

ТРАНСГЕНЕРАЦИОННОЕ ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОГО СТРЕССА НА ПАМЯТЬ И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА 2 В МОЗГЕ ПОТОМКОВ

© 2023 г. Н. Э. Ордян^{1,*}, Е. Д. Шигалугова¹, О. В. Малышева^{1,2},
С. Г. Пивина¹, В. К. Акулова¹, Г. И. Холова¹

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: neo@infran.ru

Поступила в редакцию 25.04.2023 г.

После доработки 05.07.2023 г.

Принята к публикации 02.08.2023 г.

Стрессорные воздействия на беременных матерей нарушают поведение и когнитивные функции у их потомков не только первого, но и последующих поколений. Сходное трансгенерационное влияние на фенотип потомков могут оказывать различные стрессорные факторы, действующие на отцов до зачатия. Цель исследования: выявление трансгенерационного эффекта стрессирования самок крыс с 15–19 день беременности на память и экспрессию гена инсулиноподобного фактора роста 2 (*Igf2*) в мозге потомков мужского пола и их потомков самцов и самок, а также влияние дополнительного стрессирования в парадигме “стресс–рестресс” пренатально стрессированных самцов крыс до спаривания с интактными самками на память и экспрессию в мозге *Igf2* их потомков обоего пола. Мы показали, что пренатально стрессированные самцы и их потомки мужского пола демонстрируют улучшение памяти в тесте реакция пассивного избегания, повышение экспрессии *Igf2* в гиппокампе и неокортексе. Самки – потомки пренатально стрессированных самцов, напротив, демонстрировали снижение длительности сохранения памяти и экспрессии *Igf2* в гиппокампе и неокортексе. Дополнительное стрессирование пренатально стрессированных самцов до спаривания с интактными самками ухудшало память и длительность ее сохранения, снижало экспрессию *Igf2* в мозге потомков обоего пола. Сделано заключение, что трансгенерационные эффекты пренатального стресса на память и экспрессию *Igf2* в мозге зависят от пола потомков, а сам пренатальный стресс у самцов способствует ухудшению памяти и снижению экспрессии *Igf2* в мозге потомков, если таких самцов дополнительно стрессировали до спаривания.

Ключевые слова: пренатальный стресс, трансгенерационный эффект, память, инсулиноподобный фактор роста 2, гиппокамп, неокортекс, крыса

DOI: 10.31857/S0044452923050066, **EDN:** KPHMSE

ВВЕДЕНИЕ

Многочисленными исследованиями было установлено влияние неблагоприятных факторов (стресс, нарушение питания, гипоксия, воздействие токсикантами и многих других) на беременных матерей в отношении поведения и гормональных функций потомков не только первого, но и последующих поколений [1–3]. Сходное трансгенерационное влияние на фенотип потомков могут оказывать различные неблагоприятные факторы, действующие на отцов до зачатия [4–7]. Важно отметить, что воздействие окружающей среды на одно поколение (F0) может сохраняться в течение нескольких поколений, даже когда потомство (F1) выращивается в “контрольных” условиях, т.е. в отсутствие сигнала, запускающего реакцию в поколении F0. Не-

смотря на то что трансгенерационное наследование признаков в нескольких поколениях может быть неселективным, другими словами, все внуки в равной степени подвержены влиянию среды своих бабушек и дедушек [8], соответствующие изменения могут избирательно сохраняться из поколения в поколение в зависимости от того, кто подвергался воздействию факторов среды – мужские или женские особи – и иметь специфичность в зависимости от пола потомков. Например, у людей на внуков влияет диета их дедушки по отцовской линии, а на внушек – диета их бабушки по отцовской линии [9].

Показано, что материнский стресс вызывает нарушение пространственного обучения и памяти потомков [1, 10, 11]. Так, было показано, что воздействие на крыс хронического умеренного не-

предсказуемого стресса в течение всей беременности вызывает у их потомков нарушения обучения и памяти в водном лабиринте Морриса и в Y-лабиринте [12]. Выявленные нарушения сопровождались снижением экспрессии гена инсулиноподобного фактора роста 2 (ИФР2, *Igf2*) и самого белка этого ростового фактора в гиппокампе. Данный факт представляет значительный интерес, поскольку установлено, что ИФР2 в гиппокампе играет важную роль в консолидации памяти у лабораторных грызунов [13, 14], улучшает способность к обучению и память, а также предотвращает забывание [15]. ИФР 2 в префронтальной коре также участвует в когнитивных процессах. При исследовании *post mortem* головного мозга пациентов, больных шизофренией и имевших значительные когнитивные нарушения, было показано снижение экспрессии *Igf2* в префронтальной коре [16]. Ранее нами было установлено, что пренатально стрессированные самцы – потомки матерей, которых подвергали иммобилизационному стрессу с 15 по 19 день гестации – характеризуются не только измененными гормональными функциями [17, 18], но и проявляют повышенную чувствительность к травматическому стрессу [19, 20]. Также нами было показано, что травматический стресс с последующим рестрессом (парадигма “стресс-рестресс”) у самцов крыс в период сперматогенеза вызывает у их потомков мужского пола нарушение памяти в тесте реакция пассивного избегания и снижает экспрессию *Igf2* в гиппокампе и неокортексе [21]. Можно полагать, что добавочный стресс самцов, родившихся от стрессированных во время беременности матерей, может оказывать более значительное влияние на память их потомков в зависимости от пола. Однако такие исследования ранее не проводились.

В связи с этим цель настоящего исследования состояла в выявлении трансгенерационного эффекта пренатального стресса на память и экспрессию *Igf2* в мозге потомков мужского пола и их потомков самок и самок следующего поколения, а также влияние дополнительного стрессирования с использованием парадигмы “стресс-рестресс” в период сперматогенеза самцов крыс, родившихся от стрессированных матерей, на память и экспрессию *Igf2* в мозге их потомков обоего пола.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на крысах Вистар из ЦКП “Биоколлекция Института физиологии им. И.П. Павлова РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем”. В исследовании использовали самцов крыс весом 250–280 г и самок весом 220–230 г. Все процедуры, проведенные с животными, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Ба-

зельской декларации и рекомендациям Комиссии по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Животных содержали в пластиковых клетках по 4–5 штук на стандартной диете (гранулированный комбикорм) при свободном доступе к воде и пище и 12-часовом режиме смены дня и ночи (9–00/21–00).

Моделирование пренатального психэмоционального стресса

Половозрелых первородящих самок ($n = 20$) парно ссаживали с половозрелыми самцами и начиная со следующего дня осуществляли ежедневный забор влагалищных мазков с целью определения стадии эстрального цикла и обнаружения сперматозоидов. День, когда в мазке были выявлены сперматозоиды на стадии проэструс – эструс, считали нулевым днем беременности. Оплодотворенных самок отсаживали в отдельные клетки и содержали группами по 5 штук. Часть самок ($n = 10$) с 15 по 19 день беременности подвергали ежедневному иммобилизационному стрессу в узких пластиковых пеналах в течение 1 ч по методике, описанной ранее [18]. Остальные самки оставались интактными, а их потомки служили контролем для потомков стрессированных самок. На 20 день беременности самок помещали в индивидуальные клетки и содержали поодиночке вместе с пометами. На 2-й день жизни число крысят в пометах выравнивали до 8–10 животных с равным соотношением полов. Потомков отнимали от матерей в 30-дневном возрасте и далее содержали в группах по 4–5 животных в соответствии с полом и пометом. Для дальнейших экспериментов использовали половозрелых самцов в возрасте 2.5 мес – потомков стрессированных во время беременности матерей и потомков контрольных самок. Из каждого помета случайным образом отбирали одного самца для получения потомства следующего поколения или для дополнительного стрессирования. По два самца из пометов групп пренатальный стресс и контроль использовали для изучения памяти, и еще по два самца из пометов исследованных групп – для изучения экспрессии *Igf2* в мозге.

Получение следующего поколения пренатально стрессированных самцов

Пренатально стрессированных самцов ($n = 5$) ссаживали с двумя интактными самками, далее осуществляли забор вагинальных мазков с целью контроля дня наступления беременности. Оплодотворенных самок до 20 дня беременности содержали группами по 5 животных, а с 20 дня беременности индивидуально. Сходным образом было получено потомство от интактных самцов ($n = 5$) и интактных самок, которое служило контролем для следующего поколения пренатально стрессиро-

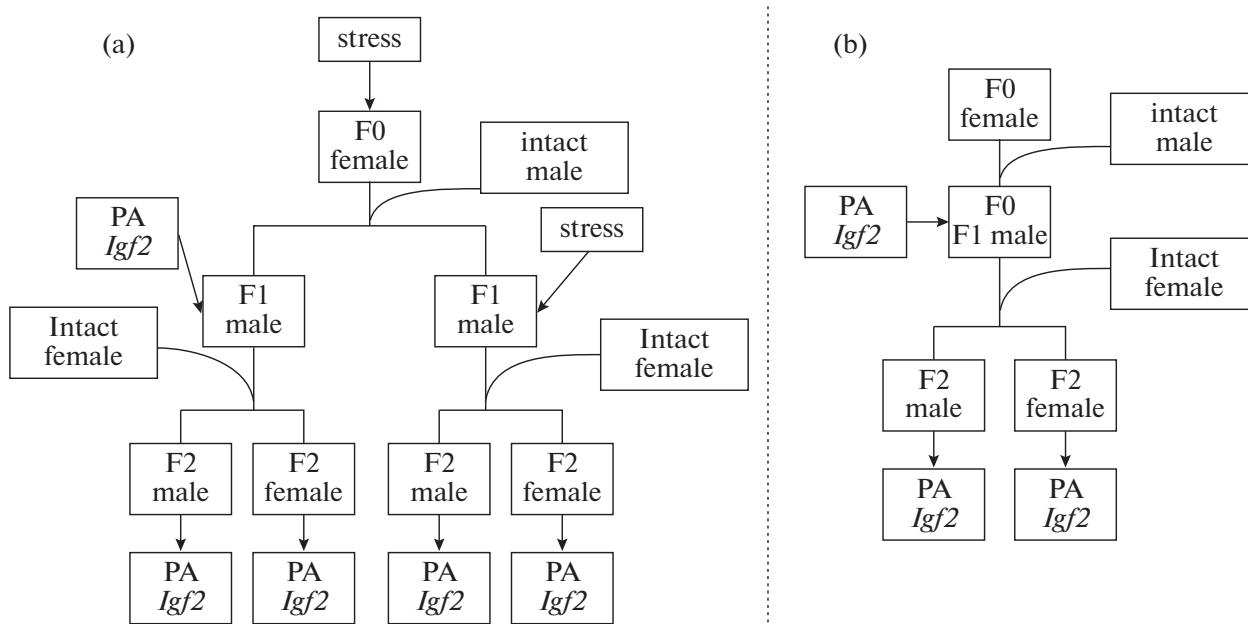


Рис. 1. Схема эксперимента получения потомства пренатально стрессированных (а) и контрольных крыс (б). Условные обозначения: PA – реакция пассивного избегания; Igf2 – изучение экспрессии *Igf2* в мозге потомков.

ванных самцов. Дальнейшие манипуляции с пометами осуществляли, как указано выше. Следующие эксперименты по изучению памяти и экспрессии *Igf2* в мозге выполняли на половозрелых потомках обоего пола в возрасте 2.5 мес, отбирая из каждого помета случайным образом по два животных соответствующего пола.

Моделирование стресса отца до зачатия и получение потомства от стрессированных отцов

Пренатально стрессированных самцов ($n = 7$) подвергали комбинированному стрессу и последующему рестрессу по методике, описанной ранее [20]. Комбинированный стресс состоял из двухчасовой иммобилизации в узких пластиковых пеналах, двадцатиминутного плавания в стеклянных цилиндрах, заполненных водой с температурой $24 \pm 2^\circ\text{C}$, и эфирного стресса в течение 1 мин. Через 6 сут после комбинированного стресса самцов подвергали 30-мин иммобилизационному стрессированию (рестресс). На 46–48 сут после рестресса каждого самца ссаживали с двумя интактными самками, находящимися в стадии проэструс-эструс, контролировали наступление беременности и получали потомство так, как описано выше. Аналогичным образом было получено потомство от интактных самцов ($n = 5$) и самок, которое служило контрольной группой для потомков пренатально стрессированных отцов, подвергнутых дополнительному стрессорному воздействию в период сперматогенеза. Дальнейшие эксперименты выполняли на половозрелых потомках обоего пола в

возрасте 2.5 мес, отбирая из каждого помета случайным образом по два животных соответствующего пола. Схема эксперимента представлена на рис. 1.

Методика оценки памяти крыс

Для исследования памяти животных использовали тест реакция пассивного избегания (РПИ). РПИ вырабатывали в камере, состоящей из светлого (50×50 см) и темного (15×15 см) отсеков, разделенных перегородкой с отверстием и дверцей. Пол темного отсека состоял из металлических прутьев, подключенных к источнику 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 она получала электрокожное раздражение 0.9 мА длительностью 2 сек (первая сессия). На следующий день проводили тестирование памяти (вторая сессия), где животное снова помещали в светлый отсек и повторяли процедуру первой сессии, при этом удар электрическим током не наносили. Для исследования угашения РПИ крыс тестировали трижды с разницей в одну неделю, повторяя процедуру второй сессии по методике, описанной ранее [21]. В каждом тесте фиксировали латентный период входа крысы в темный отсек. Общее время тестирования в каждой сессии составляло 300 сек. Тесты выполняли с 13:00 до 17:00. В каждой экспериментальной группе число животных составляло 10 особей.

*Метод изучения экспрессии *Igf2*
в гиппокампе и неокортексе крыс*

Изучение экспрессии *Igf2* проводили с использованием ПЦР в режиме реального времени у отдельных групп потомков, не участвовавших в тесте РПИ.

Животных декапитировали, извлекали мозг, из которого на льду выделяли гиппокамп и часть неокортекса, содержащую префронтальную область неокортекса (от брегмы: 2.5 мм кпереди, 0.5 мм латерально, 4 мм вентрально) и фронтальную область (от брегмы: 2.5 мм кпереди, 2.8 мм латеральнее, 1 мм в глубину, согласно атласу Паксиноса и Ватсона, 2007). Полученные области мозга помещали в пробирки с раствором для стабилизации РНК (“Евроген”, Россия) и хранили до выделения РНК при -80°C . Забой самок проводили в стадию диэструс, которую определяли по клеточному составу окрашенных азур-эозином вагинальных мазков.

Тотальную РНК выделяли с помощью набора PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу фирмы производителя. Обратную транскрипцию проводили с использованием 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.

ПЦР в реальном времени выполняли на приборе Real-Time PCR System 7500 (Applied Biosystems, США) с использованием расходных материалов производства ThermoFisher Scientific, США. Для исследования экспрессии *Igf2* использовали набор зондов и праймеров (TaqMan® Gene Expression Assays, Rn01454518_m1). В качестве внутреннего контроля использовали ген *Hprt1* (TaqMan® Gene Expression Assays, Rn01527840_m1), который ранее применяли в качестве гена домашнего хозяйства при исследовании экспрессии *Igf2* в мозге крыс [22]. Относительный уровень экспрессии мРНК в экспериментальных группах рассчитывали методом $\Delta\Delta\text{Ct}$ с использованием программы ExpressionSuite V1.0.3 (ThermoFisher Scientific, США), принимая экспрессию мРНК в контрольной группе, равной 1.0. Данные представлены как относительный уровень мРНК (RQ – relative quantity, относительное количество). Измерения проводили не менее чем в 3 параллельных пробах для каждого опыта. В каждой группе число животных $n = 7$.

Методы статистического анализа

Статистический анализ проводили с использованием дисперсионного анализа ANOVA и про-

граммы “STATISTICA 12.0”. В связи с тем, что для каждой экспериментальной группы животных использованы соответствующие группы контрольных крыс, были проведены отдельные анализы для двух поколений самцов стрессированных матерей; для самцов и самок – потомков пренатально стрессированных отцов и потомков пренатально стрессированных самцов с дополнительным стрессированием до спаривания.

Для проверки гипотезы нормальности распределения данных в выборках использовали критерий Шапиро–Уилка. В связи с тем, что показатели тестов РПИ не соответствовали нормальному распределению, логарифмируя по основанию 2. Далее для статистического анализа результатов РПИ потомков стрессированных матерей двух поколений использовали двухфакторный ANOVA для повторных измерений (день тестирования \times поколение); для потомков пренатально стрессированных самцов и пренатально стрессированных самцов с дополнительным стрессированием до спаривания – факториальный ANOVA (отец \times пол в зависимости от дня тестирования) с последующими парными *post-hoc* сравнениями (тест Тьюки) результатов отдельных тестов.

Для оценки межгрупповых различий результатов показателей экспрессии *Igf2* применяли однофакторный ANOVA с последующими парными *post-hoc* сравнениями (тест Тьюки) значений в каждой группе животных в соответствии с полом. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$. Данные представлены в виде $M \pm SEM$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты тестирования РПИ самцов первого и второго поколения стрессированных во время беременности самок представлены на рис. 2. Двухфакторный ANOVA результатов теста РПИ пренатально стрессированных самцов двух поколений и контрольных самцов показал достоверное влияние фактора день тестирования ($F_{(4,149)} = 6.5, p < 0.001$) и поколение ($F_{(2,149)} = 3.5, p < 0.01$) на латентный период захода в темный отсек камеры. Выявлено взаимодействие факторов день тестирования/поколение ($F_{(8,149)} = 2.9, p < 0.05$). Последующие парные *post-hoc* сравнения показали, что пренатально стрессированные самцы, а также их потомки следующего поколения статистически значимо отличаются от контрольных самцов повышенным латентным периодом захода в темный отсек камеры в первую сессию тестирования памяти. При этом влияние пренатального стресса в первом и следующем поколении на латентный период в последующие дни тестирования по сравнению с контрольными самцами не обнаружено.

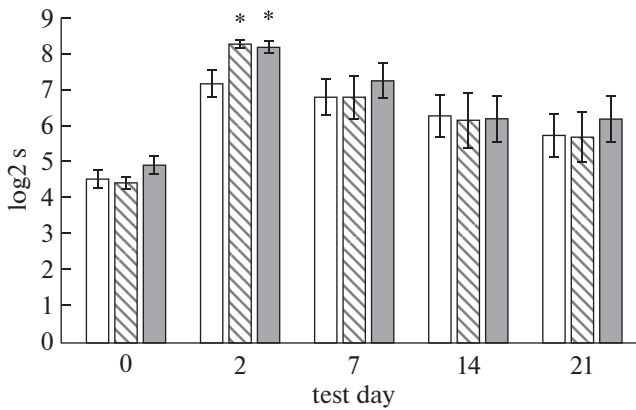


Рис. 2. Влияние пренатального стресса на память потомков самцов по мужской линии в тесте реакция пассивного избегания. По оси абсцисс – день тестирования; по оси ординат – \log_2 длительности латентного периода захода в темный отсек камеры (с). Светлые столбики – потомки интактных крыс (контрольные животные); столбики со штриховкой – пренатально стрессированные самцы; темные столбики – потомки пренатально стрессированных самцов. * – статистически значимые отличия от контрольных крыс ($p < 0.05$).

Дисперсионный анализ ANOVA результатов теста РПИ потомков обоего пола пренатально стрессированных самцов и пренатально стрессированных самок, которых до ссаживания с интактными самками подвергали стрессированию, показал статистически значимое влияния фактор пол ($F_{(5,299)} = 3.7, p < 0.01$) и фактора отец ($F_{(5,299)} = 3.4, p < 0.001$) на латентный период захода в темный отсек камеры. Выявлено взаимодействие указанных факторов ($F_{(10,299)} = 2.4, p < 0.05$). *Post hoc* анализ показал статистически значимое снижение латентного периода захода в темный отсек камеры в ознакомительную сессию (1-й тест) у самцов, родившихся от пренатально стрессированных отцов с дополнительным стрессированием до спаривания по сравнению с пренатально стрессированными самцами второго поколения, что может свидетельствовать о повышении у них уровня тревожности (рис. 3а). Снижение латентного периода обнаружено так же и во второй день тестирования по сравнению с пренатально стрессированными самцами второго поколения. Кроме того, угашение РПИ у этой группы самцов было ускорено: уже через две недели они демонстрировали сниженный латентный период по сравнению с другими группами самцов и по этому показателю не отличались от соответствующего показателя в ознакомительную сессию.

Самки – потомки пренатально стрессированных самцов отличались от контрольных самок сниженным латентным периодом захода в темный отсек камеры только через три недели после первого тестирования (рис. 3б). Если пренатально стрессированных самцов дополнительно подвергали

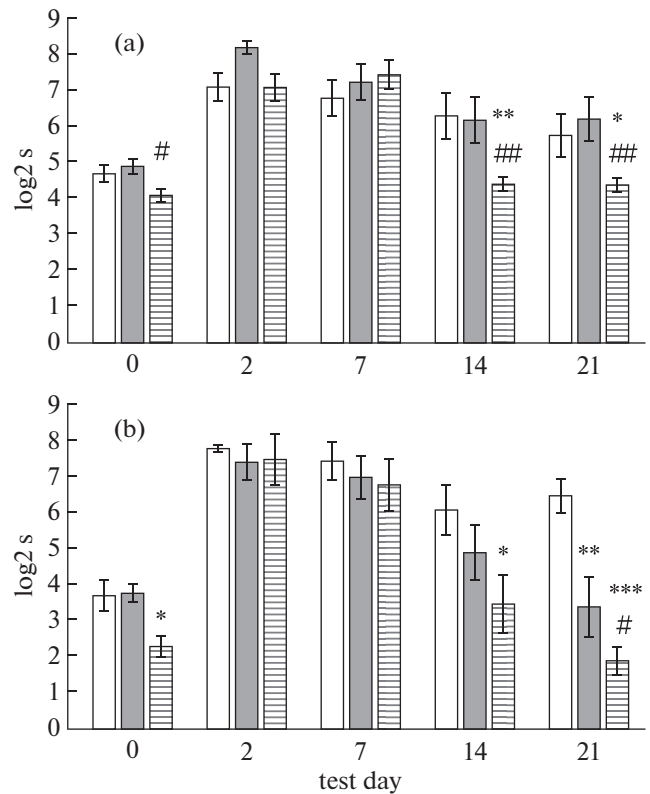


Рис. 3. Выработка реакции пассивного избегания у самцов (а) и самок (б) – потомков пренатально стрессированных самцов и пренатально стрессированных самок с дополнительным стрессированием с использованием парадигмы “стресс-рестресс” до зачатия потомков. По оси абсцисс – день тестирования; по оси ординат – \log_2 длительности латентного периода захода в темный отсек камеры (с). Светлые столбики – потомки интактных крыс (контрольные животные); темные столбики – потомки пренатально стрессированных самцов; столбики со штриховкой – потомки пренатально стрессированных самцов, испытавшие воздействие стресса до спаривания с интактными самками. * – статистически значимые отличия от контрольных крыс ($p < 0.05$), ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$. # – статистически значимые отличия от потомков пренатально стрессированных самцов ($p < 0.05$), ## – $p < 0.01$.

стрессу до зачатия потомства, то у их потомков самок выраженность угашения РПИ была еще выше, поскольку уже на 14 день теста их латентный период захода в темный отсек камеры не отличался от соответствующего показателя в ознакомительную сессию. Кроме того, у этих самок латентный период захода в темный отсек камеры в ознакомительную сессию был ниже, чем у других групп самок, что позволяет заключить о повышении их уровня тревожности. Следует отметить, что статистически значимые межполовые различия в тесте РПИ у сходных групп потомков были обнаружены только для потомков пренатально стрессированных самцов с дополнительным стрессированием до спаривания и только через 3 недели после обучения ($p < 0.05$).

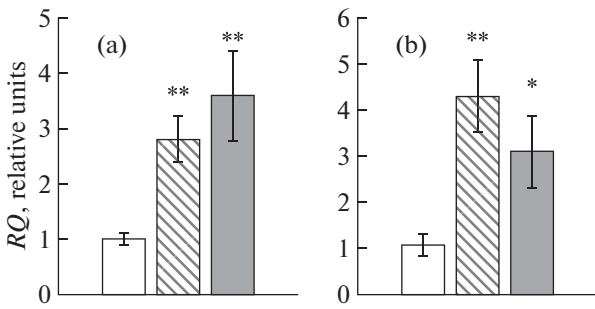


Рис. 4. Действие материнского стресса на экспрессию *Igf2* в гиппокампе (а) и неокортексе (б) потомков 2 поколений по мужской линии. По оси ординат – RQ (relative quantity, относительное количество), отн. ед. Светлые столбики – потомки интактных крыс (контрольные животные); столбики со штриховкой – пренатально стрессированные самцы; темные столбики – потомки пренатально стрессированных самцов. * – статистически значимые отличия от контрольных крыс ($p < 0.05$); ** – $p < 0.01$.

Результаты анализа уровня экспрессии *Igf2* в гиппокампе и неокортексе самцов контрольной группы и пренатально стрессированных самцов двух поколений представлены на рис. 4. Однофакторный ANOVA показал статистически значимое влияние фактора поколение на экспрессию *Igf2* в гиппокампе ($F_{(2,20)} = 6.7, p < 0.01$) и неокортексе ($F_{(2,20)} = 6.03, p < 0.05$). Последующие парные *post hoc* сравнения показали, что пренатально стрессированные самцы, а также их потомки статистически значимо отличаются от контрольных самцов повышенной экспрессией *Igf2* как в гиппокампе (рис. 4а), так и в неокортексе (рис. 4б).

Обнаружено также влияние фактора отец на экспрессию данного гена в обеих областях мозга самцов, родившихся от контрольных, пренатально стрессированных и пренатально стрессированных

с дополнительным стрессом отцов ($F_{(2,20)} = 6.1, p < 0.01$ – гиппокамп; $F_{(2,20)} = 5.2, p < 0.05$ – неокортекс). Парный *post-hoc* тест выявил снижение экспрессии *Igf2* в гиппокампе и неокортексе самцов, родившихся от пренатально стрессированных отцов с дополнительным стрессированием до зачатия по сравнению с пренатально стрессированными самцами второго поколения (рис. 5а).

У самок однофакторный ANOVA показал статистически значимое влияние фактора отец на экспрессию данного гена в гиппокампе ($F_{(2,20)} = 8.1, p < 0.01$) и неокортексе ($F_{(2,20)} = 6.2, p < 0.01$), а парные *post-hoc* сравнения выявили снижение экспрессии *Igf2* в обоих мозговых структурах самок экспериментальных групп по сравнению с контрольными самками (рис. 5б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведенные нами исследования показали, что стрессирование беременных самок крыс путем часовой иммобилизации с 15 по 19 день гестации оказывает положительное влияние на память их потомков мужского пола, которое сохраняется и в следующем поколении потомков самцов. При этом мы наблюдали улучшение памяти таких потомков, что проявлялось в статистически значимом увеличении латентного периода захода в темный отсек камеры во второй день теста. Существенных различий в скорости угашения РПИ между потомками самцами стрессированных матерей и потомками контрольных животных мы не обнаружили. Указанное улучшение памяти в тесте РПИ пренатально стрессированных самцов и их потомков мужского пола сопровождалось более высокой экспрессией *Igf2* в гиппокампе и неокортексе.

Следует отметить, что большинство работ, где проводили исследование влияния материнского

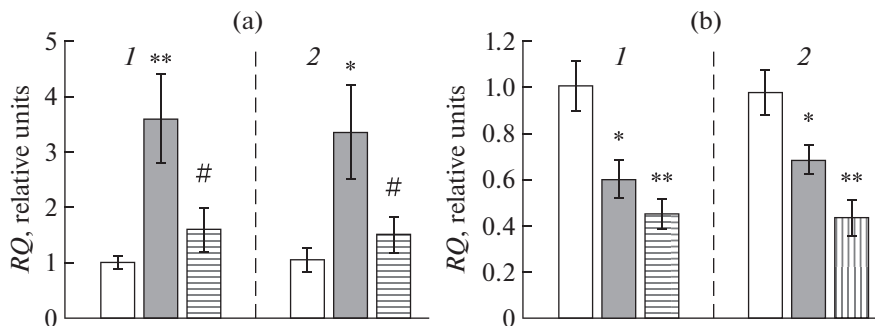


Рис. 5. Действие пренатального стресса на экспрессию *Igf2* в мозге потомков самцов (а) и потомков самок (б) по мужской линии. 1 – гиппокамп; 2 – неокортекс. Светлые столбики – потомки интактных крыс (контрольные животные); темные столбики – потомки пренатально стрессированных самцов; столбики со штриховкой – потомки пренатально стрессированных отцов, испытавших воздействие стресса до спаривания с интактными самками. По оси ординат – RQ (relative quantity, относительное количество). * – статистически значимые отличия от контрольных крыс ($p < 0.05$), ** – $p < 0.01$. # – статистически значимые отличия от потомков пренатально стрессированных самцов ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$).

стресса на способность к обучению и память потомков, посвящено изучению пространственного обучения и памяти. Показано, что данный вид обучения ухудшается у пренатально стрессированных животных [1, 12, 23]. Причем данный эффект на ориентацию в пространстве пренатально стрессированных особей зависел от длительности стрессирования и периода беременности, когда тот или иной тип стресса использовали. Например, было установлено, что пространственное обучение и память в большей мере страдают у потомков, когда стрессирование беременных самок проводили в первый триместр беременности [24]. Сходные данные были получены в исследовании, где беременных самок стрессировали весь период беременности [12]. Стрессирование самок мышей с 13–18 дня беременности (иммобилизационный стресс в течение 24 мин трижды в день) не вызывало ухудшение пространственного обучения в водном лабиринте Морриса у взрослых потомков самцов [25]. В исследовании, где изучали память потомков стрессированных матерей в тесте РПИ, выявлен факт ухудшения памяти у потомков таких матерей, но в возрасте 30–31 день [11]. В данном исследовании беременных самок крыс подвергали иммобилизационному стрессу начиная с 11 дня беременности. Сходный результат был получен в эксперименте, где беременных самок стрессировали с 13 по 20 день беременности [26], причем у взрослых потомков стрессированных матерей нарушение памяти в тесте РПИ было обнаружено только у потомков самок, но не самцов. В другом исследовании беременных самок подвергали физическому или психическому стрессу с 6 по 16 день беременности [27]. У взрослых потомков этих матерей показано ухудшение памяти в данном тесте.

Несмотря на то что использованный нами тип стрессирования и дни гестации (15–19 день), когда беременных матерей подвергали иммобилизации, в ряде случаев перекрывается с упомянутыми выше исследованиями, мы обнаружили улучшение памяти в тесте РПИ у пренатально стрессированных самцов. Отметим, что в выполненных нами ранее исследованиях с использованием потомков самцов, родившихся от стрессированных с 15 по 19 день беременности матерей, мы показали иные результаты изменения поведения таких потомков, чем в работах других авторов. Так, наши пренатально стрессированные самцы характеризовались повышенной двигательной активностью и сниженной тревожностью в новой обстановке [19] по сравнению с контрольными самцами, хотя в большинстве исследований, напротив, отмечено повышение тревожности пренатально стрессированных животных при применении к беременным самкам стрессорных воздействий большей интенсивности и длительности [1, 25]. По всей видимости эффекты стресса матери на поведенческий фенотип и когнитивные способности потомков определяются

как периодом беременности, так и длительностью стрессорного воздействия.

Улучшение показателя памяти в тесте РПИ у пренатально стрессированных самцов и их потомков сопровождалось повышением экспрессии гена *Igf2* в гиппокампе и неокортексе, что соответствует участию ИФР2 в консолидации памяти и длительности ее сохранения в тесте РПИ [15]. При этом у самцов, родившихся от пренатально стрессированных самок с дополнительным стрессированием до спаривания с самками, показано ухудшение памяти и длительности ее сохранения, а также снижение экспрессии *Igf2* в мозге.

В отличие от самцов – потомков пренатально стрессированных самцов, у самок, которые родились от таких самцов, мы обнаружили только усиленное угашение РПИ. Причем у самок, родившихся от пренатально стрессированных самцов, на 21 день тестирования латентный период захода в темный отсек камеры соответствовал этому показателю в первый “ознакомительный” день тестирования. У самок, которые родились от пренатально стрессированных самцов, испытавших дополнительное стрессорное воздействие до спаривания с интактными самками, угашение РПИ происходило уже через 2 нед. Соответственно экспрессия *Igf2* в гиппокампе и неокортексе подопытных самок была снижена по сравнению с самками – потоками интактных родителей. Следует отметить, что несмотря на снижение экспрессии *Igf2* в мозге подопытных самок мы выявили у них только более быстрое угашение РПИ, но не ухудшение самой памяти, поскольку во второй день теста эти самки не отличались от контрольных самок латентным периодом захода в темный отсек камеры. Мы предполагаем, что у самок по сравнению с самцами существует своя специфика участия ИФР2 в процессах, связанных с формированием памяти и длительностью ее сохранения. Однако данное предположение нуждается в дальнейших исследованиях.

В исследованиях, выполненных нами ранее, показано, что стрессирование самцов крыс с использованием парадигмы “стресс-рестресс” вызывает у их потомков самцов, но не самок, ухудшение памяти в тесте РПИ и снижение экспрессии *Igf2* в гиппокампе и неокортексе [28]. В случае, когда сходному стрессированию подвергали самцов, рожденных от стрессированных во время беременности матерей, эффекты на память и экспрессию *Igf2* проявлялись у потомков обоего пола. Вероятно, более выраженное влияние стресса отца на исследованные нами функции связано с повышенной и длительной стрессорной реакцией пренатально стрессированных самцов [19], в том числе, и в парадигме “стресс-рестресс” [20].

Обращает на себя внимание тот факт, что трансгенерационный эффект пренатального стресса по мужской линии по-разному проявляется у самцов

и самок. Так, у самцов второго поколения, рожденных от пренатально стрессированных самцов так же, как и у их отцов мы выявили улучшение памяти и увеличение экспрессии *Igf2* в мозге, тогда как у самок – потомков пренатально стрессированных самцов, напротив, обнаружены нарушение длительности сохранения РПИ и снижение экспрессии *Igf2*. Мы пришли к заключению, что трансгенерационная передача признаков является зависимой от пола потомков. В качестве подтверждения данного заключения можно привести исследования, выполненные на пресноводной популяции трехиглой колюшки (*Gasterosteus aculeatus*), где были изучены последствия визуального сигнала риска нападения хищников у самцов и самок с последующим определением антихищнического поведения потомства обоего пола [29]. Эти исследования показали, что у отцов, подвергавшихся воздействию хищников, рождались сыновья, более склонные к “рisku” (высокая двигательная и исследовательская активность), в то время как у матерей, подвергавшихся воздействию хищников, рождались более тревожные сыновья и дочери. Авторы продолжили данное исследование и изучили, может ли подвергание самцов риску нападения хищников повлиять на внуков через сперму в зависимости от пола потомков. Оказалось, что эффекты неблагоприятного воздействия на самца F0 в отношении особенностей поведения их потомков F2 зависели от пола таких потомков и в большей мере проявлялись у самок F2 [7]. Зависимость трансгенерационной передачи признаков от пола потомков была получена и при исследовании 3-х поколений самцов и самок морских свинок, родившихся от матерей, у которых стресс моделировали введением синтетического глюкокортикоида [4].

В настоящее время в качестве основного механизма трансгенерационного переноса признаков по отцовской линии рассматривается эпигенетическая модификация генома в сперматозоидах, связанная с метилированием ДНК, модификацией гистонов и экспрессией микроРНК [30]. В исследованиях, выполненных нами ранее, показано, что стрессирование самцов с использованием той же парадигмы, что и в настоящем исследовании, приводит к значительному изменению содержания в их сперме микроРНК, в том числе тех, которые взаимодействуют с генами, связанными с ИФР2 (*Igf2*, *Igf2bp2*, *Igf2r*) [31]. Вопрос о том, может ли стрессорное воздействие в пренатальном онтогенезе вызывать изменение экспрессии микроРНК в сперматозоидах самцов и способствовать модификации функций их потомков в зависимости от пола, остается открытым и нуждается в дальнейшем исследовании.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Госпрограммы 47 ГП “Научно-технологическое развитие Российской Федерации” (2019-2030), тема 0134-2019-0002.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Н.Э.О.), сбор данных (Е.Д.Ш., С.Г.П., В.К.А., Г.И.Х.), обработка данных (О.В.М., С.Г.П.), написание и редактирование манускрипта (Н.Э.О., С.Г.П., О.В.М.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bock J, Wainstock T, Braun K, and Segal M (2015) Stress in utero: prenatal programming of brain plasticity and cognition. *Biol Psychiatr* 78: 315–326. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.02.036>
2. Nilsson EE, Skinner MK (2015) Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of disease susceptibility. *Transl Res* 165: 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2014.02.003>
3. Zhang Q, Tian Y (2022) Molecular insights into the transgenerational inheritance of stress memory. *J Genet Genom* 49: 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2021.11.015>
4. Moisiadis VG, Constantinof A, Kostaki A, Szyf M, Matthews SG. (2017) Prenatal Glucocorticoid Exposure Modifies Endocrine Function and Behaviour for 3 Generations Following Maternal and Paternal Transmission. *Sci Rep* 7: 11814. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11635-w>
5. Soubry A (2018) Epigenetics as a Driver of Developmental Origins of Health and Disease: Did We Forget the Fathers? *BioEssays* 40: 1700113. <https://doi.org/10.1002/bies.201700113>
6. Rando OJ (2012) Daddy Issues: Paternal Effects on Phenotype. *Cell* 151: 702–708. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.020>
7. Hellmann JK, Carlson ER, Bell AM (2020) Sex-specific plasticity across generations II: Grandpaternal effects are lineage specific and sex specific. *J Anim Ecol* 89: 2800–2812. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13365>
8. Bell AM, Hellmann JK (2019) An integrative framework for understanding the mechanisms and multigenerational consequences of transgenerational plasticity. *Ann Rev Ecol Evol Systemat* 50: 97–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110218-024613>
9. Pembrey ME, Bygren LO, Kaati G, Edvinsson S, Northstone K, Sjöström M, Golding J, Team AS (2006) Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans. *Eur J Hum Genet* 14: 159–166. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201538>

10. *Van den Bergh B, van den Heuvel MI, Lahti M, Braeken M, de Rooij SR, Entringer S, Hoyer D, Roseboom T, Räikkönen K, King S, Schwab M* (2020) Prenatal developmental origins of behavior and mental health: The influence of maternal stress in pregnancy. *Neurosci Biobehav Rev* 117: 26–64. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.07.003>
11. *Cherian SB, Bairy KL, Rao MS* (2009) Chronic prenatal restraint stress induced memory impairment in passive avoidance task in post weaned male and female Wistar rats. *Indian J Exp Biol* 47: 893–899.
12. *Guan SZ, Fu Y, Zhao F, Liu HY, Chen XH, Qi FQ, Liu ZH, Ng TB* (2021) The mechanism of enriched environment repairing the learning and memory impairment in offspring of prenatal stress by regulating the expression of activity-regulated cytoskeletal-associated and insulin-like growth factor-2 in hippocampus. *Environment Health Prevent Med* 26: 8. <https://doi.org/10.1186/s12199-020-00929-7>
13. *Chen DY, Stern SA, Garcia-Osta A, Saunier-Rebori B, Pollonini G, Bambah-Mukku D* (2011) A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement. *Nature* 469: 491–497. <https://doi.org/10.1038/nature09667>
14. *Bracko O, Singer T, Aigner S, Knobloch M, Winner B, Ray J, Clemenson GD Jr, Suh H, Couillard-Despres S, Aigner L, Gage FH, Jessberger S* (2012) Gene expression profiling of neural stem cells and their neuronal progeny reveals IGF2 as a regulator of adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 32: 3376–3387. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4248-11.2012>
15. *Alberini CM, Chen DY* (2012) Memory enhancement: consolidation, reconsolidation and insulin-like growth factor 2. *Trends Neurosci* 35: 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.12.007>
16. *Fromer M, Roussos P, Sieberts SK, et al.* (2016) Gene expression elucidates functional impact of polygenic risk for schizophrenia. *Nat Neurosci* 19: 1442–1453. <https://doi.org/10.1038/nn.4399>
17. *Ordyan NE, Pivina SG, Baranova KA, Rakitskaya VV, Akulova VK, Kholova GI* (2021) Sex-Dependent Actions of Prenatal Stress on the Activity of the Hypothalamo-Hypophyseal-Adrenocortical System in Rats: The Role of Corticosteroid Receptors in the Brain. *Neuroscience and Behavioral Physiology* 51: 357–366. <https://doi.org/10.1007/s11055-021-01079-1>
18. *Pivina SG, Rakitskaya VV, Akulova VK, Shigalugova ED, Ordyan NE* (2022) Effects of Prenatal Stress on Reproductive Function in Male Rats. *Neurosci Behav Physiol* 52: 568–573. <https://doi.org/10.1007/s11055-022-01276-6>
19. *Ordyan NE, Pivina SG* (2004) Characteristics of the behavior and stress-reactivity of the hypophyseal-adrenal system in prenatally stressed rats. *Neurosci Behav Physiol* 34 (6): 569–74. <https://doi.org/doi:10.1023/b:ne-ab.0000028286.83083.73>
20. *Ordyan NE, Smolenskiy IV, Pivina SG, Akulova VK, Rakitskaya VV* (2014) 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* 44: 657–663. <https://doi.org/10.1007/s11055-014-9966-6>
21. *Pivina SG, Rakitskaya VV, Akulova VK, Ordyan NE* (2016) Activity of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal System in Prenatally Stressed Male Rats on the Experimental Model of Post-Traumatic Stress Disorder. *Bull Exp Biol Med* 160: 601–4. <https://doi.org/10.1007/s10517-016-3227-3>
22. *Ordyan NE, Malysheva OV, Akulova VK, Pivina SG, Kholova GI* (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 J* 14: 191–196. <https://doi.org/10.1134/S1819712420020075>
23. *Markham JA, Koenig JI* (2011) Prenatal stress: role in psychotic and depressive diseases. *Psychopharmacology (Berl)* 214: 89–106. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-2035-0>
24. *Modir F, Elahdadi Salmani M, Goudarzi I, Lashkarboluki T, Abrari K* (2014) Prenatal stress decreases spatial learning and memory retrieval of the adult male offspring of rats. *Physiol Behav* 129: 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.02.040>
25. *Akatsua S, Ishikawa C, Takemura K, Ohtani A, Shiga T* (2015) Effects of prenatal stress and neonatal handling on anxiety, spatial learning and serotonergic system of male offspring mice. *Neurosci Res* 101: 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2015.07.002>
26. *Wua J, Songa TB, Lia YJ, Heb KS, Geb L, Wang LR* (2007) Prenatal restraint stress impairs learning and memory and hippocampal PKCbeta expression and translocation in offspring rats. *Brain Res* 1141: 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.01.024>
27. *Nazeri M, Shabani M, Ravandi SG, Aghaei I, Nozari M, Mazhari S.* (2015) Psychological or physical prenatal stress differentially affects cognition behaviors. *Physiol Behav* 142: 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.02.016>
28. *Ordyan NE, Malysheva OV, Holova GI, Akulova VK, Pivina SG* (2022) Sex-Dependent Effects of Stress in Male Rats on Memory and Expression of the Insulin-Like Growth Factor 2 Receptor Gene in the Brains of Offspring. *Neurosci Behav Physiol* 52: 242–250. <https://doi.org/10.1007/s11055-021-01079-1>
29. *Hellmann JK, Bukhari SA, Deno J, Bell AM* (2020) Sex-specific plasticity across generations I: Maternal and paternal effects on sons and daughters. *J Anim Ecol* 89 (12): 2788–2799. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13364>
30. *Duffy KA, Bale TL, Epperson CN* (2021) Germ cell drivers: transmission of preconception stress across generations. *Front Hum Neurosci* 15: 642762. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2021.642762>
31. *Мальшева ОВ, Пивина СГ, Пономарева ЕН, Ордян НЭ* (2023) Изменение содержания малых некодирующих РНК в сперматозоидах как возможный механизм трансгенерационной передачи эффектов отцовского стресса: экспериментальное исследование. *Цитология* 65 (1): 28–38. [*Malysheva OV, Pivina SG, Ponomareva EN, Ordyan NE* (2023) Changes in the content of small non-coding RNAs in spermatozoa as a possible mechanism of transgenerational transmission of the effects of paternal stress: experimental research. *Citology*

TRANSGENERATIONAL EFFECTS OF PRENATAL STRESS ON MEMORY AND EXPRESSION OF THE INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR 2 GENE IN THE OFFSPRING BRAIN

N. E. Ordyan^{a,#}, E. D. Shigalugova^a, O. V. Malysheva^{a,b}, S. G. Pivina^a,
V. K. Akulova^a, and G. I. Kholova^a

^a*Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

^b*Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russia*

[#]*e-mail: neo@infran.ru*

Stress effects on pregnant female disrupt the behavior and cognitive abilities of their offspring not only of the first, but also of the subsequent generations. A similar transgenerational effect on the offspring phenotype can be exerted by various stress factors that affect fathers before conception. The purpose of the study was to reveal the transgenerational effect of stress in female rats from 15–19 days of pregnancy on memory and expression of the insulin-like growth factor 2 (*Igf2*) gene in the brain of male and female offspring, as well as the effect of additional stress in the stress-restress paradigm in prenatally stressed male rats before conception on the memory and expression in the brain *Igf2* of their offspring of both sexes. We have shown that prenatally stressed males and their next-generation male offspring show improved memory in the passive avoidance test, increased *Igf2* expression in the hippocampus and cortex. Females, descendants of prenatally stressed males, on the contrary, showed a decrease in the duration of memory retention, *Igf2* expression in the hippocampus and cortex. Additional stressing of prenatally stressed males before mating with intact females worsened memory and the duration of its retention, reduced *Igf2* expression in the brain of the offspring of both sexes. We concluded that the transgenerational effects of prenatal stress on memory and *Igf2* expression in the brain depend on the sex of the offspring, and prenatal stress itself in males contributes to memory impairment and a decrease in *Igf2* expression in the offspring brain if such males were additionally stressed before mating.

Keywords: prenatal stress, transgenerational effects, offspring, memory, insulin-like growth factor 2, hippocampus, cortex, rat