



УДК 612.062:577.25

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-61-70>

## Нарушение когнитивных функций потомков самцов крыс, подвергнутых стрессированию в парадигмах «стресс — рестресс» или «выученная беспомощность»: роль инсулиноподобного фактора роста 2

Н. Э. Ордян<sup>✉1</sup>, О. В. Малышева<sup>1,2</sup>, В. К. Акулова<sup>1</sup>, Г. И. Холова<sup>1</sup>, С. Г. Пивина<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

<sup>2</sup> Институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д. О. Отта, 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3

### Сведения об авторах

Наталья Эдуардовна Ордян,  
SPIN-код: 9324-5244,  
Scopus AuthorID: 6603325559,  
ORCID: 0000-0002-2492-262X,  
e-mail: [ordyann@infran.ru](mailto:ordyann@infran.ru)

Ольга Викторовна Малышева,  
SPIN-код: 1740-2691,  
Scopus Author ID: 6603763549,  
ORCID: 0000-0002-8626-5071,  
e-mail: [omal99@mail.ru](mailto:omal99@mail.ru)

Виктория Константиновна  
Акулова,  
Scopus AuthorID: 15749860500,  
e-mail: [neo@infran.ru](mailto:neo@infran.ru)

Гулрухсор Исхакджоновна  
Холова,  
e-mail: [garmieva@bk.ru](mailto:garmieva@bk.ru)

Светлана Геннадьевна Пивина,  
SPIN-код: 3324-7408,  
Scopus AuthorID: 6602095959,  
e-mail: [sgpivina@infran.ru](mailto:sgpivina@infran.ru)

### Для цитирования:

Ордян, Н. Э., Малышева, О. В., Акулова, В. К., Холова, Г. И., Пивина, С. Г. (2021) Нарушение когнитивных функций потомков самцов крыс, подвергнутых стрессированию в парадигмах «стресс — рестресс» или «выученная беспомощность»: роль инсулиноподобного фактора роста 2. *Интегративная физиология*, т. 2, № 1, с. 61–70. <https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-61-70>

**Получена** 29 января 2021; прошла рецензирование 22 февраля 2021; принята 24 февраля 2021.

**Финансирование:** Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 18-015-00186.

**Аннотация.** Такие психопатологии, как депрессия и посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР), которыми страдают отцы в репродуктивном возрасте, могут оказывать влияние на физиологические функции потомков, в том числе на когнитивные функции и память. Целью исследования являлось сопоставление эффектов стрессирования самцов крыс в двух парадигмах, моделирующих ПТСР («стресс — рестресс») или депрессию («выученная беспомощность»), на память их взрослых потомков-самцов, которую изучали в тестах «пассивное избегание» и «распознавание нового объекта». В связи с вовлеченностью инсулиноподобного фактора роста 2 (Igf2) и его рецептора 2-го типа (Igf2r) в контроль памяти в гиппокампе потомков изучена экспрессия генов *Igf2* и *Igf2r* методом ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени. Показано нарушение памяти потомков самцов-отцов с ПТСР-подобным состоянием, сопровождающееся снижением в гиппокампе экспрессии *Igf2*, но не *Igf2r*. У потомков самцов в депрессивноподобном состоянии нарушений памяти и экспрессии генов в гиппокампе не выявлено. Сделано заключение, что одним из факторов, обеспечивающих влияние состояния отца на память потомков, может служить интенсивность стрессорного воздействия, которому подвергается самец-отец, а также о значимости роли снижения в гиппокампе экспрессии *Igf2* в нарушении формирования памяти и длительности ее сохранения.

**Ключевые слова:** посттравматическое стрессовое расстройство, депрессия, модель, потомки, память, инсулиноподобный фактор роста 2, рецептор инсулиноподобного фактора роста 2, гиппокамп, крыса.

**Права:** © Авторы (2021).  
Опубликовано Российским  
государственным педагогическим  
университетом им. А. И. Герцена.  
Открытый доступ на условиях  
лицензии CC BY-NC 4.0.

## Cognitive impairment in the offspring of male rats exposed to stress in “stress — restrest” or “learned helplessness” paradigms: The role of insulin-like growth factor 2

N. E. Ordyan<sup>✉1</sup>, O. V. Malysheva<sup>1,2</sup>, V. K. Akulova<sup>1</sup>, G. I. Kholova<sup>1</sup>, S. G. Pivina<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 6 Makarova Emb.,  
Saint Petersburg 199034, Russia

<sup>2</sup> D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, 3 Mendeleev Line,  
Saint Petersburg 199034, Russia

### Authors

Natalia E. Ordyan,  
SPIN: 9324-5244,  
Scopus AuthorID: 6603325559,  
ORCID: 0000-0002-2492-262X,  
e-mail: [ordyann@infran.ru](mailto:ordyann@infran.ru)

Olga V. Malysheva,  
SPIN: 1740-2691,  
Scopus AuthorID: 6603763549,  
ORCID: 0000-0002-8626-5071,  
e-mail: [omal99@mail.ru](mailto:omal99@mail.ru)

Viktoria K. Akulova,  
Scopus AuthorID: 15749860500,  
e-mail: [neo@infran.ru](mailto:neo@infran.ru)

Gulrukhsor I. Kholova,  
e-mail: [garmieva@bk.ru](mailto:garmieva@bk.ru)

Svetlana G. Pivina,  
SPIN: 3324-7408,  
Scopus AuthorID: 6602095959,  
e-mail: [sgpivina@infran.ru](mailto:sgpivina@infran.ru)

### For citation:

Ordyan, N. E., Malysheva, O. V.,  
Akulova, V. K., Kholova, G. I.,  
Pivina, S. G.  
(2021) Cognitive impairment  
in the offspring of male rats exposed  
to stress in “stress — restrest”  
or “learned helplessness” paradigms:  
The role of insulin-like growth  
factor 2. *Integrative Physiology*,  
vol. 2, no. 1, pp. 61–70.  
<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-61-70>

**Received** 29 January 2021;  
reviewed 22 February 2021;  
accepted 24 February 2021.

**Funding:** This study was supported  
by the Russian Foundation for Basic  
Research, project no. 18-015-00186.

**Copyright:** © The Authors (2021).  
Published by Herzen State  
Pedagogical University of Russia.  
Open access under [CC BY-NC](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)  
License 4.0.

**Abstract.** Psychopathologies such as depression and post-traumatic stress disorder (PTSD), which fathers suffer during reproductive years, can affect the physiological functions of the offspring, including cognitive function and memory. The aim of the study was to compare how the stress in male rats affected the memory of their adult male offspring. The experiment modeled two stress paradigms: PTSD (“stress — restrest”) and depression (“learned helplessness”). The methodology included a passive avoidance test and recognition of a new object test. In connection with the involvement of insulin-like growth factor 2 (Igf2) and its receptor type 2 (Igf2r) in memory control, the expression of *Igf2* and *Igf2r* genes in the hippocampus of the offspring was studied by reverse transcription real-time PCR. The study revealed memory impairment in male offspring with a PTSD-like status. It was accompanied by a decrease in the expression of *Igf2*, but not *Igf2r* in the hippocampus. The offspring of depressive males did not show impaired memory and gene expression in the hippocampus. We concluded that the influence of the paternal stress on the memory of their offspring may be dependent on the intensity of stress to which the male was exposed. We also concluded that a decrease in *Igf2* expression in the hippocampus contributed to impaired memory and the duration of memory retention.

**Keywords:** post-traumatic stress disorder, depression, modeling, offspring, memory, insulin-like growth factor 2, receptor of insulin-like growth factor 2, hippocampus, rat.

## Введение

В литературе появились клинические и экспериментальные данные о влиянии нарушения уровня глюкокортикоидных гормонов у отцов на различные физиологические функции потомков. В исследованиях А. Лехнера и соавторов было показано, что потомки отцов, которые страдали посттравматическим стрессовым расстройством (ПТСР), демонстрируют нарушение активности гипофизарно-адренокортикальной системы (ГАС), свидетельствующее о снижении чувствительности этой гормональной оси к сигналам отрицательной обратной связи (Lehrner et al. 2014). В экспериментах, где у лабораторных грызунов моделировали депрессию с использованием хронического умеренного стресса, выявлено, напротив, снижение стрессорной активности ГАС (Rodgers et al. 2013). Эти данные указывают, что разные психопатологии отца как в клинике, так и при моделировании в эксперименте могут оказывать различное по своей направленности действие на потомков. Такие различия могут быть обусловлены тем, что при указанных психопатологиях наблюдается диаметрально противоположная активность ГАС. При депрессии активность этой гормональной системы увеличена, что проявляется в повышении базального уровня глюкокортикоидов в крови и снижении ее чувствительности к сигналам отрицательной обратной связи (Pariante, Lightman 2008). При ПТСР, напротив, чаще всего наблюдается снижение базального уровня кортикостерона с усилением регуляция ГАС по механизму отрицательной обратной связи (Andreasen 2011).

В исследованиях, выполненных ранее, было показано, что моделирование ПТСР в парадигме «стресс — рестресс» у самцов крыс в период сперматогенеза не только оказывает деструктивное влияние на их репродуктивные функции (Pivina et al. 2019), но и проявляется в нарушении памяти у их потомков-самцов в тесте «реакция пассивного избегания» (Ordyan et al. 2020). Выявленные нарушения памяти сопровождались снижением экспрессии гена инсулиноподобного фактора роста 2 (ИФР2, *Igf2*) в гиппокампе. Остается неизвестным, оказывает ли депрессивноподобное влияние на состояние самцов-отцов на когнитивные функции потомков и экспрессию гена *Igf2* в мозге.

В связи с этим целью исследования являлось сопоставление стрессирования самцов-отцов в двух парадигмах, моделирующих ПТСР или депрессию. Следует отметить, что в большинстве работ, где изучали последствия стрессирования

самцов-отцов у их потомков, использовали различные виды хронического стрессирования (Dietz et al. 2011; Rodgers et al. 2013). Для моделирования депрессии мы использовали парадигму «выученная беспомощность». Выбор этой модели депрессии обосновывался тем, что в данной парадигме животным предъявляется однократное неизбежаемое стрессорное воздействие в течение 1 ч. Однократное стрессорное воздействие используется и при моделировании ПТСР в парадигме «стресс — рестресс», и хотя здесь животных дополнительно стрессируют через 7 суток после первоначального воздействия с целью создания стойкого ПТСР-подобного состояния, эта дополнительная стрессорная процедура является кратким 30-минутным ограничением подвижности. У потомков самцов-отцов в ПТСР-подобном или депрессивноподобном состоянии была исследована память, а в гиппокампе изучена экспрессия гена *Igf2* и его рецептора второго типа (*Igf2r*) в связи с имеющимися в литературе данными о вовлеченности этого ростового фактора в контроль гиппокамп-зависимой памяти (Chen et al. 2011; Yu et al. 2020).

## Объекты и методы исследования

Для проведения экспериментов было использовано 15 крыс линии Wistar (самцы, вес 250–300 г) из ЦКП «Биоколлекция ИФ РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем» и их потомки самцы, полученные от интактных самок (вес 200–230 г) той же линии. Животных содержали в стандартных условиях вивария без ограничения доступа к воде и пище и световом режиме 12:12 ч. Все эксперименты выполнены в соответствии с требованиями, изложенными в директиве Европейского сообщества 2010 г. (2010/63/ЕЕС). Самцы были случайным образом разделены на три группы (моделирование ПТСР — 5 крыс, моделирование депрессии — 5 крыс и контрольная — 5 крыс). После процедуры стрессирования через 46–48 суток каждый самец был посажен к рецептивной самке, находящейся в стадии эструса. 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 качестве модели ПТСР использовали парадигму «стресс — рестресс», в которой самцов подвергали комбинированному воздействию, состоящему из последовательно применяемых стрессоров (двухчасовая иммобилизация в узких пластиковых пенах, двадцатиминутное плавание в стеклянных цилиндрах диаметром 40 см и глубиной 60 см, заполненных водой с температурой  $24 \pm 2$  °С, а после небольшой паузы — эфирный стресс в течение 1 мин). Через шесть суток после комбинированного стресса производили тридцатиминутную иммобилизацию — «рестресс», который служит триггером для развития стойкого ПТСР-подобного состояния. Контроль развития ПТСР-подобного состояния осуществляли по уровню кортикостерона на 10 суток 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 размером  $30 \times 18 \times 20$  см. Удары электрического тока (1мА, 50 Гц) длительностью 15 с подавали 60 раз в течение 1 ч с длительностью интервала между ударами током от 15 до 54 с. Такой режим электрокожной стимуляции создает неизбежность 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 депрессивноподобного состояния осуществляли по уровню кортикостерона на 10-е сутки 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.

Помимо кортикостерона, в крови самцов, у которых моделировали психопатологии, определяли уровень тестостерона. Кровь животных центрифугировали при 2 500 об/мин и температуре 4 °С. Полученную плазму хранили при  $-20$  °С до момента определения в ней уровня кортикостерона и тестостерона. Содержание гормонов в плазме самцов анализировали методом ИФА, используя стандартные наборы

производства «ХЕМА» (Россия) и анализатор Multiskan FS (ThermoFisher Scientific, Финляндия).

Память потомков изучали в тестах «реакция пассивного избегания» (РПИ) и «распознавание нового объекта» (РНО). Особенность теста РПИ заключается в том, что используемый в данном тесте удар электрического тока после захода в темную камеру животным запоминается на достаточно длительный срок, а угашение этой реакции (забывание) можно определить, проводя дополнительные тестирования животных через некоторые промежутки времени после первой сессии обучения. Второй тест связан со способностью животного различать старый объект и новый, а при предъявлении нового объекта — проявлять повышенную исследовательскую активность по отношению к нему. Тестирование памяти осуществляли только у половозрелых потомков самцов весом 230–250 г, родившихся от отцов с ПТСР-подобным или депрессивноподобным состоянием, а также от контрольных отцов ( $n = 10$  в каждой группе животных). С целью нивелирования влияния материнского ухода на исследуемые параметры группы потомков формировали таким образом, чтобы в каждой группе присутствовало только по два самца из помета. Тесты выполняли с 13:00 до 17:00.

Вначале выполняли тест РНО как менее стрессогенный. 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 5 минут. 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 этого в течение 5 минут регистрировали время исследования знакомого и нового объектов. Для оценки памяти распознавания объектов использовали коэффициент дискриминации ( $K_d$ ), который рассчитывали по формуле:

$$K_d = \frac{\text{Время (Объект Новый)} - \text{Время (Объект Знакомый)}}{\text{Время (Объект Новый)} + \text{Время (Объект Знакомый)}} \times 100$$

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

На следующие сутки вырабатывали РПИ в камере, состоящей из двух 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 тесте фиксировали латентный период входа крысы в темный отсек. Общее время тестирования в каждой сессии составило 180 сек.

Экспрессию генов *Igf2* и *Igf2r* в гиппокампе изучали 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  $-80^{\circ}\text{C}$ .

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 (ThermoFisher Scientific, США). Каждую реакцию проводили в объеме 20 мкл, в присутствии 10 ммоль dNTP, 200 Ед/мл обратной транскриптазы MMLV, расщепленной 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 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  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . Исследования выполняли на приборе Real-Time PCR System 7500 (Applied Biosystems, США).

Статистический анализ проводили с использованием параметрических критериев и программы «STATISTICA 8.0». 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  $\times$  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 применяли *t*-критерий Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ . Данные представлены в виде  $M \pm m$ .

## Результаты

### *Влияние модельных психопатологий на уровень стероидных гормонов в крови самцов-отцов*

С целью контроля развития ПТСП-подобного или депрессивноподобного состояния у самцов отцов на 10 день после «рестресса» или электрокожной стимуляции в крови определяли базальный уровень кортикостерона и тестостерона. Выявлено снижение уровня кортикостерона и тестостерона у самцов с ПТСП-подобным состоянием и повышение уровня кортикостерона у самцов с депрессивноподобным состоянием, сопровождающееся снижением уровня тестостерона (рис. 1).

### *Влияние ПТСП-подобного состояния самца-отца на способность к обучению и память потомков*

Результаты экспериментов, где исследовали выработку и угашение РПИ, а также показатель различения нового и старого объекта (Кд) в тесте РНО у потомков подопытных и контрольных самцов-отцов, представлены

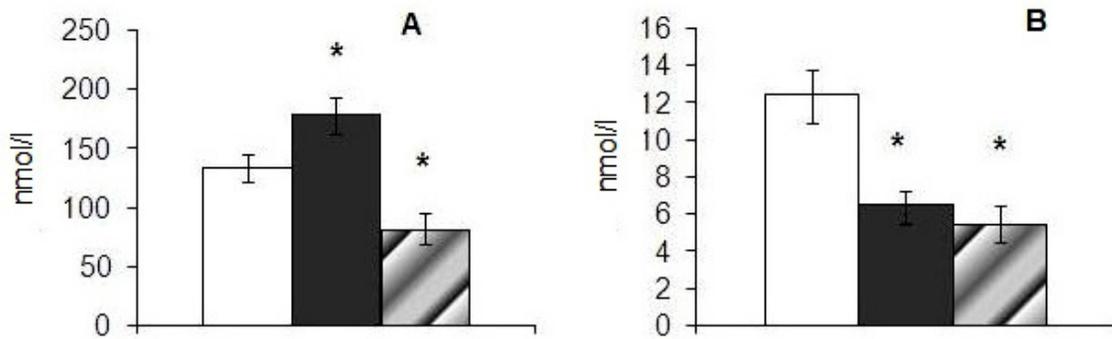


Рис. 1. Влияние экспериментальных психопатологий на уровни кортикостерона (А) и тестостерона (В) в крови самцов крыс. Светлые столбики — контрольные самцы, темные столбики — самцы с моделированием депрессии, столбики со штриховкой — самцы с моделированием ПТСР. \* — достоверные отличия от контрольных самцов ( $p < 0,05$ )

Fig. 1. The influence of experimental psychopathologies on corticosterone (A) and testosterone (B) levels in the blood of male rats. Light bars — control males, dark bars — simulated depression males, dashed columns — simulated PTSD males. \* — significant differences from control males ( $p < 0.05$ )

на рисунке 2. Двухфакторный дисперсионный анализ результатов теста РПИ методом ANOVA показал взаимодействие факторов день тестирования — группа животных ( $F_{(3,79)} = 9,3$ ,  $p = 0,00004$ ). *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. 2А).

В тесте РНО также были обнаружены различия между самцами — потомками подопытных или контрольных самцов-отцов (рис. 2В). Кд у самцов, родившихся от отцов в ПТСР-подобном состоянии, был статистически значимо снижен по сравнению с этим показателем у потомков контрольных самцов-отцов.

Полученные данные свидетельствуют о значительном нарушении памяти и длительности ее сохранения у самцов, родившихся от отцов с ПТСР-подобным состоянием.

#### *Влияние депрессивноподобного состояния отца-самца на способность к обучению и память потомков*

Результаты данной серии экспериментов представлены на рисунке 3. Анализ способности

к выработке РПИ и ее угашения у самцов, родившихся от отцов в депрессивноподобном состоянии или контрольных отцов, с использованием двухфакторного ANOVA показал отсутствие достоверного влияния фактора группа животных на выработку РПИ и ее сохранность ( $F_{(3,79)} = 0,34$ ,  $p = 0,58$ ). В тесте РНО также не было выявлено существенного влияния депрессивноподобного состояния самца-отца на Кд их потомков-самцов.

Можно заключить, что стрессирование самцов-отцов в парадигме «выученная беспомощность» не оказывает значимого влияния на память их потомков мужского пола.

#### *Влияние ПТСР- или депрессивноподобного состояния отца-самца на экспрессию генов *Igf2* и *Igf2r* в гиппокампе потомков*

Анализ экспрессии генов в гиппокампе 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. 4). В гиппокампе потомков отцов с депрессивноподобным состоянием изменений экспрессии обоих генов не обнаружено. Данные свидетельствуют о том, что ПТСР-подобное состояние отца в период сперматогенеза оказывает более выраженное влияние на экспрессию *Igf2* в мозге потомков.

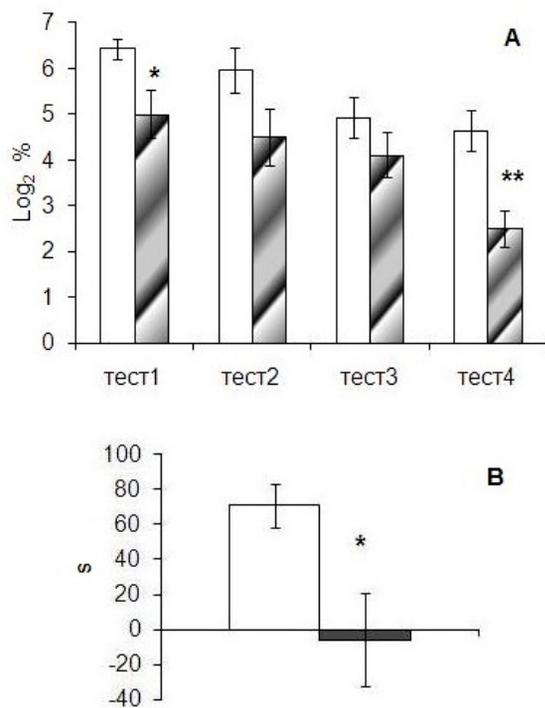


Рис. 2. Влияние ПТСР-подобного состояния самцов на память потомков в тестах «реакция пассивного избегания» (А) и «распознавание нового объекта» (В).

Панель А: по оси ординат —  $\text{Log}_2$  латентного периода захода в темный отсек камеры в % от общего времени тестирования (180 с).

Панель В: по оси ординат — коэффициент дискриминации (с).

Светлые столбики — потомки контрольных самцов. Темные столбики — потомки стрессированных отцов. \* — достоверные различия между потомками контрольных и стрессированных отцов ( $p < 0,05$ ). \*\* — ( $p < 0,01$ )

Fig. 2. The influence of paternal PTSD-like status on the offspring memory in the passive avoidance (A) and novel object recognition tests (B).

Panel A: ordinate —  $\text{Log}_2$  of latency period of entering the dark compartment of the chamber in % of the total testing time (180 s).

Panel B: ordinate — discrimination coefficient (s).

Light bars — the offspring of control fathers.

Dark bars — the offspring of stressed fathers.

\* — significant differences between the offspring of control and stressed fathers ( $p < 0.05$ ). \*\* — ( $p < 0.01$ )

### Обсуждение полученных результатов

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

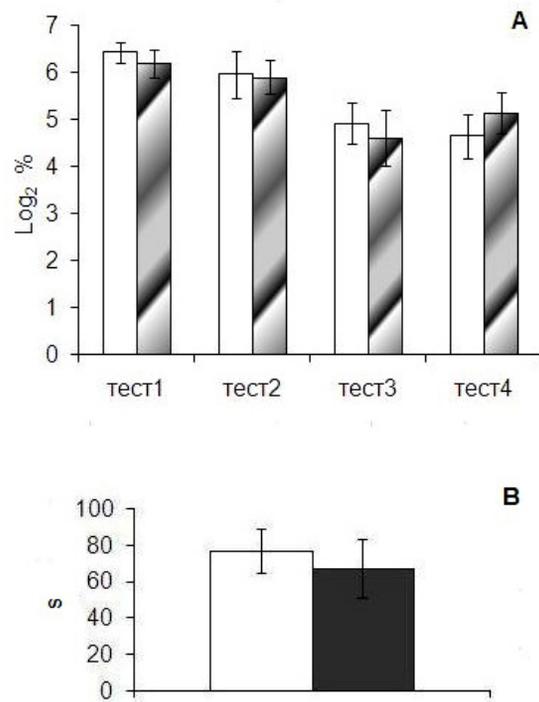


Рис. 3. Влияние депрессивно-подобного состояния самца-отца на память потомков в тестах «реакция пассивного избегания» (А) и «распознавание нового объекта» (В).

Панель А: по оси ординат —  $\text{Log}_2$  латентного периода захода в темный отсек камеры в % от общего времени тестирования (180 с).

Панель В: по оси ординат — коэффициент дискриминации (с). Светлые столбики — потомки контрольных самцов. Темные столбики — потомки стрессированных отцов

Fig. 3. The influence of paternal depressive-like status on the offspring memory in the passive avoidance (A) and novel object recognition tests (B).

Panel A: ordinate —  $\text{Log}_2$  of latency period of entering the dark compartment of the chamber in % of the total testing time (180 s).

Panel B: ordinate — discrimination coefficient (s).

Light bars — the offspring of control fathers.

Dark bars — the offspring of stressed fathers

(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, подтверждается и нашими данными, которые демонстрируют

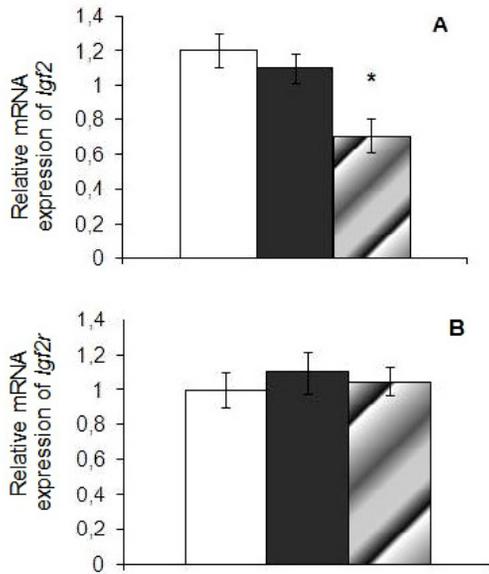


Рис. 4. Уровень экспрессии генов *Igf2* (A) и *Igf2r* (B) в гиппокампе потомков, родившихся от самцов с моделированием ПТСР или депрессии.

Светлые столбики — потомки контрольных самцов.

Темные столбики — потомки отцов с депрессивноподобным состоянием.

Столбики со штриховкой — потомки отцов с ПТСР-подобным состоянием. \* — достоверные отличия от потомков контрольных отцов ( $p < 0,05$ )

Fig. 4. Expression level of *Igf2* (A) and *Igf2r* (B) genes in the hippocampus of the offspring born from males with modelled PTSD or depression.

Light bars — the offspring of control males.

Dark bars — the offspring of males in depressive-like status.

Dashed columns — the offspring of males in PTSD-like status. \* — significant differences from the offspring of control males ( $p < 0.05$ )

ухудшение памяти потомков отцов с ПТСР-подобным состоянием, что сопровождается снижением экспрессии гена *Igf2* в гиппокампе. Следует отметить, что ухудшение памяти нами выявлено не только в тесте РПИ, который сопровождается отрицательным подкреплением, но и в тесте РНО. 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 депрессивноподобным состоянием память не нарушается, так же, как и экспрессия *Igf2* в гиппокампе.

Механизмы, благодаря которым ИФР2 регулирует память, до сих пор активно обсуждаются. Как известно, ИФР2 может связываться с рецептором ИФР1 и с рецептором самого инсулина (Kolychnev 2000). Однако данные, полученные Д. Чен 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).

Помимо указанных выше рецепторов, ИФР2 специфически связывается с катион-независимым маннозо-6-фосфатным рецептором, который также именуют ИФР2 рецептором 2-го типа (М6Ф/ИФР2Р). Этот рецептор не связан с какими-либо вторичными посредниками (или они пока не идентифицированы), и долгое время считалось, что основная его функция заключается в секвестрировании как циркулирующего, так и локально синтезируемого ИФР2 (Brown et al. 2009).

Недавно было установлено, что М6Ф/ИФР2Р вовлечен в действие ИФР2 на память, связанную с гиппокампом. Такой эффект был выявлен как в тесте РПИ, так и в тесте на пространственную память (Yu et al. 2020). Тем не менее мы не обнаружили изменений экспрессии гена *Igf2r* в гиппокампе самцов, которые демонстрировали нарушения памяти. Вероятно, в данном случае большее значение имеет изначально сниженная экспрессия гена *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.

Следует подчеркнуть, что нарушение памяти мы обнаружили только у потомков отцов с ПТСР-подобным состоянием, но не депрессивноподобным 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 часов, а затем применяли повторное стрессорное воздействие меньшей интенсивности. ПТСР-подобное состояние в этой модели сохраняется длительно, до 30 суток (Pivina et al. 2016).

Для индукции депрессивноподобного состояния использовали однократное неизбежное и неконтролируемое стрессорное воздействие в течение 1 ч. За это время животное получало 60 ударов током длительностью 15 сек. По данным литературы депрессивноподобное 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 депрессивноподобного 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).

## Заключение

Наши исследования показали: моделирование ПТСР у самцов-отцов оказывает выраженное влияние на память их потомков, что сопровождается снижением экспрессии гена *Igf2* в гиппокампе. Вместе с тем экспрессия гена *Igf2r*, кодирующего М6Ф/ИФР2R, у таких потомков не изменялась, что свидетельствует о значимости снижения именно ИФР2 в нарушении памяти этих животных. 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.

## References

- Andreasen, N. C. (2011) What is post-traumatic stress disorder? *Dialogues in Clinical Neuroscience*, vol. 13, no. 3, pp. 240–243. PMID: 22033951. <https://www.doi.org/10.31887/DCNS.2011.13.2/nandreasen> (In English)
- Brown, J., Jones, E. Y., Forbes, B. E. (2009) Interactions of IGF-II with the IGF2R/cation-independent mannose-6-phosphate receptor mechanism and biological outcomes. *Vitamins and Hormones*, vol. 80, pp. 699–719. [https://www.doi.org/10.1016/S0083-6729\(08\)00625-0](https://www.doi.org/10.1016/S0083-6729(08)00625-0) (In English)
- Chen, D. Y., Stern, S. A., Garcia-Osta, A. et al. (2011) A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement. *Nature*, vol. 469, no. 7331, pp. 491–497. <https://www.doi.org/10.1038/nature09667> (In English)
- Cinalli, D. A. Jr., Cohen, S. J., Guthrie, K., Stackman, R. W. Jr. (2020) Object recognition memory: Distinct yet complementary roles of the mouse CA1 and perirhinal cortex. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, vol. 13, article 527543. <https://www.doi.org/10.3389/fnmol.2020.527543> (In English)
- Czén, B., Fuchs, E., Wiborg, O., Simon, M. (2016) Animal models of major depression and their clinical implications. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, vol. 64, pp. 293–310. <https://www.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.04.004> (In English)
- Dietz, D. M., LaPlant, Q., Watts, E. L. et al. (2011) Paternal transmission of stress-induced pathologies. *Biological Psychiatry*, vol. 70, no. 5, pp. 408–414. <https://www.doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.05.005> (In English)
- Kolychev, A. P. (2000) Insulin-like growth factor II (IGF-II). Its role among regulatory peptides of the insulin superfamily. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, vol. 36, no. 2, pp. 91–110. (In English)
- Lehrnera, A., Bierera, L. M., Passarella, V. et al. (2014) Maternal PTSD associates with greater glucocorticoid sensitivity in offspring of Holocaust survivors. *Psychoneuroendocrinology*, vol. 40, pp. 213–220. <https://www.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.11.019> (In English)
- Ordyan, N. E., Malysheva, O. V., Akulova, V. K. et al. (2020) 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*, vol. 14, no. 2, pp. 191–196. <https://www.doi.org/10.1134/S1819712420020075> (In English)
- Pardo, M., Cheng, Y., Sitbon, Y. H. (2019) Insulin growth factor 2 (IGF2) as an emergent target in psychiatric and neurological disorders. Review. *Neuroscience Research*, vol. 149, pp. 1–13. <https://www.doi.org/10.1016/j.neures.2018.10.012> (In English)
- Pariante, C. M., Lightman, S. L. (2008) The HPA axis in major depression: Classical theories and new developments. *Trends in Neurosciences*, vol. 39, no. 9, pp. 464–468. <https://www.doi.org/10.1016/j.tins.2008.06.006> (In English)
- Pivina, S. G., Holova, G. I., Rakitskaya, V. V. et al. (2019) Changes in reproductive functions of male rats in a posttraumatic stress disorder model. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, vol. 55, no. 5, pp. 426–428. <https://www.doi.org/10.1134/S0022093019050120> (In English)
- Pivina, S. G., Rakitskaya, V. V., Akulova, V. K., Ordyan, N. E. (2016) Activity of the hypothalamic–pituitary–adrenal system in prenatally stressed male rats on the experimental model of post-traumatic stress disorder. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, vol. 160, no. 5, pp. 601–604. <https://www.doi.org/10.1007/s10517-016-3227-3> (In English)

- Rodgers, A. B., Morgan, C. P., Bronson, S. L. et al. (2013) Paternal stress exposure alters sperm microRNA content and reprogramming offspring HPA axis stress regulation. *Journal of Neurosciences*, vol. 33, no. 21, pp. 9003–9012. <https://www.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0914-13.2013> (In English)
- Yeshurun, S., Hannan, A. J. (2019) Transgenerational epigenetic influences of paternal environmental exposures on brain function and predisposition to psychiatric disorders. *Molecular Psychiatry*, vol. 24, no. 4, pp. 536–548. <https://www.doi.org/10.1038/s41380-018-0039-z> (In English)
- Yu, X.-W., Pandey, K., Katzman, A. C., Alberini, C. M. (2020) A role for CIM6P/IGF2 receptor in memory consolidation and enhancement. *eLife*, vol. 9, article e54781. <https://www.doi.org/10.7554/eLife.54781> (In English)