

*На правах рукописи*

АНИСИМОВА МАРГАРИТА ВЛАДИМИРОВНА

**ВЛИЯНИЕ АНТИГЕННОЙ СТИМУЛЯЦИИ САМЦОВ МЫШЕЙ НА ИХ  
РЕПРОДУКТИВНУЮ ЭФФЕКТИВНОСТЬ И МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ  
ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОТОМКОВ**

03.03.01 – Физиология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск, 2022

Работа выполнена в лаборатории генетики лабораторных животных Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН)» (г. Новосибирск).

**Научный руководитель:**

**Герлинская Людмила Алексеевна**, д.б.н., в.н.с. Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН)» (г. Новосибирск).

**Официальные оппоненты:**

**Назарова Галина Григорьевна**, д.б.н., в.н.с. лаборатории структуры и динамики популяций животных Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук (ИСЭЖ СО РАН) (г. Новосибирск);

**Роговин Константин Александрович**, д.б.н., в.н.с. лаборатории популяционной экологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова Российской академии наук (ИПЭЭ РАН) (г. Москва).

**Ведущая организация** – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии имени И.П. Павлова Российской академии наук (ИФ РАН) (г. Санкт-Петербург).

Защита диссертации состоится \_\_\_\_\_ 2022 года в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 001.014.02 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины» по адресу: 630117, а/я 237, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4, тел. (383)335-98-01, факс (383) 335-97-54, эл. почта: dissovet@neuronm.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «НИИНМ» и на сайте <http://www.neuronm.ru/>.

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2022 г.

Учёный секретарь диссертационного совета

д.б.н.

Мельников В.Н.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Опыт столкновений самцов с неблагоприятными факторами окружающей среды, до спариваний с самками, отражается на их репродуктивном успехе и на морфофизиологических свойствах потомков (Anway et al., 2005; Terashima et al., 2015; Wu et al., 2016; Sun et al., 2018). Вместе с тем варьирующее антигенное окружение является неотъемлемой частью среды обитания млекопитающих, которое формируется патогенными и непатогенными микроорганизмами, антигенами растительного происхождения, токсинами и так далее. Актуальность проблемы репродуктивных эффектов и отдаленных последствий на фенотипические свойства потомков при столкновении отцов с новыми антигенами резко возросла в связи с пандемией COVID-19, которая стимулировала масштабную вакцинацию людей детородного возраста. Иммунный ответ, спровоцированный инфекцией или другими формами антигенной стимуляции, например, вакцинацией, может влиять на многие функции организма особей мужского пола, включая функцию воспроизводства. Размножение в таких условиях не является экстраординарным событием, но при этом остается открытым вопрос о вкладе иммунных факторов самцов, обусловленных индивидуальными особенностями иммунного реагирования в формирование жизненно важных морфофизиологических характеристик потомков. Недавние исследования показали, что спаривание самцов с самками на фоне системной активации иммунитета, индуцированной однократным введением KLH (keyhole limpet hemocyanin), влияет на внутриутробное развитие их потомков (Gerlinskaya et al., 2017). При воздействии иммуногенных стимулов, адресованных как к врождённому, так и к приобретённому иммунитету, регистрируется уменьшение половой привлекательности самцов (Moshkin et al., 2002; Zala et al., 2004). Кроме того установлено, что, несмотря на снижение запаховой привлекательности и половой активности, самцы мышей, которым вводили в качестве чужеродного антигена иммуногенный белок KLH (keyhole limpet hemocyanin), показывали большую репродуктивную эффективность по сравнению с контрольными особями (Gerlinskaya et al., 2012). Покрытие интактных самок антигенстимулированными самцами влияло на гуморальное обеспечение беременности и даже увеличивало темпы роста плодов (Gerlinskaya et al., 2015). Поскольку вероятность спаривания самок с инфицированными самцами может играть значимую роль в формировании у потомства устойчивости к антигенному разнообразию окружающей среды, мы задались вопросом, могут ли отцовский опыт столкновения с антигенами и иммуно-репродуктивные последствия таких столкновений влиять на фенотип их потомков? На сегодняшний день существуют лишь теоретические предположения о том,

что отцовский опыт в противостоянии паразитарной интервенции может передаваться потомкам в качестве иммунологической памяти (Luu, Tate, 2017).

**Цель исследования:** изучить влияние системной активации иммунитета самцов нереплицируемыми антигенами на фертильные свойства, пренатальное развитие и фенотип взрослых потомков.

**Задачи исследования:**

1. Исследовать динамику гуморального иммунного ответа, количественные и качественные показатели сперматозоидов после однократного введения иммуногенного белка KLH самцам мышей, характеризующиеся преобладанием провоспалительного (Th1) (линия C57BL/6) или противовоспалительного (Th2) (линия BALB/c) типов иммунного реагирования.
2. Проанализировать на стадии максимального антителообразования фертильность антигенстимулированных самцов линии C57BL/6 и модулирующее влияние антигенной стимуляции отцов на параметры пренатального развития и гуморального обеспечения беременности.
3. Исследовать влияние иммунизации отцов на динамику массы тела в постнатальном онтогенезе, спектр нейрометаболитов в структурах головного мозга, иммунореактивность, уровень тестостерона в плазме крови, индексы масс иммунных и репродуктивных органов и параметры сперматозоидов у взрослых потомков иммунизированных самцов.

**Научная новизна результатов**

Активация механизмов иммунной защиты однократным введением антигена впервые использована нами для изучения баланса между поддержанием иммунной системы и репродуктивной функцией антигенстимулированных самцов и их сыновей. При этом впервые установлено, что:

1. На начальной стадии иммунного ответа, обусловленного введением нереплицируемого антигена, снижается концентрация и подвижность сперматозоидов, которая восстанавливается до контрольного уровня на стадии максимального антителообразования.
2. Активация специфического иммунитета нереплицируемым антигеном влияет на репродуктивную эффективность самцов мышей. Выраженность репродуктивных эффектов антигенной стимуляции самцов определяется сроком совместного содержания с самками.
3. Спаривание с иммунизированными самцами приводит к повышению уровня тестостерона в амниотической жидкости, снижению смертности новорожденных и снижению массы тела детенышей в момент завершения материнского вскармливания.

4. Иммунизация отцов отражается на профиле нейрометаболитов в головном мозге их потомков. В частности, в амигдале потомков иммунизированных самцов изменяется соотношение возбуждающих и тормозных нейромедиаторов в сторону возбуждающих по сравнению с контролем.

5. В условиях антигенной нагрузки, потомство иммунизированных отцов способно в равной степени поддерживать как иммунную, так и репродуктивную функции, тогда как у потомства контрольных отцов андрогенная функция гонад подавляется.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Результаты, полученные при исследовании последствий иммунизации самцов, расширяют понимание особенностей взаимодействий иммунной и репродуктивной систем в малоизученной области иммунно-физиологической регуляции мужской репродуктивной функции. Разработанный экспериментальный подход может быть использован в сельском хозяйстве при разработке способов регуляции фертильности и качества потомков сельскохозяйственных животных. Также полученные результаты указывают на репродуктивное значение иммунных реакций, которые имеют место не только при инфекциях, но и при профилактических вакцинациях. Эти знания могут быть полезны для разработки оптимальных протоколов проведения вакцинации как в медицине, так и в животноводстве. Результаты исследования используются в лекционном курсе «Модельные объекты генетики» для магистрантов Университета «Сириус» (г. Сочи).

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Активация специфических механизмов иммунной защиты, вызванная введением чужеродного антигена (иммуногенный белок KLH), усиливает репродуктивный выход антигенстимулированных самцов.

2. Антигенная стимуляция самцов до спаривания с самками влияет на показатели сперматозоидов (концентрация, подвижность) и состав семенной жидкости. Покрытие самок антигенстимулированными самцами снижает постнатальную смертность потомков, что указывает на более эффективное формирование гестационной доминанты у самок, покрытых антигенстимулированными самцами.

3. Покрытие самок антигенстимулированными самцами приводит к изменению гуморального окружения развивающихся плодов, в частности, к повышению уровня тестостерона в амниотической жидкости.

4. Отцовский опыт, обусловленный иммунизацией нереплицируемым антигеном (KLH), влияет на спектр и соотношение возбуждающих и тормозных нейромедиаторов в

амигдале их взрослых потомков, а также на их способность к поддержанию иммунной и репродуктивной функции.

### **Апробация результатов**

Материалы, положенные в основу диссертации, были представлены и обсуждены на Международной научной студенческой конференции «МНСК-2020» (Новосибирск, 2020), Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2020) и на XVI Международном Междисциплинарном Конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2020).

### **Публикации**

Основные результаты работы подробно изложены в семи научных статьях, опубликованных в российских и зарубежных журналах, входящих в международные базы цитирования (WoS, Scopus), а также в трёх тезисах международных научных конференций.

### **Объём и структура диссертации**

Диссертация включает введение, обзор литературы, разделы, описывающие материалы и методы исследований, результаты, обсуждение результатов, выводы, список сокращений и список цитируемой литературы. Работа изложена на 140 страницах, содержит 19 рисунков и 11 таблиц. Библиографический указатель включает 279 источников литературы.

### **Личный вклад автора**

Автором лично выполнены все экспериментальные исследования и статистическая обработка данных. Определение содержания нейрометаболитов методом МРТ спектроскопии выполнено совместно с к.б.н. А.В. Ромащенко.

### **Благодарности**

Автор выражает особую благодарность центру коллективного пользования «Центр генетических ресурсов лабораторных животных, сформированный на базе ЦКП SPF-виварий ИЦиГ СО РАН» за предоставление SPF-животных и доступ к оборудованию.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **Экспериментальные животные и экспериментальные группы**

Исследования были выполнены на мышах линий C57BL/6 и BALB/c SPF-статуса в возрасте 12 – 14 недель. Мышей содержали в контролируемой среде: искусственном фотопериоде 14С : 10Т, температуре 22 – 24 °С и влажности воздуха 40 – 50 %. В качестве подстилочного материала были использованы обеспыленные берёзовые опилки (ООО

«Альбион», г. Новосибирск). Пищу (SNIFF, Германия) и воду после автоклавирования (121 °С) давали без ограничений. Животных содержали в индивидуально вентилируемых клетках (OptiMice) разнополыми группами по 3 особи (1 самец и 2 самки) или одиночно. Исследования были выполнены с использованием ресурсов ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных, сформированный на базе ЦКП SPF-виварий ИЦиГ СО РАН».

Для индукции иммунного ответа был использован метод однократной внутрибрюшинной инъекции высокомолекулярного иммуногенного белка KLH (keyhole limpet hemocyanin) (MP biomedical, USA) в дозе 50 мкг/мышь. В качестве контроля использовался физиологический раствор в дозе 100 мкл/мышь.

#### **1. Исследование динамики иммунного ответа и параметров сперматозоидов**

Исследование выполнено на самцах инбредных линий C57BL/6 (n = 120 особей) и BALB/c (n = 80 особей) в возрасте 12 – 14 нед.

**Контроль** – C57BL/6 (n = 60) и BALB/c (n = 40).

**Иммунизация** – C57BL/6 (n = 60) и BALB/c (n = 40).

#### **2. Исследование эффектов иммунизации самцов на морфофизиологические характеристики потомков**

Исследование выполнено на самцах (n = 50 особей) и самках (n = 60 особей) C57BL/6 в возрасте 12 – 14 недель.

**Контроль** – 10 самцов – одиночное содержание; 15 самцов – ссаживание с самками

**Иммунизация** – 10 самцов – одиночное содержание; 15 самцов – ссаживание с самками.

#### **Динамика иммунного ответа и показатели сперматозоидов**

Динамику иммунного ответа и показатели сперматозоидов у мышей линий C57BL/6 и BALB/c исследовали после декапитации на 3, 9, 15 и 21 сутки после введения KLH или физиологического раствора. В образцах плазмы крови определяли анти-KLH IgG и уровень тестостерона. Показатели сперматозоидов (концентрация, подвижность, скорость и направление движения сперматозоидов, например, VAP, VSL), взятых из каудального отдела эпидидимиса, были исследованы при помощи автоматического анализатора спермы со встроенной оптической системой Mouse-Traxx (Hamilton Thorne, USA). В каждом образце было исследовано 5 полей при четырёхкратном увеличении.

#### **Спаривание, беременность и пренатальное развитие потомков**

На 9-й день после инъекций KLH или физиологического раствора к иммунизированным и контрольным самцам линии C57BL/6 подсаживали по 2 интактных самки и содержали их совместно в течение 6 дней. Каждое утро самки осматривались на

наличие вагинальной пробки. Другая часть иммунизированных и контрольных самцов содержалась одиночно (группа до спаривания). После декапитации собирали образцы плазмы для определения уровня тестостерона и анти-KLH IgG. Также собирали сперматозоиды из каудального отдела эпидидимисов для определения их параметров. В собранной семенной жидкости определяли показатели анти-KLH IgG и TNF $\alpha$ .

Самок с вагинальными пробками отсаживали в отдельные клетки. Одна часть самок была декапитирована на 16-е сутки беременности, другая часть самок родила и выкормила потомков. У беременных самок были извлечены и взвешены плоды и плаценты и взяты образцы плазмы крови и амниотической жидкости для определения уровня прогестерона, тестостерона и GM-CSF.

### **Постнатальное развитие и фенотипирование потомков**

Не позднее чем через сутки после родов и далее ежедневно в период выкармливания фиксировали число потомков в каждом помете. В возрасте 3-х недель потомков взвешивали и отсаживали от самок. В возрасте 12 – 14 недель самцы потомки были разделены на 2 группы для исследования спектра нейрометаболитов в амигдале и коре головного мозга и иммунной реакции на KLH. Спектр нейрометаболитов в амигдале и коре головного мозга исследовали при помощи метода прижизненной магнитно-резонансной спектроскопии с использованием горизонтальной томографии с магнитным полем 11,7 Тл (Bruker, Biospec 117/16 USR, Германия). Реакцию иммунной и репродуктивной функций на антигенный стимул исследовали на 9-е сутки после введения KLH или физиологического раствора. В возрасте 12 – 14 недель потомки были декапитированы и измерены массы тимуса, селезенки, семенников, семенных пузырей, препуциальных желез, эпидидимисов и взяты образцы плазмы крови для определения содержания анти-KLH IgG и тестостерона. В каудальном отделе эпидидимисов были исследованы показатели сперматозоидов.

### **Определение уровня иммуноглобулинов, гормонов и цитокинов**

Уровень анти-KLH IgG определяли в плазме крови и семенной жидкости методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Для определения уровней прогестерона в плазме крови беременных самок и тестостерона в плазме крови самцов и амниотической жидкости использовали наборы «Прогестерон-ИФА» (ХЕМА, Россия) и «Тестостерон-ИФА» (ХЕМА, Россия). Уровень цитокинов, TNF $\alpha$  и GM-CSF определяли с помощью наборов «Mouse TNF alpha ELISA kit» (eBioscience, USA) и «Mouse GM-CSF ELISA Set» (BD Bioscience, USA).



## Статистическая обработка результатов

При статистической обработке данных использовали: критерий Колмогорова – Смирнова, параметрический и непараметрический (тест Фридмана) двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA), ковариационный анализ (ANCOVA), Student *t*-test, непараметрический критерий Манна-Уитни, коэффициенты корреляции Пирсона (*r*), критерий хи-квадрат ( $\chi^2$ ). Для анализа данных использовали программу «Statistica 6.0».

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Динамика адаптивного иммунного ответа и показателей сперматозоидов у самцов мышей линий C57BL/6 и BALB/c

На уровень специфических анти-KLH IgG статистически значимо влияли: время после инъекции KLH ( $F_{3,90} = 23,3$ ;  $p < 0,001$ ), линия ( $F_{1,90} = 7,3$ ;  $p = 0,008$ ), и взаимодействие этих факторов ( $F_{1,90} = 3,4$ ;  $p = 0,02$ ) (рисунок 1). У мышей линии C57BL/6 уровень анти-KLH IgG возрастал и выходил на плато через 9 дней после иммунизации. У мышей линии BALB/c имел место монотонный рост концентрации IgG, которая достигала максимума на 21-е сутки после введения KLH. Концентрация тестостерона в плазме крови была практически одинаковой у исследуемых линий мышей (эффект линии –  $F_{1,101} = 0,69$ ;  $p = 0,41$ ) и существенно не изменялась после иммунизации (эффект KLH –  $F_{1,101} = 3,79$ ,  $p = 0,13$ ).

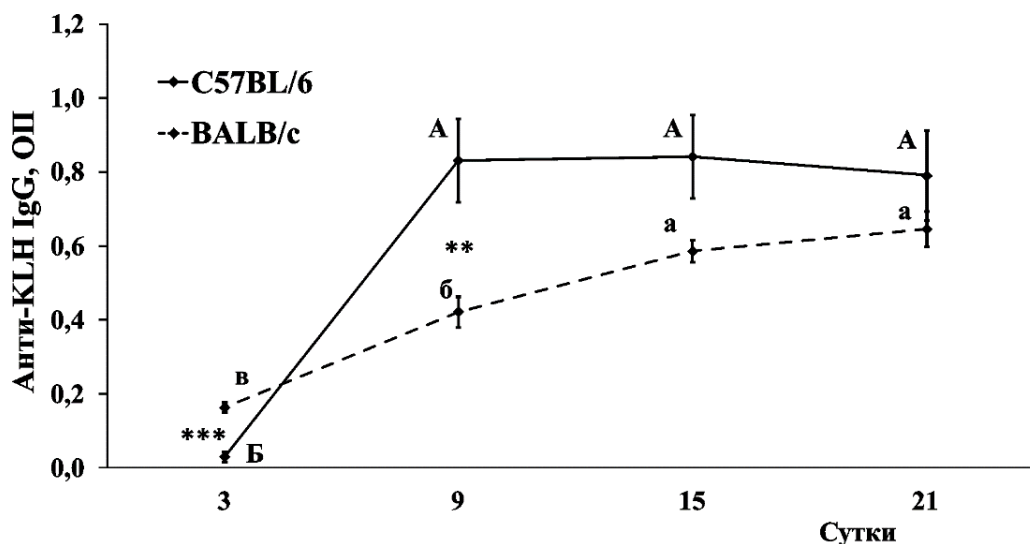


Рисунок 1. Содержание специфических анти-KLH IgG в образцах плазмы самцов исследуемых линий мышей в разные сроки после введения KLH.

Достоверность различий (Student *t*-test) между линиями C57BL/6 и BALB/c: \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ .

Разные буквы А, Б – C57BL/6 и а, б, в – BALB/c достоверно различающиеся значения для каждой линии (LSD тест  $p < 0,05$ ).

Число сперматозоидов и их подвижность были существенно выше у самцов линии C57BL/6 по сравнению с линией BALB/c. У самцов обеих линий отмечено снижение концентрации и подвижности сперматозоидов только в образцах, взятых через 3 дня после иммунизации (рисунок 2). Таким образом, самцы линии C57BL/6 отличаются от BALB/c более выраженной иммунной реакцией на антигенную стимуляцию KLH, которая сочетается с одинаковым снижением концентрации и доли подвижных сперматозоидов только на самой ранней стадии антителообразования (3-и сутки). Это определило выбор линии C57BL/6 для проведения дальнейших исследований.

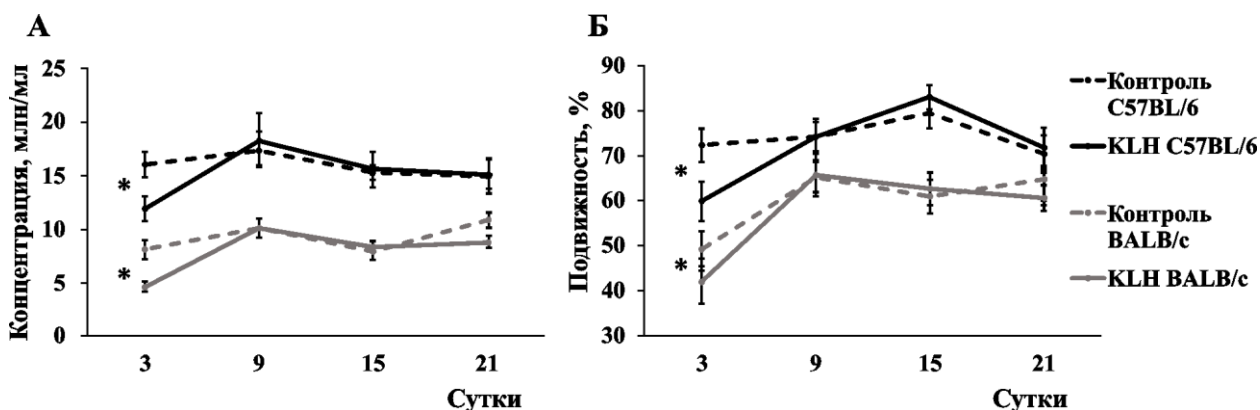


Рисунок 2. Динамика показателей сперматозоидов мышей линий C57BL/6 и BALB/c после введения KLH. А – концентрация; Б – подвижность; \* –  $p < 0,05$  (Student t-test).

### Влияние иммунизации самцов на фертильную способность, беременность и пренатальное развитие потомков

У иммунизированных самцов C57BL/6 уровень анти-KLH IgG в плазме крови и семенной жидкости после спаривания не отличался от такового у одиночно содержащихся особей (рисунок 3). Концентрация анти-KLH IgG в семенной жидкости коррелировала с уровнем анти-KLH IgG в плазме крови этих же особей ( $r = 0,54$ ,  $p < 0,005$ ,  $n = 25$ ).

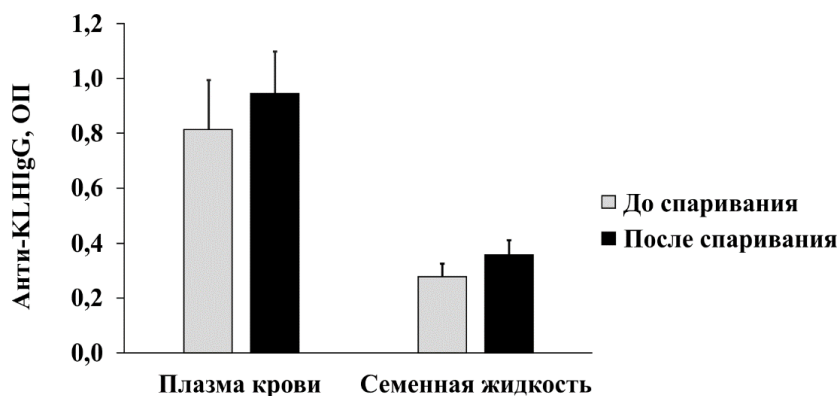


Рисунок 3. Концентрация анти-KLH IgG в плазме крови и семенной жидкости до и после спаривания у мышей линии C57BL/6.

Непараметрический двухфакторный анализ ANOVA выявил статистически значимое влияние факторов иммунизации ( $F_{1,46} = 4,21, p = 0,046$ ), спаривания ( $F_{1,46} = 5,20, p = 0,027$ ) и взаимодействия между этими факторами ( $F_{1,46} = 13,30, p < 0,001$ ) на уровень тестостерона в плазме крови (рисунок 4). Если до спаривания уровень тестостерона в плазме крови иммунизированных и контрольных самцов не различался, то после спариваний иммунизированные самцы показали более высокий уровень тестостерона в плазме крови по сравнению с контрольными самцами. При этом у иммунизированных самцов после спариваний уровень анти-KLH IgG в семенной жидкости положительно коррелировал с уровнем тестостерона в плазме крови ( $r = 0,56, p = 0,027, n = 15$ ).

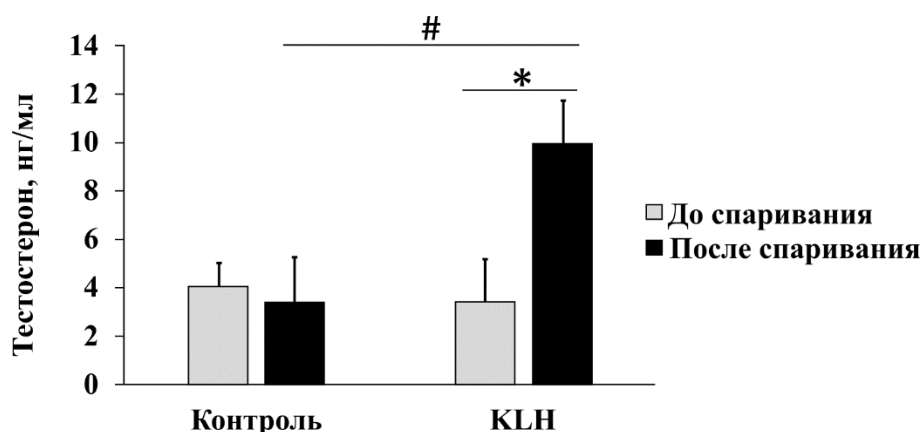


Рисунок 4. Уровень тестостерона в плазме крови у контрольных и иммунизированных самцов мышей линии C57BL/6 до и после спаривания. # –  $p < 0,02$ ; \* –  $p = 0,037$  (Mann–Whitney U-test).

Иммунизация самцов не влияла на их фертильную способность. За период содержания самок с самцами самцы контрольной группы совершили 20 ( $70,0 \pm 8,4 \%$ ), а в группе иммунизированных 24 ( $83,3 \pm 5,0 \%$ ) фертильных спариваний. В то время как показатель кумулятивного роста числа потомков (плоды и новорожденные), рассчитанный как процент потомков, зачатых за первые два дня содержания самок с самцами, значительно различался между контрольной и экспериментальной группами (рисунок 5А). В частности, доля зачатых потомков в контрольной группе составила  $55,4 \pm 4,1 \%$ , а в экспериментальной группе – только  $35,8 \pm 3,6 \%$  ( $t = 3,6, df = 322, p < 0,001, Student t$ -test). В последующие дни (3 – 6) эти пропорции стали противоположными:  $44,6 \pm 4,1 \%$  в контрольной группе и  $64,2 \pm 3,6 \%$  в группе иммунизированных самцов ( $t = 3,6, df = 322, p < 0,001, Student t$ -test) (рисунок 5А). С точки зрения абсолютных чисел количество потомков, произведенных в первые два дня, достоверно не различалось у контрольных и антигенстимулированных самцов (рисунок 5Б). Но при этом в период с третьего по шестой день содержания с самками иммунизированные самцы зачали существенно больше потомства, чем контрольные самцы (рисунок 5В).

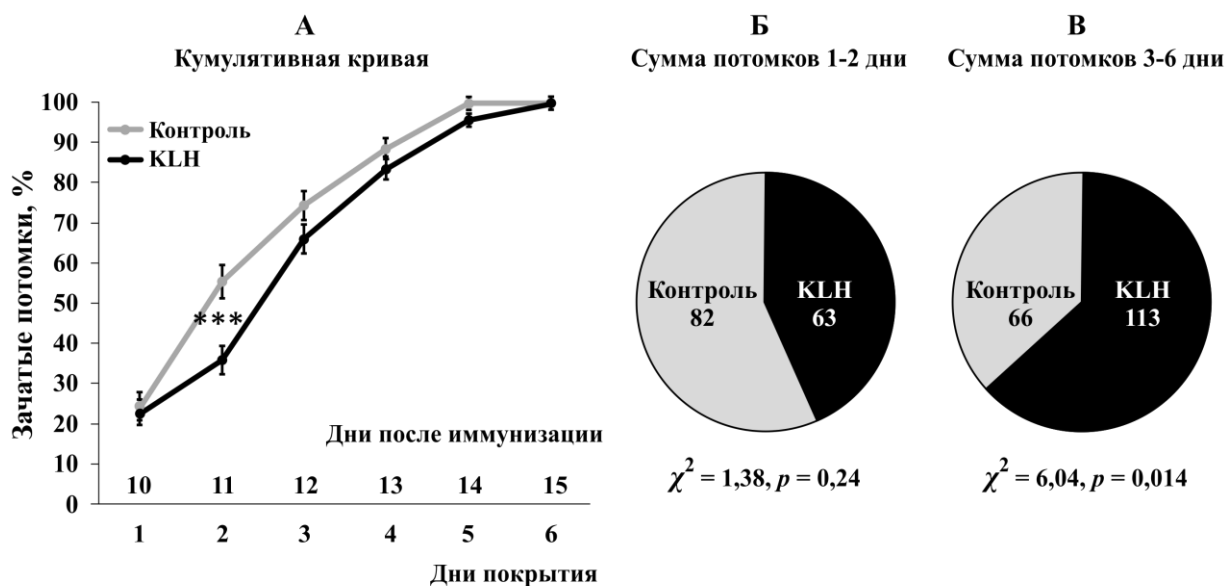


Рисунок 5. Репродуктивный успех контрольных и иммунизированных самцов мышей линии C57BL/6 при спаривании с интактными самками. \*\*\* –  $p < 0,001$  (Student t-test).

А – кумулятивная кривая, процент потомков контрольных и иммунизированных самцов, зачатых в разное время от момента ссаживания самками. Б и В – сумма живых плодов, зачатых контрольными и иммунизированными самцами.

Исследование показателей пренатального развития потомков показало: на 16-е сутки беременности среднее число живых плодов, вынашиваемых одной самкой, составило в контрольной группе  $7,78 \pm 0,36$  и в экспериментальной группе  $7,92 \pm 0,26$ . Такие показатели эмбрионального развития как масса плодов ( $F_{1,177} = 0,387, p = 0,53$ ), масса плацент ( $F_{1,177} = 0,557, p = 0,45$ ) и фетоплацентарный индекс ( $F_{1,177} = 0,502, p = 0,47$ ), достоверно не различались между исследованными группами.

Концентрации прогестерона и тестостерона в плазме крови были одинаковыми в группах беременных самок, вынашивающих потомков иммунизированных и контрольных самцов. Уровни прогестерона и GM-CSF в амниотической жидкости (рисунок 6) также между группами значимо не различались. В то же время уровень амниотического тестостерона был выше у самок, вынашивающих потомков антигенстимулированных самцов (рисунок 6).

Эти результаты показывают, что спаривание самок с иммунизированными особями мужского пола в период максимального антителообразования может увеличивать фертильную способность вынашивающих их потомков самок, а также влиять на уровень содержащегося в амниотической жидкости тестостерона, который, как известно, играет важную роль в формировании метаболического профиля структур головного мозга (Hu et al., 2015).

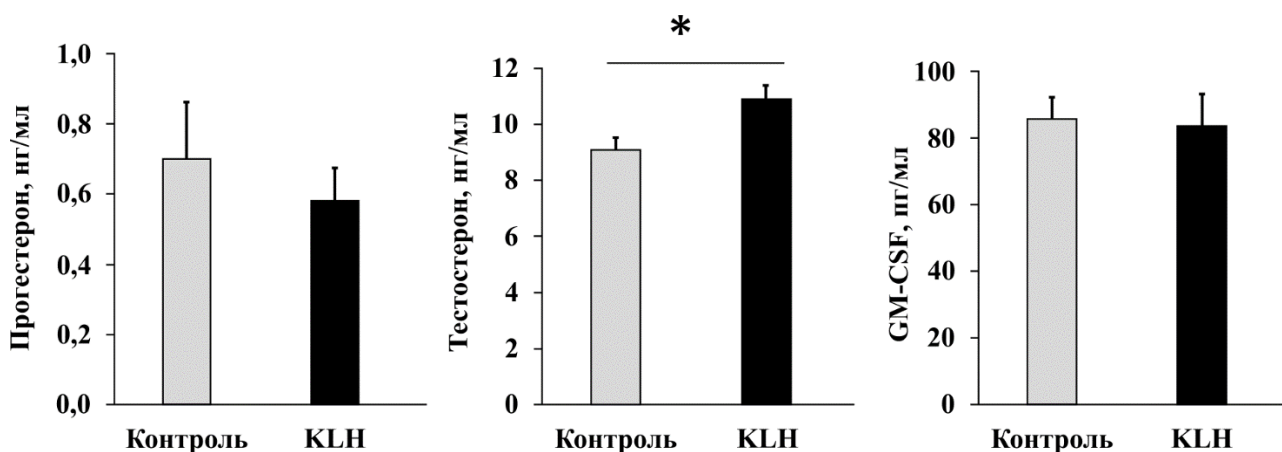


Рисунок 6. Концентрация прогестерона, тестостерона и GM-CSF в амниотической жидкости на 16-й день беременности у самок, покрытых контрольными или иммунизированными самцами. \* –  $p = 0,035$  (Mann–Whitney U-test).

### Морфофизиологические характеристики потомков в постнатальном онтогенезе

Среднее число новорожденных было приблизительно одинаковым у самок, покрытых контрольными ( $7,80 \pm 0,55$ ) и иммунизированными ( $7,44 \pm 0,34$ ) самцами (рисунок 7).

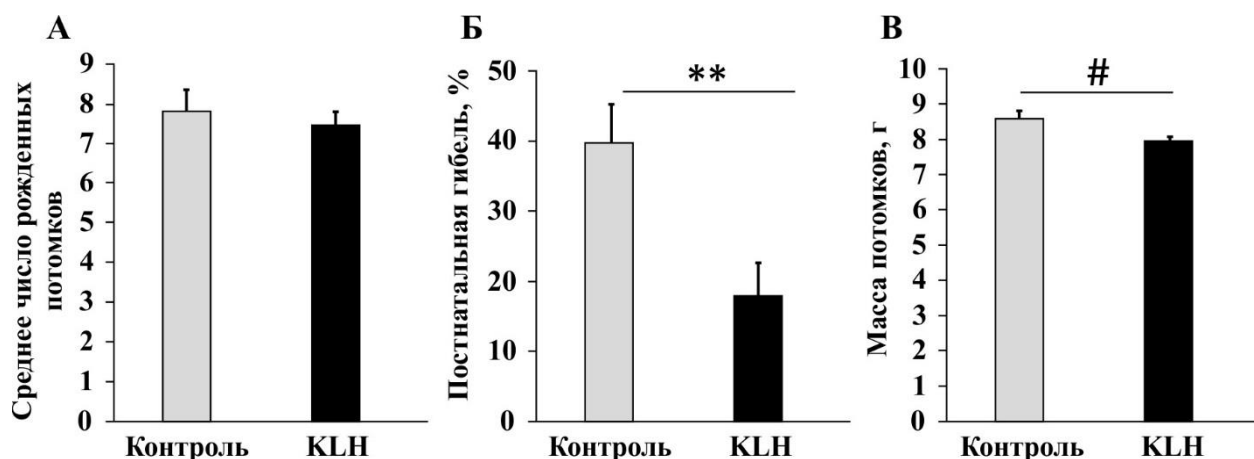


Рисунок 7. Размер помета, постнатальная гибель и масса потомков. \*\* –  $p < 0,01$  (Student t-test); # –  $p < 0,001$  (ANCOVA с группой и полом в качестве факторов и числом потомков в качестве ковариаты,  $F_{1,97} = 38,88$ ,  $p < 0,001$ ).

Процент потомков, погибших за период выкармливания (рисунок 7 Б), был значительно выше у самок, покрытых контрольными самцами ( $39,74 \pm 5,54$  %), по сравнению с наблюдаемыми показателями у самок, спаренных с иммунизированными самцами ( $17,90 \pm 4,68$  %) ( $p < 0,01$ , Student t-test). Эти различия обусловлены сочетанием двух эффектов: отказом самок от выкармливания (3 самки из контрольной группы и 1 самка из группы KLH) и гибелью новорожденных, которая составила  $16,1 \pm 4,9$  % в контрольной группе и  $8,1 \pm 3,6$  % в группе KLH. Размер помета при достижении потомками 3 недельного возраста также не различался и составлял в контрольной группе

6,71 ± 0,86 и группе КЛН 6,88 ± 0,35 соответственно. Масса тела потомков при отъеме от матерей была выше в контрольной группе по сравнению с группой КЛН (рисунок 7 В).

Анализ спектра нейрометаболитов амигдалы показал, что самцы, потомки иммунизированных отцов, в возрасте 12 – 14 недель отличались от потомков контрольной группы более низкими значениями уровня гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), аланина, креатина и фосфокреатина (рисунок 8). Напротив, уровни глутамата и глутамина в амигдале были значительно выше у потомков иммунизированных отцов. Таким образом, у потомков иммунизированных самцов увеличилось содержание возбуждающих нейромедиаторов (глутамата и глутамина) и снизилось содержание тормозных (ГАМК) нейромедиаторов.

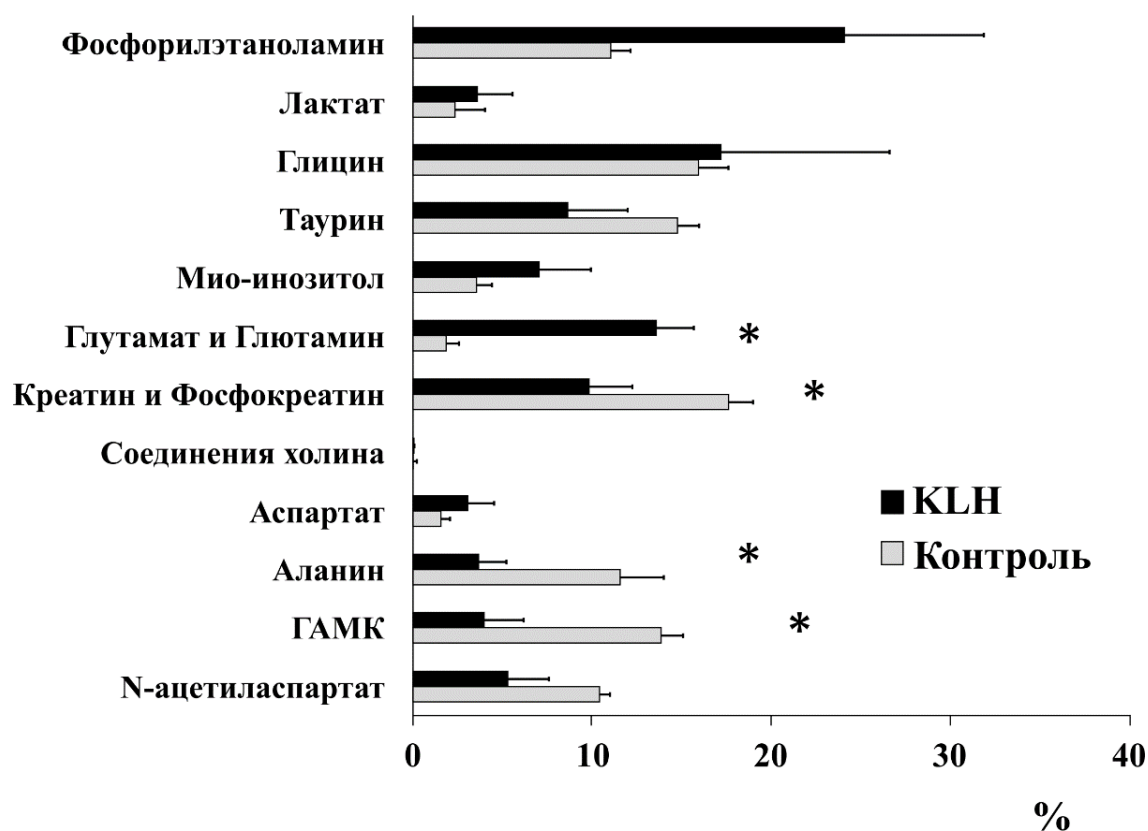


Рисунок 8. Содержание нейрометаболитов в амигдале самцов потомков контрольных и иммунизированных отцов. \* –  $p < 0,05$  (Student t-test).

Профиль нейрометаболитов в коре головного мозга был одинаковым у потомков из обеих групп (рисунок 9).

Результаты исследования реагирования иммунной и репродуктивной систем потомков на введение КЛН показали, что уровень антителообразования в группах потомков контрольных и иммунизированных отцов на 9-е сутки после инъекции КЛН значимо не различался (таблица 1).

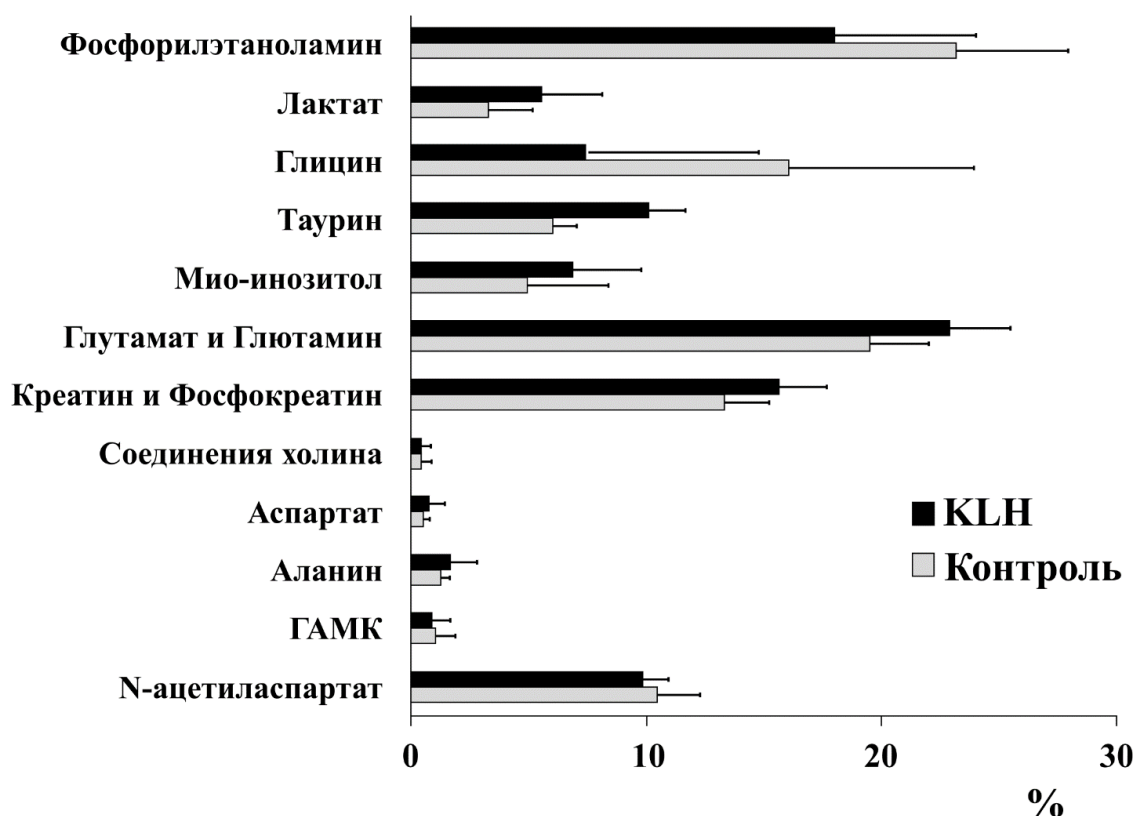


Рисунок 9. Содержание нейрометаболитов в коре головного мозга самцов потомков контрольных и иммунизированных отцов.

Таблица 1. Уровень антителообразования у самцов, потомков контрольных и иммунизированных отцов на 9 сутки после введения KLH

Признаки	Потомки	
	Контроль (n = 7) Mean ± SE	KLH (n = 7) Mean ± SE
Анти-KLH IgG, ОП	0,736 ± 0,17	0,736 ± 0,06

Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) также не выявил значимого влияния иммунизации отцов ( $F_{1,24} = 0,27, p = 0,59$ ) и иммунизации потомков ( $F_{1,24} = 0,29, p = 0,33$ ) на массу тела. Масса тела в возрасте 12 – 14 недель была  $23,4 \pm 0,5$  г в контрольной группе (n = 14) и  $23,1 \pm 0,5$  г в группе KLH (n = 14). При этом фактор иммунизации отцов влиял на массовые индексы тимуса ( $F_{1,24} = 10,52, p = 0,004$ ) и селезенки ( $F_{1,24} = 11,038, p = 0,003$ ) (рисунок 10). Взрослые самцы, потомки иммунизированных отцов, имели более высокие индексы масс тимуса и селезенки по сравнению с потомками контрольных отцов.

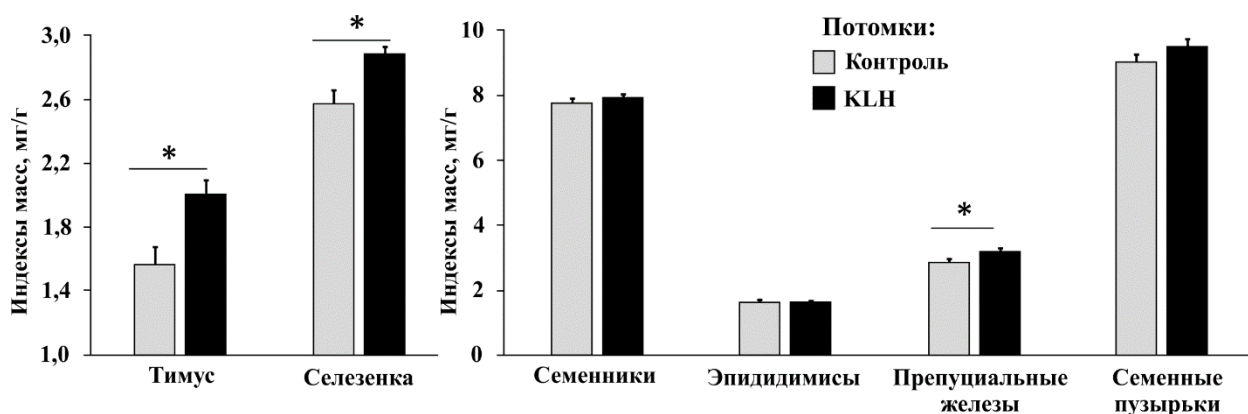


Рисунок 10. Индексы масс иммунных и репродуктивных органов взрослых самцов потомков контрольных и иммунизированных отцов. \* –  $p < 0,01$  (Student *t*-test).

Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) показал существенное влияние иммунизации отцов в группе потомков (контрольные/KLH отцы) только на индексы масс препуциальных желез  $F_{1,24} = 4,335$ ,  $p = 0,048$ , которые у потомков иммунизированных отцов имели большую массу по сравнению с потомками контрольных отцов (Student *t*-test,  $df = 26$ ,  $p < 0,05$ ) (рисунок 10). На вариации уровня тестостерона в плазме крови после введения потомкам контрольных и иммунизированных самцов физиологического раствора или KLH значимо влиял фактор группы потомков (контроль/KLH) ( $F_{1,24} = 7,725$ ,  $p = 0,010$ ), а также взаимодействие факторов «группа потомков» – «иммунизация» ( $F_{1,24} = 6,116$ ,  $p = 0,021$ ). Иммунизация потомков контрольных отцов привела к значительному снижению концентрации тестостерона ( $p = 0,04$ , Mann–Whitney U-test), в то время как после иммунизации потомков иммунизированных отцов наблюдалась тенденция к ее увеличению (рисунок 11). В целом после иммунизации уровень тестостерона в плазме крови у самцов потомков иммунизированных отцов был выше, чем у потомков контрольных отцов.

Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) показал статистическую значимость влияния взаимодействия факторов (группа потомков и иммунизация) на VAP (скорость равномерного движения) ( $F_{1,24} = 4,08$ ,  $p < 0,05$ ) и VSL (скорость прямолинейного движения) ( $F_{1,24} = 4,07$ ,  $p < 0,05$ ) сперматозоидов. Анализ корреляций между уровнем тестостерона в плазме крови и характеристиками сперматозоидов подтвердил зависимость показателей концентрации и скоростных VAP и VSL характеристик сперматозоидов от уровня тестостерона в крови ( $r = 0,38$ ,  $p = 0,042$ ;  $r = 0,5$ ,  $p = 0,006$ ). Эти результаты свидетельствуют, что антигенная стимуляция потомков иммунизированных самцов не влияла на морфологию и концентрацию сперматозоидов у потомков, но модулировала скоростные характеристики сперматозоидов на 9-ый день после введения KLH этим потомкам.



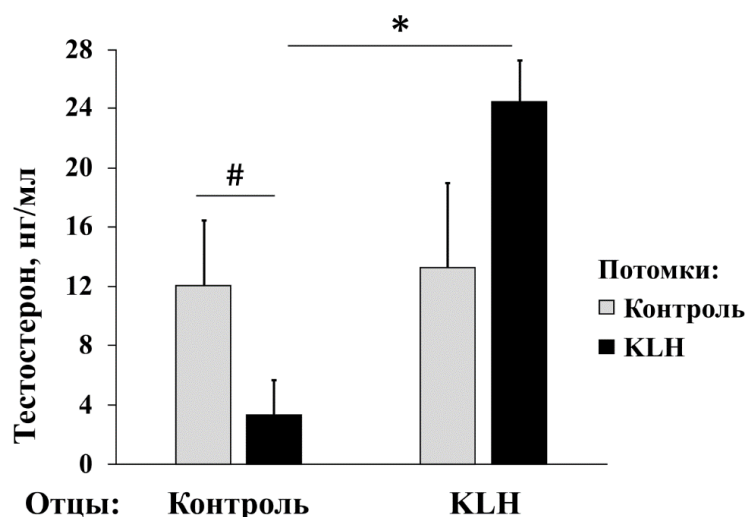


Рисунок 11. Уровень тестостерона в плазме крови самцов потомков контрольных и иммунизированных отцов. # –  $p = 0,04$ , \* –  $p < 0,05$  (Mann–Whitney U-test).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на межлинейные различия параметров сперматозоидов и динамики иммунного ответа на введение KLH, антигенная стимуляция C57BL/6 и BALB/c вызывала однонаправленное значимое снижение концентрации и подвижности сперматозоидов в каудальном отделе эпидидимиса только на 3-и сутки после антигенной стимуляции, то есть на самой ранней стадии антителообразования. Ранее сообщалось, что в первые трое суток после введения KLH активируются Т-лимфоциты и растет концентрация в крови ряда провоспалительных цитокинов (Kojima et al., 2013; Zhong et al., 2016), которые негативно влияют на количество сперматозоидов в каудальном отделе эпидидимисов самцов мышей и крыс (Abu et al., 2008; Collodel et al., 2015; Wang et al., 2019).

За первые 2 дня спаривания (9 – 10 дни после иммунизации) иммунизированные самцы произвели меньше потомков по сравнению с контрольными самцами, но в последующие дни они превосходили показатели последних. Снижение фертильной способности иммунизированных KLH самцов не может быть объяснено негативным влиянием активации провоспалительного ответа на параметры сперматозоидов, так как результаты нашего исследования показали, что снижение концентрации и подвижности сперматозоидов наблюдается только на 3-й день после введения KLH. Одной из причин наблюдаемого снижения фертильности иммунизированных самцов может быть снижение их запаховой привлекательности. Ранее было показано, что у иммунизированных KLH самцов снижение фертильной способности на 4 – 7-ые сутки после иммунизации сочеталось со снижением их запаховой привлекательности для самок (Moshkin et al., 2010; Gerlinskaya et al., 2012). Следует отметить, что выявленное в нашем исследовании увеличение репродуктивной эффективности иммунизированных самцов на более поздних

сроках содержания самок с самцами происходило на фоне значимого увеличения уровня тестостерона в плазме крови иммунизированных самцов, а уровень тестостерона у иммунизированных самцов положительно коррелировал с концентрацией анти-KLN IgG в семенной жидкости. Наличие гематотестикулярного и гематоэпидидимального барьеров не обеспечивает абсолютную непроницаемость для антигенов и IgG (Yan et al., 2016). По нашим данным показатели анти-KLN IgG в семенной жидкости положительно коррелировали с анти-KLN IgG в плазме крови, что совпадает с данными других авторов (Pillay et al., 2019), и также положительно коррелировали с числом произведенных потомков.

Композиция иммунных факторов семенной жидкости обуславливает ее множественное влияние на иммунный и эндокринный состав внутренней среды женского репродуктивного тракта (Robertson et al., 2018; Maslennikova et al., 2019). В нашем исследовании спаривание самок с иммунизированными самцами не влияло на показатели плодовитости и массу потомков, но при этом смертность новорожденных была ниже среди потомков иммунизированных самцов. Следует отметить, что эмбриональное развитие потомков контрольных и иммунизированных самцов проходило в разных условиях гуморального окружения. Уровень тестостерона в амниотической жидкости самок, вынашивающих потомков иммунизированных самцов, был значимо выше, чем при вынашивании потомков контрольных самцов. Исходя из роли материнского тестостерона (Hu et al., 2015) и иммунных факторов семенной жидкости (Schjenken, Robertson, 2015) в формировании фенотипа взрослых потомков можно предположить, что основные эффекты иммунизации отцов могут оказывать модулирующее влияние на функции головного мозга и иммунитет взрослых потомков.

Результаты исследования нейрометаболического спектра структур головного мозга взрослых потомков показали значимое изменение баланса нейромедиаторов и преобладание возбуждающих (глутамат + глутамин) нейромедиаторов над тормозными (ГАМК) у потомков иммунизированных самцов. Наблюдаемый дисбаланс возбуждающих и тормозных нейромедиаторов может быть объяснен влиянием амниотического тестостерона. Роль материнского тестостерона в его влиянии на спектр нейрометаболитов, и, как следствие, на риск возникновения болезней, ассоциированных с мозгом, показано как в экспериментальных, так и в клинических исследованиях (Kerchner et al., 1995; Lombardo et al., 2012; Watanabe, Yamamoto, 2015; Heany et al., 2016; Dulka et al., 2018).

Отцовское влияние на половую функцию потомков было наиболее очевидным после антигенной стимуляции потомков. Введение KLN сопровождалось снижением уровня

тестостерона в плазме крови у потомков контрольных отцов, тогда как у потомков отцов, стимулированных антигеном, наблюдалась противоположная тенденция. Различия в тестостероновом ответе на антигенную стимуляцию в исследованных группах потомков были параллельны изменениям скоростных характеристик и траекторий движения сперматозоидов. Эти данные соответствуют наблюдениям других исследователей (Guvvala et al., 2016; Dardmeh et al., 2017).

Изменения в фенотипе потомков иммунизированных отцов можно объяснить либо эпигенетической модификацией мужских гамет, либо передачей отцовских сигналов через семенную жидкость, либо и тем и другим. Действительно, время, когда иммунизированные самцы в данном исследовании спаривались с самками, совпадает со временем выхода сперматозоидов в галлерову сеть семенников, где уже появляются специфические IgG и начинается процесс созревания сперматозоидов и массовая замена гистоновых белков на протамины (Khil et al., 2004; Knee et al., 2005), и влияние на этот процесс могут оказывать иммунные факторы галлеровой сети семенников отца (Hazzoufi et al., 2000; Morinière et al., 2009; Shirakata et al., 2014). Аналогично клеточный и гуморальный состав семенной жидкости, который непосредственно модулирует женский репродуктивный тракт, влияет на успех беременности (Dietz et al., 2011; Bromfield et al., 2014; Collodel et al., 2015; Robertson, Sharkey, 2016). Все эти данные подтверждают ключевую роль семенной жидкости в передаче отцовского опыта следующему поколению, хотя этот факт не исключает влияния эпигенетических сигналов отца.

Суммируя полученные результаты, можно заключить, что отцовский опыт, обусловленный активацией системного иммунитета нереплицируемым антигеном KLN, влияет на фертильную способность. Вопреки существующим представлениям о негативном влиянии активации мужского иммунитета на успех беременности, наши результаты показывают, что спаривание с иммунизированными KLN самцами не только не нарушает беременность, но и способствует формированию гестационной доминанты у самок, вынашивающих их потомков. Наблюдаемые нами различия условий внутриутробного развития, обусловленные повышенным уровнем тестостерона в амниотической жидкости, оказывали долговременное модулирующее влияние на фенотип их взрослых потомков. Влияние отцовских факторов проявлялось в амигдале в виде измененного спектра нейрометаболитов и сдвига в соотношении возбуждающие / тормозные нейромедиаторы в сторону увеличения возбуждающих у потомков иммунизированных самцов. Кроме того, потомство иммунизированных отцов продемонстрировало способность в равной степени поддерживать как иммунные, так и

андрогензависимые признаки, в то время как потомки контрольных отцов снижали свои репродуктивные возможности в ответ на антигенную стимуляцию.

## ВЫВОДЫ

1. Системная активация специфического иммунитета самцов нереплицируемым антигеном оказывает влияние на качественные и количественные характеристики сперматозоидов, а степень этого влияния зависит от фазы иммунного ответа.
2. Антигенная иммуностимуляция самцов влияет на половые взаимодействия с самками и сдвигает фертильные покрытия на более поздние сроки после посадки самок, а в период максимального антителообразования изменяется состав семенной жидкости, в которой обнаруживаются анти-KLH IgG.
3. В период беременности иммунный статус покрывших самок самцов влияет только на уровень амниотического тестостерона и его значения значимо выше в амниотической жидкости самок, вынашивающих потомков иммунизированных самцов.
4. Спаривание самок с иммунизированными самцами не влияет на размер помёта, но снижает смертность потомков в подсосный период и массу тела потомков в возрасте 3-х недель.
5. Иммунизация отцов оказывает модулирующее влияние на фенотип сыновей, потомков первого поколения. Наши результаты показали значимое влияние иммунного статуса отцов на профиль нейрометаболитов в амигдале и значительный сдвиг в соотношении тормозных (ГАМК) и возбуждающих (глутамат и глутамин) нейромедиаторов.
6. Самцы, потомки иммунизированных и контрольных отцов, демонстрируют разнонаправленный тестостероновый ответ на иммунизацию KLH, который сочетается с соответствующими изменениями скоростных характеристик сперматозоидов.
7. Самцы, потомки иммунизированных отцов, способны в равной степени поддерживать как иммунную, так и репродуктивную функции под давлением новых антигенов, в то время как у потомства контрольных отцов в этих условиях подавляется андрогенная функция гонад.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. Kontsevaya G. V., Gerlinskaya L. A., Moshkin Y. M., **Anisimova M. V.**, Stanova A. K., Babochkina T. I., Moshkin M. P. The Effects of Sperm and Seminal Fluid of Immunized Male Mice on In Vitro Fertilization and Surrogate Mother–Embryo Interaction //International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – V. 22. – №. 19. – P. 10650. **Q1**, doi.org/10.3390/ijms221910650;

2. **Анисимова М. В.**, Гон Я., Юдин Н. С., Мошкин Ю. М., Герлинская Л. А. Метаболический фенотип взрослых потомков мышей, полученных при разных вариантах эмбриональных пересадок // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2020. – Т. 24. – №. 7. – С. 761-769 doi: 10.18699/VJ20.671;
3. Gerlinskaya L. A., **Anisimova M. V.**, Kontsevaya G. V., Maslennikova S. O., Romashchenko A. V., Gong Y. L., Moshkin Y. M, Moshkin M. P. Mating with immunized male mice affects the phenotype of adult progeny // *Reproduction*. – 2020. – V. 160. – №. 1. – P. 117-127. **Q1**, doi.org/10.1530/REP-19-0360;
4. Gerlinskaya L. A., Litvinova E. A., Kontsevaya G. V., Feofanova N. A., Achasova K. M., **Anisimova M. V.**, Maslennikova S. O., Zolotykh M. A., Moshkin Y. M., Moshkin M. P. Phenotypic variations in transferred progeny due to genotype of surrogate mother // *Mol Hum Reproduction: Basic science of reproductive medicine*. – 2019. – V. 25. – №. 2. – P. 88-99. **Q1**, doi.org/10.1093/molehr/gay052;
5. Maslennikova S. O., Gerlinskaya L. A., Kontsevaya G. V., **Anisimova M. V.**, Nedospasov S. A., Feofanova N. A., Moshkin M. P., Moshkin Y. M. TNF $\alpha$  is responsible for the canonical offspring number-size trade-off // *Scientific reports*. – 2019. – V. 9. – №. 1. – P. 1-8. **Q1**, doi.org/10.1038/s41598-019-38844-9;
6. Gerlinskaya L. A., Maslennikova S. O., **Anisimova M. V.**, Feofanova N. A., Zavialov E. L., Kontsevaya G. V., Moshkin Y. M., Moshkin M. P. Modulation of embryonic development due to mating with immunized males // *Reproduction, Fertility and Development*. – 2017. – V. 29. – №. 3. – P. 565-574. **Q2**, doi.org/10.1071/RD15173;
7. Масленникова С. О., Концевая Г. В., Золотых М. А., **Анисимова М. В.**, Феофанова Н. А., Мошкин М. П., Недоспасов С. А., Герлинская Л. А. Репродуктивные эффекты нокаута гена фактора некроза опухолей (TNF) у мышей // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т. 19. – №. 4. – С. 404-409. doi.org/10.18699/VJ15.052.