Министерство науки и высшего образования Российской федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук

На правах рукописи

Холова Гулрухсор Исхокджоновна

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

1.5.5 – физиология человека и животных

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель: Ордян Наталья Эдуардовна,
доктор биологических наук

Санкт-Петербург - 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ…… ……..…..6
ВВЕДЕНИЕ …… …….....7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ…… …….....16
1. Современные представления о стрессе……..…16
1.1. Организация гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы……...….17
1.2. Роль гормонов и нейрогормонов гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы в стрессорном ответе……..19
1.3. Строение и регуляция мужской репродуктивной системы……..…21
1.3.1. Строение и функции семенников…….…….…..22
1.3.2. Сперматогенез……..……..23
1.3.3. Организация гипоталамо-гипофизарно-семенниковой системы…….…...27
1.4. Влияние неблагоприятных факторов среды на мужскую репродуктивную систему…….…..29
1.5. Влияние стресса отца на физиологические функции потомства….…35
1.6. Моделирование ПТСР и депрессия в эксперименте…….…...45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ…….….49
2.1. Характеристика экспериментальных животных……..……...49
2.2. Моделирование ПТСР и депрессии у самцов крыс ……..…49
2.2.1. Модель ПТСР «стресс-рестресс»……..……..49
2.2.2. Модель депрессии «выученная беспомощность»……..……...50
2.3. Изучение состояния семенников самцов с ПТСР-подобным или депрессивно-подобным состоянием…….…….…51
2.4. Получение потомства от интактных самок и самцов с ПТСР-подобным или депрессивно-подобным состоянием…….....51
2.5. Оценка соматического развития потомков……..……...53
2.6. Методы изучения функций ГАС…….....53
2.7. Методы изучение поведение и памяти……....53

2.7.1. Исследования уровня тревожности в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» ……..……....54
2.7.2. Изучение ориентировочно-исследовательского поведения в тесте «открытое поле» ……..…….....55
2.7.3. Исследование депрессивно-подобного поведения в тесте «вынужденное плавание»……..….55
2.7.4. Методы изучения памяти крыс…….56
2.7.4.1. Исследование памяти распознавания……...56
2.7.4.2. Исследование памяти в тесте «реакция пассивного избегания».....57
2.8. Морфологическая оценка репродуктивная активность семенников…...57
2.9. Метод изучения экспрессии генов *Igf2* и *Igf2r* в мозге потомков……...60
2.10. Иммуногистохимический метод определения экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в структурах мозга…….……..61
2.11. Метод определения стероидных гормонов в плазме крови……62
2.12. Методы статистической обработки данных……63
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ……65
3.1. Изменение репродуктивных функций самцов крыс в результате моделирования ПТСР или депрессии…….……65
3.1.1. Влияние модельных психопатологий на уровень стероидных гормонов в крови самцов-отцов……..65
3.1.2. Показатели репродуктивной функции самцов-отцов в ПТСР-подобном или депрессивно-подобном состоянии……66
3.2. Влияние ПТСР-подобного или депрессивно-подобного состояния самца-отца на физиологические функции потомков……...……69
3.2.1. Влияние ПТСР-подобного состояния самца-отца на соматическое развитие потомков……...69
3.2.2. Влияние ПТСР-подобного состояния самца-отца на поведенческий фенотип потомков……..……..70

3.2.3. Влияние ПТСР-подобного состояния самца-отца на память потомков……74
3.2.4. Влияние ПТСР-подобного состояния самца-отца на экспрессию гена инсулиноподобного фактора роста 2 в структурах головного мозга потомков…….....……....…..77
3.2.5.Влияние ПТСР-подобного состояния самца-отца на уровень половых стероидных гормонов в плазме крови половозрелых потомков…..79
3.3. Влияние депрессивно-подобного состояния «вынужденная беспомощность» самца-отца на физиологические функции потомков……..81
3.3.1. Влияние депрессивно-подобного состояния самца-отца на физиологические функции потомков……..…….....81
3.3.2. Влияние депрессивно-подобного состояния самца-отца на поведенческий фенотип потомков……..82
3.3.3. Влияние депрессивно-подобного состояния самца-отца на память потомков…….……..86
3.3.4. Влияние депрессивно-подобного состояния самца-отца на экспрессию гена инсулиноподобного фактора роста 2 в структурах головного мозга потомков……..……....89
3.3.5 Влияние депрессивно-подобного состояния самца-отца на уровень половых стероидных гормонов в крови половозрелых потомков……..91
3.4. Влияние ПТСР-подобного или депрессивно-подобного состояния самцов крыс перед спариванием на активность гипофизарно-адренокортикальной системы и экспрессию глюкокортикоидных рецепторов в головном мозге половозрелых потомков……..….....92
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ……97
4.1. Репродуктивные функции самцов крыс при моделировании ПТСР или депрессии…….……...97
4.2. Соматическое развитие и поведенческий фенотип потомства самцов-отцов с ПТСР-подобным или депрессивно-подобном состоянием……100

4.3. Влияние ПТСР-подобного или депрессивно-подобного состояния самца-отца на гормональные функции потомков……..……102
4.4. Влияние ПТСР-подобного или депрессивно-подобного состояния самца-отца на память и экспрессию гена инсулиноподобного фактора роста 2 в мозге потомков……...……..……106
ЗАКЛЮЧЕНИЕ……..…..116
ВЫВОДЫ……120
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ……..…….121

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПТСР - посттравматическое стрессовое расстройство

ГАС - гипофизарно-адренокортикальная система

ИФР2 - инсулиноподобный фактор роста 2

РПИ - реакция пассивного избегания

САС - симпато-адреналовая система

ГГАС - гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальная система

АКТГ - адренокортикотропный гормон

ГР - глюкокортикоидные рецепторы

МР - минералокортикоидные рецепторы

мПФК - медиальная префронтальная кора

ГК – глюкокортикоиды

ГГС - гипоталамус-гипофиз-семенники

ГЛ - гонадолиберин

ЛГ - лютеинизирующий гормон

КЛ - кортиколиберин

ФСГ - фолликулостимулирующий гормон

ГнИГ - гонадотропин-ингибирующий гормон

ИСК - извитой семенной каналец

Кр – коэффициент распознавания

ВВЕДЕНИЕ

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, поведение и способность к обучению потомков. Однако результаты таких исследований весьма противоречивы. Так, было установлено, что стрессирование взрослых самцов мышей и крыс до спаривания их с самками в различных парадигмах 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 ИФР-2 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.

Задачи исследования:

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, сопровождается ухудшением памяти их потомков и 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 такого 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 их памяти, возникающее вследствие воздействия неблагоприятных факторов (стрессоров) на организм 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.

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 сопровождается нарушением памяти самцов - потомков отцов с ПТСР-подобным состоянием.

Апробация работы. 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., на Международной научно-практической конференции Хотлонского государственного медицинского университета «Актуальные вопросы медицины и медицинского образования», Дангара, Таджикистан, 2020 г., на Всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология», Санкт-Петербург, 2021 г., на XXIX

Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2023», Санкт-Петербург, 2023 г.

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 от стрессированных самцов-отцов, изучение соматического развития и поведения потомства, проводила морфометрический анализ семенников, выполняла 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.

Степень достоверности. 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 исследования прошли независимую экспертизу при их публикации в ведущих российских рецензируемых журналах, а также при представлении докладов по теме диссертации на научных конференциях.

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

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.
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.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1. Современные представления о стрессе

В современном обществе стрессовые факторы окружают нас повсюду. Последние десятилетие характеризуются отчетливым возрастанием количества и интенсивности стрессовых факторов, что существенным образом отражается на состоянии здоровья населения планеты. Согласно данным Global Organization for Stress, стрессовые состояния испытывают 91% австралийцев, 86% жителей Китая и 75 % взрослого населения США (Гусакова, 2020). Стресс, является фактором риска развития различных соматических и психических заболеваний, а также значительно повышает тяжесть течения этих заболеваний, что, в свою очередь, может привести к летальному исходу(Алексеев,2019).

Еще в 1914 году Уолтер Кеннон заметил, что стресс активирует симпато-адреналовую систему (САС), которая стимулирует выброс гормонов надпочечников в кровоток, тем самым мобилизуя защитные силы организма для реакции «борьба/ бегство» (Cannon, 1914). В дальнейшем основоположник теории стресса Ганс Селье выделил 2 вида стресса: патологический стресс (дистресс) и физиологический стресс (эустресс). Со времен Селье концепция стресса существенно дополнялась новыми знаниями, но основы её остаются незыблемыми: в настоящее время стресс рассматривается как системная неспецифическая ответная реакция организма на воздействие, внешнее или внутреннее, угрожающее гомеостазу (McEwen B.S., 2007). В зависимости от природы факторов, вызывающих стресс, различают психологический (психогенный), эмоциональный (иногда объединяемый единым понятием психоэмоциональный), тепловой, холодовой и другие виды стресса. В последние годы особо выделяют так называемый травматический стресс, в основе которого лежат события, приводящие наряду с физическими повреждениями к значительным нарушениям в психической сфере (психотравматизации) при исчерпании мобилизационных резервных ресурсов организма. Согласно исследованиям,

травматическое событие – это опыт столкновения субъекта с событием или ситуацией, представляющей угрозу для него самого (или его близких) и сопровождающийся интенсивным страхом, ужасом, беспомощностью (Heim, Nemeroff, 2009).

Согласно Кеннону, воздействие стресса подготавливает организм к борьбе, которая связана с страхом, яростью и болью (Жуков, 2004). В соответствие с биологической целью стресс активирует адаптивные свойства, а также иммунную систему для предотвращения неблагоприятных патогенных воздействий на организм. Стресс имеет двойственную природу: адаптивную и патогенную, развиваясь через ряд последовательных стадий. В фазу тревоги появляются первичные стрессорные реакции. В фазу резистентности организм усиливает защитные адаптационные функции, способствующие преодолению неблагоприятной ситуации, в фазу истощения стрессорное состояние оказывает негативное повреждающее влияние на физиологические функции организма. Последняя стадия может заканчиваться гибелью организма (Юматов, 1990). В реализации стрессорной реакции задействованы несколько анатомических областей мозга, включая миндалину, регулирующую страх, гиппокамп, в котором стресс вызывает синаптическую дегенерацию, гибель нейронов и уменьшение его объема. Третья - префронтальная кора головного мозга, в которой стресс вызывает функциональные и структурные нарушения (Sharp B.M., 2017). Реакция организма на стресс заканчивается высвобождением различных нейромедиаторов, пептидов и гормонов (McEwan, 2005), которые, действуя на различных уровнях организма (центрально и/или периферически), способствуют поддержанию гомеостаза.

1.1. Организация гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы

Гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальная система играет большую роль в регуляции ответа организма на стрессорные воздействия.

Современные исследователи проблем и теории стресса пишут о том, что под влиянием стрессоров происходит активация как симпато-адреналовой системы (САС) через голубое пятно (locus coeruleus) ствола мозга, так и гипофиз-адренокортикальной системы (ГАС) через паравентикулярное ядро (ПВЯ) гипоталамуса (Chrousos, Gold,1992). Голубое пятно является основным синтезатором нейромедиатора норадреналина и основным подкорковым центром регуляции САС (Шаляпина, Шабанов, 2005), а в ПВЯ гипоталамуса сосредоточено основное скопление кортиколиберинергических нейронов, регулирующих гормональную функцию ГАС. В связи с этим гипоталамус и ГАС объединяют в одну систему – гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальную (ГГАС). Это связано с тем, что в гипоталамусе синтезируется кортиколиберин, регулирующий гормонопоэз в аденогипофизе, а гипоталамус и гипофиз имеют общую систему кровоснабжения (Чернышева, 1995). Кортиколиберин считается «первым агентом стресса», а также интегратором основных адаптивных систем организма (Шаляпина, Шабанова, 2005). Синтезирующийся в нейронах ПВЯ гипоталамуса кортиколиберин стимулирует выделение адренокортикотропного гормона (АКТГ) в кортикотропоцитах аденогипофиза. Выделение АКТГ активизирует выработку глюкокортикоидов в коре надпочечников. Механизм действия глюкокортикоидов состоит в том, что они взаимодействуют со специфическими внутриклеточными рецепторами, далее этот комплекс связывается со специфическими участками ДНК и оказывает регулирующий эффект на экспрессию генов. Регуляция одной функции несколькими гормонами, взаимосвязь между различными эндокринными функциями приводят к тому, что физиологический эффект зависит не столько от концентрации гормона, сколько от динамики его высвобождения в кровь.

В организме обнаруживают два типа рецепторов, взаимодействующих с глюкокортикоидными гормонами. В периферических органах и тканях локализуются глюкокортикоидные рецепторы, тогда как в головном мозге

присутствуют как глюкокортикоидные рецепторы (ГР), так и минералокортикоидные рецепторы (МР) (deKloet et al., 2005). Оба типа рецепторов присутствуют в нейронах и глиальных клетках. В некоторых структурах мозга ГР и МР находятся в пределах одного нейрона и участвуют в механизмах регуляции его функций (de Kloet et al.,2004) Кроме того, оба типа рецепторов обеспечивают регуляцию ГГАС как в базальном состоянии, так и в стрессорных условиях и, особенно, в части торможения этой оси по механизму обратной связи. Здесь важнейшая регуляторная роль принадлежит таким структурам мозга как гиппокамп, медиальная префронтальная кора (мПФК) и амигдала. Последняя оказывает возбуждающее действие на активность ГГАС, тогда как гиппокамп и медиальная префронтальная кора обеспечивают торможение ГГАС после стрессорной активации (McEwen ,2012; McEwen B.S., Morrison J.H.,2013). Поскольку МР имеют более высокое сродство к глюкокортикоидному гормону, их эффекты в основном реализуются при базальных концентрациях гормона в крови, тогда как ГР вовлекаются в регуляцию активности ГГАС в условиях повышения уровня глюкокортикоидов в крови, например, при стрессе и циркадном максимуме активности ГГАС (Harris et al.,2013; Koning et al.,2019).

1.2. Роль гормонов и нейрогормонов гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы в стрессорном ответе.

Характер самого стресса, индивидуальная оценка возникшей стрессовой ситуации и поведенческая стратегия субъекта в условиях стресса определяет наличие определенного компонента в реакции организма (Summers, 2001; Armario et. al., 2004). При стрессе происходит выброс кортиколиберина из гипоталамуса, что приводит к увеличению выработки АКТГ гипофизом и, соответственно, глюкокортикоидов из надпочечников. Одновременно под воздействием эмоционального восприятия стресса активируется кортиколиберин, локализованный в экстрагипоталамических

структурах мозга (Arendt et al., 2012). Таким образом, на ранних стадиях формирования стресса кортиколиберин играет ключевую роль, поскольку запускает каскад реакций и дальнейшие защитные адаптивные процессы, в которых участвуют стресс-активирующая и стресс лимитирующая системы (Aguilera et al., 2007).

АКТГ – это пептид, который вырабатывается клетками гипофиза в ответ на действие кортиколиберина. Влияние кортиколиберина на высвобождение АКТГ усиливается и другими гормонами гипоталамуса (вазопрессином), активность которых зависит от стимулирующего или ингибирующего действия таких активных веществ, как ацетилхолин, катехоламины, дофамин, серотонин и цитокины. На периферии органом-мишенью АКТГ являются клетки коры надпочечника. АКТГ усиливает синтез и высвобождение глюкокортикоидов (ГК) и, в меньшей степени, минералокортикоидов и андрогенов надпочечников (Ronan , Summers , 2011).

Эндогенные ГК (кортизол, кортикостерон) играют ключевую модулирующую роль в стрессовых ситуациях. ГК регулируют многие центральные и периферические функции. Эти гормоны оказывают множество эффектов на клетки-мишени, опосредуя различные аспекты гомеостаза, регулируя иммунную систему и играя важную роль в системном стрессорном ответе. Метаболический эффект ГК достигается за счет готовности к мобилизации энергоресурсов. Эти гормоны изменяют обмен углеводов, липидов и белков. Кроме того, рост и дифференцировка клеток регулируются с помощью изменения активности генов, что также оказывает влияние на иммунную систему и на многие специфические реакции, которые развиваются в ответ на раздражители (Pearson-Murphy B.E. 2007). Высокая плотность глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе, амигдале и префронтальной коре убедила учёных продолжить изучение роли гормонов стресса в обеспечении функций этих структур мозга (McEwen et al., 2016).

Было показано, что при сбалансированной активации стресс-активирующих систем (САС и ГГАС) и стресс-лимитирующих систем

происходит развитие соответствующего ответа к внешним воздействиям (Jiang et al., 2009), тогда как пролонгированный стрессорный ответ приводит к болезням адаптации. (Гусакова, 2020; deKloet et al.,2005).

Введение ГК в физиологических дозах оказывает стресс-протекторный эффект: ограничивает изменение концентрации адренокортикотропного гормона, кортизола и инсулина в крови, прирост содержания продуктов перекисного окисления липидов, лимитирует гиперкоагуляцию, улучшает неврологический статус и функцию сердечно-сосудистой системы, минимизирует апоптотические изменения в клетках и демонстрирует гастропротективный эффект (Филаретова и др., 2022).

Воздействие неблагоприятной окружающей среды во время беременности вызывает индуцированные глюкокортикоидами изменения, которые могут повысить выживаемость потомства в раннем возрасте, но за счет более высокой восприимчивости к последующим сосудистым и метаболическим заболеваниям, а также ментальным и когнитивным дисфункциям во взрослом возрасте (Dinesh Yadav et al., 2018). Значительное влияние стресс оказывает и на репродуктивную систему в мужском организме. Но прежде, чем коснуться вопроса влияния стресса на мужскую репродуктивную систему необходимо рассмотреть ее строение и регуляцию.

1.3. Строение и регуляция мужской репродуктивной системы

Основным органом мужской репродуктивной системы являются семенники, в которых осуществляется синтез тестостерона и созревание сперматозоидов. Контроль функций семенников осуществляется гормонами аденогипофиза и нейрогормонами гипоталамуса. В связи с этим ось гипоталамус – гипофиз – семенники объединяют в единую функциональную систему. Рассмотрим строение и функции каждой составляющей этой системы.

1.3.1. Строение и функции семенников

Семенники являются парными органами мужской половой системы. У млекопитающих они вынесены из брюшной полости в мошонку, так как для нормального сперматогенеза необходима температура не выше 35 °С. Кровоснабжение семенников обеспечивается яичковой артерией, а отток крови – яичковой веной. Семенные извитые канальцы и клетки Лейдига окружает сеть кровеносных сосудов (Аршифексов, Артюхин, 2007).

Семенники окружены тремя оболочками: брюшиной, белочной оболочкой и сосудистой оболочкой. Белочная оболочка глубоко вдается в ткань семенника в виде осевого тяжа - средостения семенника (Ноздрачев, Поляков, 2001). В средостении расположена сеть из протоков, в которые открываются семенные канальцы. Сам семенник разделен на конические дольки, в которых расположено по несколько семенных канальцев. Они включают извитые семенные канальца, расположенные в дольках и прямые семенные канальца. Между семенными канальцами, в рыхлой соединительной ткани, расположены клетки Лейдига (КЛ). В извитых семенных канальцах осуществляется сперматогенез, а клетки КЛ отвечают за эндокринную функцию. Строение КЛ характерное для активно секретирующих клеток: хорошо развит гладкий эндоплазматический ретикулюм, комплекс Гольджи и митохондрии. КЛ секретируют андрогены, в основном тестостерон. Помимо этого, в семенниках вырабатываются и другие стероидные гормоны в небольших количествах (Бахтюков, Шпаков, 2016). Тестостерон попадает в просвет канальцев, где связывается с андроген-связывающим белком, который выделяется клетками Сертоли. Тестостерон необходим для нормального сперматогенеза. Функция тестостерона в поддержании сперматогенеза будет рассмотрена ниже.

Извитые семенные канальцы имеют стенку из нескольких слоев и изнутри выстланы сперматогенным эпителием. Сперматогенный эпителий представлен клетками Сертоли, поверхность которых имеет многочисленные выступы. Между этими выступами созревают будущие гаметы. Около

базальной мембраны располагается базальный компартмент, где находятся только сперматогонии, а дальше располагается адлюминальный компартмент, где находятся клетки в следующих стадиях дифференцировки, вплоть до сперматозоидов. Извитые семенные канальцы переходят в прямые, а те, в свою очередь, в сеть семенника. Из сети семенника выходят выносящие канальцы придатка семенника (эпидидимис), где скапливаются сперматозоиды В эпидидимисе различают головку, тело и хвост. Головка расположена на головном конце семенника и функционально с ним связана. Тело эпидидимиса представляет из себя узкую часть эпидидимиса и соединяет головку с хвостом. Последний продолжается в семявыносящий проток. Семявыносящие протоки впадают в мочеиспускательный канал – общий выход мочевого и полового тракта самцов (Ноздрачев, Поляков, 2001).

1.3.2. Сперматогенез

Процесс сперматогенеза происходит в семенном эпителии извитых семенных канальцев, функциональной единице семенников млекопитающих (Majd et al., 2019). У млекопитающих морфологические изменения, которые происходят во время сперматогенеза, включают клеточную дифференцировку и трансформацию, митоз, мейоз, движение половых клеток, сперматогенез и спермию. Время полного сперматогенеза различается в зависимости от вида. У человека полный цикл сперматогенеза завершается за 74 дня, а у крыс за 48 дней.

В процессе сперматогенеза выделяют следующие периоды: размножение, рост, созревание и формирование. Первый период характеризуется размножением сперматогоний, находящихся в базальном компартменте семенных канальцев. Сперматогонии делятся на два типа: стволовые, ответственные за самообновление популяции этих клеток, и дифференцирующиеся сперматогонии, которые впоследствии станут полноценными сперматозоидами (Волошин, Тополенко, 2009).

Дифференцирующиеся сперматогонии вступают в фазу роста и превращаются в сперматоциты первого порядка. В это время они увеличиваются в размерах, а затем проходят редукционное деление мейоза, когда из каждого сперматоцита первого порядка образуется два гаплоидных сперматоцита второго порядка. При первом делении мейоза происходит кроссинговер – процесс рекомбинации ДНК, который обеспечивает генетическое разнообразие гамет (Реунов, 2005). Сперматоциты второго порядка вступают во второе деление мейоза, в результате которого из них образуются по две сперматиды – небольшие крупноядерные клетки правильной формы. Сперматиды претерпевают определенные изменения и становятся сперматозоидами (Плехова и др., 2000). Сперматозоиды значительно меньше, чем сперматиды. Уменьшение размера сперматозоидов достигается за счет отбрасывания части цитоплазмы, которую фагоцитируют клетки Сертоли (Дроздов, Иванков, 2000).

Регуляция сперматогенеза осуществляется под контролем гонадотропных гормонов, вырабатываемых передней долей гипофиза, и тестостерона, что будет рассмотрено в следующем разделе, посвященном организации гипоталамо-гипофизарно-семенниковой системы.

Клеткам Сертоли принадлежит важнейшая роль в сперматогенезе. Неслучайно их называют «клетками-няньками» (O'Donnell et al., 2021). В препубертатный период клетки Сертоли поддерживают развитие перитубулярных миоидных клеток и сперматогониев, а также предшественников клеток Лейдига. Во взрослых семенниках они обеспечивают вхождение сперматогониев в мейоз. Поддержание плотных контактов между клетками Сертоли необходимо для развития зародышевых клеток. Кроме того, они поддерживают развитие и выживание половых клеток во время мейоза и сперматогенеза, а также высвобождение удлиненных сперматид при спермии. Схематично участие клеток Сертоли в обеспечении сперматогенеза представлено на Рис. 1.

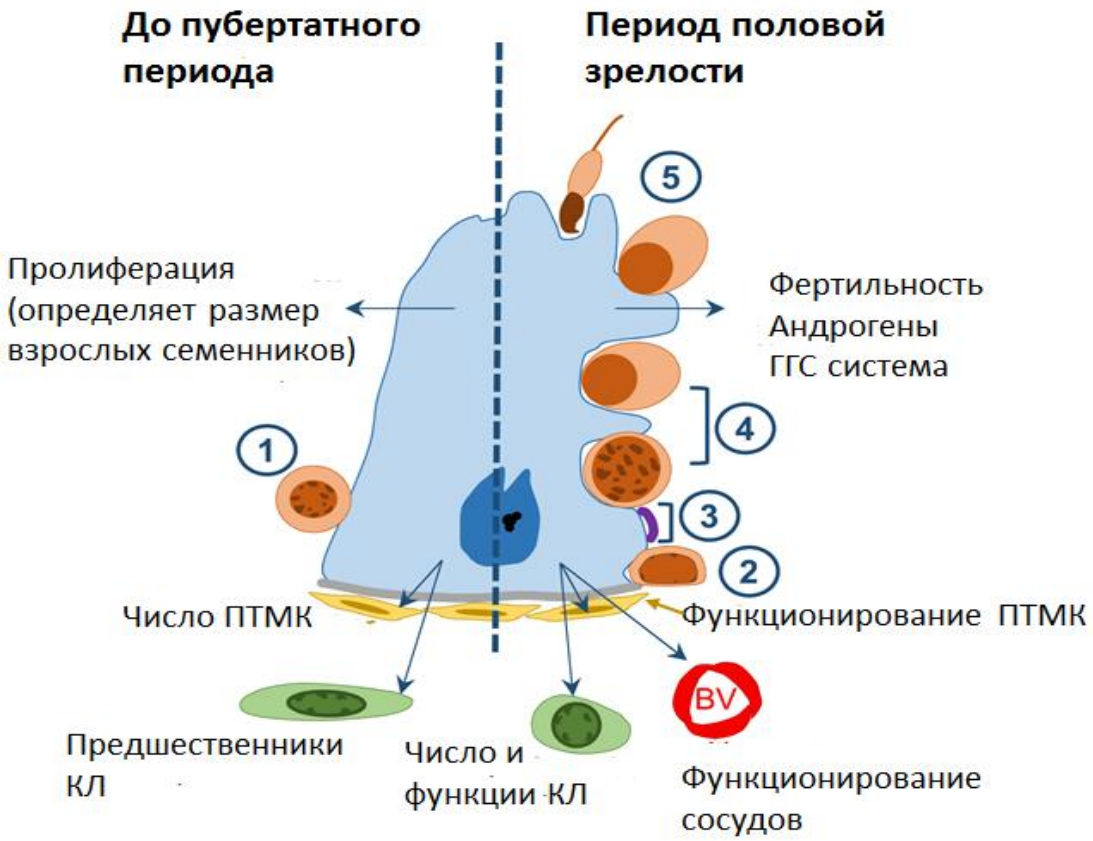


Рис. 1. Функциональная роль клеток Сертоли в препубертатном и взрослом возрасте на моделях грызунов. Клетка Сертоли с базально расположенным ядром показана синим цветом. Сперматогенные клетки оранжевого цвета, перитубулярные миоидные клетки (ПТМК) – желтого цвета, клетки Лейдига (КЛ) – зеленого цвета, сосудистая сеть – красного цвета. Стрелки указывают роль клеток Сертоли в семенниках, включая поддержание пролиферации клеток Лейдига до полового созревания и, во взрослом семеннике, выработку спермы, необходимую для фертильности, оптимального производства андрогенов и регуляции оси гипоталамус-гипофиз-семенники (ГГС). Препубертатные клетки Сертоли поддерживают развитие сперматогенных клеток и нормальную экспрессию генов сперматогенных клеток во взрослом возрасте. Роли клеток Сертоли в семенном эпителии пронумерованы следующим образом: 1) поддержание сперматогониальных стволовых клеток и сперматогоний; 2) вхождение сперматогониев в мейоз; 3) поддержание плотных контактов между клетками Сертоли, необходимых для развития зародышевых клеток; 4) Поддержание развития и выживания половых клеток во время мейоза и сперматогенеза; 5) высвобождение удлиненных сперматид при спермии (O'Donnell et al., 2021, с модификациями).

За последние два десятилетия были достигнуты значительные успехи с использованием новых методов биохимической, клеточной и молекулярной биологии для понимания того, как различные гены, белки и сигнальные пути регулируют различные аспекты сперматогенеза. К ним относятся исследования дифференциации сперматогониев от гоноцитов; регуляция сперматогониальных стволовых клеток; регуляция сперматогониального митоза; регуляция мейоза, сперматогенеза и спермиации; роль гормонов (например, эстрогенов, андрогенов) в сперматогенезе; транскрипционная регуляция сперматогенеза; регуляция апоптоза; межклеточные взаимодействия во время сперматогенеза. Среди последних открытий, связанных с регуляцией сперматогенеза у млекопитающих, является открытие роли микро-РНК в процессе регуляции сперматогенеза (Chen et al., 2017). Сперматогенез млекопитающих включает три непрерывных и организованных процесса, посредством которых сперматогонии подвергаются митозу и дифференцируются в сперматоциты, затем мейозу с образованием гаплоидных сперматид и в конечном итоге превращаются в сперматозоиды. Эти процессы требуют точно, пространственно и временно регулируемых паттернов экспрессии генов. Малые некодирующие РНК, такие как микроРНК и piwiРНК, представляют собой новый класс посттранскрипционных регуляторов. Последние важны для нормального сперматогенеза, осуществляя функцию генного сайленсинга транспозонов (Czech et al.,2008; Ozata et al., 2019). Половые клетки самцов также содержат микроРНК длинной 21-23 пары нуклеотидов. МикроРНК играют критическую роль в регуляции экспрессии большого числа генов, в основном на пост-транскрипционном уровне. Дисрегуляция продукции микроРНК в процессе созревания сперматозоидов рассматривается как одна из причин мужского бесплодия (Kamalidehghan et al.,2020).

Продукты некоторых генов, регулируемых микроРНК, играют важную роль в процессах сперматогенеза. Так, ДНК метилтрансфераза 3 (Dnmt3)

осуществляет метилирование генов de novo в течение сперматогенеза, а метадгерин (Mtdh) поддерживает процесс сперматогенеза (Hilz et al., 2016; Meng et al., 2015). Нормальный паттерн экспрессии микроРНК в сперме имеет определенное значение в контроле транскриптомного гомеостаза зиготы (Okada, Yamaguchi, 2017). Важно отметить, что измененный паттерн экспрессии микроРНК в сперме может быть передан потомству (Pang et al., 2017).

1.3.3. Организация гипоталамо-гипофизарно-семенниковой системы.

Функционирование мужской репродуктивной системы определяется активностью гипоталамо-гипофизарно-семенниковой оси. В гипоталамусе содержатся нейросекреторные клетки, в которых синтезируется и выделяется гонадолиберин (ГЛ) или гонадотропин-рилизинг-гормон. Основная часть нейросекреторных клеток, продуцирующих ГЛ, расположена в медиальной преоптической области гипоталамуса. Секреция ГЛ происходит в пульсирующем режиме (Moradi et al., 2013). Организация такого режима секреции ГЛ имеет критическое значение для полового созревания и репродукции в целом (Herbison, 2016). Активность нейросекреторных клеток, синтезирующих ГЛ, регулируется различными нейромедиаторами, стероидными гормонами и ростовыми факторам. (Watanabe et al., 2014).

Через капиллярную сеть воротной системы срединного возвышения ГЛ поступает в аденогипофиз, где под его действием синтезируются и поступают в центральный кровоток гонадотропные гормоны. К гонадотропным гормонам относятся лютеинизирующий гормон (ЛГ) и фолликулостимулирующий гормон (ФСГ). Рецепторы ЛГ присутствуют на клетках Лейдига семенников, стимулируя синтез тестостерона этими клетками, тогда как рецепторы к ФСГ экспрессируются преимущественно на мембранах клеток Сертоли, обеспечивая поддержание активности данных клеток и процесс созревания сперматозоидов (Ramaswamy, 2014).

Тестостерон через специфические ядерные рецепторы, расположенные в нейросекреторных клетках гипоталамуса и гонадотропах гипофиза, вовлечен в регуляцию гипоталамо-гипофизарно-семенниковой системы по механизму отрицательной обратной связи, угнетая продукцию ГЛ и гипофизарных гормонов (Tilbrook et al., 1995). Помимо этого, тестостерон вовлечен в регуляцию различных процессов во многих тканях, в том числе ЦНС (Шпаков, 2017).

Наряду с ГЛ, имеется много факторов, которые вовлечены в регуляцию продукции и функциональной активности ФСГ и ЛГ, а также влияют на синтез и секрецию самого ГЛ. Среди них гонадотропин-ингибирующий гормон (ГнИГ), который получил свое название в связи со способностью подавлять секрецию гипофизарных гонадотропинов (Iwasa et al., 2017). Нейроны, в которых экспрессируется ген, кодирующий ГнИГ, расположены в паравентрикулярных ядрах гипоталамуса (Tsutsui et al., 2006). На КЛ-нейроны ГнИГ действует через специфический рецептор, нарушая пульсовую секрецию КЛ в гипоталамусе, а на гонадотропы напрямую, подавляя в них синтез гонадотропинов. Важно отметить, что до 53% ГнИГ-нейронов имеют рецепторы к глюкокортикоидам, последние положительно влияют на секрецию ГнИГ (Шпаков, 2017). В связи с этим, ГнИГ рассматривается как один из основных факторов, опосредующих негативное влияние стресса на активность ГГС системы (Kirby et al., 2009).

Гипоталамус связан практически со всеми отделами центральной нервной системы, в том числе с корой головного мозга. Естественно, что стрессоры и импульсы, возникающие в коре головного мозга, непосредственно влияют на гипоталамус, а через него и на гипофиз, с которым гипоталамус имеет тесную гуморальную связь.

Как уже было сказано ранее, регуляция сперматогенеза осуществляется под действием гонадотропных гормонов, вырабатываемых передней долей гипофиза: ФСГ и ЛГ. ЛГ влияет на клетки Лейдинга, вырабатывающие тестостерон. ФСГ же влияет на клетки Сертоли в семенных канальцах,

которые оказывают наибольшее влияние на сперматогенез и качество вырабатываемой семенной жидкости (Лихоносов и др., 2019). В последнее время был выявлен целый ряд белковых агентов, отрицательно влияющих на сперматогенез (Nargund, 2015).

Основным фактором нормального функционирования репродуктивной системы млекопитающих самцов является тестостерон. Сперматогенез и мужская фертильность зависят от наличия тестостерона в семенниках. В отсутствие тестостерона или рецептора андрогенов сперматогенез не выходит за пределы стадии мейоза (Sadowska-Krępa et al., 2017). Основной клеточной мишенью и транслятором сигналов тестостерона в развивающиеся половые клетки является клетка Сертоли. В клетке Сертоли сигналы тестостерона могут транслироваться непосредственно в изменения экспрессии генов (классический путь), или тестостерон может активировать киназы, которые регулируют процессы, необходимые для поддержания сперматогенеза (неклассический путь). (Green, McCormick, 2016). В результате местного производства уровень тестостерона в семенниках значительно выше, чем в сыворотке крови. Было установлено, что сперматогенез не происходит в отсутствие относительно высоких уровней тестостерона в семенниках (> 70 нМ у крыс) (Sadowska-Krępa et al.,2017).

1.4. Влияние неблагоприятных факторов среды на мужскую репродуктивную систему

Ряд исследований последних лет показывает, что нарушение мужской фертильности, связанное с неправильным образом жизни, нарушением питания, пожилым возрастом и факторами окружающей среды, играет важную роль в снижении рождаемости (Ilacqua et at.,2018).

Чрезмерное использование высокоэнергетических диет в современном обществе изменяет функционирование мужской репродуктивной оси и, как следствие, влияет на физиологию яичек, нарушая их метаболизм и биоэнергетические способности (Bell et al., 2016). Метаболизм яичек

обладает уникальными характеристиками, отчасти из-за его клеточной гетерогенности и специфических функций (Кубасов и др., 2014). Нарушение строго регулируемых метаболических путей приводит к неблагоприятным репродуктивным результатам, таким как неэффективное снабжение половых клеток энергией, дефекты сперматозоидов или остановка сперматогенеза. Сходным действием на мужскую фертильность обладают токсические агенты, например, никотин и содержащиеся в табачном дыме токсические вещества (Dai et al., 2015). Не меньшее отрицательное влияние на мужскую фертильность оказывают стрессорные состояния (Nargund, 2015).

Стресс является приспособительным фактором, помогающим организму приспособиться к неблагоприятным условиям внешней среды. Сталкиваясь с угрозами жизни, организм временно выключает некоторые функции, в пользу приоритета других жизненно важных на данный момент, с последующим восстановлением ингибированных систем. Функция размножения относится к их числу. Как ни странно, угнетение репродуктивной функции в моменты стрессовых ситуаций является приспособительным фактором, позволяющим организму выжить в критический момент, и произвести потомство в безопасное для него время (Амстиславская, Попова, 2009). При кратковременных воздействиях стрессовых факторов эта схема, разработанная природой, работает без сбоев. Однако при многократном повторении отмечается постепенная перестройка всех систем организма, в том числе и репродуктивной системы (Алексеев, 2019).

Именно из-за того, что сперматозоиды очень чувствительны к воздействию внешней среды, мужское бесплодие становится очень распространенным явлением в современном мире. Примерно в 50% случаев бесплодие пары происходит по вине партнера-мужчины, в основном из-за нарушения сперматогенеза. Параметры спермы могут быть потенциально связаны со стрессом, который снижает пульсацию ЛГ и тестостерона, что, в свою очередь, негативно влияет на сперматогенез (Gollenberg et al., 2010).

Хорошо известно, что стрессорные воздействия, приводящие к повышению уровня глюкокортикоидов, влияют на продукцию тестостерона клетками Лейдига. Глюкокортикоидные гормоны, взаимодействуя с классическими рецепторами, напрямую ингибируют транскрипцию генов, кодирующих ферменты биосинтеза тестостерона, такие как цитохром P450-зависимый фермент расщепления боковой цепи холестерина и цитохром P450-зависимая 17α-гидроксилаза / 17,20-лиаза (Юматов., 1990). Ген регуляторного белка стероидогенеза (StAR) также подавляется глюкокортикоидами (Ilacqua et at.,2018). Кроме того, было показано, что снижение продукции тестостерона в условиях повышенного уровня глюкокортикоидов может быть опосредовано индукцией апоптоза в клетках Лейдига и, соответственно, уменьшением их количества (Agarwal et al.,2018; Agarwal et al., 2007). ГК могут оказывать и быстрое не геномное действие на клетки Лейдига. Так, было показано, что введение кортикостерона мышам снижает продукцию тестостерона клетками Лейдига уже через 30 мин (Aguilera et al.,2000).

Помимо клеток Лейдига, ГР экспрессируются в сперматогониях. Было показано, что введение дексаметазона крысам индуцирует апоптоз в этих сперматогенных клетках. Совместное введение дексаметазона и антагониста ГР мефипристона устраняет проапоптотический эффект дексаметазона, что свидетельствует о вовлечении ГР в действие экзогенного глюкокортикоида (Czén et al., 2016). Кроме того, было показано, что в условиях хронического стресса наблюдается ингибирование клеточного цикла в сперматогониях на G0/G1 фазе, что приводило к снижению числа сперматид в сперматогенном эпителии и сперматозоидов в эпидидимисе (Шаляпина, Шабанов, 2005). Интересно, что стресс в данном исследовании приводил к активации ГР, а введение антагониста ГР нормализовало число сперматозоидов у стрессированных крыс.

Глюкокортикоиды в стрессовых концентрациях, взаимодействуя с глюкокортикоидными рецепторами, способны снижать секрецию ГЛ в

гипоталамусе и ЛГ в аденогипофизе. Показано, что глюкокортикоидные рецепторы присутствуют в ГЛ-содержащих клетках гипоталамуса и выступают в качестве лиганд-активируемого регулятора транскрипции (Chandran et al., 1994). Элемент, необходимый для репрессии гена ГЛ, не связывается непосредственно с глюкокортикоидным рецептором, но распознается Oct-1, что установлено на мышах (Chandran et al., 1994). Следовательно, механизм глюкокортикоидной репрессии транскрипции гена ГЛ не включает прямое связывание глюкокортикоидного рецептора с ДНК, а скорее предполагает белок-белковые взаимодействия между глюкокортикоидным рецептором и ДНК-связанным фактором транскрипции Oct-1. Помимо подавления синтеза ГЛ, глюкокортикоиды снижают активность центра генерации импульсов секреции ГЛ (Dubey, Plant,1985). В совокупности это говорит о том, что основной сайт для ингибирующего действия глюкокортикоидов на секрецию гонадотропинов находится в гипоталамической области (Whirledge, Cidlowski ,2010).

При действии стрессорных факторов падение секреции ГЛ и гонадотропинов происходит в течение нескольких минут. Такой эффект стресса опосредован кортиколиберином и вазопрессином, вырабатывающимися в ПВЯ гипоталамуса. Внутрижелудочковое введение антагонистов кортиколиберина частично снимает индуцированное стрессом подавление секреции ГЛ, а введение антагонистов вазопрессина подавляют ингибирующее действие стресса на секрецию ЛГ. Показано, что аксоны кортиколиберинергических нейронов паравентрикулярного ядра образуют синапсы на ГАМК-ергических нейронах в медиальной преоптической области, а на самих ГЛ-ергических нейронах выявлены синапсы, содержащие кортиколиберин или вазопрессин. Предполагают, что кортиколиберин через ГАМК-ергические нейроны медиальной преоптической области гипоталамуса снижает частоту импульсов ГЛ, а вазопрессин через опиоидергические нейроны подавляет амплитуду импульсов ГЛ (Hardy et al., 2005). Схематично влияние ГГАС на ось ГГС приведено на рис. 2.

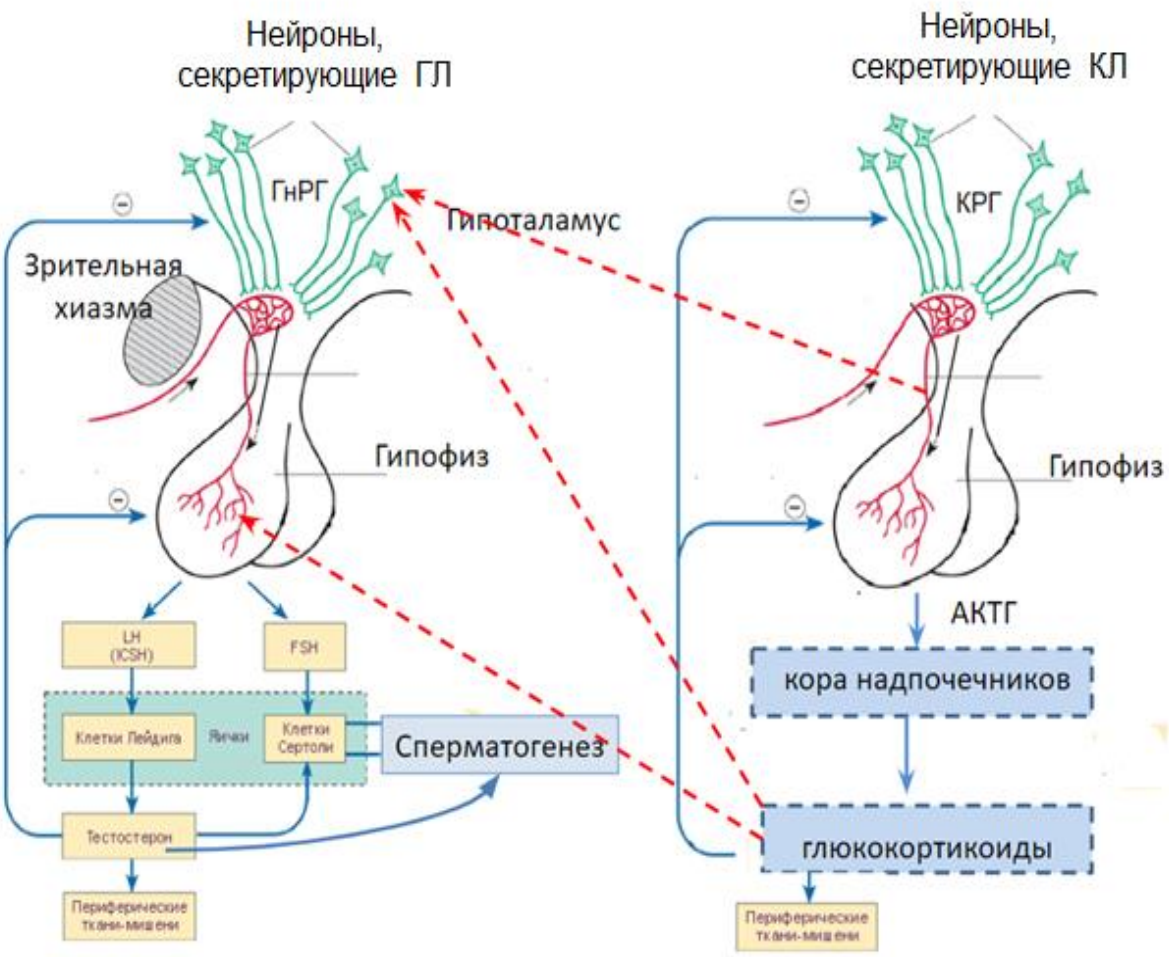


Рис. 2. Взаимодействие между гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системой и системой гипоталамус-гипофиз-семенники.

Ряд психических заболеваний, опосредованных тяжелыми стрессорными воздействиями, или значительно увеличивающих активность ГАС и, соответственно, повышающих секрецию КЛ и глюкокортикоидов, оказывает существенное влияние на репродуктивные функции у мужчин. К таким заболеванием относится депрессия и ПТСР. Депрессия характеризуется устойчивым повышением уровня кортизола в крови за счет нарушения регуляции ГГАС по механизму отрицательной обратной связи (Mikulska et al., 2021), а развитие ПТСР связано с сильным психотравматизирующим событием (Kéri, 2022).

С этой точки зрения интересно исследование, которое было направлено на изучение патологического влияния психологического стресса на фертильность у мужчин (Bhongade et al., 2015). В этом исследовании оценивали влияние психологического стресса на уровень мужских гормонов и качество спермы у партнеров-мужчин в бесплодных парах. Семьдесят партнеров-мужчин бесплодных пар были оценены на предмет уровня психологического стресса с использованием опросника по шкале оценки тревожности и депрессии (HADS), уровня общего тестостерона в сыворотке крови, ЛГ и ФСГ. 27% мужчин имели уровень тревожности и депрессии по шкале HADS ≥8 (ненормальный показатель HADS). У людей с ненормальными показателями тревожности по опроснику HADS уровень общего тестостерона в сыворотке был ниже, а уровень ФСГ и ЛГ в сыворотке выше, чем у людей с нормальными показателями по данному опроснику. Общий тестостерон в сыворотке отрицательно коррелировал с уровнем напряжённости, но ЛГ и ФСГ коррелировали положительно. Количественные показатели сперматозоидов, такие как подвижность и число морфологически нормальных сперматозоидов, были ниже у лиц с патологическими показателями тревожности. Количество сперматозоидов положительно коррелировало с показателями общего тестостерона и отрицательно с ФСГ и ЛГ. Аномальная подвижность и морфология сперматозоидов были связаны с более низким уровнем тестостерона и более высокими уровнями ЛГ и ФСГ. Исследователи сделали вывод, что психологический стресс в первую очередь снижает уровень общего тестостерона в сыворотке со вторичным повышением уровней ЛГ и ФСГ в крови, что, в свою очередь, изменяет качество сперматозоидов. Всё это показывает насколько стресс отрицательно влияет на показатели фертильности у мужчин, а в последствии может оказывать негативное действие и на здоровье детей.

1.5. Влияние стресса отца на физиологические функции потомства.

Стресс в раннем возрасте является хорошо установленным фактором риска развития различных заболеваний на протяжении всей жизни, в том числе нервно-психических расстройств. Стресс охватывает различные функциональные системы, которые нарушают гомеостаз организма и приводят к физиологическим и/или поведенческим реакциям (McEwen, 2000). У людей стрессоры могут инициировать метаболические проблемы (например, голод), иммунные проблемы (например, болезнь) и воспринимаемые психологические угрозы (например, социальные/эмоциональные расстройства). Поскольку воздействие стресса передается от родителей к потомству, был предложен термин “передача из поколения в поколение” (Kengel et al., 2016). Во время беременности материнский стресс изменяет материнскую среду, что может прямо или косвенно повлиять на развитие плода (Bale, 2016; Weinstock, 2006).

В последние время выяснилось, что влияние отца на психическое и физическое состояние потомства также крайне важно. Причём, как показывают данные последних исследований, большое значение имеет влияние окружающей среды на отца не только в ближайший период до рождения ребёнка, но и состояние здоровья и поведенческие особенности в молодости и даже в раннем детстве.

Ретроспективные эпидемиологические исследования предоставили убедительные доказательства связи воздействия неблагоприятных факторов в течение жизни мужчин с риском развития различных заболеваний в последующих поколениях. Исследования с использованием показателей рождаемости и записей о поставках продовольствия во время шведского голода в 1836 году является первым заявлением о влиянии мужчин на здоровье последующих поколений потомков. Эти исследования установили связь между питанием в раннем детстве у лиц мужского пола с измененными показателями здоровья, включая риск заболеваний и продолжительность жизни у их сыновей и внуков (Kaati et al., 2007).

Другие клинические исследования показывают, что риск заболеваемости сердечно-сосудистой патологией и сахарным диабетом напрямую зависит от того, насколько часто потомки с отцовской стороны недоедали в своё время. Ожирение с отцовской стороны, даже в прошлом, увеличивает риск развития избыточной массы тела у ребёнка, как во внутриутробном периоде, так и в будущей жизни. (Pembrey et al., 2006; Kaati et al., 2002).

Ретроспективное исследование здоровья родителей детей с нарушением развития центральной нервной системы и другими отклонениями показало, что у многих детей с аутизмом и тяжёлым нарушением процесса внимания отмечались сильные стрессовые воздействия в анамнезе отцов (Sood et al.,2018).

Имеются также экспериментальные исследования, посвящённые воздействию стрессовых факторов, перенесённых отцом, на состояние здоровья потомства, которые показали непосредственное влияние стресса отца на потомков не только первого, но и второго поколения (Franklin et al., 2010). Длительный отъём от матери мышат-самцов в период от первых суток и до двух недель вызывал депрессивно-подобный фенотип у потомков этих особей. В исследованиях других авторов, проведенных на половозрелых мышах, получены сходные данные, но с использованием парадигмы «стресс социальных поражений» (Dietz et al., 2011).

Однако, данные, полученные в эксперименте весьма противоречивы. Так в исследовании, проведённом на мышах, как самцах, так и самках, показали сильное влияние перенесённого родителями стресса в прегестационном периоде на поведение потомства (He et al., 2016). В этом исследовании взрослых мышей-самцов и самок подвергали иммобилизационному стрессированию в течение 60 дней перед спариванием с партнерами, подвергавшимися или не подвергавшимися стрессу. Потомство первого поколения проверяли на уровень тревожности или спаривали для получения потомства второго поколения. Как самки первого

поколения, так и самцы от матерей и/или отцов, подвергавшихся стрессу, показали значительно меньшую тревожность и уровень кортикостерона в сыворотке крови, а также повышенные уровни мРНК глюкокортикоидного рецептора и нейротрофического фактора мозга по сравнению с потомством от не подвергавшихся стрессу родителей. Подобные поведенческие и молекулярные изменения наблюдались также у самок и самцов второго поколения. В исследованиях Rodgers с коллегами (Rodgers et al., 2013) также было выявлено снижение стрессорной активности ГАС у потомков самцов мышей, которых подвергали хроническому умеренному стрессу на протяжении всего периода сперматогенеза.

Существуют и некоторые другие исследования, данные которых получены в ходе эксперимента, и которые очень часто противоречат друг другу. Одни авторы указывают что стрессовое влияние на отца способно оказывать ингибирующее действие на стрессовый выброс кортикостерона у потомков обоих полов, но не на поведение потомков (Olff, 2017). Другие исследователи дают зеркально противоположные данные, утверждая, что стрессирование отцов (самцов мышей) влияет как на поведение потомков, так и на уровень выброса глюкокортикоидных гормонов (Dietz et al.,2011). Вероятно, подобные противоречия связаны с использованием различных стрессовых парадигм.

Травматический стресс в раннем возрасте увеличивает риск когнитивных и психоневрологических расстройств в более позднем возрасте. Такой ранний стресс также может повлиять на потомство, вероятно, через эпигенетические механизмы (Chen et al., 2017). Есть множество исследований, проведённых на мышах, которые показывают, что у потомков самцов, подвергшихся постнатальному стрессу, снизилась экспрессия генов, кодирующих белки, необходимые для синаптогенеза, и, как результат, у животных изменилась синаптическая пластичность во взрослом возрасте. Долговременная память у таких особей снижается, а депрессивные процессы в долговременной перспективе усиливаются в гиппокампе, и эти дефекты

связаны с нарушением долговременной памяти как у подвергшихся воздействию отцов, так и у их потомков. Специфическая для мозга изоформа протеинкиназы С является одним из затронутых сигнальных компонентов в гиппокампе. Ее экспрессия снижается у потомства, а метилирование ДНК на ее промоторе изменяется как в гиппокампе потомства, так и в сперме отцов. Эти результаты предполагают, что постнатальный травматический стресс у мужчин может влиять на пластичность мозга и когнитивные функции у взрослых потомков, возможно, через эпигенетические изменения в сперматозоидах.

Существуют также исследования, где предпринимались попытки выявить влияние стресса отца до зачатия на способность к обучению их потомков. Однако данные, полученные в этих исследованиях, также весьма противоречивы. Yeshurun с коллегами показали, что длительное введение с питьем самцам мышей кортикостерона с целью моделирования хронического стресса нарушает процесс реконсолидации памяти только у потомков-самок при тестировании пространственной памяти в водном лабиринте Морриса (Yeshurun et al., 2017). Другие авторы, используя хроническое умеренное стрессирование самцов крыс в течение 27 дней (ежедневная иммобилизация в условиях повышенной освещенности в течение 30 мин дважды в день), не выявили изменений в обучении в аналогичном тесте у их потомков самцов и самок (Harker et al., 2018).

Ещё одно исследование, показавшее что стрессы, испытываемые родителями, могут влиять на поведенческое развитие их потомства, было проведено на представителях трехиглой колюшки (вид, в котором самцы являются единственными особями, ухаживающими за потомством). Данное исследование (Bell et al.,2016) доказало факт того, что, когда родители подвергаются воздействию экологически значимого стрессора (риска хищничества), отмечаются последствия для потомства. Например, самки колюшки, подверженные риску нападения хищников, производят яйца с более высокими концентрациями кортизола, гормона стресса, а потомство в

последствии появляется с измененным поведением и физиологией. Самцы колюшки, подверженные риску нападения хищников, дают потомство более активное и демонстрирующее значительно рискованное поведение. Точные механизмы, с помощью которых материнский и отцовский опыт влияет на фенотип потомства, изучаются и могут включать воздействие стероидных гормонов, обонятельные сигналы и/или поведение родителей. Как и у других видов, некоторые из последствий подверженности родителей риску нападения хищников для потомства колюшки могут быть адаптивными, но зависят от фактора стресса, безопасности факторов окружающей среды для родителей и потомства, а также эволюционной истории популяции.

Следует отметить, что исследования, выполненные на лабораторных животных (крысы и мыши), где изучались последствия стресса отца для потомков, проведены в основном с использованием хронических стрессов, которые не только создают повышенный уровень глюкокортикоидных гормонов в крови, но и ряд из этих стрессоров служат моделями депрессии, например, «стресс социальных поражений» или хронический умеренный стресс (Hollis et al., 2014; Czén et al., 2016). В отличие от депрессии, для клинической картины которой характерно не только повышение уровня глюкокортикоидных гормонов в крови, но и снижение чувствительности ГАС к сигналам отрицательной обратной связи (Pariante, Lightman , 2008), развитие ПТСР, хотя и связано с сильным стрессорным воздействием, в отличие от депрессии характеризуется иным профилем активности ГАС, заключающимся не только в снижении базальной активности, но и в повышенной чувствительности к сигналам отрицательной обратной связи (Andreasen, 2011). Такое состояние отцов перед зачатием может специфическим образом проявляться у их потомков. Однако экспериментальных исследований влияния ПТСР отца на физиологические функции потомков не проводили. Тем не менее, необходимость проведения исследований влияния ПТСР отца на состояние здоровья потомков, а также

выявление механизмов такого влияния диктуется современным состоянием общества.

В боевых действиях в основном участвуют лица мужского пола. В последнее время, с увеличением числа терактов, количества горячих точек по всему миру, а также природных катастроф, отмечается учащение развития ПТСР в человеческой популяции, что обуславливает повышение внимания научного мира к этой проблеме. Причём ПТСР характеризуется намного более серьёзными последствиями для организма, чем влияние других разновидностей хронического стресса.

Отмечено что ПТСР в современном социуме может встречаться от 2,5 до 16% случаев, в зависимости от сопутствующих условий (Sood et al., 2018). Данная разновидность стрессового воздействия несёт с собой сложные психические расстройства, характеризующиеся развитием стойкого состояния плохого настроения, которое сопровождается потерей интереса или удовольствия, чувством вины или низкой самооценкой и нарушение сна и/или аппетита (Sadowska-Krępa et al., 2017). Кроме того, у таких людей отмечается нарушение работы сердечно-сосудистой системы, желудочно-кишечного тракта, а также репродуктивной системы (Виноградова и др.,2017).

В тоже время влияние ПТСР на мужскую репродуктивную функцию, а также на потомство, к сожалению, очень мало изучено. Существует предположение, что в популяции, перенесшей ПТСР, намного чаще встречаются случаи рождения детей с психическими отклонениями, а также с патологиями других органов и систем. Так, в западном научном мире широко известны исследования, проведённые на выборках потомков, переживших Холокост (Lehrner et al., 2014; Yehuda et al., 2007). В ходе проведения серии исследований крови участников, учёные обнаружили более низкий уровень кортизола и повышенную активность ГАС как у переживших посттравматическое стрессовое расстройство, так и у следующего поколения, которое само по себе воздействию травматического стресса не подвергались.

Однако, такой профиль активности ГАС был характерен только для потомков матерей, болевших ПТСР, но не отцов, потомки которых, напротив, демонстрировали признаки ослабления регуляции ГАС по механизму отрицательной обратной связи (Lehrner et al., 2014), что свидетельствует о дифференциальном влиянии психотравматизирующих событий на отца или мать в отношении активности ГАС их потомков.

Интересно исследование, посвящённое связи уровней кортизола, норадреналина и адреналина с посттравматическим стрессовым расстройством, вызванным войной, у отцов и их детей (Yahyavi et al.,2015). Из 168 добровольцев, принявших участие в исследовании, 167 согласились на забор крови. Участники обеих групп ветеранов (A и C) были среднего возраста и в раннем взрослом возрасте подверглись посттравматическому стрессу, связанному с участием в военных действиях. Участники исследования подбирались так, чтобы между ними не было явных различий в продолжительности и тяжести военного участия, разницы в образовании, росте, весе, наличие медицинских проблем или наличие сопутствующих психических заболеваниях. Тяжесть посттравматического стрессового расстройства в группе A была умеренной на основании самооценки шкалы тяжести посттравматического стрессового расстройства, связанного с боевыми действиями. Участники обеих групп потомства (B и D) в среднем находились в подростковом возрасте. Не было значительных различий между двумя группами по росту, весу, медицинским проблемам, сопутствующим психическим заболеваниям или интервалу между отцовской травмой и рождением ребенка. При ретроспективном анализе была выявлена значительная разница в уровнях кортизола в сыворотке крови, забранной для анализа после принятия пищи, между потомками ветеранов с нынешним или прошлым анамнезом посттравматического стрессового расстройства, связанного с боевыми действиями, и потомками ветеранов, которые не страдали посттравматическим стрессовым расстройством ранее. Результаты согласуются с исследованиями, в которых сообщается о более низких

уровнях кортизола в сыворотке у потомков пациентов с посттравматическим стрессовым расстройством по сравнению с потомками пациентов, не страдающих посттравматическим стрессовым расстройством, и нормальными уровнями адреналина и норадреналина в покое.

Мы только начинаем понимать сложные механизмы, с помощью которых половые клетки, такие как сперматозоиды, могут передавать информацию об окружающей среде потомству и как это может влиять на риск депрессии и тревоги у нескольких поколений. Однако имеющиеся на данный момент исследования уже дают общее представление относительно того как эпигенетические изменения вследствие отцовского стресса могут опосредовать передачу стрессовых фенотипов от поколения к поколению, и указывается на несколько новых тем. В новейшем исследовании, обобщающие данные которого вышли в 2021 году, было выведено три закономерности такой передачи (Cunningham et al., 2021). Во-первых, возраст отца на момент воздействия стрессового фактора чрезвычайно важен с точки зрения влияния на характер передачи стресса потомству. Поскольку развитие первичных сперматозоидов происходит в раннем возрасте, ранний возраст является более критичным с точки зрения влияния стрессовых факторов на потомство. Во-вторых, тип отцовского стресса (социальный или несоциальный), который переживается, оказывает сильное влияние на характер передачи поведенческих изменений, наблюдаемых у потомства. Важно отметить, что социальные и несоциальные стрессоры, вероятно, связаны с различными молекулярными путями и нервными цепями в мозге, как показали более ранние исследования, которые использовали авторы в качестве ориентира. Кроме того, было показано, что социальный стресс и несоциальный стресс по-разному влияют на депрессию и тревожное поведение. В-третьих, имеющиеся на сегодняшний день данные показывают, что потомство женского пола менее чувствительно к воздействию стрессовых факторов на родителей в прегестационном периоде, чем потомство мужского пола. Однако необходимы дополнительные

исследования на потомстве женского пола, чтобы более точно оценить эту теорию. Хотя в этой области достигнут прогресс в понимании того, как отцовский опыт влияет на потомство, остается мало причинно-следственных данных, напрямую связывающих эпигенетические изменения в половых клетках с поведенческими фенотипами потомства. Также мало известно о молекулярных процессах, посредством которых эпигенетические изменения в половых клетках влияют на определенные типы нейронов в головном мозге, и о том, как эти адаптации изменяют нейронные схемы, вызывая ненормальное поведение.

В качестве потенциальных эпигенетических механизмов передачи отцовских эффектов потомству обычно рассматривают такие механизмы как изменение паттернов метилирования ДНК, конденсация хроматина и некоторые другие (Sharma , 2013; Xavier et al., 2019). Также важную роль, вероятно, играют регуляторные некодирующие РНК, как длинные, так короткие (Morgan et al., 2019; Yan , 2014). Такая эпигенетическая модификация генома с большей вероятностью может осуществляться только в зреющих сперматозоидах на стадиях от сперматогониев до сперматид (Ly et al., 2015).

Малые некодирующие РНК являются потенциальными медиаторами взаимодействия генома с окружающей средой. Зрелые сперматозоиды у млекопитающих изобилуют малыми РНК разных классов, в связи с чем этот тип молекул рассматривается как один из наиболее вероятных механизмов, обеспечивающих трансгенерационное влияние отцовского стресса на потомство (Duffy et al., 2021; Jodar et al.,2013; Chen et al., 2016). МикроРНК играют важнейшую роль в регуляции экспрессии большого числа генов, действуя в основном на пост-транскрипционном уровне, хотя не исключают возможность их воздействия на структуру хроматина, и, следовательно, транскрипционную активность генов. МикроРНК регулируют различные процессы в эмбриональный период развитии и дифференцировки, а продукты некоторых генов, регулируемых микроРНК, играют определенную роль в

процессах сперматогенеза (Meng et al., 2015; Yuan et al., 2016; Guo et al., 2017; Kamalidehghan et al., 2020). Важно, что измененный паттерн экспрессии микроРНК в сперме может быть передан потомству (Godia et al., 2018).

В исследованиях Rogers с коллегами (Rodgers et al., 2013) было выявлено повышение экспрессии 9 микроРНК в сперматозоидах самцов мышей, перенесших хронический переменный стресс. Причем такое повышение экспрессии микроРНК наблюдалось независимо от того, в какой период развития (пубертатный период или взрослые животные) применялось воздействие. Сходные данные были получены и в исследованиях Short с коллегами (Short et al., 2016), в котором самцам мышей на протяжении периода, соответствующего продолжительности сперматогенеза, вводили кортикостерон. Эти авторы выявили повышение экспрессии трех микроРНК в сперматозоидах самцов в результате хронического введения кортикостерона. Gapp с соавторами (Gapp et al., 2014), исследовав **с** помощью секвенирования следующего поколения экспрессию микроРНК в сперме взрослых мышей, подвергнутых длительному отъему от матери, обнаружили повышение в ней 5 микро РНК. Принципиальная возможность влияния микроРНК, введенных в зиготу, на фенотип потомков, была доказана в работе Rodgers с соавторами (Rodgers et al., 2015).

Приведенные выше результаты работы указывают на принципиальную возможность влияния стресса отца до зачатия на функции потомков и демонстрируют значимость нарушения экспрессии микроРНК в сперме таких отцов для здоровья потомков. В связи с тем, что, как было упомянуто выше, основные результаты о влиянии стресса отца на потомков были получены в условиях хронического повышения уровня глюкокортикоидов в крови отцов перед зачатием, в своем исследовании мы использовали стрессорные воздействия на самцов отцов, которые моделируют не только депрессию, но и ПТСР. Поэтому стоит отдельно остановиться на методах моделирования депрессии и ПТСР в экспериментах на лабораторных животных.

1.6. Моделирование ПТСР и депрессия в эксперименте

Моделирование психопатологий в эксперименте является важной составляющей исследования механизмов патогенеза заболеваний и разработки способов лечения (Cohen, Yehuda, 2011). Воздействие травмы является провоцирующим фактом для развития ПТСР и может влиять на ключевые нервные структуры, провоцируя нарушения эндокринной системы и её регуляции (Ollf et al., 2006). В последнее время все большее внимание уделяется выявлению факторов, объясняющих индивидуальные различия в реакции на травму, таких как генетические и социальные факторы, процессы развития мозга, совокупные биологические и психологические последствия раннего детства и другие стрессовые события в жизни.

Разработка животных моделей ПТСР, связанных с травматическим стрессом, является важной частью понимания нейробиологического процесса заболевания. ПТСР включает в себя набор изменений когнитивных функций и настроения (Bisson, Cosgrove, 2015). ПТСР ассоциируется с разрушительной совокупностью симптомов, возникающих в результате постоянного и длительного воздействия травматических событий, которые прямо или косвенно вызывают стресс (Stein et al.,2014). ПТСР может характеризоваться клинически значимыми социальными нарушениями, неспособностью работать или снижением способности выполнять повседневные функции (Stratyner et al., 2018). Психопатология и патофизиология ПТСР связаны с глубоко укоренившимися чувствами или воспоминаниями о травматическом событии, которые остаются яркими. Воспоминания не просто не исчезают со временем, но и могут задерживаться или даже усиливаться с годами (Iribarren et al., 2005). Эти эффекты могут быть связаны с прогрессирующим повреждением ЦНС, которое способствует развитию хронического ПТСР.

Одним из клинических симптомов ПТСР является нарушение регуляции ГАС, что проявляется в снижении уровня глюкокортикоидных гормонов в крови (хотя и не у всех больных) и усиление чувствительности

этой гормональной оси к сигналам отрицательной обратной связи (Yehuda.,2009). Модели животных должны учитывать симптомы ПТСР, которые наблюдаются в клинической практике, включая повышенную тревогу и депрессивное настроение, длительное воспоминание о травме и изменение активности ГАС (Ursano et al., 2007).

В литературе описаны различные модели ПТСР, в том числе экспозиция хищнику (Cohen et al., 2003) или моче хищника (Tseilikman et al., 2021) , водно-иммерсионное воздействие (Richter-Levin, 1998), неизбегаемый электрокожное воздействие (Foa et al., 1992), линейные и трансгенные животные (Gass et al., 2001). Antelman была предложена модель ПТСР «стресс-рестресс» (Antelman, 1988). Суть этой модели заключается в том, что вне зависимости от модальности фактора, опасного для жизни, стрессорные воздействия усиливали реакцию на такой же или более слабый стимул, даже предъявляемый спустя длительное время после первоначального травматического воздействия. Патологическое состояние, формируемое у животных в данной модели, проявляется на разных уровнях и включает когнитивный дефицит (Harvey et al., 2003), повышенную тревожность (Harvey et al., 2006), изменение концентрации различных нейромедиаторов (Antelman et al ., 1991), нейроэндокринные и иммунные реакции (Antelman et al., 1991; Liberzon et al., 1997).

В последствие была предложена другая модель ПТСР, названная «одиночный пролонгированный стресс», которая по сути являлась модификацией модели «стресс-рестресс» (Beckham et al., 2021). Эта модель получила наибольшее распространение, хотя она и не в полной мере удовлетворяет критериям правомерности (Yehuda, Antelman ,1993), так как не учитывает длительного характера течения заболевания. Следует отметить, что большинство используемых моделей такое клиническое проявление ПТСР не охватывает. Отмечено, что у крыс, как правило, к месячному сроку патологическое состояние, формирующееся в моделях ПТСР, исчезает (Brewin, 2007).

Депрессия представляет собой наиболее распространенное психиатрическое состояние во всем мире, при котором у пациентов проявляются такие симптомы, как подавленное настроение, ангедония, утомляемость, изменения веса и суицидальные настроения (Kessler et al., 2005; Richter-Levin, Xu ,2018). До настоящего времени моделирование на животных играет существенную роль в изучении механизмов депрессии и поиску эффективных терапевтических мишеней для лечения данного заболевания. Исследования показали, что около 40-50% случаев депрессии опосредуются генетическими факторами (Flint, Kendler, 2014).

Для моделирования депрессии у лабораторных животных используют в основном воздействия, связанные со стрессом, и оценивают поведение ангедонии, беспомощности, мотивации и отчаяния как поведенческие особенности (Uliana et al., 2022).

Наибольшее распространение получила модель депрессии, названная «хронический умеренный стресс» (англ. chronic mild stress). В этой модели, используемой в основном для грызунов (крысы и мыши), животное подвергают на протяжении месяца ежедневным стрессорным процедурам, например, депривация сна, содержание в клетке с мокрыми опилками, скученность и т.д. (Antoniuk et al., 2019). Еще одной моделью депрессии является выработка состояния «выученная беспомощность» (Maier , Seligman ,2016). Данное состояние у животных проявляется в низком намерение убежать в среде неконтролируемой и непредсказуемой травмы. «Выученная беспомощность» помимо снижения ориентировочно-исследовательской активности и усиления депрессивно-подобного поведения, характеризуется повышенным уровнем глюкокортикоидных гормонов в крови и снижением чувствительности ГАС к сигналам отрицательной обратной связи на протяжении около двух недель (Czén et al.,2016). Распространение получила такая модель депрессии как «стресс социальных поражений», используемая у мышей (Коваленко и др., 2010; Hollis et al., 2014). В качестве модели

депрессии предлагается и стрессорное воздействие, связанное с длительным отъемом от матери в неонатальный период развития (Schmidt et al., 2011).

У депрессивных животных существует несколько взаимодействующих изменений в отношении нейромедиаторов и нейрогормонов. Нарушение регуляции некоторых нейромедиаторов вызывают нейробиологические нарушения которые могут наблюдаться у пациентов с депрессивными расстройствами. (Hill et al.,2012; Belujon , Grace ,2017). Например, хронический умеренный стресс вызывает у грызунов изменения, связанные с ангедонией, отсутствием мотивации и снижением активности дофаминовой системы (Antoniuk al., 2019; Willner et al., 1987), а выученная беспомощность характеризуется гиперактивостью кортиколибернергической системы гипоталамуса (Mironova et al., 2013).

Для моделирования ПТСР у самцов крыс мы использовали парадигму «стресс-рестресс», в которой основным воздействием служит травматический комбинированный стресс с последующим дополнительным стрессированием (рестрессс) через 6 сут, но более слабым и менее продолжительным. Рестресс служит триггером для развития стойкого ПТСР-подобного состояния, сопровождающееся снижением уровня кортикостерона и усилением чувствительности ГАС к сигналам отрицательной обратной связи не менее 20 дней (Ordyan et al., 2014). В качестве модели депрессии использовали парадигму «выученная беспомощность», где самцов подвергали часовой электро-кожной стимуляции в режиме неизбегаемости и неконтролируемости. Такое воздействие создает не только повышенный уровень кортикостерона в крови, но и нарушает регуляцию ГАС по механизму отрицательной обратной связи на протяжении не менее 10 дней (Пивина и др., 2016). В обоих парадигмах, по сути, используется однократное сильное стрессорное воздействие, что позволяет дифференциально учитывать влияние уровня кортикостерона в крови самцов в процессе сперматогенеза на различные физиологические функции их половозрелых потомков.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Характеристика экспериментальных животных.

Опыты выполнены на половозрелых самцах крыс 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. Животных содержали в стандартных условиях вивария без ограничения доступа к воде и пище (гранулированный корм) и 12-часовом световом режиме. 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. Количество самцов, использованных для моделирования ПТСР или депрессии, количество контрольных самцов и интактных самок, а также количество их потомков, участвовавших в экспериментах, указано в соответствующим разделах.

2.2. Моделирование ПТСР и депрессии у самцов крыс.

2.2.1. Модель ПТСР «стресс-рестресс»

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. Иммобилизационный стресс заключался в ограничение подвижности животных путем их помещения в пластиковые пеналы размером 20x7x6 см. Вынужденное плавание проводили в заполненных водой (t=24ºC) стеклянных цилиндрах высотой 70 см и диаметром 30 см. После 15- минутного перерыва, животных подвергали эфирному стрессу до потери сознания путем экспозиции диэтиловому эфиру (Нева реактив, Россия) в течение примерно 1 мин. Затем крыс помещали обратно в клетки. Триггером для развития стойкого ПТСР-подобного состояния являлся рестресс, заключавшийся в 30-мин иммобилизацации в

пластиковых пеналах через 7 дней после комбинированного стресса. Контрольная группа самцов оставалась интактной.

Для контроля развития ПТСР-подобного состояния у контрольной и подопытной групп самцов на 10 сут после рестресса из хвостовой вены отбирали пробы крови в покое, в которых определяли уровень кортикостерона. Пробы крови центрифугировали (1000 x g, 20 мин, +4^{0}С) и далее плазму хранили при температуре –20^{0}С до момента определения содержания в ней кортикостерона. Дополнительно в данных пробах определяли уровень тестостерона. В последующем исследовании принимали участие только те самцы, у которых базальный уровень кортикостерона в крови был ниже, по сравнению с контрольной группой.

2.2.2. Модель депрессии «выученная беспомощность»

В качестве экспериментальной модели депрессии использовали парадигму «выученная беспомощность». Крыс подвергали неизбегаемому и неконтролируемому болевому электрокожному раздражению в камерах размером 13x16x26 см с токопроводящим полом, 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 (Seligman and Maier, 1967; Sonoda and Hirai, 1993; Henkel et al., 2002). Промежуток между ударами варьировал от 15 до 45 с, что создавало неуправляемость ситуации, что приводила к развитию состояния выученной беспомощности. При этом нарушения, наблюдаемые в физиологических и поведенческих показателях таких животных, аналогичны симптомам людей с депрессией (LoLordo, 2001). Контрольные самцы были помещены в ту же камеру на 1 час, но они не подвергались электро-кожным раздражениям.

Для контроля развития депрессивно-подобного состояния у контрольной и подопытной групп самцов на 10 сут после электрокожного раздражения из хвостовой вены отбирали пробы крови в покое, в которых

определяли уровень кортикостерона. Пробы крови центрифугировали (1000 x g, 20 мин, +4^{0}C) и далее плазму хранили при температуре –20^{0}C до момента определения содержания в ней кортикостерона. Дополнительно в данных пробах определяли уровень тестостерона. В последующем исследовании принимали участие только те самцы, у которых базальный уровень кортикостерона в крови был выше, чем у контрольной группой животных.

2.3. Изучение состояния семенников самцов с ПТСР-подобным или депрессивно-подобным состоянием.

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 (см. 2.8). Семенники и надпочечники взвешивали. Пробы крови центрифугировали (1000 x g, 20 мин, +4^{0}C) и далее плазму хранили при температуре –20^{0}C до момента определения содержания в ней кортикостерона и тестостерона. В каждой группе животных было по 5 самцов.

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

Самцов подопытных и контрольной группы 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. Стадию эстрального цикла определяли по характеру окрашенных азур-эозином вагинальных мазков. Наступление беременности контролировали по наличию сперматозоидов в вагинальном мазке. В случае если беременность не наступала, самцов

оставляли с самками еще на один эстральный цикл. Самок, у которых в вагинальном мазке обнаруживали сперматозоиды, сразу 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. Пометы с преобладанием крысят одного пола или с малым количеством животных из исследования исключали.

Полученное потомство содержали совместно с самками до 30-дневного возраста, а затем в группах по 4-5 животных в соответствие с полом и пометом. При организации групп для последующих экспериментов отбирали по 2 животных из помета. В эксперименты брали самцов в возрасте 2,5 мес и весом 230-250 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. Перед началом тестирования крыс подвергали ежедневному взятию в руки в течение 10 дней. У самок такую процедуру совмещали с исследованием вагинальных мазков, по характеру которых определяли стадию эстрального цикла. В экспериментах использовали только регулярно циклирующих самок, тестирование которых проводили в стадию диэструс в каждом из поведенческих тестов.

В каждой серии экспериментов использовали 5 контрольных и 5 стрессированных самцов, а также 20 самок. В каждой серии экспериментов было получено 10 пометов от контрольных самцов, 8 пометов от самцов с ПТСР-подобным состоянием и 8 пометов от самцов с депрессивно-подобным состоянием (по 2 самца в каждой подопытной группе покрыли по одной самке).

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.

2.5. Оценка соматического развития 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.

2.6. Методы изучения функций ГАС

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). Полученные пробы крови центрифугировали (2500 об/мин, 10 мин, 4°С) и далее плазму хранили при температуре –20°С до момента определения содержания в ней кортикостерона. Оценку активности ГАС проводили с 11-00 до 14-00 ч. Каждая группа контрольных и подопытных крыс состояла из 6 животных соответствующего пола.

2.7. Методы изучение поведения и памяти

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»), 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».

Эксперименты начинали с выполнения теста «приподнятый крестообразный лабиринт», как наименее стрессогенного. Затем крыс тестировали в тесте «открытое поле», которое совмещали с тестом «распознавание нового объекта». Далее крыс тестировали в тесте «вынужденное плавание», и на следующий день проводили выработку реакции пассивного избегания, которую осуществляли в течение трех недель. Затем животных выводили из эксперимента. Самок начинали тестировать в стадию диэструс, в связи с тем, что уровень тревожности, депрессивно-подобное поведение и способность к обучению зависит от содержания в крови половых стероидных гормонов - прогестерона и эстрадиола (Taxier et al., 2020; Blair et al., 2022; Hiroi, Neumaier, 2006; Koebele et al., 2021).

В этих тестах каждая подгруппа животных каждого пола состояла из 10 особей.

2.7.1. Исследования уровня тревожности в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт»

Тест «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ), который дает возможность охарактеризовать уровень тревожности животных, основан на боязни открытого пространства и высоты у грызунов (Pellow et al., 1985). ПКЛ состоял из 2 открытых (10х50 см) и 2 закрытых рукавов без крыши (10х50х40см), имеющих входы в открытые рукава (10х20 см). Лабиринт располагался на высоте 75 см над уровнем пола. Время, проведённое крысой в открытых рукавах лабиринта, служило основным показателем тревожности в этом тесте. При проведении теста фиксировали время пребывания в открытых и закрытых рукавах лабиринта в течение 5 минут. Чем меньше промежуток времени, проведённый животным в открытых рукавах ПКЛ, тем выше уровень тревожности. После каждого тестирования пол лабиринта протирали

слабым спиртовым раствором для уничтожения меток и запаха, оставленных предыдущим животным.

2.7.2. Изучение ориентировочно-исследовательского поведения в тесте «открытое поле»

Тест «открытое поле», признан наиболее адекватным методом мониторинга локомоторной и исследовательской активности, а также эмоциональности животных (Маркель и др., 1988; Belzung, 1999). Открытое поле представляет собой четырёхугольную камеру размером 90×90 см со стенками высотой 45 см. В центре поля на высоте 50 см помещали источник света (150 лк). Надо отметить, что дополненное световым стимулом «открытое поле» усиливает эффект стресса новизны обстановки, поскольку грызуны инстинктивно боятся открытых освещённых пространств. Пол камеры был расчерчен на квадраты 15×15 см. Крысу помещали в центр арены и в течение 5 минут регистрировали количество пересечённых квадратов (горизонтальная двигательная активность, или локомоторная активность), число вставаний на задние лапы, т.е. число вертикальных стоек (исследовательская активность), длительность реакции груминга, время замирания (отсутствие каких-либо поведенческих реакций) и число дефекаций (проявление эмоционального возбуждения в условиях новый обстановки). После каждого тестирования пол камеры протирали слабым спиртовым раствором.

2.7.3. Исследование депрессивно-подобного поведения в тесте «вынужденное плавание»

Тест «вынужденное плавание» выполняли два дня. В первый день крыс индивидуально помещали в стеклянные цилиндры (55х20 см), 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.

2.7.4. Методы изучения памяти крыс

Для изучения влияния ПТСР-подобного или депрессивно-подобного состояния отца перед спариванием на память их половозрелых потомков самцов и самок использовали два теста: «распознавание нового объекта» и «реакция пассивного избегания».

2.7.4.1. Исследование памяти распознавания

Для изучения памяти распознавания использовали тест «распознавание нового объекта» (РНО). Этот тест основан на естественном для грызунов стремлении исследовать нового объекта (предпочтении новизны) (Cohen, Stackman, 2015). Тест проводили в установке «открытое поле». После 5 мин тестирования животного в установке (см. п. 2.5.2.), что способствовало привыканию к ней и снижению стрессорного воздействия на поведение крыс, на следующий день в установку помещали два объекта, различающихся по форме, и позволяли крысе их исследовать в течение 5 мин (фаза «ознакомления»). Зафиксировав время исследования каждого из них, грызунов помещали в домашнюю клетку. 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. Перед началом теста, для каждой последующей крысы, установку и объекты протирали слабым спиртовым раствором.

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).

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

2.7.4.2. Исследование памяти в тесте «реакция пассивного избегания»

Оборонительную реакцию пассивного избегания (РПИ) вырабатывали в экспериментальной установке, состоящей из двух отсеков: светлого отсека размером 50х50 см и темного отсека размером 15х15 см. Отсеки были разделены автоматически открывающейся 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.

2.8. Морфологическая оценка репродуктивной активности семенников

Семенники фиксировали в жидкости Буэна в течение 24 ч при комнатной температуре. Затем проводили стандартную гистологическую обработку ткани, которая заключалась в проводке материала через этиловые спирты возрастающей концентрации (70%, 80%, 96%, 96% по 1 ч) и через бутанолы (1 ч и ночь). Затем материал проводили через 4 порции ксилола (по 15 мин) и заливали в парафиновые блоки. Далее при помощи микротома изготавливали серии чередующихся срезов семенных желез во фронтальной плоскости толщиной 5–7 мкм, которые окрашивали гематоксилином-эозином. Морфологические исследования проводили с использованием системы, состоящей из светового микроскопа Olympus CX31 (Япония), цветной цифровой камеры VideoZavr Standard VZ-C31Sr и программного обеспечения Видеозавр Мультиметр 2.3 (разработка ООО “АТМ-практика”,

Санкт-Петербург) при общем увеличении ×4, ×20, ×40. Морфологические особенности строения семенных желез исследовали по следующим параметрам: количество извитых семенных канальцев в одном поле зрения и площадь поперечного сечения извитого семенного канальца; толщина сперматогенного эпителия извитого семенного канальца; количество клеток Сертоли в сперматогенном эпителии извитого семенного канальца и их площадь; количество разных видов сперматогенных клеток (сперматогоний, сперматоцитов и сперматид) в сперматогенном эпителии извитого семенного канальца, а также количество и площадь клеток Лейдига в участке интерстиция.

Клетка Сертоли содержит базальную часть, лежащую между начальными клетками сперматогенного ряда и апикальную часть, представленную многочисленными цитоплазматическими отростками, которые на препарате не различимы, т.к. маскируются сперматогенными клетками. В связи с этим показатель площадь клеток Сертоли, представленный в работе, это - площадь базальной части. Количество сперматоцитов учитывали только на стадии профазы. Такие сперматоциты являются крупными клетками, в ядрах которых хорошо виден рисунок хроматина. Сперматиды разделяются на ранние и поздние. Ранние сперматиды – клетки округлой формы со светлым ядром, лежащие в средних слоях сперматогенного эпителия. Мы учитывали только количество ранних сперматид. Образец среза извитого семенного канальца с обозначенными клеточным элементами представлен на рис. 3.

Учет сперматогенных клеток проводили только в тех извитых семенных канальцах, которые находились в одинаковой фазе развития сперматогенных клеток (VII-VIII) согласно рекомендациям (Hess, Moore, 1993). Измерения проводили в 20 поперечных срезах извитых семенных канальцев и окружающих их участках интерстициальной ткани, полученных от каждого самца.

Число аномальных сперматозоидов, выделенных из каудального эпидидимиса оценивали следующим образом. Эпидидимисы после извлечения немедленно помещали в сосуд с 1 мл питательной среды G-MOPS PLUS (Virtolife, Швеция) нагретый до 37^0С. На эпидидимисы скальпелем наносили продольный разрез и инкубировали в течение 10 мин при температуре 37^0С, позволяя сперматозоидам свободно всплыть. Взвесь сперматозоидов разводили 1:10, наносили на предметное стекло и окрашивали 5% раствором эозина. Шлифованным стеклом делали мазок, который высушивали и исследовали под световым микроскопом. К дегенеративным (патологическим) 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.

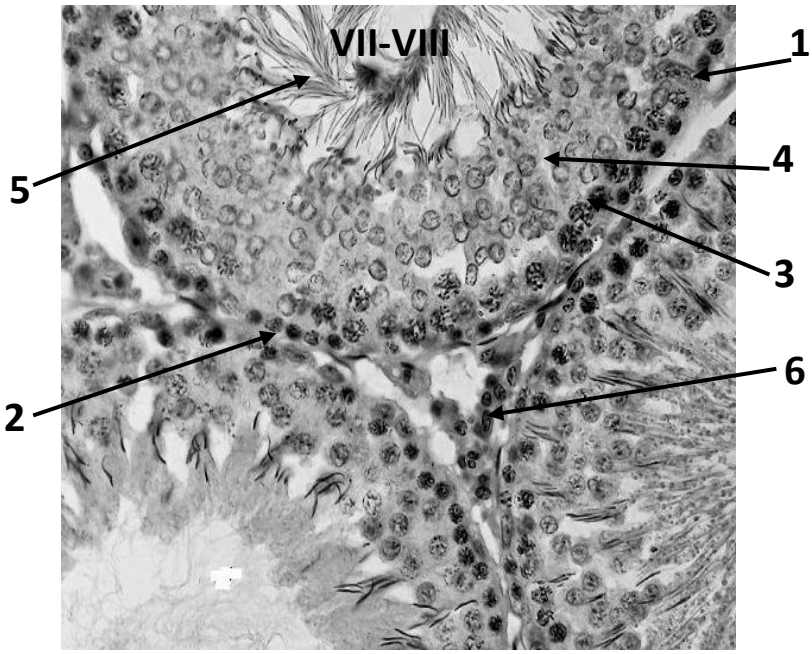


Рис. 3. Микрофотография среза семенников (окраска гематоксилином-эозином). 1 – клетки Сертоли; 2 – сперматогонии; 3 – сперматоциты; 4 – сперматиды; 5 - сперматозоиды; 6 – клетки Лейдига.

2.9. Метод изучения экспрессии генов *Igf2* и *Igf2r* в мозге потомков

Экспрессию генов *Igf2* (гиппокамп и неокортекс) и *Igf2r* (гиппокамп) изучали у отдельных групп потомков, рожденных от отцов с моделированием ПТСР или депрессии (n = 6 для каждой группы) или контрольных самцов (n= 6).

Крыс декапитировали, из черепной коробки извлекали мозг, из которого на льду выделяли гиппокамп и часть неокортекса, содержащую фронтальную и медиальную префронтальную области. Полученные области мозга помещали в пробирки с реагентом IntactRNA («Евроген», Россия) и хранили до выделения РНК при -80ºС. Кровь, собранную при декапитации, центрифугировали (2500 об/мин, 20 мин, +4^{0}С) и далее плазму хранили при температуре –20^{0}С до момента определения содержания в ней тестостерона или эстрадиола. 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 гена *Igf2* использовали набор зондов и праймеров (Rn01454518_m1, TaqMan® Gene Expression Assays, ThermoFisher Scientific, США). Для анализа экспрессии гена *Igf2r* была использована технология с интеркалирующим красителем (Eva Green) и олигонуклеотидные праймеры, синтезированные АлкорБио, Россия: прямой TTGCCCTCCAGAAACGGAAG, обратный TACACCACAGTTTCGCTCGT. Данные праймеры ранее были ранее использованы другими авторами (Yu et al. 2020). 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. В качестве внутреннего контроля использовали ген *Hprt1* (Rn01527840_m1, TaqMan® Gene Expression Assays, ThermoFisher Scientific, США). Относительный уровень экспрессии мРНК рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Исследования выполняли на приборе Real-Time PCR System 7500 (Applied Biosystems, США).

2.10. Иммуногистохимический метод определения экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в структурах мозга

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 быстро извлекали из черепной коробки и помещали в 4% раствор параформальдегида в 0,1М фосфатном буфере (pH 7.3) 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 АВС-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), средне- (0,1-0,25 ед. оптической плотности) и сильноиммунореактивные (0,25-0,5 ед. оптической плотности) клетки. Проанализировали общее число иммунореактивных клеток и число клеток каждого класса.

Для оценки индекса общей иммунореактивности (ОИр) использовали формулу:

$$1 \times n(3\ кл.) + 2 \times n(2\ кл.) + 3 \times n(1\ кл.) = ОИр,$$

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.

2.11. Метод определения стероидных гормонов в плазме крови

В плазме крови самцов-отцов и их потомках определяли уровни кортикостерона, тестостерона и эстрадиола с использованием стандартных наборов для иммуноферментного анализа («Хема-Медика», Россия), согласно

рекомендации производителя, и анализатор Multickan FS (Thermo Fisher Scientific, Финляндия). Перед началом определения плазму размораживали.

2.12 Методы статистической обработки данных

Статистическую обработку результатов проводили с использованием параметрических критериев ANOVA и *t*-критерия Стьюдента и пакета программ STATISTICA 12.0 и Excel 2013. Для проверки гипотезы нормальности распределения данных в выборках использовали критерий Шапиро-Уилка.

В связи с тем, что показатели тестов РПИ не соответствовали нормальному распределению, их приводили к нормальному распределению, логарифмируя по основанию 2. Далее для статистического анализа результатов РПИ использовали двухфакторный ANOVA для повторных измерений (день тестирования х группа животных) с последующими парными *post-hoc* сравнениями (тест Тьюки) результатов отдельных тестов. Для оценки межгрупповых различий в тесте РНО, результатов показателей экспрессии генов *Igf2*, *Igf2r* и уровня гормонов в плазме крови потомков применяли *t*-критерий Стьюдента.

Двухфакторный ANOVA (вес крысят в день тестирования х группа животных) использовали для оценки соматического развития крысят с последующими парными *post-hoc* сравнениями (тест Тьюки) значений веса тела крысят в каждый день постнатального онтогенеза.

Для анализа динамики стрессорной реактивности ГАС применяли двухфакторный ANOVA для повторных измерений (группа (отец) х уровень кортикостерона в зависимости от времени начала стрессирования) с последующими парными *post-hoc* сравнениями (тест Тьюки) значений уровня кортикостерона в каждой временной точке у отдельных групп животных. Результаты иммуноцитохимического исследования анализировали с применением однофакторного ANOVA с последующими парными *post-hoc* сравнениями (тест Тьюки) значений для каждой группы животных.

Результаты морфометрического анализа семенников, а также уровни кортикостерона и тестостерона в крови самцов отцов оценивали с использованием однофакторного ANOVA. При выявлении различий проводили последующие парные *post-hoc* сравнения (тест Тьюки). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Изменение репродуктивных функций самцов крыс в результате моделирования ПТСР или депрессии

Репродуктивные функции самцов крыс, у которых формировали ПТСР-подобное или депрессивно-подобное состояние, оценивали на основании мофрометрического анализа показателей извитых семенных канальцев (ИСК) и уровня тестостерона в плазме крови.

3.1.1. Влияние модельных психопатологий на уровень стероидных гормонов в крови самцов-отцов

Для определения манифестации ПТСР-подобного или депрессивно-подобного состояния у самцов-отцов на 10 день после «рестресса» или электрокожной стимуляции в крови определяли базальный уровень кортикостерона и тестостерона. Обнаружено снижение показателей кортикостерона и тестостерона у самцов с ПТСР-подобным состоянием, тогда как у самцов с депрессивно-подобным состоянием отмечалось повышение уровня кортикостерона, сопровождающееся также сниженным уровнем тестостерона (рис. 4). Следует отметить, что у трети самцов, подвергнутых стрессированию в парадигме «стресс-рестресс», уровень кортикостерона не отличался от контрольных значений. Таких самцов из дальнейших исследований исключали. При этом повышенный уровень кортикостерона при формировании состояния «выученная беспомощность» был обнаружен у всех самцов.

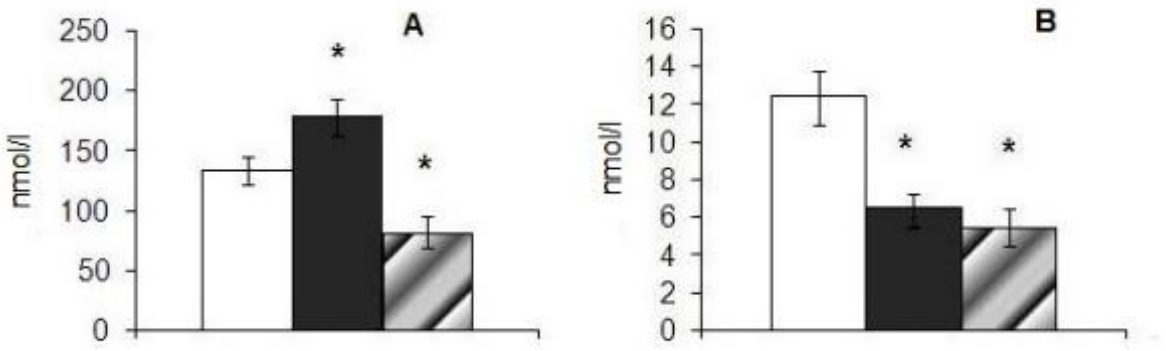


Рис. 4. Влияние экспериментальных психопатологий на уровни кортикостерона (А) и тестостерона (В) в крови самцов крыс на 10 сут после стрессирования. Светлые столбики — контрольные самцы, темные столбики — самцы с моделированием депрессии, столбики со штриховкой — самцы с моделированием ПТСР. * — достоверные отличия от контрольных самцов ($p < 0,05$).

3.1.2. Показатели репродуктивной функции самцов-отцов в ПТСР-подобном или депрессивно-подобном состоянии

С целью изучения репродуктивной компетентности самцов крыс, находящихся в ПТСР-подобном состоянии или депрессивно-подобном состоянии («выученная беспомощность»), был проведен морфометрический анализ семенников на 45 сут после стрессирования (день подсадки к самкам). Для анализа были взяты только те самцы, которые на 10 сут после стрессирования демонстрировали изменение уровня кортикостерона в крови: снижение при ПТСР-подобном состоянии и повышение при депрессивно-подобном состоянии.

Результаты данного исследования, представленные в таблице 1, показали более выраженное влияние ПТСР-подобного состояния на состояние семенников и показатели сперматогенеза самцов.

При моделировании ПТСР-подобного состояния у самцов было выявлено снижение площади поперечного сечения ИСК, а также толщины и площади сперматогенного эпителия. Также отмечалось значимое снижение

количества и площади клеток Сертоли в сперматогенном эпителии. Кроме того, травматический стресс и последующий рестресс привели к снижению площади клеток Лейдига и их количества в интерстициальной ткани семенников. Количество сперматоцитов и сперматид в сперматогенном эпителии ИСК было значительно ниже по сравнению с соответствующими показателями контрольной группы. При этом количество сперматогониев достоверно не отличалось от соответствующего показателя контрольных самцов. Число аномальных спермиев, выделенных из эпидидимиса самцов, подвергнувшихся травматическому стрессу и последующему рестрессу, было в несколько раз выше, чем у контрольной группы.

У самцов с «выученной беспомощностью» также были обнаружены некоторые изменения показателей сперматогенеза, а именно, снижение количества сперматоцитов и сперматид в сперматогенном эпителии ИСК, а также уменьшение площади клеток Лейдига в интерстициальной ткани семенников. Следует отметить, что вес самцов, подвергнутых стрессированию в двух парадигмах, статистически не отличался от контрольных самцов, но уровень тестостерона был снижен у обоих групп стрессированных самцов. Только у самцов с ПТСР-подобным состоянием выявлено снижения веса надпочечников, хотя уровень кортикостерона не различался с соответствующим показателем контрольных самцов и самцов с «выученной беспомощностью на момент подсадки к самкам.

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	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 Лейдигаn	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 *
Число аномальных спермиев (% от общего числа оцененных клеток)	0,8±0,2	3,37±0,2**	1,2±0,3
Вес самцов (г)	346,6±7,0	358,2±11,2	332,2±13,4
Вес семенников (г)	3,74±0,1	3,8±0,1	3,5±0,07*
Уровень тестостерона в крови (нмоль/л)	12,4±1,4	5,1±1,0**	6,5±0,8**
Вес надпочечников (г)	73,8±4,3	63,6±4,9	56,2±4,5*
Уровень кортикостерона (нмоль/л)	158±14,9	178,7±15,4	173±9,3

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

Полученные данные свидетельствуют о том, 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.

3.2. Влияние ПТСР-подобного или депрессивно-подобного состояния самца-отца на физиологические функции потомков

Мы исследовали потомков обоего пола и оценивали у них различные физиологические функции, такие как соматическое развитие в раннем постнатальном онтогенез, у половозрелых крыс изучали характеристики поведения и память, а также оценивали у них уровни половых стероидных гормонов в крови и активность ГАС. В связи с тем, что исследования влияния модельных психопатологий самцов отцов на физиологически функции потомков выполняли в различных сериях, для каждой модельной психопатологии использовали своих потомков, полученных от контрольных самцов. В соответствие с этим результаты исследований поведения потомков представлены отдельно для каждой экспериментальной группы (потомки отцов с ПТСР-подобным состоянием и потомки отцов с депрессивно-подобным состоянием).

3.2.1. Влияние ПТСР-подобного состояния самца-отца на соматическое развитие потомков

Результаты исследования динамики изменения веса самцов и самок – потомков отцов с ПТСР-подобным состоянием и контрольных животных представлены в таблице 2. Двухфакторный анализ методом ANOVA выявил эффект отца 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.

Таблица 2. Эффекты стресса отца на вес их потомков самцов и самок

Группа самцов отцов	Вес крысят-потомков самцов (г)			
	5 день	10 день	15 день	20 день
Моделирование ПТСР (n=8)	11,3±0,19**	21,4±0,4*	32,13±0,3	41±2,5
Контрольная группа (n=10)	13,2±0,2	22,8±0,4	33±0,7	44±1,5
	Вес крысят-потомков самок (г)			
Моделирование ПТСР (n=8)	11,2±0,2**	20,6±0,6**	29,8±1,4 (p=0,054)	39,0±1,6
Контрольная группа (n=10)	12,5±0,2	21,7±0,5	31,9±0,6	41±1,4

* Достоверное (p<0,05) отличие от контрольной группы животных. ** (p<0,01)

3.2.2. Влияние ПТСР-подобного состояния самца-отца на поведенческий фенотип потомков

Анализировали ориентировочно-исследовательскую активность и эмоциональности потомства в тесте «открытое поле» и уровень тревожности в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». В каждой экспериментальной группе животных было 10 самцов и 10 самок.

Однофакторный анализ ANOVA ориентировочно-исследовательского поведения в тесте «открытое поле» 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 (Рис. 5). Потомки самцы отцов с ПТСР-

подобным состоянием имели сниженную локомоторную активность по сравнению с потомками контрольных самцов, а также увеличенное время замирания.

Анализ поведения потомков самцов в ПКЛ (Рис. 5) 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 – потомков отцов с ПТСР-подобным состоянием – 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 (Рис. 5) по сравнению с потомками контрольных самцов.

В тоже время у самок – потомков стрессированных отцов – существенных изменений поведенческих характеристик практически во всех использованных тестах не обнаружено (Рис. 6). Однофакторный дисперсионный анализ показал 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 самок – потомков стрессированных отцов в открытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта, и, соответственно, увеличение уровня тревожности по сравнению с самками – потомками контрольных самцов.

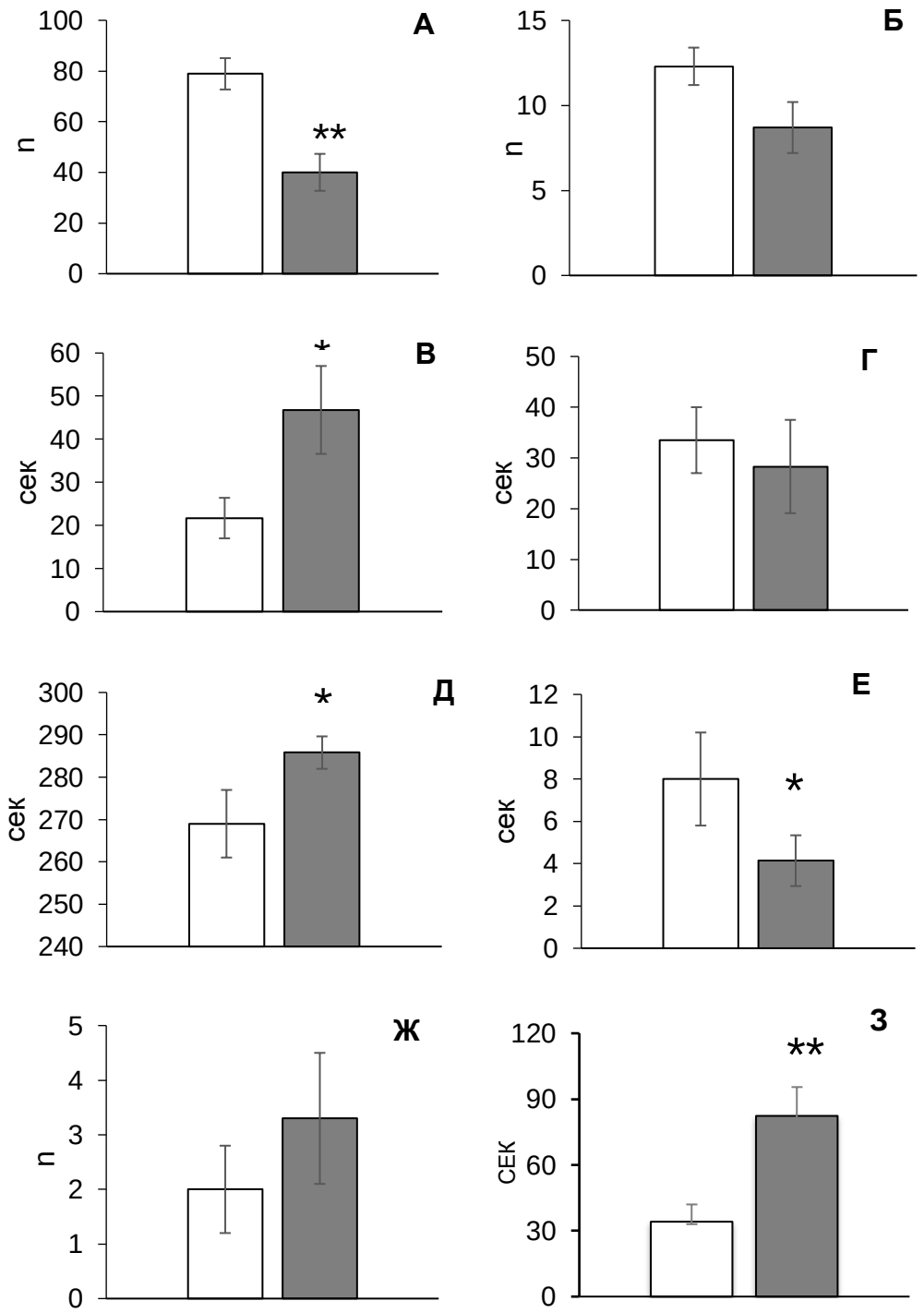


Рис.5. Влияние ПТСР-подобного состояния отцов на поведенческий фенотип потомков самцов. А – число пересеченных квадратов; Б – число вертикальных стоек; В – продолжительность замирания; Г – продолжительность реакции груминга; Д – время в закрытых рукавах; Е- время в открытых рукавах; Ж – число дефекаций в открытом поле; З – время неподвижности в тесте «вынужденное плавание». Светлые столбики — потомки контрольных самцов, темные столбики — потомки самцов с моделированием ПТСР * - достоверные отличия от контрольных крыс ($p<0,05$); ** - $p<0,01$

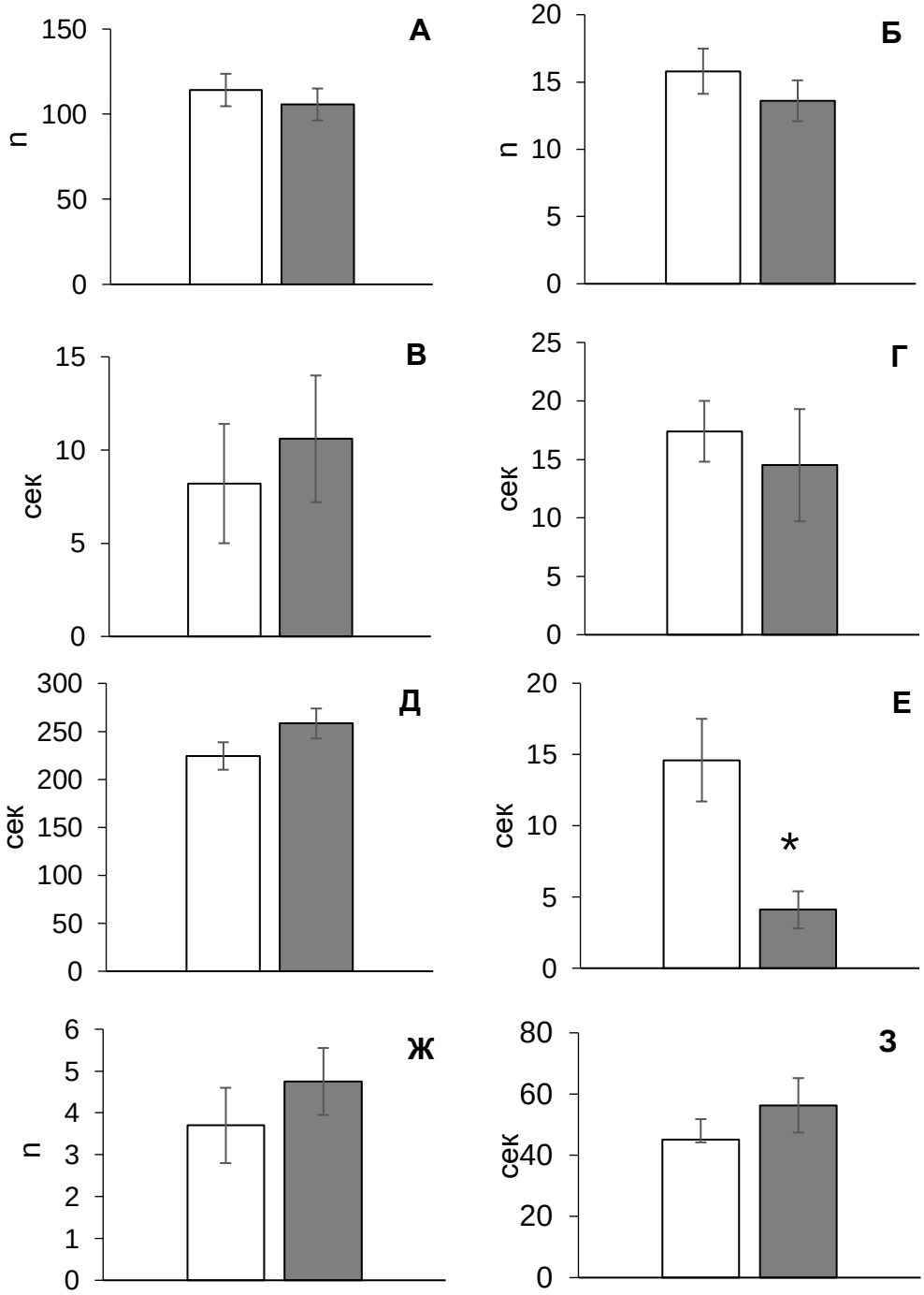


Рис.6. Влияние ПТСР-подобного состояния самцов отцов на поведенческий фентотип потомков самок. А – число пересеченных квадратов; Б – число вертикальных стоек; В – продолжительность замирания; Г – продолжительность реакции груминга; Д – время в закрытых рукавах; Е- время в открытых рукавах; Ж – число дефекаций в открытом поле; З – время неподвижности в тесте «вынужденное плавание». Светлые столбики — контрольные самцы, темные столбики — самцы с моделированием ПТСР * - достоверные отличия от контрольных крыс ($p<0,05$).

3.2.3. Влияние ПТСР-подобного состояния самца-отца на память потомков

Результаты экспериментов, где исследовали выработку и угашение РПИ у самцов – потомков отцов с ПТСР-подобным состоянием, представлены на рисунке 7. Двухфакторный анализ результатов теста РПИ методом ANOVA 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.

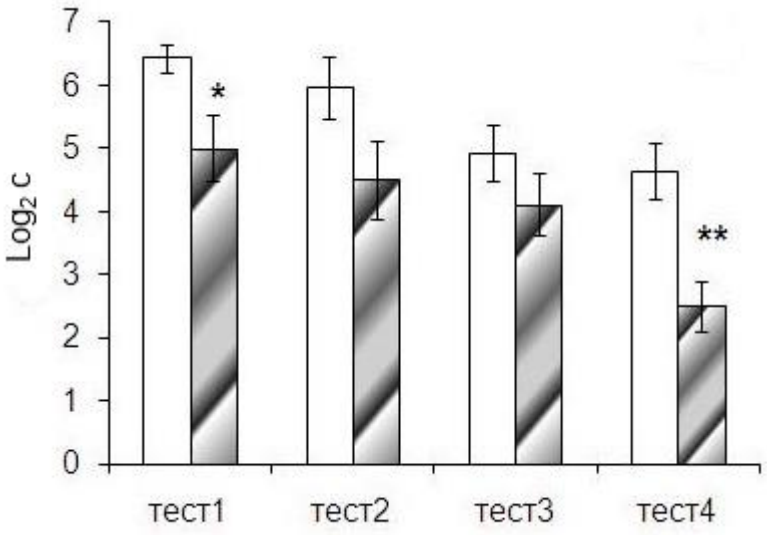


Рис. 7. Влияние ПТСР-подобного состояния самцов на память потомков мужского пола в тесте «реакция пассивного избегания». По оси ординат — Log_2 латентного периода захода в темный отсек камеры. Светлые столбики — потомки контрольных самцов. Темные столбики — потомки стрессированных отцов. * — достоверные различия между потомками контрольных и стрессированных отцов ($p < 0,05$). ** — ($p < 0,01$).

У потомок 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 (Рис. 8).

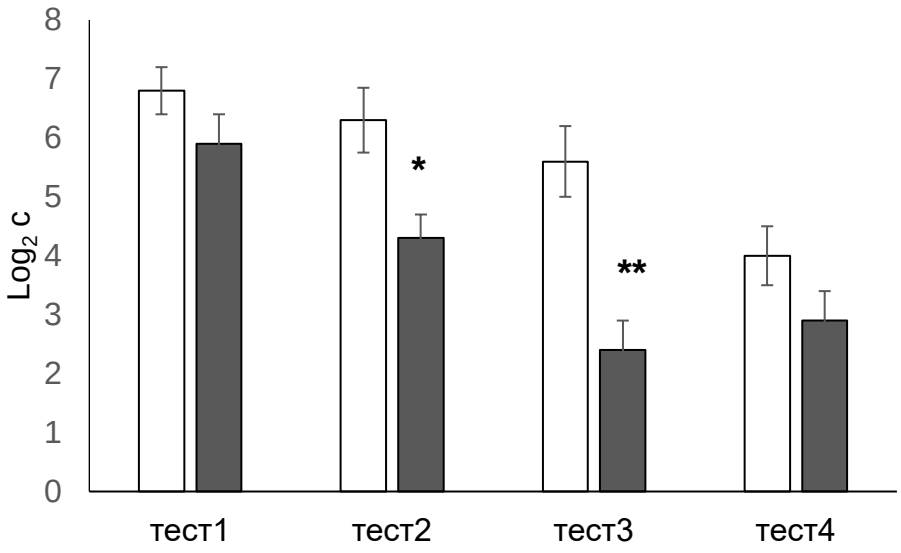


Рис. 8. Влияние ПТСР-подобного состояния самцов на память потомков женского пола в тесте «реакция пассивного избегания. По оси ординат — Log_2 латентного периода захода в темный отсек камеры. Светлые столбики — потомки контрольных самцов. Темные столбики — потомки стрессированных отцов. * — достоверные различия между потомками контрольных и стрессированных отцов ($p < 0,05$). ** — ($p < 0,01$).

Исследование памяти распознавания в тесте «распознавание нового объекта» показали, что в контрольной группе животных у самцов обнаружены статистически значимые различия во времени исследования «нового» и «знакомого» объекта в «тестовую» фазу ($F_{1,19}$=10.3, p=0.005, Рис.9). Сходные различия были выявлены и у самок – потомков контрольных самцов-отцов ($F_{1,19}$=4.8, p=0.03, Рис.10).

У самцов – потомков самцов-отцов с ПТСР-подобным состоянием – и потомков контрольных самцов-отцов различий в суммарном времени исследования объектов в «ознакомительную» фазу теста не обнаружено (Рис.9, а), также, как и у самок, рожденных от стрессированных или

контрольных самцов-отцов (Рис. 10, а). Различий во времени исследования «нового» и «знакомого» объекта в «тестовую» фазу не выявлено ни у самцов – потомков стрессированных самцов-отцов ($F_{1,19}$=1.12, p=0.31), ни у самок, которые родились от стрессированных самцов-отцов $F_{1,19}$=3.25, p=0.09). При этом 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). *Post-hoc* анализ показателей экспериментальных групп показал снижение Кр у потомков стрессированных отцов.

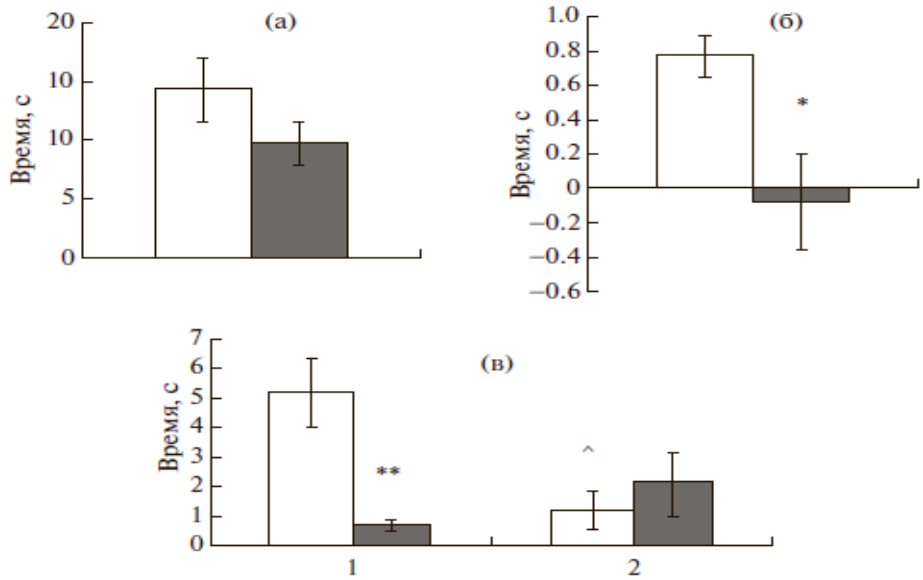


Рис. 9. Влияние ПТСР-подобного состояния отца на память распознавания у потомков-самцов. (а) – суммарное время исследования объектов в ознакомительной фазе теста. (б) – коэффициент распознавания (Кр). (в) – исследование объектов в “тестовой” фазе. По оси ординат – время в с. По оси абсцисс (в): 1 – время исследования нового объекта; 2 – время исследования знакомого объекта. Светлые столбики – потомки контрольных самцов. Темные столбики – потомки стрессированных отцов. * – статистически значимые различия между потомками контрольных и стрессированных отцов (p < 0.05), ** – p < 0.01. ^ – статистически значимые различия во времени исследования нового и знакомого объекта (p < 0.01).

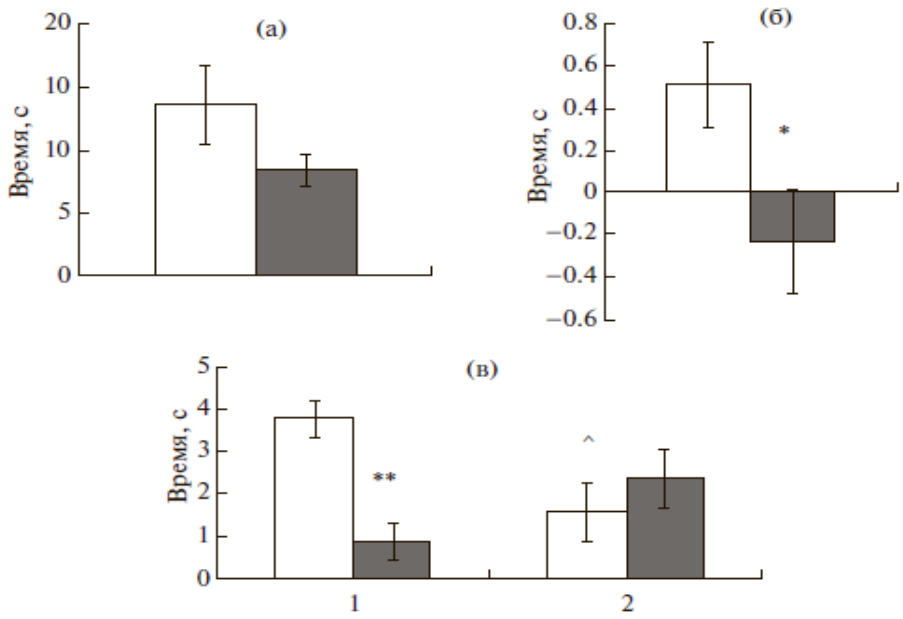


Рис. 10. Влияние ПТСР-подобного состояния отца на память распознавания у потомков-самок. (а) – суммарное время исследования объектов в ознакомительной фазе теста. (б) – коэффициент распознавания (Кр). (в) – исследование объектов в “тестовой” фазе. По оси ординат – время в с. По оси абсцисс (в): 1 – время исследования нового объекта; 2 – время исследования знакомого объекта. Светлые столбики – потомки контрольных самцов. Темные столбики – потомки стрессированных отцов. * – статистически значимые различия между потомками контрольных и стрессированных отцов ($p < 0.05$), ** – $p < 0.01$. ^ – статистически значимые различия во времени исследования нового и знакомого объекта ($p < 0.01$).

3.2.4. Влияние ПТСР-подобного состояния самца-отца на экспрессию гена инсулиноподобного фактора роста 2 в структурах головного мозга потомков

Для определение механизмов влияния ПТСР-подобного состояния самца отца на память потомков мы исследовали экспрессию гена ИФР2 (*Igf2*) и его рецептора второго типа (*Igf2r*) в отдельных структурах мозга их половозрелых потомков.

Для изучения влияния ПТСР-подобного состояния отцов на экспрессию генов в гиппокампе и неокортексе их половозрелых потомков использовали отдельную группу потомков самцов и самок, рожденных от

контрольных или подопытных отцов-самцов. В каждой группе число животных составило по 7 самцов и самок. Количественный анализ экспрессии генов оценивали с применением метода ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией.

Анализ экспрессии *Igf2* показал, что у половозрелых крыс обеих экспериментальных групп обнаружены статистически значимые различия между самцами и самками, где экспрессия *Igf2* была существенно более высокой у самок, как в неокортексе (рис. 11, а), так и в гиппокампе (рис. 11, б). Кроме того, 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.

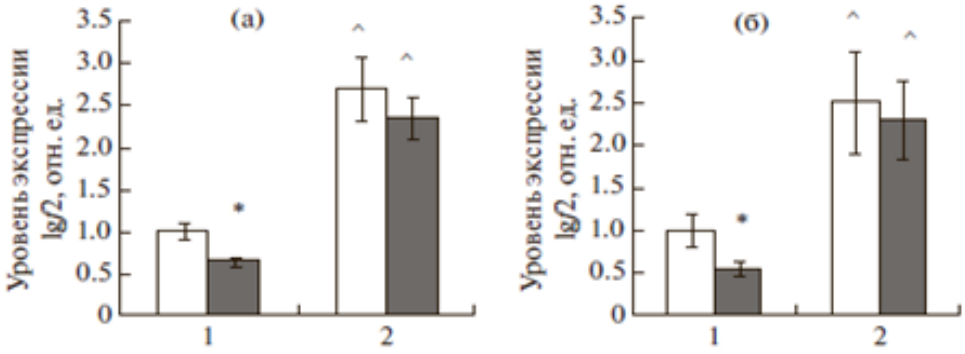


Рис. 11. Влияние стресса отца на уровень экспрессии *Igf2* в мозге потомков. (а) –уровень экспрессии *Igf2* в неокортексе взрослых крыс; (б) – в гиппокампе. По оси абсцисс: 1 – самцы крыс, 2 – самки крыс. Светлые столбики – потомки контрольных самцов. Темные столбики – потомки стрессированных отцов. * – статистически значимые различия между потомками контрольных и стрессированных отцов ($p < 0.05$). ^ – статистически значимые различия между самцами и самками крыс ($p < 0.01$).

Межполовые различия были обнаружены и в экспрессии гена *Igf2r* в гиппокампе крыс (рис. 12). Влияние ПТСР-подобного состояния самца отца на экспрессию данного гена в гиппокампе самцов и самок крыс не выявлено.

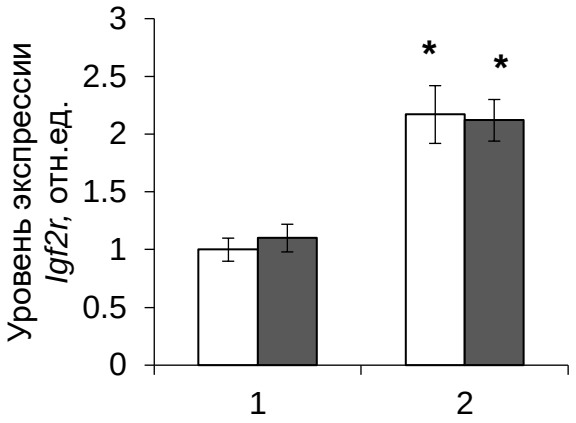


Рис. 12. Влияние стресса отца на уровень экспрессии гена *Igf2r* в гиппокампе потомков. По оси абсцисс: 1 – самцы крыс, 2 – самки крыс. Светлые столбики – потомки контрольных самцов. Темные столбики – потомки стрессированных отцов. * – статистически значимые различия между самцами и самками крыс ($p < 0.01$).

3.2.5. Влияние ПТСР-подобного состояния самца-отца на уровень половых стероидных гормонов в плазме крови половозрелых потомков.

Анализ содержания тестостерона в плазме крови потомков-самцов показал статистически значимое снижение уровня гормона у самцов – потомков стрессированных отцов (Рис. 13 а). Статистически значимых различий в уровне эстрадиола между самками – потомками контрольных или стрессированных отцов – не выявлено (Рис. 13, б).

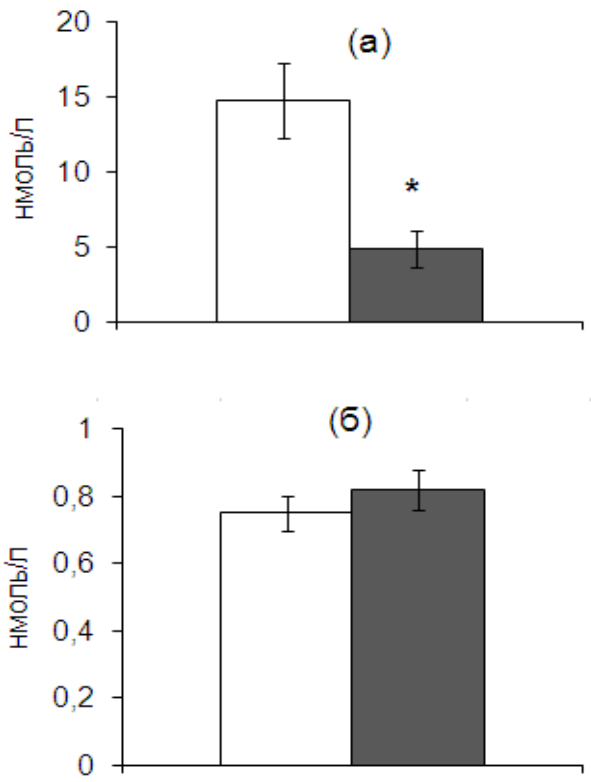


Рис. 13. Содержание половых стероидных гормонов в плазме крови потомков контрольных и стрессированных отцов. (а) – уровень тестостерона в крови самцов. (б) – уровень эстрадиола в крови самок. Светлые столбики – потомки контрольных самцов. Темные столбики – потомки стрессированных отцов. * - статистически значимые различия между потомками контрольных и стрессированных отцов ($p<0.01$).

Таким образом, проведенные исследования показали, что ПТСР-подобное состояние самцов-отцов оказывает существенное влияние на соматическое развитие, поведенческий фенотип и память потомков. Обнаруженные нарушения памяти потомков сопровождались снижение экспрессии гена ИФР2 в гиппокампе и неокортексе, но только потомков самцов. У половозрелых самцов – потомков стрессированных самцов – также выявлено снижение уровня тестостерона в плазме крови. Несмотря на показанные нарушения памяти и у потомков самок, экспрессия гена ИФР2 и уровень эстрадиола в их крови не изменялся.

3.3. Влияние депрессивно-подобного состояния «вынужденная беспомощность» самца-отца на физиологические функции потомков

В данной серии исследований выполнено изучение влияния депрессивно-подобного состояния самцов-отцов до спаривания с интактными самками на соматическое развитие, поведенческий фенотип и память потомков по аналогии с серией экспериментов на потомках самцов-отцов, переживших травматический стресс с последующим рестрессом.

3.3.1. Влияние депрессивно-подобного состояния самца-отца на физиологические функции потомков

Результаты исследования динамики изменения веса самцов и самок – потомков отцов с депрессивно-подобным состоянием и контрольных животных представлены на рисунке 14. Двухфакторный анализ методом ANOVA выявил эффект отца 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.

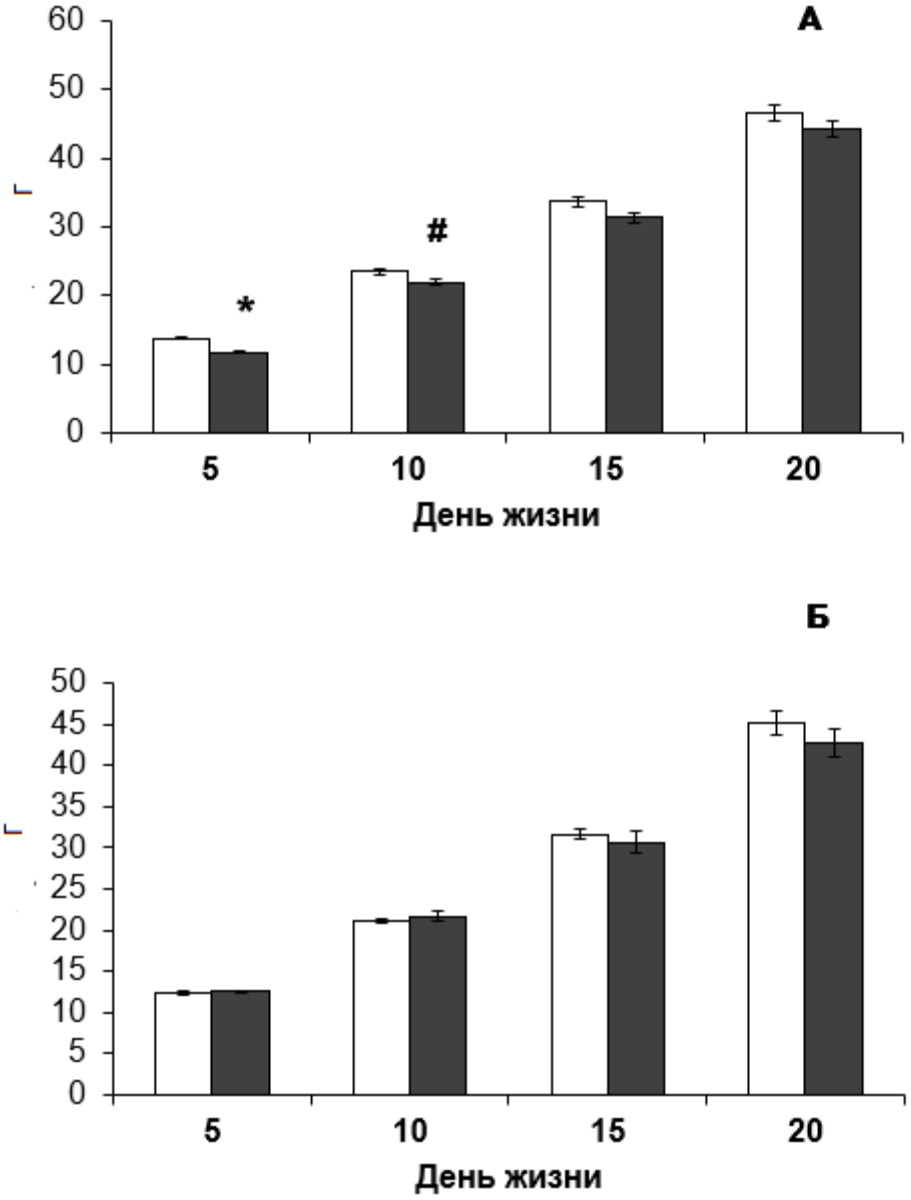


Рис. 14. Динамика изменения веса тела крысят самцов (А) и самок (Б) в пометах, родившихся от самцов с депрессивно-подобным состоянием. Белые столбики – контрольные самцы, темные столбики – самцы с моделированием депрессии. * - достоверные ($p<0,01$) различия между потомками подопытных и контрольных самцов. # - $p=0,07$.

3.3.2. Влияние депрессивно-подобного состояния самца-отца на поведенческий фенотип потомков

Проведенные исследования показали, что депрессивно-подобное состояние самцов-отцов оказывает 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 (Рис. 15). У самок – потомков самцов с депрессивно-подобным состоянием – обнаружено увеличение числа дефекаций ($F_{2,19}$=4,7, p<0,01), что свидетельствует о повышении у них уровня эмоциональности (Рис. 16). Уровень дефекаций мы также фиксировали и в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». Здесь подопытные самки также демонстрировали тенденцию к увеличению числа дефекаций (2±0,6 и 0,8±0,4, соответственно, p=0,07). Другие поведенческие характеристики, такие как локомоторная активность в тесте «открытое поле», уровень тревожности в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт», депрессивность поведения в тесте «вынужденное плавание» у потомков обоего пола, полученных от самцов с «выученной беспомощностью», не изменялись по сравнению с потомками контрольных самцов.

Далее на рисунках представлены результаты различных поведенческих тестов у самцов (Рис. 15) и самок (Рис. 16) крыс – потомков отцов с депрессивно-подобным состоянием. Условные обозначения на диаграммах идентичны: А – число горизонтальных побежек в открытом поле (n), Б – число вертикальный стоек в открытом поле (n), В – время неподвижности в открытом поле (сек), Г – продолжительность груминга в открытом поле (сек), Д – время пребывания животного в закрытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта (сек), Е – время пребывания животного в открытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта (сек), Ж – число дефекаций в открытом поле (n), З – время неподвижности в тесте «вынужденное плавание». Светлые столбики – потомки контрольных самцов, темные столбики – потомки самцов с депрессивно-подобным состоянием. * - статистически значимые различия между потомками контрольных и стрессированных самцов.

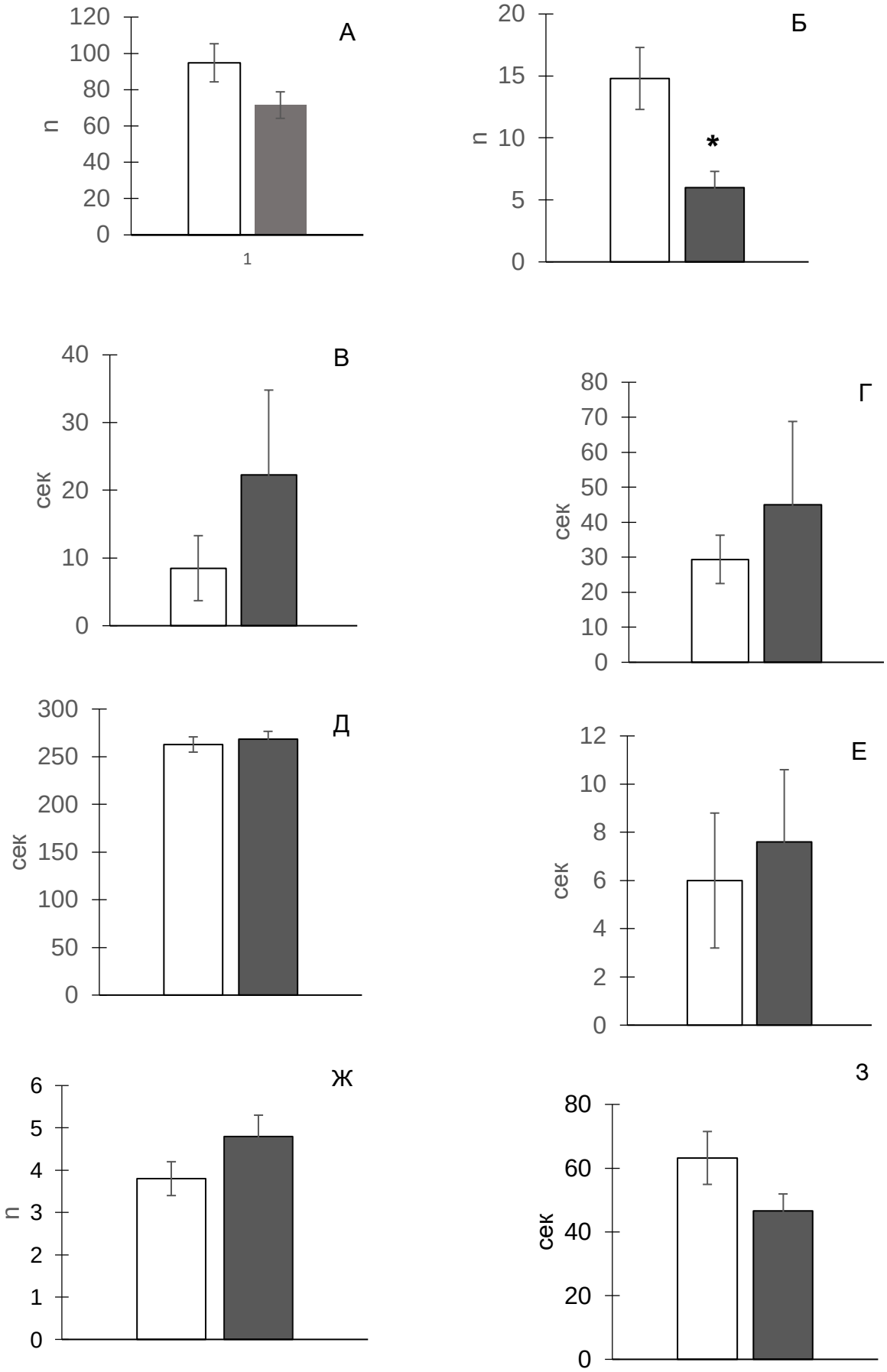


Рис. 15. Поведенческий фенотип потомков самцов.

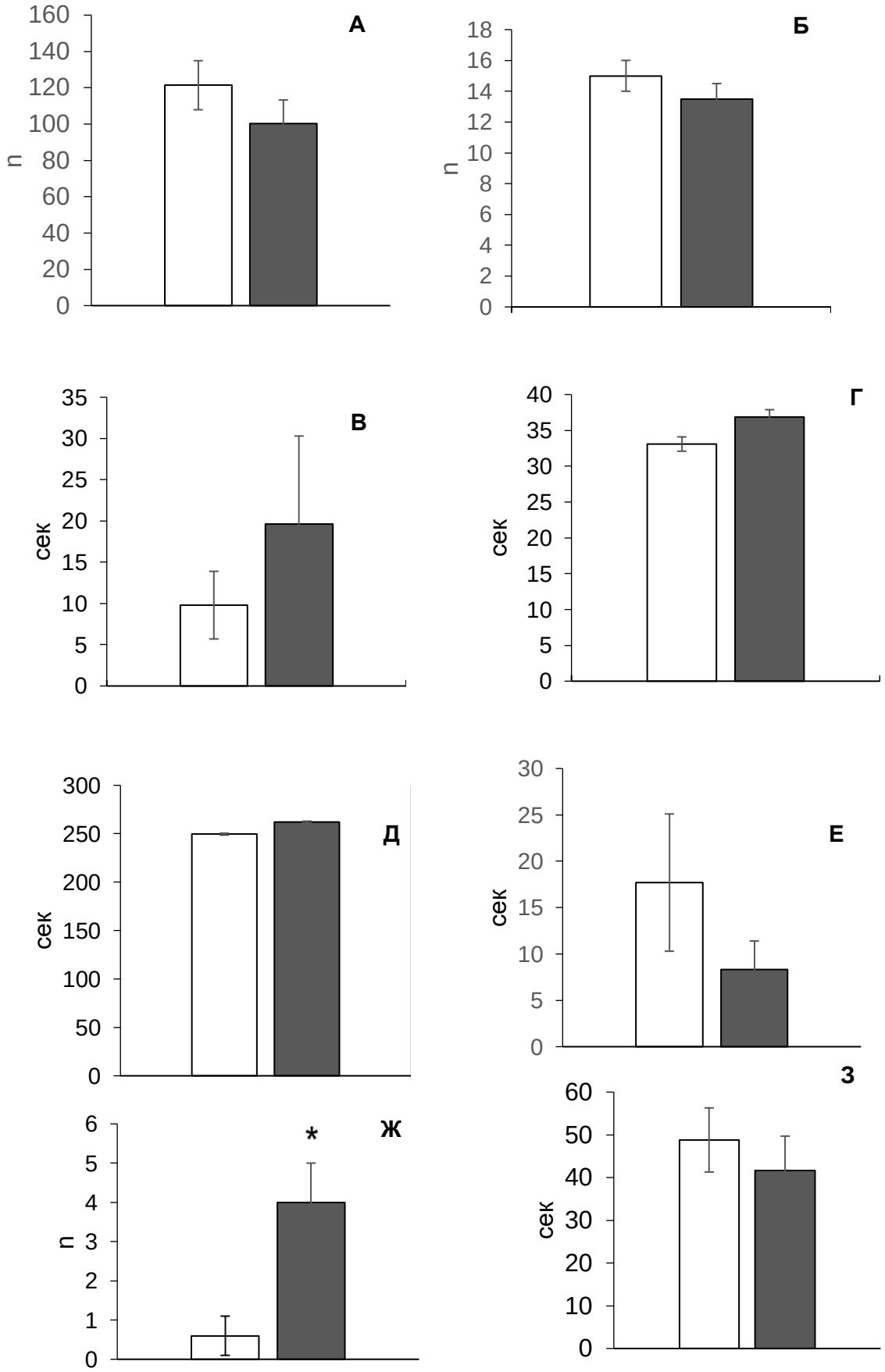


Рис. 16. Поведенческий фенотип потомков самок.

3.3.3. Влияние депрессивно-подобного состояния самца-отца на память потомков

Анализ способности к выработке РПИ и ее угашения у самцов, родившихся от отцов в депрессивно-подобном состоянии или контрольных отцов, с использованием двухфакторного ANOVA показало отсутствие достоверного влияния фактора отец на выработку РПИ и ее сохранность ($F_{(3,79)}$ = 0,34, p = 0,58). Результаты представлены на рисунке 17.

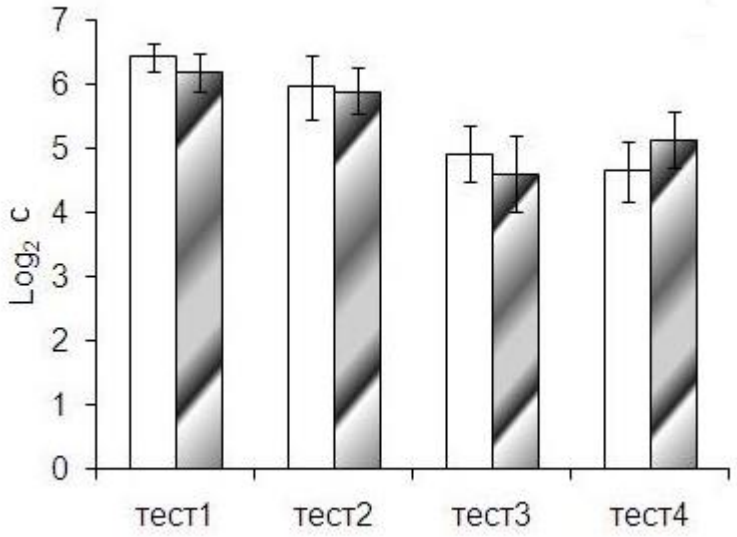


Рис. 17. Влияние депрессивно-подобного состояния самца–отца на память потомков мужского пола в тесте «реакция пассивного избегания». по оси ординат – Log_2 латентного периода захода в темный отсек камеры. Светлые столбики – потомки контрольных самцов. Темные столбики – потомки стрессированных отцов.

У самок – потомков отцов с «выученной беспомощностью» - также не выявлено статистически значимых различий в выработке РПИ и ее угашения по сравнению с потомками контрольных самцов-отцов (Рис. 18).

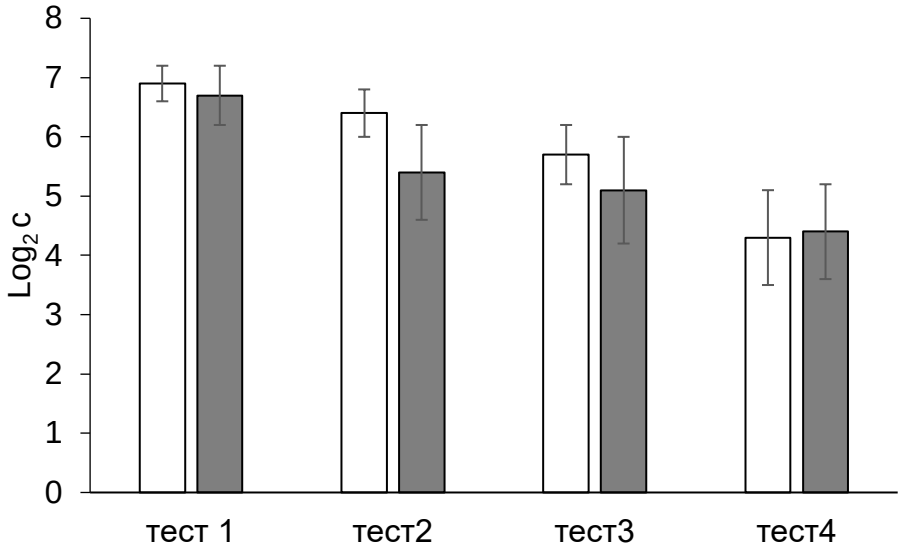


Рис. 18. Влияние депрессивно-подобного состояния самца–отца на память потомков женского пола в тесте «реакция пассивного избегания». по оси ординат – Log_2 латентного периода захода в темный отсек камеры. Светлые столбики – потомки контрольных самцов. Темные столбики – потомки стрессированных отцов.

В ходе исследования памяти распознавания обнаружено, что потомки самцы от депрессивных и контрольных отцов в фазу «ознакомления» имели тенденцию (p=0,05) к различиям по времени суммарного исследования первого и второго объекта (Рис. 19, а). В «тестовую» фазу различия между группами животных обнаружены в отношении времени исследования нового объекта ($F_{1,19}$ = 6.4, p= 0.02, Рис. 19, в). Тем не менее, величина Кр не различалась между группами крыс (Рис. 19, б).

У самок – потомков самцов с «выученной беспомощностью» - обнаружены сходные изменения памяти распознавания, как и у потомков самцов. Несмотря на то, что подопытные и контрольные самки не различались Кр, в тестовую фазу они исследовали новый ($F_{1,19}$ = 6.8, p= 0.02) объект меньше времени, а также демонстрировали тенденцию к меньшему времени исследования знакомого объекта ($F_{1,19}$ = 3.45, p= 0.07), чем самки – потомки контрольных самцов (Рис. 20).

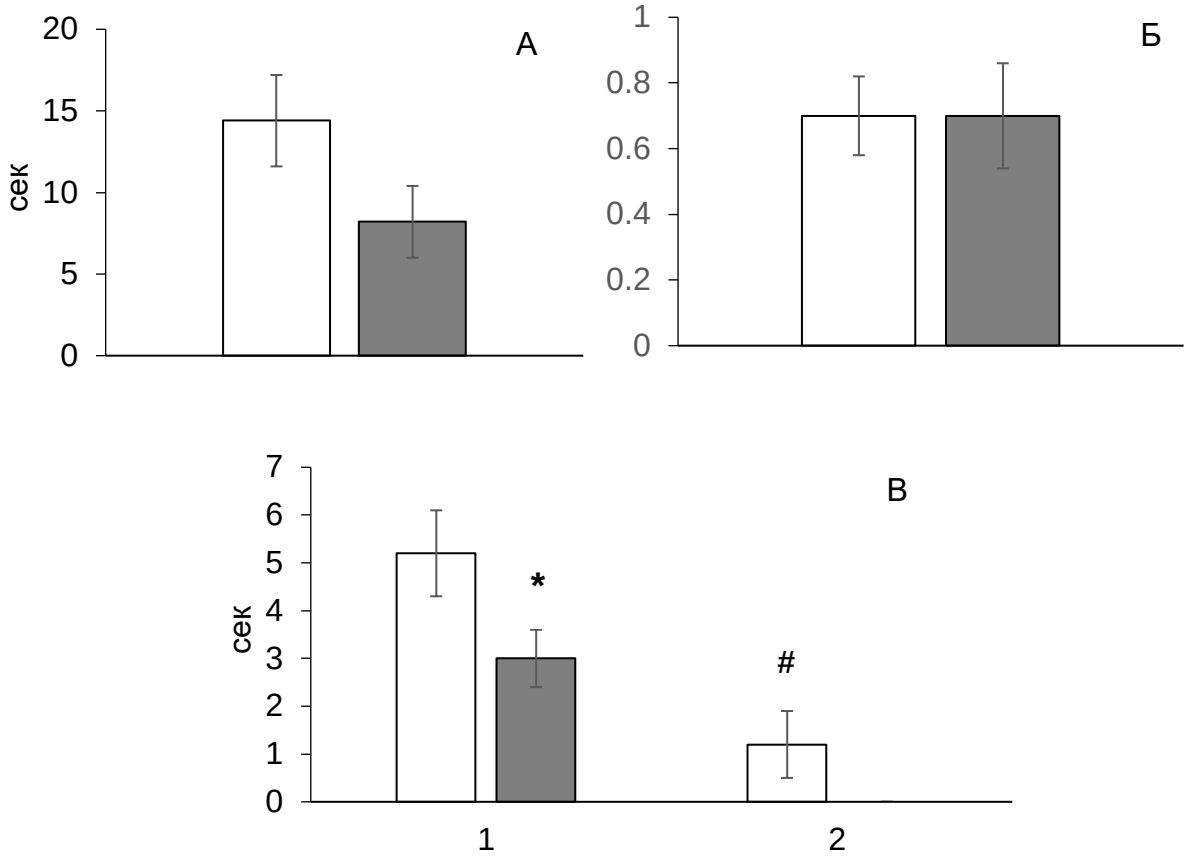


Рис.19. Влияние депрессивно-подобного состояния отца на память распознавания у потомков самцов. А – суммарное время исследования объектов в «ознакомительную» фазу. Б – коэффициент распознавания (Кр). В – исследование объектов в “тестовой” фазе. По оси ординат – время в с. По оси абсцисс (В): 1 – время исследования нового объекта; 2 – время исследования знакомого объекта. 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 во времени исследования нового и знакомого объекта ($p < 0.01$).

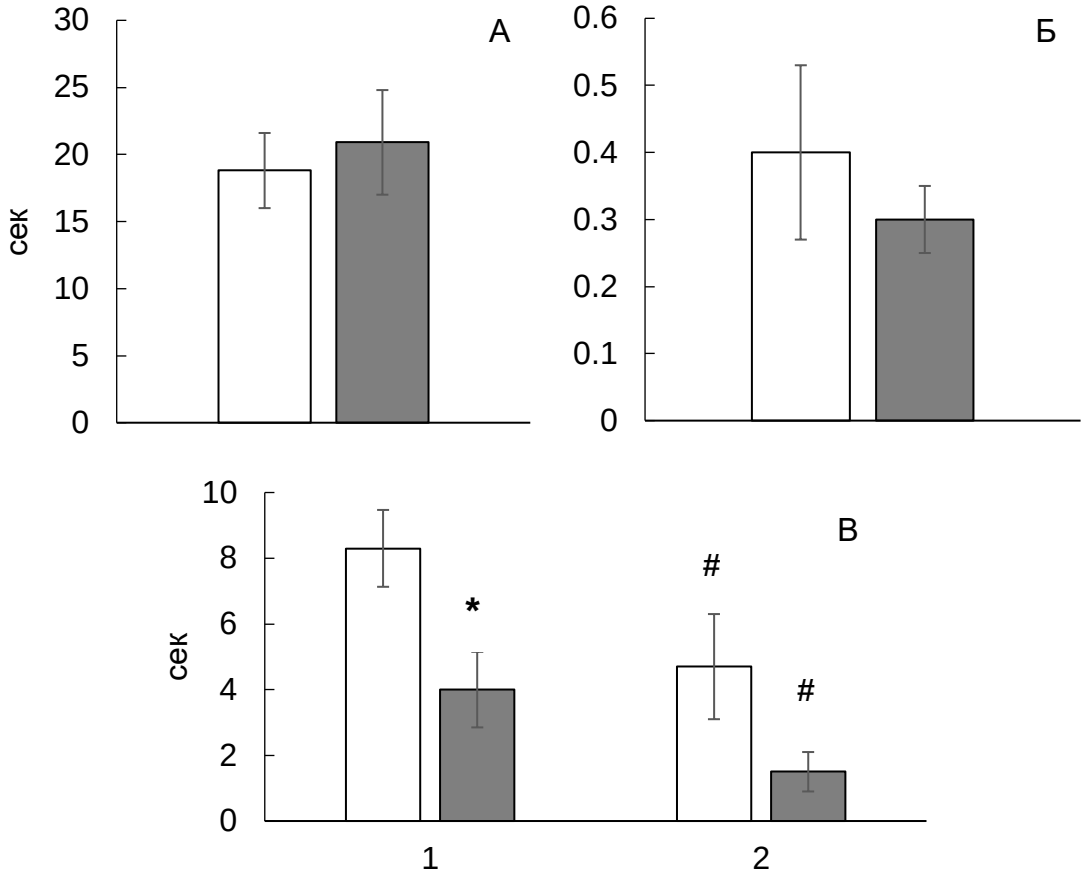


Рис. 20. Влияние депрессивно-подобного состояния отца на память распознавания у потомков самок. А – «ознакомительная» фаза. Б – фаза «тестовая». Светлыми столбиками обозначены крысы – потомки контрольных отцов, темными столбиками – крысы – потомки стрессированных отцов. По оси ординат – время (сек) исследования объектов. Кр – коэффициент распознавания. * - достоверные ($p<0,05$) различия между потомками подопытных и контрольных отцов; ** - $p<0,01$. # - достоверные ($p<0,05$) различия во времени исследования нового и знакомого объекта.

3.3.4. Влияние депрессивно-подобного состояния самца-отца на экспрессию гена инсулиноподобного фактора роста 2 в структурах головного мозга потомков

В данной серии экспериментов исследовали влияние депрессивно-подобного состояния самца отца на экспрессию *Igf2* и *Igf2r* только в гиппокампе потомков обоего пола. Обнаружено, что депрессивно-подобное

состояние самца-отца перед спариванием с интактными самками не приводит к изменению экспрессии изученных генов в гиппокампе потомков обоего пола (Рис. 21)

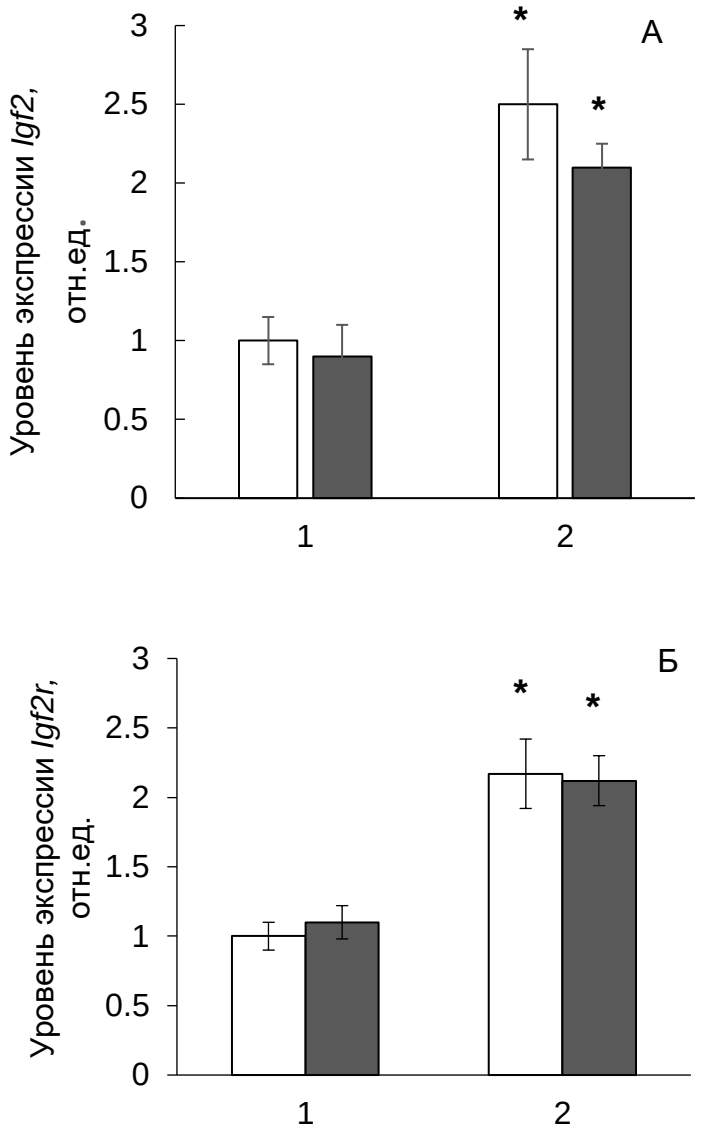


Рис. 21. Уровень экспрессии генов *Igf2* (А) и *Igf2r* (Б) в гиппокампе потомков, родившихся от самцов с моделированием депрессии. Светлые столбики — потомки контрольных самцов. Темные столбики — потомки отцов с депрессивно-подобным состоянием. * — достоверные различия между самцами и самками ($p < 0,05$).

3.3.5 Влияние депрессивно-подобного состояния самца-отца на уровень половых стероидных гормонов в крови половозрелых потомков

Содержание тестостерона в плазме крови потомков-самцов стрессированных отцов статистически значимо отличался сниженным уровнем гормона от самцов – потомков контрольных отцов (Рис. 22, а). Статистически значимых различий в уровне эстрадиола между самками – потомками контрольных или стрессированных отцов – не выявлено (Рис. 22, б).

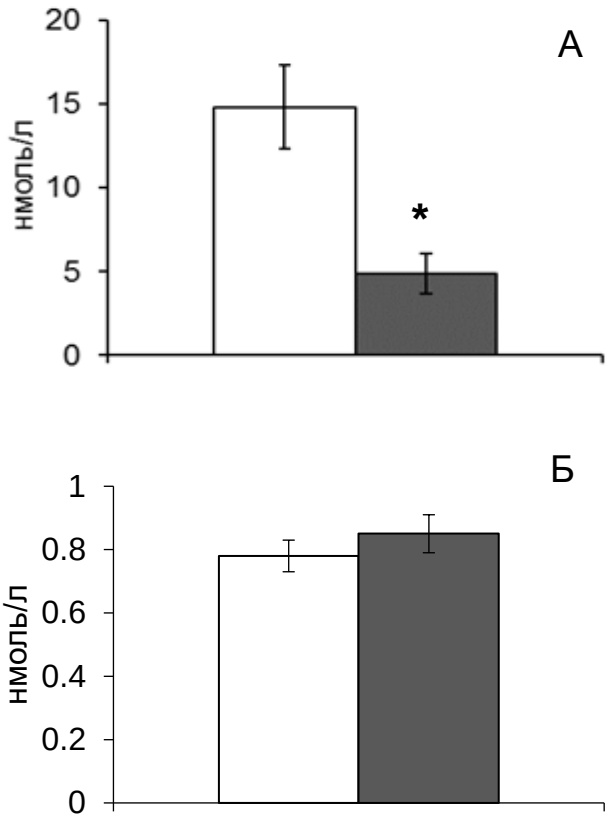


Рис. 22. Содержание половых стероидных гормонов в плазме крови потомков контрольных и стрессированных отцов. А – уровень тестостерона в крови самцов. Б – уровень эстрадиола в крови самок. Светлые столбики – потомки контрольных самцов. Темные столбики – потомки стрессированных отцов. * - статистически значимые различия между потомками контрольных и стрессированных отцов ($p<0.01$).

Таким образом, моделирование депрессии у самцов до спаривания их с интактными самками оказывает незначительное влияние на соматическое

развитие, поведенческих фенотип и память потомков обоего пола, за исключением уровня тестостерона, который у самцов - потомков «депрессивных» отцов - снижается также, как и у потомков отцов с «ПТСР».

3.4. Влияние ПТСР-подобного или депрессивно-подобного состояния самцов крыс перед спариванием на активность гипофизарно-адренокортикальной системы и экспрессию глюкокортикоидных рецепторов в головном мозге половозрелых потомков

Данная серия экспериментов выполнена на отдельных группах крыс – потомках контрольных самцов-отцов, потомках самцов-отцов с ПТСР-подобным состоянием и потомках самцов-отцов с депрессивно-подобным состоянием. Определение уровня кортикостерона в плазме крови этих групп потомков, а также иммуногистохимическое исследование экспрессии белка глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе и мПФК проводилось одномоментно. В связи с этим результаты этих экспериментов представлены в отдельном разделе.

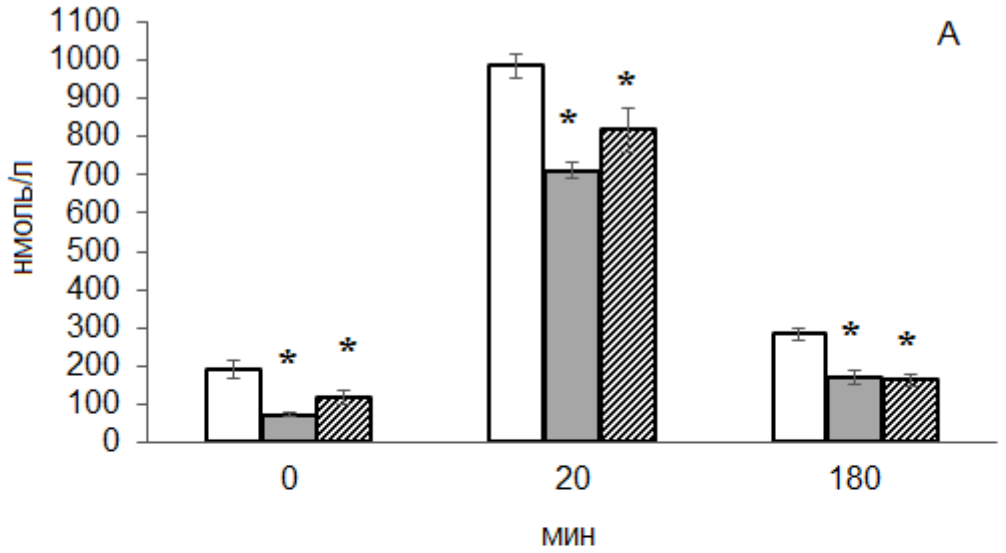
Двухфакторный дисперсионный анализ показал достоверное влияние пола животных на динамику стрессорного выброса кортикостерона как в группе потомков контрольных самцов отцов ($F_{(2,59)}=7.3$, $p<0.001$), так и в группах потомков отцов с ПТСР-подобным ($F_{(2,59)}=7.9$, $p<0.01$) или депрессивно-подобным состоянием ($F_{(2,59)}=13.8$, $p<0.001$). Таким образом стресс отца не повлиял на характер активности ГАС потомков в зависимости от пола.

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. 23, а).

Сходный характер активности ГАС был выявлен и у самцов – потомков отцов с ПТСР-подобным состоянием (Рис.23, 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 потомками контрольных самцов отцов.

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. Микрофотографии областей мозга с выявленными клетками, экспрессирующими глюкокортикоидные рецепторы, у самцов – потомков отцов разных экспериментальных групп – представлены на рисунке 24.



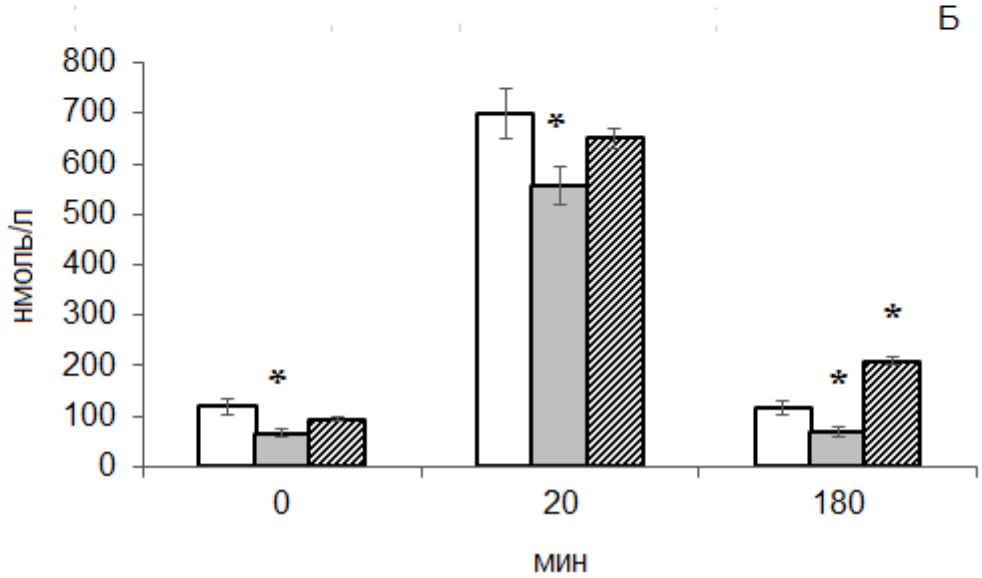


Рис. 23. Характер базальной и стрессорной активности ГАС потомков самцов отцов с ПТСР-подобным или депрессивно-подобным состоянием. А – потомки самки; Б – потомки самцы. По вертикали – уровень кортикостерона в плазме крови (нмоль/л), по горизонтали – время от начала 20-мин иммобилизации. Белые столбики – потомки контрольных самцов 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

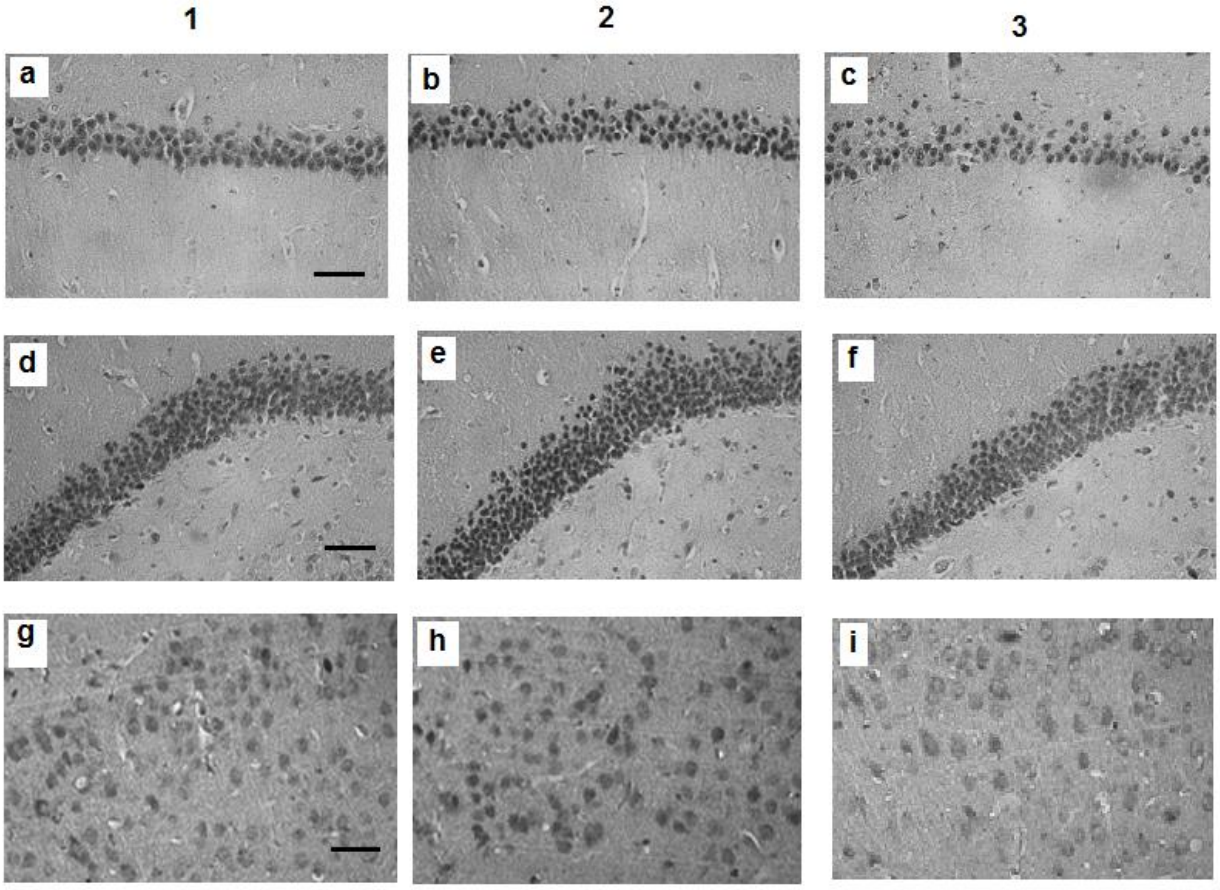


Рисунок 24. Экспрессия белка глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе и медиальной префронтальной коре самцов – потомков отцов экспериментальных групп. 1 – потомки контрольных самцов; 2 – потомки самцов с ПТСР-подобным состоянием; 3 – потомки самцов с депрессивно-подобным состоянием. a, b, c – CA1 поле гиппокампа; d, e, f – зубчатая извилина; g, h, i – медиальная префронтальная кора. Масштаб 50 мкм.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Последнее десятилетие ознаменовалось резким ростом интереса к идее о том, что условия окружающей среды предков могут влиять на фенотип будущих поколений. Не вызывает сомнений тот факт, что матери играют гораздо большую роль в обеспечении раннего развития, чем отцы, особенно у млекопитающих. Условия окружающей среды матери могут влиять на потомство как посредством направленных молекулярных изменений в ооците, так и путем прямого воздействия материнских факторов на развивающийся плод (Sharma,2013)

В последние годы не меньшее внимание привлекает роль отца в фенотипической модификации физиологических признаков потомства (Rando et al.,2012; Xavier et al.,2019). Помимо нарушения питания отцов (Dimofski et al.,2021; Fullston et al., 2013) также в мировой литературе рассматриваются эффекты стресса на организм отца до зачатия, и влияние отцовского стресса и/или психического здоровья на фенотип потомков (Duffy et al., 2021; Tan et al., 2023). Очевидно, что любые воздействия неблагоприятных факторов на организм отца, по всей видимости, сопряжены с нарушением его репродуктивных функций. В связи с этим в первую очередь рассмотрим, как влияет ПТСР-подобное или депрессивно-подобное состояние самцов отцов на процессы, связанные со сперматогенезом.

4.1. Репродуктивные функции самцов крыс при моделировании ПТСР или депрессии

В условиях падения рождаемости проблема охраны репродуктивного здоровья приобретает особую медицинскую и социальную значимость. Уровень заболеваемости мужчин в отношении репродуктивной патологии неуклонно возрастает. Связано это не только со снижением физической активности и неправильным питанием, но и с широким распространением различных психических заболеваний, опосредованных действием стрессорных факторов (Day et al.,2016). К таким заболеваниям относится,

прежде всего, посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР), при котором в клинических исследованиях у пациентов обнаружены сексуальные дисфункции (Yehuda et al.,2015). Длительное течение этого заболевания, сопряженное со значительными перестройками нейроэндокринных функций, может являться причиной снижения фертильности, нарушения сперматогенной функции семенников и в последствие иметь негативное влияние на потомство. Депрессия также ассоциируется со значительным снижением фертильности, поскольку повышенный уровень глюкокортикоидных гормонов в крови в течение данного заболевания негативным образом сказывается на продукции тестостерона семенниками и на сам процесс сперматогенеза (Gollenberg et al., 2010).

Наши исследования показали, что у самцов с ПТСР-подобным состоянием на 10 день после рестресса уровень кортикостерона и тестостерона в крови снижен, тогда как у самцов с депрессивно-подобным состоянием отмечалось повышение уровня кортикостерона на фоне снижения уровня тестостерона. Сниженный уровень глюкокортикоидных гормонов в крови является прогностическим критерием ПТСР в клинике (Yehuda, 2009), а повышенное содержание в крови глюкокортикоидов характерно для больных депрессией (Pariante, Lightman, 2008). Снижение уровня тестостерона в крови самцов, подвергнутых стрессированию в двух парадигмах, является вероятнее всего следствием самой стрессорной процедуры. Хорошо известно, что стрессорные воздействия, приводящие к повышению уровня глюкокортикоидов, влияют на продукцию тестостерона клетками Лейдига (Hu et al.,2008; Zou et al.,2019). Глюкокортикоидные гормоны, взаимодействуя с классическими рецепторами, напрямую ингибируют транскрипцию генов, кодирующие ферменты биосинтеза тестостерона (Wang et al.,2017). Кроме того, было показано, что снижение продукции тестостерона в условиях повышенного уровня глюкокортикоидов может быть опосредовано гибелью клеток Лейдига (Yazawa et al., 2000; Guo et al., 2003).

Тем не менее, морфометрический анализ семенников на 48 сут после стрессирования (день подсадки к самкам) показал, что у самцов с ПТСР-подобным состоянием нарушения сперматогенной функции семенников более выражены, чем у самцов с депрессивно-подобным состоянием. Нами обнаружено не только снижение площади поперечного сечения извитого семенного канальца у этих самцов, а также толщины и площади сперматогенного эпителия, но и снижение количества клеток Сертоли в сперматогенном эпителии и их площади. Стрессирование самцов в парадигме «стресс-рестресс» привело и к снижению площади клеток Лейдига и их количества в интерстициальной ткани семенников, что может быть прямым следствием сильного травматического стресса и апаптоза клеток Лейдига (Yazawa et al., 2000). Количество сперматоцитов и сперматид в сперматогенном эпителии семенного канальца также снижались по сравнению с соответствующими показателями контрольной группы. Число аномальных спермиев, выделенных из эпидидимиса самцов с ПТСР-подобным состоянием, было в несколько раз выше, чем у контрольной группы.

У самцов с депрессивно-подобным состоянием были обнаружены некоторые изменения показателей сперматогенеза, а именно, снижение количества сперматоцитов и сперматид в сперматогенном эпителии, а также уменьшение количества и площади клеток Лейдига в интерстициальной ткани семенников, хотя эти изменения были менее существенными, чем у самцов с ПТСР-подобным состоянием. Снижение количества и площади клеток Лейдига у этих самцов соответствует сниженному уровню тестостерона в их крови.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что травматический стресс и последующий рестресс, который использовали для моделирования ПТСР, вызывает более значительные нарушения репродуктивных функций самцов крыс, чем неизбегаемый стресс, в результате которого возникает депрессивно-подобное состояние. Однако в

обеих моделях психопатологии выявлено нарушение функций клеток Лейдига, и как следствие снижение уровня тестостерона, что вероятнее всего обусловлено самой стрессорной процедурой. Закономерно, что ПТСР-подобное или депрессивно-подобное состояние самцов-отцов оказывает на их потомство различное по выраженности влияние.

4.2. Соматическое развитие и поведенческий фенотип потомства самцов-отцов с ПТСР-подобным или депрессивно-подобном состоянием

В литературе имеются многочисленные указания на то, что низкий вес при рождении служит фактором риска развития в последующей жизни многих заболеваний, таких как метаболический синдром (Gluckman et al., 2004), сердечно-сосудистые заболевания (Alexander et al.,2015), синдром гиперактивности и дефицита внимания (Franz et al.,2018) а также депрессии (Loret de Mola et al.,2014). В исследованиях на лабораторных животных были получены сходные результаты (Green et al., 2010; Vuguin, 2007). Имеются доказательства того, что низкий вес новорожденных может быть обусловлен различными факторами, воздействующими на мать во время беременности (Braithwaite et al 2018; Spry et al.,2020). Не только состояние матери во время беременности, но и отца может обуславливать определенную задержку развития.

Проведенные нами исследования показали, что ПТСР-подобное состояние самцов-отцов оказывает более выраженное влияние на соматическое развитие их потомства, чем депрессивно-подобное состояние самцов-отцов. Так, потомки обоего пола самцов, подвергнутых травматическому стрессу и рестрессу, отставали в развитии (имели более низкий вес) от контрольных сверстников до 10 дня жизни, тогда как сниженный вес потомков отцов с депрессивно-подобным состоянием наблюдали только на 5 день жизни и только у потомков самцов. Вероятно, что более значительное влияние на соматическое развитие потомков ПТСР-подобного состояния отцов, которое затрагивает потомков обоего пола,

связано с тем, что стрессорное воздействие при моделировании ПТСР сильнее, чем при моделировании депрессии. Соответственно стрессорные воздействия на отцов травматического характера могут служить причиной развития у их потомства различных нарушений в последующей жизни.

Подтверждением данному предположению служит и выраженность изменения поведенческого фенотипа взрослых потомков самцов-отцов с ПТСР-подобным или депрессивно-подобным состояниями. Так у потомков самцов, родившихся от отцов с ПТСР-подобным состоянием, наблюдали снижение локомоторной активности и увеличение времени неподвижности в тесте открытое поле. Кроме того, у этих самцов возрастало время неподвижности в тесте «вынужденное плавание» и соответственно усиливалась депрессивность поведения. Следует отметить, что у самок – потомков стрессированных отцов - поведенческие изменения были минимальны. Выявлено увеличение уровня тревожности в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» подопытных самок по сравнению с потомками контрольных родителей. Депрессивно-подобное состояние самцов-отцов оказывало незначительное влияние на поведение в различных тестах их потомков мужского и женского пола. У потомков самцов выявлено лишь снижение исследовательской активности в тесте «открытое поле», у потомков самок – повышение эмоциональности (увеличение числа дефекаций).

Изменения в поведении потомков стрессированных отцов были обнаружены и другими авторами. Однако результаты этих работ весьма противоречивы. Так было показано, что хронический умеренный стресс самцов мышей как в период пубертата, так и в период половой зрелости не оказывает влияние на поведение (Rogers et al., 2013). В работе других авторов, напротив, было показано, что хронический стресс социальных поражений в течение 10 дней самцов мышей перед спариванием у их потомков формирует поведенческий фенотип, характеризующийся повышенной тревожностью и депрессивностью (Dietz et al., 2011).

Хроническое стрессирование (вариант иммобилизационного стресса в течение 30 мин дважды в день) самцов крыс линии Лонг-Еванс в течение 27 дней перед спариванием повышало уровень тревожности у потомков в период пубертата и снижало его у взрослых крыс (Harker et al.,2018).Моделирование стресса у самцов мышей путем хронического введения кортикостерона в течение 4 недель повышало уровень тревожности у потомков, но только у самцов, в то время как у самок изменений в поведении этими авторами не обнаружено (Short et al.,2016). В исследованиях Yeshurun и коллег (Yeshurun et al., 2017), напротив, было показано преимущественное влияние хронического введения глюкокортикоидов самцам мышей перед спариванием на способность к пространственному обучению у потомков самок, но не самцов. Такие различия в полученных данных, вероятно, определяются типами стрессорных воздействий на самцов отцов и их длительностью. Обращает на себя внимание факт дифференциального влияния различных стрессорных процедур у отцов на поведение их потомков мужского и женского пола, что подтвердилось и в наших исследованиях. Механизмы такого различного действия стрессирования самцов-отцов на потомков в зависимости от пола остаются неизвестными.

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

Внимание к роли ПТСР родителей как фактора риска развития ПТСР у их потомков было привлечено исследованием, проведенным Solomon Z. и соавторами (Solomon et al.,1988), которые показали, что ветераны войны в Ливане, которые являлись потомками переживших Холокост, были более склонны к развитию ПТСР, чем другие израильские солдаты, после своего военного опыта. Это исследование предоставило первое эмпирическое доказательство большей чувствительности потомков родителей, переживших Холокост, к их собственным стрессовым событиям.

Более подробно данная проблема была разработана Yahuda R. с соавторами, которые убедительно продемонстрировали, что у потомков, переживших травматические события, вероятность развития ПТСР была выше, если их родители болели этой психопатологией (Yehuda et al., 1988,а; Yehuda et al., 1988,б). Авторы пришли к выводу, что ПТСР у родителей может быть фактором риска развития соответствующего заболевания у потомков.

Дальнейшие исследования, проведенные коллективом этих авторов, выявили, что родительское ПТСР, а не воздействие Холокоста, связано с изменениями в функции оси гипоталамус-гипофиз-надпочечники, включая повышенное подавление уровня кортизола после введения дексаметазона и более низкие исходные уровни кортизола в крови потомков (Yehuda et al., 2007, а; Yehuda et al., 2007, б). Следует отметить, что наибольшие изменения в активности ГАС этими авторами были обнаружены у тех потомков, у которых оба родителя страдали ПТСР, тогда как если болели только отцы, то у их взрослых потомков, напротив, чувствительность ГАС к сигналам отрицательной обратной связи снижалась (Yehuda et al., 2008), и это, по мнению авторов, связано с риском развития у таких потомков депрессии.

В экспериментах на крысах было установлено, что более низкая исходная активность ГАС играет решающую роль в формировании долгосрочных нейрональных и гормональных дисбалансов, лежащих в основе поведенческих симптомов, характерных для ПТСР (Cohen et al., 2006, Danan et al., 2021). Эти данные также подтверждают мысль о том, что более низкий уровень активности ГАС может являться фактором риска ПТСР.

Тем не менее, в экспериментальных исследованиях, выполненных на лабораторных грызунах, показано общее снижение активности ГАС у потомков самцов, которые подвергались стрессированию в течение всего периода сперматогенеза (Rodgers et al., 2013), т.е. имели повышенный уровень глюкокортикоидов в крови, а не сниженный как при моделировании ПТСР. Причем этот эффект не зависел от пола потомков и от того, в какой

период онтогенеза (неполовозрелые и взрослые животные) применялись стрессорные процедуры к самцам.

Наши исследования показали, что моделирование ПТСР у самцов в парадигме «стресс-рестресс» приводит к сходным изменениям активности ГАС у их взрослых потомков обоего пола. Мы выявили не только сниженный базальный уровень кортикостерона в крови таких потомков, но и снижение стрессорной реактивности ГАС. Активированная стрессом ГАС потомков отцов с моделированием ПТСР возвращалась к исходному более низкому состоянию в те же сроки, что и у потомков контрольных самцов отцов. Более того, у этих же потомков мы обнаружили повышение экспрессии белка глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе и мПФК. Сходный профиль активности ГАС и уровень глюкокортикоидных рецепторов в исследованных областях мозга были выявлены и у потомков самок отцов, у которых моделировали депрессию. При этом у потомков самцов тех отцов, у которых моделировали депрессию, базальная и стрессорная активность ГАС не изменялась по сравнению с потомками контрольных отцов, но торможение их ГАС после стрессорной активации была отсрочена, о чем свидетельствовал более высокий уровень кортикостерона в их крови через 3 ч после начала стрессирования. Характерно, что у этих самцов мы обнаружили более низкий уровень глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе и мПФК – структурах, ответственных в том числе за торможение стрессорной активности ГАС (McEwen et al., 2016). Другими словами, эффекты моделирования разных психопатологий у самцов отцов на активность ГАС их взрослых потомков различались только в отношении потомков самцов, и были схожи у потомков самок. Складывается впечатление, 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.

Обращает на себя внимание выявленный нами факт более выраженного изменения экспрессии глюкокортикоидных рецепторов во 2-ом слое мПФК по сравнению с 5-ым слоем. Цепь, посредством которой эфферентные проекционные нейроны из мПФК ингибируют нейросекреторную активность гипоталамуса и, соответственно ГАС, включает вторичную активацию тормозных ГАМКергических нейронов в подобластях ядра ложа конечной полоски (BNST) (Radley et al. al., 2009). Слой 5 является основным местом для проекционных нейронов, которые распространяются на подкорковые лимбические структуры, такие как BNST (Gabbott et al., 2005). Вместе с тем, 2-й слой мПФК также участвует в регуляции активности ГАС по механизму отрицательной обратной связи, а его пирамидные нейроны проявляет повышенную чувствительность к глюкокортикоидам (Radley et al., 2008). Нейроны обоих слоев обильно экспрессируют глюкокортикоидные рецепторы. Учитывая эти данные мы полагали, что снижение активности оси гипоталамус-гипофиз-кора надпочечников, выявленное у потомков обоего пола самцов отцов с моделированием ПТСР, и самок – потомков отцов с моделированием депрессии в большей мере отразится на количестве глюкокортикоидных рецепторов в 5-ом слое мПФК, а не во 2-ом. Тем не менее, данный факт представляет определенный интерес для дальнейшего анализа.

В настоящий момент сложно предполагать, с чем может быть связан такой дифференциальный эффект на потомков самцов ПТСР-подобного или депрессивно-подобного состояния их отцов. Отметим, что в упомянутых выше работах Yehuda R. и соавторов не было выявлено значимого гендерного влияния ПТСР родителей на потомков. Более того, было продемонстрировано, что у потомства отцов с посттравматическим стрессовым расстройством наблюдается более высокое метилирование экзона 1_F промотора гена глюкокортикоидного рецептора (*NR3C1*), тогда как у потомства обоих родителей с ПТСР, напротив, более низкое

метилирование. Метилирование промотора глюкокортикоидного рецептора 1_F было в значительной степени связано с большим подавлением секреции кортизола после введения дексаметазона и не зависело от пола потомков (Yehuda et al., 2013). Авторы пришли к заключению, что отцовский посттравматический стресс и материнское ПТСР вероятнее всего имеет различные механизмы трансгенерационной передачи признаков, связанных с травматическими событиями. Может ли сходный механизм, связанный с метилированием ДНК промотора гена глюкокортикоидных рецепторов, быть вовлечен в обнаруженное нами дифференциальное влияние отцовского ПТСР-подобного или депрессивно-подобного состояния на экспрессию белка глюкокортикоидных рецепторов в мозге и соответственное изменение активности ГАС потомков самцов нуждается в дальнейшем исследовании.

Обращает на себя внимание выявленный нами эффект стрессирования самцов отцов на уровень тестостерона их потомков мужского пола, причем сниженный уровень этого стероида наблюдали независимо от того, какой тип стрессорной процедуры использовали: травматический стресс и последующий рестресс, или неизбегаемое стрессорное воздействие. Мы не проводили подробный анализ репродуктивных функций таких потомков – самцов, но полагаем, что сниженный уровень тестостерона у них может свидетельствовать и о сниженном репродуктивном потенциале.

4.4. Влияние ПТСР-подобного или депрессивно-подобного состояния самца-отца на память и экспрессию гена инсулиноподобного фактора роста 2 в мозге потомков

Наши исследования показали, что стрессирование самцов-отцов в парадигме «стресс-рестресс» оказывает существенное влияние на память потомков. Однако у самок и самцов – потомков таких самцов – нарушения памяти проявлялись различным образом.

Межполовые различия в эффектах ПТСР-подобного состояния отца нами обнаружены при исследовании выработки РПИ, где наиболее

существенные изменения были выявлены у потомков-самцов. У этих животных обнаружен дефицит памяти, что проявилось в сниженном латентном периоде захода в темный отсек камеры на следующий день после обучения. При этом самки – потомки стрессированных отцов – отличались от контрольных самок лишь длительностью сохранения памяти в тесте РПИ, поскольку сниженный латентный период захода в темный отсек камеры был обнаружен у подопытных самок через одну и две недели после первого тестирования. При этом депрессивно-подобное состояние самцов-отцов существенного влияния на память потомков обоего пола в тесте РПИ не оказывало.

Значительные изменения в процессах памяти были обнаружены у потомков обоего пола, родившихся от стрессированных самцов в тесте «распознавание нового объекта». Самцы и самки - потомки отцов с ПТСР-подобным состоянием - демонстрировали ухудшение памяти об объектах, что проявлялось в снижении Кр, отражающего различение нового и знакомого объекта. Такое изменение памяти подопытных крыс, вероятнее всего, не связано с изменением их исследовательской активности, так как в «ознакомительную» фазу тестирования они исследовали объекты такое же время, как и потомки контрольных самцов. Кроме того, мы обнаружили влияние стресса отца только на локомоторную активность потомков-самцов в тесте «открытое поле», но не на исследовательскую, оцениваемую по числу вертикальных стоек. При этом у потоков-самок эти показатели ориентировочно-исследовательской активности не менялись. Нельзя исключить, что снижение Кр, свидетельствующие о нарушении памяти об объекте у самцов – потомков самцов-отцов с ПТСР-подобным состоянием, связаны с нарушением внимания у этих животных, учитывая данные, полученные Алфимовой М.В. и соавторами в исследованиях на людях, о роли ИФР2 именно в продуктивности избирательного внимания при зрительном поиске (Алфимова и др., 2012). Следует отметить, что у

потомков отцов с депрессивно-подобным состоянием мы также не обнаружили нарушение распознавания нового объекта.

Снижение экспрессии гена *Igf2* в неокортексе и гиппокампе было выявлено только у самцов, родившихся от самцов-отцов с ПТСР-подобным состоянием, по сравнению с потомками контрольных крыс, тогда как у самок изменений по этому показателю не обнаружено. Примечательно, что у потомков отцов с депрессивно-подобным состоянием память не нарушается, так же, как и экспрессия *Igf2* в гиппокампе. Характерной межполовой особенностью экспрессии гена *Igf2* в мозге явилось более высокая его экспрессия у самок по сравнению с самцами.

В последние годы ИФР2 привлекает пристальное внимание исследователей всего мира в связи с появившимися данными о вовлечении этого ростового фактора в обеспечение когнитивных процессов в норме и при различных патологиях, таких как шизофрения, болезнь Альцгеймера, алкоголизм и некоторых других (Pardo et al. 2019). В исследованиях, выполненных на лабораторных грызунах, было показано, что повышение содержания ИФР2 в гиппокампе при обучении в тесте РПИ является необходимым условием для консолидации памяти и длительности ее сохранения (Chen et al. 2011; Lee et al. 2015). Вовлеченность ИФР2 в процессы, связанные с памятью, подтверждаются и нашими данными, которые демонстрируют ухудшение памяти потомков отцов с ПТСР-подобным состоянием, что сопровождается снижением экспрессии *Igf2* в гиппокампе. Следует отметить, что ухудшение памяти нами выявлено не только в тесте РПИ, который сопровождается отрицательным подкреплением, но и в тесте «распознавание нового объекта». В работах, где изучали участие ИФР2 в гиппокамп-зависимой памяти, использовали преимущественно тесты с отрицательным подкреплением. Мы впервые показали, что этот ростовой фактор может принимать участие и в других видах памяти, например, памяти об объекте, зависящей от гиппокампа и некоторых областей коры (Cinalli et al. 2020). Примечательно, что у потомков

отцов с депрессивно-подобным состоянием память не нарушается, так же, как и экспрессия *Igf2* в гиппокампе.

В литературе имеются указания на значимость неблагоприятных воздействий на организм матери или отца в отношении экспрессии гена *Igf2* в гиппокампе потомков. Так, в исследованиях, где изучали последствия ограничения калорийности питания у самок крыс во время беременности (с 8-21 день), показано повышение экспрессии этого гена в гиппокампе потомков- самок первого и второго поколения, но не потомков-самцов (Harper et al., 2014). Также было проведено исследование, где изучены последствия стрессирования мышей отцов, которое моделировали хроническим введением кортикостерона, на экспрессию *Igf2* в гиппокампе потоков обоего пола (Short et al., 2016). Эти авторы показали, что в возрасте 8 недель у потомков-самок наблюдается снижение экспрессии этого гена, а у потомков – самцов, напротив, повышение. Интересно, что в этом исследовании существенных изменений в поведении и выработке условно-рефлекторной реакции страха у самок этого возраста не обнаружено, тогда как у самцов выявлено повышение уровня тревожности и депрессивности поведения.

Вероятно, подобные различия определяются тем, что в указанных работах авторы использовали разные парадигмы стрессорных воздействий. Кроме того, в этих исследованиях самцов-отцов подвергали воздействиям, создающим хронически повышенный уровень глюкокортикоидных гормонов в крови, тогда как использованная нами парадигма «стресс-рестресс», являющаяся экспериментальной моделью ПТСР, подразумевает применение к крысам комбинированного стресса, который включает несколько последовательно применяющихся стрессорных процедур разной модальности и общей длительности воздействия более 2-х ч, а также повторного стрессорного воздействия через 7 сут, что приводит к длительному снижению уровня кортикостерона в крови (Ордян и др., 2013; Пивина и др., 2014). Однако, что в данном случае является критическим для нарушения

памяти потомков – характер стрессорного воздействия или сниженный уровень кортикостерона в крови отцов – еще предстоит выяснить, т.к. наши исследования не позволяют сделать однозначный вывод.

Интересны обнаруженные нами межполовые различия в экспрессии *Igf2* в гиппокампе и неокортексе половозрелых крыс. В исследованиях Takeo и соавторов показано, что экспрессия *Igf2* в некоторых тканях, в том числе в нейронах гиппокампа, увеличивается под воздействием эстрадиола (Takeo et al., 2009). Именно уровнем эстрадиола, который у половозрелых самок существенно выше, чем у самцов, можно объяснить выявленные нами межполовые различия в экспрессии данного гена в мозге половозрелых животных. Кроме того, показано, что у овариэктомированных крыс улучшение памяти, вызванное введением эстрадиола, сопровождается увеличением количества ИФР2 в гиппокампе (Sárvár et al., 2015). Эти данные дают дополнительную информацию о вовлеченности ИФР2 гиппокампа в процессы, связанные с памятью. Вероятно, отсутствие существенных изменений в формировании памяти у самок в тесте РПИ – потомков стрессированных отцов – определяется, в том числе, сходным с контрольными самками уровнем эстрадиола крови. Может ли у подопытных самцов снижение экспрессии *Igf2* в мозге быть связано со снижением у них уровня тестостерона неизвестно, и хотя многие эффекты тестостерона в мозге самцов реализуются через его ароматизацию и синтез эстрадиола (Cooke et al., 2017; Frick et al., 2018), данные о влиянии уровня тестостерона на *Igf2* в литературе отсутствуют. Однако, у самцов – потомков отцов с депрессивно-подобным состоянием - на фоне сниженного уровня тестостерона экспрессия *Igf2* не изменялась, что в целом свидетельствует о наличие иных механизмов, не связанных с тестостероном, снижения экспрессии *Igf2* в мозге самцов – потомков отцов с депрессивно-подобным состоянием.

Тем не менее, остается неясным вопрос о механизмах нарушения памяти в тесте «распознавание нового объекта» у самок, родившихся от

самцов с ПТСР-подобным состоянием. Следует отметить, что формирование памяти в данном тесте регулируется не только гиппокампом, но и перирональной корой. При этом гиппокамп ответственен за формирование «сильной» памяти в тесте «распознавание нового объекта», а перирональная кора – «слабой» (Cinalli et al., 2020). Использованная нами модификация теста «распознавание нового объекта» подразумевает формирование «слабой» памяти, которая возникает при суммарном исследовании объектов в «ознакомительную» фазу теста около 10 с. При этом «сильная» память развивается при суммарном исследовании двух объектов в «ознакомительную» фазу не менее 38 с, что требует предъявление животным исследуемых объектов в течение не менее 3-х последовательных дней (Cohen et al., 2015).

Механизмы, благодаря которым ИФР2 регулирует память, до сих пор активно обсуждаются. Как известно, ИФР2 может связываться с рецептором ИФР1 и с рецептором самого инсулина (Kolychev 2000). Однако данные, полученные Чен Д. с соавторами, показали, что введение в гиппокамп только ИФР2, но не ИФР1 способствует консолидации памяти и длительности ее сохранения в тесте РПИ (Chen et al. 2011). Роль ИФР2 в формировании памяти об объектах в обоих вариантах неизвестна. Хотя недавно было показано, что эффекты ИФР2 на гиппокамп-зависимую память опосредуются через взаимодействие этого ростового фактора с ИФР2 рецептором, известным как катион-независимый рецептор маннозо-6-фосфата (М6Ф), который специфически связывает ИФР2, но не взаимодействует с ИФР1 и инсулином (Yu et al., 2020). Вовлеченность данного рецептора в гиппокамп-зависимую память эти авторы исследовали не только в отношении выработки РПИ, но и в отношении памяти в тесте «распознавание нового объекта». Выявлено, что мыши с дефицитом гиппокампального М6Ф/ИФР2 рецептора в результате нокдауна хуже различают новый и знакомый объект. Кроме того, эти авторы показали, что связывание данного рецептора с ИФР2 имеет

критическое значение для консолидации памяти, но не влияет на сам процесс обучения и реконсолидацию памяти.

Следует отметить, что М6Ф/ИФР2 рецептор не связан ни с какими вторичными посредниками. Долгое время считалось, что основная функция этого рецептора заключается в транспорте связавшихся с ним молекул в лизосомы и их деградацию (Brown et al., 2009). Тем не менее, Yu с соавторами (Yu et al., 2020) установили, что этот рецептор вовлечен в контроль увеличения синтеза *de novo* в гиппокампе ряда белков, являющихся продуктами ранних генов, таких как *Arc*, *Fos* и *Egr1*, быстрая индукция которых на уровне трансляции и транскрипции наблюдается при обучении. Показано, что такая индукция ранних генов необходима для формирования памяти (Gallo et al., 2018). Тем не менее, мы не обнаружили изменений экспрессии *Igf2r* в гиппокампе самцов, которые демонстрировали нарушения памяти. Вероятно, в данном случае большее значение имеет изначально сниженная экспрессия *Igf2* и, соответственно, самого белка ИФР2 в гиппокампе, количество которого недостаточно для реализации эффектов этого ростового фактора на память даже при неизменном количестве М6Ф/ИФР2Р.

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.

Кроме того, экспрессия импринтированных генов, к которым относится и *Igf2*, строго зависит от метилирования особой регуляторной последовательности на хромосоме, представляющей из себя центр импринтинга (ЦИ). Метилирование ЦИ происходит в период гаметогенеза, его паттерн различен на хромосомах материнского и отцовского происхождения, что определяет специфичность экспрессии генов, находящихся в импринтированном локусе. Ген *Igf2* по-разному метилирован на аллеле отцовского и материнского происхождения, в результате чего его экспрессия осуществляется преимущественно на отцовском аллеле (Nordin et al., 2014). Однако такая моноаллельная экспрессия *Igf2* характерна только для соматических тканей, тогда как в ЦНС наблюдается биаллельная экспрессия данного гена (Ye et al., 2015). Вопрос о том, за счет отцовского или материнского аллеля снижается экспрессия *Igf2* у самцов, родившихся от стрессированных отцов, и наблюдается ли при этом нарушение импринтинга данного гена, требует дальнейших исследований.

Следует подчеркнуть, что нарушение памяти мы обнаружили только у потомков отцов с ПТСР-подобным состоянием, но не депрессивно-подобным состоянием. Эти модели характеризуются различным функциональным состоянием ГАС, что было выявлено при исследовании базального уровня кортикостерона в ходе формирования модельных психопатологий. Преимущественное влияние ПТСР-подобного состояния отцов на потомков мы связываем с интенсивностью стрессорного воздействия, которому подвергали самцов-отцов. В случае моделирования ПТСР использовали комбинированный стресс, который в общей сложности длится больше двух ч, а затем применяли повторное стрессорное воздействие меньшей интенсивности. ПТСР-подобное состояние в этой модели сохраняется длительно, до 30 сут (Pivina et al. 2016). Для индукции депрессивно-подобного состояния использовали однократное неизбегаемое и неконтролируемое стрессорное воздействие в течение 1 ч. За это время животное получало 60 ударов током длительностью 15 сек. По данным

литературы депрессивно-подобное состояние у крыс в этой парадигме сохраняется не более двух недель (Czén et al. 2016). Несмотря на то, что у самцов-отцов в обеих экспериментальных моделях мы выявили снижение уровня тестостерона, вероятно, интенсивность стрессорного воздействия для формирования депрессивно-подобного состояния недостаточна для нарушения процессов, связанных со сперматогенезом, и, в частности, для нарушения эпигенетических процессов при созревании сперматозоидов, которым отводится ведущая роль в трансгенерационном влиянии отцов на потомков (Yeshurun, Hannan, 2019).

Подтверждением данного заключения служат исследования, которые недавно были проведены в нашей лаборатории. Эти исследования были направлены на исследование влияние стресса отца в моделях ПТСР и депрессии на представленность малых РНК (микро- и piwiРНК) в сперме стрессированных животных методом секвенирования следующего поколения (Малышева и др., 2023). У самцов с ПТСР-подобным состоянием по сравнению с группой контроля было выявлено изменение экспрессии 27 piwiРНК и 77 микроРНК. Среди генов-мишеней этих микроРНК можно выделить гены, продукты которых могут быть вовлечены в такие механизмы передачи отцовских эффектов потомству, как изменения метилирования ДНК, модификации гистонов и РНК-интерференции (*Dnmt3a, Setd5, Hdac1, Mllt10, Mtdh*), а также гены, связанные с функционированием инсулиноподобного фактора роста 2, экспрессия которого, как нами было показано, изменена в ЦНС у потомства самцов с ПТСР-подобным состоянием (*Igf2, Igf2bp2, Igf2r*). У самцов со смоделированным депрессивно-подобным состоянием изменения представленности малых РНК были незначительными. Авторы пришли к заключению, что стресса отца оказывает выраженное влиянии на спектр коротких некодирующих РНК в сперматозоидах у крыс, однако данный эффект зависит от характера (силы) стрессорного воздействия.

В исследованиях других авторов также была предпринята попытка оценить влияние стресса самцов на содержание в сперматозоидах некоторых микроРНК. В работе Rogers с соавторами (Rodgers et al., 2013) было обнаружено повышение в сперме самцов мышей, подвергнутых хроническому умеренному стрессу, содержания 9 микроРНК. В исследовании, где самцам мышей хронически вводили кортикостерон, показано увеличение в сперме содержания других микроРНК (miR98, miR144, miR190b) (Short et al., 2016). Gapp с соавторами (Gapp et al., 2014) исследовали экспрессию микроРНК в сперме взрослых мышей, подвергнутых длительному отъему от матери в раннем неонатальном онтогенезе, и обнаружили повышение в ней 5 микроРНК. В работе, выполненной на самцах крыс, которых стрессировали с использованием парадигмы «стресс-рестресс» обнаружено частичное совпадение с этими результатами (Малышева и др., 2023). Так, в наибольшей степени в сперме самцов с ПТСР-подобным состоянием увеличивалась экспрессия miR-375-5p, что также было выявлено в исследованиях Gapp с соавторами и Rogers с соавторами. Повышение экспрессии miR-30 также было отмечено Rogers с соавторами у мышей и в исследовании влияния стресса на спектр микроРНК в сперме у мужчин (Morgan et al., 2020). Несмотря на различия исследованных объектов (мыши, крысы, человек), используемых типов стрессорных воздействий и других деталей, изменение экспрессии некоторых микроРНК при отцовском стрессе, по-видимому, может носить универсальный характер. Это открывает определенные перспективы по поиску тех микроРНК, изменение количества которых в сперме мужчин может служить диагностическим критерием нежелательности зачатия детей в данный момент.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время роль отца в здоровье потомства привлекает все большее внимание исследователей всего мира. История этого вопроса, начавшаяся фактически в 70-е годы прошлого столетия, получила наиболее значительное развитие в последнее десятилетие. В исследованиях учитывают не только образ жизни отца (питание, физическая активность), но и неблагоприятные воздействия окружающей среды, такие как токсиканты и стрессоры различной природы. Психическое состояние отцов также находится в фокусе внимания. Такие исследования, выполненные как в человеческой популяции, так и в эксперименте на лабораторных животных, показали, что отцы, наряду с матерями, могут оказывать влияние на здоровье потомства (Dimofski et al., 2021; Yehuda et al., 2007, б; Rodgers et al.,2015).

В экспериментальных исследованиях большинство авторов используют хронические стрессорные воздействия на самцов-отцов, создающие повышенный уровень глюкокортикоидных гормонов в крови (Dietz et al., 2011; Harker et al., 2018; Rodgers et al., 2013). В наших исследованиях был установлен факт преимущественного влияния ПТСР-подобного состояния самцов крыс в период сперматогенеза на различные физиологические функции их половозрелых потомков. Однако, использованная нами модель ПТСР «стресс-рестресс» создает сниженный уровень кортикостерона в крови, а не повышенный, как в упомянутых выше исследованиях. Возникает вопрос: сама ли по себе стрессорная процедура, предъявленная самцам-отцам, влияет на потомков, или значение имеет тот уровень кортикостерона, который в крови самцов-отцов создается в период созревания сперматозоидов? Последнее представляет определенный интерес в связи с тем, что как повышенный, так и сниженный уровень глюкокортикоидов в крови может оказывает влияние на процесс сперматогенеза (Whirledge et al.,2017).

В связи с этим в данном диссертационном исследовании проведено сравнение эффектов ПТСР-подобного состояния (сниженный уровень

кортикостерона) и депрессивно-подобного состояния (повышенный уровень кортикостерона) самцов-отцов перед спариванием на поведенческий фенотип, память и гормональные функции их половозрелых потомков. Использование в исследовании потомков обоего пола позволило нам выявить определенную секс-зависимую специфичность модельной психопатологии отцов на потомков

Для моделирования ПТСР у самцов крыс мы использовали парадигму «стресс-рестресс», в которой основным воздействием служит травматический комбинированный стресс с последующим дополнительным стрессированием (рестрессс)через 6 сут, но более слабым и менее продолжительным. Рестресс служит триггером для развития стойкого ПТСР-подобного состояния, сопровождающееся снижением уровня кортикостерона и усилением чувствительности ГАС к сигналам отрицательной обратной связи не менее 10 дней. В качестве модели депрессии использовали парадигму «выученная беспомощность», где самцов подвергали часовой электро-кожной стимуляции в режиме неизбегаемости и неконтролируемости. Такое воздействие создает не только повышенный уровень кортикостерона в крови, но и нарушает регуляцию ГАС по механизму отрицательной обратной связи на протяжении не менее 10 дней. В обоих парадигмах по сути используется однократное сильное стрессорное воздействие, что позволяет дифференциально учитывать влияние уровня кортикостерона в крови самцов в процессе сперматогенеза на их потомков. Этому также способствовало то, что физиологические функции потомков отцов, стрессированных с использование двух парадигм, были изучены в однотипных экспериментальных условиях и с использованием сходной методологии.

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 по сравнению с потомками контрольных отцов, но торможение их ГАС после стрессорной активации была нарушена. 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.

Возможность отцовского вклада в потомство у многих видов ограничена сперматозоидами, поэтому в качестве основного механизма действия стресса

отца на различные функции потомков рассматривается эпигенетическая модификация генома в сперматозоидах, связанная с метилированием ДНК, модификацией гистонов и экспрессией микроРНК. Анализируя литературу по данному вопросу, а также учитывая данные по изменению спектра коротких РНК в сперме стрессированных отцов, полученных в нашей лаборатории, 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев В. В., Арестова И.Ю. Морфофункциональное состояние семенников самцов белых крыс при применении седимина на фоне стресса // Вестник Чувашской государственной сельскохозяйственной академии. – 2019. – №. 3. – С. 53-56.
2. Алфимова М.В., Лежейко Т.В., Гриценко И.К., Голимбет В.Е. Ассоциация гена инсулиноподобного фактора роста II (Igf2) с когнитивными способностями человека// Генетика. – 2012. – Т.48, №. 8. – С. 993-998.
3. Амстиславская Т. Г., Попова Н. К. Нейроэндокринные механизмы регуляции полового мотивационного поведения самцов: эффекты неблагоприятных воздействий в разные периоды онтогенеза //Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2009. – Т. 7, №2. – С.3 – 21.
4. Аршифексов С. Б., Артюхин А. А. Состояние органного кровотока в семенниках и придатках самцов крыс в условиях экспериментального венозного тестикулярного блока //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – Т.143, №. 6. – С. 623-627.
5. Бахтюков А. А., Шпаков А. О. Молекулярные механизмы регуляции стероидогенеза в клетках Лейдига //Цитология. – 2016. – Т. 58, №. 9. – С. 666-678
6. Виноградова Е.П., Каргин А.В., Жуков Д.А., Огиенко Н. А. Влияние окситоцина и тиреолиберина на тревожность у самцов белых крыс при социальном стрессе //Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. – 2017. – Т. 67, №. 3. – С. 341-348.
7. Волошин Н. А., Тополенко Т. А. Морфофукциональные особенности формирования яичек крыс от момента рождения до второго месяца жизни //Український морфологічний альманах. – 2009. – Т. 7, №. 2. – С. 32-34.

8. Гусакова Е. А., Городецкая И. В. Значение глюкокортикоидов в организации стресс-реакции организма //Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2020. – Т. 19, №. 1. – С.24 – 35;
9. Дроздов А. Л., Иванков В. Н. Морфология гамет животных. Значение для систематики и филогенетики. – 2000. – 460 с.
10. Жуков А.Д. Биологические основы поведения. Санкт-Петербург. – 2004. –458 с
11. Коваленко И.Л., Вишнивецкая Г.Б., Бондарь Н.П., Кудрявцева Н.Н. Снижение потребления раствора сахарозы мышами линии CBA/LAC в условиях хронического социального стресса //Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. – 2010. – Т. 60, № 5 . – С. 609-614.
12. Кубасов Р. В., Барачевский Ю.Е., Лупачев В.В. Функциональные изменения гипофизарно-гонадного и тиреоидного эндокринных звеньев в ответ на стрессовые факторы //Фундаментальные исследования. – 2014. – Т. 5, №. 10. – С.1010 - 1014.
13. Лихоносов Н.П., Аюб А.Х., Бабенко А.Ю., Боровец С.Ю. Роль ингибина В в регуляции сперматогенеза и его клиническая значимость при мужском бесплодии //Урологические ведомости. – 2019. – Т. 9, №. 1.– С.39 – 45.
14. Малышева О.В., Пивина С.Г., Пономарева Е.Н., Ордян Н.Э. Изменение содержания малых некодирующие РНК в сперматозидах как возможный механизм трансгенерационной передачи эффектов отцовского стресса: экспериментальное исследование// Цитология.- 2023. – Т. 65, №1 .- С. 28-38)
15. Маркель А. Л., Галактионов Ю. К., Ефимов В. М. Факторный анализ поведения крыс в тесте открытого поля //Журн. высш. нервн. деятельности. – 1988. – Т. 38, №. 5. – С. 855-863.

16. Ноздрачев А. Д., Поляков Е. Л. Анатомия крысы (лабораторные животные) //СПб.: Лань. – 2001. – С. 159.
17. Ордян Н.Э., Смоленский И.В., Пивина С.Г.,Акулова В.К. Особенности формирования тревожно-депрессивного состояния в экспериментальной модели посттравматического стрессового расстройства у пренатально стрессированных самцов крыс //Журнал высшей нервной деятельности им. ИП Павлова. – 2013. – Т. 63, №. 2. – С. 280-280.
18. Пивина С.Г., Акулова В.К., Ракицкая В.В., Ордян Н.Э. Развитие поведенческих и гормональных нарушений в экспериментальной модели постравматического стрессового расстройства у пренатально стрессированных самок крыс //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – Т. 157, №. 3. – С. 289-293.
19. Пивина С.Г., Ракицкая В.В., Акулова В.К., Ордян Н.Э. Характеристика активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы пренатально стрессированных самцов крыс в экспериментальной модели депрессии//Журнал эволюционной биохимии и физиологии. - 2016.- Т. 52, №1. – С. 52-57.
20. Плехова, Е. И., Хижняк О. О., Левчук Л. П. Задержка полового развития мальчиков //М.: Знание. – 2000. – 112 с.
21. Реунов А. А. Проблема терминологии в характеристике сперматозоидов многоклеточных животных //Онтогенез. – 2005. – Т. 36, № 6. – С. 403-421.
22. Филаретова Л. П., Морозова О. Ю. От гипоталамической регуляций гипофизарно- адренокортикальной системы к участию глюкокортикоидных гормонов в гастропротективном действии кортикотропин-релизинг фактора //Российский физиологический журнал им. ИМ Сеченова. – 2022. – Т. 108, №. 12. – С.1559–1574.
23. Чернышова М.П. Гормоны животных. -1995. -СПб.: Глаголъ. 296с.

24. Шаляпина В.Г., Шабанов П.Д. Основы нейроэндокринологии // СПб.: Элби-СПб, 2005. – С.84-146.
25. Шпаков А.О.Регуляция и молекулярные механизмы функционирования гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси // Санкт-Петербург: Издательство Политехнического университета. – 2017. 284 с.
26. Юматов Е.А., Мещерякова О.А. Прогнозирование устойчивости к эмоциональному стрессу на основе индивидуального тестирования поведения. //журн. Высш. Нервн. Деят. – 1990. – Т .40, №3. – С.575-579.
27. Agarwal A, Rana M, Qiu E, AlBunni H, Bui AD, Henkel R. Role of oxidative stress, infection and inflammation in male infertility //Andrologia. – 2018. – V. 50, №.11. – P. 13126.
28. Aguilera G, Ochedalski T, Subburaju S, Wynn P C. Interaction between oestrogen and oxytocin on hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity// Journal of Neuroendocrinology. – 2007. –V.19, №3. – P.189-197.
29. Aguilera G., Kiss A., Liu Y., Kamitakahara A. Negative regulation of corticotropin releasing factor expression and limitation of stress response// Stress. –2007. –V.10, №2. – P.153-161.
30. Aguilera G., Rabadan-Deihl C. Vasopressinergic regulation of the hipothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for stress adaptation // Regulatory peptides. – 2000. – V. 96, № (1-2). – P.23-29.
31. Alexander BT, Dasinger JH, Intapad S. Fetal programming and cardiovascular pathology//Compr Physiol. – 2015 . –V5, №2. – P. 997-1025.
32. Andreasen, N. C. What is post-traumatic stress disorder?//Dialogues in clinical neuroscience. – 2011. – V.13, №3– P.240-243.
33. Antelman SM, Caggiula AR, Kocan D, Knopf S, Meyer D, Edwards DJ, Barry H 3rd. One experience with 'lower' or 'higher' intensity stressors, respectively enhances or diminishes responsiveness to haloperidol weeks later: implications for understanding drug variability// Brain Res. – 1991. – V.566, № (1-2). – P.276-283.

34. Antelman SM, Knopf S, Caggiula AR, Kocan D, Lysle DT, Edwards DJ. Stress and enhanced dopamine utilization in the frontal cortex: the myth and the reality// Ann N Y Acad Sci. – 1988. – V.537. –P.262-272.
35. Antoniuk S, Bijata M, Ponimaskin E, Wlodarczyk J. Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: Meta-analysis of model reliability// Neurosci Biobehav Rev. – 2019. –V.99. – P.101-116.
36. Arendt DH, Smith JP, Bastida CC, Prasad MS, Oliver KD, Eyster KM, Summers TR, Delville Y, Summers CH. Contrasting hippocampal and amygdalar expression of genes related to neural plasticity during escape from social aggression//Physiol Behav. – 2012. – V.107, №5 – P.670-679.
37. Armario A, Marti O, Vallès A, Dal-Zotto S, Ons S. Long-term effects of a single exposure to immobilization on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: neurobiologic mechanisms //Ann N Y Acad Sci .– 2004.–V.1018, №1. –P.162-172.
38. Baker S, Rees S, Chebli M, Lemarec N, Godbout R, Huta V, Bielajew C. Effects of gestational stress: 2. Evaluation of male and female adult offspring // Brain Res.– 2009 .–V.1302. –P.194-204.
39. Bale TL. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development// Nat Rev Neurosci.– 2015.–V.16, №6. –P.332-344.
40. Bale TL. Lifetime stress experience: transgenerational epigenetics and germ cell programming// Dialogues Clin Neurosci. – 2014. –V16, №3. – P. 297-305.
41. Bale TL. The placenta and neurodevelopment: sex differences in prenatal vulnerability//Dialogues Clin Neurosci. – 2016. – V.18, №4.–P. 459 – 464.
42. Beckham C.F., Chaby L.E., Daskalakis N.P. , Knox D., Liberzon I., Lim M.M., McIntyre C. , Perrine S.A., Risbrough V.B., Sabban E.L., Jeromin A., Haas M. Systematic review and methodological considerations for the use of Single Prolonged Stress and fear extinction retention in rodents// Front Behav Neurosci.– 2021.– V.15. –P.652-636.

43. Bell A. M., McGhee K. E., Stein L.R. Effects of mothers' and fathers' experience with predation risk on the behavioral development of their offspring in threespined sticklebacks//Current opinion in behavioral sciences.–2016.–V.7.–P. 28-32.
44. Belujon P, Grace AA. Dopamine System Dysregulation in Major Depressive Disorders // Int J Neuropsychopharmacol. 2017.–V.20, № 12.–P.1036-1046.
45. Belzung C. Measuring exploratory behavior // In: Handbook of molecular genetic techniques for brain and behavior research (Techniques in the behavioral and neural sciences) // Eds.: W.E. Crusio, R.T. Gerlai. Elsevier, Amsterdam . – 1999. –V.13. – P. 738-749.
46. Bhongade MB, Prasad S, Jiloha RC, Ray PC, Mohapatra S, Koner BC. Effect of psychological stress on fertility hormones and seminal quality in male partners of infertile couples //Andrologia .–2015. –V. 47, №. 3.–P. 336-342.
47. Bisson J.I., Cosgrove S., Lewis C., Roberts N.P. Post-traumatic stress disorder// BMJ. – 2015. – 351.
48. Blair RS, Acca GM, Tsao B, Stevens N, Maren S, Nagaya N. Estrous cycle contributes to state-dependent contextual fear in female rats // Psychoneuroendocrinology. –2022. –V.141:105776. doi: 10.1016/j.psyneuen.2022.105776.
49. Boos A, Kohtes J, Janssen V, Mülling C, Stelljes A, Zerbe H, Hässig M, Thole HH. Pregnancy effects on distribution of progesterone receptors, oestrogen receptor alpha, glucocorticoid receptors, Ki-67 antigen and apoptosis in the bovine interplacentomal uterine wall and foetal membranes// Anim Reprod Sci. – 2006. –V.91, №(1-2). – P.55-76.
50. Braithwaite EC, Hill J, Pickles A, Glover V, O'Donnell K, Sharp H. Associations between maternal prenatal cortisol and fetal growth are specific to infant sex: findings from the Wirral Child Health and Development Study// J Dev Orig Health Dis. – 2018 . –V9, №4. – P.425-431.

51. Brewin CR. Autobiographical memory for trauma: update on four controversies //Memory. – 2007.–V.15, №. 3.–P.227-248.
52. Brown J, Jones EY, Forbes BE. Interactions of IGF-II with the IGF2R/cation-independent mannose-6-phosphate receptor mechanism and biological outcomes// Vitam Horm. – 2009 .–V.80.–P.699-719.
53. Brydges NM, Jin R, Seckl J, Holmes MC, Drake AJ, Hall J. Juvenile stress enhances anxiety and alters corticosteroid receptor expression in adulthood//Brain Behav. – 2014.–V.4, №.1.–P.4-13.
54. Cannon W.B. The emergency function of the adrenal medulla in pain andthe major emotions //Am J Physiol. –1914.– V.33. – P.356–372.
55. Carvalho LA, Pariante CM. In vitro modulation of the glucocorticoid receptor by antidepressants // Stress. – 2008 .–V11, №6. – P. 411-424.
56. Chandran UR, Warren BS, Baumann CT, Hager GL, DeFranco D B. The glucocorticoid receptor is tethered to DNA-bound Oct-1 at the mouse gonadotropin-releasing hormone distal negative glucocorticoid response element // J. Bio.l Chem.– 1999.–V.274, №. 4.–P. 2372–2378.
57. Chandran UR, Attardi B, Friedman R, Dong KW, Roberts JL, DeFranco DB. Glucocorticoid receptor-mediated repression of gonadotropin-releasing hormone promoter activity in GT1 hypothalamic cell lines// Endocrinology. – 1994. – V.134, №.3. – P.1467–1474.
58. Chen DY, Stern SA, Garcia-Osta A, Saunier-Rebori B, Pollonini G, Bambah-Mukku D, Blitzer RD, Alberini CM. A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement // Nature . –2011.–V.469, №.7331.– P.491-497.
59. Chen J, Wang ZZ, Zhang S, Zuo W, Chen NH. Does mineralocorticoid receptor play a vital role in the development of depressive disorder?// Life Sci. – 2016. – V.152. – P.76-81.
60. Chen Q, Yan M, Cao Z, Li X, Zhang Y, Shi J, Feng GH, Peng H, Zhang X, Zhang Y, Qian J, Duan E, Zhai Q, Zhou Q. Sperm tsRNAs contribute to

intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder//Science.– 2016 .–V.351,№6271.–P.397–400.

61. Chen X., Li X., Guo J., Zhang P. and Zeng W. The roles of microRNAs in regulation of mammalian spermatogenesis //Journal of Animal Science and Biotechnology. –2017.–V.8, №.1.– P. 1-8.
62. Chrousos G.P., Gold P.W., The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis // JAMA .– 1992. – V.267, №9 .– P.1244 –1252.
63. Cinalli DA Jr, Cohen SJ, Guthrie K, Stackman RW Jr. Object Recognition Memory: Distinct Yet Complementary Roles of the Mouse CA1 and Perirhinal Cortex // Front Mol Neurosci .– 2020. – V.13.– article 527543. doi: 10.3389/fnmol.2020.527543. PMID: 33192287
64. Cohen H, Matar MA, Richter-Levin G, Zohar J. The contribution of an animal model toward uncovering biological risk factors for PTSD// Ann N Y Acad Sci. – 2006. –V1071. – P.335-350.
65. Cohen H, Zohar J, Matar M. The relevance of differential response to trauma in an animal model of posttraumatic stress disorder// Biol Psychiatry. – 2003. – V.53, №6.–P. 463-473.
66. Cohen H., Yehuda R. Gender Differences in Animal Models of Posttraumatic Stress Disorder // Disease Markers.–2011.–V.30,№(2–3). – P.141–150.
67. Cohen SJ, Munchow AH, Rios LM, Zhang G, Asgeirsdóttir HN, Stackman RW Jr. The rodent hippocampus is essential for nonspatial object memory // Curr Biol. – 2013. –V.23, №17. – P.1685-1690.
68. Cohen SJ, Stackman RW Jr. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review // Behav Brain Res. – 2015. – V.285. – P.105-117.
69. Cooke PS, Nanjappa MK, Ko C, Prins GS, Hess RA. Estrogens in Male Physiology// Physiol Rev. – 2017. –V97, №3. – P.995-1043.

70. Cunningham AM, Walker DM, Nestler EJ. Paternal transgenerational epigenetic mechanisms mediating stress phenotypes of offspring //European Journal of Neuroscience. – 2021. – V. 53, №1. – P. 271-280.
71. Czech B, Munafò M, Ciabrelli F, Eastwood EL, Fabry MH, Kneuss E, Hannon GJ. piRNA-Guided Genome Defense: From Biogenesis to Silencing //Annu Rev Genet. – 2018. – V. 52. – P. 131-157.
72. Czén B., Fuchs E., Wiborg O., Simon M. Animal models of major depression and their clinical implications // Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.– 2016. – V.64. – P. 293-310.
73. Dai J. B., Wang Z. X., Qiao Z. D. The hazardous effects of tobacco smoking on male fertility //Asian journal of andrology. – 2015. – V.17 , №. 6. – P. 954-960.
74. Danan D, Todder D, Zohar J, Cohen H. Is PTSD-Phenotype Associated with HPA-Axis Sensitivity? Feedback Inhibition and Other Modulating Factors of Glucocorticoid Signaling Dynamics // Int J Mol Sci. – 2021. –V22, №11. – P.6050. doi: 10.3390/ijms22116050
75. Darnaudéry M, Maccari S. Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress// Brain Res Rev. – 2008. – V.57 , №. 2. – P.571-585.
76. Daskalakis NP, Cohen H, Cai G, Buxbaum JD, Yehuda R. Expression profiling associates blood and brain glucocorticoid receptor signaling with trauma-related individual differences in both sexes// Proc Natl Acad Sci U S A. – 2014. – V.111 , №. 37. – P.13529-13534.
77. Davis EP, Glynn LM, Waffarn F, Sandman CA. Prenatal maternal stress programs infant stress regulation // J Child Psychol Psychiatry. – 2011. – V.52 , №. 2. – P.119-129.
78. Day J, Savani S, Krempley BD, Nguyen M, Kitlinska JB. Influence of paternal preconception exposures on their offspring: through epigenetics to phenotype// Am. J. Stem Cells. – 2016. –V5, №1. – P.11-18.

79. deKloet E. R., Derijk R., Signaling pathways in brain involved in predisposition and pathogenesis of stress-related disease: genetic and kinetic factors affecting the MR/GR balance// Ann N Y Acad Sci. –2004. – V.1032. – P.14–34.
80. deKloet E.R., Joels M., Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease// Nat Rev Neurosci. – 2005. –V.6, №6. – P.463–475.
81. Dietz D.M., LaPlant Q., Watts E.L., Hodes G.E., Russo S.J., Feng J., Oosting R.S., Vialou S., Nestler E.J. Paternal transmission of stress-induced pathologies // Biol Psychiatry.– 2011. – V. 70, №. 5. – P. 408-414.
82. Dimofski P, Meyre D, Dreumont N, Leininger-Muller B. Consequences of Paternal Nutrition on Offspring Health and Disease// Nutrients. – 2021. – V13, №8. – P. 2818.
83. Dinesh Yadav DM, Muralidhar MN, Prasad SMVK, Rajender Rao K. Pre-pubertal diet restriction reduces reactive oxygen species and restores fertility in male WNIN/Obese rat // Andrologia. – 2018. – V.50, №2– P.128-149.
84. Dubey A.K., Plant T.M. A suppression of gonadotropin secretion by cortisol in castrated male rhesus monkeys (Macaca mulatta) mediated by the interruption of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone release // Biol Reprod. – 1985. – V. 33, № 2. – P. 423-431.
85. Duffy K.A., Bale T.L., Epperson C.N. Germ cell drivers: Transmission of preconception stress across generations // Front. Hum. Neurosci.–2021. – V.15. –P.642–762.
86. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data // Behav Brain Res.–1988. – V. 31, №1. – P. 47-59.
87. Erfani Majd N, Sadeghi N, Tavalaee M, Tabandeh MR, Nasr-Esfahani MH. Evaluation of Oxidative Stress in Testis and Sperm of Rat Following Induced Varicocele // Urol J.–2019. – V. 16, №3. – P. 300-306.

88. Finsterwald C, Alberini CM. Stress and glucocorticoid receptor-dependent mechanisms in long-term memory: from adaptive responses to psychopathologies // Neurobiol Learn Mem.–2014. – V. 112. – P.17-29.
89. Flint J., Kendler K.S. The genetics of major depression // Neuron. 2014. – V.81, №. 3.–P.484-503.
90. Foa EB, Zinbarg R, Rothbaum BO. Uncontrollability and unpredictability in post-traumatic stress disorder: an animal model // Psychol Bull .–1992.– V. 112, №. 2. – P. 218-238.
91. Franklin T. B., Russig H.,Weiss I.C., Gräff J., Linder N., Michalon A.,Vizi S.,Mansuy I. M. Epigenetic transmissionof the impact of early stress across generations. // Biol. Psychiatry. – 2010. –V.68, №5.–P.408–415.
92. Franz AP, Bolat GU, Bolat H, Matijasevich A, Santos IS, Silveira RC, Procianoy RS, Rohde LA, Moreira-Maia CR. Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Very Preterm/Very Low Birth Weight: A Meta-analysis // Pediatrics. – 2018. –V141, №1:e20171645 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29255083/
93. Frick KM, Tuscher JJ, Koss WA, Kim J, Taxier LR. Estrogenic regulation of memory consolidation: A look beyond the hippocampus, ovaries, and females// Physiol Behav. – 2018. –V187, №1. – P. 57-66
94. Fromer M, Roussos P, Sieberts SK, Johnson JS, Kavanagh DH, Perumal TM, Ruderfer DM, Oh EC, Topol A, Shah HR, Klei LL, Kramer R, Pinto D, Gümüş ZH, Cicek AE, Dang KK, Browne A, Lu C, Xie L, Readhead B, Stahl EA, Xiao J, Parvizi M, Hamamsy T, Fullard JF, Wang YC, Mahajan MC, Derry JM, Dudley JT, Hemby SE, Logsdon BA, Talbot K, Raj T, Bennett DA, De Jager PL, Zhu J, Zhang B, Sullivan PF, Chess A, Purcell SM, Shinobu LA, Mangravite LM, Toyoshiba H, Gur RE, Hahn CG, Lewis DA, Haroutunian V, Peters MA, Lipska BK, Buxbaum JD, Schadt EE, Hirai K, Roeder K, Brennand KJ, Katsanis N, Domenici E, Devlin B, Sklar P. Gene expression elucidates functional impact of polygenic risk for schizophrenia // Nat Neurosci. – 2016. –V19, №11. – P.1442-1453.

95. Fullston T, Ohlsson Teague EM, Palmer NO, DeBlasio MJ, Mitchell M, Corbett M, Print CG, Owens JA, Lane M. Paternal obesity initiates metabolic disturbances in two generations of mice with incomplete penetrance to the F2 generation and alters the transcriptional profile of testis and sperm microRNA content // FASEB J. – 2013. –V27,№10. – P.4226-4243.
96. Gabbott PL, Warner TA, Jays PR, Salway P, Busby SJ. Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers// J Comp Neurol. – 2005. –V492 №2. – P.145-177.
97. Galeeva A, Pelto-Huikko M, Pivina S, Ordyan N. Postnatal ontogeny of the glucocorticoid receptor in the hippocampus // Vitam Horm. – 2010. –V.82.– P.367-389.
98. Gallo FT, Katche C, Morici JF, Medina JH, Weisstaub NV. Immediate Early Genes, Memory and Psychiatric Disorders: Focus on c-Fos, Egr1 and Arc// Front Behav Neurosci. – 2018. –V12, №79. doi: 10.3389/fnbeh.2018.00079. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29755331/
99. Gao HB, Tong MH, Hu YQ, You HY, Guo QS, Ge RS, Hardy MP. Mechanisms of glucocorticoid-induced Leydig cell apoptosis// Mol Cell Endocrinol. – 2003. –V199, №(1-2). – P.199153-199163.
100. Gapp K, Jawaid A, Sarkies P, Bohacek J, Pelczar P, Prados J, Farinelli L, Miska E, Mansuy IM. Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice// Nat Neurosci. – 2014 . – V17, №5. – P.667-669.
101. Gass P, Reichardt HM, Strekalova T, Henn F, Tronche F. Mice with targeted mutations of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors: models for depression and anxiety ? // Physiol Behav . – 2001. –V.73, №5. – P. 811–825.
102. George SA, Rodriguez-Santiago M, Riley J, Rodriguez E, Liberzon I. The effect of chronic phenytoin administration on single prolonged stress induced extinction retention deficits and glucocorticoid upregulation in the

rat medial prefrontal cortex // Psychopharmacology (Berl). –2015. –V. 232, №. 1. – P. 47-56.

103. Giguère V, Tremblay A, Tremblay GB. Estrogen receptor beta: re-evaluation of estrogen and antiestrogen signaling // Steroids. –1998. –V. 63, №. (5-6). – P.335-339.
104. Gluckman PD, Hanson MA. The developmental origins of the metabolic syndrome //Trends Endocrinol Metab. – 2004 . –V15, №4. – P.183-187.
105. Godia M., Swanson G., Krawetz S. A. A history of why fathers'. RNA matters // Biol. Reprod .–2018.–V. 99, №. 1.–P.147-159.
106. Gollenberg A.L., Liu F., Brazil C., Drobnis E.Z., Guzick D., Overstreet J.W., et al. Semen quality in fertile men in relation to psychosocial stress. Fertil Steril.–2010.–V. 93, № 4. –P.1104 –1111.
107. Gollenberg AL, Hediger ML, Mumford SL, Whitcomb BW, Hovey KM, Wactawski-Wende J, Schisterman EF. Perceived stress and severity of perimenstrual symptoms: the BioCycle Study// J Womens Health. – 2010. – V19, №5. – P .959-967.
108. Green AS, Rozance PJ, Limesand SW. Consequences of a compromised intrauterine environment on islet function // J Endocrinol. – 2010 . –V205, №3. – P.211-224.
109. Green M. R., McCormick M. R. Sex and stress steroids in adolescence: gonadal regulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the rat //General and comparative endocrinology. – 2016. – V. 234. – P. 110-116.
110. Guo L, Chao SB, Xiao L, Wang ZB, Meng TG, Li YY, Han ZM, Ouyang YC, Hou Y, Sun QY, Ou XH. Sperm-carried RNAs play critical roles in mouse embryonic development //Oncotarget.– 2017.–V.8, № 40 .–P. 67394–67405.
111. Hardy MP, Gao HB, Dong Q, Ge R, Wang Q, Chai WR, Feng X, Sottas C. Stress hormone and male reproductive function // Cell Tissue Res .–2005. – V.322, №1.–P.147-153.

112. Harker A, Carroll C, Raza S, Kolb B, Gibb R. Preconception Paternal Stress in Rats Alters Brain and Behavior in Offspring //Neuroscience.– 2018.– V.388.– P.474-485.
113. Harper KM, Tunc-Ozcan E, Graf EN, Herzing LB, Redei EE. Intergenerational and parent of origin effects of maternal calorie restriction on Igf2 expression in the adult rat hippocampus // Psychoneuroendocrinology. – 2014 . –V45. – P.187-191.
114. Harris A, Seckl J. Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease//Horm Behav). –2011. –V. 59, №. 3. – P.279-289.
115. Harris A.P., Holmes M.C., de Kloet E.R., Chapman K.E., Seckl J.R. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor balance in control of HPA axis and behavior // Psychoneuroedocrinol.–2013.–V.38, №5.–P.648-658.
116. Harvey BH, Brand L, Jeeva Z, Stein DJ. Cortical/hippocampal monoamines, HPA-axis changes and aversive behavior following stress and restress in an animal model of post-traumatic stress disorder// Physiology and Behavior. – 2006. –V.87, №5. – P.881-890.
117. Harvey BH, Naciti C, Brand L, Stein DJ. Endocrine, cognitive and hippocampal/cortical 5HT 1A/2A receptor changes evoked by a time-dependent sensitisation (TDS) stress model in rats// Brain Res . – 2003. – V.983, №1-2. – P. 97-107.
118. He F, Wang Z, Guo G. Postnatal separation prevents the development of prenatal stress-induced anxiety in association with changes in oestrogen receptor and oxytocin immunoreactivity in female mandarin vole (Microtus mandarinus) offspring // Eur J Neurosci. – 2018. –V.47, №1. – P.95-108.
119. He N., Kong Q, Zuo Wang J, Ning S, Miao Y, Yuan H, Gong S, Cui X, Li C and HeTan J . Parental life events cause behavioral difference among offspring: adult pre-gestational restraint stress reduces anxiety across generations //Scientific reports. – 2016. – V.6, №1. – P.1-12.
120. Heim C, Nemeroff CB. Neurobiology of posttraumatic stress disorder //CNS Spectr.– 2009 .– V.14,(1 Suppl 1).–P.13-24.

121. Henkel V, Bussfeld P, Möller HJ, Hegerl U. Cognitive-behavioural theories of helplessness/hopelessness: valid models of depression? // Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci. –2002.–V.252, №5. – P. 240-249.
122. Herbison AE. Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons // Nat Rev Endocrinol. –2016.–V.12, №. 8.– P.452-466.
123. Herman JP, McKlveen JM, Solomon MB, Carvalho-Netto E, Myers B. Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanisms // Braz J Med Biol Res. –2012.–V.45, №4. – P.292-298.
124. Hess RA, Moore BJ. Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In book: Methods in Reproductive Toxicology. Publisher: Academic Press. 1993. P. 52-85.
125. Hill MN, Hellemans KG, Verma P, Gorzalka BB, Weinberg J. Neurobiology of chronic mild stress: parallels to major depression // Neurosci Biobehav Rev.– 2012 .– V. 36, №9. –P.2085-2117.
126. Hilz S, Modzelewski AJ, Cohen PE, Grimson A. The roles of microRNAs and siRNAs in mammalian spermatogenesis // Development. –2016. – V. 143, №. 17. – P. 3061-3073.
127. Hinkelmann K, Hellmann-Regen J, Wingenfeld K, Kuehl LK, Mews M, Fleischer J, Heuser I, Otte C. Mineralocorticoid receptor function in depressed patients and healthy individuals// Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. –2016. – V. 71. – P.183-188.
128. Hiroi R, Neumaier JF. Differential effects of ovarian steroids on anxiety versus fear as measured by open field test and fear-potentiated startle // Behav Brain Res. – 2006. –V.166, №1. – P.93-100.
129. Holl C.S. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity // J. Comp. Physiol. – 1936. – V.22. – P.345-352.
130. Hollis F, Kabbaj M. Social defeat as an animal model for depression // ILAR J.–2014.–V. 55. – №. 2. – P.221-232.

131. Horst J.P.T., Van der M.M.H., Arp M., Berger S., de Kloet E.R., Oitzl M.S. Stress or no stress: mineralocorticoid receptors in the forebrain regulate behavioral adaptation // Neurobiol Learn Mem .–2012.–V. 98. – №. 1. – P.33-40.
132. Hu GX, Lian QQ, Lin H, Latif SA, Morris DJ, Hardy MP, Ge RS. Rapid mechanisms of glucocorticoid signaling in the Leydig cell // Steroids. – 2008. –V73, № (9-10). – P. 1018-1024.
133. Ilacqua A., Izzo G., Emerenziani G.P., Baldari C., Aversa A.. Lifestyle and fertility: the influence of stress and quality of life on male fertility / //Reproductive Biology and Endocrinology. – 2018. – . V.16, №1.–P. 115.
134. Iribarren J., Prolo P., Neagos N., Chiappelli F. Post-Traumatic Stress Disorder: Evidence-Based Research for the Third Millennium. Evid. Based Complement //Altern. Med.–2005.–V.2, №4.–P.503–512.
135. Iwasa T, Matsuzaki T, Yano K, Irahara M. Gonadotropin-Inhibitory Hormone Plays Roles in Stress-Induced Reproductive Dysfunction // Front Endocrinol (Lausanne).–2017.–V.8:62. doi: 10.3389/fendo.2017.00062.
136. Jiang X., Wang J., Luo T., Li Q. Impaired hypothalamic-pituitary-adrenal axis and its feedback regulation in serotonin transporter knockout mice //Psychoneuroendocrinology .–2009.–V.34, №.3.–P.317-331.
137. Jodar M, Selvaraju S, Sendler E, Diamond MP, Krawetz SA. The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs // Hum Reprod Update.– 2013.– V.19, №6.–P.604-624.
138. Kaati G, Bygren LO, Pembrey M, Sjöström M. Transgenerational response to nutrition, early life circumstances and longevity// Eur.J. Hum. Genetics.– 2007.–V.15, №. 7. – P. 784-790.
139. Kaati1 G., Bygren L.O. , Edvinsson S. Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period // Eur.J. Hum. Genetics .–2002.–V.10.–№.11.–P.682-688.
140. Kamalidehghan B, Habibi M, Afjeh SS, Shoai M, Alidoost S, Almasi Ghale R, Eshghifar N, Pouresmaeili F. The Importance of Small Non-Coding

RNAs in Human Reproduction: A Review Article // Appl Clin Genet. – 2020. – V.13 . – P. 1-11 .

141. Kendler KS, Myers J. The boundaries of the internalizing and externalizing genetic spectra in men and women. Psychol Med. – 2014. –V44, №3. – P.647-655.
142. Kéri S. Trauma and Remembering: From Neuronal Circuits to Molecules // Life (Basel).– 2022.–V.12, №.11.–P.1707.
143. Kirby ED, Geraghty AC, Ubuka T, Bentley GE, Kaufer D. Stress increases putative gonadotropin inhibitory hormone and decreases luteinizing hormone in male rats // Proc Natl Acad Sci U S A.–2009. –V. 106, №. 27.– P.11324-11329.
144. Klengel T, Dias BG, Ressler KJ. Models of Intergenerational and Transgenerational Transmission of Risk for Psychopathology in Mice // Neuropsychopharmacology.–2016.–V.41, №.1.–P.219-231.
145. Koebele SV, Hiroi R, Plumley ZMT, Melikian R, Prakapenka AV, Patel S, Carson C, Kirby D, Mennenga SE, Mayer LP, Dyer CA, Bimonte-Nelson HA. Clinically Used Hormone Formulations Differentially Impact Memory, Anxiety-Like, and Depressive-Like Behaviors in a Rat Model of Transitional Menopause //Front Behav Neurosci. – 2021. –V.15: 696838. doi: 10.3389/fnbeh.2021.696838.
146. Kolychev, A. P. Insulin-like growth factor II (IGF-II). Its role among regulatory peptides of the insulin superfamily // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology.–2000.–V.36, №.2.–P. 91–110.
147. Koning ACAM, Buurstede JC, van Weert LTCM, Meijer OC. Glucocorticoid and Mineralocorticoid Receptors in the Brain: A Transcriptional Perspective // J Endocr Soc.–2019. –V.3, №10. – P.1917-1930.
148. Kudielka BM, Kirschbaum C. Sex differences in HPA axis responses to stress: a review // Biol Psychol.–2005. –V.69, №1. – P.113-132.

149. Lee Y., Lee Y.W., Gao Q., Lee Y., Lee H.E., Ryu J.H. Exogenous insulin-like growth factor 2 administration enhances memory consolidation and persistence in a time-dependent manner// Brain Res. – 2015. –V1622. – P. 466–473.
150. Lehrner A, Bierer LM, Passarelli V, Pratchett LC, Flory JD, Bader HN, Harris IR, Bedi A, Daskalakis NP, Makotkine I, Yehuda R. Maternal PTSD associates with greater glucocorticoid sensitivity in offspring of Holocaust survivors // Psychoneuroendocrinology. 2014. –V.40. – P.213-220.
151. Liberzon I., Krstov M., Young E. A. Stress-restress: effects on ACTH and fast feedback //Psychoneuroendocrinology. –1997.–V. 22, №. 6. – P. 443-453.
152. Lightman SL. The neuroendocrinology of stress: a never ending story// J Neuroendocrinol.– 2008. –V20, №6. – P.880-884.
153. Lo Lordo V. M. Learned helplessness and depression/ Animal Research and Human Health// Ed. Carroll M.E., Overmier J.B., Washington D.C // Am. Psychol. Assoc.– 2001.– P. 63–77.
154. López JF, Chalmers DT, Little KY, Watson SJ. A.E. Bennett Research Award. Regulation of serotonin1A, glucocorticoid, and mineralocorticoid receptor in rat and human hippocampus: implications for the neurobiology of depression // Biol Psychiatry.–1998.–V.43, №.8.–P.547-573.
155. Loret de Mola C, de França GV, Quevedo Lde A, Horta BL. Low birth weight, preterm birth and small for gestational age association with adult depression: systematic review and meta-analysis // Br J Psychiatry. – 2014 . –V205, №5. – P.340-347.
156. Lund TD, Hinds LR, Handa RJ. The androgen 5alpha-dihydrotestosterone and its metabolite 5alpha-androstan-3beta, 17beta-diol inhibit the hypothalamo-pituitary-adrenal response to stress by acting through estrogen receptor beta-expressing neurons in the hypothalamus // J Neurosci .–2006.– V.26, №.5.–P.1448-1456.

157. Lund TD, Munson DJ, Haldy ME, Handa RJ. Androgen inhibits, while oestrogen enhances, restraint-induced activation of neuropeptide neurones in the paraventricular nucleus of the hypothalamus // J Neuroendocrinol.– 2004.–V.16, №.3.–P.272-278.
158. Ly L., Chan D., Trasler J. M. Developmental windows of susceptibility for epigenetic inheritance through the male germline //Seminars Cell Developmental Biology.–2015.–V.43.–P.96-105.
159. Maccari S, Morley-Fletcher S. Effects of prenatal restraint stress on the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and related behavioural and neurobiological alterations// Psychoneuroendocrinology . –2007.–V.32, №.1.–P.10-15.
160. Maier SF, Seligman ME. Learned helplessness at fifty: Insights from neuroscience // Psychol Rev.– 2016.–V. 123, №. 4.–P. 349-367.
161. McEwen B.S., Glucocorticoids, depression, and mood disorders: structural remodeling in the brain // Metabolism. – 2005. – V.54, №5 (Suppl 1). – P. 20 –23.
162. McEwen BS, Morrison JH. The brain on stress: vulnerability and plasticity of the prefrontal cortex over the life course // Neuron. –2013 .–V. 79, №.1. – P.16-29.
163. McEwen BS, Nasca C, Gray JD. Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex// Neuropsychopharmacology. – 2016. – V.41, №1. – P.3-23.
164. McEwen BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain // Physiol Rev. – 2007. –V.87, №3. – P.873-904.
165. McEwen BS. The ever-changing brain: cellular and molecular mechanisms for the effects of stressful experiences // Dev Neurobiol .– 2012 .–V.72, №6. – P. 878–890.
166. McEwen BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance // Brain Res .–2000. –V.886, №1-2.– P. 172-189.

167. McKlveen JM, Myers B, Flak JN, Bundzikova J, Solomon MB, Seroogy KB, Herman JP. Role of prefrontal cortex glucocorticoid receptors in stress and emotion // Biol Psychiatry.–2013. –V.74, № 9 .–P. 672-679.
168. Medina A, Seasholtz AF, Sharma V, Burke S, Bunney W Jr, Myers RM, Schatzberg A, Akil H, Watson SJ. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor expression in the human hippocampus in major depressive disorder// J Psychiatr Res .–2013. –V.47, №3.– P.307-314.
169. Meng X, Yang S, Zhang Y, Wang X, Goodfellow RX, Jia Y, Thiel KW, Reyes HD, Yang B, Leslie KK. Genetic Deficiency of Mtdh Gene in Mice Causes Male Infertility via Impaired Spermatogenesis and Alterations in the Expression of Small Non-coding RNAs // J Biol Chem. – 2015. – V.290,№19. – P.11853-11864.
170. Meng YN, Meng LJ, Song YJ, Liu ML, Zhang XJ. Small RNA molecules and regulation of spermatogenesis // Yi Chuan. – 2011 .–V. 33, №. 1. – P. 9-16.
171. Mikulska J, Juszczyk G, Gawrońska-Grzywacz M, Herbet M. HPA Axis in the Pathomechanism of Depression and Schizophrenia: New Therapeutic Strategies Based on Its Participation // Brain Sci. – 2021 .–V.11, №.10. – P.1298. doi: 10.3390/brainsci11101298.
172. Mironova V, Rybnikova E, Pivina S. Effect of inescapable stress in rodent models of depression and posttraumatic stress disorder on CRH and vasopressin immunoreactivity in the hypothalamic paraventricular nucleus // Acta Physiol Hung. –2013. –V.100, №.4. – P.395-410.
173. Moradi SV, Mansfeld FM, Toth I. Synthesis and in vitro evaluation of glycosyl derivatives of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) // Bioorg Med Chem. – 2013. –V. 21, № 14. – P. 4259-4265.
174. Morgan C.P. , Shetty A.C., Chan J.C. , Berger D.S. , Ament S.A., Epperson N., Bale T.L. Repeated sampling facilitates within- and between-subject modeling of the human sperm transcriptome to identify dynamic and

stress-responsive sncRNAs// Scientifc Reports. – 2020. –V10, №1. Art. 17498. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33060642/

175. Morgan C.P., Chan J.C., Bale T. L. Driving the Next Generation: Paternal Lifetime Experiences Transmitted via Extracellular Vesicles and Their Small RNA Cargo // Biol. Psychiatry. – 2019. – V.85, №. 2. – P.164-171.
176. Murphy, BE Pearson. "Glucocorticoids, overview." . –2007. – P.198-210.
177. Nargund VH. Effects of psychological stress on male fertility// Nat Rev Urol. – 2015. – V. 12, №. 7. – P. 373-382.
178. Nath A, Murthy GVS, Babu GR, Di Renzo GC. Effect of prenatal exposure to maternal cortisol and psychological distress on infant development in Bengaluru, southern India: a prospective cohort study// BMC Psychiatry. – 2017. – V. 17, №. 1. – P.255. doi: 10.1186/s12888-017-1424-x.
179. Nordin M., Bergman D., Halje M., Engström W., Ward A. Epigenetic regulation of the Igf2/H19 gene cluster//Cell Prolif. – 2014. – V. 47, N.3. – P.189-199.
180. O'Donnell L, Smith LB, Rebourcet D. Sertoli cells as key drivers of testis function //Semin Cell Dev Biol. –2021. –V.121. –P. 2–9.
181. Okada Y., Yamaguchi K. Epigenetic modifications and reprogramming in paternal pronucleus: sperm, preimplantation embryo, and beyond// Cell. Mol. Life Sci. –2017. –V.74, № 11. –P.1957–1967.
182. Olff M, Güzelcan Y, de Vries GJ, Assies J, Gersons BP. HPA- and HPT-axis alterations in chronic posttraumatic stress disorder. //Psychoneuroendocrinology. –2006. –V.31, № 10. –P. 1220-1230.
183. Olff M. Psychotraumatology on the move // Eur J Psychotraumatol. – 2018. –V. 9. – № 1. – P.1439650. doi: 10.1080/20008198.2018.1439650.
184. Ordyan N.E., Pivina S.G., Akulova V.K., Kholova G.I. Changes in the Nature of Behavior and the Activity of the Hypophyseal-Adrenocortical System in the Offspring of Paternal Rats Subjected to Stress in the Stress–Restress Paradigm before Mating// Neurosci Behav Physi .– 2021. – V. 51. – P. 528–534.

185. Ordyan N.E., Smolenskiy I.V., Pivina S.G., Akulova V.K., Rakitskaya V.V. Characteristics of the formation of the Anxious-Depressive State in an Experimental Model of Post-Traumatic Stress Disorder in Prenatally Stressed Male Rats //Neurosci Behav Physiol.– 2014. – V. 44, №. 2. –P. 657-663.
186. Ordyan NE, Pivina SG, Baranova KA, Rakitskaya VV, Akulova VK, Kholova GI. Sex-de-pendent actions of prenatal stress on the activity of the hypothalamo-hypophyseal-adrenocortical system in rats: the role of corticosteroid receptors in the brain // Neurosci Behav Physiol. – 2021. –V. 51. – P. 357–366.
187. Ordyan N. E., Malysheva O. V., Akulova V. K., Pivina S. G., Kholova G. I. The capability to learn and expression of the insulin-like growth factor II gene in the brain of male rats whose fathers were subjected to stress factors in the “stress–restress” paradigm //Neurochemical Journal. – 2020. –V. 14, № 2. – P. 191–196.
188. Otte C, Wingenfeld K, Kuehl LK, Kaczmarczyk M, Richter S, Quante A, Regen F, Bajbouj M, Zimmermann-Viehoff F, Wiedemann K, Hinkelmann K. Mineralocorticoid receptor stimulation improves cognitive function and decreases cortisol secretion in depressed patients and healthy individuals // Neuropsychopharmacology. – 2015. –V.40, № 2. – P.386-393.
189. Oyola MG, Handa RJ. Hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity//Stress.– 2017. –V.20, № 5. – P.476-494.
190. Ozata DM, Gainetdinov I, Zoch A, O'Carroll D, Zamore PD. PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions // Nat Rev Genet. – 2019. – V. 20, №. 2. – P. 89-108.
191. Pang T. Y.C., Short A.K., W. Bredy T.W., Hannan A.J. Transgenerational paternal transmission of acquired traits: Stress-induced modification of the sperm regulatory transcriptome and offspring phenotypes // Curr Opin Behav Sci. – 2017. –V14. –P. 140–147.

192. Pardo M, Cheng Y, Sitbon YH, Lowell JA, Grieco SF, Worthen RJ, Desse S, Barreda-Diaz A. Insulin growth factor 2 (IGF2) as an emergent target in psychiatric and neurological disorders// Neurosci Res .– 2019. –V.149. – P. 1-13.
193. Pariante, C. M., Lightman, S. L. The HPA axis in major depression: Classical theories and new developments // Trends in Neurosciences. – 2008. – V. 39, № 9. – P.464–468.
194. Patrick J Ronan 1, Cliff H Summers. Molecular signaling and translational significance of the corticotropin releasing factor system // Transl Sci . – 2011. – V.98. –P.235-292.
195. Pellow S., Chopin P., File S., Briley M. Validation of open:closed arm entries in the elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat // J. Neurosci. Methods. – 1985. –V.14, №3 .– P.149-167.
196. Pembrey M.E., Bygren L.O., Kaati G. , Edvinsson S., Northstone K. , Sjöström M., Jean Golding J., The ALSPAC Study Team. Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans // Eur.J. Hum. Genetics. – 2006. – V.14, №2. –P.159–166.
197. Pivina S.G., Rakitskaya V.V., Akulova V.K., Ordyan N.E. Activity of the hypothalamic–pitu-itary–adrenal system in prenatally stressed male rats on the experimental model of post-trau-matic stress disorder // Bull Exp Biol Med. – 2016. –V.160 .– P.601–604.
198. Pivina, S. G., Holova, G. I., Rakitskaya, Akulova V. K., . Ordyan N. E. Changes in reproductive functions of male rats in a posttraumatic stress disorder model // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. – 2019.–V.55,№5.–P. 426-428.
199. Przegaliński E, Budziszewska B. The effect of long-term treatment with antidepressant drugs on the hippocampal mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in rats // Neurosci Lett . – 1993.–V.161,№2.–P.215-218.

200. Radley J.J. Toward a limbic cortical inhibitory network: implications for hypothalamic-pituitary-adrenal responses following chronic stress. Front // Behav. Neurosci. – 2012. – V. 6. – P.7. doi: 10.3389/fnbeh.2012.00007.
201. Radley JJ, Gosselink KL, Sawchenko PE. A discrete GABAergic relay mediates medial prefrontal cortical inhibition of the neuroendocrine stress response.//J Neurosci. – 2009. –V29, №22. – P.7330-7340.
202. Radley JJ, Rocher AB, Rodriguez A, Ehlenberger DB, Dammann M, McEwen BS, Morrison JH, Wearne SL, Hof PR. Repeated stress alters dendritic spine morphology in the rat medial prefrontal cortex // J Comp Neurol. – 2008. –V507, №1. – P. 1141-1150.
203. Radley JJ, Williams B, Sawchenko PE. Noradrenergic innervation of the dorsal medial prefrontal cortex modulates hypothalamo-pituitary-adrenal responses to acute emotional stress// J Neurosci. – 2008. –V528, №22. – P.5806-5816.
204. Ramaswamy S, Weinbauer GF. Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/ testosterone // Spermatogenesis. –2015. –V.4,№2. e996025. doi: 10.1080/21565562.2014.996025.
205. Reul J.M., Stec I., Soder M., Holsboer F. Chronic treatment of rats with the antidepressant amitriptyline attenuates the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system // Endocrinolology. – 1993. – V. 133, №. 1. – P.312–320. doi: 10.1210/endo.133.1.8391426
206. Richter-Levin G, Xu L. How could stress lead to major depressive disorder? // IBRO Rep. – 2018. –V4. –P.38-43. doi: 10.1016/j.ibror.2018.04.001
207. Richter-Levin G. Acute and long-term behavioral correlates of underwater trauma--potential relevance to stress and post-stress syndromes // Psychiatry Res. – 1998. – V.79, №1. –P.73–83.doi: 10.1016/s0165-1781(98)00030-4.
208. Rocker J.B., Berkley K.J., Geary N., Hampson E., Herman J.P., Young E.A. (Eds). Sex differences in the brain from genes to behavior //New York. Oxford Univer. Press Inc.– 2006. –P.95–105.

209. Rodgers A. B., Morgan C. P., Bronson S. L., Revello S., Bale T. L. Paternal stress exposure alters sperm microRNA content and reprograms offspring HPA stress axis regulation // J. Neurosci. – 2013. – V.33, №21. –P.9003–9012.
210. Rodgers AB, Bale TL. Germ Cell Origins of Posttraumatic Stress Disorder Risk: The Transgenerational Impact of Parental Stress Experience// Biol Psychiatry. – 2015 . –V78, №5. – P.307-314.
211. Rodgers AB, Morgan CP, Leu NA, Bale TL. Transgenerational epigenetic programming via sperm microRNA recapitulates effects of paternal stress// Proc Natl Acad Sci U S A. – 2015. – V.112, №44. –P.13699-13704
212. Rosenfield PJ, Stratyner A, Tufekcioglu S, Karabell S, McKelvey J, Litt L. Complex PTSD in ICD-11: A Case Report on a New Diagnosis // J Psychiatr Pract.–2018.–V.24,№5.–P.364-370.
213. Sadowska-Krępa E, Kłapcińska B, Jagsz S, Nowara A, Szołtysek-Bołdys I, Chalimoniuk M, Langfort J, Chrapusta SJ. High-dose testosterone enanthate supplementation boosts oxidative stress, but exerts little effect on the antioxidant barrier in sedentary adolescent male rat liver // Pharmacol Rep. – 2017. – V.69, №4. – P.673-678.
214. Sárvár M., Kalló I., Hrabovsz, E., Solymosi N., Rodoloss A., Vastag C., Auer H., Liposits Z. Hippocampal gene expression is highly responsive to estradiol replacement in middle-aged female rats// Endocrinology. – 2015. – V156. – P. 2632–2645.
215. Schmidt MV, Wang XD, Meijer OC. Early life stress paradigms in rodents: potential animal models of depression?//Psychopharmacology. –2011. – V.214, №1. –P. 131–140..
216. Seckl JR, Fink G. Antidepressants increase glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in rat hippocampus in vivo // Neuroendocrinology.–1992. –V.55, №6.–P.621-626.
217. Seligman ME, Maier SF. Failure to escape traumatic shock // J Exp Psychol. –1967. – V.74, №1. –P. 1-9. doi: 10.1037/h0024514.

218. Shamolina T.S., Pivina S.G., Ordyan N.E. Changes in the activity of hypophyseal-adrenocortical and reproductive systems in prenatally stressed female rats during aging // Neurosci. Behav. Physiol. . –2010. –V.40, №9. – P. 1017–1022.
219. Sharma A. Transgenerational epigenetic inheritance: focus on soma to germline information transfer// Prog Biophys Mol Biol. – 2013. –V113, №3. – P.439-446.
220. Sharp B.M. Basolateral amygdala and stress-induced hyperexcitability affect motivated behaviors and addiction // Translational Psychiatry. – 2017. –V.7, №8. doi: 10.1038/tp.2017.161. PMID:
221. Short AK, Fennell KA, Perreau VM, Fox A, O'Bryan MK, Kim JH, Bredy TW, Pang TY, Hannan AJ. Elevated paternal glucocorticoid exposure alters the small noncoding RNA profile in sperm and modifies anxiety and depressive phenotypes in the offspring // Transl. Psychiatry. – 2016. –V.6, №6. doi: 10.1038/tp.2016.109.
222. Solomon M.B., Furay A.R., Jones K., Packard A.E.B., Packard B.A., Wulsin A.C., Herman J.P. Deletion of forebrain glucocorticoid receptors impairs neuroendocrine stress responses and induces depression-like behavior in males but not females// Neuroscience. – 2012. – V.203. –P. 135–143.
223. Solomon Z, Kotler M, Mikulincer M. Combat-related posttraumatic stress disorder among second-generation Holocaust survivors: preliminary findings//Am J Psychiatry. – 1988. – V.145, №7. –P.865-868. doi: 10.1176/ajp.145.7.865
224. Sonoda A., Hirai H. The differential effect of control vs. loss of control over food acquisition on disk-pull responses elicited by inescapable shocks // Learning and motivation. – 1993. – V.24. – P.40-54.
225. Sood E, Karpyn A, Demianczyk AC, Ryan J, Delaplane EA, Neely T, Frazier AH, Kazak AE. Mothers and Fathers Experience Stress of Congenital Heart Disease Differently // Recommendations for Pediatric

Critical Care. Pediatr Crit Care Med. – 2018. – V.19, №7. –P.626-634. doi: 10.1097/PCC.0000000000001528

226. Spry EA, Wilson CA, Middleton M, Moreno-Betancur M, Doyle LW, Howard LM, Hannan AJ, Wlodek ME, Cheong JL, Hines LA, Coffey C, Brown S, Olsson CA, Patton GC. Parental mental health before and during pregnancy and offspring birth outcomes: A 20-year preconception cohort of maternal and paternal exposure//EClinicalMedicine. – 2020 . –V27:100564. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33150327/
227. Stein DJ, McLaughlin KA, Koenen KC, Atwoli L, Friedman MJ, Hill ED, Maercker A, Petukhova M, Shahly V, van Ommeren M, Alonso J, Borges G, de Girolamo G, de Jonge P, Demyttenaere K, Florescu S, Karam EG, Kawakami N, Matschinger H, Okoliyski M, Posada-Villa J, Scott KM, Viana MC, Kessler RC. DSM-5 and ICD-11 definitions of posttraumatic stress disorder: investigating "narrow" and "broad" approaches // Depress Anxiety.– 2014.– V.31, №6.–P.494-505..
228. Summers CH. Mechanisms for quick and variable responses// Brain Behav Evol. – 2001. –V57, №5.– P.283-292. doi: 10.1159/000047246.
229. Takeo C., Ikeda K., Horie-Inoue K., Inoue S. Identification of IGF2, Igfbp2 and Enpp2 as estrogen-responsive genes in rat hippocampus// Endocr. J. – 2009. –V56, №1. – P.113–120.
230. Tan X., Luo J., Ding X., Li H. Preconception paternal mental disorders and child health: Mechanisms and interventions//Neurosci. Biobehav. Rew. – 2023. – V. 144:104976. doi: 10.1016/j.neubiorev.2022.104976.
231. Taxier LR, Gross KS, Frick KM. Oestradiol as a neuromodulator of learning and memory // Nat Rev Neurosci. –2020. –V.21, №10. – P. 535-550.
232. Tilbrook AJ, Clarke IJ. Negative feedback regulation of the secretion and actions of GnRH in male ruminants // J Reprod Fertil Suppl. – 1995. – V49. – P.297-306.
233. Tseilikman V., Komelkova M., Manukhina E., Downey H.F., Platkovskii P., Pashkov A., Tseilikman O., Maltseva N., Chrousos G.P., Ullmann E.,

Chereshnev V., Chereshneva M., Kondashevskaya M.V., Goryacheva A., Fedotova J., Cherkasova O., Steenblock C., Bornstein S.R., Ettrich B. A rat model of post-traumatic stress syndrome causes phenotype-associated morphological changes and hypofunction of the adrenal gland // International Journal of Molecular Sciences.– 2021.–V22, № 24 :13235. doi: 10.3390/ijms222413235.

234. Tsutsui K, Ubuka T, Yin H, Osugi T, Ukena K, Bentley GE, Ciccone N, Inoue K, Chowdhury VS, Sharp PJ, Wingfield JC. Mode of action and functional significance of avian gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): a review // J Exp Zool A Comp Exp Biol. – 2006. – V305, №9. – P.801-806.
235. Uliana DL, Zhu X, Gomes FV, Grace AA. Using animal models for the studies of schizophrenia and depression: The value of translational models for treatment and prevention // Front Behav Neurosci . – 2022. – V.16:935320. doi: 10.3389/fnbeh.2022.935320.
236. Ursano RJ, Benedek DM, Engel CC. Mental illness in deployed soldiers // BMJ. –2007. – V335, № 7620. – P.571-572.
237. Vuguin PM. Animal models for small for gestational age and fetal programming of adult disease// Horm Res. – 2007. –V68, №3. – P. 113-123.
238. Wang X, Walsh LP, Reinhart AJ, Stocco DM. The role of arachidonic acid in steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory (StAR) gene and protein expression // J Biol Chem. – 2000. –V275, №26. – P.20204-20209.
239. Wang Y, Chen F, Ye L, Zirkin B, Chen H. Steroidogenesis in Leydig cells: effects of aging and environmental factors //Reproduction. – 2017. –V154, №4: R111–R122. http://doi.org/10.1530/REP-17-0064
240. Watanabe M, Fukuda A, Nabekura J. The role of GABA in the regulation of GnRH neurons // Front Neurosci. – 2014. – V.8:387. doi: 10.3389/fnins.2014.00387.
241. Weinstock M. The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring//Brain Behav. Imun. – 2006. – V19, №4. – P. 296-308.

242. Weiser M.J., Foradori C.D., Handa R.J. Estrogen receptor beta activation prevents glucocorticoid receptor-dependent effects of the central nucleus of the amygdala on behavior and neuroendocrine function // Brain Res. –2010. –V.1336. – P.78–88.
243. Whirledge S, Cidlowski JA. Glucocorticoids and Reproduction: Traffic Control on the Road to Reproduction // Trends Endocrinol Metab. – 2017 . – V28, №6. – P.399-415.
244. Whirledge S., Cidlowski J.A. Glucocorticoids, Stress, and Fertility// Minerva Endocrinol. – 2010. – V.35, № 2. – P.109–125.
245. Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant // Psychopharmacology (Berl). – 1987. – V.93, № 3. –P.358-364.
246. Xavier MJ, Roman SD, Aitken RJ, Nixon B. Transgenerational inheritance: how impacts to the epigenetic and genetic information of parents affect offspring health // Hum Reprod Update. – 2019. –V25,№5. – P.518-540.
247. Yahyavi ST, Zarghami M, Naghshvar F, Danesh A. Relationship of cortisol, norepinephrine, and epinephrine levels with war-induced posttraumatic stress disorder in fathers and their offspring // Braz J Psychiatry. – 2015. – V.37, №2. – P.93-98.
248. Yan W. Potential roles of noncoding RNAs in environmental epigenetic transgenerational inheritance // Moll. Cell. Endocrinol. – 2014. – V.398, №1-2. – P.24-30.
249. Yazawa H, Sasagawa I, Nakada T. Apoptosis of testicular germ cells induced by exogenous glucocorticoid in rats // Hum Reprod. – 2000. –V15, №9. – P.1917-1920.
250. Ye X, Kohtz A, Pollonini G, Riccio A, Alberini CM. Insulin Like Growth Factor 2 Expression in the Rat Brain Both in Basal Condition and following Learning Predominantly Derives from the Maternal Allele// PLoS One. – 2015. –V10:e0141078. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26495851/

251. Yehuda R, Bierer LM. Transgenerational transmission of cortisol and PTSD risk// Prog Brain Res. – 2008 . –V167. – P.121-135.
252. Yehuda R, Daskalakis NP, Lehrner A, Desarnaud F, Bader HN, Makotkine I, Flory JD, Bierer LM, Meaney MJ. Influences of maternal and paternal PTSD on epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor gene in Holocaust survivor offspring // Am J Psychiatry. – 2014. –V171, №8. – P.872-880.
253. Yehuda R, Lehrner A, Rosenbaum TY. PTSD and Sexual Dysfunction in Men and Women // J Sex Med. – 2015 –V12, №5. – P.1107-19.
254. Yehuda R, Neylan TC, Flory JD, McFarlane AC. The use of biomarkers in the military: from theory to practice// Psychoneuroendocrinology. – 2013. – V38, №9. – P. 1912-1922.
255. Yehuda R, Schmeidler J, Giller EL Jr, Siever LJ, Binder-Brynes K. Relationship between posttraumatic stress disorder characteristics of Holocaust survivors and their adult offspring// Am J Psychiatry. – 1998. – V155, №6. –P.841-843.
256. Yehuda R, Schmeidler J, Wainberg M, Binder-Brynes K, Duvdevani T. Vulnerability to posttraumatic stress disorder in adult offspring of Holocaust survivors // Am J Psychiatry. – 1998. – V.155, №9. – P.1163-1171.
257. Yehuda R, Teicher MH, Seckl JR, Grossman RA, Morris A, Bierer LM. Parental posttraumatic stress disorder as a vulnerability factor for low cortisol trait in offspring of holocaust survivors// Arch Gen Psychiatry. – 2007. – V64, №9. –P.1040-1048. https://doi.org/10.1001/archpsyc.64.9.1040
258. Yehuda R. Post-traumatic stress disorder// N Engl J Med. – 2002. – V346, №2. –P.108-114.
259. Yehuda R. Status of glucocorticoid alterations in post-traumatic stress disorder // Ann N Y Acad Sci. – 2009 .–V1179. – P.56-69.
260. Yehuda R., Antelman S. M. Criteria for rationally evaluating animal models of postraumatic stress disorder // Biological Psychiatry. – 1993. – V33, №7. – P. 479–486.

261. Yehuda R., Blair W., Labinsky E., Bierer L.M. Effects of parental PTSD on the cortisol response to dexamethasone administration in their adult offspring // Am J Psychiatry. – 2007. – V164, №1. –P. 163-166.
262. Yeshurun S, Rogers J, Short AK, Renoir T, Pang TY, Hannan AJ. Elevated paternal glucocorticoid exposure modifies memory retention in female offspring // Psychoneuroendocrinology. – 2017 . –V83. – P.9-18.
263. Yeshurun, S., Hannan, A. J. Transgenerational epigenetic influences of paternal environmental exposures on brain function 9and predisposition to psychiatric disorders // Molecular Psychiatry. – 2019. – V24, №4. –P.536–548.
264. Young E. A., Korszun A., Figueiredo H. F., Solomon M. B., Herman J. P. Sex differences in HPA axis regulation. In:. Rocker J.B., Berkley KJ., Geary N., Hampson E., Herman J.P., Young E.A. (Eds). Sex differences in the brain from genes to behavior. New York // Oxford Univer. Press Inc. – 2006. – P.95–105.
265. Yu XW, Pandey K, Katzman AC, Alberini CM. A role for CIM6P/IGF2 receptor in memory consolidation and enhancement // Elife. . – 2020. – V.9:e54781. https://www.doi.org/10.7554/eLife.54781
266. Yuan S., Schuster A., Tang C., Yu T., Ortogero N., Bao J., Zheng H., Yan W. Sperm-borne miRNAs and endo-siRNAs are important for fertilization and preimplantation embryonic development // Develop. – 2016. –V143,№4. – P. 635-647.
267. Zou P, Wang X., Yang W., Liu C., Chen Q., Yang H., Zhou N., Zeng Y., Chen H., Zhang G., Liu J., Cao J., Ao L., Sun L. Mechanisms of stress-induced spermatogenesis impairment in male rats following unpredictable chronic mild stress (uCMS) // Int. J. Mol. Sci. – 2019. –V20, №18. – P.4470. http://doi.org/10.3390/ijms20184470