


DOI 10.18699/vjgb-24-44

Трансгенерационное влияние пренатального стресса на поведение и перекисное окисление липидов в структурах мозга у самок крыс в течение эстрального цикла

А.В. Вьюшина, А.В. Притворова  , С.Г. Пивина , Н.Э. Ордян

Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия
 PritvorovaAV@infran.ru

Аннотация. Исследовано влияние стресса у беременных самок крыс Вистар на поведение и показатели перекисного окисления липидов (ПОЛ) в неокортексе, гиппокампе и гипоталамусе у поколения самок F2 в течение эстрального цикла. Беременных самок подвергали ежедневному 1-часовому иммобилизационному стрессу с 15-го по 19-й день беременности. Далее из рожденных пренатально стрессированных и контрольных самцов и самок крыс поколения F1 формировали семейные группы: группа 1 – контрольные самка и самец, группа 2 – контрольная самка и пренатально стрессированный самец, группа 3 – пренатально стрессированная самка и контрольный самец, группа 4 – пренатально стрессированные самка и самец. Рожденных от этих семейных пар самок поколения F2 отбирали в четыре экспериментальные группы в соответствии с семейной группой. В возрасте трех месяцев у крыс исследовали показатели поведения в тесте «открытое поле» в двух стадиях полового цикла – эструсе и диэструсе. Через 7–10 дней крыс декапитировали и производили отбор неокортекса, гипоталамуса и гиппокампа для определения уровня диеновых и триеновых конъюгатов, оснований Шиффа и степени окисленности липидов (индекса Клейна). У самок F2 с одним пренатально стрессированным родителем отсутствует межстадиальная разница в локомоторно-исследовательской активности и тревожности. Если оба родителя F1 являются пренатально стрессированными, самки крыс F2 сохраняют межстадиальные различия, схожие с контрольным паттерном, при этом по абсолютным значениям у них снижаются локомоторно-исследовательская активность и время нахождения в центре открытого поля. В неокортексе у самок F2 в группах с пренатально стрессированными матерями снижается уровень первичных продуктов ПОЛ и повышается уровень оснований Шиффа в стадии эструса. В гиппокампе у самок F2 в группах с пренатально стрессированными отцами снижается уровень оснований Шиффа в стадии эструса, а уровень первичных продуктов ПОЛ повышается в группе 2 и снижается в группе 4. В гипоталамусе у самок F2 в группах с пренатально стрессированными матерями уровень оснований Шиффа повышается в стадии эструса и снижается в диэструсе, кроме того, в группе 3 повышается уровень первичных продуктов ПОЛ в стадии эструса. Таким образом, выявлено влияние пренатального стресса как матери F1, так и отца F1 на показатели поведения и уровень ПОЛ в неокортексе, гиппокампе и гипоталамусе у самок крыс поколения F2 в эструсе и диэструсе.

Ключевые слова: пренатальный стресс; поколение F2; поведение; перекисное окисление липидов; эструс; диэструс.

Для цитирования: Вьюшина А.В., Притворова А.В., Пивина С.Г., Ордян Н.Э. Трансгенерационное влияние пренатального стресса на поведение и перекисное окисление липидов в структурах мозга у самок крыс в течение эстрального цикла. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(4):387-397. DOI 10.18699/vjgb-24-44

Финансирование. Работа поддержана средствами федерального бюджета в рамках государственного задания ФГБУН Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (№ 1023032400236-8-3.1.4).

Transgenerational effect of prenatal stress on behavior and lipid peroxidation in brain structures of female rats during the estral cycle

A.V. Vyushina, A.V. Pritvorova  , S.G. Pivina , N.E. Ordyan

Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia
 PritvorovaAV@infran.ru

Abstract. The effect of stress in pregnant female Wistar rats on the behavior and lipid peroxidation (LP) in the neocortex, hippocampus and hypothalamus in the female F2 generation during the ovarian cycle was investigated. We subjected pregnant females to daily 1-hour immobilization stress from the 15th to the 19th days of pregnancy. Further, family groups were formed from prenatally stressed and control male and female rats of the F1 generation: group 1, the control female and male; group 2, the control female and the prenatally stressed male; group 3, the

prenatally stressed female and the control male; group 4, the prenatally stressed female and male. The females of the F2 generation born from these couples were selected into four experimental groups in accordance with the family group. At the age of 3 months, behavior of rats was studied in the "open field" test in two stages of the ovarian cycle – estrus and diestrus. After 7–10 days, the rats were decapitated and the neocortex, hypothalamus and hippocampus were selected to determine the level of diene and triene conjugates, Schiff bases and the degree of lipid oxidation (Klein index). In F2 females with one prenatally stressed parent, there was no interstage difference in locomotor-exploratory activity and anxiety. If both F1 parents were prenatally stressed, female F2 rats retained interstage differences similar to the control pattern, while their locomotor-exploratory activity and time spent in the center of an "open field" decreased in absolute values. In the neocortex of F2 females in groups with prenatally stressed mothers, the level of primary LP products decreased and the level of Schiff bases increased in the estrus stage. In the hippocampus of F2 females in the groups with prenatally stressed fathers, the level of Schiff bases decreased in the estrus stage, and the level of primary LP products increased in group 2 and decreased in group 4. In the hypothalamus of F2 females in the groups with prenatally stressed mothers, the level of Schiff bases increased in the estrus stage and decreased in the diestrus; in addition, in group 3, the level of primary LP products in the estrus stage increased. Thus, we demonstrated the influence of prenatal stress of both F1 mother and F1 father on the behavior and the level of LP in the neocortex, hippocampus and hypothalamus in female rats of the F2 generation in estrus and diestrus.

Key words: prenatal stress; F2 generation; behavior; lipid peroxidation; estrus; diestrus.

For citation: Vyushina A.V., Pritvorova A.V., Pivina S.G., Ordyan N.E. Transgenerational effect of prenatal stress on behavior and lipid peroxidation in brain structures of female rats during the estral cycle. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(4):387-397. DOI 10.18699/vjgb-24-44

Введение

В настоящее время установлено, что рост уровня материнских глюкокортикоидов в течение беременности вызывает у потомства перестройки в нейроэндокринной и иммунной системах. Повышенный уровень глюкокортикоидов у матери способствует избыточному продуцированию активных форм кислорода (АФК), при этом орган-специфический ответ на стресс зависит от относительного баланса между генерацией АФК и антиоксидантными способностями клетки (Denney, 2010; Thompson, Al-Hasan, 2012). Нарушение такого баланса приводит к окислительному стрессу и способствует эпигенетическим изменениям у пренатально стрессированного потомства. Эпигенетические изменения сохраняются в ряде митотических делений соматических клеток, а также могут передаваться следующим поколениям, если эти изменения произошли в половых клетках (Дыбан, 1988; Rodgers, Bale, 2015; Yao et al., 2021). Таким образом, многочисленные негативные последствия материнского стресса, выявленные у первого поколения, могут сохраняться и у последующих поколений (Essex et al., 2013; Provençal, Binder, 2015).

У самок и эпигенетические изменения, и материнское поведение оказывают влияние на потомство, поэтому исследование трансгенерационного влияния стресса у самцов грызунов имеет явные преимущества по сравнению с самками (Brunton, 2013; Bale, 2014). В связи с этим трансгенерационные изменения, вызванные воздействием стресса у самок, остаются малоизученными. В настоящее время особое внимание исследователей обращено на изменения фертильности у крыс поколения F2 и последующих поколений. Так, в экспериментальных работах (Zhang et al., 2020; Piquer et al., 2022) установлено, что пренатальные нефизиологические воздействия различного генеза изменяют фертильность и во втором, и в третьем поколении. Это выражается в изменении ряда морфометрических показателей яичников и матки, биохимических показателей, таких как уровень кортикостерона, лютеинизирующего гормона, фолликулостимулирующего гормона, инсулина

и других метаболических показателей в сыворотке крови, а также в нарушении эстрального цикла. В других исследованиях установлено, что пренатальный стресс оказывает трансгенерационное влияние на процессы свободно-радикального окисления биомолекул в различных тканях (Aiken et al., 2019).

Эпигенетические изменения потенциально могут влиять на эндокринное программирование и развитие мозга у плода в течение нескольких поколений. В обзоре (Babenko et al., 2015) авторы подчеркивают сложную взаимосвязь между воздействием пренатального стресса на изменения экспрессии микроРНК и метилирования ДНК в плаценте и головном мозге и повышенным риском развития психических заболеваний.

Можно предположить, что пренатальный стресс, вызывающий эпигенетические изменения, становится одним из наиболее мощных факторов, влияющих на психическое здоровье. Причем такие изменения затрагивают, в том числе и различные отделы мозга, связанные с нейроэндокринной системой и когнитивными способностями. В работе (Huerta-Cervantes et al., 2021) отмечается, что когнитивные нарушения у самок крыс в разных стадиях цикла могут быть сопряжены с нарушениями в процессах перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гиппокампе и неокортексе.

Перекисное окисление липидов – не только универсальный модификатор свойств биологических мембран, но и важный физиологический регулятор их структуры, фактор, устанавливающий и поддерживающий стационарное функционирование ферментов, каналовобразователей, рецепторов. Интенсивность свободно-радикальных процессов ПОЛ, находящаяся под контролем эндогенных окислителей, взаимосвязана с составом и физическим состоянием фосфолипидов биологических мембран (их текучестью), с их чувствительностью к сигналам лигандов и экстремальным воздействиям и имеет чрезвычайно важное значение для регуляторной и информационной роли мембран в нормально протекающем метаболизме. Окис-

лительные процессы, влияющие на состав и вязкость липидного слоя мембран, способны осуществлять регуляцию клеточного метаболизма (Барабой и др., 1992).

Изменение поведения в разные стадии цикла у крыс связано с подготовкой к успешной репродуктивной функции. Изменение межстадийных особенностей поведения может быть следствием изменения фертильности. Таким образом, представляет интерес исследование трансгенерационного влияния пренатального стресса на поведение и перекисное окисление липидов в структурах мозга у самок крыс в течение эстрального цикла.

Материалы и методы

Работа проведена на животных из питомника Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (г. Санкт-Петербург) с соблюдением рекомендаций по этике работы с животными, предложенных Директивой N 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского Союза «О защите животных, используемых для научных целей» (Страсбург, 22 сентября 2010 г.) (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes). Опыты проводили на крысах Вистар (рис. 1).

Получение экспериментальных групп потомства F2.

Этап 1. В эксперименте использовали самок крыс Вистар поколения F0 весом 280–300 г, которых содержали в условиях нормального цикла свет/темнота (12/12 ч) при +22 °С в клетках для лабораторных мышей и крыс М-6 («Профлаб», Россия), свободном доступе к воде и комбикорму для лабораторных животных марки ЛБК-120 Тосненского комбикормового завода. Самок крыс спаривали с самцами F0, оплодотворение подтверждали обнаружением сперматозоидов во влагалищном мазке и обозначали как нулевой день беременности. Беременные сам-

ки были случайным образом разделены на две группы: контрольные беременные крысы для получения контрольного потомства F1 ($n = 12$) и крысы, которых подвергли в дальнейшем стрессу для получения пренатально стрессированного потомства F1 ($n = 12$).

Этап 2. Для получения пренатально стрессированного потомства F1 беременных самок F0 подвергли одностороннему иммобилизационному стрессу в условиях повышенной освещенности с 15-го по 19-й день гестации (Ордян, Пивина, 2003). Процедуру стрессирования проводили в одно и то же время суток с 14.00 и до 15.00 ч. Выбор сроков стрессирования обусловлен тем, что именно в этот период происходит интеграция всех звеньев нейроэндокринной регуляции и завершается созревание гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы (Rice, Varone, 2000).

Контрольных и стрессированных беременных самок содержали по 4–5 особей в клетке. По достижении 20-го дня беременности их рассаживали в индивидуальные клетки. Полученное потомство на второй день жизни подсчитывали, учитывая число самцов и самок в пометах, а сами пометы выравнивали до 8–10 крысят с равным соотношением полов. Крысята находились с матерью 30 дней без ограничения доступа к воде и пище. Далее пренатально стрессированное потомство F1 рассаживали в клетки, отделяя самцов от самок. Контрольное потомство F1, рожденное интактными самками F0, также на второй день жизни выравнивали и в возрасте 30 дней отделяли от матери – отдельно самцы и самки.

Этап 3. Животных для дальнейшего разведения отбирали случайным образом независимым лицом. Для получения потомства F2 составляли семейные группы из потомства F1 из расчета 1 самец на 3 самки, так, чтобы животные не были сибсами. Семейные группы составляли с таким расчетом, чтобы в дальнейшем получить

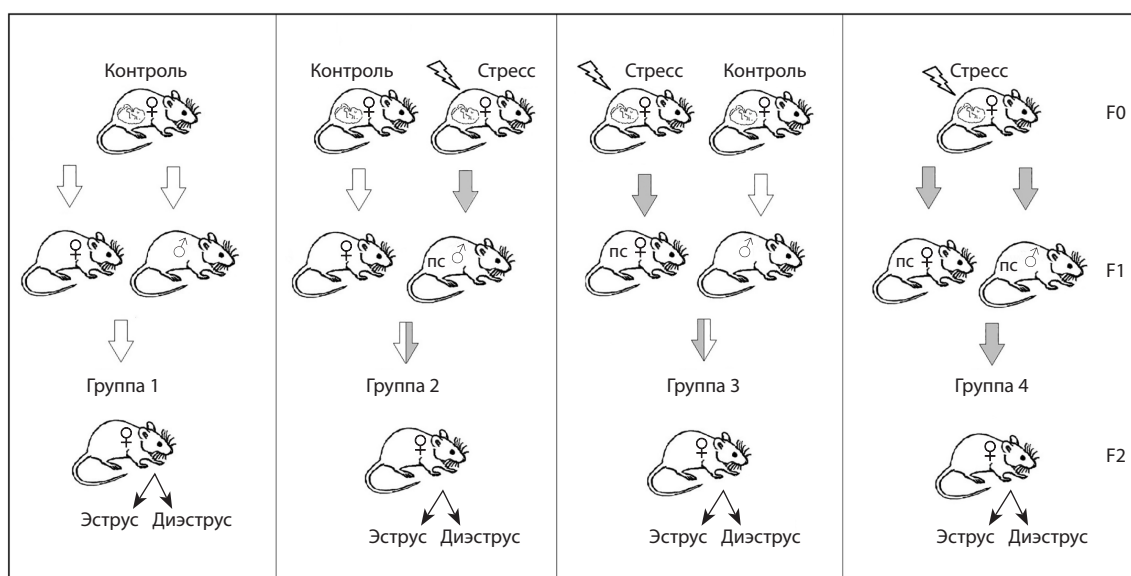


Рис. 1. Схема опыта.

Группа 1 – потомство F2, рожденное от родителей, не подвергавшихся воздействию; группа 2 – потомство F2, рожденное от матери, не подвергавшейся воздействию, и пренатально стрессированного (ПС) отца; группа 3 – потомство F2, рожденное от пренатально стрессированной матери и отца, не подвергавшегося воздействию; группа 4 – потомство F2, рожденное от пренатально стрессированных отца и матери.

следующие экспериментальные группы: группа 1 (к+к) – потомство, полученное от самок F1 и самцов F1 из контрольной группы, не подвергавшейся воздействиям; группа 2 (к+2) – потомство, полученное от самок F1 контрольной группы и самцов F1 пренатально стрессированной группы; группа 3 (2+к) – потомство, полученное от самок F1 пренатально стрессированной группы и самцов F1 из контрольной группы; группа 4 (2+2) – потомство, полученное от самок F1 и самцов F1 из пренатально стрессированной группы.

После получения потомства F2 родившихся крысят на второй день жизни подсчитывали, учитывая число самцов и самок в пометах, а сами пометы так же, как и в случае потомства F1, выравнивали до 8–10 крысят с равным соотношением полов. Крысята находились с матерью 30 дней без ограничения доступа к воде и пище. Далее потомство F2 рассаживали в клетки по 5–7 особей в каждой, отделяя самцов и самок. Для дальнейших исследований отбирали самок в возрасте 3 месяцев.

Предварительно крыс подвергали хэндлингу и приучали к взятию вагинальных мазков в течение трех недель. Далее тестировали поведение животных, сразу после проведения тестирования у крыс брали вагинальные мазки и определяли стадию цикла. Через две недели после тестирования поведения крыс декапитировали. Непосредственно после декапитации еще раз брали контрольные вагинальные мазки.

Исследование поведения. Тестирование поведения животных выполняли в тесте «открытое поле» (ОП), представляющее собой четырехугольную камеру размером 90 × 90 × 50 см, пол которой был расчерчен на квадраты размером 15 × 15 см каждый. Освещенность камеры составляла 300 лк. Тестирование проводили с 10.00 до 13.00 ч. Крысу помещали в центр арены и в течение 5 мин регистрировали общее время в центре, число пересеченных квадратов (горизонтальная двигательная активность или локомоторная активность), число вертикальных стоек без упора (вертикальная двигательная активность или исследовательская активность), длительность реакции груминга и время неподвижности (замирание). Показатели горизонтальной и вертикальной двигательной активности свидетельствуют о локомоторно-исследовательской активности. Общее время в центре, время неподвижности и время реакции груминга показывают степень тревожности у крыс.

Определение уровня перекисного окисления липидов. После декапитации из черепной коробки извлекали мозг и производили на льду выделение следующих структур: неокортекса, гиппокампа и гипоталамуса. Далее проводили экстракцию липидов по методу Фолча.

Для определения уровня диеновых конъюгатов (ДК), триеновых конъюгатов (ТК) и индекса Клейна сухой липидный остаток, полученный методом Фолча, растворяли в смеси метанол:гептан (2:1) и измеряли оптическую плотность – уровень ДК на волне 230 нм и уровень ТК на волне 274 нм. Результаты выражали в единицах оптической плотности на 1 мг фосфолипидов (Арутюнян и др., 2000). Содержание оснований Шиффа (ОШ) определяли флюориметрическим методом при максимуме возбуждения 365 нм и максимуме испускания 425 нм (Bidlack, Tappel,

1973), выражая в относительных единицах флюоресценции на 1 мг фосфолипидов.

Количество фосфолипидов оценивали по содержанию неорганического фосфора методом Бартлетта. В основе метода лежит реакция взаимодействия неорганического фосфата с молибдатом аммония, в результате чего образуется фосфорномолибденовая кислота, которая затем восстанавливается эйконогеном с образованием окрашенных оксидов молибдена, оптическую плотность раствора которых измеряют при длине волны 830 нм.

Для определения степени окисленности липидов подсчитывали индекс Клейна следующим образом: спектрофотометрически определяли оптическую плотность липидных экстрактов при длине волны 215 нм и рассчитывали соотношение оптических плотностей при 233 и 215 нм.

Определение уровня ДК, ТК, количества фосфолипидов и индекса Клейна проводили с использованием спектрофотометра BioTek PowerWave HT (США). Уровень ОШ определяли с помощью спектрофлюориметра Hitachi MPF-4 (Япония).

Все реагенты, используемые при биохимических анализах, приобретены в фирме «Вектон» (Россия), за исключением эйконогена (Merck, Германия).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc.). Данные анализировали с помощью параметрического критерия Стьюдента и непараметрического U-теста Манна–Уитни после того, как была проведена оценка нормальности распределения значений в выборках с помощью критерия Шапиро–Уилка. Данные представлены как $M \pm SEM$ – показатели поведения, а также в виде медиан (Me) и интерквартильного размаха (IQR) между значениями 25 и 75 перцентилей – биохимические показатели. Проводили сравнения каждого показателя в стадии эструса и диэструса для выявления межстадийных различий в каждой из четырех исследованных групп. А также сравнивали значения каждого показателя как в стадии эструса, так и в стадии диэструса в группах 2, 3 и 4 по сравнению с группой 1. Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты

Поведение

В группе контроля по всем показателям наблюдаются различия между стадиями цикла (рис. 2).

Показатели горизонтальной двигательной активности, вертикальной двигательной активности и времени нахождения в центре ОП у самок в стадии эструса выше, чем у самок в стадии диэструса, тогда как время неподвижности и время груминга ниже у самок в стадии эструса. Можно заключить, что в группе контроля у самок в стадии эструса повышена двигательная и исследовательская активность и снижена тревожность (по показателям в тесте ОП), что, по-видимому, представляет эволюционно целесообразную стратегию, связанную с половым поведением.

В группе к+2 горизонтальная и вертикальная двигательные активности, а также время в центре у самок крыс F2 не отличаются в стадиях эструса и диэструса. Показатели

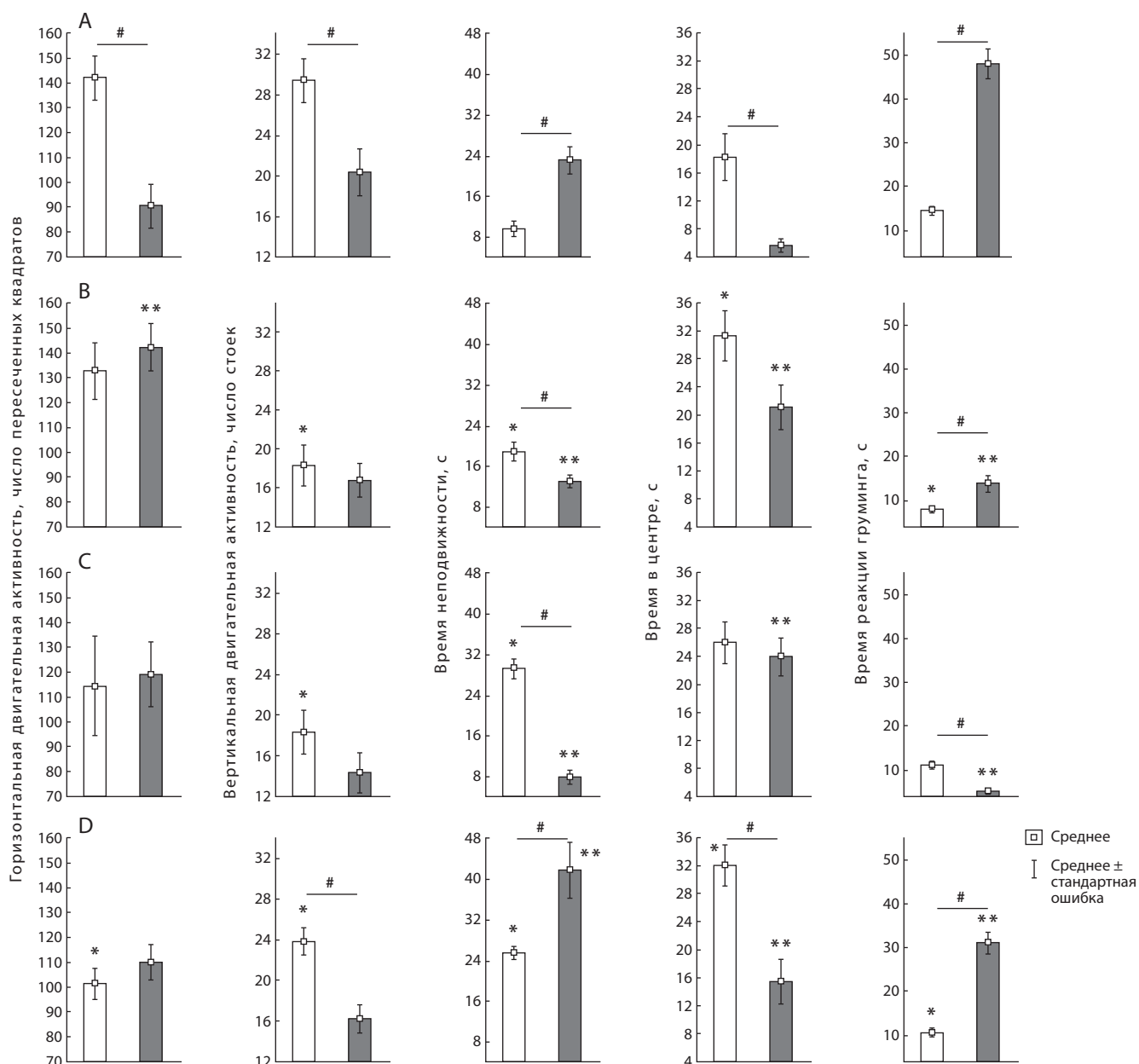


Рис. 2. Показатели поведения у крыс в тесте «открытое поле».

Здесь и на рис. 3–5: светлые столбики – крысы в стадии эструса, темные – крысы в стадии диэструса. Панель А – группа 1 (контрольные крысы); панель В – группа 2 (контрольная мать и ПС отец); панель С – группа 3 (ПС мать и контрольный отец); панель D – (ПС мать и ПС отец). # Статистически значимые отличия крыс в стадии диэструса от крыс в стадии эструса, $p < 0.05$; * статистически значимые отличия от контроля в стадии эструса, $p < 0.05$; ** статистически значимые отличия от контроля у животных в стадии диэструса, $p < 0.05$.

«время неподвижности» и «время реакции груминга» демонстрируют межстадиальную разницу. Самки F2 в диэструсе становятся более подвижными и менее тревожными по сравнению с контролем. У самок F2 в эструсе снижается исследовательская активность, увеличивается время неподвижности, увеличивается время нахождения в центре, т.е. самки становятся менее тревожными. На основании вышеописанных изменений мы предполагаем, что самки F2 в период, наиболее благоприятный для спаривания, становятся менее подвижными по сравнению с контролем, и, соответственно, снижается вероятность их встречи с партнером. В то же время самки, находящиеся в стадии диэструса, по исследованным показателям по-

ведения приближаются к самкам, находящимся в стадии эструса в контрольной группе.

В группе 2+к показатели горизонтальной и вертикальной двигательной активности и время в центре у самок крыс F2 не отличаются в стадиях эструса и диэструса. Показатели «время неподвижности» и «время реакции груминга» демонстрируют межстадиальную разницу, которая инвертирована по отношению к контролю. Самки F2 в диэструсе менее подвижны, меньше грумируют и предпочитают находиться в центре ОП, т.е. у них снижена тревожность по сравнению с контролем. У самок F2 в эструсе снижается исследовательская активность и увеличивается время неподвижности по сравнению с контролем, кроме

того, крысы данной группы в эструсе менее подвижны, чем самки этой группы в диэструсе. Таким образом, и в этой группе у самок в стадии эструса произошло искажение поведения, связанного с поиском партнера.

В группе 2+2 у самок крыс F2 по всем показателям, кроме горизонтальной двигательной активности, наблюдаются различия между стадиями цикла. Самки F2 в диэструсе менее подвижны и более тревожны по сравнению с контролем. У самок F2 в эструсе также отмечаются снижение локомоторно-исследовательской активности и повышение тревожности по сравнению с контролем. Тем не менее межстадиальное соотношение у самок данной группы остается схожим с межстадиальным соотношением у контрольной группы, однако по абсолютным значениям показателей поведения самки группы 2+2 отличаются от контрольной группы увеличением тревожности.

Неокортекс

В группе контроля наблюдаются различия между стадиями цикла только по показателю ОШ: в стадии эструса уровень конечных продуктов реакций перекисления липидов в 2 раза ниже по сравнению со стадией диэструса (рис. 3).

В группе к+2 уровень ОШ в стадии диэструса в 2 раза ниже, чем в группе контроля, однако показатели других исследованных продуктов ПОЛ не отличаются от уровня группы контроля. Межстадиальные различия отсутствуют.

В группе 2+к у самок F2 относительно показателей контроля уровень ДК и ТК – начальных продуктов ПОЛ – ниже, а уровень ОШ – конечных продуктов – выше. Следует отметить, что показатели ДК и индекс Клейна демонстрируют межстадиальную разницу.

Уровни ДК, ТК и индекс Клейна в группе 2+2 ниже относительно соответствующих показателей контроля в обе стадии цикла, за исключением ТК в эструсе. Уровень ОШ в эструсе в 3 раза выше, чем в группе контроля. Можно заключить, что в группе 2+2 уровень показателей ПОЛ ниже по сравнению с контролем, в особенности в стадии диэструса, исключая показатель ОШ. Следует отметить, что все исследованные показатели ПОЛ этой группы демонстрируют межстадиальную разницу.

Таким образом, группы к+к, и к+2 в неокортексе сходны по своему профилю уровней ДК, ТК и индекса Клейна, тогда как группы 2+2 и 2+к выделяются снижением этих показателей ПОЛ в неокортексе. В то же время показатели

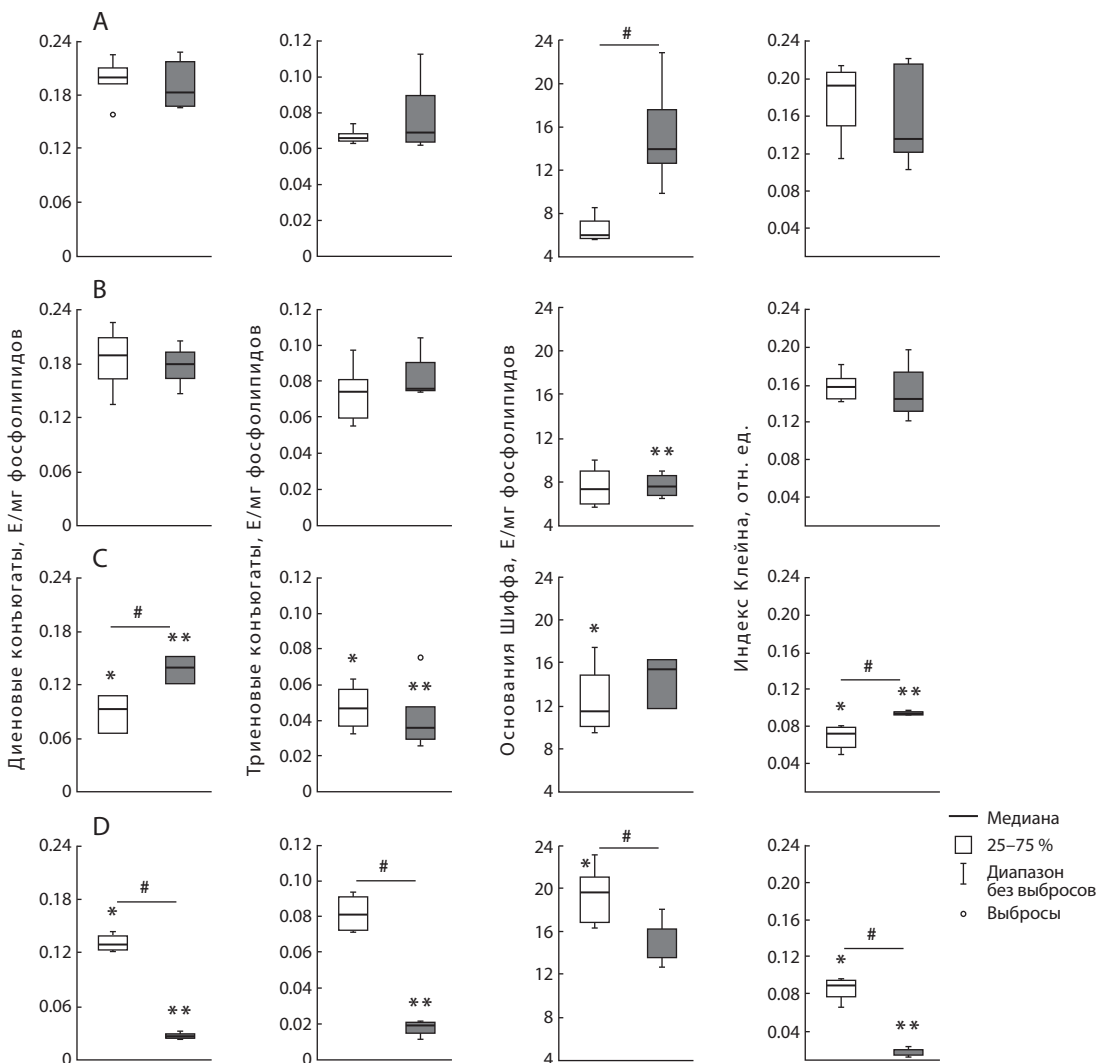


Рис. 3. Уровень ДК, ТК, ОШ и индекс Клейна в неокортексе у самок крыс в экспериментальных группах.

ОШ этих групп в стадии эструса значительно выше показателей контроля, тогда как в диэструсе резким снижением этого показателя характеризуется только группа к+2.

Гиппокамп

В группе контроля наблюдаются различия между стадиями цикла только по показателю ОШ: в стадии эструса уровень конечных продуктов реакций перекисления липидов в 2 раза выше по сравнению со стадией диэструса (рис. 4).

В группе к+2 уровень ДК в стадии эструса и диэструса выше показателей контроля, уровень ТК в диэструсе выше показателей контроля. Уровень ОШ в стадии эструса в 2 раза ниже, чем в группе контроля. Значения индекса Клейна в диэструсе выше, чем в контроле. Можно заключить, что уровень показателей начальных продуктов ПОЛ выше по сравнению с контролем, в особенности в стадии диэструса, однако для этой группы характерно отсутствие межстадиальных различий.

В группе 2+к уровень ОШ в стадии диэструса ниже относительно уровня контроля. В диэструсе отличия ДК, ТК и индекса Клейна относительно показателей контроля отсутствуют. При этом для ДК, ОШ и индекса Клейна наблюдается межстадиальная разница.

Уровни ДК в группе 2+2 в обеих стадиях цикла ниже относительно значений в группе контроля. Уровень ТК характеризуется отсутствием межстадиальных различий и отличий от группы контроля. Показатель ОШ в стадии эструса в 3 раза ниже по сравнению с группой контроля, а отличия в диэструсе по сравнению с контролем отсутствуют. Индекс Клейна в стадии эструса и диэструса ниже относительно соответствующих показателей контроля. В группе 2+2 уровень показателей ПОЛ ниже по сравнению с контролем и имеются межстадиальные различия в уровнях как начальных, так и конечных продуктов ПОЛ. Обращает на себя внимание, что группы 2+к и 2+2 демонстрируют межстадиальную разницу показателей перекисного окисления липидов.

Гипоталамус

В группе контроля наблюдаются различия между стадиями цикла по показателю ТК и ОШ. Уровень этих продуктов ПОЛ выше в стадии диэструса по сравнению со стадией эструса (рис. 5).

В группе к+2 уровень ОШ в стадии диэструса ниже, чем в группе контроля. Уровень ДК и индекс Клейна в диэструсе в 3 раза выше уровня контроля. Отличия уров-

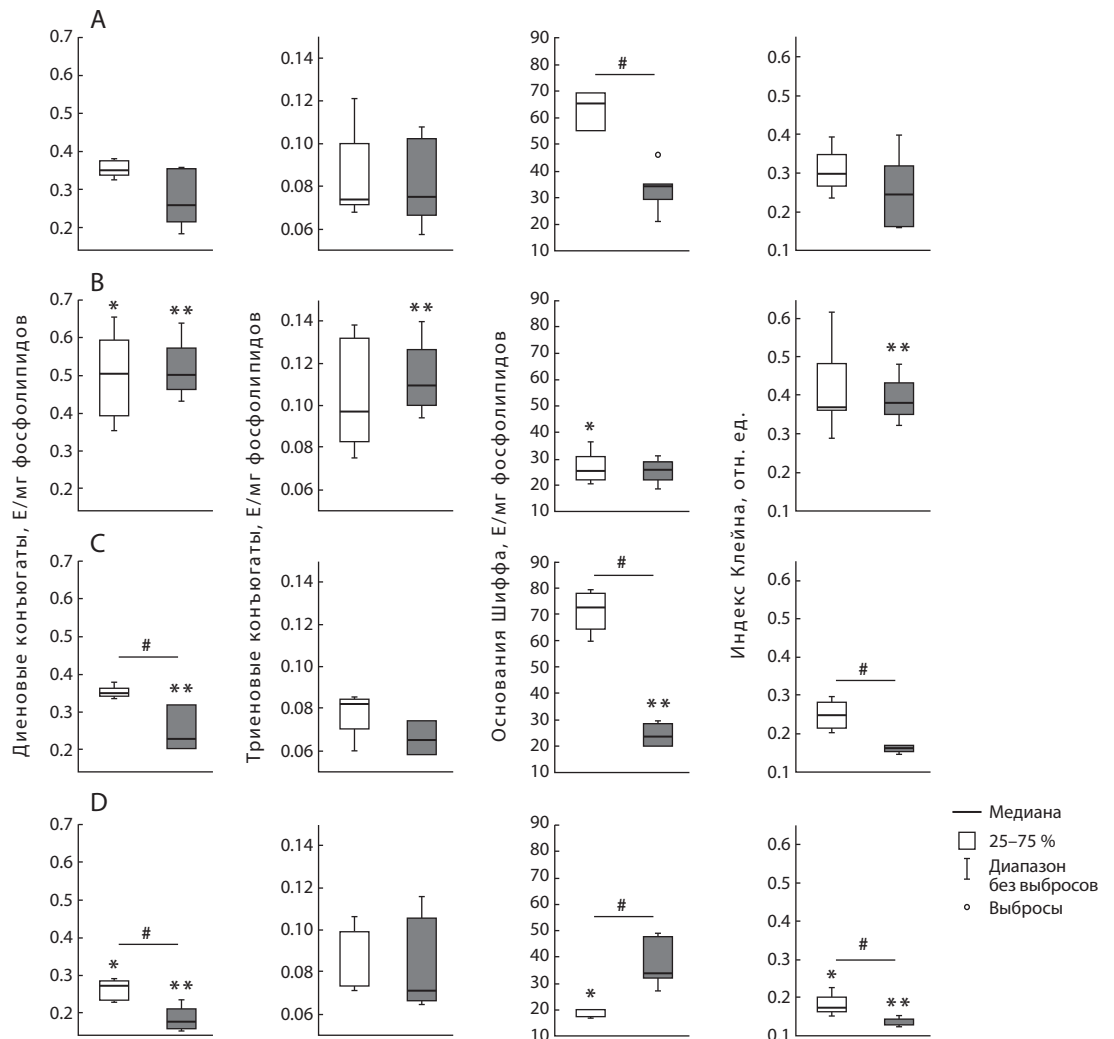


Рис. 4. Уровень ДК, ТК, ОШ и индекс Клейна в гиппокампе у самок крыс в экспериментальных группах.

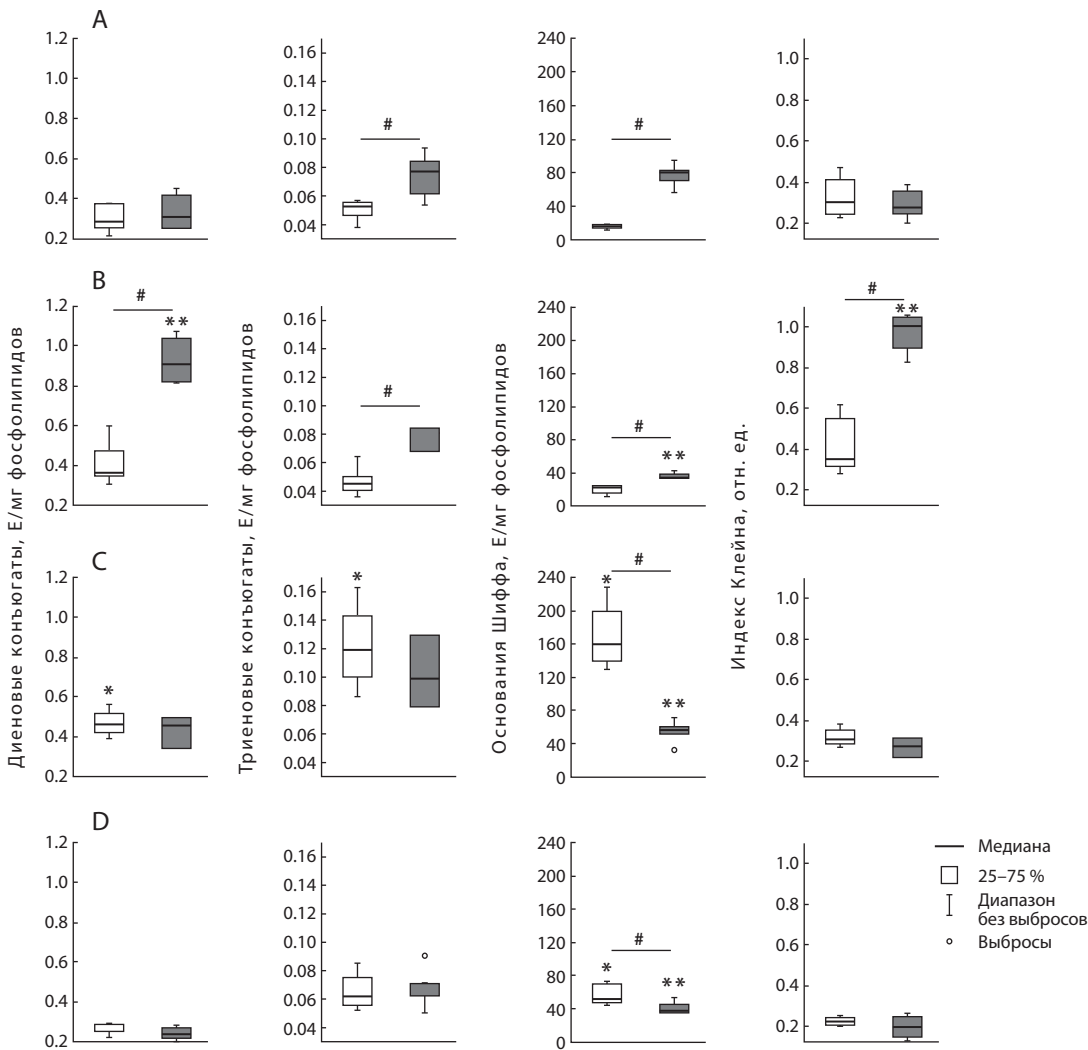


Рис. 5. Уровень ДК, ТК, ОШ и индекс Клейна в гипоталамусе у самок крыс в экспериментальных группах.

ня ТК от контроля в этой группе отсутствуют. Для всех исследованных показателей ПОЛ характерны межстадиальные различия.

В группе 2+к уровень ОШ в эструсе выше относительно показателей контроля в 10 раз, а в диэструсе ниже. Уровни ДК и ТК в стадии эструса выше по сравнению с контрольной группой. Межстадиальная разница есть только у показателя ОШ, и она инвертирована по отношению к контролю.

Показатель ОШ в группе 2+2 в стадии эструса в 3 раза выше по сравнению с группой контроля, при этом в диэструсе уровень ОШ ниже, чем в контроле в 2 раза. Для остальных показателей ПОЛ межстадиальные и межгрупповые различия отсутствуют.

Обращает на себя внимание сходство у групп к+к и 2+2 в уровне начальных и промежуточных показателей ПОЛ. В то же время уровни ОШ группы 2+2 в эструсе и диэструсе инвертированы относительно контроля. Также привлекают внимание многократное увеличение по сравнению с контролем начальных продуктов ПОЛ и показателя окисленности (индекс Клейна) в диэструсе у группы к+2 и уровень ОШ в стадии эструса у группы 2+к.

Обсуждение

Повышение уровня материнских глюкокортикоидов во время беременности может приводить к стойким эпигенетическим изменениям. В работах (Guilbert et al., 2012; Matthews, Phillips, 2012) отмечается, что эпигенетические изменения могут сохраняться на протяжении последующих поколений.

В связи с изменившимся социальным положением женщины в последние десятилетия произошел сдвиг репродуктивного возраста в более поздние возрастные когорты. Наличие большого числа вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) позволяет женщинам осуществлять деторождение даже в случае значительных патологий. Однако негативные последствия в ряде поколений таких патологических беременностей в настоящее время только начинают осознаваться (Aiken et al., 2015; Sanches-Garrido et al., 2022).

В обзоре (Левинсон и др., 2022) авторы отмечают многофакторность гормональных воздействий при проблеме нарушений репродуктивной функции. При анализе неудач применения ВРТ выявлено не только значение гипоталамических нарушений, но и влияние паракринных факто-

ров яичника. В то же время в исследовании, выполненном в нашей лаборатории, обнаружено, что негативное воздействие пренатального стресса на морфометрические показатели матки, связанные с нарушением цикла половых гормонов, отмечается только у молодых самок крыс в возрасте 3 месяцев, тогда как у более возрастных животных такие нарушения нивелируются (Пивина и др., 2010). Однако в исследовании В. Piquer с коллегами (2022) обнаружено снижение фертильности самок крыс, выраженное в нарушении оплодотворения и количества родившихся крысят после пренатального стресса вплоть до поколения F4. Этими же авторами показано нарушение морфометрических показателей яичников и матки и нарушения эстрального цикла до поколения F4. Как отмечают А.Л. Левинсон с коллегами, несмотря на то, что исследования последствий психоэмоционального стресса широко представлены как в медицинской, так и в научной биологической литературе, посвященной экспериментам на лабораторных моделях, эти два направления развиваются во многом независимо (Левинсон и др., 2022). Можно предположить, что неудачи в применении ВРТ могут быть вызваны, в том числе и трансгенерационными воздействиями стресса.

В различных экспериментальных моделях трансгенерационной передачи эпигенетических изменений отмечаются нарушения фертильности потомков-самок на протяжении нескольких поколений (Guilbert et al., 2012; Moisiadis et al., 2017; Adams, Smith, 2020). Кроме того, действие пренатального стресса на трансгенерационные изменения у самцов и самок потомства различно (Grundwald, Brunton, 2015; Zaidan, Gaisler-Salomon, 2015; Zhang et al., 2020; Huerta-Cervantes et al., 2021). При этом воздействие оказывают как пренатально стрессированные матери, так и отцы.

По нашим данным, поведение самок контрольной группы 1 в стадии диэструса характеризуется повышенными показателями тревожности, тогда как в эструсе снижена тревожность и повышена локомоторная и исследовательская активность. Эти данные соответствуют более ранним исследованиям (Mora et al., 1996; Marcondes et al., 2001; Miller et al., 2021), где изменения поведения в указанные стадии цикла связаны с различным гормональным профилем. Очевидно, эта взаимосвязь – результат того, что в структурах мозга присутствуют рецепторы к половым гормонам, вызывающим эволюционно целесообразные поведенческие реакции, связанные с размножением (Резников и др., 2004).

Изменение уровня ПОЛ считается важным показателем дестабилизации мембран (Левицкий, Губский, 1994) и может служить причиной нарушения молекулярной структуры мембран, что в свою очередь выражается и в изменении поведения (Moisiadis et al., 2017). В то же время процессы ПОЛ, протекающие в рамках физиологической нормы, являются механизмом регуляции физико-химического состояния мембран и, соответственно, связанных с мембранами структур – рецепторов и ионных каналов (Halliwell, Gutteridge, 2007). Данные, полученные в нашем исследовании, позволяют сделать вывод (на основании изменений показателя ОШ), что в эструсе происходят сни-

жение вязкости и увеличение пластичности мембран в неокортексе и обратные изменения в гиппокампе. При этом в гипоталамусе в стадии эструса изменения уровня ПОЛ и, соответственно, изменения физико-химического состояния мембран сходны с неокортексом, но более выражены. По-видимому, изменения в поведении в стадии эструса, по сравнению с диэструсом, требуют соответствующих изменений в мембранах и связанных с ними структур (рецепторов и ионных каналов).

Пренатальный стресс отца является при объяснении результатов более понятным методом изучения механизмов эпигенетической передачи, чем эксперименты с пренатально стрессированными матерями, которые оказывают дополнительное воздействие на потомство F2 материнским поведением, родами и лактацией (Bale, 2015). Обнаружение измененного фенотипа в случае эксперимента с пренатально стрессированным отцом может считаться достоверным доказательством трансгенерационной передачи эпигенетических изменений во втором поколении (Dunn et al., 2011).

Наше исследование показало, что в группе 2, где один из родителей – пренатально стрессированный отец, поведение в разные стадии цикла не соответствует задачам репродуктивного поведения, следовательно, можно сделать косвенный вывод о нарушении гормональной регуляции полового поведения. Рассматривая результаты изменения ПОЛ, мы видим, что физико-химические свойства мембран неокортекса у крыс в диэструсе характеризуются повышенным уровнем пластичности мембран по показателю ОШ в сравнении с контролем. В гиппокампе изменения разных продуктов ПОЛ разнонаправлены по сравнению с контролем, но с учетом такого показателя, как индекс Клейна, характеризующего степень окисленности липидов, можно сделать вывод о повышении уровня ПОЛ в диэструсе по сравнению с группой контроля. При этом в гипоталамусе изменения показателей ПОЛ в стадии эструса, по сравнению с диэструсом, сходны с контролем, но более выражены.

Таким образом, изменение уровня ПОЛ в исследованных структурах мозга, вероятно, также вносит вклад в изменение полового поведения самок группы, где одним из родителей является пренатально стрессированный отец. Можно заключить, что пренатальный стресс отца вносит весомый вклад в репродуктивный паттерн дочерей, в том числе через биохимические процессы, связанные с окислением биомолекул.

Пренатальный стресс матери – дополнительный стрессировующий фактор, поскольку потомство F2 воспитывается самкой с нарушением материнского поведения (Граф и др., 2012). Однако поведение группы 3, где пренатальному стрессу подвергалась мать, демонстрирует искажение поведения самок как в эструсе, так и в диэструсе, сходное с группой 2. Процессы ПОЛ в неокортексе показывают разбалансировку между начальными и конечными продуктами, за счет чего происходят изменения по сравнению с контролем. Так, появляется межстадиальная разница в показателях ДК и индекса Клейна при снижении этих показателей относительно контрольных, в то время как показатель конечных продуктов ПОЛ – ОШ в стадии эструса

превышает значения в группе контроля, вследствие чего исчезает межстадиальная разница.

В гиппокампе основные изменения касаются снижения показателей ПОЛ в диэструсе относительно контроля, тогда как в гипоталамусе, напротив, показатели ПОЛ возрастают в эструсе относительно значений контроля. По-видимому, нарушения поведения в разные стадии цикла могут быть в этой группе, в том числе следствием изменения физико-химических свойств мембран исследованных структур: дисбаланса в неокортексе и межстадиальными искажениями процессов ПОЛ в гиппокампе и гипоталамусе (увеличением пластичности мембран гиппокампа в диэструсе и снижением пластичности мембран гипоталамуса в эструсе). Таким образом, пренатально стрессированная мать влияет на изменения репродуктивного паттерна дочерей по-разному в разные стадии цикла. Вероятно, на возможные эпигенетические изменения самок F2 накладывается и влияние нарушений материнского поведения пренатально стрессированных самок F1.

В литературе имеются сведения о кумулятивном влиянии пренатального стресса обоих родителей на потомство (Adams, Smith, 2020). В наших исследованиях в группе 4, где пренатальному стрессу подвергались оба родителя, поведение самок потомства F2 демонстрирует увеличение тревожности в обе стадии цикла. Перекисное окисление липидов в неокортексе этой группы претерпевает изменения по сравнению с группой контроля, за счет чего появляется значительная межстадиальная разница по всем показателям ПОЛ. Сходный профиль межстадиальных различий наблюдается и в гиппокампе. В гипоталамусе ОШ инвертированы по стадиям относительно контрольной группы. Можно предположить, что одной из причин увеличения тревожности в независимости от стадии эстрального цикла в этой группе может быть изменение процессов ПОЛ в неокортексе и гиппокампе. Возможно, что кумулятивный эффект пренатального стресса обоих родителей проявляется в этой группе однозначным изменением поведения в обе стадии цикла и нарушением ПОЛ в неокортексе.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о трансгенерационном влиянии пренатального стресса на процессы ПОЛ и поведение у поколения F2 самок крыс в зависимости от стадии эстрального цикла.

Пренатальный стресс отца или матери изменяет процессы ПОЛ в неокортексе, гиппокампе и гипоталамусе поколения F2 самок крыс таким образом, что физико-химическое состояние мембран этих структур мозга не соответствует задачам стадий эстрального цикла, при этом пренатальный стресс отца вызывает наибольшие изменения процессов ПОЛ в гипоталамусе, а пренатальный стресс матери – в неокортексе. Поведение в обоих случаях не соответствует репродуктивным задачам.

Пренатальный стресс обоих родителей поколения F2 самок крыс оказывает наибольшее влияние на изменение процессов ПОЛ в изученных структурах мозга, снижая интенсивность перекисного окисления липидов. Поведение характеризуется повышением тревожности в обе стадии цикла.

Список литературы / References

- Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. СПб.: Фолиант, 2000
- [Arutyunyan A.V., Dubinina E.E., Zyбина N.N. Methods of Evaluation of Free-radical Oxidation and the Antioxidant System. Saint Petersburg: Foliant Publ., 2000 (in Russian)]
- Барабой В.А., Брехман И.И., Голотин В.Г., Кудряшов Ю.Б. Перекисное окисление и стресс. СПб.: Наука, 1992
- [Baraboy V.A., Brekhman I.I., Golotin V.G., Kudriashov Yu.B. Peroxidation and Stress. Saint Petersburg: Nauka Publ., 1992 (in Russian)]
- Граф А.В., Дунаева Т.Ю., Маклакова А.С., Маслова М.В., Соколова Н.А., Трофимова Л.К. Трансгенерационные последствия острого антенатального стресса беременных крыс. *Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова*. 2012;98(3):331-341
- [Graf A.V., Dunaeva T.Y., Maklakova A.S., Maslova M.V., Sokolova N.A., Trofimova L.K. Transgenerational consequences of acute antenatal stress in pregnant rats. *Rossiyskiy Fiziologicheskiy Zhurnal imeni Ivana Mikhaylovicha Sechenova = Russian Journal of Physiology*. 2012;98(3):331-341 (in Russian)]
- Дыбан А.П. Раннее развитие млекопитающих. Л., 1988
- [Dyban A.P. Early Development of Mammals. Leningrad, 1988 (in Russian)]
- Левинсон А.Л., Игонина Т.Н., Рожкова И.Н., Брусенцев Е.Ю., Амстиславский С.Я. Психоэмоциональный стресс, фолликулогенез и репродуктивные технологии: клинические и экспериментальные данные. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(5):431-441. DOI 10.18699/VJGB-22-53
- [Levinson A.L., Igonina T.N., Rozhkova I.N., Brusentsev E.Yu., Amstislavsky S.Ya. Psycho-emotional stress, folliculogenesis, and reproductive technologies: clinical and experimental data. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(5):431-441. DOI 10.18699/VJGB-22-53 (in Russian)]
- Левицкий Е.Л., Губский Ю.И. Свободнорадикальные повреждения ядерного генетического аппарата клетки. *Украинский биохимический журнал*. 1994;66(4):18-30
- [Levytskyi E.L., Gubskii Yu.Y. Free radical damage of the nuclear genetic apparatus of cells. *Ukrainskiy Biokhimicheskiy Zhurnal = The Ukrainian Biochemical Journal*. 1994;66(4):18-30 (in Russian)]
- Ордыан Н.Э., Пивина С.Г. Характеристика поведения и стрессо-реактивности гипофизарно-адреналовой системы пренатально стрессированных крыс. *Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова*. 2003;89(1):52-59
- [Ordyan N.E., Pivina S.G. Behavioral characteristics and stress reaction of the pituitary-adrenal system in prenatally stressed rats. *Rossiyskiy Fiziologicheskiy Zhurnal imeni Ivana Mikhaylovicha Sechenova = Russian Journal of Physiology*. 2003;89(1):52-59 (in Russian)]
- Пивина С.Г., Ракицкая В.В., Шамолина Т.С., Ордыан Н.Э. Изменение морфометрических характеристик матки крыс под действием пренатального стресса. *Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова*. 2010;96(6):621-626
- [Pivina S.G., Rakitskaya V.V., Shamolina T.S., Ordyan N.E. Change of the uterus morphometric parameters in the prenatally stressed rats. *Rossiyskiy Fiziologicheskiy Zhurnal imeni Ivana Mikhaylovicha Sechenova = Russian Journal of Physiology*. 2010;96(6):621-626 (in Russian)]
- Резников А.Г., Пишак В.П., Носенко Н.Д., Ткачук С.С., Мыслицкий В.Ф. Пренатальный стресс и нейроэндокринная патология. Черновцы: Медакадемия, 2004
- [Reznikov A.G., Pishak V.P., Nosenko N.D., Tkachyuk S.S., Myslitskiy V.F. Prenatal Stress and Neuroendocrine Pathology. Chernivtsi: Medacademia Publ., 2004 (in Russian)]
- Adams R.C.M., Smith C. *In utero* exposure to maternal chronic inflammation transfers pro-inflammatory profile to generation F2 via sex-

- specific mechanisms. *Front. Immunol.* 2020;11:48. DOI 10.3389/fimmu.2020.00048
- Aiken C.E., Tarry-Adkins J.L., Ozanne S.E. Transgenerational developmental programming of ovarian reserve. *Sci. Rep.* 2015;5:16175. DOI 10.1038/srep16175
- Aiken C.E., Tarry-Adkins J.L., Spiroski A., Nuzzo A.M., Ashmore T.J., Rolfo A., Sutherland M.J., Camm E.J., Giussani D.A., Ozanne S.E. Chronic gestational hypoxia accelerates ovarian aging and lowers ovarian reserve in next-generation adult rats. *FASEB J.* 2019;33(6):7758-7766. DOI 10.1096/fj.201802772R
- Babenko O., Kovalchuk I., Metz G.A.S. Stress-induced perinatal and transgenerational epigenetic programming of brain development and mental health. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2015;48:70-91. DOI 10.1016/j.neubiorev.2014.11.013
- Bale T.L. Lifetime stress experience: transgenerational epigenetics and germ cell programming. *Dialogues Clin. Neurosci.* 2014;16(3):297-305. DOI 10.31887/DCNS.2014.16.3/tbale
- Bale T.L. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nat. Rev. Neurosci.* 2015;16(6):332-344. DOI 10.1038/nrn3818
- Bidlack W.R., Tappel A.L. Fluorescent products of phospholipids during lipid peroxidation. *Lipids.* 1973;8(4):203-207. DOI 10.1007/BF02544636
- Brunton P.J. Effects of maternal exposure to social stress during pregnancy: consequences for mother and offspring. *Reproduction.* 2013;146(5):R175-R189. DOI 10.1530/REP-13-0258
- Dennery P.A. Oxidative stress in development: nature or nurture? *Free Radic. Biol. Med.* 2010;49(7):1147-1151. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.011
- Dunn G.A., Morgan C.P., Bale T.L. Sex-specificity in transgenerational epigenetic programming. *Horm. Behav.* 2011;59(3):290-295. DOI 10.1016/j.yhbeh.2010.05.004
- Essex M.J., Boyce W.T., Hertzman C., Lam L.L., Armstrong J.M., Neumann S.M.A., Kobor M.S. Epigenetic vestiges of early developmental adversity: childhood stress exposure and DNA methylation in adolescence. *Child Dev.* 2013;84(1):58-75. DOI 10.1111/j.1467-8624.2011.01641.x
- Grundwald N.J., Brunton P.J. Prenatal stress programs neuroendocrine stress responses and affective behaviors in second generation rats in a sex-dependent manner. *Psychoneuroendocrinology.* 2015;62:204-216. DOI 10.1016/j.psyneuen.2015.08.010
- Guilbert F., Lumineau S., Kotrschal K., Mostl E., Richard-Yris M., Houdelier C. Trans-generational effects of prenatal stress in quail. *Proc. Biol. Sci.* 2012;280(1753):20122368. DOI 10.1098/rspb.2012.2368
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. New York: Oxford University Press, 2007
- Huerta-Cervantes M., Peña-Montes D.J., López-Vázquez M.A., Montoya-Pérez R., Cortés-Rojo C., Olvera-Cortés M.E., Saavedra-Molina A. Effects of gestational diabetes in cognitive behavior, oxidative stress and metabolism on the second-generation off-spring of rats. *Nutrients.* 2021;13(5):1575. DOI 10.3390/nu13051575
- Marcondes F.K., Miguel K.J., Melo L.L., Spadari-Bratfisch R.C. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol. Behav.* 2001;74(4-5):435-440. DOI 10.1016/S0031-9384(01)00593-5
- Matthews S.G., Phillips D.I. Transgenerational inheritance of stress pathology. *Exp. Neurol.* 2012;233(1):95-101. DOI 10.1016/j.expneurol.2011.01.009
- Miller C.R., Halbing A.A., Patisaul H.B., Meitzen J. Interaction of the estrous cycle, novelty and light on female and male rat open field locomotor and anxiety-related behaviors. *Physiol. Behav.* 2021;228:113203. DOI 10.1016/j.physbeh.2020.113203
- Moisiadis V.G., Constantinof A., Kostaki A., Szyf M., Matthews S. Prenatal glucocorticoid exposure modifies endocrine function and behavior for 3 generations following maternal and paternal transmission. *Sci. Rep.* 2017;7(1):11814. DOI 10.1038/s41598-017-11635-w
- Mora S., Dussaubat N., Diaz-Veliz G. Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. *Psychoneuroendocrinology.* 1996;21(7):609-620. DOI 10.1016/S0306-4530(96)00015-7
- Piquer B., Ruz F., Barra R., Lara H.E. Gestational sympathetic stress programs the fertility of offspring: a rat multi-generation study. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2022;19(5):3044. DOI 10.3390/ijerph19053044
- Provençal N., Binder E.B. The effect of early life stress on the epigenome: from the womb to adulthood and even before. *Exp. Neurol.* 2015;268:10-20. DOI 10.1016/j.expneurol.2014.09.001
- Rice D., Barone S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ. Health Perspect.* 2000;108(Suppl. 3):511-533. DOI 10.1289/ehp.00108s3511
- Rodgers A.B., Bale T.L. Germ cell origins of posttraumatic stress disorder risk: the transgenerational impact of parental stress experience. *Biol. Psychiatry.* 2015;78(5):307-314. DOI 10.1016/j.biopsych.2015.03.018
- Sanches-Garrido M.A., Garcia-Galiano D., Tena-Sempere M. Early programming of reproductive health and fertility: novel neuroendocrine mechanisms and implications in reproductive medicine. *Hum. Reprod. Update.* 2022;28(3):346-375. DOI 10.1093/humupd/dmac005
- Thompson L.P., Al-Hasan Y. Impact of oxidative stress in fetal programming. *J. Pregnancy.* 2012;2012:582748. DOI 10.1155/2012/582748
- Yao S., Lopes-Tello J., Sferruzzi-Perri A.N. Developmental programming of the female reproductive system – a review. *Biol. Reprod.* 2021;104(4):745-770. DOI 10.1093/biolre/iaaa232
- Zaidan H., Gaisler-Salomon I. Prereproductive stress in adolescent female rats affects behavior and corticosterone levels in second-generation offspring. *Psychoneuroendocrinology.* 2015;58:120-129. DOI 10.1016/j.psyneuen.2015.04.013
- Zhang H.-L., Yi M., Li D., Li R., Zhao Y., Qiao J. Transgenerational inheritance of reproductive and metabolic phenotypes in PCOS rats. *Front. Endocrinol.* 2020;11:144. DOI 10.3389/fendo.2020.00144

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 14.09.2023. После доработки 19.12.2023. Принята к публикации 09.02.2024.