

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

Холова Гулрухсор Исходжоновна

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД ОБ ОСНОВНЫХ РЕЗУЛЬТАТАХ
НАУЧНО-КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ

**ВЛИЯНИЕ СТРЕССА ОТЦА НА ПОВЕДЕНИЕ И ГОРМОНАЛЬНЫЕ
ФУНКЦИИ ПОТОМКОВ**

Программа подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре по
направлению подготовки кадров высшей квалификации

06.06.0 1 Биологические науки

Специальность 03.03.0 1 – физиология

Научный руководитель: Ордян Наталья Эдуардовна, доктор биологических наук,
заведующий лабораторией нейроэндокринологии ФГБУН «Институт физиологии им. И.П.
Павлова РАН»

Санкт –Петербург
2021

Оглавление:

Актуальность темы исследования	3
Цель и задачи исследования	4
Научная новизна	4
Положения, выносимые на защиту.....	5
Теоретическая и практическая значимость	5
Объект и методы исследования	6
Основные результаты и обсуждение	11
Заключение	20
Выводы	21
Список публикаций	21

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. Проведение исследований с учетом «фактора отца» для здоровья детей представляется актуальным в связи с широкой и, вероятно, недооцененной распространенностью психических нарушений у мужского населения, сопровождающихся снижением fertильности. Поиск биомаркеров, которые могут свидетельствовать о неблагоприятном прогнозе для потомства, представляет собой актуальнейшую проблему современной фундаментальной физиологии и медицины.

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 кортикостерона и усиление чувствительности гипофизарно-адренокортиkalной 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 стрессорную реактивность ГАС, поведение и способность к обучению потомков. 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 (Rodgers et al., 2013), усиливает депрессивно-подобное и тревожное поведение, а также повышает базальный уровень кортикостерона (Dietz et al., 2011; Franklin et al., 2010).

В качестве стрессорных воздействий в этих работах 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 в течение 4 недель кортикостерона 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 (Chen et al., 2011). Показано также, что эффекты ИФР2 на память реализуются посредством взаимодействия этого ростового фактора с катион-независимым маннозо-6-фосфатным рецептором, который также именуют ИФР2 рецептором 2-го типа (Yu et al. 2020).

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

Цель и задачи исследования

Цель исследования состояла в изучении влияния экспериментального аналога ПТСР или депрессии самцов крыс в период сперматогенеза на поведение, память и гормональные функции их полновозрелых потомков обоего пола.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценить влияние ПТСР-подобного или депрессивно-подобного состояния самцов-отцов на состояние их репродуктивной системы на момент подсадки к интактным самкам.
2. Изучить влияние ПТСР-подобного состояния самцов-отцов на соматическое развитие, ориентировочно-исследовательскую активность, уровень тревожности, память и уровень половых стероидных гормонов потомков обоего пола.
3. Изучить влияние депрессивно-подобного состояния самцов-отцов на соматическое развитие, ориентировочно-исследовательскую активность, уровень тревожности, память и уровень половых стероидных гормонов потомков обоего пола.
4. Исследовать экспрессию гена инсулиноподобного фактора роста 2 (*Igf2*) и его рецептора 2-го типа (*Igf2r*) в гиппокампе потомков самцов отцов с ПТСР-подобным или депрессивно-подобным состоянием.

Новизна исследования

Впервые установлено более выраженное 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 у потомков самцов-отцов с ПТСР-подобным состоянием выше у потомков-самцов, чем у потомков-самок. 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 эстрadiола не выявлено.

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

Основные 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. Изменения уровня половых стероидных гормонов в крови потомков стрессированных отцов не зависит от использованной стрессорной процедуры (модель психопатологии), но определяется полом потомков.
4. Инсулиноподобный фактора роста 2 вовлечен в нарушение памяти самцов - потомков отцов с ПТСР-подобным состоянием в период сперматогенеза.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты расширяют имеющиеся представления о влиянии стресса отца на развитие и физиологические функции 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.

Объект и методы исследования

1. Объект исследования.

Для проведения экспериментов было использовано 30 крыс линии Вистар (самцы, вес 250–300 г) из ЦКП «Биоколлекция ИФ РАН» и их потомки, полученные от 60 интактных самок (вес 200-230 г) той же линии. Животных содержали в стандартных условиях вивария со сменой темной и светлой фаз суток 12/12 ч и при свободном доступе к воде и корму (гранулированный комбикорм).

Все манипуляции с животными были проведены в соответствие с требованиями Директивы Европейского сообщества 2010 г. (2010/63/EEC). Протоколы опытов были утверждены Комиссией по гуманному обращению с животными Института Физиологии им. И. П. Павлова РАН.

Самцы были разделены на три группы (моделирование ПТСР — 10 крыс, моделирование депрессии — 10 крыс и контрольная — 10 крыс). После процедуры стрессирования через 46-48 сут каждый самец был подсажен к рецептивной самке, находящейся в стадии проэструс-эструс. На следующий день осуществляли контроль наступления беременности по наличию сперматозоидов во влагалищном мазке. Беременных самок сразу отсаживали от самца и содержали по 5 особей в клетке до 17 дня беременности, а с 18 дня - в индивидуальных клетках. Пометы содержали с матерью до 30-дневного возраста, а далее по 6-7 особей в соответствии с полом. От каждого самца было получено по два помета.

В отдельной серии экспериментов самцов трех групп (по 5 особей в каждой группе) на 46 сут после стрессирования декапитировали, извлекали семенники, эпидидимисы и надпочечники, которые взвешивали. Собирали тулowiщную кровь, которую центрифугировали при 2500 об/мин и t -4⁰C. В полученной плазме определяли уровень тестостерона и кортикостерона методом ИФА с использованием стандартных наборов (ХЕМА, Россия) согласно инструкции производителя. Семенники подвергали морфометрическому анализу.

2. Моделирование ПТСР или депрессии у самцов.

Для моделирования ПТСР использовали парадигму «стресс-рестресс», которая наиболее полно воспроизводит клинические симптомы этого заболевания, такие как длительно сохраняющаяся повышенная тревожность, снижение базальной активности ГАС

и усиление ее чувствительности к сигналам отрицательной обратной связи (Liberzon et al., 1997; Ordyan et al., 2014). Крыс подвергали комбинированному стрессу, состоящему из двухчасовой иммобилизации, 20-мин вынужденного плавания и, после 15-мин перерыва, эфирного стресса до потери сознания. Триггером для развития стойкого ПТСР-подобного состояния являлся рестресс, который заключался в 30-мин иммобилизационном стрессе на 7 сут после комбинированного стресса. Контроль развития ПТСР-подобного состояния осуществляли по уровню кортикостерона на 10 сут после «рестресса», который определяли в пробах крови, взятых из хвостовой вены. Для спаривания с самками использовали только тех самцов, базальный уровень кортикостерона в крови которых был снижен по сравнению с соответствующим показателем контрольных самцов.

Для моделирования депрессии использовали парадигму «выученная беспомощность». Самцов подвергали электрокожному раздражению в клетке с токопроводящим полом. Удары электрического тока (1mA, 50 Гц) длительностью 15 с подавались 60 раз в течение 1 ч с длительностью интервала между ударами током от 15 до 55 с. Такой режим электрокожной стимуляции создает неизбежаемость и неконтролируемость воздействия, в результате чего у животного формируется состояние «выученная беспомощность», характеризующееся рядом поведенческих и гормональных нарушений, воспроизводящих симптоматику депрессии у людей (Czén et al. 2016). Контроль развития депрессивно-подобного состояния осуществляли по уровню кортикостерона на 10 сут после электрокожной стимуляции, который определяли в пробах крови, взятых из хвостовой вены. Для спаривания с самками использовали только тех самцов, базальный уровень кортикостерона в крови которых был повышен по сравнению с соответствующим показателем контрольных самцов.

3. Морфометрический анализ семенников и метод анализа сперматозоидов.

Правый семенник от каждого самца фиксировали в жидкости Буэна течение 24 ч при комнатной температуре. Далее осуществляли стандартную гистологическую обработку ткани семенников и заливали в парафиновые блоки. При помощи микротома изготавливали серии чередующихся срезов семенных желез во фронтальной плоскости толщиной 5-7 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином-эозином. Морфометрические исследования проводили с использованием светового микроскопа Olimpus (Япония), цифровой камеры vz-c50s (Videozavr, Россия) и компьютера IBM PC с программным обеспечением «Videotest Master Morphology» (Россия) при общем увеличении 10×10, 40×10, 100×10. Морфологические особенности строения семенных желез исследовали по следующим параметрам: 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 (сперматогонии, сперматоциты и сперматиды) в сперматогенном эпителии извитого семенного канальца, количество сперматозоидов в просвете извитого семенного канальца. Измерения проводили в 20 поперечных срезах извитых семенных канальцев, полученных от каждого самца трех экспериментальных групп.

Эпидидимисы после извлечения немедленно помещали в сосуд с 1 мл питательной среды G-MOPS PLUS (Virtolife, Швеция) нагретый до 37⁰C. На эпидидимисы наносили продольный разрез и инкубировали в течение 10 мин при температуре 37⁰C, позволяя сперматозоидам свободно всплыть. Взвесь сперматозоидов разводили 1:10, наносили на предметное стекло, окрашивали 5% раствором эозина 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.

4. Методы исследования физиологических функций потомков

4.1. Анализ соматического развития

Соматическое развитие потомков оценивали по прибавке в весе тела. Крысят взвешивали на 5, 10, 15 и 20 день жизни. Поскольку вес крысят в помете на ранних стадиях постнатального развития зависит от количества крысят в помете, то на 2-й день жизни количество крысят в помете было выровнено до 8-10 особей с равным соотношением полов.

4.2. Методы исследования поведения потомков.

Ориентировочно-исследовательскую активность полновозрелых потомков изучали в тесте «открытое поле», уровень тревожности оценивали в тестах «приподнятый крестообразный лабиринт» и «светлая-темная камера». Тест «открытое поле» выполняли в течение 5 мин, во время которых фиксировали локомоторную активность (число пересеченных квадратов), исследовательскую активность (число вертикальных стоек без упора), продолжительность замирания и реакции груминга, а также число дефекаций (проявление эмоционального возбуждения в условиях новый обстановки). В тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» в течение 5 мин измеряли время, проведенное животным в открытых лабиринта, что служило основным показателем тревожности в этом тесте. В тесте «светлая-темная камера» фиксировали латентный период перехода из светлой камеры в темную. Самок начинали тестировать в стадию диэструса.

4.3. Методы исследования памяти потомков.

Память потомков оценивали в половозрелом возрасте с использованием тестов «реакция пассивного избегания» (РПИ) и «распознавание нового объекта» (РНО). РНО вырабатывали в установке «открытое поле». В качестве объектов использовали три предмета округлой формы, выполненных из пластика. В первую фазу «ознакомления», крысам позволяли исследовать два незнакомых объекта в течение пяти мин. Регистрировали время исследования каждого из них. Затем крысу помещали в домашнюю клетку. Во вторую фазу «тестовую», которую проводили через 24 ч после первой фазы, один из объектов меняли на новый объект. После чего в течение 5 мин регистрировали время исследования знакомого и нового объектов. Для оценки памяти распознавания объектов использовали коэффициент дискриминации (Кд), который рассчитывали по формуле:

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

Чем меньше Кд, тем хуже животное различает новый и старый объекты (Cinalli et al. 2020).

На следующие сутки вырабатывали РПИ в камере, состоящей из 2 отсеков: светлого и темного, разделенных перегородкой с отверстием и дверцей. Пол темного отсека был представлен металлическими прутьями, подключенными к источнику тока. В первый день проводили обучение РПИ (первая сессия): 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 (вторая сессия) 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 teste фиксировали латентный период входа крысы в темный отсек. Общее время тестирования в каждой сессии составило 180 сек.

4.4. Метод изучения экспрессии генов Igf2 и Igf2r.

Экспрессию генов *Igf2* и *Igf2r* в гиппокампе изучали с использованием метода ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени у отдельных групп потомков, рожденных от отцов с моделированием психопатологий ($n = 6$ для каждой группы) или контрольных самцов ($n = 6$). Крыс декапитировали, из мозга выделяли гиппокамп, который помещали в раствор для стабилизации РНК («Евроген», Россия) на 24 ч, а затем хранили до выделения РНК при -80°C .

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 TACACCACAGTTCGCTCGT. 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).

4.5. Методы изучения уровня половых гормонов в крови

Самцов и самок крыс – потомков контрольных и стрессированных отцов – декапитировали, мозг извлекали и в дальнейшем использовали для анализа экспрессии генов. Туловищную кровь собирали, центрифугировали (2500 об/мин, 20 мин, 4°C) и далее плазму хранили при температуре –20°C до момента определения содержания в ней тестостерона (самцы) и эстрадиола (самки). Самок декапитировали в стадию диэструс. Уровень гормонов определяли методом ИФА с использованием стандартных наборов (ХЕМА, Россия).

5. Методы статистического анализа

Статистический анализ проводили с использованием параметрических критериев и программы «STATISTICA 12.0». 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 (день тестирования х группа

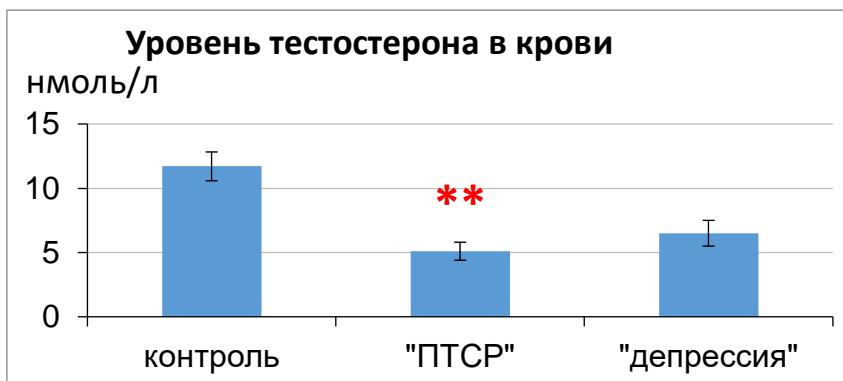
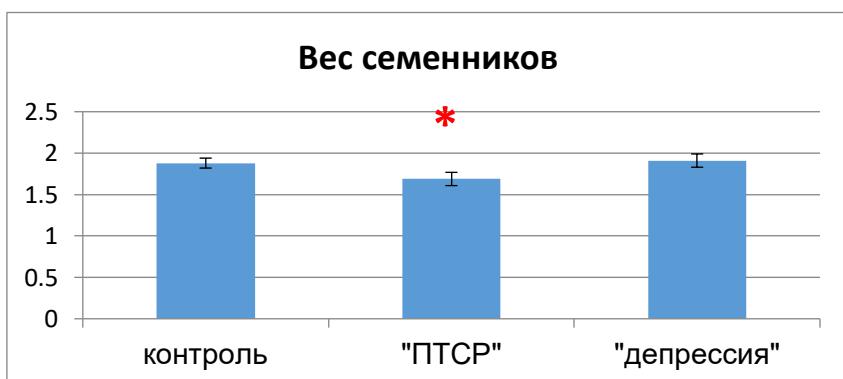
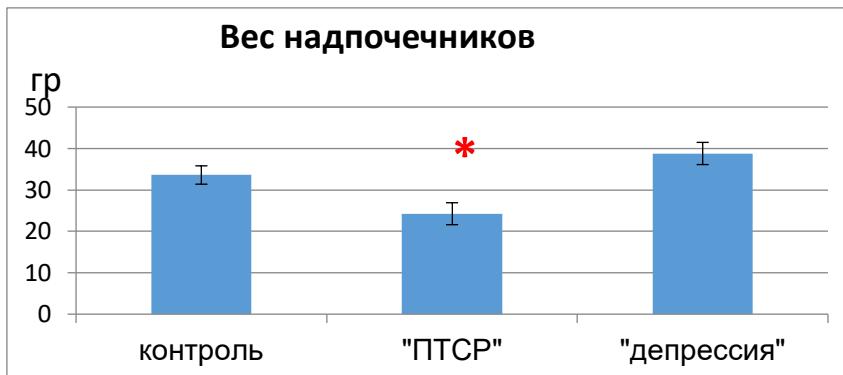
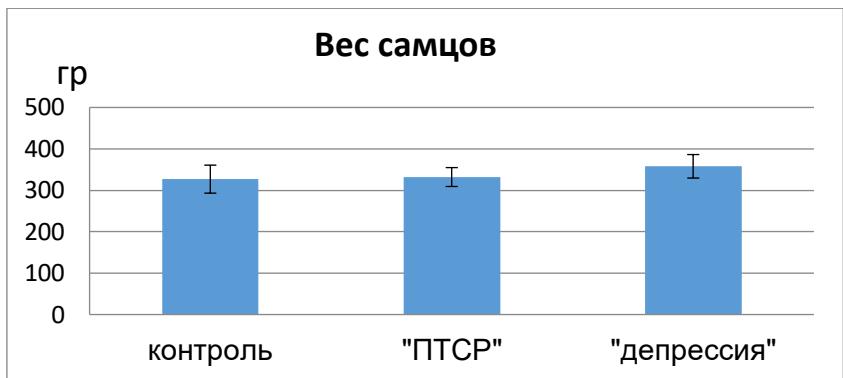
животных) с последующими парными *post-hoc* сравнениями (тест Тьюки) результатов отдельных тестов. Для оценки межгрупповых различий в teste РНО, результатов показателей экспрессии генов *Igf2*, *Igf2r*, уровня гормонов в плазме крови и морфометрических показателей семенников применяли *t*-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Данные представлены в виде $M \pm m$.

Результаты их обсуждение

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

С целью контроля развития ПТСР-подобного или депрессивно-подобного состояния у самцов отцов на 10 день после «рестресса» или электрокожной стимуляции в крови, взятой из хвостовой вены контрольных и экспериментальных животных, определяли базальный уровень кортикостерона. Изучение репродуктивных функций проводили на 46 сут после рестресса при моделировании ПТСР и на 46 сут после неизбежаемого стрессорного воздействия при моделировании депрессии только у тех самцов, у которых уровень кортикостерона был снижен (модель ПТСР) или повышен (модель депрессии). Исследования показали, что в обеих моделях постстрессорных психопатологий вес животных не изменяется. Вес семенников, надпочечников и уровень кортикостерона снижен только у самцов с моделированием ПТСР (рис. 1). При этом уровень тестостерона был снижен как у самцов с ПТСР-подобным состоянием, так и у самцов с депрессивно-подобным состоянием.

Результаты морфометрического анализа состояния семенников и показателей сперматогенеза представлены в таблице 1. Из таблицы видно, что ПТСР-подобное состояние оказывает более выраженное влияние на все исследованные параметры состояния семенников и показатели сперматогенеза по сравнению с депрессивно-подобным состоянием. Обращает на себя внимание факт снижения числа клеток Сертоли и уменьшение их площади у самцов в ПТСР-подобном состоянии. Хорошо известно, что клеткам Сертоли принадлежит важнейшая роль в обеспечении процесса сперматогенеза (Crisostomo et al., 2018). Возможно, что нарушение сперматогенеза, обнаруженное у самцов с ПТСР-подобным состоянием, связано не только со снижением числа клеток Сертоли, но и с уменьшением их функциональной активности, о чем свидетельствует снижение площади этих клеток.



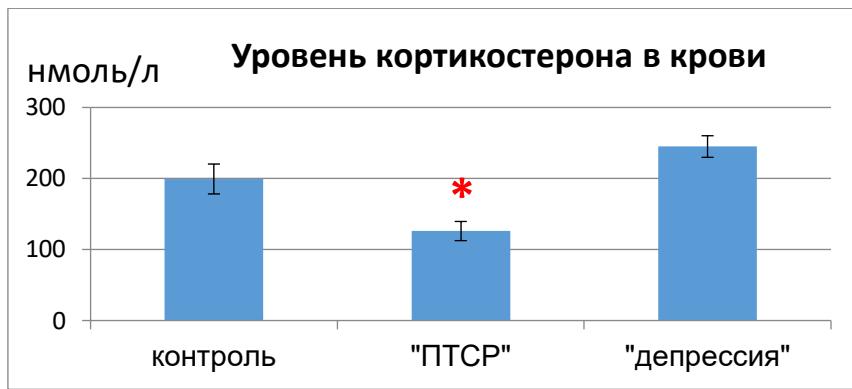


Рис. 1. Влияние экспериментальных аналогов ПТСР и депрессии на показатели веса тела и некоторых эндокринных желез, а также уровень стероидных гормонов в плазме крови самцов. * - статистически значимые отличия от контрольных самцов ($p<0,05$). ** - $p<0,01$.

Таблица 1. Влияние экспериментальных ПТСР и депрессии на морфометрические показатели семенников и сперматогенеза самцов

Показатель	Контрольные самцы (n=5)	Самцы моделированием ПТСР (n=5)	Самцы с моделированием депрессии (n=5)
Площадь поперечного сечения извитого семенного канальца, мкм^2	62878±4585,0	48693± 3025,2**	67490±3846,3
Толщина сперматогенного эпителия, мкм	57,7±3,22	44,8± 3,84**	48,4±4,37
Площадь сперматогенного эпителия, мкм^2	41207±3443,9	34223±3163,2**	34963±3784,3
Количество клеток Сертоли в сперматогенном эпителии	24,2±1,03	22,3±0,63*	23,4±0,85
Площадь клеток Сертоли, мкм^2	77,6±2,22	72,3±1,36 *	77,0±2,28
Количество недифференцированных сперматогониев	54,1±3,57	46,5±3,37*	48,8±4,08
Количество дифференцирующихся сперматогониев	62,7±3,38	53,13±2,67 *	55,6±1,82 *
Количество сперматоцитов	53,7±3,03	39,9±3,44 **	41,3±2,86 *
Количество сперматид	50,5±4,81	35,8±3,56**	34,9±3,38 *
Количество сперматозоидов	334±28,7	272±21,3 *	277±23,5
Число аномальных спермиев, выделенных из	0,8±0,22	3,37±0,19**	1,2±0,3

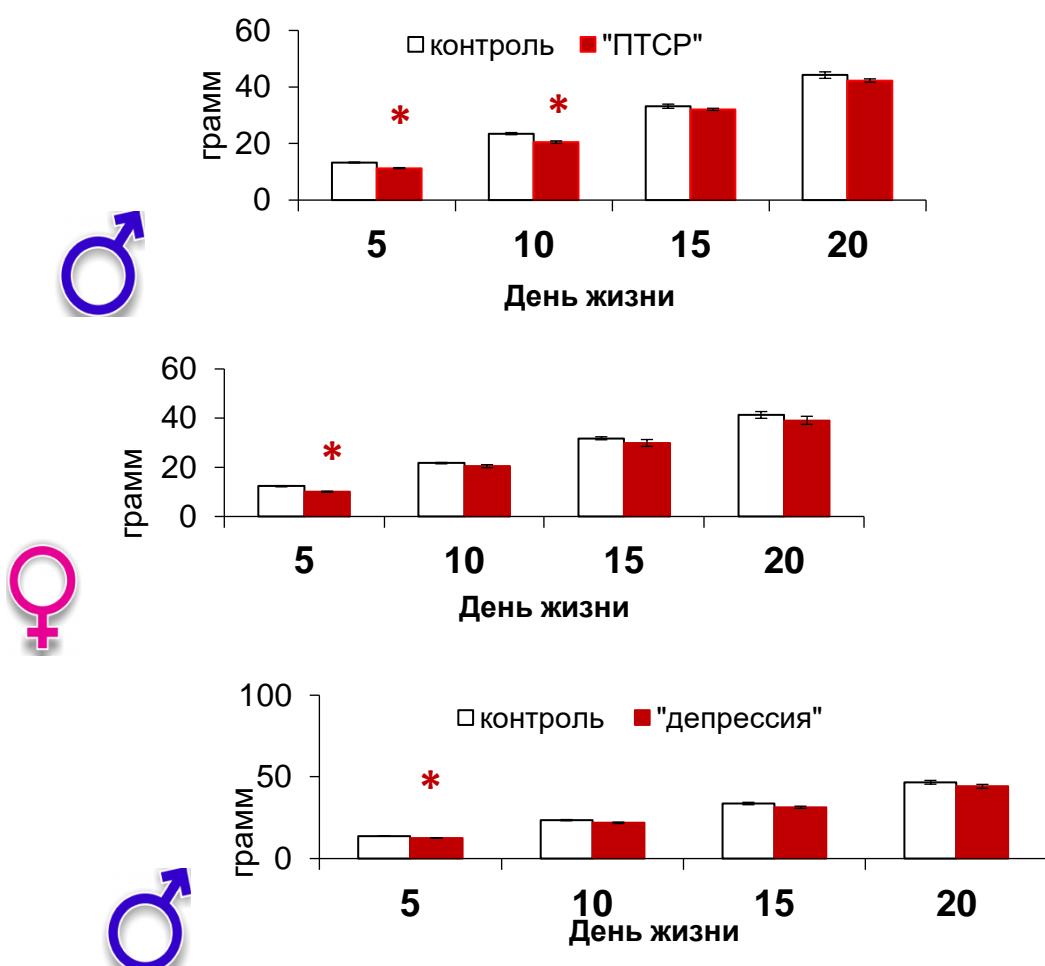
эпидидимиса (% от общего числа оцененных клеток)			
--	--	--	--

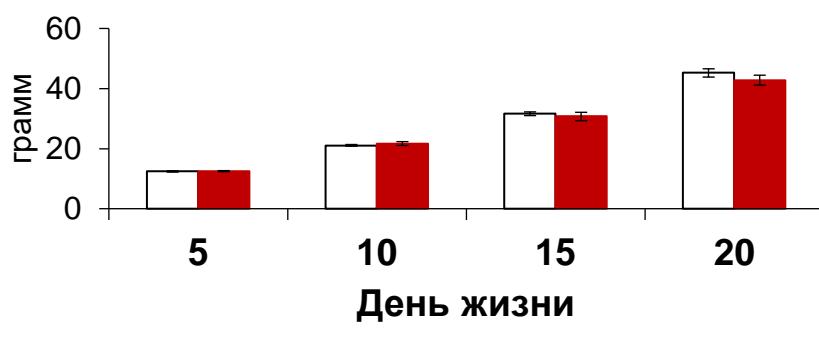
Примечание. * - статистически значимые отличия от контрольных самцов ($p<0,05$).

** - $p<0,01$.

2. Влияние ПТСР-подобного или депрессивно-подобного состояния самцов – отцов на соматическое развитие потомков.

Наиболее выраженное влияние на соматическое развитие потомков обнаружено для самцов-отцов с ПТСР-подобным состоянием. Их потомки мужского пола отставали в развитии до 10 дня жизни, а потомки самки в 5-й день жизни (Рис. 2). Влияние на вес тела потомков отцов с депрессивно-подобным состоянием выявлено только для потомков самцов и только на 5-й день жизни.





Таким образом, выявлено, что ПТСР-подобное состояние оказывает более выраженное влияние не только на репродуктивные функции самцов, но и соматическое развитие их потомков по сравнению с депрессивно-подобным состоянием. Это мы связываем с тем, что стрессорное воздействие, применяемое для моделирования ПТСР, более сильное, чем при моделировании депрессии.

3. Влияние экспериментальных ПТСР и депрессии самцов- отцов на поведение половозрелых потомков

Результаты исследования ориентировано-исследовательской активности и уровня тревожности потомков обоего пола схематично представлены в Таблице 2. Выявлено, что ПТСР-подобное состояние самцов-отцов оказывает более значительное влияние на показатели поведение потомков обоего пола по сравнению с депрессивно-подобным состоянием. В последнем случае обнаружено изменение исследовательской активности у потомков обоего пола.

Группа крыс	Пол крыс	Показатели поведения		
		Уровень тревожности		Ориентировано-исследовательская активность
		Тест «светлая-темная камера»	Тест «приподнятый крестообразный лабиринт»	
Потомки отцов с моделированием ПТСР по сравнению с контрольным и потомками	самцы	↑	↑	↓
	самки	↑	↑	—
Потомки отцов с моделированием депрессии по сравнению с контрольным и потомками	самцы	—	—	↓ Исследовательская активность
	самки	—	—	↓ Исследовательская активность

4. Влияние экспериментальных ПТСР и депрессии самцов- отцов на память потомков.

Результаты экспериментов, где исследовали выработку и угашение РПИ, а также показатель различия нового и старого объекта (Кд) в тесте РНО у потомков подопытных и контрольных самцов отцов представлены на следующем рисунке. Статистический 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.

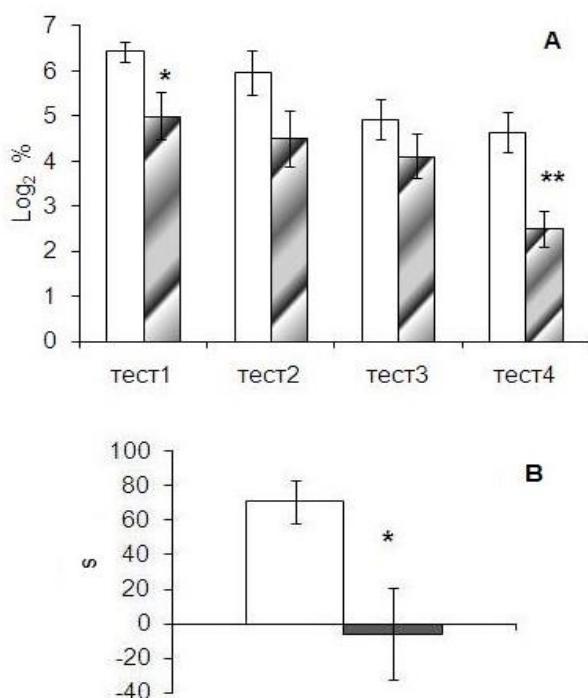


Рис. 3. Влияние ПТСР-подобного состояния самцов на память потомков мужского пола в тестах «реакция пассивного избегания» (А) и «распознавание нового объекта» (В). Панель А: по оси ординат — Log_2 латентного периода захода в темный отсек камеры в % от общего времени тестирования (180 с). Панель Б: по оси ординат — коэффициент дискриминации (с). 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 был выявлен сниженный латентный период захода в темный отсек камеры во вторую сессию (тестирование обученности) по сравнению с потомками контрольных самцов. Угашение РПИ у самок – потомков подопытных самцов –

происходило значительно быстрее, чем у контрольных самок (Рис. 4). Достоверные различия были обнаружены также в «тестовую» фазу РНО, где самки – потомки подопытных самцов – значительно меньшее время исследовали новый объект и имели меньший КР, чем контрольные самки.

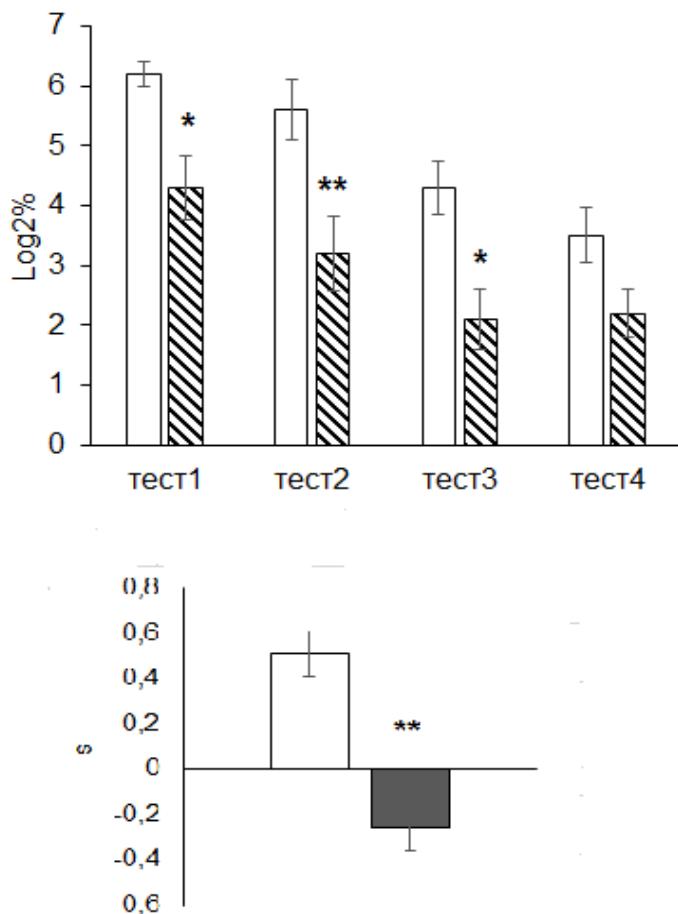


Рис. 4. Влияние ПТСР-подобного состояния самцов на память потомков женского пола в тестах «реакция пассивного избегания» (А) и «распознавание нового объекта» (В). Панель А: по оси ординат — Log_2 латентного периода захода в темный отсек камеры в % от общего времени тестирования (180 с). Панель Б: по оси ординат — коэффициент дискриминации (с). Светлые столбики — потомки контрольных самцов. Темные столбики — потомки стрессированных отцов. * — достоверные различия между потомками контрольных и стрессированных отцов ($p < 0,05$). ** — ($p < 0,01$)

Анализ способности к выработке РПИ и ее угашения у самцов и самок, родившихся от отцов в депрессивно-подобном состоянии или контрольных отцов, с использованием двухфакторного ANOVA показало отсутствие достоверного влияния фактора группы животных на выработку РПИ и ее сохранность. В teste РНО также не было выявлено существенного влияния депрессивно-подобного состояния самца-отца на Кд их потомков. Результаты тестирования памяти потомков-самцов представлены на рис. 5.

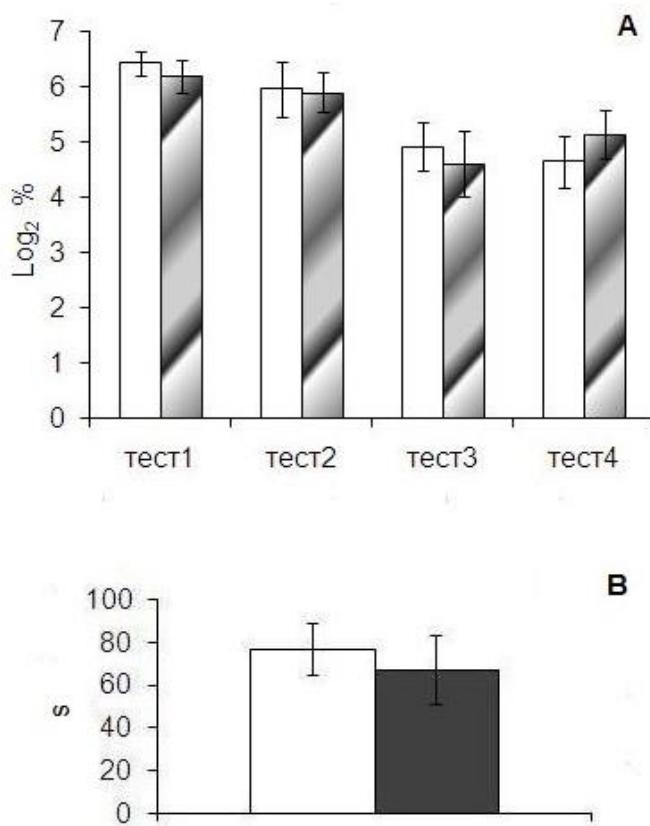


Рис. 5. Влияние депрессивно-подобного состояния самца-отца на память потомков мужского пола. Обозначения те же, что и на рис. 3.

5. Влияние ПТСР- или депрессивно-подобного состояний отца-самца на уровень половых стероидных гормонов в крови потомков.

Выявлено снижение уровня тестостерона к самцов – потомков отцов, стрессированных как в парадигме «стресс-рестресс», так и в парадигме «выученная беспомощность, по сравнению с потомками контрольных самцов (Рис. 6). При этом у самок обеих экспериментальных групп изменений в уровне эстрадиола не обнаружено.

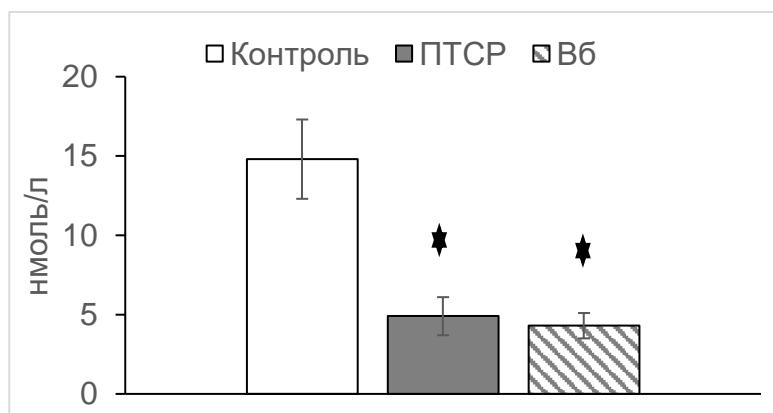


Рис. 6. Влияние стресса отца на уровень тестостерона в крови потомков самцов. Светлые столбики – потомки контрольных самцов. Темные столбики – потомки отцов с ПТСР-подобным состоянием., столбики со штриховкой - потомки отцов с депрессивно-подобным состоянием * - достоверные отличия от потомков контрольных отцов ($p < 0,05$).

6. Влияние ПТСР- или депрессивно-подобного состояний отца-самца на экспрессию генов Igf2 и Igf2r в гиппокампе потомков

Анализ экспрессии генов в гиппокампе самцов - потомков отцов с ПТСР-подобным состоянием выявил снижение экспрессии гена *Igf2* по сравнению с аналогичным показателем у потомков контрольных отцов, тогда как экспрессия гена *Igf2r* существенных изменений не претерпевала (рис. 7). У потомок – самок, родившихся от самцов с ПТСР-подобным состоянием, изменений в экспрессии обоих генов не выявлено (данные не представлены). В гиппокампе самцов и самок - потомков отцов с депрессивно-подобным состоянием изменений экспрессии обоих генов не обнаружено. Данные свидетельствуют о том, что ПТСР-подобное состояние отца в период сперматогенеза оказывает выраженное влияние на экспрессию *Igf2* в мозге потомков, но только мужского пола.

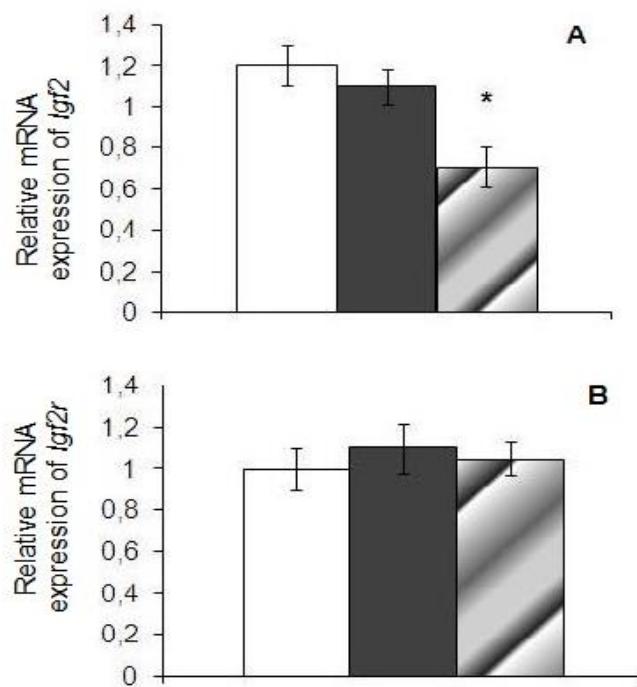


Рис. 7. Уровень экспрессии генов *Igf2* (A) и *Igf2r* (B) в гиппокампе самцов, родившихся от самцов-отцов с моделированием ПТСР или депрессии. Светлые столбики – потомки контрольных самцов. Темные столбики – потомки отцов с депрессивно-подобным состоянием, столбики со штриховкой - потомки отцов с ПТСР-подобным состоянием. * - достоверные отличия от потомков контрольных отцов ($p < 0,05$).

Таким образом, наши исследования показали, что моделирование ПТСР у самцов-отцов оказывает выраженное влияние на память их потомков обоего пола, что сопровождается снижением экспрессии гена *Igf2* в гиппокампе, но только у потомков самцов. Вместе с тем экспрессия гена *Igf2r*, кодирующего М6Ф/ИФР2Р, не изменялась, что свидетельствует о значимости снижение именно ИФР2 в нарушении памяти. Моделирование депрессии у самцов-отцов не влияло ни на память, ни на экспрессию генов *Igf2* и *Igf2r* в гиппокампе потомков. Мы полагаем, что одним из факторов, усиливающих влияние состояния отца на их потомков, может служить интенсивность стрессорного воздействия, которому подвергается самец-отец. Тот факт, что у потомков самцов, родившихся от самцов-отцов, стрессированных в обеих парадигмах, выявлено снижение уровня тестостерона, а снижение экспрессии *Igf2* – только у потомков самцов-отцов с ПТСР-подобным состоянием свидетельствует о том, что тестостерон не вовлекается в регуляцию экспрессии данного гена. Показано, что экспрессия гена *Igf2* регулируется эстрadiолом (Pardo et al., 2018). Вероятно, отсутствие изменений в экспрессии данного гена у самок обеих экспериментальных групп определяется неизменным уровнем эстрadiола по сравнению с контрольными самками.

Заключение.

Проведенные нами исследования выявили определенные различия эффектов стрессирования самцов в парадигме «стресс-рестресс» (модель ПТСР) и «выученная беспомощность» (модель депрессии) не только на состояние репродуктивной системы, но и на различные функции их потомков. Несмотря на то, что и ПТСР-подобное состояние и депрессивно-подобное состояние у самцов-отцов приводило к снижению уровня тестостерона, наиболее значительные изменения в процессах сперматогенеза выявлены при ПТСР-подобном состоянии. Именно ПТСР-подобное состояние самцов – отцов в период сперматогенеза оказывало наибольшее влияние на соматическое развитие, поведение, память и гормональные функции потомков. При этом выраженность изменений у потомков-самцов была выше, чем у потомков-самок. Нарушения памяти потомков, родившихся от самцов с ПТСР-подобным состоянием, сопровождалось снижением экспрессии гена *Igf2* в гиппокампе, но только у потомков – самцов, а не самок. Депрессивно-подобное состояние самцов-отцов оказывало незначительные эффекты на исследованные нами параметры поведения и память потомков обоего пола.

Дифференциальное влияние ПТСР-подобного или депрессивно-подобного состояния в период сперматогенеза у самцов-отцов на потомков, вероятнее всего не связаны с уровнем кортикостерона, которые создают у самцов использованные типы

стрессорных воздействий, а определяются силой стрессорного воздействия и теми изменениями, которые в результате возникают в сперматозоидах самцов-отцов.

Выводы

1. ПТСР-подобное состояние оказывает более значительное влияние на 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. Нарушение памяти самцов, но не самок - потомков отцов с ПТСР-подобным состоянием - сопровождается снижением экспрессии гена инсулиноподобного фактора роста 2 (*Igf2*) в гиппокампе и не изменяет экспрессию гена рецептора 2-го типа (*Igf2r*) этого ростового фактора.

Список публикаций по результатам работы.

Список ВАК.

1. Пивина С.Г., Холова Г.И., Ракицкая В.В., Акулова В.К., Ордян Н.Э. Изменение репродуктивных функций самцов крыс при моделировании посттравматического стрессового расстройства// Журнал эвол. биохим. физиол.- 2019.- Т. 55, №5.- С.374-376.
2. Ордян Н.Э., Малышева О.В., Акулова В.К., Пивина С.Г., Холова Г.И. Способность к обучению и экспрессия гена инсулиноподобного фактора роста II в мозге самцов крыс – потомков отцов, подвергнутых стрессирующему воздействию в парадигме «стресс-рестресс»// Нейрохимия.- 2020.- Т. 37, №2.- С.153-160.
3. Ордян Н.Э., Пивина С.Г., Баранова К.А., Ракицкая В.В., Акулова В.К., Холова Г.И. Зависимое от пола действие пренатального стресса на активность гипоталамо-гипофизарно-адренокортиkalной системы крыс: роль кортикостероидных

рецепторов мозга// Российский физиол. журн. им. И.М. Сеченова.- 2020.-Т. 106, № 6.- С. 740-755.

4. Ордян Н.Э., Пивина С.Г., Акулова В.К., **Холова Г.И.** Изменение характера поведения и активности гипофизарно-адренокортичальной 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.
5. 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 Высш. Нервн. Деят.- 2021. -Т. 71, № 3.- С. 387–399.

Иные издания.

6. **Холова Г.И.**, Акулова В.К., Ордян Н.Э. Роль стресса отца в программировании физиологических функций потомков// Сб. материалов научно-практической конференции «Молодые ученые в решении актуальных проблем современной физиологии», Астрахань. - 2019. - С. 28-30.
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 DOI: [10.33910/2687-1270-2021-2-1-61-70](https://doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-61-70)
8. 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.
9. **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.
10. Ордян Н.Э., **Холова Г.И.** Стресс отца и когнитивные функции потомков// Сб. материалов Международной научно-практической конференция ГОУ Хотлонского государственного медицинского университета «Актуальные вопросы медицины и медицинского образования». 25-декабря 2020. Дангаре, Таджикистан.