б – потомки самцы. По вертикали – уровень кортикостерона в плазме крови (нмоль/л), по горизонтали – время от начала 20-мин иммобилизации. Белые столбики – потомки контрольных отцов, темные столбики – потомки отцов с ПТСР-подобным состоянием, столбики со штриховкой – потомки отцов с депрессивно-подобным состоянием. * - статистически значимые различия между потомками подопытных и контрольных самцов отцов (p<0.05).

Таблица 3. Показатель индекса иммунореактивности к глюкокортикоидным рецепторам областей мозга потомков самок

Область мозга	Потомки контрольных самцов	Потомки самцов с ПТСР-подобным состоянием	Потомки самцов с депрессивно-подобным состоянием	Однофакторный ANOVA
CA1 поле гиппокампа	60.2±3.2	80±5.8*	74,6±4.3**	$F_{(2,17)}$=7.8, p<0.01
Зубчатая извилина	220.7±16.2	341.5±18.9 **	283.5±15.8*	$F_{(2,17)}$=15.5, p<0.0001
2-й слой мПФК	194.3±4.4	246.5±9.6*	244±10.9*	$F_{(2,17)}$=9.4, p<0.001
5-й слой мПФК	104.5±6.7	127.3±12.4	123.8±11.2	$F_{(2,17)}$=3.56, p>0.05

Примечание: * - статистически значимые отличия от потомков контрольных самцов (p<0,05), ** - p<0,01

Таблица 4. Показатель индекса иммунореактивности к глюкокортикоидным рецепторам областей мозга потомков самцов

Область мозга	Потомки контрольных самцов	Потомки самцов с ПТСР-подобным состоянием	Потомки самцов с депрессивно-подобным состоянием	Однофакторный ANOVA
CA1 поле гиппокампа	64.2±4.6	78±6.8*	34.3±4.4**	$F_{(2,17)}$=17.6, p<0.0001
Зубчатая извилина	253.7±10.5	380±21.3 *	211.5±22.2	$F_{(2,17)}$=13.2, p<0.0001
2-й слой мПФК	253.3±12.2	352.2±25.4*	206.7±13.9*	$F_{(2,17)}$=21.4, p<0.0001
5-й мПФК	123.8±4.2	148.5±15.3	115±6.3	$F_{(2,17)}$=3.4, p>0.05

Примечание: * - статистически значимые отличия от потомков контрольных самцов (p<0,05), ** - p<0,01

Таким образом, проведенные исследования показали, что ПТСР-подобное состояние самцов-отцов оказывает более существенное влияние на соматическое развитие, поведенческий фенотип, память и гормональные функции потомков, чем депрессивно-подобное состояние. Обнаруженные нарушения памяти потомков сопровождались снижение экспрессии гена ИФР2 в гиппокампе и неокортексе, но только потомков самцов, что подтверждает участие ИФР2 в регуляции процессов, связанных с памятью (Chen et al. 2011; Lee et al. 2015). Тем не менее, мы не обнаружили изменений в экспрессии гена рецептора второго типа ИФР2 у таких самцов. Вероятно, это связано с имеющимися в литературе данными, что связывание данного рецептора с ИФР2 имеет критическое значение для консолидации памяти, но не влияет на сам процесс обучения (Yu et al., 2020). У половозрелых самцов – потомков самцов с моделированием психопатологий – также выявлено снижение уровня тестостерона в плазме крови, что несомненно скажется на репродуктивном потенциале таких самцов. Несмотря на показанные нарушения памяти и у потомков самок, родившихся от самцов с ПТСР-подобным состоянием, экспрессия гена ИФР2 и уровень эстрадиола в их крови не изменялся. Механизмы, обуславливающие нарушение памяти у таких самок нуждаются в дальнейших исследованиях.

Обсуждая возможные механизмы действия стресса отца на различные функции потомков, отметим, что в настоящее время в качестве основного механизма рассматривается эпигенетическая модификация генома в сперматозоидах, связанная с метилированием ДНК, модификацией гистонов и экспрессией микроРНК (Day et al., 2016; Morgan et al., 2019). Такая эпигенетическая модификация генома может осуществляться только в зреющих сперматозоидах на стадиях от сперматогониев до сперматид (Bale, 2014). Поскольку в наших исследованиях спаривание стрессированных самцов с самками

осуществляли после полного цикла созревания сперматозоидов, любой из этих механизмов может быть вовлечен в эффекты стресса отцов на потомков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы впервые получили доказательства тому, что основным фактором, влияющим на физиологические функции потомков, является, по всей видимости, длительность и интенсивность стрессорного воздействия, которому подвергается самец-отец, а не уровень кортикостерона в их крови в период сперматогенеза. Так, соматическое развитие, поведенческий фенотип и процессы, связанные с памятью, в большей мере нарушались у потомков самцов, которые подвергались травматическому стрессу в течение 2-х ч и последующему рестрессу. Причем у потомков самок и самцов были выявлены особенности влияния такого стрессирования самцов-отцов. В целом, можно утверждать, что наибольшие нарушения были выявлены у потомков мужского пола. Применение к самцам отцам часовой электро-кожной стимуляции оказывало незначительное влияние на поведенческий фенотип и память потомков обоего пола.

Мы также впервые показали снижение экспрессии *Igf2* в неокортексе и гиппокампе самцов – потомков отцов с ПТСР-подобным состоянием, характеризующихся нарушением памяти. Эти данные дают дополнительные сведения о роли ИФР2 в процессах, связанных с формированием памяти.

Следует отметить, что стрессирование самцов-отцов в обоих парадигмах вызывает не только сниженный базальный уровень кортикостерона в крови потомков - самок, но и снижение стрессорной реактивности ГАС. Сходный профиль активности ГАС был выявлен и у потомков самцов тех отцов, у которых моделировали ПТСР. При этом у потомков самцов отцов с моделированием депрессии базальная и стрессорная активность ГАС не изменялась, но торможение их ГАС после стрессорной активации было нарушено. Мы пришли к заключению, что, у потомков самок изменение активности ГАС происходит вследствие самого стресса отца, а у потоков самцов зависит от того, какую парадигму использовали для стрессирования самцов отцов и, вероятно, от уровня кортикостерона, который создавался в этих парадигмах. Также независимо от типа стресса отцов у их половозрелых потомков самцов снижается уровень тестостерона в крови, что является последствием самого стресса.

Анализируя литературу по вопросу возможных механизмов влияния стресса отца на потомков, а также учитывая данные по изменению спектра коротких РНК в сперме стрессированных отцов, полученных в нашей лаборатории (Малышева и др., 2023), мы заключили, что изменение экспрессии некоторых микроРНК в сперме при отцовском стрессе может носить универсальный характер. Дальнейшие исследования в этом

направлении могут способствовать выявлению специфических биомаркеров в сперме, которые будут свидетельствовать о неблагоприятном прогнозе для здоровья потомства.

ВЫВОДЫ

1. ПТСР-подобное состояние оказывает более значительное влияние на состояние семенников и сперматогенез самцов, чем депрессивно-подобное состояние, несмотря на снижение уровня тестостерона в равной мере при моделировании обеих психопатологий.
2. ПТСР-подобное состояние самцов-отцов в период сперматогенеза проявляется у их потомков в виде отставания в соматическом развитии, в изменениях ориентировочно-исследовательской активности, уровня тревожности и памяти в зависимости от пола потомков.
3. Состояние «выученная беспомощность» (модель депрессии) самцов-отцов оказывает незначительные эффекты на соматическое развитие, ориентировочно-исследовательскую активность и память их потомков обоего пола.
4. Последствия стрессирования самцов-отцов в двух парадигмах проявляются у их потомков-самцов в виде снижения уровня тестостерона и не затрагивают уровень эстрадиола у самок.
5. ПТСР-подобное или депрессивно-подобное состояние самцов-отцов оказывает сходное влияние на базальную и стрессорную активности ГАС их потомков-самок, но дифференциальное влияние на активность ГАС потомков-самцов. Выявленные изменения активности ГАС сопровождаются изменениями количества глюкокортикоидных рецепторов в CA1 поле гиппокампа и зубчатой извилине, а также в медиальной префронтальной коре в зависимости от пола потомков.
6. Нарушение памяти самцов, но не самок - потомков отцов с ПТСР-подобным состоянием - сопровождается снижением экспрессии гена инсулиноподобного фактора роста 2 (*Igf2*) в гиппокампе и неокортексе, но не изменяет экспрессию гена его рецептора 2-го типа (*Igf2r*) в гиппокампе.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК:

1. Пивина С.Г., **Холова Г.И**., Ракицкая В.В., Акулова В.К., Ордян Н.Э. Изменение репродуктивных функций самцов крыс при моделировании посттравматического стрессового расстройства// Журнал эвол. биохим. физиол.- 2019.- Т. 55, №5.- С.374-376.
2. Ордян Н.Э., Малышева О.В., Акулова В.К., Пивина С.Г., **Холова Г.И**. Способность к обучению и экспрессия гена инсулиноподобного фактора роста II в мозге самцов крыс –

потомков отцов, подвергнутых стрессирующему воздействию в парадигме «стресс-рестресс»// Нейрохимия. 2020 Т. 37, №2. С.153-160.

3. Ордян Н.Э., Пивина С.Г., Акулова В.К., **Холова Г.И.** Изменение характера поведения и активности гипофизарно-адренокортикальной системы крыс – потомков отцов, подвергнутых стрессированию в парадигме “стресс–рестресс” перед спариванием// Российский физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2020. Т. 106, № 9, С. 1085–1097.
4. Ордян Н.Э., Малышева О.В., **Холова Г.И.**, Акулова В.К., Пивина С.Г. Зависимое от пола влияние стресса самцов крыс на память и экспрессию гена инсулиноподобного фактора роста 2 в мозге потомков// Журнал Высшей нервной деятельности им И.П. Павлова. 2021. Т. 71, № 3, с. 387–399.
5. Ордян Н. Э., Пивина С.Г., **Холова Г.И**., Акулова В.К., Ракицкая В.В. Дифференциальное влияние ПТСР-подобного или депрессивно-подобного состояния самцов крыс перед спариванием на активность гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы половозрелых потомков//Росс. физиол. Журнал им. И.М. Сеченова. – 2022.- Т.108, №9.- С. 1114–1124.

Иные издания:

6. **Холова Г.И**., Акулова В.К., Ордян Н.Э. Роль стресса отца в программировании физиологических функций потомков// В сборнике: Молодые учёные в решении актуальных проблем современной физиологии. Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции. Составители Д.Л. Тёплый, Е.И. Кондратенко, Е.В. Курьянова, А.В. Трясучёв. 2020. С. 38-40.
7. Ордян Н.Э., Малышева О.В., Акулова В.К., **Холова Г.И**., Пивина С.Г. Нарушение когнитивных функций потомков самцов крыс, подвергнутых стрессированию в парадигмах «стресс-рестресс» или «выученная беспомощность»: роль инсулиноподобного фактора роста 2// Интегративная физиология. 2021. Т. 2, № 1, с. 61–70.
8. Ордян Н.Э., **Холова Г.И.** Стресс отца и когнитивные функции потомков: эсперементальное иследование // Тезисы докл. Международной научно-практической конференции Хотлонского государственного медицинского университета «Актуальные вопросы медицины и медицинского образования», Дангара, 22-25 декабря 2020 г.,С. 408-411.
9. Пивина С.Г., Акулова В.К., Ракицкая В.В., **Холова Г.И**., Ордян Н.Э. Показатели сперматогенеза самцов крыс при моделировании посттравматического стрессового расстройства//Обзоры клинич. Фармакол. лекарственной терапии.-2018.- Т.16, Вып. 1.- С.106. (Метериалы Межд. Конференции «Психофизиология и психонейроэндокринология», Ставрополь, 23-16 мая 2018 г.).

10. Ордян Н.Э., Малышева О.В., Пивина С.Г., **Холова Г.И**., Акулова В.К. Стресс отца и физиологические функции потомков: роль инсулиноподобного фактора роста 2// Тезисы докладов XVI Всероссийской конференции с международным участием «Совещание по эволюционной физиологии». Ж. эвол. биохим. физиол. 2020. Т. 56, № 7. С. 611.
11. **Холова Г.**И., Акулова В.К., Ракицкая В.В. Нарушение репродуктивных функций самцов крыс в моделях посттравматического стрессового расстройства и депрессии// Тезисы докладов Всероссийской конференции с международным участием **«**Интегративная физиология**»,** посвящённая 95-летию Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, 9-11 декабря 2020, Санкт-Петербург. С. 208.
12. **Холова Г.И**., Шигалугова Е.Д., Ракицкая В.В. Репродуктивные функции пренатально стрессированных самцов крыс при моделировании посттравматического стрессового расстройства. Всероссийская конференция с международным участием// Тезисы докл. Всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология, Санкт-Петербург, 8-10 декабря 2021 г., С. 40.
13. **Холова Г.И**. Влияние стресса самцов крыс в период сперматогенеза на поведенческий фенотип потомков// Материалы XXIX Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины–2023», Санкт-Петербург, 30-31 марта 2023 г., С. 177.