

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И  
ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»**

*На правах рукописи*

Анисимова Маргарита Владимировна

**Влияние антигенной стимуляции самцов мышей  
на их репродуктивную эффективность и  
морфофизиологические характеристики потомков**

03.03.01 - физиология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

На соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д.б.н. Л.А. Герлинская

**Новосибирск, 2021**

## Оглавление

Введение.....	5
I. Обзор литературы .....	15
1.1. Размножение в условиях паразитарного пресса .....	15
1.2. Иммуно-эндокринная регуляция репродуктивной функции самцов	19
1.2.1. Иммуно-эндокринная регуляция функции семенников .....	20
1.2.1.1. Иммунная регуляция .....	20
1.2.1.2. Гормональная регуляция.....	22
1.2.2. Сперматогенез и гематотестикулярный барьер.....	23
1.2.3. Иммунная и гормональная регуляция гематотестикулярного барьера... ..	25
1.2.4. Иммунные факторы в регуляции сперматогенеза в семенниках.....	28
1.2.5. Иммунитет эпидидимиса .....	31
1.3. Влияние отцовских факторов на успех беременности.....	34
1.3.1. Посткопуляторные отцовские эффекты .....	34
1.3.2. Влияние отцовских факторов на эмбриональное развитие .....	38
1.3.3. Влияние отцовских факторов на фенотип потомков .....	41
II. Материалы и методы.....	45
2.1. Животные и условия содержания.....	45
2.2. Экспериментальные исследования .....	45
2.2.1. Влияние антигенной стимуляции мышей разных линий на характеристики сперматозоидов .....	45
2.2.2. Исследование влияния иммунизации самцов линии C57BL/6 на репродуктивный успех и беременность .....	47
2.2.3. Исследование влияния иммунизации отцов на фенотип взрослых потомков .....	48
2.3. Методы .....	49
2.3.1. Магнитно-резонансная спектроскопия.....	49
2.3.2. Иммунизация взрослых потомков .....	51

2.3.3. Определение специфических к гемоцианину иммуноглобулинов IgG.....	51
2.3.4. Исследование сперматозоидов.....	52
2.3.5. Иммуноферментный анализ гормонов.....	53
2.3.6. Определение цитокинов ELISA.....	53
2.3.7. Статистическая обработка данных.....	54
III. Результаты.....	56
3.1. Влияние антигенной стимуляции на характеристики сперматозоидов мышей разных линий.....	56
3.1.1. Динамика адаптивного иммунного ответа самцов линий C57BL/6 и BALB/c на введение KLH.....	56
3.1.2. Параметры сперматозоидов в динамике иммунного ответа самцов линии C57BL/6 и BALB/c.....	58
3.2. Исследование влияния иммунизации самцов линии C57BL/6 на репродуктивный успех и беременность.....	64
3.2.1. Уровень Анти-KLH IgG и тестостерона у самцов линии C57BL/6.....	64
3.2.2. Влияние иммунизации самцов линии C57BL/6 на фертильную способность, беременность и пренатальное развитие потомков.....	67
3.2. Влияние иммунизации самцов линии C57BL/6 на постнатальное развитие и фенотип взрослых потомков.....	72
3.3.1. Влияние иммунизации самцов линии C57BL/6 на постнатальное развитие потомков.....	72
3.3. Влияние иммунизации самцов линии C57BL/6 на фенотип взрослых потомков.....	75
3.4.1. Спектры нейрометаболитов в амигдале и коре головного мозга у самцов потомков контрольных и иммунизированных отцов.....	75
3.4.2. Иммунитет самцов, потомков контрольных и иммунизированных отцов.....	78

3.4.3. Влияние иммунизации потомков контрольных и иммунизированных самцов на уровень тестостерона, массы андрогензависимых органов и характеристики сперматозоидов .....	81
IV. Обсуждение .....	90
Заключение .....	100
Выводы .....	102
Список сокращений .....	104
Список литературы .....	106

## Введение

### Актуальность

Согласно теории жизненных циклов, популяции хозяев могут отвечать на давление паразитов более интенсивным, в том числе и зависящим от возраста, размножением (Stearns, 1992; McNamara, Houston 1996; Luu, Tate, 2017). Возможность такой адаптивной стратегии подтверждают демографические исследования, показывающие увеличение воспроизводства людей и животных, обитающих на территориях с высоким видовым разнообразием паразитов (Guegan et al., 2001; Shaner et al., 2017). Эффективное размножение в этих условиях предполагает сохранение репродуктивного потенциала животных на фоне стимуляции механизмов врожденного и приобретённого иммунитета. Репродуктивную значимость иммунных ответов на антигенные стимулы, в том числе и обусловленные паразитами, наиболее убедительно доказывают эксперименты с введением нереплицируемых антигенов, которые, не будучи возбудителями болезней, запускают весь комплекс иммунных и эндокринных процессов, развёртывающихся в рамках защитных реакций организма. При воздействии иммуногенных стимулов, адресованных как к врождённому, так и к приобретённому иммунитету, регистрируется уменьшение половой привлекательности особей мужского пола. У грызунов это реализуется через изменение хемосигналов (Moshkin et al., 2002; Zala et al., 2004; Arakawa et al., 2010), у яркоокрашенных птиц - через побледнение сигнальной окраски (Faivre et al., 2003), а у певчих птиц - через сокращение песенного репертуара (Garamszegi et al., 2004). Однако снижение привлекательности имеет репродуктивную значимость только в условиях свободного выбора

партнеров, который в естественной среде ограничен факторами социальной организации (Potts et al., 1991), а в лаборатории - условиями эксперимента.

Ранее в наших исследованиях было установлено: несмотря на снижение запаховой привлекательности и половой активности, самцы мышей, которым вводили в качестве чужеродного антигена гемоцианин (keyhole limpet hemocyanin - KLN), показывали при отсутствии у самок свободного выбора больший репродуктивный выход по сравнению с контрольными особями (Gerlinskaya et al., 2012). Кроме того, покрытие интактных самок антигенстимулированными самцами влияло на гуморальное обеспечение беременности и даже увеличивало темпы роста эмбрионов (Gerlinskaya et al., 2017). Иными словами, сигнальные и поведенческие эффекты антигенной стимуляции не подавляют репродуктивную способность самцов, а следовательно, в популяциях, обитающих в условиях паразитарного обилия, имеет место высокая вероятность покрытия на фоне активации механизмов иммунной защиты. Поскольку вероятность спаривания самок с инфицированными самцами может преобладать в популяциях, живущих под паразитарным давлением, мы задались вопросом: может ли отцовский опыт, полученный при антигенной стимуляции иммунной системы, передаваться потомству? Следует отметить, что передача отцовского опыта из поколения в поколение исследована в ряде экспериментальных работ. Например, у мышей потомки самцов, испытавших поражения в повторяющихся социальных конфликтах, демонстрируют повышенную тревожность и депрессивное поведение (Dietz et al., 2011). Аналогично стимуляция страха у отцов с помощью интраназального введения ацетофенона усиливала реакцию испуга у их потомков (Dias, Ressler, 2014). Кроме того, у мышей, чьи отцы подвергались стрессу перед спариванием, наблюдалась меньшая адренокортикальная реакция на иммобилизацию по сравнению с потомством контрольных отцов (Rodgers et al., 2013; 2015).

Вместе с тем, практически отсутствуют сведения об отдаленных последствиях покрытия инфицированными или антигенстимулированными

самцами. Существуют лишь теоретические предположения о том, что отцовский опыт в противостоянии паразитарной интервенции может отражаться на защитных функциях потомков (Luu, Tate, 2017).

В данном исследовании было изучено влияние системной активации иммунитета самцов на параметры сперматозоидов в динамике иммунного ответа, репродуктивный потенциал самцов (способность к фертильным спариваниям), пренатальное развитие, постнатальное выживание и фенотип их взрослых потомков. Иммуногенный белок KLH использовали в качестве антигенного стимула и для отцов, и для их потомков. Основной принцип решения проблемы эпигенетической значимости передачи отцовского опыта заключается в оценке реакции потомков на те же самые стимулы, которые испытывали их отцы до спаривания. На этом основании у потомков антигенстимулированных самцов были исследованы параметры иммунного и эндокринного реагирования на введение KLH: антителообразование, индексы масс главных иммунокомпетентных органов тимуса и селезенки, уровень тестостерона и индексы андрогензависимых органов. В соответствии со стратегией терминальных инвестиций (Williams, 1966) между поддержанием иммунитета и репродукцией взаимоотношения между иммунной и репродуктивной системами в условиях паразитарного пресса направлены на достижение баланса, обеспечивающего устойчивое воспроизводство в этих условиях (Luu, Tate, 2017). Исходя из этого, было исследовано изменение уровня тестостерона в плазме крови и параметры сперматозоидов в ответ на введение KLH у потомков мужского пола контрольных и иммунизированных самцов. Используя магнитно-резонансную спектроскопию (МРС), также изучили нейрометаболические профили амигдалы и коры головного мозга обеих групп потомков. Амигдала является важной частью регуляторного контура мужского полового поведения (Dominguez et al., 2001; Gresham et al., 2016), которое модулируется балансом возбуждающих (глутамат / глутамин) и тормозных (ГАМК) нейромедиаторов структур головного мозга (Tzanoulinou et al., 2014; Adams, Rosenkranz, 2016). Метод магнитно-

резонансной спектроскопии позволяет исследовать эти структуры *in vivo* (Moshkin et al., 2014).

В целом, полученные результаты показали, что иммунизация самцов чужеродным антигеном до спаривания существенно повлияла на иммунные и репродуктивные особенности их сыновей. Введение чужеродных антигенов самцам за 9-16 дней до спаривания значимо повлияло на фенотипические свойства их потомков. Это проявлялось в способности потомков поддерживать высокий уровень тестостерона и показатели сперматогенеза на фоне антигенной стимуляции, которая негативно влияла на уровень тестостерона потомков контрольных самцов. Кроме того, суммарная концентрация глутамата и глутамина преобладала над уровнем ГАМК в амигдале у потомков мужского пола иммунизированных отцов, но не у потомков контрольных отцов. Наконец, индексы массы основных иммунокомпетентных органов были выше у потомков иммунизированных отцов, однако реакция антителообразования, индуцируемая КЛН, была одинаковой в обеих группах.

#### **Цель исследования:**

Изучить влияние системной активации иммунитета самцов нереплицируемыми антигенами на фертильные свойства, пренатальное развитие и фенотип взрослых потомков.

#### **Задачи:**

1. Исследовать динамику гуморального иммунного ответа, количественные и качественные показатели сперматозоидов после однократного введения иммуногенного белка КЛН 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:**

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:

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, в то время как у потомства контрольных отцов подавляется андрогенная функция гонад.

**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. Воздействие на самцов KLH влияет на концентрацию, на показатели подвижности сперматозоидов и на 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.

#### **Методы исследования:**

Для проведения исследований были использованы следующие методы:

1. Для индукции иммунного ответа был использован метод однократной внутрибрюшинной инъекции высокомолекулярного иммуногенного белка KLH (Keyhole limpet hemocyanin) (MP biomedical, USA).

2. Для определения содержания нейрометаболитов в структурах головного мозга использовали метод прижизненной магнитно-резонансной спектроскопии при помощи горизонтальной томографии с магнитным полем 11,7 Тл (Bruker, Biospec 117/16 USR, Германия).

3. Определение специфических к гемоцианину иммуноглобулинов IgG, содержания тестостерона, прогестерона, TNF  $\alpha$ , GM-CSF проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа.

4. Характеристики сперматозоидов были исследованы при помощи автоматического анализатора спермы со встроенной оптической системой Mouse-Traxx (Hamilton Thorne, USA) и автоматическим анализом параметров сперматозоидов (CASA).

5. 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 ( $\chi^2$ ).

### **Личный вклад автора в исследование:**

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.

### **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:

1. Galina Vladimirovna Kontsevaya, Ludmila Alekseevna Gerlinskaya, Yury Mikhailovich Moshkin, Margarita Vladimirovna Anisimova, Aliya Konstantinovna Stanova, Tatyana Ivanovna Babochkina, Mikhail Pavlovich Moshkin. The Effects of Sperm and Seminal Fluid of Immunized Male Mice on In Vitro Fertilization and Surrogate Mother – Embryo Interaction // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – V. 22. – №. 19. In press. Q1;
2. 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. – Т. 160. – V. 1. – P. 117-127. Q1.
3. **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. Q3.

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. – Т. 25. – V. 2. – P. 88-99. Q1.

5. Maslennikova S. O., Gerlinskaya L. A., Kontsevaya G. V., **Anisimova M. V.**, Nedospasov S. A., Feofanova N. A., Moshkin1 M. P., Moshkin Y. M. TNF $\alpha$  is responsible for the canonical offspring number-size trade-off // *Scientific reports*. – 2019. – Т. 9. – V. 1. – P. 1-8. Q1.

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. – Т. 29. – V. 3. – P. 565-574. Q2.

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. – P. 404-409. Q3.

### **Конференции:**

1. Анисимова М.В. Влияние антигенной стимуляции мышей на фертильность самцов и постнатальное развитие потомков // МНСК–2020, Новосибирск, 2020.

2. Анисимова М.В. Иммунизация самцов влияет на успех беременности и фенотип взрослых потомков // Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», Москва, 2020.

3. Гон Я., Анисимова М.В. Пересадка эмбрионов влияет на морфологию и метаболиты мозга половозрелых мышей линии CD-1, XVI Международный

Междисциплинарный Конгресс «Нейронаука для медицины и психологии», Судак, 2020.

**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.

**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.

## I. Обзор литературы

Оплодотворение является одним из ключевых этапов, определяющих репродуктивный успех в процессе размножения. Фертильный потенциал спермы во многом определяется взаимодействием мужской и женской репродуктивных систем с другими физиологическими системами организма, причём иммунная система играет ключевую роль в этих взаимодействиях. Роль иммунной системы не ограничивается поддержанием здоровья обоих полов в условиях патогенного окружения. Иммунные факторы также могут оказывать антагонистическое влияние на фертильность сперматозоидов. Эффекты иммунитета на фертильную эффективность самцов (способность самцов совершать фертильные покрытия) разнообразны и могут включать в себя компромисс между инвестициями в воспроизводство или в поддержание жизнеспособности, а также более прямые, неблагоприятные воздействия иммунных факторов репродуктивного тракта на сперматозоиды и фенотип потомков.

### 1.1. Размножение в условиях паразитарного пресса

Многочисленные клинические, ветеринарные и экологические наблюдения свидетельствуют о негативном влиянии инфекций и паразитарных болезней на репродуктивные характеристики особей обоего пола (Benfield et al., 1992; Feore et al., 1997; Fichorova, 2009). Это положение подкрепляют результаты заражения лабораторных животных, согласно которым инфицирование приводит к снижению внешней привлекательности потенциальных брачных партнеров (Kavaliers, Colwell, 1995; Willis, Poulin, 2000), подавляет гаметогенез и половое поведение (Weiss et al., 2009; Arteaga-Silva et al., 2009), а также повышает риск до и постимплантационной гибели эмбрионов (Fitzgerald, Shellam, 1991; Moshkin et al., 2002). При инфекциях

или инвазиях наблюдается уменьшение сексуальной активности (Loehle, 1995), которое обусловлено не только снижением половой мотивации зараженных животных, но и изменением сексуальной реакции здоровых особей на инфицированных половых партнеров. Как показали Эдвардс и Бернард (Edwards, Bernard, 1987), самки мышей, зараженные трихинеллой (*Trichinella spiralis*), были менее привлекательными половыми партнерами для здоровых самцов, которые предпочитали спариваться с незараженными особями.

Следовательно, увеличение паразитарного пресса должно приводить к сокращению воспроизводства в популяциях хозяев. Снижение собственной сексуальной активности и уменьшение привлекательности для брачных партнеров рассматриваются в качестве одного из проявлений синдрома болезненного поведения, который включает в себя вызванные инфекцией подавление аппетита (анорексия), повышенную сонливость и снижение исследовательского интереса к другим особям (Barnett, 1975). Ведущую роль в развитии болезненного синдрома играют провоспалительные цитокины, секреция которых возрастает при инфекции или при введении липополисахарида (ЛПС), являющегося фрагментом оболочки грамотрицательных бактерий (Dantzer et al., 1996). Действительно, внутрибрюшинное введение ЛПС, интерлейкина-1 (IL-1) или фактора некроза опухолей (TNF $\alpha$ ) снижает половую привлекательность крыс обоего пола (Avitsur, 1997, 1998). Специфическое влияние паразитов на половое поведение хозяина продемонстрировано на примере поражающего гонады хозяина гельминта (*Taenia Crassiceps cysticerci*). У зараженных им самцов домовый мыши происходит существенное изменение стероидогенеза, а именно: подавляется активность 5 $\alpha$ -редуктазы, катализирующей синтез андрогенов, и усиливается активность ароматазы, обеспечивающей образование эстрогенов, что приводит к 50-кратному росту концентрации эстрадиола при одновременном снижении уровня тестостерона. При взаимодействии с самками зараженные самцы совершают меньше садок,



которые, к тому же, никогда не заканчиваются эякуляцией (Morales-Montor et al., 1999).

Вместе с тем, анализ рождаемости в 150 этнических группах людей свидетельствует об обратном эффекте (Guegan et al., 2001). Используя статистические приемы, позволяющие нивелировать влияние факторов образа жизни (характер питания, религиозная принадлежность, уровень образования и др.) авторы показывают, что фактическая плодовитость женщин (количество рожденных потомков) находится в прямой зависимости от видового разнообразия возбудителей паразитарных и инфекционных болезней на территории проживания исследуемых групп. Более того, не только общее число детей, но и масса новорожденных имеют нелинейную зависимость от биоразнообразия паразитов (Thomas et al., 2004). Самые крупные дети рождаются в этнических группах, живущих в условиях минимального паразитарного окружения, а самые маленькие - при близком к среднему видовому разнообразию паразитов. Далее масса тела новорожденных возрастает пропорционально росту паразитарной нагрузки. При обсуждении полученных результатов авторы акцентируют внимание на возможности адаптивной селекции, которая обеспечивает устойчивое существование популяций в условиях видового обилия паразитов, и которая предполагает генетически детерминированные межпопуляционные различия по репродуктивным параметрам (Guegan et al., 2001; Thomas et al., 2004). Однако не исключено, что вклад в формирование данного феномена вносят не только микроэволюционные преобразования. Разнообразие паразитических видов может положительно влиять на плодовитость хозяев в результате сформировавшихся в ходе паразит-хозяинной коэволюции механизмов иммунофизиологического реагирования на интервенцию. Обилие паразитов в сочетании с разнообразной комменсальной микрофлорой неизбежно активизирует системы иммунной защиты. При этом далеко не во всех случаях интервенции вирусов, бактерий, экто – и эндопаразитов приводят к болезни. Иными словами, оценивая репродуктивные последствия

существования в среде с большим разнообразием паразитов, нужно четко разграничить собственные эффекты инфекционных болезней, включая гельминтозы, от эффектов мобилизации различных звеньев иммунной системы.

Первые результаты, указывающие на возможность позитивного значения антигенной стимуляции на процессы беременности, были получены при изучении влияния иммуногенетических различий в системе мать – плод на жизнеспособность эмбрионов (Billington, 1964; James, 1967). Последующие результаты оказались не столь оптимистичными, поскольку подтвердить данные Джеймса (James, 1967) не удалось (Clarke, 1971; Netherington, Humber, 1975; Netherington, 1978, Но et al., 1994). Противоречивость полученных результатов отчасти объясняется тем, что разные авторы вводили чужеродные антигены в разные сроки постимплантационной стадии беременности. В более поздних работах учет сроков становления иммуногенетического диалога матери и плода, который начинается с экспрессии генов гистосовместимости уже на двухклеточной стадии развития (Goldbard et al., 1985; Warner, Gollnick, 1993), позволил воспроизвести показанные Джеймсом (1967) положительные эффекты антигенной стимуляции. В исследовании Герлинской и соавторов (Gerlinskaya et al., 2000) было установлено, что введение эритроцитов, взятых от самцов линии C57BL/6, инбредным самкам линии BALB/c на 2-е сутки после внутрилинейного скрещивания приводит к увеличению массы тела эмбрионов и к снижению постнатальной гибели новорожденных. Учитывая общность иммунных процессов, развертывающихся в ответ на самые разнообразные антигенные стимулы, можно предположить, что и паразитарные антигены, с которыми сталкивается материнская иммунная система, могут в зависимости от стадии беременности оказать положительное влияние на вынашивание и выкармливание потомков.

## **1.2. Иммуно-эндокринная регуляция репродуктивной функции самцов**

Риск столкновения с паразитами, как правило, выше у особей мужского, чем женского пола (Zuk, McKean, 1996). Тем не менее, лишь в единичных исследованиях анализируется влияние антигенной стимуляции самцов на вероятность фертильного покрытия и последующее развитие потомков. В частности, активация неспецифического иммунитета введением бактериального липополисахарида (ЛПС) повышает общий репродуктивный выход у самцов олуши, причем только у старых особей (Velando et al., 2006). В опытах на мышах аутбредной линии ICR было установлено, что введение самцам ЛПС вызывает в первые часы подавление половой активности (Мошкин и др., 2009). Но к концу 5-х суток совместного содержания различия между контрольной и экспериментальной группами по общему числу фертильных покрытий и общему числу жизнеспособных эмбрионов нивелируются. У самок, покрытых ЛПС стимулированными самцами, отмечено снижение до- и постимплантационных эмбриональных потерь. Еще более выраженные репродуктивные эффекты были получены при подсадке самок к самцам, чья иммунная система была активирована введением эритроцитов барана (ЭБ). При практически одинаковом числе фертильных покрытий спаривание с антигенстимулированными самцами характеризовалось большей потенциальной и фактической плодовитостью самок (Мошкин и др., 2010). Причем основные репродуктивные эффекты антигенной стимуляции самцов приходились на 3–5-е сутки после введения ЭБ, т.е. на период, соответствующий началу специфического антителообразования. Сопоставляя результаты экспериментов с введением ЛПС и ЭБ, можно заключить, что обусловленные активацией защитных механизмов репродуктивные эффекты зависят от типа иммунного ответа, вызываемого иммуногенными стимулами. При активации неспецифического иммунитета самцов (введение ЛПС) у покрытых ими самок падают эмбриональные потери, а при развитии специфического иммунного ответа

(введение ЭБ) увеличивается потенциальная и фактическая плодовитость (Мошкин и др., 2010). Мукозальный эпителий является неотъемлемой частью мужского репродуктивного тракта и способен демонстрировать врожденный и адаптивный иммунные ответы, подобно мукозальному эпителию желудочно-кишечного тракта и легких. Иммунная система мужского репродуктивного тракта адаптирована к физиологически сложным требованиям как успешного воспроизводства, так и поддержания полной защиты от микробной инвазии. Разделение системного иммунитета и иммунных ответов мукозального эпителия является характерной чертой мужского репродуктивного тракта. Иммунитет репродуктивного тракта определяется, с одной стороны, взаимодействием клеток репродуктивной системы с компонентами локального иммунитета, а с другой - локальной средой, в которой преобладающими являются половые гормоны и местный микробиом (Wira et al., 2005; Kaushic et al., 2010). Таким образом, можно заключить, что активация отдельных звеньев иммунитета оказывает разнонаправленное воздействие на репродуктивную функцию самцов. На направленность реагирования влияют природа патогена и доза вырабатываемых при этом иммуномодулирующих веществ.

### **1.2.1. Иммунно-эндокринная регуляция функции семенников**

#### **1.2.1.1. Иммунная регуляция**

Установлено, что системная инфекция и даже болезни неинфекционной природы могут оказывать тормозящее действие на мужскую репродуктивную функцию (Dong et al., 1992; Baker, 1998). Ответственные за это действие механизмы плохо исследованы, но тот факт, что не имеющая отношения к репродуктивному тракту болезнь может ингибировать фертильную способность самцов, предполагает, что ингибирование обусловлено чем-то большим, чем простое повреждение клеток, вызванное активностью антимикробных клеток и их секрецией (Hedger, Hales, 2006). В частности, результаты исследования последствий активации иммунной системы,

вызванной инъекциями бактериального липополисахарида (ЛПС), на репродуктивную функцию самцов показывают, что высокие дозы 100 мг/кг ЛПС вызывают активацию провоспалительного звена иммунного ответа и угнетение тестостерон-продуцирующей функции и сперматогенеза (Hedger, Hales, 2006). При этом следует отметить, что использование доз ЛПС, не превышающих 50 мг/кг, не оказывало значимого негативного влияния на сперматогенез. В последние годы растет число доказательств того, что воспаление, вызванное инфекционными и неинфекционными агентами, может оказывать непосредственное влияние на семенной эпителий (O'Bryan, Hedger, 2008; Hedger, 2011).

Влияние патоген-ассоциированных молекулярных паттернов обеспечивается наличием TLR (толл-подобных рецепторов) на миелоидных клетках (моноциты, макрофаги и дендритные клетки), эпителиальных клетках и клетках Сертоли семенников (Hedger, 2011). Клетки Сертоли экспрессируют большинство рецепторов TLR, включая TLR4 (рецептор LPS). Стимуляция клеток Сертоли с помощью TLR – лигандов активирует механизм, стимулирующий экспрессию MAPK (митоген активированная протеинкиназа) и, как следствие, активацию факторов транскрипции, таких как NF $\kappa$ B (ядерный фактор Каппа Б) и IRF3 (регуляторный фактор интерферона) (Riccioli et al., 2006; Bhushan et al., 2008). Индукция этих факторов сопровождается активацией экспрессии генов интерлейкинов (*IL1 $\alpha$*  и *IL1 $\beta$* ), синтазы оксида азота (*NOS2*), фактора некроза опухоли (*TNF $\alpha$* ) и активина (*ACV-A*), контролирующих развитие воспалительного процесса (Gerard et al., 1991; Syed et al., 1995; Riccioli et al., 2006; Winnall et al., 2009; 2011). Кроме того, клетки Сертоли также демонстрируют способность реагировать на многие из эндогенных цитокинов и других медиаторов воспаления, в первую очередь, на *IL1 $\alpha$*  и *IL1 $\beta$* , *TNF $\alpha$* , *NO*, *TGF- $\beta$ 3* и *IFN* (Mauduit et al., 1993; Dejucq et al., 1997; Bauche et al., 1998; Lui et al., 2003 a, b).

### 1.2.1.2. Гормональная регуляция

Тестостерон продуцируется присутствующими в интерстициальном пространстве семенника клетками Лейдига и диффундирует в семенные каналы. Тестостерон вырабатывается клетками Лейдига локально, поэтому уровни тестостерона в семенниках крыс, морских свинок, макака, человека (340–2000 нМ), в 25 – 125 раз превышают величины характерные для сыворотки крови (8,7 – 35 нМ) (Comhaire, Vermeulen, 1976; Turner et al., 1984; Awoniyi et al., 1989; Maddocks et al., 1993; Jarow et al., 2001). Примерно две трети интратестикулярного тестостерона является биодоступным, поскольку он находится в форме, не связанной альбумином (Jarow et al., 2005). Уровень тестостерона в семенниках намного превышает 1-10 нМ, необходимых для классической регуляции экспрессии генов посредством связывания тестостерона с андрогеновыми рецепторами (Tsai, O'Malley, 1994). Это обстоятельство указывает на существование альтернативных механизмов действия тестостерона.

В семенниках андрогеновые рецепторы экспрессируются в перитубулярных миоидных клетках, которые окружают семенные каналы, и в клетках Лейдига между семенными каналами. Внутри семенных каналов только клетки Сертоли имеют рецепторы к тестостерону и являются основным преобразователем сигналов тестостерона, необходимых для поддержания выживания и развития зародышевых половых клеток (Sar et al., 1990). Классический механизм действия начинается с диффузии тестостерона через плазматическую мембрану и связывания в цитозоле с AR. Затем AR перемещается в ядро, где связывается со специфическими промоторами ДНК, что приводит к привлечению коактиваторов регуляции экспрессии генов. Этот классический путь действия тестостерона требует, по крайней мере, 30 – 45 минут для изменения экспрессии генов и часов для синтеза белков (Shang et al., 2002).

Ряд данных показывает, что участие тестостерона в поддержании сперматогенеза может реализовываться через отличные от классических

механизмы. В частности, стимуляция тестостероном деполяризует клетки Сертоли и стимулирует приток кальция в клетки. Тестостерон также активирует ряд киназ, что приводит к активации киназного каскада (Walker, 2010). Кроме того, тестостерон вовлекается в регуляцию белок - белковых взаимодействий для закрепления сперматид в клетках Сертоли.

У крыс зрелые сперматозоиды высвобождаются из клеток Сертоли на стадии VIII сперматогенного цикла. В отсутствие тестостерона сперматозоиды не выделяются в просвет семенных канальцев, а вместо этого фагоцитируются клетками Сертоли (Holdcraft, Braun, 2004). Для оценки влияния тестостерона на специализированные адгезивные соединения (АЖ) и высвобождение сперматозоидов культивировали срезы семенных канальцев крыс, содержащие зрелые сперматозоиды непосредственно перед их высвобождением. Культивирование срезов семенных канальцев с тестостероном или ингибиторами различных сигнальных путей, реализующих эффекты тестостерона, показало, что индукция киназного пути действия тестостерона является важным регулятором высвобождения сперматозоидов и их фертильности (Walker, 2010).

### **1.2.2. Сперматогенез и гематотестикулярный барьер**

Способность созревающих половых клеток и зрелых сперматозоидов избегать иммунного распознавания собственным организмом является одной из интригующих загадок мужской репродуктивной функции. Сперматогенез проходит в семенных канальцах семенника, который включает мышечную ткань (перитубулярные клетки) и базальный апикальный семенной эпителий. Стадии сперматогенеза, проходящие в базальном компартменте семенного эпителия за пределами гематотестикулярного барьера (ГТБ) включают серию клеточных событий: 1) обновление и пролиферация сперматогоний посредством митоза и дифференцировки; 2) продвижение клеточного цикла от сперматогоний к прелептотенным сперматоцитам. Последующие стадии сперматогенеза, проходящие в апикальном эпителии в пределах ГТБ, включают: 3) прохождение клеточного цикла от зиготены и пахитены к

диплотенным сперматоцитам, за которыми следуют последовательные мейотические деления I и II порядков; 4) преобразование круглых сперматид в удлиненные формы сперматид, а затем в спермии, которые выбрасываются в просвет канальцев. Таким образом, ГТБ обеспечивает физический барьер для разделения событий сперматогенеза, а именно стадий митотических делений и мейоза с последующей дифференцировкой, которые проходят в иммунопривилегированных участках апикального эпителия (Cheng, Mruk, 2012).

Основная функция ГТБ – ограничивать поток веществ (вода, ионы, питательные вещества, гормоны, паракринные факторы и другие биологические молекулы) через эпителий клеток Сертоли в апикальный компартмент. Кровеносные и лимфатические сосуды расположены только в интерстиции между семенными канальцами и не проникают в семенной эпителий ГТБ. ГТБ регулирует поступление веществ (сахаров, аминокислот), жизненно важных молекул (гормонов, ионов) и токсикантов (токсиканты окружающей среды, лекарства, химические вещества) в апикальный компартмент, в котором происходит постмейотическое развитие половых клеток (спермиогенез и спермиация). Эта «избирательность» функции ГТБ создает уникальную микросреду, необходимую для развития постмейотических сперматид в апикальном компартменте семенного эпителия (Mital et al., 2011; Cheng, Mruk, 2012). Морфологическое разграничение, обусловленное ГТБ, обеспечивает неограниченный доступ к необходимым для митотической пролиферации и дифференциации сперматозоидов гормонам и другим биомолекулам, высвобождающимся из микрососудов в интерстициальное пространство. Тогда как дальнейшее развитие метаболически неактивных сперматид проходит в иммунопривилегированном апикальном компартменте ГТБ.



### 1.2.3. Иммунная и гормональная регуляция гематотестикулярного барьера

Во время сперматогенеза в семенниках млекопитающих прелептотенные и лептотенные сперматоциты выходят за пределы ГТБ. Миграция прелептотенных и лептотенных сперматоцитов через ГТБ на стадии VIII семенного эпителиального цикла включает обширную реструктуризацию плотных соединений (ТJ) (Mruk, Cheng, 2004; Wong, Cheng, 2005). Установлено, что сосуществование плотных соединений (ТJ) и апикальных закрепляющих соединений (АJ) в ГТБ направлено на усиление целостности барьера на этапе эпителиального цикла, когда ГТБ «закрыт». На стадии VIII эпителиального цикла, когда ГТБ должен «раскрыться», ТJ и АJ отключаются, так что ТJ могут временно замещать функцию АJ при реструктуризации АJ и наоборот (Wong, Cheng, 2005). При реструктуризации ГТБ на стадии VIII семенного эпителиального цикла во время транзита сперматоцитов через ГТБ разрушаются межклеточные соединения сперматиды – клетка Сертоли, хотя необходимость поддержания функции иммунологического барьера в этот период сохраняется.

Цитокины, ростовые факторы и тестостерон играют важную роль в поддержании целостности ГТБ (Lui et al., 2003; Wong et al., 2004; Xia et al., 2006; Li et al., 2006). Цитокины, такие как TGF- $\beta$  (трансформирующий фактор роста), EGF (эпидермальный фактор роста), интерлейкины (IL-1 $\alpha$ , IL-13) и TNF $\alpha$  (фактор некроза опухоли) участвуют в регуляции функции барьера в различных эпителиальных клетках (Walsh et al., 2000; Xia et al., 2009; Li et al., 2009c; Koch, Nusrat, 2009; Kirschner et al., 2009). Например, TNF $\alpha$  может нарушать функцию кишечного барьера, индуцируя эндоцитоз окклюдина (Turner, 2009; Clayburgh et al., 2005). Однако точная роль цитокинов в динамике ГТБ долгое время оставалась не изученной. В начале 2000 годов впервые было показано, что про- и противовоспалительные цитокины TNF $\alpha$  и TGF- $\beta$  могут влиять на сборку барьера и проницаемости ТJ клеток Сертоли (Lui et al., 2001; 2003). Дополнительные исследования *in vivo*,

выполненные на крысах, продемонстрировали, что ГТБ регулируется митоген-активированной протеинкиназой (Lui et al., 2003; Lui et al., 2009 a; Wong et al., 2004; Xia, Cheng, 2005) и n-концевой киназой c-Jun (Li et al., 2006; Wong et al., 2005; Siu et al., 2003), которые, в свою очередь, активируются TGF- $\beta$  и TNF $\alpha$  соответственно. Цитокины способствуют эндоцитозу белков, в частности, окклюдина, который активирует опосредованную эндосомами деградацию ГТБ. Цитокины участвуют в реструктуризации плотных контактов в местах AJ между постмейотическими сперматидами и клетками Сертоли в апикальном семенном эпителии ГТБ (Lui, Cheng, 2007; Li et al., 2008; 2009b). По сути, результаты этих исследований демонстрируют, что цитокины могут нарушать адгезию апикального эпителия ГТБ, снижая стационарные уровни ключевых интегральных мембранных белков, таких как N-кадгерин и окклюдин, в апикальном эпителии ГТБ (Li et al., 2005; 2008). Выводы этих авторов подтверждаются результатами исследований, показывающими, что подавление интегральных мембранных белков ГТБ, наблюдаемое после обработки клеток Сертоли цитокинами, отчасти вызывается увеличением эндоцитоза белков и внутриклеточной деградацией, опосредованной эндосомами (Li et al., 2008; Yan et al., 2008a, b). Интересно, что фагоцитоз остаточных тел в сперматиде клетками Сертоли, который происходит перед спермацией, индуцирует секрецию клетками Сертоли IL-1 $\alpha$  *in vitro*, что согласуется с данными, полученными *in vivo* и показывающими, что продукция этого цитокина наиболее высока в канальцах на VIII стадии (Syed et al., 1995). Фактически, интратестикулярное введение взрослым крысам IL-1 $\alpha$  вызывает истощение сперматид в эпителии, имитирующее спермиацию, и нарушение барьера, имитирующего реструктуризацию ГТБ (Sarkar et al., 2008). В совокупности эти результаты указывают на то, что своевременная продукция IL-1 $\alpha$  клетками Сертоли после фагоцитоза остаточных тел сперматид может координировать формирование спермаций и ГТБ.

Тестостерон, продуцируемый клетками Лейдига, реализует свои эффекты через специфические андрогенные рецепторы клеток Сертоли и семенного эпителия. Уровень экспрессии андрогенных рецепторов у грызунов наиболее высок в семенном эпителии на стадиях VII – VIII эпителиального цикла, когда ГТБ открывается для транзита мигрирующих прелептотенных или лептотенных сперматоцитов (Wang et al., 2006; Yan et al., 2007). Мыши с селективным нокаутом андрогенного рецептора в клетках Сертоли бесплодны. Показано, что их бесплодие обусловлено остановкой сперматогенеза на стадии первого мейоза. Кроме того, у этих мышей зафиксировано нарушение ГТБ (Wong et al., 2004, 2008). Эти данные, а также результаты исследований *in vitro* демонстрируют способность тестостерона к поддержанию барьерной функции клеток Сертоли и TJ и позволяют предположить, что ГТБ является основной мишенью для действия андрогенов (Li et al., 2009). Кроме того, было показано, что тестостерон способствует перемещению интегральных мембранных белков между клеточной поверхностью и цитозолем, а также их рециркуляции из цитозоля обратно на поверхность клетки без увеличения экспрессии белков ГТБ, участвующих в поддержании целостности барьера (Cheng, Mruk, 2010). С другой стороны, тестостерон вовлекается в регуляцию сборки соединительных комплексов ГТБ и тем самым способствует его целостности (Wang et al., 2009; Meng et al., 2005). Исследования *in vitro* также показали, что тестостерон может усиливать синтез белков TJ, необходимых для сборки и поддержания барьерной функции плотного соединения клеток Сертоли (Janecki et al., 1992; Chung et al., 2001; Siu et al., 2009). Таким образом, можно заключить, что цитокины нарушают межклеточные соединения в семенном эпителии, а тестостерон поддерживает их целостность. Однако, представленные выше данные не объясняют, как цитокины и тестостерон, которые, по сути, функционируют в одной и той же микросреде, могут оказывать противоположное влияние на динамику плотных соединений, но при этом поддерживать гомеостаз семенного эпителия.

Исследования, в которых изучались эффекты TGF- $\beta$ 2 и тестостерона на эндоцитоз и рециркуляцию белков, участвующих в формировании плотных контактов, показывают, что и цитокины, и тестостерон усиливают кинетику эндоцитоза интегральных мембранных белков ГТБ *in vitro* в клетках Сертоли (Yan et al., 2008; Xia et al., 2009). Однако только тестостерон индуцирует перемещение эндоцитозированных белков обратно на поверхность клеток Сертоли, (Yan et al., 2008) и, следовательно, способствует поддержанию барьерной функции плотных контактов, тогда как цитокин-индуцированные белки предназначены для внутриклеточной деградации интегральных мембранных белков. Эти данные объясняют, как функция иммунологического барьера может поддерживаться во время транзита прелептотенных/лептотенных первичных сперматоцитов через ГТБ на стадии VIII эпителиального цикла.

Тестостерон также способствует сборке «новых» фибрилл с плотными контактами под мигрирующими первичными сперматоцитами путем синтеза *de novo* новых белков, а также за счет трансцитоза и повторного перемещения интернализированных белков плотных контактов из вышележащих в нижележащие сперматоциты. В то же время цитокины, продуцируемые Сертоли и зародышевыми клетками, запускают разборку «старых» фибрилл с плотным соединением, расположенных над перемещающимися сперматоцитами, что позволяет зародышевым клеткам преодолевать барьер.

#### **1.2.4. Иммуные факторы в регуляции сперматогенеза в семенниках**

Известно, что провоспалительные медиаторы иммунного ответа играют ключевую роль в инициации волны сперматогенеза и в реализации многих других аспектов развития сперматогенных клеток. Эти регуляторы включают макрофагальные цитокины IL-1, IL-6 и TNF $\alpha$ , а также небелковые медиаторы воспаления, такие как NO. Кроме того, имеющиеся данные свидетельствуют, что медиаторы воспаления продуцируются в семенниках соматическими клетками, в том числе клетками Сертоли, перитубулярными клетками,

клетками Лейдига и зародышевыми клетками (O'Bryan, Henger, 2008). На примере TNF $\alpha$  показано, что его высокие концентрации в циркулирующей крови сочетаются с нарушением гематотестикулярного барьера и высвобождением незрелых сперматозоидов в полость семявыносящих канальцев (Li et al., 2009b). При высоких концентрациях TNF $\alpha$  с помощью даун-регуляции системы Fas ингибирует апоптоз зрелых половых клеток, в результате нарушается оптимальное соотношение клеток Сертоли и зрелых половых клеток, которое является определяющим фактором созревания половых клеток и нормального сперматогенеза (Pentikäinen et al., 2001). Высокий уровень TNF $\alpha$  также оказывает негативное влияние на синтез тестостерона (Huleihel, Lunenfeld, 2004), что может быть критичным для поддержания нормального сперматогенеза. К тому же, повышенное содержание TNF $\alpha$  в семенных пузырьках оказывает влияние на подвижность сперматозоидов (Koçak et al., 2002). Обнаружена также положительная взаимосвязь между уровнем TNF $\alpha$  в семенной плазме с разрушением ДНК/хроматина в сперматозоидах и снижением подвижности сперматозоидов (Perdichizzi et al., 2007). В экспериментах *in vitro* добавление TNF $\alpha$  вызывало значительное снижение подвижности сперматозоидов (Eisermann et al., 1989) и снижение числа сперматозоидов с нормальной митохондриальной функцией (Bian et al., 2004). В клинической практике также накоплены многочисленные примеры, демонстрирующие, что увеличение уровня TNF $\alpha$ , вызванного инфекциями, негативно влияет на фертильную способность мужчин (Gruschwitz et al., 1996; Huleihel et al., 1996; Koçak et al., 2002; Politch et al., 2007).

Вместе с тем, накапливается все больше доказательств того, что медиаторы воспаления в физиологических концентрациях необходимы для становления и функционирования мужской репродуктивной системы (Lazaros et al., 2012). Отмечается значимая роль TNF $\alpha$  в регуляции важнейших этапов сперматогенеза, а именно созревания сперматозоидов и продвижения их в просветы канальцев семенников. Показано, что TNF $\alpha$ ,

вовлекаясь в регуляцию сперматогенеза (O'Bryan, Hedger, 2008), обеспечивает поддержание жизнеспособности половых клеток (Bornstein et al., 2004), регулирует апоптоз зародышевых клеток в семенных канальцах, контролирует функционирование лигандной системы Fas (Pentikäinen et al., 2001) и секреторную функцию клеток Сертоли (Mauduit et al., 1996). В целом, TNF $\alpha$  является важнейшим фактором выживания половых клеток (O'Bryan, Hedger, 2008). Дополнительные доказательства ключевой роли TNF $\alpha$  в процессе сперматогенеза были получены в экспериментах на самцах мышей с нокаутом по гену фактора некроза опухоли *TNF $\alpha$ -/-* (Suh et al., 2008). У самцов *TNF $\alpha$ -/-* наблюдалось уменьшение концентрации сперматозоидов в эякуляте по сравнению с самцами дикого типа *TNF $\alpha$ +/+* (Suh et al., 2008). Кроме того, повышенная секреция мюллеровой ингибирующей субстанции клетками Сертоли, обнаруженная у мышей *TNF $\alpha$ -/-*, ингибировала синтез тестостерона клетками Лейдига (Fynn-Thompson et al., 2003). Другие провоспалительные цитокины также играют важную роль в регуляции сперматогенеза. IL1 $\alpha$  стимулирует вовлечение нового поколения половых клеток в цикл сперматогенеза и контролирует прохождение ими всех стадий сперматогенеза. IL1 $\alpha$  также индуцирует продукцию IL6, который необходим для регулирования количества сперматоцитов, находящихся на стадии мейоза. В свою очередь TNF $\alpha$  способствует продвижению сперматоцитов через гематотестикулярный барьер (O'Bryan, Henger, 2008).

Таким образом, семенник является иммунологически привилегированным органом, но при этом семенной эпителий проявляет признаки хронического воспаления, выделяя в процессе сперматогенеза медиаторы воспаления. Этот механизм имеет ключевое значение для успешного сперматогенеза, и нарушение в балансе между этими двумя иммунологическими "компартаментами" в результате какого-либо иммуноопосредованного повреждения семенника или недостаточности сперматогенеза приводит к гибели зародышевых клеток (O'Bryan, Henger, 2008).

### 1.2.5. Иммуниет эпидидимиса

Изучение иммунитета эпидидимиса оставалось долгое время вне интереса исследователей, поскольку господствующая точка зрения опиралась на то, что семенники обеспечивают иммунитет всего репродуктивного тракта. Однако клинические данные опровергают этот взгляд. Например, эпидидимит – вызванное иммунным ответом на патогены воспаление эпидидимиса – является наиболее частой патологией (Moore et al., 1971). Первой линией защиты эпидидимиса является гематозэпидидимальный барьер (ГЭБ). ГЭБ представляет собой сложную структуру, состоящую из трёх типов барьеров: анатомического, физиологического и иммунологического. (Mital et al., 2011). Анатомический барьер образован плотными контактами между базолатеральной и апикальной мембраной эпителиальных клеток (Hoffer, Hinton, 1984) и его функция заключается в ограничении входа и выхода клеток из просвета в просвет. Физиологический барьер обеспечивается с помощью транспортёров, которые контролируют движение веществ из просвета в просвет, и тем самым, создают специализированное микроокружение, необходимое для созревания сперматозоидов (Cooper et al., 1979; Hinton, Howards, 1981). И, наконец, иммунологический барьер представлен не только иммунными клетками ( $CD4^+$ ,  $CD8^+$ Т лимфоциты, В лимфоциты, макрофаги, дендритные клетки), но и, в большинстве своем, эпителиальными клетками, экспрессирующими толл-подобные рецепторы (TLR).

Эпидидимис играет решающую роль в поддержании фертильности сперматозоидов, обеспечивая созревание, транспортировку и хранение сперматозоидов. Кроме того, он должен создавать защитную среду от восходящего урогенитального потока патогенов и толерогенную среду для защиты сперматозоидов от непрерывного потока антиспермальных аутоантигенов. Для создания таких условий требуется относительная стабильность состава внутренней гуморальной среды эпидидимиса. Следует отметить, что эпидидимис является основной мишенью для бактерий

(например, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoea* и *Escherichia coli*) и вирусов (например, вирус иммунодефицита человека), передающихся половым путем (Mullen et al., 2003; Hedger, 2011). Важной особенностью эпидидимиса является присутствие большого количества компонентов врожденного иммунитета, обильно экспрессируемых даже в отсутствие повреждения или инфекции (Ribeiro et al., 2016). Состав гуморальных компонентов эпидидимиса включает антимикробные/иммуномодулирующие белки (b-дефензины, лактоферрин) и медиаторы воспаления (цитокины и родственные им молекулы). Они действуют как первый барьер в защите от широкого спектра вызовов (инфекционных и неинфекционных) и критически вовлечены в регуляцию как врожденных, так и адаптивных иммунных ответов. Таким образом, мужская репродуктивная функция зависит от наличия надежных механизмов врожденного и адаптивного иммунитета во всех репродуктивных органах и протоках.

Головной отдел эпидидимиса является ключевым участком иммунного ответа, поскольку он является одним из последних отделов, в который по восходящему пути попадают урогенитальные патогены. Продемонстрировано, что в этом отделе наиболее представленной популяцией иммунных клеток являются антигенпрезентирующие клетки, такие как дендритные клетки и макрофаги (Voisin et al., 2018). Кроме того, наличие высокой доли канонических CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов позволило предположить существование в этой области классических иммунных ответов (Da Silva et al., 2011). Следует отметить, что лейкоциты обнаруживаются во всех областях эпидидимиса, хотя имеется тенденция к наибольшему увеличению количества всех подгрупп лейкоцитов в перитубулярной зоне и эпителии головного отдела (Nashan et al., 1989; Flickinger et al., 1997; Seiler et al., 1999). В свою очередь, количество интраэпителиальных макрофагов и CD8<sup>+</sup> Т-клеток увеличивается преимущественно в проксимальных областях эпителия, и их количество увеличивается при нарушении сперматогенеза у крыс (Serre, Robaire, 1999).



Различия в распределении лейкоцитов в эпидидимисе по сравнению с семенником указывают на существование отличной иммунологической среды, в которой разделение между антигенами сперматозоидов и местными иммунными клетками менее устойчиво.

В эпидидимисе плотные соединения (ТТ) менее специализированы и расположены апикально, поэтому иммунные клетки (дендритные клетки, макрофаги, CD8<sup>+</sup> лимфоциты) и другие иммунные факторы могут проникать в эпителий, где становятся возможными их контакты с содержимым просвета. Поступление антител (IgA и IgG) в эпидидимис может происходить либо путем трансэпителиального транспорта, либо через восходящий тракт от добавочных половых желез (Voisin et al., 2019). В частности, показано, что после иммунизации крыс столбнячным анатоксином, который имеет высокую иммуногенность, а антитела к нему не являются антиспермальными, специфичные к столбнячному анатоксину IgG обнаруживаются в протоках эпидидимиса (Knee et al., 2005). Эти данные подтверждают полученные ранее результаты, показывающие, что через 20 часов после внутривенного введения крысам I<sup>125</sup>IgG, иммуноглобулин G обнаруживается в головном отделе эпидидимиса (Pöllänen, Cooper, 1995). Предполагается, что при отсутствии патологических нарушений целостности ГЭБ молекулы белков и клетки могут поступать в протоки эпидидимиса через инициальный отдел эпидидимиса, по которому осуществляется транспорт сперматозоидов из семенников в головной отдел эпидидимиса (Da Silva, Barton, 2016). Канал инициального сегмента окружен очень плотной сетью капилляров, значительная часть из них представлена фенестрированными кровеносными капиллярами (Abe et al., 1984; Hirai et al., 2010). Эта сеть является наиболее хрупкой зоной ГЭБ, через которую в проток эпидидимиса может попадать содержимое периферических кровеносных сосудов, включая и клетки. Показано, что в протоке инициального сегмента эпидидимиса содержится максимальное количество макрофагов и дендритных клеток (Da Silva, Barton, 2016), а также IgG

(Pöllänen, Cooper, 1995; Knee et al., 2005). В просвете протока инициального сегмента эпидидимиса сперматозоиды, покидающие семенник, могут напрямую взаимодействовать с компонентами крови, поступающими из сосудистого русла, и интраэпителиальными иммунными клетками (макрофаги, дендритные клетки Т и В лимфоциты). Поэтому предполагается, что в этой области осуществляется надзор за качеством сперматозоидов и происходит элиминация некачественных гамет (Da Silva, Barton, 2016).

Таким образом, взаимодействия между иммунной системой и эпидидимисом создают особую иммунную среду в разных отделах эпидидимиса, необходимую для созревания сперматозоидов. Любые нарушения, вызванные различными причинами, могут влиять на параметры сперматозоидов, определяющих их фертильную способность (Hedger, 2011; Silva et al., 2018).

### **1.3. Влияние отцовских факторов на успех беременности**

#### **1.3.1. Посткопуляторные отцовские эффекты**

Растворимая фракция эякулята, известная как семенная жидкость, представляет собой больше, чем просто транспортную среду для хранения сперматозоидов. Семенная жидкость, попадающая в женские половые пути при коитусе, не только способствует выживанию и оплодотворяющей способности сперматозоидов, но также содержит в своем составе сигнальные молекулы, которые влияют на шансы зачатия и репродуктивный успех. Посткопулятивная среда матки, активируемая семенной жидкостью, не только обеспечивает оплодотворение, но и активирует иммунитет женского репродуктивного тракта, который способствует имплантации и поддержанию беременности.

Кроме того, в экспериментах на мышах показано, что многие гуморальные факторы и иммунные клетки, обнаруживаемые в семенной жидкости, происходят из фракции семенной плазмы (Robertson et al., 2005). Состав семенной жидкости представляет собой сложную

многокомпонентную смесь, состоящую из белков, фруктозы, липидов, цитокинов и иммуноглобулинов, главным образом, IgG. (Mann, 1964; Aumuller, Riva, 1992; Maegawa et al., 2002; Gopichandran et al., 2006; Morgan, Watkins, 2019). В семенной жидкости также присутствуют и внеклеточные нуклеиновые кислоты, такие как ДНК, длинная одноцепочечная РНК и малая РНК. Высказывается предположение, что эти РНК могут играть потенциальную биологическую роль, выступая в качестве коммуникационных молекул при межклеточных взаимодействиях, а также во временной и пространственной регуляции экспрессии генов в мужской репродуктивной системе (Zagoskin et al., 2017). Следует отметить, что основными источниками семенной жидкости являются семенные пузырьки, которые, в отличие от семенников и эпидидимиса, не защищены от поступления иммунных факторов и клеток из кровеносных и лимфатических сосудов. В большинстве исследований, посвященных инфекции/воспалению мужских половых органов, показано, что провоспалительные цитокины и их растворимые рецепторы экспрессированы в семенной жидкости (Sanocka et al., 2003; Matalliotakis et al., 2006; Martinez-Prado, Bermudez, 2010; Kokab et al., 2010). Изменение концентрации отдельных цитокинов, а также их комбинаций наблюдается на разных этапах воспалительного процесса (Papadimas et al., 2002; Sanocka et al., 2003). Более того, предполагается, что наиболее ранними маркерами воспалительного процесса в репродуктивных органах, обусловленного как инфекционными, так и неинфекционными причинами, являются провоспалительные цитокины IL-6 и IL-8 (Eggert-Kruse et al., 2001; Sanocka et al., 2003; Kora et al., 2005; Penna et al., 2007; Kokab et al., 2010). Цитокины семенной жидкости, попадая в женский репродуктивный тракт, взаимодействуют с выстилающими цервиковагинальный тракт эпителиальными клетками и вызывают локальные клеточные и молекулярные изменения, напоминающие воспалительную реакцию (Robertson, 2005). Показано, что семенная жидкость мышей и свиней активирует экспрессию нескольких провоспалительных цитокинов и

хемокинов в эпителиальных клетках матки (Robertson et al., 1996; 2005; O'Leary et al., 2004). В свою очередь, эти факторы усиливают действие хемотаксических агентов семенной жидкости, что приводит к изменениям в сосудистом русле матки, привлечению и активации макрофагов, гранулоцитов и дендритных клеток, которые накапливаются в ткани эндометрия матки, прилегающей к эпителиальной поверхности, и мигрируют между эпителиальными клетками в просветную полость. (Phillips, Mahler, 1975; McMaster et al., 1992; O'Leary et al., 2004). Проникающие лейкоциты участвуют в удалении из женских репродуктивных тканей семенных остатков и, потенциально, в отборе оплодотворяющей спермы (Mattner, 1969; Roldan et al., 1992), а также могут влиять на женский иммунный ответ на семенные антигены и вызывать необходимые для имплантации изменения в эндометрии матки (Robertson et al., 1997; Robertson, 2005). У мышей и свиней эпителиальные клетки эндометрия матки являются основными мишенями воздействия молекулярных факторов семенной жидкости, и у обоих видов ключевыми индуцируемыми в матке цитокинами являются GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), IL-6, IL-8 и MCP-1 (моноцитарный хемотаксический белок -1) (Robertson et al., 1992; 1996; O'Leary et al., 2004). Эксперименты, выполненные на самцах мышей с дефицитом семенной жидкости после вазэктомии или хирургического удаления семенных пузырьков, показывают, что основные иммунологически активные сигнальные фрагменты поступают в семенную жидкость из семенного пузырька (Robertson et al., 1996).

У грызунов семенная жидкость вызывает каскад долговременных изменений функционирования иммунной системы беременных самок. Первая фаза женского иммунного ответа на компоненты семенной жидкости подобна классической воспалительной реакции с начальной экспрессией провоспалительных цитокинов, сопровождающейся образованием обширного лейкоцитарного инфильтрата в эндометрии матки. Этот воспалительный ответ разрешается у мышей к 4 дню, когда начинается

имплантация эмбриона. Этот непродолжительный воспалительный ответ задает траекторию экспрессии генов и клеточных изменений, которые модулируют иммунную и репродуктивную функции, и тем самым поддерживают имплантацию и беременность (Schjenken, Robertson, 2020).

Вторая фаза иммунной реакции женского репродуктивного тракта на семенную жидкость – это инфильтрация макрофагов и дендритных клеток из периферической крови в субэпителиальную строму шейки матки и эндометрий матки, которая проходит в течение 24 часов после контакта с семенной жидкостью. Кинетика рекрутирования макрофагов и дендритных клеток в субэпителиальную строму хорошо согласуется с индукцией экспрессии генов, запускаемой факторами семенной жидкости. Эти иммунные клетки способствуют восприимчивости матки к имплантации эмбриона и последующему развитию плаценты (Schjenken, Robertson, 2020). В индуцированной семенной жидкостью матке мышей усиливается продукция эпителиальными клетками хемотаксических факторов (Schjenken et al., 2015), что приводит к усилению воспалительного ответа. Во второй волне в инфильтратах децидулярной стромы появляются макрофаги и дендритные клетки (De et al., 1991; Robertson et al., 1998). Эти клетки сохраняются в строме эндометрия в течение примерно 24 - 48 часов, но затем эвакуируются по мере разрешения воспаления до имплантации эмбриона, что совпадает с индуцированным прогестероном сдвигом экспрессии провоспалительных цитокинов в сторону экспрессии противовоспалительных цитокинов (De et al., 1991; Kachkache et al., 1991) и накоплением внутриматочных натуральных киллеров (uNK). Нарушение передачи молекулярных и клеточных сигналов, содержащихся в семенной жидкости, ослабляет иммунную адаптацию к беременности и нарушает эмбриональное развитие (Johansson et al., 2004; Guerin et al., 2011; Bromfield et al., 2014). Ключевым результатом иммунного ответа на семенную жидкость является индукция иммуносупрессивных Treg-клеток, обеспечивающих иммунную толерантность и, как следствие, нормальное

развитие антигенно отличных от материнского организма эмбрионов (Robertson et al., 2018). Это происходит после того, как дендритные клетки покидают репродуктивный тракт через афферентные лимфатические узлы и попадают в дренирующие лимфатические узлы, где они представляют антигены мужской семенной жидкости для примирования Т-клеток (Bromfield et al., 2014). Затем Т-клетки проникают в эндометрий матки до и во время имплантации из периферической крови и вследствие их локальной пролиферации. Сила и качество ответа Т-клеток может варьировать в зависимости от баланса состава семенной жидкости, который влияет на экспрессию цитокинов и хемокинов в матке и фенотип рекрутированных макрофагов и дендритных клеток (Guerin et al., 2011; Bromfield et al., 2014). Эндометрий секреторной фазы эстрального цикла содержит высокую долю uNK-клеток (децидуальные натуральные киллеры), дендритных клеток и Т-клеток, среди которых 20-25% клеток являются Treg лимфоцитами CD45 + (Vulmer et al., 2009). Все эти клетки участвуют в подготовке эндометрия к прикреплению и имплантации эмбриона путем регуляции ангиогенеза (Evans et al., 2016). Таким образом, все сказанное выше указывает на ключевую роль композиции иммунных факторов семенной жидкости в подготовке матки к имплантации и успешной реализации беременности.

### **1.3.2. Влияние отцовских факторов на эмбриональное развитие**

Развитие эмбриона от зиготы до бластоцисты является критическим этапом онтогенеза. И изменения гуморального и клеточного состава среды, окружающей эмбрион, могут навсегда изменить его онтогенетическую программу развития за счет эпигенетических эффектов, определяющих ход развития и долгосрочное влияние на здоровье потомства (Thompson et al., 2002; Gerlinskaya et al., 2019). Семенная жидкость, как было показано выше, является значимым регулятором материнской гуморальной среды за счет модулирующего влияния на экспрессию факторов роста и цитокинов, определяющих выживаемость и программирование развития эмбрионов (Robertson et al., 2018).

Семенная жидкость регулирует экспрессию нескольких цитокинов, экспрессируемых в яйцеводе и эпителии матки, и влияние этих цитокинов на развитие эмбрионов может быть, как положительным, так и отрицательным. Эмбриотрофические факторы (ростовые факторы и интерлейкины) в яйцеводе и матке, индуцируемые семенной жидкостью (CSF1, GM-CSF, CSF3, IL-6, LIF и VEGF), оказывают положительное влияние на эмбриональное развитие (O'Leary et al., 2004; Scott et al., 2009; Bromfield et al., 2014; Schjenken et al., 2015). При нарушении экспрессии цитокинов на ранних сроках беременности, обусловленном спариванием самок с самцами, имеющими дефицит семенной плазмы в результате хирургического иссечения семенных пузырьков, наблюдается снижение скорости расщепления зигот до 2-клеточной стадии и нарушение развития бластоцист (Bromfield et al., 2014). Наиболее убедительные доказательства эмбриотрофического действия цитокинов получены для GM-CSF. Показано, что отсутствие GM-CSF нарушает развитие бластоцисты из-за активации апоптоза (Robertson et al., 2001; Chin et al., 2009). У эмбрионов крупного рогатого скота GM-CSF действует посредством регуляции генов метилирования *de novo* и влияет на эпигенетическое репрограммирование (Loureiro et al., 2009; Siqueira et al., 2017). Культивирование *in vitro* человеческих эмбрионов в присутствии GM-CSF увеличивает число эмбрионов, достигающих стадии бластоцисты, увеличение размера клеток внутренней клеточной массы и количество клеток трофобластической оболочки (Sjoblom et al., 1999). Кроме того, эффект GM-CSF проявляется в увеличении частоты имплантации и успешных родов (Ziebe et al., 2013).

При определенных обстоятельствах в матке и яйцеводе могут экспрессироваться эмбриотоксические факторы, которые могут оказывать негативное влияние на развитие эмбриона и вызывать апоптоз. Экспрессия эмбриотоксических цитокинов IFN- $\gamma$  и TNF $\alpha$ , связывающихся с лигандом, индуктором апоптоза клеток (TRAIL), регулируется семенной жидкостью у мышей и людей (Sharkey et al., 2012; Bromfield et al., 2014; Schjenken et al.,

2015; Sharkey et al., 2018). TRAIL относится к числу ключевых регуляторов жизнеспособности и потенциала развития эмбриона. TRAIL и его рецептор экспрессируются в доимплантационных эмбрионах мышей (Riley et al., 2004), а также в эмбрионах и тканях репродуктивного тракта человека (Robertson et al., 2018). TRAIL, по-видимому, оказывает негативное влияние на развитие эмбриона за счет индукции апоптоза (Riley et al., 2004). Снижение фертильности и изменённое онтогенетическое программирование плода, наблюдаемые у мышей, зачатых при отсутствии семенной плазмы в женском репродуктивном тракте, и повышенная экспрессия TRAIL в этих условиях указывают на его значимую роль в регуляции эмбрионального развития (Bromfield et al., 2014). На ранних стадиях беременности TNF $\alpha$  действует как фактор апоптоза, увеличивая процент апоптотических бластомеров в эмбрионах мыши (Fabian et al., 2007). В свою очередь, IFN- $\gamma$  подавляет экспрессию эмбриотрофического фактора GM-CSF и напрямую ингибирует развитие бластоцист мыши (Haimovici et al., 1988; Sharkey et al., 2018).

Способность тканей репродуктивного тракта самок высвобождать эмбриотрофические и эмбриотоксические цитокины повышает перспективу «контроля качества» эмбрионов со стороны материнского тракта. Это подтверждается результатами, показывающими, что в спаривающихся парах, когда у самцов отмечается провоспалительный фенотип семенной плазмы, связанный с инфекцией или неинфекционным воспалением, отмечается увеличение экспрессии провоспалительных цитокинов в цервикальном эпителии матки (Rasmussen et al., 1997; Sharkey et al., 2007). Предполагается, что изменения баланса иммунных факторов в семенной жидкости самцов могут влиять на развитие эмбрионов, фенотип и здоровье потомков во взрослой жизни (Sjoblom et al., 2005; Bromfield et al., 2014). В целом, эти данные указывают на то, что баланс эмбриотрофических и эмбриотоксических цитокинов семенной жидкости обеспечивает механизм, посредством которого женский репродуктивный тракт отвечает на сигналы, получаемые с содержимым семенной жидкости самца, а далее либо



способствует поддержанию, либо препятствует развитию преимплантационного эмбриона, и, тем самым, может модулировать его долгосрочное программирование.

### **1.3.3. Влияние отцовских факторов на фенотип потомков**

Внимание исследователей, изучающих родительский вклад в фенотип потомков, сосредоточено, в первую очередь, на факторах, определяющих материнское влияние, тогда как роли отцов уделяется ограниченное внимание. Однако появляется все больше данных, подтверждающих идею о том, что неблагоприятные факторы, воздействующие на самцов до спаривания с самками, влияют на фенотипическое программирование их потомства (Anway et al., 2005; Terashima et al., 2015; Wu et al., 2016; Sun et al., 2018). Отцовские факторы, включая возраст, характер питания, условия окружающей среды, разнообразие патогенов, влияют на развитие сперматозоидов, их количество, качество и функцию (Lane et al., 2014; Fleming et al., 2018). В свою очередь, с этими изменениями параметров сперматозоидов связано развитие эмбрионов и успех беременности (Lane et al., 2014). Важно отметить, что отцовские факторы влияют на генетический и эпигенетический ландшафт программирования траектории развития эмбриона и плода, переносимый сперматозоидами и семенной жидкостью (Hales, Robaire, 2001). В частности, показано, что передача эпигенетической информации, включая некодирующие РНК в семенной жидкости и статус метилирования сперматозоидов (Liu et al., 2012; Fullston et al., 2012; 2013; Lambrot et al., 2013; Chen et al., 2016; Sharma et al., 2016), напрямую влияет на траекторию развития эмбрионов после оплодотворения. Одним из ярких примеров такого влияния является исследование эпигенетических эффектов диет, различающихся по содержанию фолиевой кислоты. Содержание самцов на дефицитной по фолиевой кислоте диете приводило к снижению фертильной способности. Авторы (Lambrot et al., 2013) показали, что отцовская диета изменяет метилирование ДНК сперматозоидов, которое сочетается с негативными репродуктивными последствиями, включая

врожденные дефекты у потомства. Участки генома сперматозоидов, несущие изменения в метилировании ДНК, связаны с генами, участвующими в развитии хронических заболеваний.

У людей и крупного рогатого скота искусственное оплодотворение очищенной спермой является успешным, а семенная жидкость не является необходимой для оплодотворения и становления беременности. Тем не менее, исследования, проведенные на мышах, показывают важность семенной жидкости для эмбрионального развития после оплодотворения, роста плода и здоровья потомков (Morgan, Watkins, 2020). Факторы семенной жидкости, модулирующие материнскую среду, также могут вызывать эпигенетические эффекты. Так, у мышей зачатие от самцов с удаленными семенными пузырьками вызывает снижение фертильности, нарушение развития эмбриона и программирование неблагоприятных последствий для здоровья потомства (Bromfield et al., 2014). В пометах, полученных от самцов с удаленными семенными пузырьками, потомство демонстрирует ожирение, гипертонию и пониженную толерантность к глюкозе, наиболее выраженное у самцов (Bromfield et al., 2014). Эти изменения сочетаются со снижением способности самцов стимулировать выработку самками эмбриотрофических цитокинов, защищающих эмбрионы от апоптоза, и неспособностью подавлять выработку эмбриотоксических цитокинов при беременности (Bromfield et al., 2014). Установлено, что эти эффекты опосредованы влиянием семенной плазмы на гуморальную среду материнского репродуктивного тракта, поскольку аналогичные результаты были получены в экспериментах при пересадках здоровых эмбрионов самкам-реципиентам после их спаривания с самцами с удаленными семенными пузырьками (Bromfield et al., 2014). У золотистых хомячков спаривание с самцами, у которых отсутствуют добавочные железы и их секрет в семенной жидкости, приводило к нарушению эмбрионального развития, снижению фертильной способности, а также к изменению темпов роста и увеличению тревожности их взрослых потомков (Chan et al., 2001; Jiang et al., 2001; Wong et al., 2007; 2008). У

хомяков эти изменения сочетаются с эпигенетическим перепрограммированием, которое проявляется в измененной кинетике ацетилирования и метилирования, а также в нарушении регуляции экспрессии импринтированных генов *Igf2* и *Dlk1* в эмбриональных тканях (Jiang et al., 2001). Исследования на мышах показывают, что отцовское ожирение изменяет гормональный профиль семенной плазмы (Binder et al., 2015), в то время как удаление белков из семенной жидкости подавляет ее способность стимулировать экспрессию материнских цитокинов и соответствующий Т-клеточный ответ (Watkins et al., 2018). Эти данные подчеркивают, что изменения в составе семенной жидкости не только проявляются в нарушении фертильной способности самцов, но могут влиять на развитие плода и оказывать долгосрочное влияние на здоровье потомства. В последнее время появляются клинические доказательства, что ЭКО у человека связано с изменением исходов здоровья у детей (Hart, Norman, 2013), и во многих отношениях этот клинический фенотип соответствует фенотипу потомков от самцов, лишенных жидкости семенных пузырьков (Bromfield et al., 2014). В своих исследованиях Ваткинс с соавторами показали, что у самок мышей среда репродуктивного тракта значительно изменяется в ответ на сперму самцов, получавших низкобелковую диету (Watkins et al., 2018). На 3-й – 5-й день беременности в матке самок, покрытых получавшими низкобелковую диету самцами, было обнаружено значительное снижение экспрессии TNF, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , MIP-1 $\alpha$  и CSF3, генов синтеза простагландинов и генов, связанных с ответами, опосредованными регуляторными Т-клетками (Treg), такими как *Cd3e*, *Foxp3* и *H2-Ab1*. Анализ бластоцист, взятых у этих же самок, выявил значительное снижение экспрессии множества генов в центральном метаболическом регуляторном пути АМПК (Watkins et al., 2017). В зрелом возрасте у потомков получавших низкобелковую диету самцов наблюдали ожирение, гипотензию, сердечно-сосудистую дисфункцию и пониженную толерантность к глюкозе (Watkins et al., 2014). Данные этих исследований показывают, что семенная жидкость

самцов, получавших низкобелковый рацион, вызывает недостаточный ответ репродуктивного тракта самки во время беременности, что, в конечном итоге, модулирует траекторию развития эмбриона, последующий рост плода и здоровье взрослого потомства.

Таким образом, женский иммунный ответ проявляет способность различать и реагировать на качество семенной жидкости и завершать спаривание беременностью только тогда, когда семенная жидкость имеет достаточное качество для имплантации эмбрионов и успешной беременности. Воздействие мужского эякулята дает возможность особям женского пола оценивать репродуктивную пригодность половых партнеров и влиять на распределение ресурсов, вкладываемых в беременность. Этот механизм гарантирует оптимальные репродуктивные инвестиции самок и, таким образом, максимизирует приспособленность потомства и здоровье последующего поколения.

## II. Материалы и методы

### 2.1. Животные и условия содержания

Все эксперименты проводились в Центре генетических ресурсов лабораторных животных Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики СО РАН (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI61914X0010). В экспериментах использовали мышей инбредных линий C57BL/6, BALB/c SPF-статуса в возрасте 12 – 14 недель. Протоколы экспериментов были одобрены Комитетом по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН. Мышей содержали в контролируемой среде: инвертированном фотопериоде 14C:10T, температуре 22 – 24 °С и влажности воздуха 40 – 50 %. В качестве подстилочного материала были использованы обеспыленные березовые опилки (ООО «Альбион», Новосибирск). Пищу (SNIFF, Германия) и воду давали *ad libitum* после автоклавирования (121 °С). Животных содержали в индивидуально вентилируемых клетках (OptiMice) однополыми группами по 5 особей. За пять дней до эксперимента самцы были рассажены по одному в отдельные клетки.

### 2.2. Экспериментальные исследования

#### 2.2.1. Влияние антигенной стимуляции мышей разных линий на характеристики сперматозоидов

Исследования выполнены на самцах инбредных линий C57BL/6 (n = 120) и BALB/c (n = 80) в возрасте 12 – 14 недель.

Для индукции иммунного ответа самцам вводили однократно внутрибрюшинно (100 мкл на самца) иммуногенный белок KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin, Native, MP biomedical, USA (SRP6195)) в дозе 50 мкг / мышь. Контрольным самцам вводили в дозе 100 мкл физиологического раствора / мышь.

### Экспериментальные группы:

**I. Контроль** – внутрибрюшинная инъекция физиологического раствора самцам C57BL/6 (n = 60) и BALB/c (n = 40);

**II. Иммунизация** – внутрибрюшинная инъекция KLH самцам C57BL/6 (n = 60) и BALB/c (n = 40).

После введения физиологического раствора или KLH контрольных и экспериментальных животных декапитировали на 3, 9, 15, и 21 сутки (таблица 1).

Таблица 1. Влияние антигенной стимуляции мышей разных линий на характеристики сперматозоидов (число исследованных животных)

Линия		3 сутки (n = 50)	9 сутки (n = 50)	15 сутки (n = 50)	21 сутки (n = 50)
C57BL/6	Контроль	15	15	15	15
	KLH	15	15	15	15
BALB/c	Контроль	10	10	10	10
	KLH	10	10	10	10

Для получения плазмы кровь центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 минут, плазму собирали в отдельные пробирки и хранили при температуре минус 80 °С до проведения анализов. Далее извлекали и взвешивали тимус, селезенку, препуциальные железы, семенные пузырьки, семенники и эпидидимисы. Эпидидимис разделяли на головку и каудальную части, каждую часть помещали в отдельную пробирку, содержащую 500 мкл (плюс 37 градусов Цельсия) раствора Хенкса (Sigma) без магния и кальция.

Характеристики сперматозоидов: концентрация ( $10^6$  сперматозоидов/мл); морфология – размер ( $\text{мкм}^2$ ), средний размер головки ( $\text{мкм}^2$ ); элонгация (ширина головки / длина); показатели подвижности – подвижность (% подвижных со средней скоростью  $\geq 30$   $\text{мкм/с}$ ); VAP (скорость равномерного движения в  $\text{мкм/с}$ ); VSL (скорость прямолинейного движения в  $\text{мкм/с}$ ); VCL (криволинейная скорость в  $\text{мкм/с}$ ); BSF (частота

биения хвоста в Гц); STR (прямолинейность в % VSL / VAP); LIN (линейность в % VSL / VCL) были исследованы при помощи автоматического анализатора спермы со встроенной оптической системой Mouse-Traxx (Hamilton Thorne, USA).

### **2.2.2. Исследование влияния иммунизации самцов линии C57BL/6 на репродуктивный успех и беременность**

Исследование выполнено на самцах (50 особей) и самках (60 особей) в возрасте 12 – 16 недель.

#### **Экспериментальные группы:**

I. Контроль – введение физиологического раствора:

10 самцов – одиночное содержание;

15 самцов – ссаживание каждого самца с двумя самками.

II. Иммунизация – введение KLN:

10 самцов – одиночное содержание;

15 самцов – ссаживание каждого самца с двумя самками.

На 9-ый день после введения KLN или физиологического раствора одиночно содержащихся самцов декапитировали, кровь для получения плазмы центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 минут, плазму хранили при температуре минус 80 °С до проведения анализов. Семенные пузырьки взвешивали и помещали в пробирку эппендорф, содержащую 500 мкл фосфатного буфера, гомогенизировали и центрифугировали при 4000 об/мин в течение 20 минут, гомогенат собирали в отдельные пробирки и хранили при температуре минус 80 °С до проведения анализов.

Для получения беременных самок и взрослого потомства на 9-й день после введения KLN или физиологического раствора к каждому самцу подсаживали по две случайно выбранных виргинных самки сразу же после выключения света (16.00 по местному времени). Самок содержали с самцами в течение 6 дней, этого времени достаточно для достижения каждой самкой эструса (Nelson et al., 1982; Byers et al., 2012) и, соответственно,

осуществления фертильного покрытия. На следующее утро после подсадки к самцу (09 – 10 часов) и далее ежедневно в течение 6 дней самки были обследованы на наличие вагинальной пробки, как индикатора беременности. При обнаружении вагинальной пробки самок отсаживали в отдельные клетки. Непокрытых самок отсаживали от самцов через 6 дней совместного содержания. Через 6 дней содержания самцов с самками (на 15-й день после введения КЛН или физиологического раствора) самцов декапитировали. Плазма крови, семенные пузырьки и эпидидимисы были собраны согласно протоколам, описанным выше. Беременность была установлена у 20-ти самок в контрольной группе и у 24-х – в экспериментальной группе. На 16-е сутки беременности 9 самок из контрольной группы и 15 из экспериментальной группы были декапитированы. Остальные самки – 11 из контрольной и 9 из экспериментальной группы – рожали и выкармливали потомков.

Собранную после декапитации беременных самок кровь центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин для получения плазмы. Самок вскрывали, определяли общее число плодов с учетом резорбированных и живых плодов. 16-дневные плоды извлекали и взвешивали, собранную амниотическую жидкость центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Полученную плазму и амниотическую жидкость переносили в чистые пробирки, замораживали при температуре минус 80 °С и хранили до проведения анализов.

### **2.2.3. Исследование влияния иммунизации отцов на фенотип взрослых потомков**

Все самки (11 самок из контрольной группы и 9 из экспериментальной) успешно родили потомков. В течение суток после родов было подсчитано число потомков в каждом помете. Далее, на протяжении периода выкармливания, проводили ежедневные осмотры и фиксировали все случаи гибели потомков. В возрасте трёх недель потомки были взвешены и отсажены от матерей в отдельные клетки по 5 особей в соответствии с их половой принадлежностью.



В возрасте 14 – 15 недель каждая группа самцов – потомков контрольных и иммунизированных отцов, отобранных случайным образом из равных по величине помётов, была разделена на 2 группы:

### **Группы:**

#### **I. Потомки контрольных самцов:**

Контроль (n = 7) – внутрибрюшинная инъекция 100 мкл физиологического раствора;

Иммунизация (n = 7) – внутрибрюшинная инъекция 100 мкл КЛН

#### **II. Потомки иммунизированных самцов:**

Контроль (n = 7) – внутрибрюшинная инъекция 100 мкл физиологического раствора;

Иммунизация (n = 7) – внутрибрюшинная инъекция 100 мкл КЛН.

На 9-е сутки после инъекций физиологического раствора или КЛН животные были декапитированы, собранная кровь была центрифугирована при 3000 об/мин в течение 15 минут, плазма крови хранилась при температуре минус 80 °С до проведения исследований. Параметры сперматозоидов иммунизированных и контрольных самцов были исследованы при помощи автоматического анализатора спермы со встроенной оптической системой Mouse-Traxx (Hamilton Thorne, USA).

У отдельных групп не получавших инъекций самцов, потомков контрольных (n = 5) и иммунизированных отцов (n = 5), исследовали содержание нейрометаболитов в амигдале и коре головного мозга методом магнитно-резонансной спектроскопии (МРС).

## **2.3. Методы**

### **2.3.1. Магнитно-резонансная спектроскопия**

Нейрометаболиты мозга были исследованы у 5 самцов – потомков экспериментальных и 5 самцов – потомков контрольных отцов, по 1 самцу из равных по численности выводков. Содержание метаболитов определяли с использованием горизонтального томографа с магнитным полем 11,7 Тл

(Bruker, Biospec 117/16 USR, Германия) и градиентными катушками внутреннего диаметра 9 см (амплитуда: 750 мТ/м и скорость нарастания: 6660 Т/м/с). Все протонные спектры головного мозга мышей были получены с использованием передающей объемной (500,3 МГц, диаметр 72/89 мм) и приемной поверхностной (500,3 МГц, размером 123 × 64 × 31 мм) <sup>1</sup>H радиочастотных катушек. В данном случае мыши были обездвижены при использовании ингаляционного наркоза (Isoflurane; Baxter Healthcare Corp., Deerfield, IL) с использованием прибора Univentor 400 (Univentor, Zejtun, Мальта). Для поддержания температуры тела животного во время исследования использовали водяной контур в томографическом столике, температура поверхности которого составляла 30 °С. Пневматический датчик дыхания (SA Instruments, Stony Brook, NY) был помещен под тело, что позволяло контролировать глубину анестезии. Все протонные спектры мышечной миндалины и коры были записаны. Для правильного позиционирования спектроскопических вокселей (1,0 × 1,0 × 2,0 мм) методом RARE (rapid with relaxation enhancement) с параметрами импульсной последовательности TE = 11 мс, TR = 2,5 с были сняты T2-взвешенные изображения высокого разрешения (толщина среза 0,5 мм, поле обзора 2,5 × 2,5 см и размер матрицы 256 × 256 точек) амигдалы и фронтальной коры головного мозга мышей. Все протонные спектры получены с помощью пространственно-локализованной одновоксельной спектроскопии методом STEAM (stimulated echo acquisition mode spectroscopy) с параметрами импульсной последовательности TE = 3 мс, TR = 5 с и количеством накоплений 150. Перед каждым спектроскопическим измерением проводили настройку однородности магнитного поля в пределах выбранного вокселя с помощью методики FastMap. Подавление сигнала воды в спектрах осуществлялось с помощью импульса переменной мощности и оптимизированной задержки релаксационной последовательности (VAPOR) (Tkáč et al., 1999). Для обработки экспериментальных спектров <sup>1</sup>H МРС и определения количественного состава метаболитов использовалась

оригинальная разработанная специализированная компьютерная программа, основанная, как и программный пакет LCModel (Provencher, 1993), на предположении о том, что спектр смеси известных соединений представляет собой линейную комбинацию спектров анализируемых компонентов.

### **2.3.2. Иммунизация взрослых потомков**

Внутрибрюшинное введение KLH или физиологического раствора проводили согласно описанному ранее протоколу. На 9-й день после введения KLH или физиологического раствора, самцы были взвешены и декапитированы. Тимус, селезенка, препуциальные железы, семенные пузырьки, семенники и эпидидимисы были извлечены и взвешены. Кровь была собрана, центрифугирована при 3000 об/мин в течение 15 минут для получения плазмы. Собранную плазму переносили в чистые пробирки, замораживали при температуре минус 80 °С и хранили до проведения анализов.

### **2.3.3. Определение специфических к гемоцианину иммуноглобулинов IgG**

Содержание в плазме крови и в семенной жидкости анти-KLH IgG определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). В качестве негативного контроля использовали плазму крови контрольных самцов C57BL/6.

В каждую лунку иммунологического планшета с плоским дном вносили по 50 мкл гемоцианина (KLH, Sigma) в концентрации 10 мг/мл в фосфатном буфере, инкубировали 24 часа при температуре плюс 4 °С и промывали фосфатным буфером с Твин-20 (в конечной концентрации 0,01 %), блокировали бычьим сывороточным альбумином 1% в фосфатном буфере (100 мкл), инкубировали 2 часа при комнатной температуре и промывали фосфатным буфером с Твин-20 (в конечной концентрации 0,01 %).

Уровень IgG определяли в образцах плазмы крови иммунизированных животных после предварительного титрования образца плазмы,

пулированного от 10 иммунизированных самцов, в разведениях 1 : 100; 1 : 200; 1 : 400; 1 : 800 и 1 : 1600. По результатам титрования было определено оптимальное разведение 1 : 200, которое было использовано в дальнейшем при определении уровня анти-KLN IgG. Уровень IgG в семенной жидкости проводили без разбавления образцов. Позитивную и негативную (контрольные самцы) плазму, разведенную в 200 раз фосфатным буфером, вносили по 100 мкл в лунки планшета, покрытые гемоцианином. Планшеты с образцами плазмы и семенной жидкости инкубировали 3 часа при температуре плюс 37 °С в термошейкере SkyLine (ELMI) и после инкубации промывали фосфатным буфером с Твин-20 (в конечной концентрации 0,01 %) с помощью автоматического промывателя планшет Wellwash (Thermo-Scientific).

Вторичные биотинилированные анти-IgG (BD Biosciences), специфичные к IgG мыши (разведение 1 : 200), вносили по 100 мкл и инкубировали 1 час при температуре плюс 37 °С. После инкубации планшеты вновь промывали и в каждую лунку вносили по 100 мкл конъюгата (стрептавидин-пероксидаза 1:5000). После инкубации в течение 1 часа при температуре плюс 37 °С и последующей промывки в каждую лунку вносили по 100 мкл субстрата ABTS (Sigma-Aldrich), инкубировали при комнатной температуре 30 мин. Оптическую плотность раствора в лунках измеряли на планшетном фотометре вертикального сканирования iMark (Bio-RAD) при длине волны 415 нм. При статистической обработке были использованы значения оптической плотности (ОП). Содержание специфических к KLN IgG в плазме крови и семенной жидкости контрольных самцов не превышало значений холостых проб при всех разведениях.

#### **2.3.4. Исследование сперматозоидов**

В образцах головки и каудальной части эпидидимиса, находящихся в 500 мкл раствора Хенкса (Sigma) без магния и кальция, делали 5-6 надрезов и помещали на 20 мин в термостат при плюс 37 °С. При помощи автоматического анализатора спермы Mouse-Traxx (Hamilton Thorne, USA)

были измерены следующие параметры сперматозоидов: концентрация ( $10^6$  сперматозоидов/мл); размер ( $\text{мкм}^2$ ); средний размер головки ( $\text{мкм}^2$ ); элонгация (% ширины головки сперматозоида к длине); подвижность (скорость подвижных сперматозоидов со средней скоростью  $\geq 30$   $\text{мкм/с}$  / прогрессивная скорость  $\geq 15$   $\text{мкм/с}$  в %); VAP скорость равномерного движения ( $\text{мкм/с}$ ); VSL скорость прямолинейного движения ( $\text{мкм/с}$ ); VCL криволинейная скорость ( $\text{мкм/с}$ ); BSF поперечная частота биения хвоста (Гц); STR прямолинейность (% , VSL / VAP); LIN (линейность %, VSL / CL). В каждом образце было исследовано 5 полей при четырёхкратном увеличении. Все манипуляции проводились при температуре плюс  $37^\circ\text{C}$ .

### **2.3.5. Иммуноферментный анализ гормонов**

Концентрации стероидных гормонов в амниотической жидкости и плазме крови определяли иммуноферментным методом с использованием наборов «ТЕСТОСТЕРОН-ИФА» и «ПРОГЕСТЕРОН-ИФА» производства ООО «ХЕМА». Минимальная определяемая концентрация тестостерона составляла  $0,087$  нг/мл, а стандартное отклонение метода внутри и между анализами составляло  $8,2\%$  и  $5,6\%$  соответственно. Минимальная определяемая концентрация прогестерона составляла  $0,15$  нг/мл, а стандартное отклонение метода внутри и между анализами составляло  $7,6\%$  и  $4,3\%$  соответственно. Измерения выполняли без предварительной экстракции в соответствии с инструкцией производителя.

### **2.3.6. Определение цитокинов ELISA**

Содержание  $\text{TNF}\alpha$  в семенной жидкости определяли иммуноферментным методом с помощью набора Mouse TNF alpha ELISA kit (eBioscience, USA). Измерения выполняли в соответствии с инструкцией производителя. Стандартное отклонение метода внутри и между анализами составляло  $7,4\%$  и  $9,5\%$  соответственно.

Содержание GM-CSF в амниотической жидкости определяли иммуноферментным методом с помощью набора Mouse GM-CSF ELISA Set

(BD Bioscience, USA). Измерения выполняли в соответствии с инструкцией производителя. Стандартное отклонение метода внутри и между анализами составляли 5,2 % и 3,9 % соответственно. Уровень GM-CSF в крови был ниже предела обнаружения.

### **2.3.7. Статистическая обработка данных**

Распределение изучаемых признаков было оценено с помощью критерия Колмогорова – Смирнова. В зависимости от характера распределения применяли параметрические (нормальное распределение) или непараметрические (ненормальное распределение) критерии статистического анализа. Пороговое значение величины  $F$ -критерия для параметров сперматозоидов, соответствующее уровню статистической значимости  $p < 0,05$ , было установлено исходя из числа степеней свободы (Снедекор, 1961; Лакин, 1968). В частности, при анализе эффектов иммунизации на показатели сперматозоидов ( $df = 1,45$ ) величина  $F$ -критерия равнялась 4,06. Для выяснения статистической значимости отцовского влияния и влияния иммунизации на потомков использовали параметрический и непараметрический (тест Фридмана) двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Отцовское влияние на массу тела потомков было проанализировано с помощью ковариационного анализа (ANCOVA), где иммунизация отцов и пол потомства использовались в качестве факторов, а размер помета до отъёма в качестве ковариаты. Для средних показателей был использован Student  $t$ -test. Для оценки статистических различий между группами по концентрации тестостерона в амниотической жидкости и плазме крови, IgG в плазме крови и семенной жидкости и TNF $\alpha$  в семенной жидкости был использован непараметрический критерий Манна-Уитни. Коэффициенты корреляции Пирсона ( $r$ ) рассчитывались для характеристик сперматозоидов и уровня тестостерона в плазме крови. Разница между суммой потомства от иммунизированных и контрольных отцов оценивалась с помощью критерия хи-квадрат ( $\chi^2$ ). Статистическая значимость

рассматривалась при  $p < 0,05$ . Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SE).

### III. Результаты

#### 3.1. Влияние антигенной стимуляции на характеристики сперматозоидов мышей разных линий

##### 3.1.1. Динамика адаптивного иммунного ответа самцов линий C57BL/6 и BALB/c на введение KLH

Введение KLH стимулировало реакцию антителообразования, которая проявлялась в росте уровня анти-KLH IgG в плазме крови (рисунок 1). На уровень специфических анти-KLH IgG статистически значимо влияли время после инъекции KLH ( $F_{3,90} = 23,3; p < 0,001$ ), линий мышей ( $F_{3,90}=7,3; p = 0,008$ ) и взаимодействие этих факторов ( $F_{3,90} = 3,4; p = 0,02$ ). У мышей линии C57BL/6 уровень анти-KLH IgG возрастал и выходил на плато через 9 дней после иммунизации. У линии BALB/c имел место монотонный рост уровня анти-KLH IgG, которая достигала максимума на 21 сутки после введения KLH.



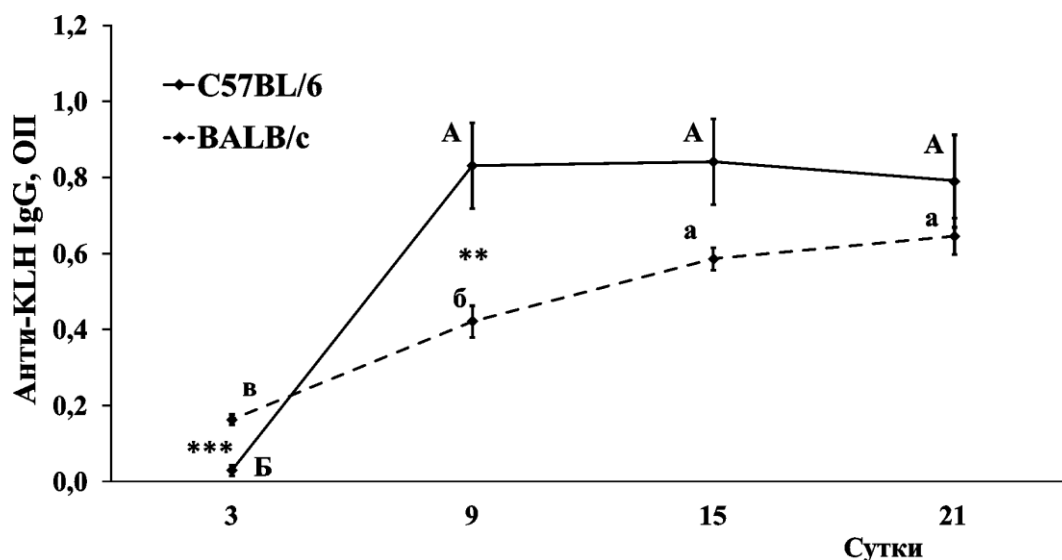


Рисунок 1. Содержание специфических анти-KLN IgG в образцах плазмы крови, полученных от мышей исследуемых линий в разные сроки после введения KLH.

Различия между линиями: \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$  (Student *t*-test);

Разными буквами обозначены достоверно различающиеся значения средних величин (LSD тест): для C57BL/6 (А, Б); для BALB/c (а, б, в).

Уровень тестостерона в плазме крови (таблица 2) был практически одинаковым у исследуемых линий мышей (эффект линии –  $F_{1,101} = 0,69$ ;  $p = 0,41$ ) и существенно не изменялся после иммунизации (эффект KLH –  $F_{1,101} = 3,79$ ;  $p = 0,13$ ).

Таблица 2. Уровень тестостерона (нг/мл) в плазме крови самцов C57BL/6 и BALB/c в разные дни после инъекций KLH и физиологического раствора

День	C57BL/6		BALB/c	
	Контроль (n = 14)	KLH (n = 14)	Контроль (n = 10)	KLH (n = 10)
3	3,01 ± 1,81	5,21 ± 1,70	2,76 ± 1,83	6,09 ± 2,18
9	5,14 ± 2,07	8,27 ± 1,88	2,26 ± 0,47	3,25 ± 1,64
15	7,37 ± 2,70	4,57 ± 1,09	3,48 ± 0,41	7,23 ± 2,22
21	5,50 ± 2,05	7,00 ± 1,62	7,40 ± 3,70	9,55 ± 3,04

### 3.1.2. Параметры сперматозоидов в динамике иммунного ответа самцов линии C57BL/6 и BALB/c

Результаты дисперсионного анализа влияния факторов «линия» × «иммунизация» × «день после иммунизации» выявили значимое влияние на концентрацию сперматозоидов: линии  $F_{1,175} = 98,95$ ,  $p < 0,0001$  и дня взятия образцов из каудальной части эпидидимиса  $F_{3,173} = 5,044$ ,  $p < 0,002$ , а на подвижность сперматозоидов  $F_{1,173} = 52,43$ ,  $p < 0,0001$  и  $F_{3,173} = 12,69$ ,  $p < 0,0001$  соответственно.

Число сперматозоидов и их подвижность были существенно выше у самцов линии C57BL/6 по сравнению с линией BALB/c (Таблица 3). Морфология (форма головки) и характеристики подвижности сперматозоидов также различались у исследованных линий мышей. Скорость равномерного движения (VAP), скорость прямолинейного движения (VSL) и прямолинейность (STR) были заметно выше у мышей линии C57BL/6, чем у линии BALB/c. Соответственно, криволинейная скорость (VCL) была выше у сперматозоидов самцов линии BALB/c. Такое же соотношение исследуемых линий имело место для показателей, отражающих перемещения головки

сперматозоидов: амплитуды бокового смещения головки (ALH) и поперечной частоты биения хвоста сперматозоидов (BCF).

При этом размеры головки сперматозоидов самцов линии BALB/c превосходили таковые у сперматозоидов линии C57BL/6. В целом наблюдаемые межлинейные различия соответствовали данным других авторов (Albert, Roussel, 1984).

Индивидуальные характеристики сперматозоидов статистически значимо коррелировали с уровнем тестостерона в плазме крови, но только у самцов линии C57BL/6 (таблица 4). При этом вариации уровня тестостерона положительно коррелировали со степенью элонгации головки, долей подвижных сперматозоидов и показателями скорости их перемещения, отрицательно – с размерами головки и частотой биений хвостом. Вся совокупность статистически значимых корреляций указывает на то, что у линии C57BL/6 степень зрелости сперматозоидов, проявлением которой является большая подвижность и большая вытянутость – элонгация головки, находится в прямой зависимости от уровня тестостерона.

Влияние антигенной стимуляции на число, форму и подвижность сперматозоидов, оцененных по общей выборке, полученной в разные сроки после введения KLH, было статистически не значимым (таблица 3). Но, как известно, иммунный и нейроэндокринный ответы развиваются во времени. Поэтому статистическая значимость эффектов иммунизации могла варьировать в зависимости от времени с момента введения KLH, что и демонстрирует рисунок 2, на котором показаны изменения во времени значений *F*-критерия, отражающего вклад иммунизации в варьирование числа, формы и подвижности сперматозоидов. Значения *F*-критерия превышали пороговый уровень статистической значимости только для двух показателей (концентрация и подвижность), измеренных на третьи сутки после инъекций KLH или физиологического раствора (рисунок 2).

Таблица 3. Концентрация, морфометрия, подвижность и кинематика положения сперматозоидов контрольных и иммунизированных самцов линий C57BL/6 и BALB/c

Признаки	C57BL/6		BALB/c		ANOVA			
	Контроль (n = 60)	KLH (n = 60)	Контроль (n = 40)	KLH (n = 40)	Линия		KLH	
					$F_{1,189}$	$p$	$F_{1,189}$	$p$
VAP, мкм/с	39,4 ± 0,7	39,5 ± 0,7	91,2 ± 2,2	90,1 ± 2,5	1449,7	< 0,001	0,06	= 0,81
VSL, мкм/с	24,2 ± 0,6	24,8 ± 0,6	60,5 ± 2,0	59,7 ± 2,1	731,8	< 0,001	0,001	= 0,98
VCL, мкм/с	234,2 ± 3,4	234,3 ± 3,0	205,4 ± 4,1	201,4 ± 5,2	62,9	< 0,001	0,17	= 0,81
ALH, мкм	12,6 ± 0,2	12,0 ± 0,3	13,2 ± 0,2	13,2 ± 0,2	13,0	< 0,001	2,80	= 0,09
BCF, Гц	35,0 ± 0,7	35,2 ± 0,6	40,4 ± 0,4	39,9 ± 0,4	70,7	< 0,001	0,02	= 0,88
STR	58,5 ± 0,6	59,4 ± 0,6	62,2 ± 0,6	62,7 ± 0,9	25,8	< 0,001	1,28	= 0,25
LIN	31,6 ± 0,6	32,3 ± 0,6	30,6 ± 0,6	31,1 ± 0,6	3,2	= 0,08	1,04	= 0,31
Элонгация	62,9 ± 0,5	62,4 ± 0,6	63,3 ± 0,4	63,1 ± 0,6	0,93	= 0,33	0,06	= 0,81
Размер, мкм <sup>2</sup>	28,2 ± 1,0	28,3 ± 1,0	32,2 ± 1,0	32,0 ± 1,4	12,1	< 0,001	0,001	= 0,98
Концентрация, млн/мл	16,0 ± 0,9	15,1 ± 0,7	9,2 ± 0,5	8,0 ± 0,4	92,7	< 0,001	2,03	= 0,15
Подвижность, %	74,1 ± 1,8	72,2 ± 2,2	60,0 ± 1,9	55,7 ± 2,5	51,2	< 0,001	2,82	= 0,18

Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA был использован для оценки эффектов «линии» и «иммунизации»

Таблица 4. Ранговые корреляции (Спирмен) содержания тестостерона в плазме крови и характеристик сперматозоидов у мышей линий C57BL/6 и BALB/c

Признаки	C57BL/6	BALB/c
VAP	<b>0,357**</b>	-0,127
VSL	<b>0,290*</b>	-0,138
VCL	0,106	-0,103
ALH	0,008	-0,240
BCF	<b>-0,475***</b>	0,081
STR	0,138	-0,152
LIN	<b>0,283*</b>	-0,136
Элонгация	<b>0,414***</b>	-0,174
Размер	<b>-0,369**</b>	-0,001
Концентрация	-0,054	0,003
Подвижность	<b>0,414**</b>	-0,047

\* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$

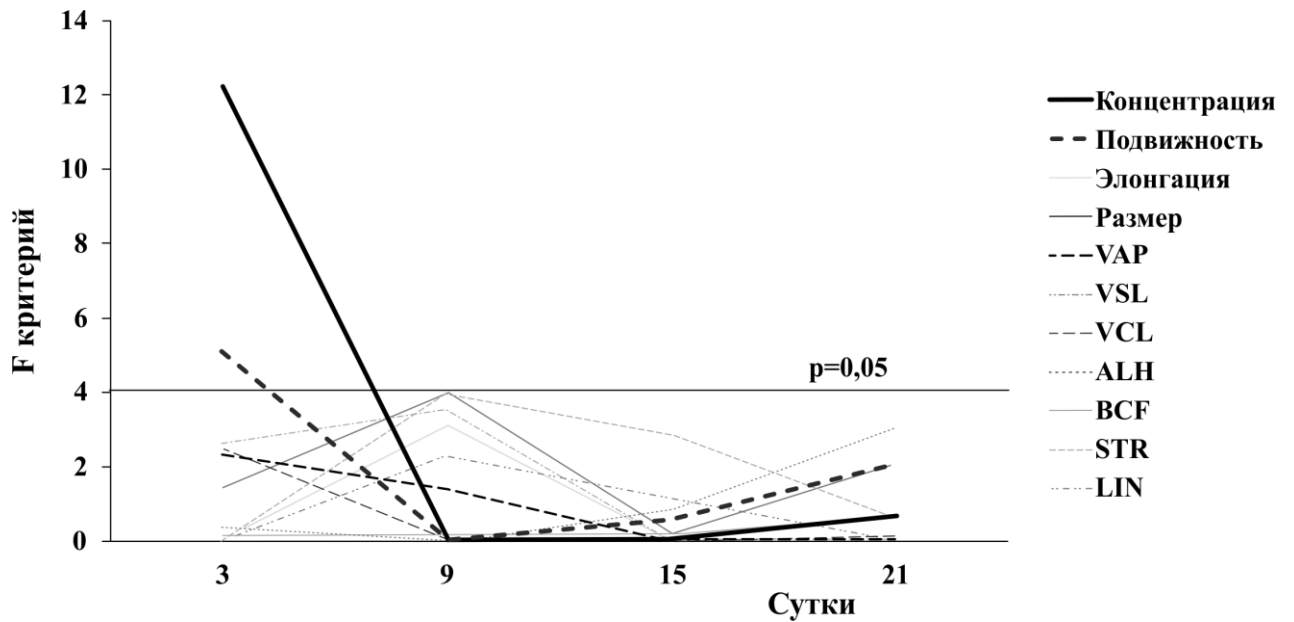


Рисунок 2. Влияние иммунизации ( $F$ -критерий) на морфофункциональные характеристики сперматозоидов контрольных и антигенстимулированных мышей обеих линий, измеренных в разные сроки после введения КЛН или физиологического раствора. Значения  $F$ -критерия получены при использовании двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA с факторами «линия» и «иммунизация». Пороговое значение  $F_{1,45}$  для  $p = 0,05$  обозначено горизонтальной линией.

При этом у самцов обеих линий было отмечено снижение концентрации и подвижности сперматозоидов в образцах, взятых через 3 дня после иммунизации (рисунки 3, 4). В остальные сроки различия между контрольными и антигенстимулированными животными были статистически недостоверными.

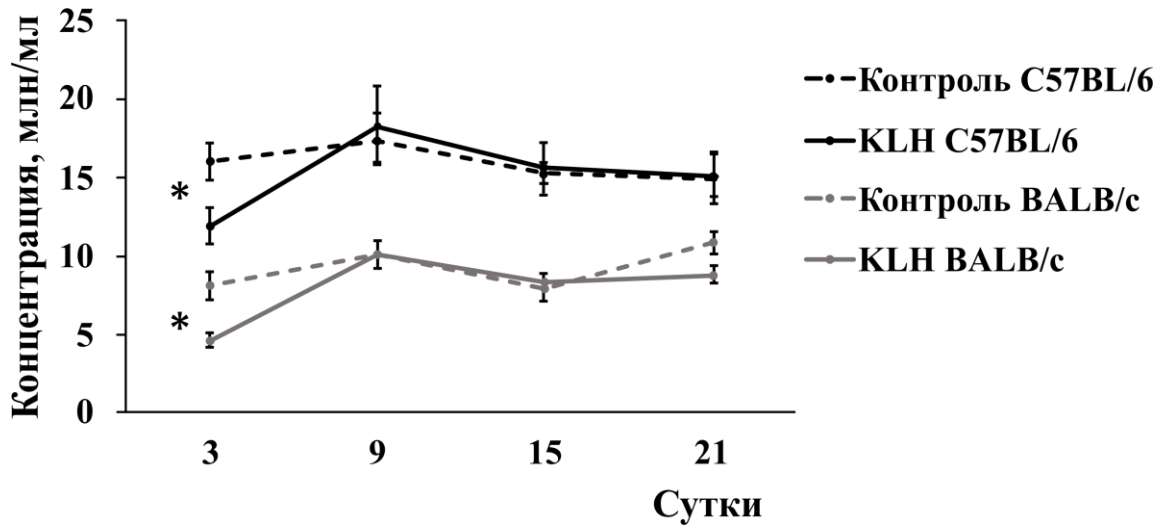


Рисунок 3. Динамика концентрации сперматозоидов в эпидидимисах мышей линий C57BL/6 and BALB/c в разные сроки после введения KLH или физиологического раствора.

\* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем (Student  $t$ -test).

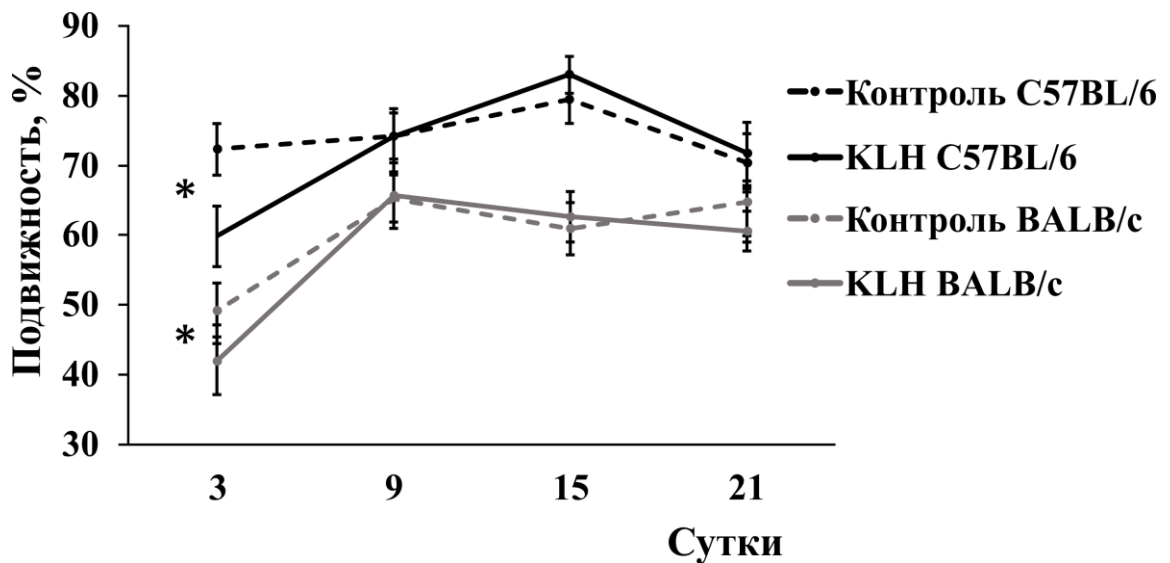


Рисунок 4. Динамика подвижности сперматозоидов в эпидидимисах мышей линий C57BL/6 и BALB/c в разные сроки после введения KLH или физиологического раствора.

\* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем (Student  $t$ -test).

## 3.2. Исследование влияния иммунизации самцов линии C57BL/6 на репродуктивный успех и беременность

### 3.2.1. Уровень Анти-KLN IgG и тестостерона у самцов линии C57BL/6

Уровень анти-KLN IgG в плазме крови у одиночно содержащихся самцов линии C57BL/6 достигал максимальных величин на 9-й день после внутрибрюшинной инъекции KLN и далее показатели анти-KLN IgG не изменялись до 21-го дня (рисунок 5). Это свидетельствует о том, что самцы при спаривании с интактными самками между 9-м и 15-м днями после иммунизации находились в стабильном состоянии антителообразования.

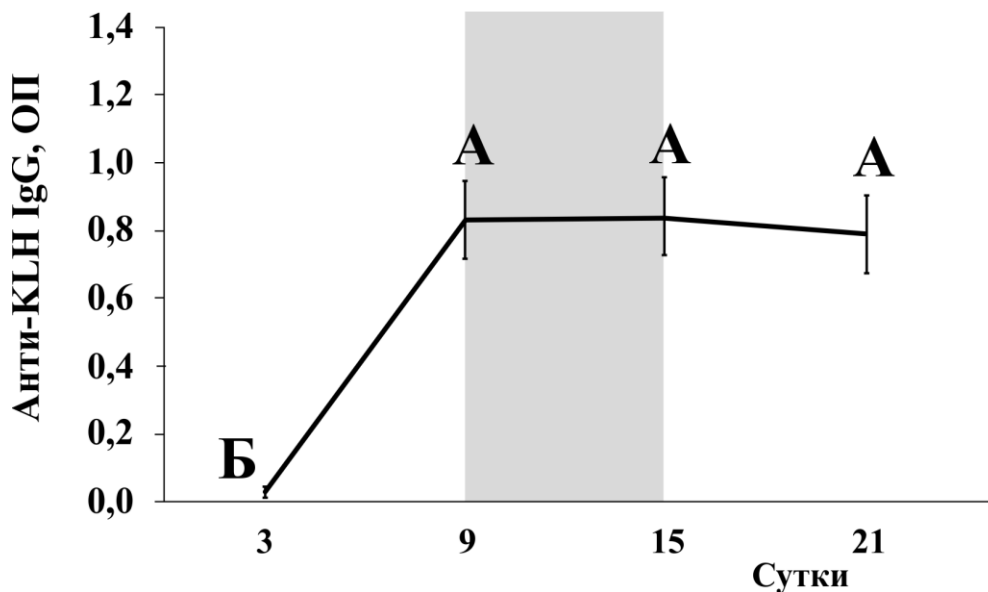


Рисунок 5. Динамика уровня анти-KLN IgG в плазме крови, выраженная как ОП. Буквы указывают на статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) в соответствии с LSD-test. Время спаривания после введения KLN указано серой полосой.



Значения ОП, отражающие уровни анти-KLN IgG в плазме крови и семенной жидкости, не отличались у иммунизированных самцов до и после спаривания (рисунок 6). Уровень анти-KLN IgG в плазме крови имел положительную корреляцию с уровнем анти-KLN IgG в семенной жидкости ( $r = 0,54, p < 0,005, n = 25$ ).

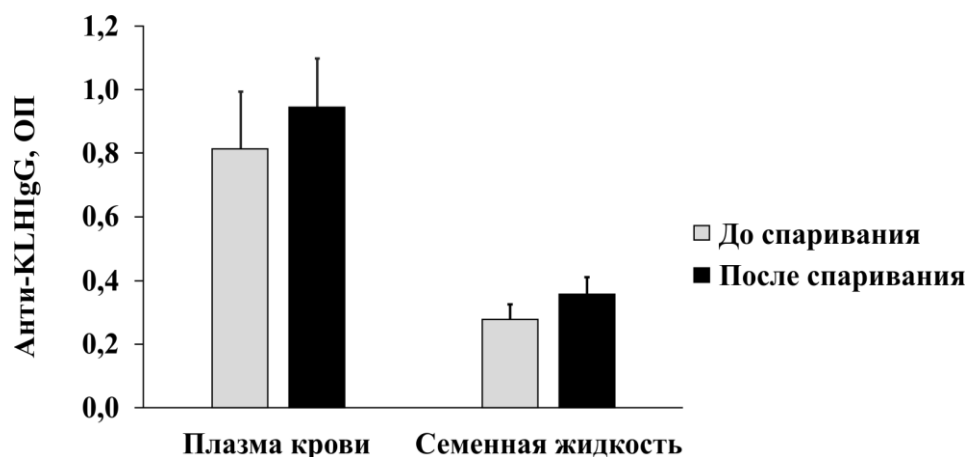


Рисунок 6. Уровень анти-KLN IgG в плазме крови и семенной жидкости до и после спаривания.

Непараметрический двухфакторный анализ ANOVA (тест Фридмана) выявил статистически значимое влияние «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 7). До спаривания (на 9-й день после иммунизации) уровень тестостерона в плазме крови иммунизированных и контрольных самцов не различался. После спаривания (на 15-й день после иммунизации) иммунизированные самцы показали более высокий уровень тестостерона в плазме крови по сравнению с контрольными самцами. В частности, уровень тестостерона в плазме после спаривания значимо увеличивался у иммунизированных и не изменялся у контрольных самцов (рисунок 7). Уровень анти-KLN IgG в семенной жидкости положительно коррелировал с

уровнем тестостерона в плазме крови ( $r = 0,56$ ,  $p = 0,027$ ,  $n = 15$ ) после спаривания.

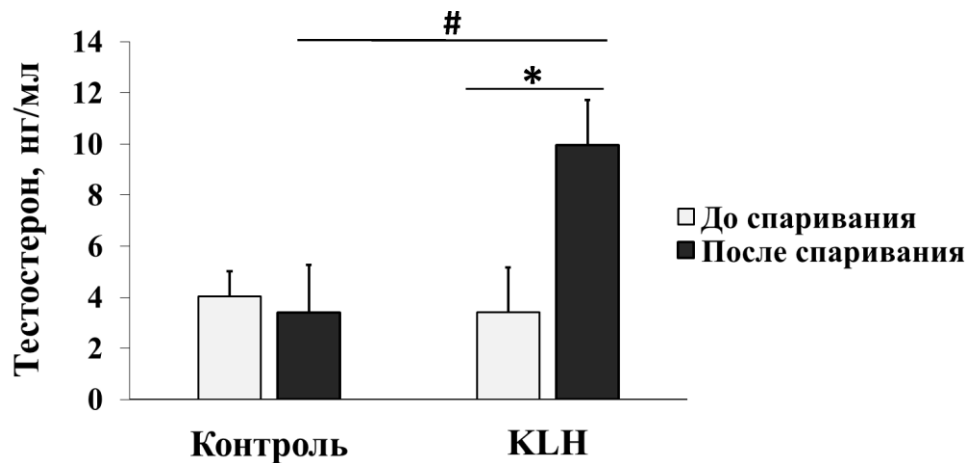


Рисунок 7. Уровень тестостерона в плазме крови у контрольных и иммунизированных самцов до и после спаривания. Статистически значимые различия по Mann – Whitney U-test: # –  $p < 0,025$  для сравнения иммунизированных и контрольных самцов после спаривания;

\* –  $p = 0,037$  для сравнения иммунизированных самцов до и после спаривания.

Согласно непараметрическому двухфакторному анализу ANOVA (тест Фридмана) на уровень TNF $\alpha$  в семенной жидкости «иммунизация», «спаривание» и взаимодействие между этими факторами не влияли (рисунок 8).

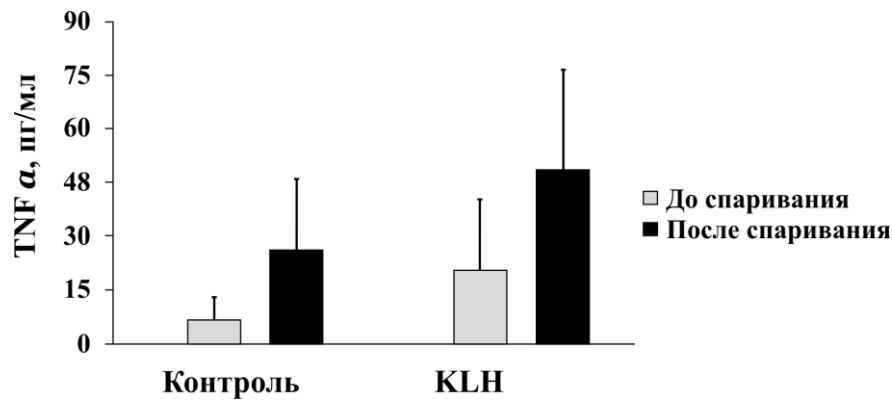


Рисунок 8. Уровень TNF $\alpha$  в семенной жидкости у контрольных и иммунизированных самцов до и после спаривания.

### 3.2.2. Влияние иммунизации самцов линии C57BL/6 на фертильную способность, беременность и пренатальное развитие потомков

Содержание самок с самцами в течение 6-ти дней завершилось 20-ю фертильными спариваниями ( $70,0 \pm 8,4$  %) в группе контрольных самцов, а антигенстимулированные самцы совершили 24 фертильных спариваний ( $83,3 \pm 5,0$  %). Разница между этими группами не была статистически достоверной.

В то же время, показатель кумулятивного роста числа потомков (плоды и новорожденные), рассчитанный как доля потомков, зачатых за первые два дня содержания самок с самцами, значительно различался между контрольной и экспериментальной группами (рисунок 9А). В частности, доля потомков, зачатых за этот период совместного содержания самок с самцами, 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's  $t$ -test). В последующие – с третьего по шестой – дни 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's  $t$ -test) (рисунок 9В).

С точки зрения абсолютных чисел количество потомков, произведенных в первые два дня, достоверно не различалось у контрольных и антигенстимулированных самцов (рисунок 9Б). В период с третьего по шестой день содержания с самками иммунизированные самцы зачали больше потомства, чем контрольные самцы ( $\chi^2 = 6,04$ ,  $p = 0,014$ ) (рисунок 9В).

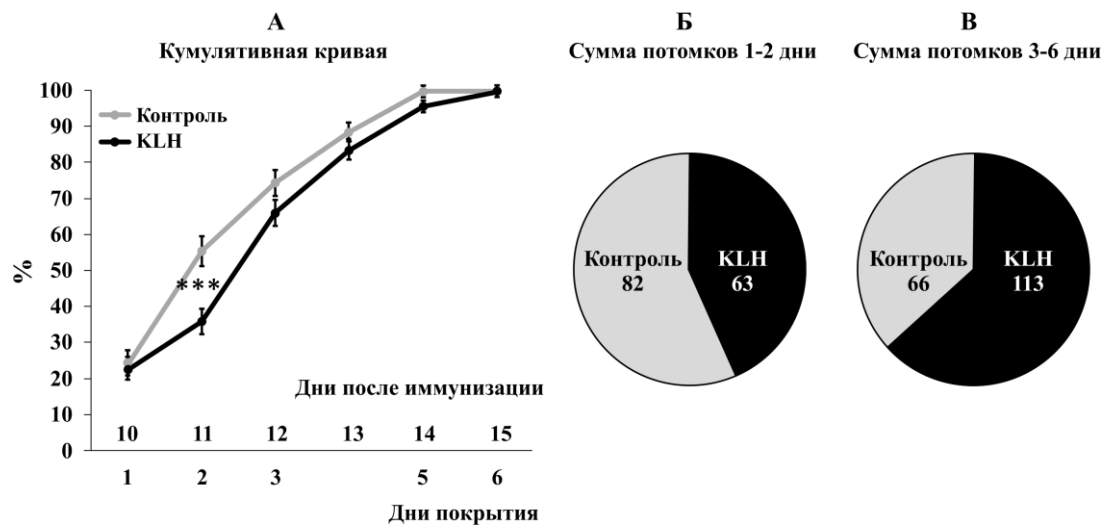


Рисунок 9. Репродуктивный успех контрольных и иммунизированных самцов при спаривании с интактными самками.

А – Кумулятивная кривая, отражающая доли потомков, зачатых контрольными или иммунизированными самцами в разное время от момента спаривания с двумя интактными самками. Время после введения KLH или физиологического раствора указано над осью  $x$ . Student's  $t$ -test ( $df = 322$ ): \*\*\* –  $p < 0,001$  для сравнения контрольных и иммунизированных самцов.

Б, В – круговые диаграммы, показывающие количество живых плодов (сумма потомков), зачатых контрольными или иммунизированными самцами на первом (1 – 2 дни) (Б) и втором (3 – 6 дни) (В) этапе спаривания. Количество плодов, полученных от контрольных и иммунизированных самцов, не различалось ( $\chi^2 = 1,38$ ,  $p = 0,24$ ) в первые два дня. В последующие – с третьего по шестой – дни иммунизированные самцы зачали больше потомков, чем контрольные самцы ( $\chi^2 = 6,04$ ,  $p = 0,014$ ).

Кроме того, иммунизированные самцы, которые успешно оплодотворили двух самок, имели более высокий уровень анти-KLH IgG в плазме крови и семенной жидкости, чем самцы, которые оплодотворили только одну самку (таблица 5). В результате общее количество потомков, зачатых иммунизированными самцами, достоверно коррелировало с уровнем анти-KLH IgG в семенной жидкости ( $r = 0,67$ ,  $p = 0,006$ ,  $n = 15$ ) и почти достоверно коррелировало с уровнем анти-KLH IgG в плазме крови ( $r = 0,44$ ,  $p = 0,098$ ,  $n = 15$ ). Уровень TNF $\alpha$  в семенной жидкости не различалась у самцов, которые спаривались с одной или двумя самками (таблица 5).

Таблица 5. Различия в иммунном ответе на введение KLH самцам, которые успешно оплодотворили одну или две самки

Признаки	Число самок		Mann-Whitney test
	Одна (n = 6) Mean $\pm$ SE	Две (n = 9) Mean $\pm$ SE	
Уровень анти-KLH IgG в плазме крови, ОП	0,52 $\pm$ 0,17	1,23 $\pm$ 0,18	<b><math>p = 0,021^*</math></b>
Уровень анти-KLH IgG в семенной жидкости, ОП	0,22 $\pm$ 0,03	0,45 $\pm$ 0,07	<b><math>p = 0,011^*</math></b>
Уровень TNF $\alpha$ в семенной жидкости, пг/мл	18,96 $\pm$ 9,49	68,16 $\pm$ 46,36	NS

\* –  $p < 0,05$ , NS – не достоверно

Кроме того, следует отметить, что до спаривания с самками уровень тестостерона в плазме крови контрольных и иммунизированных самцов значимо не различался (Таблица 6). Совместное содержание и спаривание самцов с самками сопровождалось достоверным ростом уровня тестостерона только у иммунизированных самцов.

Таблица 6. Уровень тестостерона в плазме крови самцов при одиночном и совместном с самками содержании

Группы	Одиночное содержание	Содержание с самками	Student <i>t</i> -test
Контроль	4,0 ± 0,96 (n = 10)	2,2 ± 0,98 (n = 15)	t = 1,3, df = 23, p < 0,2
Иммунизация	3,4 ± 1,84 (n = 10)	9,9 ± 1,76 (n = 15)	t = 2,48, df = 23, p < 0,02
Student <i>t</i> -test	t = 0,3, df = 18, p < 0,76	t = 3,86, df = 28, p < 0,001	

На 16 сутки беременности среднее число живых плодов, вынашиваемых одной самкой, составившее в контрольной и в экспериментальной группах  $7,78 \pm 0,36$  и  $7,92 \pm 0,26$  соответственно, а также такие признаки эмбрионального развития как масса плодов, вес плацент и фетоплацентарный индекс достоверно не различались между исследованными группами (рисунок 10).

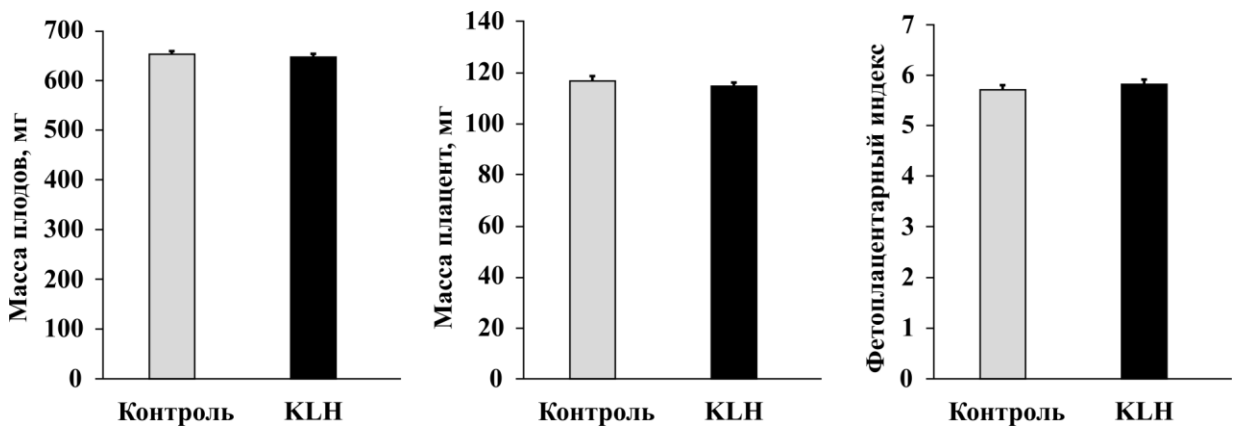


Рисунок 10. Массы плодов, массы плацент и фетоплацентарный индекс на 16-й день беременности у самок, спаренных с контрольными или иммунизированными самцами.

Тем не менее, индивидуальные различия в иммунных реакциях самцов на инъекцию KLH коррелировали с массой плаценты – для анти-KLH IgG в

плазме крови ( $r = 0,28$ ,  $p = 0,004$ ) и для анти-KLN IgG в семенной жидкости ( $r = 0,22$ ,  $p = 0,02$ ) ( $n = 108$ ), и с фетоплацентарным индексом ( $r = -0,21$ ,  $p = 0,03$ ) – для анти-KLN IgG в плазме крови ( $n = 108$ ).

Уровни 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 11) также значимо не различались между группами. В то же время уровень амниотического тестостерона был выше у самок, вынашивающих потомков антигенстимулированных самцов, по сравнению с самками, покрытых контрольными самцами (рисунок 11).

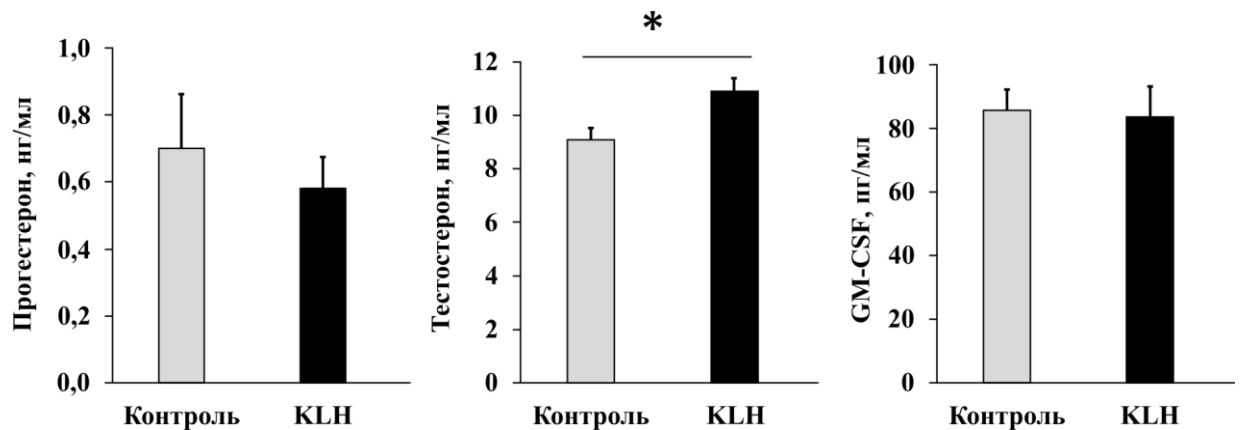


Рисунок 11. Уровни прогестерона, тестостерона и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) в амниотической жидкости на 16-й день беременности у самок, покрытых контрольными или иммунизированными самцами.

Mann–Whitney U-test: \* –  $p = 0,035$ , указывает на различия в уровне тестостерона в амниотической жидкости.

## **3.2. Влияние иммунизации самцов линии C57BL/6 на постнатальное развитие и фенотип взрослых потомков**

### **3.3.1. Влияние иммунизации самцов линии C57BL/6 на постнатальное развитие потомков**

Среднее число новорожденных, оцененное в течение суток после родов, было приблизительно одинаковым у самок, спаренных с контрольными ( $7,80 \pm 0,55$ ) и иммунизированными ( $7,44 \pm 0,34$ ) самцами (рисунок 12). Однако, процент потомков, погибших за период выкармливания, был значительно выше у самок, спаренных с контрольными самцами ( $39,74 \pm 5,54$  %) по сравнению с таковым у самок, спаренных с иммунизированными самцами ( $17,90 \pm 4,68$  %) ( $t = 2,31$ ,  $df = 143$ ,  $p < 0,05$ , (Student *t*-test)). Эти различия были обусловлены сочетанием двух эффектов, в том числе отказом самок от выкармливания, который был обнаружен у 3-х самок из контрольной группы и одной самки из группы KLN, и гибелью новорождённых, которая составила  $16,1 \pm 4,9$  % в контрольной группе против  $8,1 \pm 3,6$  % в экспериментальной группе. Наблюдаемая в нашем исследовании суммарная постнатальная гибель потомков была сопоставима с данными других исследований мышей линии C57BL/6 (Cooper et al., 2007; Whitaker et al., 2009; Weber et al., 2013).

Размер помёта при достижении потомками 3-х недельного возраста также не различался и составлял  $6,71 \pm 0,86$  и  $6,88 \pm 0,35$  в контрольной и экспериментальной группе соответственно. Масса тела потомков при отъёме от матерей (3-недельный возраст) была выше в контрольной группе по сравнению с экспериментальной (рисунок 12). Поскольку размер помёта непосредственно перед отъёмом отрицательно коррелировал с массой тела потомков в 3-недельном возрасте ( $r = -0,59$ ,  $p < 0,001$ ,  $n = 102$ ), для оценки статистической значимости между группами использовался статистический анализ ANCOVA. При этом с «размером помёта» в качестве ковариаты было выявлено достоверное влияние иммунного статуса отцов (контроль / KLN) на



массу тела потомков ( $F_{1,97} = 38,88, p < 0,001$ ). Эффекты «пола потомков» ( $F_{1,97} = 0,12, p = 0,66$ ) и взаимодействие факторов «пол – группа» ( $F_{1,97} = 0,09, p = 0,77$ ) были статистически недостоверными. Поэтому данные по массе тела потомков обоих полов были объединены (рисунок 12).

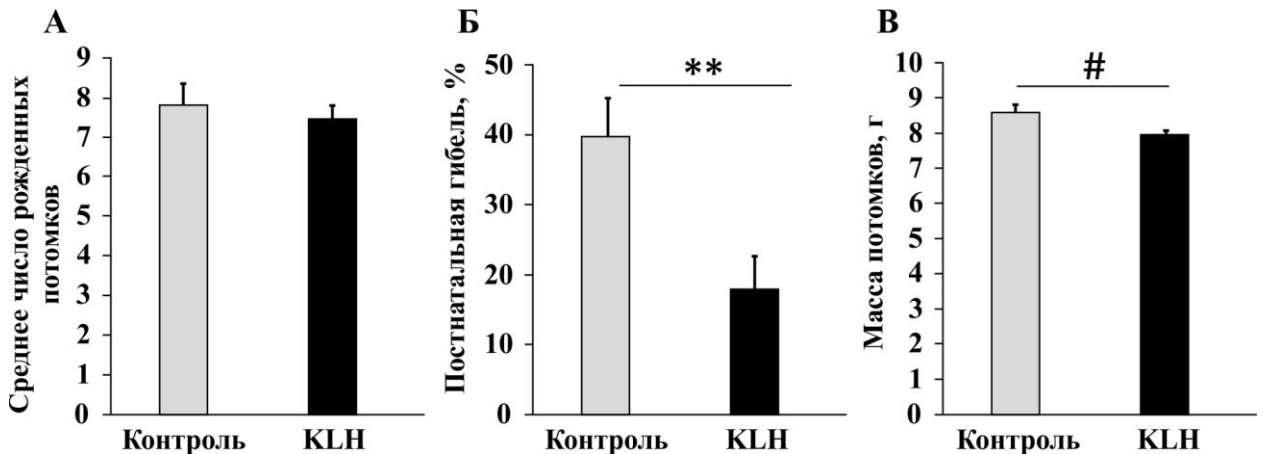


Рисунок 12. Размер помёта, постнатальная гибель и масса потомков.

А – Размер помета при рождении.

Б – Процент потомков, умерших за период от рождения до отъёма от матерей. Student *t*-test ( $df = 143$ ), \*\* –  $p < 0,01$  для сравнения групп самок, спаренных с иммунизированными и контрольными самцами.

В – Статистически значимые различия между группами (потомки контрольных и иммунизированных отцов), # –  $p < 0,001$  по данным ANCOVA с группой и полом в качестве факторов и числом потомков в качестве ковариаты ( $F_{1,97} = 38,88, p < 0,001$ ).

Следует отметить, что в тех помётах, в которых были зарегистрированы частичные потери потомков, масса тела выкормленных потомков была значительно выше ( $9,58 \pm 0,23, n = 27$ ), чем в пометах без потерь в течение подсосного периода ( $8,12 \pm 0,12, n = 75$ ). Статистическая значимость этих различий была подтверждена трехфакторным дисперсионным анализом ANOVA, в котором *F*-критерий имел следующие значения: для

коэффициента успешности выкармливания (полный помёт или неполный помёт) –  $F_{1,94} = 30,18, p < 0,001$ ; экспериментальная группа (контроль / КЛН) –  $F_{1,94} = 24,92, p < 0,001$ , а  $F$ -критерий для пола потомства был статистически недостоверным. Эти результаты показывают, что на массу тела в период выкармливания значимо влияет только наличие в помёте погибших в подсосный период потомков и иммунный статус их отцов. В целом, масса потомков при завершении подсосного периода была ниже у потомков иммунизированных КЛН отцов по сравнению с потомками контрольной группы.

### **3.3. Влияние иммунизации самцов линии C57BL/6 на фенотип взрослых потомков**

#### **3.4.1. Спектры нейрометаболитов в амигдале и коре головного мозга у самцов потомков контрольных и иммунизированных отцов**

Нейрометаболиты в структурах головного мозга, играющих ключевую роль в формировании эмоциональных реакций (амигдала) и в осуществлении высшей нервной деятельности (кора головного мозга), исследовались методом магнитно-резонансной спектроскопии (рисунки 13 А, Б). Анализ спектра нейрометаболитов амигдалы взрослых самцов показал, что самцы, потомки иммунизированных отцов, имели более низкие уровни гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), аланина, креатина и фосфокреатина по сравнению с самцами потомками контрольных отцов (рисунок 14). Напротив, уровни глутамата и глутамина в амигдале были значительно выше у потомков иммунизированных отцов, по сравнению с таковыми у потомков отцов контрольной группы (рисунок 14 А). Кроме того, наши результаты указывают на значительный сдвиг в соотношении тормозных (ГАМК) и возбуждающих (глутамат и глутамин) нейрометаболитов, который составил  $12,81 \pm 2,78$  у потомков контрольных отцов и  $0,34 \pm 0,19$  у потомков антигенстимулированных отцов ( $t = 3,95$ ,  $df = 8$ ,  $p = 0,005$ , Student's *t*-test). В отличие от амигдалы профиль нейрометаболитов в коре головного мозга был одинаковым у потомков из обеих групп (рисунок 14 Б).

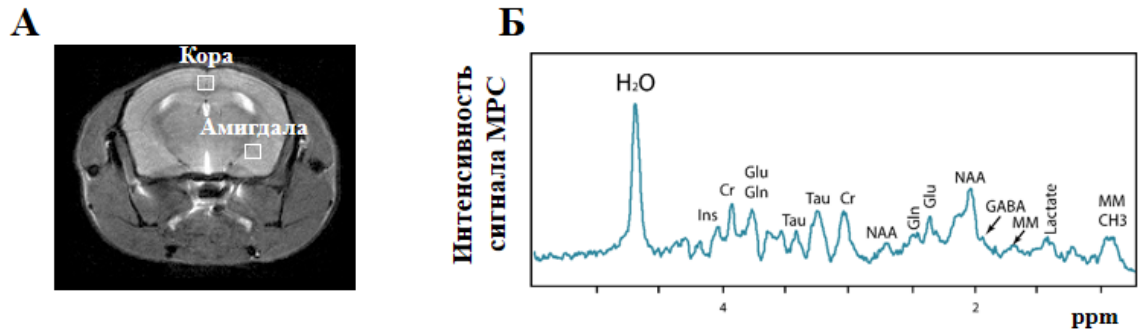


Рисунок 13. *in vivo* магнитно-резонансная спектроскопия (МРС) структур головного мозга мыши.

А – Область регистрации спектра при проведении МРС;

Б – пример получаемого спектра.

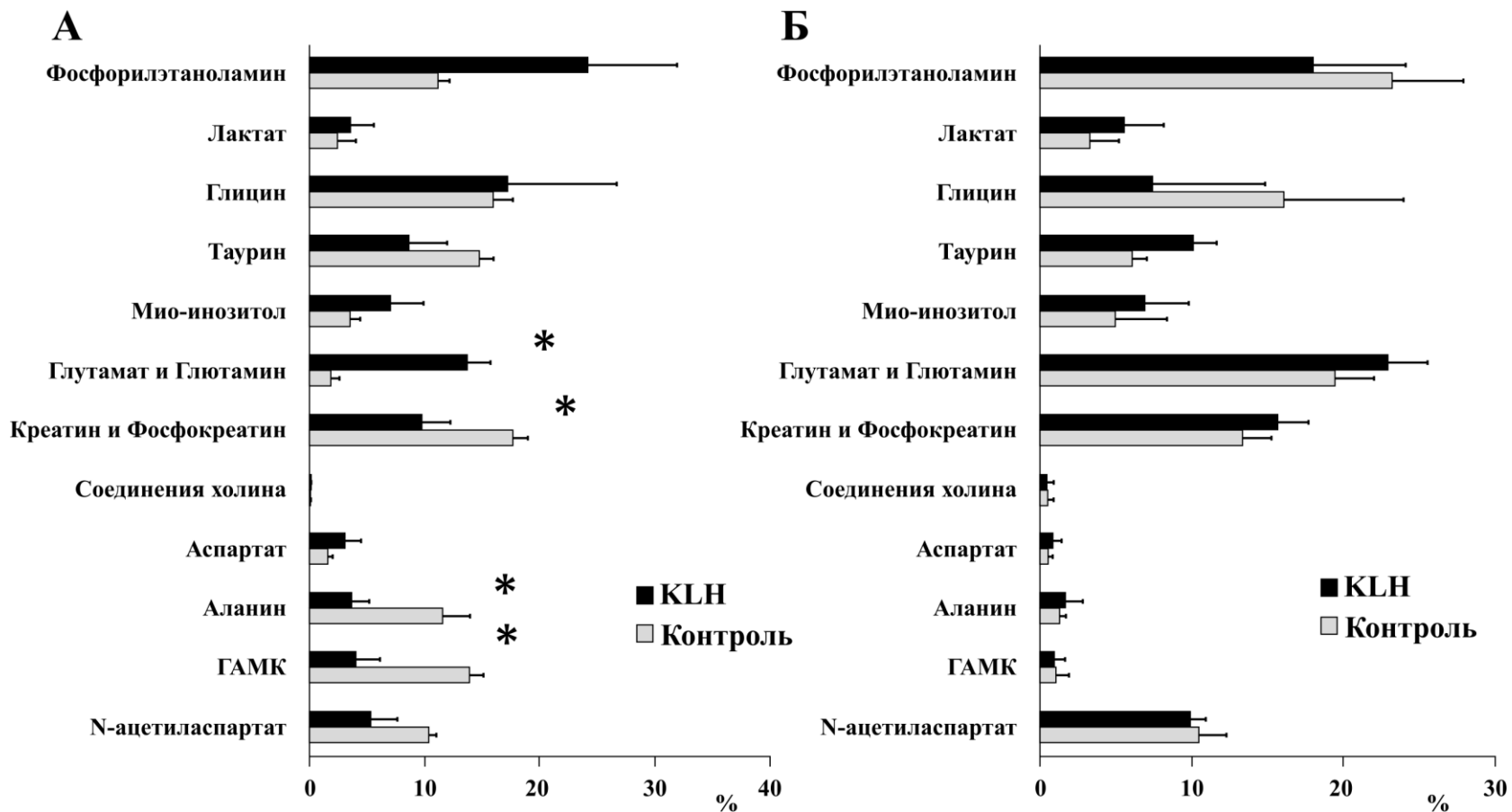


Рисунок 14. Содержание нейрометаболитов в амигдале и коре головного мозга потомков контрольных и иммунизированных самцов.

Относительные уровни нейрометаболитов (% от общего числа) в амигдале (А) и в коре головного мозга (Б) у взрослых потомков контрольных и иммунизированных отцов.

\* –  $p < 0,05$  при сравнении потомков контрольных и иммунизированных отцов, Student  $t$ -test ( $df = 8$ ).

### 3.4.2. Иммунитет самцов, потомков контрольных и иммунизированных отцов

Массу тела и индексы масс основных иммунокомпетентных органов (тимуса и селезенки) измеряли в обеих группах взрослых самцов потомков контрольных и иммунизированных отцов, получавших инъекции физиологического раствора или KLH. Результаты двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA (таблица 6) показали, что ни иммунизация отцов (группы потомков), ни иммунизация самцов, потомков контрольных и иммунизированных отцов, не имели статистически значимого влияния 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 ( $n = 14$ ). В то же время, взрослые самцы, потомки иммунизированных отцов, имели более высокие индексы масс тимуса и селезенки, по сравнению потомками контрольных отцов (таблица 7).

Таблица 6. Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) влияния группы потомков (контроль / KLH отцов) и иммунизации потомков на массу тела, показатели массы иммунокомпетентных органов и индексы масс иммунокомпетентных органов

Признаки	Группы потомков (контрольные/KLH отцы)		Иммунизация потомков		Группа × иммунизация	
	$F_{1,24}$	$p$	$F_{1,24}$	$p$	$F_{1,24}$	$p$
Масса тела	0,286	0,598	0,333	0,569	0,286	0,598
Масса тимуса	10,252	<b>0,004***</b>	0,180	0,674	0,876	0,359
Индекс массы тимуса	11,038	<b>0,003***</b>	0,020	0,888	0,588	0,450
Масса селезенки	3,965	0,059	0,367	0,550	0,686	0,416
Индекс массы селезенки	10,211	<b>0,004***</b>	0,010	0,921	0,927	0,345

\*\*\* –  $p < 0,01$

Таблица 7. Масса тела, индексы массы и массы иммунокомпетентных органов у потомков контрольных и иммунизированных отцов

Признаки	Потомки контрольных отцов		Потомки иммунизированных отцов	
	Контроль (n = 7) Mean ± SE	KLH (n = 7) Mean ± SE	Контроль (n = 7) Mean ± SE	KLH (n = 7) Mean ± SE
Масса тела, г	23,41 ± 0,66	23,44 ± 0,80	22,70 ± 0,60	23,44 ± 0,60
Масса тимуса, мг	37,29 ± 2,67	35,71 ± 4,00	44,25 ± 3,03	48,44 ± 2,34
Индекс массы тимуса, мг/г	<b>1,60 ± 0,14<sup>A</sup></b>	<b>1,52 ± 0,17<sup>A</sup></b>	<b>1,95 ± 0,12<sup>B</sup></b>	<b>2,07 ± 0,10<sup>B</sup></b>
Масса селезенки, мг	61,29 ± 3,81	59,54 ± 4,45	64,14 ± 1,88	68,93 ± 3,30
Индекс массы селезенки, мг/г	<b>2,61 ± 0,12<sup>A</sup></b>	<b>2,52 ± 0,13<sup>A</sup></b>	<b>2,83 ± 0,05<sup>B</sup></b>	<b>2,93 ± 0,07<sup>B</sup></b>

Разными буквами (А и Б) обозначены достоверно различающиеся значения (LSD test,  $p < 0,05$ ).

Поскольку эффекты иммунизации потомства и взаимодействие факторов «группа - потомство» × «иммунизация» были незначительными, данные значений индексов масс иммунокомпетентных органов у потомков контрольных и иммунизированных отцов были объединены (рисунок 15 А).

Несмотря на больший размер тимуса и селезенки потомки контрольных и иммунизированных отцов показало одинаковый уровень анти-KLH IgG, которые были определены в образцах плазмы крови через 9 дней после инъекции KLH (рисунок 15 Б).

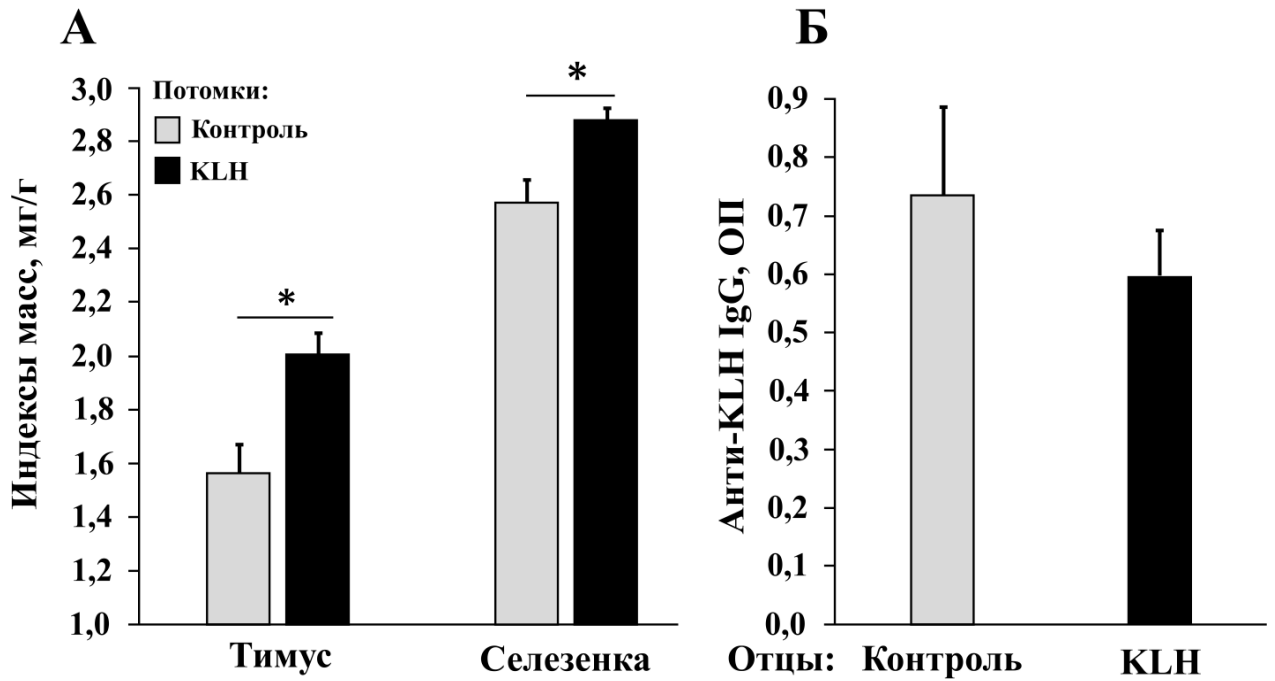


Рисунок 15. Массовые показатели иммунокомпетентных органов у взрослых потомков контрольных и иммунизированных самцов и иммунный ответ потомков.

А – индексы масс (мг/г) тимуса и селезенки у потомков иммунизированных и контрольных отцов. Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) выявил значимое влияние группы потомков ( $F_{1,24} = 11,038$ ,  $p = 0,003$ ) на индексы масс тимуса и селезенки. Так как не было выявлено значительного влияния иммунизации потомков и взаимодействия факторов «группа» – «иммунизация» (Таблица 7), данные индексов масс тимуса и селезенки контрольных и иммунизированных потомков были объединены. Student's *t*-test, \* –  $p < 0,01$  для различий между потомками контрольных и иммунизированных отцов.

Б – уровень анти-KLH IgG в плазме крови, выраженная как ОП, у потомков контрольных и иммунизированных отцов, после введения KLH.



### 3.4.3. Влияние иммунизации потомков контрольных и иммунизированных самцов на уровень тестостерона, массы андрогензависимых органов и характеристики сперматозоидов

Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) показал существенное влияние группы потомков (контрольные / KLH отцы) на индексы масс андрогензависимых органов и размер препуциальных желез (таблица 8), которые у потомков иммунизированных отцов имели большую массу, по сравнению с потомками контрольных отцов (Student *t*-test  $df = 26$ ,  $p < 0,05$ ) (рисунок 16, таблица 9). Иммунизация потомков контрольных и иммунизированных отцов, а также взаимодействие факторов «иммунизация отцов» – «иммунизация потомков» не влияли на массу андрогензависимых органов.

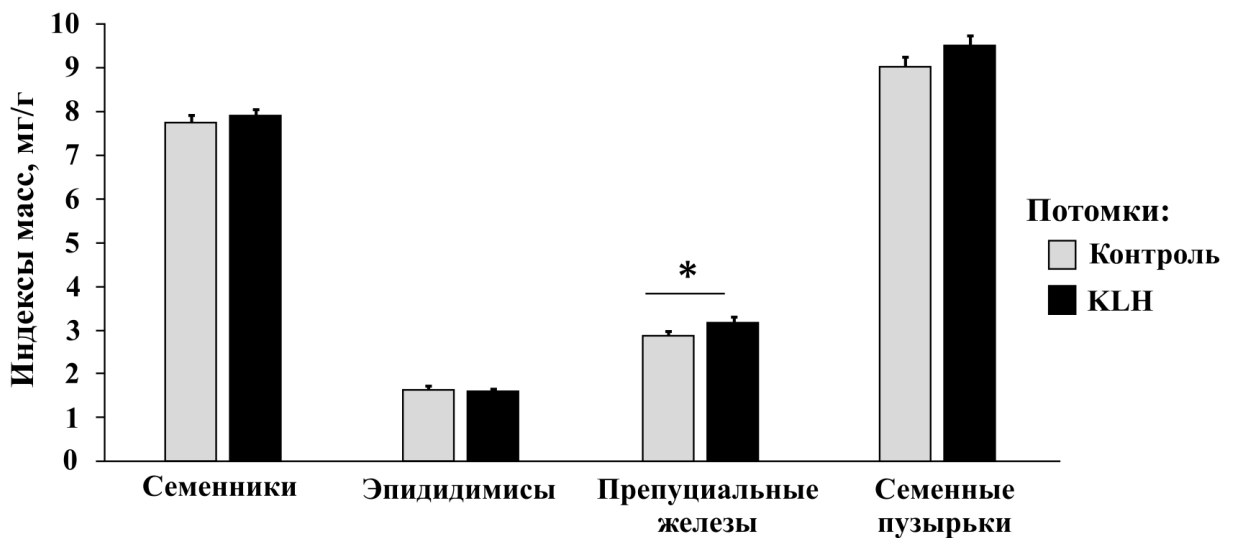


Рисунок 16. Индексы масс (мг/г) андрогензависимых органов у потомков контрольных и иммунизированных отцов.

Student's *t*-test \* –  $p < 0,01$  для различий между потомками контрольных и иммунизированных отцов.

Таблица 8. Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) влияния «группы потомков» (контроль / KLH отцы) и «иммунизации потомков» на массу тела и индексы масс андрогензависимых органов

Признаки	Группы потомков (контрольные/KLH отцы)		Иммунизация потомков		Группа × иммунизация	
	$F_{1,24}$	$p$	$F_{1,24}$	$p$	$F_{1,24}$	$p$
Масса семенников	0,115	0,738	0,896	0,353	0,111	0,741
Индекс массы семенников	0,764	0,391	0,187	0,669	0,927	0,345
Масса эпидидимисов	0,105	0,748	0,874	0,359	0,999	0,328
Индекс массы эпидидимисов	0,009	0,927	0,515	0,480	1,892	0,182
Масса препуциальных желез	2,817	0,106	0,002	0,963	0,876	0,359
Индекс массы препуциальных желез	4,335	<b>0,048*</b>	0,090	0,767	1,589	0,220
Масса семенных пузырьков	1,164	0,291	0,626	0,436	0,157	0,696
Индекс массы препуциальных желез	2,357	0,138	0,136	0,715	0,624	0,437

\* –  $p < 0,05$  (ANOVA)

Таблица 9. Масса тела и индексы масс андрогензависимых органов у потомков контрольных и иммунизированных отцов

Признаки	Потомки контрольных отцов		Потомки иммунизированных отцов	
	Контроль (n = 7) Mean ± SE	KLH (n = 7) Mean ± SE	Контроль (n = 7) Mean ± SE	KLH (n = 7) Mean ± SE
Масса тела, г	23,41 ± 0,66	23,44 ± 0,80	22,70 ± 0,60	23,44 ± 0,60
Масса семенников, мг	177,2 ± 5,5	184,1 ± 4,6	180,9 ± 6,07	184,2 ± 5,09
Индекс массы семенников, мг/г	7,60 ± 0,28	7,88 ± 0,18	7,97 ± 0,18	7,86 ± 0,14
Масса эпидидимисов, мг	36,07 ± 1,35	40,37 ± 3,98	37,57 ± 1,19	37,43 ± 0,82
Индекс массы эпидидимисов, мг/г	1,55 ± 0,06	1,72 ± 0,15	1,65 ± 0,02	1,60 ± 0,02
Масса препуциальных желез, мг	65,21 ± 3,98	68,50 ± 4,46	74,87 ± 3,14	71,24 ± 2,99
Индекс массы препуциальных желез, мг/г	<b>2,78 ± 0,14<sup>A</sup></b>	<b>2,93 ± 0,18<sup>AB</sup></b>	<b>3,30 ± 0,10<sup>B</sup></b>	<b>3,06 ± 0,17<sup>AB</sup></b>
Масса семенных пузырьков, мг	205,6 ± 9,21	215,0 ± 8,09	217,3 ± 7,18	220,4 ± 7,11
Индекс массы семенных пузырьков, мг/г	8,81 ± 0,41	9,19 ± 0,27	9,58 ± 0,24	9,44 ± 0,37

A, B выделены достоверно различающиеся значения (LSD test,  $p < 0,05$ )

Этот результат согласуется с различиями по уровню тестостерона в плазме крови, который был значительно выше у потомков иммунизированных отцов ( $18,9 \pm 3,4$  нг / мл), чем у потомков контрольных отцов ( $7,7 \pm 2,6$  нг/мл) ( $Z = 2,78$ ,  $p = 0,016$ , Mann – Whitney U-test). На вариации тестостерона после введения потомкам контрольных и иммунизированных самцов физиологического раствора или KLH значимо влияли факторы «группа потомков» (контроль/KLH) ( $F_{1,24} = 7,725$ ,  $p = 0,010$ ), а также взаимодействие факторов «группа потомков»  $\times$  «иммунизация» ( $F_{1,24} = 6,116$ ,  $p = 0,021$ ) (ANOVA – тест Фридмана). Иммунизация потомков контрольных отцов привела к значительному снижению уровня тестостерона ( $Z = 2,04$ ,  $p = 0,04$ , Mann – Whitney U-test), в то время как после иммунизации потомков иммунизированных отцов наблюдалась тенденция к её увеличению (рисунок 17). В целом, после иммунизации уровень тестостерона у потомков иммунизированных отцов был выше, чем у потомков контрольных отцов.

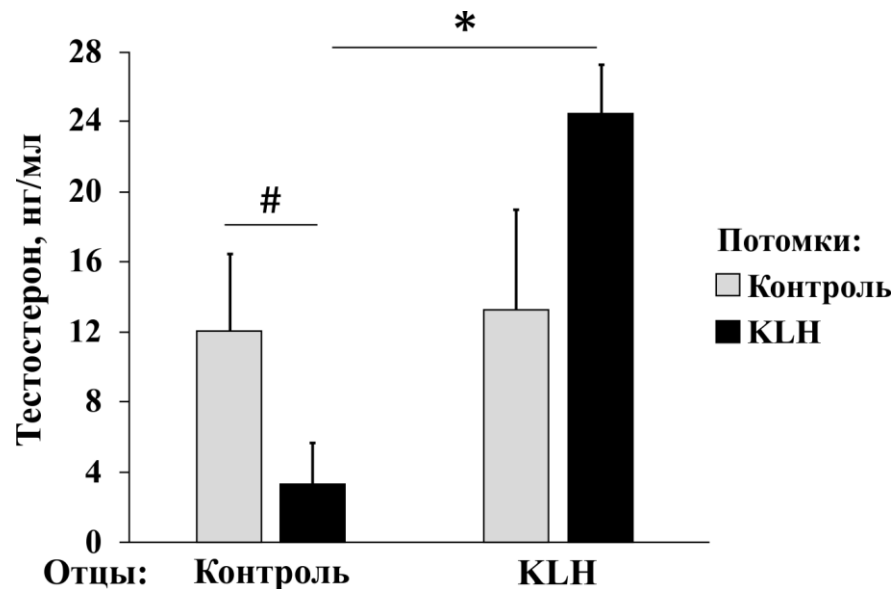


Рисунок 17. Уровень тестостерона в плазме крови потомков контрольных и иммунизированных отцов. # –  $p = 0,04$ , \* –  $p < 0,05$  (Mann–Whitney U-test).

Результаты исследования показателей сперматозоидов показали, что групповая принадлежность (контроль / KLH) не влияла на концентрацию, морфологию, подвижность и кинематику направлений движения сперматозоидов у потомков (таблица 10). Эти группы имели сходные характеристики морфологии, количества и подвижности сперматозоидов (рисунок 18).

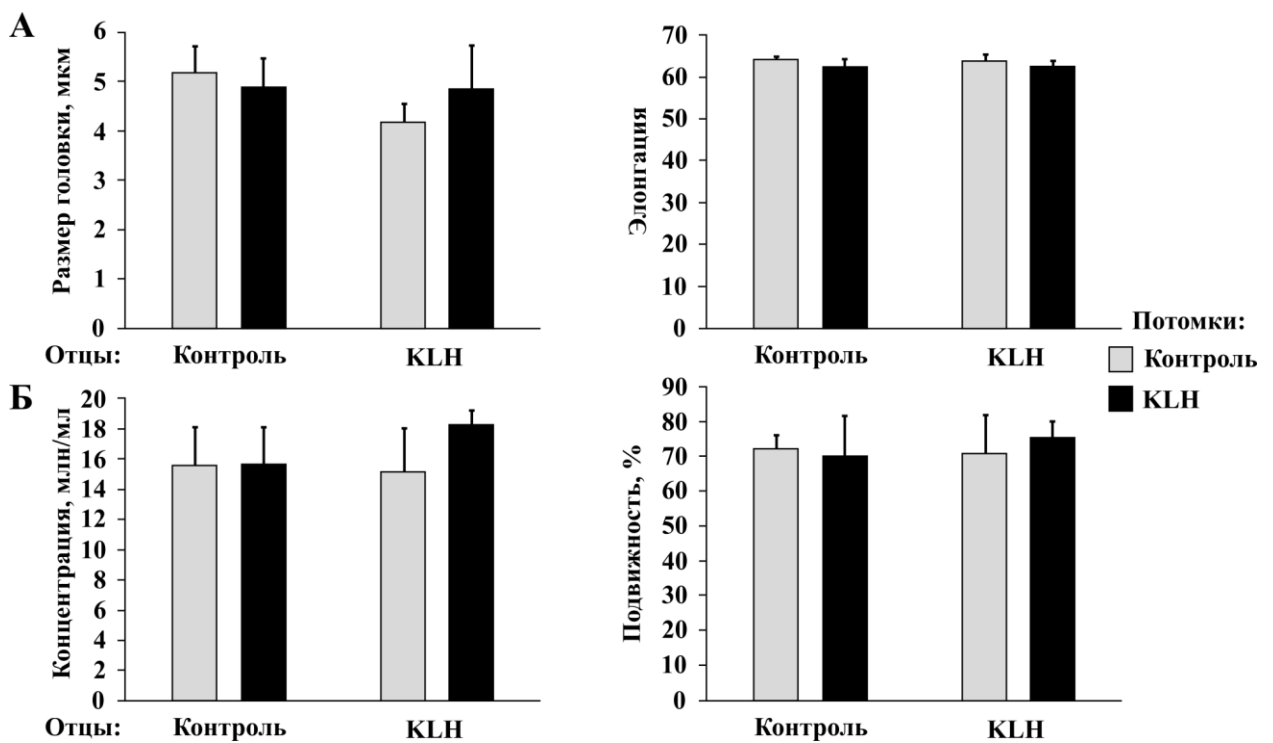


Рисунок 18. Характеристики сперматозоидов потомков контрольных и иммунизированных самцов.

А – средний размер и форма (элонгация) головки сперматозоидов у потомков контрольных и иммунизированных отцов до и после их иммунизации.

Б – концентрация и % подвижных сперматозоидов в каудальном отделе эпидидимиса.

Следует отметить, что разнонаправленные изменения уровня тестостерона на 9-й день после введения KLH потомкам иммунизированных

и контрольных отцов (рисунок 17) оказали некоторое влияние на скоростные характеристики VAP (скорость равномерного движения) и VSL (скорость прямолинейного движения) сперматозоидов. Эти показатели были ниже у потомков контрольных отцов и незначительно увеличены у потомков иммунизированных отцов после введения КЛН (рисунок 19). Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) показал статистическую значимость влияния взаимодействия факторов «группа потомства» и «иммунизация» на VAP и VSL (таблица 10). 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 (таблица 11). В целом спаривание самок с иммунизированными самцами не влияло на морфологию и концентрацию сперматозоидов у потомков, но модулировало скоростные характеристики сперматозоидов после введения КЛН этим потомкам.

Таблица 10. Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) влияния «группы потомков» (контроль / КЛН отцы) и «иммунизации потомков» на характеристики сперматозоидов

Признаки	Группа потомков (Контроль / КЛН отцы)		Иммунизация потомков		Группа потомков × Иммунизация	
	$F_{1,24}$	$p$	$F_{1,24}$	$p$	$F_{1,24}$	$p$
Размер	0,381	0,543	0,590	0,450	1,753	0,198
Элонгация	0,038	0,846	1,087	0,307	0,010	0,920
Концентрация сперматозоидов	0,474	0,498	0,218	0,644	0,421	0,523
Процент подвижных сперматозоидов	0,240	0,629	1,804	0,191	0,085	0,773
VAP	0,000	0,998	0,040	0,843	4,085	<b>0,050*</b>
VSL	0,224	0,640	0,262	0,613	4,075	<b>0,050*</b>
VCL	0,073	0,789	0,439	0,514	2,236	0,149
BCF	0,031	0,862	0,975	0,333	1,298	0,266
STR	1,476	0,236	0,001	0,971	0,049	0,826
LIN	0,543	0,468	0,377	0,545	0,966	0,335

\* –  $p < 0,05$

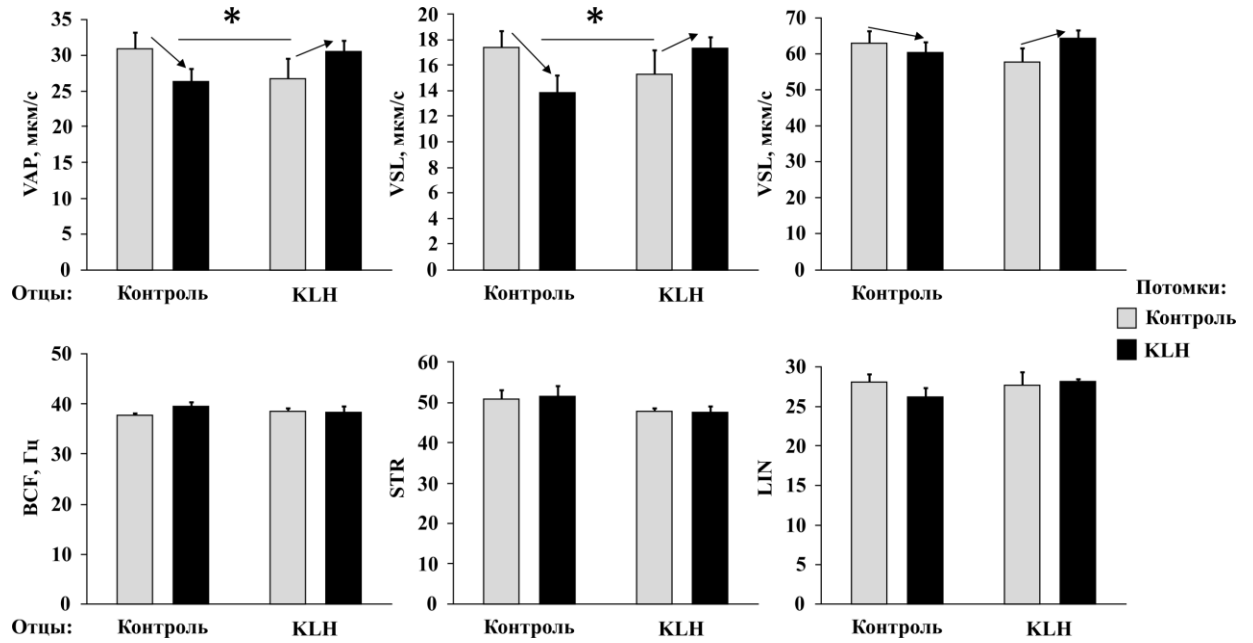


Рисунок 19. Скоростные характеристики сперматозоидов потомков контрольных и иммунизированных потомков. ANOVA \* –  $p < 0,01$ .



Таблица 11. Корреляция характеристик сперматозоидов с уровнем тестостерона в плазме крови у самцов потомков

Признаки	<i>r</i>	<i>p</i>
Размер головки сперматозоидов	0,262	NS
Элонгация головки сперматозоидов	0,028	NS
Концентрация сперматозоидов	0,423	<b>0,025*</b>
Процент подвижных сперматозоидов	0,102	NS
VAP	0,386	<b>0,042*</b>
VSL	0,503	<b>0,006**</b>
VCL	0,294	NS
BSF	-0,037	NS
STR	0,279	NS
LIN	0,402	<b>0,034*</b>

\* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , NS – недостоверно

В целом, результаты исследования показали, что спаривание самок с иммунизированными самцами оказывает модулирующее влияние на фенотипические признаки потомков, в том числе на нейрометаболизм и иммунно-эндокринное реагирование на антигенную стимуляцию.

## IV. Обсуждение

В качестве наиболее частой причины подавления мужской фертильности рассматриваются хронические воспалительные процессы в репродуктивных органах, обусловленные активацией провоспалительного звена иммунного ответа на бактериальные и вирусные инфекции. Однако провоспалительный ответ является неотъемлемой частью иммунного реагирования на любые антигены, в том числе и на нереплицируемые, которые широко используются в качестве вакцин и адъювантов. В нашем исследовании мы использовали экспериментальную модель системной активации иммунитета иммуногенным белком KLH, который применяют в качестве адъюванта, для исследования влияния нереплицируемых антигенов на количественные и качественные показатели сперматозоидов и андрогенную функцию семенников. В серии исследований, выполненных (Мошкин и др., 2010; Герлинская, 2012; Gerlinskaya et al., 2012; 2017; 2020) на мышах линий C57BL/6, BALB/c и CD-1 показано, что негативное влияние иммунизации самцов KLH на их фертильную способность проявляется только на начальной стадии иммунного ответа. Результаты наших исследований показали, что, несмотря на межлинейные различия параметров сперматозоидов и динамики иммунного ответа на введение KLH у C57BL/6 и BALB/c, антигенная стимуляция вызывала у этих линий мышей однонаправленное снижение концентрации и подвижности сперматозоидов в каудальном отделе эпидидимиса. Значимое влияние иммунизации на показатели сперматозоидов наблюдалось только на 3-и сутки, то есть на самой ранней стадии антителообразования. Эффект иммунизации варьировал в зависимости от сроков взятия образцов, что вполне ожидаемо, исходя из данных литературы об иммунных и эндокринных процессах, развертывающихся на разных стадиях иммунного ответа на чужеродный

антиген (Karp et al., 1993; Abolins et al., 2011). В опытах на мышах установлено, что в первые трое суток после введения KLH активируются Т лимфоциты и растёт концентрация в крови ряда провоспалительных цитокинов (Kojima et al., 2013; Zhong et al., 2016). Кроме того, многочисленные исследования демонстрируют негативное влияние провоспалительных цитокинов на количество сперматозоидов в каудальном отделе эпидидимисов самцов мышей и крыс (Abu et al., 2008; Collodel et al., 2015; Wang et al., 2019). Например, введение крысам линии Wistar грамм-отрицательных (LPS) и грамм-положительных (LTA) бактериальных эндотоксинов сопровождается быстрым, через 6 часов, увеличением экспрессии провоспалительных цитокинов и их снижением в тканях каудального отдела эпидидимиса через 24 часа после инъекций (Silva et al., 2018). Кроме того, эти авторы показали снижение количества и увеличении времени прохождения сперматозоидов от проксимального в дистальный отдел эпидидимиса в течение 7-и дней после инъекций LPS и LTA. Это хорошо согласуется с нашими результатами, показывающими достоверное снижение доли подвижных сперматозоидов в каудальном отделе эпидидимиса, и показывает, что снижение фертильности самцов в течение 2-х суток после иммунизации KLH может быть связано с изменением содержания провоспалительных цитокинов в семенной жидкости (Gerlinskaya et al., 2020).

Тестостерон является основным андрогеном, секретлируемым клетками Лейдига в семенниках. В семенниках тестостерон действует на клетки Сертоли, экспрессирующие тестостероновый рецептор. Кондиционный нокаут тестостеронового рецептора в клетках Сертоли у мышей нарушает иммунную привилегированность семенников за счет нарушения целостности гематотестикулярного барьера (Meng et al., 2011). В совокупности андрогены способствуют поддержанию иммунной привилегированности семенников, подавляют местные провоспалительные иммунные ответы и системную толерантность к антиспермальному иммуноглобулину. В нашем

исследовании мы обнаружили, что индивидуальные значения уровня тестостерона в плазме крови у самцов C57BL/6 положительно коррелировали с описывающими траекторию движения параметрами сперматозоидов, отрицательно – с элонгацией головки и частотой биения хвоста. При этом системная активация иммунитета иммуногенным белком KLH не влияла на уровни тестостерона в плазме крови в динамике иммунного ответа и, как следствие, наблюдаемое изменение уровня и подвижности сперматозоидов нельзя объяснить влиянием тестостерона. Можно предположить, что наблюдаемое через 3-е суток после иммунизации снижение уровня и подвижности сперматозоидов может быть обусловлено косвенным негативным влиянием факторов воспаления на сперматогенез, протекающий в семенниках. Эта гипотеза подтверждается тем, что специфическая чувствительность к медиаторам воспаления наиболее выражена на стадии выхода элонгирующих сперматид из семенного эпителия (Siu, Cheng, 2004; Nagaosa et al., 2009). Хорошо известные рецепторы TLR4, TLR2 (толл-подобные рецепторы) и рецептор пептидогликана экспрессированы в сперме человека и мыши (Fujita et al., 2011). Показано, что присутствующие на мембранах сперматозоидов TLR могут распознавать не только бактериальные эндотоксины, но и другие антигены, в число которых входит и KLH. Активированные TLR снижают подвижность сперматозоидов, вызывают апоптоз сперматозоидов и значительно снижают возможность оплодотворения.

С другой стороны, активация механизмов иммунной защиты, индуцированная введением ЛПС, сопровождается массовым притоком иммунных клеток в интерстициальное пространство семенников и повышенной экспрессией провоспалительных медиаторов (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ , MCP-1, IL-12), рецепторы к которым экспрессированы на сперматозоидах на протяжении всех стадий их постмейотического развития (Bhushan et al., 2011). При этом IL-1 и IL-6 относятся к числу главных факторов, нарушающих сперматогенез на стадии образования ранних сперматид

(Collodel et al., 2011). Следовательно, вовлеченные в сперматогенез клетки постоянно подвергаются воздействию иммунных факторов (Chen et al., 2016). Эти воспалительные реакции оказывают только кратковременное негативное влияние на функции семенников, сперматогенез и стероидогенез, нарушение гематотестикулярного барьера, индукцию апоптоза половых клеток и потерю подвижности сперматозоидов (O'Bryan et al., 2000; 2005; Sarkar et al., 2011). Поскольку в эпидидимисе идет постоянное транзитное замещение зрелых сперматозоидов незрелыми, поступающими из семенников, то вполне вероятно, что кратковременная активация системного иммунитета вызывает аналогичную временную реакцию в семенниках и это может обеспечивать долговременное влияние на репродуктивную функцию самцов и фенотип их потомства. В некоторых исследованиях показано, что однократная доза ЛПС вызывает у мышей долговременное, до 5 недель, повреждение структуры семенников, подавление сперматогенеза, снижение мейотического индекса, инфильтрацию иммунных клеток в интерстициальное пространство и концентрацию сперматозоидов в каудальной части эпидидимисов (Jafari et al., 2018; Wang et al., 2019).

Результаты исследования эффектов активации системного иммунитета путем однократного введения КЛН свидетельствуют о том, что иммунизация самцов до спаривания модулирует их репродуктивные характеристики. В частности, мы отметили отчетливую динамику показателя совокупного репродуктивного выхода у иммунизированных отцов. За первые 2 дня спаривания иммунизированные самцы произвели меньше потомков по сравнению с контрольными самцами, но в последующие дни они превзошли показатели последних. Снижение фертильной способности иммунизированных КЛН самцов не может быть объяснено негативным влиянием активации провоспалительного ответа на параметры сперматозоидов. Во-первых, результаты нашего исследования показали, что снижение концентрации и подвижности сперматозоидов наблюдается только на самой ранней стадии антителообразования. Кроме того, данные

литературы показывают, что повышенная экспрессия провоспалительных цитокинов после однократной инъекции LPS или гликопротеинов снижается до присущего контрольным животным уровня в течение 24 – 144 часов (Rokade et al., 2021). Изначально низкий репродуктивный выход не может быть объяснен качеством сперматозоидов, поскольку снижение их концентрации и подвижности у одиночно содержавшихся самцов отмечалось только на 3 день после инъекции КЛН. Результаты, полученные в нашем исследовании, хорошо согласуются с ранее опубликованными данными которые показывают, что контрольные мыши превосходят за первые трое суток (4 – 7-е сутки после иммунизации) по числу зачатых плодов КЛН антигенстимулированных самцов. Эти различия сочетались со снижением в это время запаховой привлекательности антигенстимулированных самцов (Moshkin et al., 2010; Gerlinskaya et al., 2012).

Установленное в нашем исследовании увеличение репродуктивной эффективности иммунизированных самцов на более поздних сроках содержания самок с самцами соответствовало повышению уровня тестостерона в плазме крови самцов, спаривавшихся с самками. Так же уровень тестостерона у иммунизированных самцов положительно коррелировал с гуморальным иммунным ответом и, в частности, с уровнем анти-КЛН IgG в семенной жидкости. Наличие гематотестикулярного и гематоэпидидимального барьеров, препятствующих проникновению высокомолекулярных соединений в репродуктивные органы самцов, не обеспечивает абсолютную непроницаемость для антигенов и IgG. Установлено, что специфические к нереплицируемым и реплицируемым антигенам IgG проникают в галлерову сеть, образующую эфферентные каналы семенников, переходящих в головку эпидидимиса, а также в семенные пузырьки (Johnson, Setchell, 1968; Knee et al., 2005; Li Xingyuan et al., 2020). Иммуноглобулины IgG также в большом количестве обнаружены в жидкости дистального конца эпидидимального протока, добавочных железах и клетках сперматозоидов у кроликов (Yan et al., 2016). Точная роль и

механизм действия иммуноглобулинов G на сперматозоиды не определены, но предполагается, что они могут играть важную роль в защите сперматозоидов от негативного действия антиспермальных аутоантител, облегчать взаимодействие с яйцеклетками и, как следствие, повышать их фертильную способность. Кроме того, уровень специфических иммуноглобулинов G, обнаруживаемых в семенной жидкости, положительно коррелирует с уровнем IgG в плазме крови (Pillay et al., 2019). Показано, что иммуноглобулины модулируют цитокиновый состав семенной жидкости и обуславливают множественное влияние семенной жидкости на иммунный и эндокринный состав внутренней среды репродуктивного тракта женского организма, опосредуя тем самым успех имплантации, рост и развитие эмбрионов (Chaouat et al., 2007; Rametse et al., 2018; Robertson et al., 2018; Maslennikova et al., 2019). Эти данные позволяют нам высказать предположение, что появление в семенной жидкости однократно иммунизированных самцов анти-KLN IgG может влиять на течение беременности у покрытых ими самок. Действительно, у самок, вынашивающих потомков иммунизированных самцов, уровень тестостерона в амниотической жидкости был выше, чем у самок контрольной группы. Поэтому увеличение тестостерона в амниотической жидкости может быть одним из факторов, определяющих снижение смертности новорожденных во время выкармливания и уменьшение массы тела потомков при отъеме от матерей. Следует отметить, что в помётах с частичной потерей потомков масса тела остальных потомков была значительно выше, чем в помётах без потерь, и, следовательно, смертность новорожденных не была связана с дефицитом лактации. Вместе это указывает на то, что передача отцовских антигенных стимулов, о чём свидетельствует уровень анти-KLN IgG в семенной жидкости, может оказывать положительное влияние на беременность и выкармливание потомков. Изменения в клеточном и гуморальном составе семенной жидкости иммунизированных отцов также могут быть причиной наблюдаемых эффектов (Schjenken, Robertson, 2015).

В дополнение к репродуктивному результату однократная иммунизация отцов модулировала фенотип их взрослых потомков. Это проявилось в изменениях нейрометаболического профиля амигдалы, размеров иммунных органов, уровня тестостерона в плазме крови и характеристиках сперматозоидов у потомков. Отцовское влияние на метаболизм мозга было обнаружено только в амигдале. Исследование спектра нейрометаболитов в амигдале выявило значимое преобладание возбуждающих (глутамат/глутамин) нейромедиаторов над тормозными (ГАМК) у самцов, потомков иммунизированных отцов. Преобладание возбуждающих нейромедиаторов в амигдале может быть связано с увеличенным, по сравнению с потомками контрольных самцов, уровнем тестостерона у самцов, потомков иммунизированных отцов. Действительно, мыши с нокаутом гена глутаматного рецептора подтипа 7 характеризуются более низким уровнем тестостерона в крови по сравнению с мышами дикого типа (Masugi-Tokita et al., 2018). Аналогично, пренатальный тестостерон в амниотической жидкости влияет на развитие амигдалы, что было показано как в экспериментальных, так и в клинических исследованиях (Kerchner et al., 1995; Lombardo et al., 2012; Heany et al., 2016). Авторы (Hu et al., 2015) установили, что увеличение уровня тестостерона в крови беременных самок крыс линии Wistar, вызванное подкожными инъекциями тестостерона в период беременности, сопровождалось значимым снижением экспрессии рецептора тормозного нейромедиатора ГАМК у взрослых потомков мужского пола. У этих же потомков в амигдале было отмечено снижение уровня рецепторов к тестостерону. Действие андрогенов на структуры мозга может осуществляться семейством рецепторов андрогена и эстрогена, которые экспрессируются в амигдале плодов и зрелых особей (Sarkey et al., 2008; Filová et al., 2013, Cisternas et al., 2015). Наблюдаемый в амигдале сдвиг в соотношении возбуждающих и тормозных нейромедиаторов в пользу возбуждающих может модулировать социальное поведение потомков мужского пола иммунизированных отцов, включая сексуальную активность



и способность доминировать в социальной конкуренции с другими самцами (Watanabe, Yamamoto, 2015; Dulka et al., 2018).

Отцовское влияние на функцию половых желез потомков было наиболее очевидным при антигенной стимуляции. Инъекция КЛН вызывала снижение 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 изменениями скоростных характеристик и траекторий движения сперматозоидов. Эти данные соответствуют наблюдениям других исследователей (Guvvala et al., 2016, Dardmeh et al., 2017). Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что взрослые потомки антигенстимулированных отцов способны поддерживать высокий уровень андрогенов после иммунизации и при этом сохранять кинематические характеристики сперматозоидов при антигенном заражении. Наконец, более высокий уровень тестостерона в плазме крови и возбуждающих нейромедиаторов в амигдале может способствовать повышению социальной конкурентоспособности потомков иммунизированных отцов (Tzanoulinou et al., 2014; Adams, Rosenkranz, 2016). Это говорит о том, что при увеличении антигенной нагрузки в окружающей среде потомки иммунизированных отцов могут эффективно распределять свой ресурсный потенциал между потребностями, обеспечивающими поддержание иммунитета и воспроизводства. 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 спаривались с самками в данном исследовании (9–15 дней после иммунизации), совпадает со временем выхода сперматозоидов в галлерову сеть семенников, где уже появляются специфические IgG и начинается процесс созревания сперматозоидов (Khil et al., 2004; Knee et al., 2005). Созревание

сперматозоидов включает массовую замену гистоновых белков на протамины в отцовском геноме, и на этот процесс могут оказывать влияние иммунные факторы галлеровой сети эпидидимисов отца (Hazzouri et al., 2000; Morinière et al., 2009; Shirakata et al., 2014). Аналогично, клеточный и гуморальный состав семенной жидкости, который непосредственно модулирует женский репродуктивный тракт, вероятно, реагирует на иммунные факторы в составе семенной жидкости (Collodel et al., 2015; Robertson, Sharkey, 2016). Значение семенной жидкости в определении пре- и постнатального фенотипа было убедительно показано в экспериментах по удалению семенных пузырьков. Удаление семенных пузырьков приводит к снижению фертильности, гипертрофии плаценты и метаболическим нарушениям в основном у потомков мужского пола (Bromfield et al., 2014). Кроме того, отцовский опыт поражения в социальных конфликтах передается потомкам только посредством естественного, но не экстракорпорального оплодотворения (Dietz et al., 2011). Соответственно, результаты наших исследований показали значимую корреляцию между массой плацент и уровнем анти-KLN IgG в плазме крови и семенной жидкости. Все эти данные подтверждают ключевую роль семенной жидкости в передаче отцовского опыта следующему поколению, хотя этот факт не исключает влияния эпигенетических сигналов отца.

Отцовский эффект со стороны матери может быть реализован через изменения в иммунной и эндокринной поддержке беременности. Мы обнаружили, что уровень амниотического тестостерона был выше у беременных самок, спаренных с иммунизированными самцами. Амниотический тестостерон играет важную роль в программировании фенотипа потомков (Sarkar et al., 2008). В частности, показано, что самцы, подвергшиеся воздействию андрогенов в период беременности, имели повышенный уровень циркулирующего тестостерона в течение взрослой жизни (More et al., 2016). Это согласуется с наблюдаемыми в нашем исследовании различиями уровня тестостерона в плазме крови у потомков

контрольных и иммунизированных отцов. Изменение уровня тестостерона в период пренатального развития может также влиять на структуры развивающегося мозга, в том числе и амигдалы (Kerchner et al., 1995; Lombardo et al., 2012). В частности, уровень пренатального тестостерона подавляет экспрессию рецепторов ГАМК в амигдале (Hu et al., 2015). Следовательно, наблюдаемое в нашем исследовании изменение баланса в соотношении возбуждающих / тормозных нейромедиаторов в амигдале потомков иммунизированных самцов может быть объяснено воздействием амниотического тестостерона, уровень которого был выше у самок, вынашивающих потомков иммунизированных КЛН самцов.

В работах других исследователей широко обсуждается адаптивная значимость передачи отцовского опыта потомкам (Dietz et al., 2011; Dias, Ressler, 2014; Rodgers et al., 2013, 2015). В рамках теории жизненного цикла это подразумевает адаптацию потомства к преобладающим условиям, с которыми сталкиваются их отцы. Таким образом, следуя этой логике, имеет смысл рассматривать иммунно-репродуктивный компромисс, наблюдаемый у потомков иммунизированных отцов, как часть их адаптивной стратегии. Несмотря на то, что потомки иммунизированных отцов имели более высокие индексы масс тимуса и селезенки, их гуморальный ответ на КЛН существенно не отличался от контроля. Однако у этих же потомков сохранялся высокий уровень тестостерона после иммунизации КЛН. Другими словами, потомки иммунизированных отцов способны одинаково поддерживать наряду с иммунитетом и репродуктивный потенциал в условиях усиления антигенного давления, в то время как потомки контрольных отцов снижают свой репродуктивный успех.

## Заключение

Суммируя полученные результаты, можно заключить, что отцовский опыт, обусловленный активацией системного иммунитета нереплицируемым антигеном KLH, влияет на программу развития потомков. Реализация этого влияния прослеживается на всех этапах процесса воспроизводства. Активация системного иммунитета, вызванная иммунизацией самцов KLH, сопровождается снижением концентрации и подвижности сперматозоидов в каудальном отделе эпидидимиса на начальном этапе антителообразования. Иммунизация самцов KLH, вопреки ожиданию, не только не подавляла их фертильную способность, но и увеличивала репродуктивный успех покрытых ими самок на 3 – 6 сутки совместного содержания, который сочетался со значимым увеличением содержания тестостерона в крови только у иммунизированных самцов. Этот результат хорошо согласуется с данными полученными ранее (Герлинская и др., 2012; Gerlinskaya et al., 2012) и показывает, что спаривание самок с антигенстимулированными брачным партнером в период максимального антителообразования может оказывать положительное влияние на репродуктивный успех и, как следствие, способствовать стабильному существованию вида в условиях паразитарного давления.

Влияние отцовских факторов на фенотип потомков может реализовываться путем прямого влияния состава семенной жидкости на иммунное и эндокринное поддержание беременности, внутриутробное развитие потомков и физиологические механизмы формирования материнских качеств. Наши результаты показывают, что эффекты однократной системной активации иммунитета отцов отмечаются уже в период внутриутробного вынашивания их потомков. Эти эффекты проявляются в увеличении уровня тестостерона в амниотической жидкости.

Кроме того, в период выкармливания в пометах иммунизированных самцов отмечена меньшая, чем у контрольных потомков, смертность. В совокупности это указывает, что передача отцовских антигенных стимулов, о чём свидетельствует содержание анти-KLN IgG в семенной жидкости, положительно влияет на беременность и обеспеченность необходимыми ресурсами при молочном вскармливании.

Наряду с репродуктивной значимостью, результаты нашего исследования впервые показали, что однократная иммунизация новым KLN антигеном самцов до спаривания с самками модулирует фенотип их взрослого потомства. Наши результаты показали, что потомство иммунизированных KLN отцов имело более высокие индексы массы тимуса и селезенки, а их гуморальный ответ на KLN существенно не отличался от контроля. Однако, в отличие от контроля, потомство иммунизированных отцов сохраняло высокие уровни тестостерона после антигенного заражения KLN. Иными словами, потомство иммунизированных отцов продемонстрировало способность в равной степени поддерживать как иммунные, так и андрогензависимые признаки, в то время как потомки контрольных отцов снижают свои репродуктивные возможности в ответ на антигенную стимуляцию.

Структуры головного мозга играют ключевую роль в оценке окружающей среды и в запуске адекватных физиологических и поведенческих реакций на потенциально неблагоприятные и опасные факторы. Нарушения иммунных и эндокринных регуляций в период беременности могут приводить к риску развития расстройств аутистического спектра. Результаты данного исследования показывают, что иммунизация отцов затрагивает профиль нейрометаболитов в головном мозге их потомков. В амигдале потомков иммунизированных самцов соотношение возбуждающих и тормозных нейрометаболитов было сдвинуто в сторону возбуждающих нейрометаболитов по сравнению с контролем. Как следствие, преобладание возбуждающих нейрометаболитов в амигдале может

способствовать проявлениям аутистического спектра поведения у самцов, потомков иммунизированных отцов, включая сексуальные и социальные формы поведения.

В целом, полученные результаты позволяют заключить, что потомство иммунизированных отцов способно 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.

### **Выводы**

1. Системная активация специфического иммунитета 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 подсадки самок, а в период максимального антителообразования изменяется состав семенной жидкости, в которой обнаруживаются анти-KLN 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 КЛН, 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 сокращений

AP – андрогенный рецептор;

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота;

ГТБ – гематотестикулярный барьер;

ГЭБ – гематоэпидидимальный барьер;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ЛПС – липополисахарид;

ОП – оптическая плотность;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

ЭБ – эритроциты барана;

АСV-A – активин А;

AJ – апикальные закрепляющие соединения;

BSF – поперечная частота биения хвоста сперматозоидов (Гц);

CSF – колониестимулирующий фактор;

EGF – эпидермальный фактор роста;

GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор;

IgG – иммуноглобулин G;

IL – интерлейкин;

INF – интерферон;

IRF3 – регуляторный фактор интерферона 3;

KLH – keyhole limpet hemocyanin, гемоцианин;

LIF – лейкемия-ингибирующий фактор;

LIN – линейность (% , VSL/CL);

МАРК – митоген активированная протеинкиназа;

MPC – магнитно-резонансная спектроскопия;



MCP-1 – моноцитарный хемотаксический белок-1;

NF $\kappa$ B – ядерный фактор Каппа В;

NO – оксид азота;

NOS2 – синтаза оксида азота 2;

NS – недостоверно;

SE – стандартное отклонение;

STR – прямолинейность (% , VSL/VAP);

TGF- $\beta$  – трансформирующий фактор роста бета;

TJ – плотные соединения;

TLR – толл-подобные рецепторы;

TNF  $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа;

TRAIL – цитокин семейства факторов некроза опухоли, лиганд, вызывающий апоптоз;

VAP – скорость равномерного движения (мкм/с);

VCL – криволинейная скорость (мкм/с);

VEGF – васкулярно-эндотелиальный ростовой фактор;

VSL – скорость прямолинейного движения (мкм/с).

## Список литературы

1. Лакин Г.Ф. Биометрия. М, 1968.
2. Снедекор Дж. У. Статистические методы в применении к исследованиям в сельском хозяйстве и биологии. М. 1961.
3. Герлинская Л. А., Масленникова С. О., Завьялов Е. Л., Концевая Г. В., Мошкин, М. П. Репродуктивный успех самцов аутбредной линии ICR при размножении на фоне антигенной стимуляции // Онтогенез. – 2012. – Т. 43. – №. 5. – С. 357-357.
4. Мошкин М. П., Кондратюк Е. Ю., Герлинская Л. А. Половое поведение, хемосигналы и репродуктивный успех самцов мышей при активации неспецифического звена иммунной системы // Журнал общей биологии. – 2009. – Т. 70. – №. 6. – Р. 515-526.
5. Мошкин М. П. Кондратюк Е. Ю., Литвинова Е. А., Герлинская Л. А. Активация специфического иммунитета самцов как стимулятор фертильности самок. “Феномен дочерей Лота” // Журнал общей биологии. – 2010. – Т. 71. – №. 5. – С. 425.
6. Abe K., Takano H., Ito T. Microvasculature of the mouse epididymis, with special reference to fenestrated capillaries localized in the initial segment // The Anatomical Record. – 1984. – V. 209. – №. 2. – Р. 209-218.
7. Abolins S. R., Pockock M. J., Hafalla J. C., Riley E. M., Viney M. E. Measures of immune function of wild mice, *Mus musculus* //Molecular Ecology. – 2011. – V. 20. – №. 5. – Р. 881-892.
8. Abu Elhija M., Lunenfeld E., Huleihel M. LPS increases the expression levels of IL- 18, ICE and IL- 18 R in mouse testes // American journal of reproductive immunology. – 2008. – V. 60. – №. 4. – Р. 361-371.

9. Adams T., Rosenkranz J. A. Social isolation during postweaning development causes hypoactivity of neurons in the medial nucleus of the male rat amygdala // *Neuropsychopharmacology*. – 2016. – V. 41. – №. 7. – P. 1929-1940.
10. Albert M., Roussel C. Strain differences in the concentration, motility and morphology of epididymal sperm in relation to puberty in mice // *International journal of andrology*. – 1984. – V. 7. – №. 4. – P. 334-347.
11. Anway M. D., Cupp A. S., Uzumcu M., Skinner M. K. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility // *Science*. – 2005. – V. 308. – №. 5727. – P. 1466-1469.
12. Arakawa H., Arakawa K., Deak T. Sickness-related odor communication signals as determinants of social behavior in rat: a role for inflammatory processes // *Hormones and behavior*. – 2010. – V. 57. – №. 3. – P. 330-341.
13. Arteaga-Silva M., Vargas-Villavicencio J. A., Viguera-Villaseñor R. M., Rodríguez-Dorantes M., Morales-Montor J. *Taenia crassiceps* infection disrupts estrous cycle and reproductive behavior in BALB/c female mice // *Acta tropica*. – 2009. – V. 109. – №. 2. – P. 141-145.
14. Aumuller G., Riva A. Morphology and functions of the human seminal vesicle // *Andrologia*. – 1992. – V. 24. – №. 4. – P. 183-196.
15. Avitsur R. Gender Differences in Sickness-induced Changes in Sexual Behavior: Neuroimmune and Neurochemical Mechanisms. – Hebrew University of Jerusalem, 1998.
16. Avitsur R., Cohen E., Yirmiya R. Effects of interleukin-1 on sexual attractivity in a model of sickness behavior // *Physiology & behavior*. – 1997. – V. 63. – №. 1. – P. 25-30.
17. Awoniyi C. A., Santulli R., Sprando R. L., Ewing I. L., Zirkin, B. R. Restoration of advanced spermatogenic cells in the experimentally regressed rat testis: quantitative relationship to testosterone concentration within the testis // *Endocrinology*. – 1989. – V. 124. – №. 3. – P. 1217-1223.

18. Baker D. G. Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research // *Clinical microbiology reviews*. – 1998. – V. 11. – №. 2. – P. 231-266.
19. Barnett S. A. *The rat: A study in behavior*. – Chicago: The University of Chicago Press, –1975.
20. Bauche F., Stéphan J. P., Touzalin A. M., Jégou B. In vitro regulation of an inducible-type NO synthase in the rat seminiferous tubule cells // *Biology of reproduction*. – 1998. – V. 58. – №. 2. – P. 431-438.
21. Benfield D. A., Nelson E., Collins J. E., Harris L., Goyal S. M., Robison D., Christianson W.T., Morrison R.B., Gorcyca D., Chladek D. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332) // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. – 1992. – V. 4. – №. 2. – P. 127-133.
22. Bhushan S., Hossain H., Lu Y., Geisler A., Tchatalbachev S., Mikulski Z., Schuler G., Klug J., Pilatz A., Wagenlehner F., Chakraborty T., Meinhardt A. Uropathogenic *E. coli* induce different immune response in testicular and peritoneal macrophages: implications for testicular immune privilege // *PloS one*. – 2011. – V. 6. – №. 12. – P. e28452.
23. Bhushan S., Tchatalbachev S., Klug J., Fijak M., Pineau C., Chakraborty T., Meinhardt A. Uropathogenic *Escherichia coli* block MyD88-dependent and activate MyD88-independent signaling pathways in rat testicular cells // *The Journal of Immunology*. – 2008. – V. 180. – №. 8. – P. 5537-5547.
24. Bian J., Guo X., Xiong C., Li J., Tian Y., Ma H., Zhang Y., Nie Y., Yu L., Xiao L. Experimental study of the effect of rhTNF-alpha on human sperm mitochondrial function and motility in vitro // *Zhonghua nan ke xue= National Journal of Andrology*. – 2004. – V. 10. – №. 6. – P. 415-419.
25. Billington W. D. Influence of immunological dissimilarity of mother and foetus on size of placenta in mice // *Nature*. – 1964. – V. 202. – №. 4929. – P. 317-318.

26. Binder N. K., Sheedy J. R., Hannan N. J., Gardner D. K. Male obesity is associated with changed spermatozoa Cox4i1 mRNA level and altered seminal vesicle fluid composition in a mouse model // *MHR: Basic science of reproductive medicine*. – 2015. – V. 21. – №. 5. – P. 424-434.
27. Bornstein S. R., Rutkowski H., Vrezas I. Cytokines and steroidogenesis // *Molecular and cellular endocrinology*. – 2004. – V. 215. – №. 1-2. – P. 135-141.
28. Bromfield J. J., Schjenken J. E., Chin P. Y., Care A. S., Jasper M. J., Robertson S. A. Maternal tract factors contribute to paternal seminal fluid impact on metabolic phenotype in offspring // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2014. – V. 111. – №. 6. – P. 2200-2205.
29. Bulmer J. N., Williams P. J., Lash G. E. Immune cells in the placental bed // *International Journal of Developmental Biology*. – 2009. – V. 54. – №. 2-3. – P. 281-294.
30. Byers S. L., Wiles M. V., Dunn S. L., Taft R. A Mouse estrous cycle identification tool and images // *PloS one*. – 2012. – V. 7. – №. 4. – P. e35538.
31. Chan O. C., Chow P. H. Total ablation of paternal accessory sex glands curtails developmental potential in preimplantation embryos in the golden hamster // *Anatomy and embryology*. – 2001. – V. 204. – №. 2. – P. 117-122.
32. Chaouat G., Dubanchet S., Ledée N. Cytokines: important for implantation? // *Journal of assisted reproduction and genetics*. – 2007. – V. 24. – №. 11. – P. 491-505.
33. Chen Q., Yan M., Cao Z., Li X., Zhang Y., Shi J., Feng G.H., Peng H., Zhang X., Zhang Y., Qian J., Duan E., Zhai Q., Zhou Q. Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder // *Science*. – 2016. – V. 351. – №. 6271. – P. 397-400.
34. Cheng C. Y., Mruk D. D. The blood-testis barrier and its implications for male contraception // *Pharmacological reviews*. – 2012. – V. 64. – №. 1. – P. 16-64.

35. Chin P. Y., Macpherson A. M., Thompson J. G., Lane M., Robertson S. A. Stress response genes are suppressed in mouse preimplantation embryos by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) // Human reproduction. – 2009. – V. 24. – №. 12. – P. 2997-3009.
36. Chung N. P. Y., Cheng C. Y. Is cadmium chloride-induced inter-Sertoli tight junction permeability barrier disruption a suitable *in vitro* model to study the events of junction disassembly during spermatogenesis in the rat testis? // Endocrinology. – 2001. – V. 142. – №. 5. – P. 1878-1888.
37. Cisternas C. D., Tome K., Caeiro X. E., Dadam F. M., Garcia-Segura L. M., Cambiasso M. J.. Sex chromosome complement determines sex differences in aromatase expression and regulation in the stria terminalis and anterior amygdala of the developing mouse brain //Molecular and cellular endocrinology. – 2015. – V. 414. – P. 99-110.
38. Clarke A.G. The effects of maternal pre-immunization on pregnancy in the mouse // Reproduction. – 1971. – V. 24. – №. 3. – P. 369-375.
39. Clayburgh D. R. Barrett T. A., Tang Y., Meddings J. B., Van Eldik L. J., Watterson D. M., Clarke L. L., Mrsny R.J., Turner J. R. Epithelial myosin light chain kinase-dependent barrier dysfunction mediates T cell activation-induced diarrhea in vivo // The Journal of clinical investigation. – 2005. – V. 115. – №. 10. – P. 2702-2715.
40. Collodel G., Federico M. G., Geminiani M., Martini S., Bonechi C., Rossi C., Figura N., Moretti, E. Effect of trans-resveratrol on induced oxidative stress in human sperm and in rat germinal cells // Reproductive Toxicology. – 2011. – V. 31. – №. 2. – P. 239-246.
41. Collodel G., Moretti E., Brecchia G., Kuželová L., Arruda J., Mourvaki E., Castellini C. Cytokines release and oxidative status in semen samples from rabbits treated with bacterial lipopolysaccharide // Theriogenology. – 2015. – V. 83. – №. 7. – P. 1233-1240.

42. Comhaire F. H., Vermeulen A. Testosterone concentration in the fluids of seminiferous tubules, the interstitium and the rete testis of the rat // *Journal of Endocrinology*. – 1976. – V. 70. – №. 2. – P. 229-235.
43. Cooper T. G., Waites G. M. H. Investigation by luminal perfusion of the transfer of compounds into the epididymis of the anaesthetized rat // *Reproduction*. – 1979. – V. 56. – №. 1. – P. 159-164.
44. Cooper J. C., Dealtry G. B., Ahmed M. A., Arck P. C., Klapp B. F., Blois S. M., Fernández N. An impaired breeding phenotype in mice with a genetic deletion of beta-2 microglobulin and diminished MHC class I expression: role in reproductive fitness // *Biology of reproduction*. – 2007. – V. 77. – №. 2. – P. 274-279.
45. Da Silva N., Barton C. R. Macrophages and dendritic cells in the post-testicular environment // *Cell and tissue research*. – 2016. – V. 363. – №. 1. – P. 97-104.
46. Da Silva N., Cortez-Retamozo V., Reinecker H.C., Wildgruber M., Hill E., Brown D., Swirsk F.K., Pittet M.J., Breton S. A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis // *Reproduction (Cambridge, England)*. – 2011. – V. 141. – №. 5. – P. 653.
47. Dantzer R. et al. Cytokine actions on behavior // *Cytokines in the nervous system*. – Springer, Boston, MA, 1996. – P. 117-144.
48. Dardmeh F., Alipour H., Gazerani P., van der Horst G., Brandsborg E., Nielsen H. I. *Lactobacillus rhamnosus* PB01 (DSM 14870) supplementation affects markers of sperm kinematic parameters in a diet-induced obesity mice model // *PLoS One*. – 2017. – V. 12. – №. 10. – P. e0185964.
49. De M., Choudhuri R., Wood G. W. Determination of the number and distribution of macrophages, lymphocytes, and granulocytes in the mouse uterus from mating through implantation // *Journal of leukocyte biology*. – 1991. – V. 50. – №. 3. – P. 252-262.
50. Dejucq N., Chousterman S., Jégou B. The testicular antiviral defense system: localization, expression, and regulation of 2' 5' oligoadenylate synthetase,

double-stranded RNA-activated protein kinase, and Mx proteins in the rat seminiferous tubule // *The Journal of cell biology*. – 1997. – V. 139. – №. 4. – P. 865-873.

51. Dias B. G., Ressler K. J. Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations // *Nature neuroscience*. – 2014. – V. 17. – №. 1. – P. 89-96.

52. Dietz D. M., LaPlant Q., Watts E. L., Hodes G. E., Russo S. J., Feng J., Oosting R.S., Vialou V., Nestler E. J. Paternal transmission of stress-induced pathologies // *Biological psychiatry*. – 2011. – V. 70. – №. 5. – P. 408-414.

53. Jin L., Dong J., Zhang J. Toxicity of Mercuric Chloride at Lower Dosage Exposure on Reproductive Function of Male Mice // *Journal of Environment and Health*. – 1992. – №. 02.

54. Dominguez J., Riolo J. V., Xu Z., Hull E. M. Regulation by the medial amygdala of copulation and medial preoptic dopamine release // *Journal of Neuroscience*. – 2001. – V. 21. – №. 1. – P. 349-355.

55. Dulka B. N., Bress K. S., Grizzell J. A., Cooper M. A. Social dominance modulates stress-induced neural activity in medial prefrontal cortex projections to the basolateral amygdala // *Neuroscience*. – 2018. – V. 388. – P. 274-283.

56. Edwards J. C., Barnard C. J. The effects of *Trichinella* infection on intersexual interactions between mice // *Animal Behaviour*. – 1987. – V. 35. – №. 2. – P. 533-540.

57. Eggert-Kruse W., Boit R., Rohr G., Aufenanger J., Hund M., Strowitzki T. Relationship of seminal plasma interleukin (IL)-8 and IL-6 with semen quality // *Human reproduction*. – 2001. – V. 16. – №. 3. – P. 517-528.

58. Eisermann J., Register K. B., Strickler R. C., Collins J. L. The effect of tumor necrosis factor on human sperm motility in vitro // *Journal of andrology*. – 1989. – V. 10. – №. 4. – P. 270-274.

59. Evans J., Salamonsen L. A., Winship A., Menkhorst E., Nie G., Gargett C. E., Dimitriadis E. Fertile ground: human endometrial programming and



lessons in health and disease // *Nature Reviews Endocrinology*. – 2016. – V. 12. – №. 11. – P. 654-667.

60. Fabian D., Juhás S., Il'ková G., Koppel J. Dose-and time-dependent effects of TNF [alpha] and actinomycin D on cell death incidence and embryo growth in mouse blastocysts // *Zygote*. – 2007. – V. 15. – №. 3. – P. 241.

61. Faivre B., Grégoire A., Prévault M., Cézilly F., Sorci G. Immune activation rapidly mirrored in a secondary sexual trait // *Science*. – 2003. – V. 300. – №. 5616. – P. 103-103.

62. Feore S. M., Bennett M., Chantrey J., Jones T., Baxb D., Begon M. The effect of cowpox virus infection on fecundity in bank voles and wood mice // *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. – 1997. – V. 264. – №. 1387. – P. 1457-1461.

63. Fichorova R. N. Impact of *T. vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome // *Journal of reproductive immunology*. – 2009. – V. 83. – №. 1-2. – P. 185-189.

64. Filová B., Ostatníková D., Celec P., Hodosy, J. The effect of testosterone on the formation of brain structures // *Cells Tissues Organs*. – 2013. – V. 197. – №. 3. – P. 169-177.

65. Fitzgerald N. A., Shellam G. R. Host genetic influences on fetal susceptibility to murine cytomegalovirus after maternal or fetal infection // *Journal of Infectious Diseases*. – 1991. – V. 163. – №. 2. – P. 276-281.

66. Fleming T. P., Watkins A. J., Velazquez M. A., Mathers J. C., Prentice A. M., Stephenson J., Barker M., Saffery R, Yajnik C.S., Eckert J.J., Hanson M.A., Forrester T., Gluckman P.D., Godfrey, K. M. Origins of lifetime health around the time of conception: causes and consequences // *The Lancet*. – 2018. – V. 391. – №. 10132. – P. 1842-1852.

67. Flickinger C. J., Bush L. A., Howards S. S., Herr J. C. Distribution of leukocytes in the epithelium and interstitium of four regions of the Lewis rat epididymis // *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*. – 1997. – V. 248. – №. 3. – P. 380-390.

68. Fujita Y., Mihara T., Okazaki T., Shitanaka M., Kushino R., Ikeda C., Negishi H, Liu Z, Richards S, Shimada, M. Toll-like receptors (TLR) 2 and 4 on human sperm recognize bacterial endotoxins and mediate apoptosis // *Human Reproduction*. – 2011. – V. 26. – №. 10. – P. 2799-2806.
69. Fullston T., Palmer N. O., Owens J. A., Mitchell M., Bakos H. W., Lane, M. Diet-induced paternal obesity in the absence of diabetes diminishes the reproductive health of two subsequent generations of mice // *Human reproduction*. – 2012. – V. 27. – №. 5. – P. 1391-1400.
70. Fullston T., Teague E. M. C. O., Palmer N. O., DeBlasio M. J., Mitchell M., Corbett M., Print C.G., Owens J.A., Lane M. Paternal obesity initiates metabolic disturbances in two generations of mice with incomplete penetrance to the F2 generation and alters the transcriptional profile of testis and sperm microRNA content // *The FASEB Journal*. – 2013. – V. 27. – №. 10. – P. 4226-4243.
71. Fynn-Thompson E., Cheng H., Teixeira J. Inhibition of steroidogenesis in Leydig cells by Müllerian-inhibiting substance // *Molecular and cellular endocrinology*. – 2003. – V. 211. – №. 1-2. – P. 99-104.
72. Garamszegi L. Z., Møller A. P., Török J., Michl G., Péczely P., Richard M. Immune challenge mediates vocal communication in a passerine bird: an experiment // *Behavioral Ecology*. – 2004. – V. 15. – №. 1. – P. 148-157.
73. Gerard N., Syed V., Bardin W., Genetet N., Jégou B. Sertoli cells are the site of interleukin-1 $\alpha$  synthesis in rat testis // *Molecular and cellular endocrinology* – 1991 – V. 82 – №. 1 – P.13-16.
74. Gerlinskaya L.A., Anisimova M.V., Kontsevaya G.V., Maslennikova S.O., Romashchenko A.V., Gong Y., Moshkin Y.M., Moshkin M.P. Mating with immunised male mice affects the phenotype of adult progeny // *Reproduction*. – 2020. – V. 160. – №. 1. – P. 117-127.
75. Gerlinskaya L. A., Litvinova E. A., Kontsevaya G. V., Feofanova N. A., Achasova K. M., Anisimova Svetlana O Maslennikova, Zolotykh M. A, Moshkin Y.M, Moshkin M. P. Phenotypic variations in transferred progeny due to

genotype of surrogate mother // *MHR: Basic science of reproductive medicine*. – 2019. – V. 25. – №. 2. – P. 88-99.

76. Gerlinskaya L. A., Maslennikova S. O., Anisimova M. V., Feofanova N. A., Zavjalov E. L., Kontsevaya G. V., Moshkin Y.M., Moshkin, M. P. Modulation of embryonic development due to mating with immunised males // *Reproduction, Fertility and Development*. – 2017. – V. 29. – №. 3. – P. 565-574.

77. Gerlinskaya L., Moshkin M., Evsikov V. Allogenic stimulation in early pregnancy improves pre-and postnatal ontogenesis in BALB/cLac mice // *Journal of Reproduction and Development* – 2000 – V. 46 – №. 6. P. 387-396.

78. Gerlinskaya L. A., Shnayder E. P., Dotsenko A. S., Maslennikova S. O., Zavjalov E. L., Moshkin, M. P. Antigen-induced changes in odor attractiveness and reproductive output in male mice // *Brain, behavior, and immunity*. – 2012. – V. 26. – №. 3. – P. 451-458.

79. Goldbard S. B., Gollnick S. O., Warner C. M. Synthesis of H-2 antigens by preimplantation mouse embryos // *Biology of reproduction*. – 1985. – V. 33. – №. 1. – P. 30-36.

80. Gopichandran N., Ekbote U. V., Walker J. J., Brooke D., Orsi N. M. Multiplex determination of murine seminal fluid cytokine profiles // *Reproduction*. – 2006. – V. 131. – №. 3. – P. 613-621.

81. Gresham R., Adekunbi D. A., Hu M., Li X. F., T O'Byrne K. Kisspeptin in the medial amygdala and sexual behavior in male rats // *Neuroscience letters*. – 2016. – V. 627. – P. 13-17.

82. Gruschwitz M. S., Brezinschek R., Brezinschek H. P. Cytokine levels in the seminal plasma of infertile males // *Journal of Andrology*. – 1996. – V. 17. – №. 2. – P. 158-163.

83. Guegan C., Vila M., Rosoklija G., Hays A. P., Przedborski S. Recruitment of the mitochondrial-dependent apoptotic pathway in amyotrophic lateral sclerosis // *Journal of Neuroscience*. – 2001. – V. 21. – №. 17. – P. 6569-6576.

84. Guerin L. R., Moldenhauer L. M., Prins J. R., Bromfield J. J., Hayball J. D., Robertson S. A. Seminal fluid regulates accumulation of FOXP3+ regulatory T cells in the preimplantation mouse uterus through expanding the FOXP3+ cell pool and CCL19-mediated recruitment // *Biology of reproduction*. – 2011. – V. 85. – №. 2. – P. 397-408.
85. Guvvala P. R., Sellappan S., Parameswaraiyah R. J. Impact of arsenic (V) on testicular oxidative stress and sperm functional attributes in Swiss albino mice // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2016. – V. 23. – №. 18. – P. 18200-18210.
86. Haimovici F., Hill J. A., Anderson D. J. Variables affecting toxicity of human sera in mouse embryo cultures // *Journal of in vitro fertilization and embryo transfer*. – 1988. – V. 5. – №. 4. – P. 202-206.
87. Hales B. F., Robaire B. Paternal exposure to drugs and environmental chemicals: effects on progeny outcome // *Journal of andrology*. – 2001. – V. 22. – №. 6. – P. 927-936.
88. Hart R., Norman R. J. The longer-term health outcomes for children born as a result of IVF treatment: Part I–General health outcomes // *Human reproduction update*. – 2013. – V. 19. – №. 3. – P. 232-243.
89. Hazzouri M., Pivot-Pajot C., Faure A. K., Usson Y., Pelletier R., Sèle B., Khochbin S., Rousseaux, S. Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone-deacetylases // *European journal of cell biology*. – 2000. – V. 79. – №. 12. – P. 950-960.
90. Heany S.J., van Honk J., Stein D.J., Brooks S.J. A quantitative and qualitative review of the effects of testosterone on the function and structure of the human social-emotional brain // *Metabolic brain disease*. – 2016. – V. 31. – №. 1. – P. 157-167.
91. Hedger M.P. Immunophysiology and pathology of inflammation in the testis and epididymis // *Journal of andrology*. – 2011. – V. 32. – №. 6. – P. 625-640.

92. Hedger M.P., Hales D.B. Immunophysiology of the male reproductive tract // Knobil and Neill's physiology of reproduction. – Academic Press, 2006. – P. 1195-1286.
93. Hetherington C. M. Absence of effect of maternal immunization to paternal antigens on placental weight, fetal weight and litter size in the mouse // *Reproduction*. – 1978. – V. 53. – №. 1. – P. 81-84.
94. Hetherington C.M., Humber D.P. The effects of active immunization on the decidual cell reaction and ectopic blastocyst development in mice // *Reproduction*. – 1975. – V. 43. – №. 2. – P. 333-336.
95. Hinton B. T., Howards S. S. Permeability characteristics of the epithelium in the rat caput epididymidis // *Reproduction*. – 1981. – V. 63. – №. 1. – P. 95-99.
96. Hirai S., Naito M., Terayama H., Ning Q., Miura M., Shirakami G., Itoh M. Difference in abundance of blood and lymphatic capillaries in the murine epididymis // *Medical molecular morphology*. – 2010. – V. 43. – №. 1. – P. 37-42.
97. Ho H. N., Yang Y.S., Hsieh R.P., Lin H.R., Chen S.U., Chen H.F., Huang S.C., Lee T.Y., Gill T.J. Sharing of human leukocyte antigens in couples with unexplained infertility affects the success of in vitro fertilization and tubal embryo transfer // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. – 1994. – V. 170. – №. 1. – P. 63-71.
98. Hoffer A. P., Hinton B. T. Morphological evidence for a blood-epididymis barrier and the effects of gossypol on its integrity // *Biology of reproduction*. – 1984. – V. 30. – №. 4. – P. 991-1004.
99. Holdcraft R. W., Braun R. E. Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids // *Development*. – 2004. – V. 131. – №. 2. – P. 459-467.
100. Hu M., Richard J. E., Maliqueo M., Kokosar M., Fornes R., Benrick A., Jansson T., Ohlsson C., Wu X., Skibicka K.P., Stener-Victorin E. Maternal testosterone exposure increases anxiety-like behavior and impacts the limbic

system in the offspring // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2015. – V. 112. – №. 46. – P. 14348-14353.

101. Huleihel M., Lunenfeld E. Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors // Asian journal of andrology. – 2004. – V. 6. – №. 3. – P. 259-268.

102. Huleihel M., Lunenfeld E., Levy A., Potashnik G., Glezerman M. Distinct expression levels of cytokines and soluble cytokine receptors in seminal plasma of fertile and infertile men // Fertility and sterility. – 1996. – V. 66. – №. 1. – P. 135-139.

103. Jafari O., Babaei H., Kheirandish R., Samimi A. S., Zahmatkesh A. Histomorphometric evaluation of mice testicular tissue following short-and long-term effects of lipopolysaccharide-induced endotoxemia // Iranian journal of basic medical sciences. – 2018. – V. 21. – №. 1. – P. 47.

104. James D. A. Effects of antigenic dissimilarity between mother and foetus on placental size in mice // Nature. – 1965. – V. 205. – №. 4971. – P. 613-614.

105. Janecki A., Jakubowiak A., Steinberger A. Effect of cadmium chloride on transepithelial electrical resistance of Sertoli cell monolayers in two-compartment cultures—a new model for toxicological investigations of the “blood-testis” barrier *in vitro* // Toxicology and applied pharmacology. – 1992. – V. 112. – №. 1. – P. 51-57.

106. Jarow J. P., Chen H., Rosner W., Trentacoste S., Zirkin B. R. Assessment of the androgen environment within the human testis: minimally invasive method to obtain intratesticular fluid // Journal of andrology. – 2001. – V. 22. – №. 4. – P. 640-645.

107. Jarow J. P., Wright W. W., Brown T. R., Yan X., Zirkin B. R. Bioactivity of androgens within the testes and serum of normal men // Journal of andrology. – 2005. – V. 26. – №. 3. – P. 343-348.

108. Jiang H. Y., Lee K. H., Tang, P. L., Chow P. H. Ablation of paternal accessory sex glands is detrimental to embryo development during implantation // *Anatomy and embryology*. – 2001. – V. 203. – №. 4. – P. 255-263.
109. Johansson M.H., Bromfield J.J., Jasper M.J., Robertson S.A. Semen activates the female immune response during early pregnancy in mice // *Immunology*. – 2004. – V. 112. – №. 2. – P. 290-300.
110. Johnson M., Setchell B.P. Protein and immunoglobulin content of rete testis fluid of rams // *Reproduction*. – 1968. – V. 17. – №. 2. – P. 403-406.
111. Kachkache M., Acker G. M., Chaouat G., Noun A., Garabedian M. Hormonal and local factors control the immunohistochemical distribution of immunocytes in the rat uterus before conceptus implantation: effects of ovariectomy, fallopian tube section, and injection // *Biology of reproduction*. – 1991. – V. 45. – №. 6. – P. 860-868.
112. Karp C.L., El-Safi S.H., Wynn T.A., Satti M.M., Kordofani A.M., Hashim F.A., Hag-Ali M., Neva F.A., Nutman T.B., Sacks D.L. In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma // *The Journal of clinical investigation*. – 1993. – V. 91. – №. 4. – P. 1644-1648.
113. Kaushic C., Ferreira V. H., Kafka J. K., Nazli A. HIV infection in the female genital tract: discrete influence of the local mucosal microenvironment // *American journal of reproductive immunology*. – 2010. – V. 63. – №. 6. – P. 566-575.
114. Kavaliers M., Colwell D. D. Discrimination by female mice between the odours of parasitized and non-parasitized males // *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. – 1995. – V. 261. – №. 1360. – P. 31-35.
115. Kerchner M., Malsbury C. W., Ward O. B., Ward I. L. Sexually dimorphic areas in the rat medial amygdala: resistance to the demasculinizing effect of prenatal stress // *Brain research*. – 1995. – V. 672. – №. 1-2. – P. 251-260.

116. Khil P. P., Smirnova N. A., Romanienko P. J., Camerini-Otero R. D. The mouse X chromosome is enriched for sex-biased genes not subject to selection by meiotic sex chromosome inactivation // *Nature genetics*. – 2004. – V. 36. – №. 6. – P. 642-646.
117. Kirschner N., Poetzl C., von den Driesch P., Wladykowski E., Moll I., Behne M. J., Brandner J. M. Alteration of tight junction proteins is an early event in psoriasis: putative involvement of proinflammatory cytokines // *The American journal of pathology*. – 2009. – V. 175. – №. 3. – P. 1095-1106.
118. Knee R. A., Hickey D. K., Beagley K. W., Jones R. C. Transport of IgG across the blood-luminal barrier of the male reproductive tract of the rat and the effect of estradiol administration on reabsorption of fluid and IgG by the epididymal ducts // *Biology of reproduction*. – 2005. – V. 73. – №. 4. – P. 688-694.
119. Koçak I., Yenisey C., Dündar M., Okyay P., Serter M. Relationship between seminal plasma interleukin-6 and tumor necrosis factor  $\alpha$  levels with semen parameters in fertile and infertile men // *Urological research*. – 2002. – V. 30. – №. 4. – P. 263-267.
120. Koch S., Nusrat A. Dynamic regulation of epithelial cell fate and barrier function by intercellular junctions // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2009. – V. 1165. – №. 1. – P. 220.
121. Kojima F., Frolov A., Matnani R., Woodward J.G., Crofford L.J. Reduced T Cell-Dependent Humoral Immune Response in Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 Null Mice Is Mediated by Nonhematopoietic Cells // *The Journal of Immunology*. – 2013. – V. 191. – №. 10. – P. 4979-4988.
122. Kokab A., Akhondi M.M., Sadeghi M.R., Modarresi M.H., Aarabi M., Jennings R., Pacey A.A., Eley A. Raised inflammatory markers in semen from men with asymptomatic chlamydial infection // *Journal of andrology*. – 2010. – T. 31. – №. 2. – C. 114-120.
123. Kopa Z., Wenzel J., Papp G.K., Haidl G. Role of granulocyte elastase and interleukin-6 in the diagnosis of male genital tract inflammation // *Andrologia*. – 2005. – V. 37. – №. 5. – P. 188-194.



124. Lambrot R., Xu C., Saint-Phar S., Chountalos G., Cohen T., Paquet M., Suderman M., Hallett M., Kimmins S. Low paternal dietary folate alters the mouse sperm epigenome and is associated with negative pregnancy outcomes // *Nature communications*. – 2013. – V. 4. – №. 1. – P. 1-13.

125. Lane M., McPherson N. O., Fullston T., Spillane M., Sandeman L., Kang W.X., Zander-Fox D.L. Oxidative stress in mouse sperm impairs embryo development, fetal growth and alters adiposity and glucose regulation in female offspring // *PLoS One*. – 2014. – V. 9. – №. 7. – P. e100832.

126. Lazaros L., Xita N., Takenaka A., Sofikitis N., Makrydimas G., Stefos T., Kosmas I., Zikopoulos K., Hatzi E., Georgiou I. Semen quality is influenced by androgen receptor and aromatase gene synergism // *Human reproduction*. – 2012. – V. 27. – №. 12. – P. 3385-3392.

127. Li M. W. M., Mruk D. D., Cheng C. Y. Mitogen-activated protein kinases in male reproductive function // *Trends in molecular medicine*. – 2009. – V. 15. – №. 4. – P. 159-168. a.

128. Li M. W. M., Mruk D. D., Lee W. M., Cheng C. Y. Cytokines and junction restructuring events during spermatogenesis in the testis: an emerging concept of regulation // *Cytokine & growth factor reviews*. – 2009. – V. 20. – №. 4. – P. 329-338. b.

129. Li M. W. M., Mruk D. D., Lee W. M., Cheng C. Y. Connexin 43 and plakophilin-2 as a protein complex that regulates blood–testis barrier dynamics // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2009. – V. 106. – №. 25. – P. 10213-10218. c.

130. Li M. W. M., Xia W., Mruk D. D., Wang C. Q., Yan H. H., Siu M. K., Lui W., Lee W. M., Cheng C. Y. Tumor necrosis factor  $\alpha$  reversibly disrupts the blood–testis barrier and impairs Sertoli–germ cell adhesion in the seminiferous epithelium of adult rat testes // *Journal of Endocrinology*. – 2006. – V. 190. – №. 2. – P. 313-329.

131. Liu W. M., Pang R. T., Chiu P. C., Wong B. P., Lao K., Lee K. F., Yeung W. S. Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage

division in mouse // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2012. – V. 109. – №. 2. – P. 490-494.

132. Loehle C. Social barriers to pathogen transmission in wild animal populations // Ecology. – 1995. – V. 76. – №. 2. – P. 326-335.

133. Lombardo M. V., Ashwin E., Auyeung B., Chakrabarti B., Taylor K., Hackett G., Bullmore E. T., Baron-Cohen, S. Fetal testosterone influences sexually dimorphic gray matter in the human brain // Journal of Neuroscience. – 2012. – V. 32. – №. 2. – P. 674-680.

134. Loureiro B., Bonilla L., Block J., Fear J. M., Bonilla A. Q., Hansen, P. J. Colony-stimulating factor 2 (CSF-2) improves development and posttransfer survival of bovine embryos produced *in vitro* // Endocrinology. – 2009. – V. 150. – №. 11. – P. 5046-5054.

135. Lui W. Y., Cheng C. Y. Regulation of cell junction dynamics by cytokines in the testis – a molecular and biochemical perspective // Cytokine & growth factor reviews. – 2007. – V. 18. – №. 3-4. – P. 299-311.

136. Lui W. Y., Lee W. M., Cheng C. Y. Transforming growth factor- $\beta$ 3 perturbs the inter-Sertoli tight junction permeability barrier *in vitro* possibly mediated via its effects on occludin, zonula occludens-1, and claudin-11 // Endocrinology. – 2001. – V. 142. – №. 5. – P. 1865-1877.

137. Lui W. Y., Lee W. M., Cheng C. Y. Transforming growth factor  $\beta$ 3 regulates the dynamics of Sertoli cell tight junctions via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway // Biology of Reproduction. – 2003. – V. 68. – №. 5. – P. 1597-1612. a.

138. Lui W. Y., Wong C. H., Mruk D. D., Cheng, C. Y. TGF- $\beta$ 3 regulates the blood-testis barrier dynamics via the p38 mitogen activated protein (MAP) kinase pathway: an *in vivo* study // Endocrinology. – 2003. – V. 144. – №. 4. – P. 1139-1142. b.

139. Luu H., Tate A. T. Recovery and immune priming modulate the evolutionary trajectory of infection- induced reproductive strategies // Journal of evolutionary biology. – 2017. – V. 30. – №. 9. – P. 1748-1762.

140. Maddocks S., Hargreave T. B., Reddie K., Fraser H. M., Kerr J. B., Sharpe, R. M. Intratesticular hormone levels and the route of secretion of hormones from the testis of the rat, guinea pig, monkey and human // *International journal of andrology*. – 1993. – V. 16. – №. 4. – P. 272-278.
141. Maegawa M., Kamada M., Irahara M., Yamamoto S., Yoshikawa S., Kasai Y., Ohmoto Y., Gima H., Thaler C.J., Aono T. A repertoire of cytokines in human seminal plasma // *Journal of reproductive immunology*. – 2002. – V. 54. – №. 1-2. – P. 33-42.
142. Mann T. The biochemistry of semen and of the male reproductive tract // *The biochemistry of semen and of the male reproductive tract*. – 1964.
143. Martinez-Prado E., Camejo Bermúdez M. I. Expression of IL- 6, IL- 8, TNF-  $\alpha$ , IL- 10, HSP- 60, Anti- HSP- 60 Antibodies, and Anti- sperm Antibodies, in Semen of Men with Leukocytes and/or Bacteria // *American Journal of Reproductive Immunology*. – 2010. – V. 63. – №. 3. – P. 233-243.
144. 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.
145. Masugi-Tokita M., Yoshida T., Kageyama S., Kawata M., Kawauchi, A. Metabotropic glutamate receptor subtype 7 has critical roles in regulation of the endocrine system and social behaviours // *Journal of neuroendocrinology*. – 2018. – V. 30. – №. 3. – P. e12575.
146. Matalliotakis I.M., Cakmak H., Fragouli Y., Kourtis A., Arici A., Huszar G. Increased IL- 18 levels in seminal plasma of infertile men with genital tract infections // *American journal of reproductive immunology*. – 2006. – V. 55. – №. 6. – P. 428-433.
147. Mattner P. E. Phagocytosis of spermatozoa by leucocytes in bovine cervical mucus in vitro // *Reproduction*. – 1969. – V. 20. – №. 1. – P. 133
148. Mauduit C., Jaspard J. M., Poncelet E., Charlet C., Revol A., Franchimont P., Benahmed M. Tumor necrosis factor-alpha antagonizes follicle-

stimulating hormone action in cultured Sertoli cells // *Endocrinology*. – 1993. – V. 133. – №. 1. – P. 69-76.

149. Mauduit C., Besset V., Caussanel V., Benahmed M. Tumor necrosis factor  $\alpha$  receptor p55 is under hormonal (follicle-stimulating hormone) control in testicular Sertoli cells // *Biochemical and biophysical research communications*. – 1996. – V. 224. – №. 3. – P. 631-637.

150. McMaster M.T., Newton R.C., Dey S.K., Andrews G.K. Activation and distribution of inflammatory cells in the mouse uterus during the preimplantation period // *The Journal of Immunology*. – 1992. – V. 148. – №. 6. – P. 1699-1705.

151. McNamara J. M., Houston A. I. State-dependent life histories // *Nature*. – 1996. – V. 380. – №. 6571. – P. 215-221.

152. Meng J., Holdcraft R. W., Shima J. E., Griswold M. D., Braun, R. E. Androgens regulate the permeability of the blood–testis barrier // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2005. – V. 102. – №. 46. – P. 16696-16700.

153. Meng J., Greenlee A. R., Taub C. J., Braun R. E. Sertoli cell-specific deletion of the androgen receptor compromises testicular immune privilege in mice // *Biology of reproduction*. – 2011. – V. 85. – №. 2. – P. 254-260.

154. Mital P., Hinton B. T., Dufour J. M. The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions // *Biology of reproduction*. – 2011. – V. 84. – №. 5. – P. 851-858.

155. Moore C. A., Lockett B. L., Lennox K. W., McAninch J. W., Wurster J. C., Ceccarelli F. E., Gangai, M. P. Prednisone in the treatment of acute epididymitis: a cooperative study // *The Journal of urology*. – 1971. – V. 106. – №. 4. – P. 578-580.

156. Morales-Montor J., Gamboa-Dominguez A., Rodriguez-Dorantes M., Cerbon M. A. Tissue damage in the male murine reproductive system during experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis // *The Journal of parasitology*. – 1999. – V. 85. – №. 5. – P. 887-890.

157. More A. S., Mishra J. S., Gopalakrishnan K., Blesson C. S., Hankins G. D., Sathishkumar K. Prenatal testosterone exposure leads to gonadal hormone-dependent hyperinsulinemia and gonadal hormone-independent glucose intolerance in adult male rat offspring // *Biology of reproduction*. – 2016. – V. 94. – №. 1. – P. 1-11.

158. Morgan H. L., Watkins A. J. Transgenerational impact of environmental change // *Reproductive Sciences in Animal Conservation*. – Springer, Cham, 2019. – P. 71-89.

159. Morgan H. L., Watkins A. J. The influence of seminal plasma on offspring development and health // *Seminars in cell & developmental biology*. – Academic Press, 2020. – V. 97. – P. 131-137.

160. Morinière J., Rousseaux S., Steuerwald U., Soler-López M., Curtet S., Vitte A. L., Govin J., Gaucher J., Sadoul K., Hart D.J., Krijgsveld J., Khochbin S., Müller C.W., Petosa C. Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain // *Nature*. – 2009. – V. 461. – №. 7264. – P. 664-668.

161. Moshkin M. P., Akulov A. E., Petrovski D. V., Saik O. V., Petrovskiy E. D., Savelov A. A., Koptuyug, I. V. Proton magnetic resonance spectroscopy of brain metabolic shifts induced by acute administration of 2- deoxy- d- glucose and lipopolysaccharides // *NMR in Biomedicine*. – 2014. – V. 27. – №. 4. – P. 399-405.

162. Moshkin M., Gerlinskaya L., Morozova O., Bakhvalova V., Evsikov V. Behaviour, chemosignals and endocrine functions in male mice infected with tick-borne encephalitis virus // *Psychoneuroendocrinology*. – 2002. – V. 27. – №. 5. – P. 603-608.

163. Moshkin M.P., Elu K., Litvinova E.A., Gerlinskaia, L.A. The activation of specific immunity in male mice stimulates fertility of their breeding partners: The phenomenon of Lot's daughters // *Zhurnal obshchei biologii*. – 2010. – V. 71. – №. 5. – P. 425-435.

164. Mruk D. D., Cheng C. Y. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis // *Endocrine reviews*. – 2004. – V. 25. – №. 5. – P. 747-806.
165. Mullen Jr T. E., Kiessling R. L., Kiessling A. A. Tissue-specific populations of leukocytes in semen-producing organs of the normal, hemicastrated, and vasectomized mouse // *AIDS research and human retroviruses*. – 2003. – V. 19. – №. 3. – P. 235-243.
166. Nagaosa K., Nakashima C., Kishimoto A., Nakanishi Y. Immune response to bacteria in seminiferous epithelium // *Reproduction*. – 2009. – V. 137. – №. 5. – P. 879.
167. Nashan D., Malorny U., Sorg C., Cooper T., Nieschlag E. Immuno-competent cells in the murine epididymis // *International journal of andrology*. – 1989. – V. 12. – №. 1. – P. 85-94.
168. Nelson J. F., Felicio L. S., Randall P. K., Sims C., & Finch C. E. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology // *Biology of reproduction*. – 1982. – V. 27. – №. 2. – P. 327-339.
169. O'Bryan M. K., Hedger M. P. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis* // Austin, TX: Landes Bioscience and Springer Science+ Business Media. – 2008. – P. 92-114.
170. O'Bryan M. K., Gerdprasert O., Nikolic-Paterson D. J., Meinhardt A., Muir J. A., Foulds L. M., Phillips P., Hedger M. P. Cytokine profiles in the testes of rats treated with lipopolysaccharide reveal localized suppression of inflammatory responses // *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. – 2005. – V. 288. – №. 6. – P. R1744-R1755.
171. O'Bryan M.K., Schlatt S, Phillips D.J., de Kretser D.M., Hedger M.P. Bacterial lipopolysaccharide-induced inflammation compromises testicular function at multiple levels in vivo // *Endocrinology*. – 2000. – V. 141. – №. 1. – P. 238-246.

172. O'leary S., Jasper M. J., Warnes G. M., Armstrong D. T., Robertson S. A. Seminal plasma regulates endometrial cytokine expression, leukocyte recruitment and embryo development in the pig // *Reproduction*. – 2004. – V. 128. – №. 2. – P. 237-247.

173. Papadimas J., Goulis D. G., Sotiriades A., Daniilidis M., Fleva A., Bontis J. N., Tourkantonis A. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha in normal/infertile men // *Archives of andrology*. – 2002. – V. 48. – №. 2. – P. 107-113.

174. Penna G., Mondaini N., Amuchastegui S., Degli Innocenti S., Carini, M., Giubilei G., Fibbi B., Colli E., Maggi M., Adorini L. Seminal plasma cytokines and chemokines in prostate inflammation: interleukin 8 as a predictive biomarker in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and benign prostatic hyperplasia // *European urology*. – 2007. – V. 51. – №. 2. – P. 524-533.

175. Pentikäinen V., Erkkilä K., Suomalainen L., Ojala M., Pentikäinen M. O., Parvaneh, M., Dunkel L. TNF $\alpha$  down-regulates the Fas ligand and inhibits germ cell apoptosis in the human testis // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2001. – V. 86. – №. 9. – P. 4480-4488.

176. Perdichizzi A., Nicoletti F., La Vignera S., Barone N., D'Agata R., Vicari E., Calogero, A. E. Effects of tumour necrosis factor- $\alpha$  on human sperm motility and apoptosis // *Journal of clinical immunology*. – 2007. – V. 27. – №. 2. – P. 152-162.

177. Phillips D. M., Mahler S. Migration of leukocytes+ phagocytosis of spermatozoa in rabbit vagina // *Journal of cell biology*. – 1114 first ave, 4th fl, New York, ny 10021 usa: rockefeller univ press, 1975. – V. 67. – №. 2. – P. A334-A334.

178. Pillay T., Sobia P., Olivier A. J., Narain K., Liebenberg L. J., Ngcapu S., Mhlongo M., Passmore J. S., Baxter C., Archary D. Semen IgM, IgG1, and IgG3 differentially associate with pro-inflammatory cytokines in HIV-infected men // *Frontiers in immunology*. – 2019. – V. 9. – P. 3141.

179. Pillay T., Sobia P., Olivier A. J., Narain K., Liebenberg L. J., Ngcapu S., Mhlongo M., Passmore S., Baxter C., Archary D. Semen IgM, IgG1, and IgG3 differentially associate with pro-inflammatory cytokines in HIV-infected men // *Frontiers in immunology*. – 2019. – V. 9. – P. 3141.
180. Politch J. A., Tucker L., Bowman F. P., Anderson D. J. Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men // *Human Reproduction*. – 2007. – V. 22. – №. 11. – P. 2928-2935.
181. Pöllänen P., Cooper T. G. Vascular permeability to effectors of the immune system in the male rat reproductive tract at puberty // *Journal of reproductive immunology*. – 1995. – V. 28. – №. 2. – P. 85-109.
182. Potts W. K., Manning C. J., Wakeland E. K. Mating patterns in seminatural populations of mice influenced by MHC genotype // *Nature*. – 1991. – V. 352. – №. 6336. – P. 619-621.
183. Provencher S. W. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra // *Magnetic resonance in medicine*. – 1993. – V. 30. – №. 6. – P. 672-679.
184. Rametse C. L., Adefuye A. O., Olivier A. J., Curry L., Gamiieldien H., Burgers W. A., Lewis D. A., Williamson A. L., Katz A. A., Passmore, J. A. SInflammatory cytokine profiles of semen influence cytokine responses of cervicovaginal epithelial cells // *Frontiers in immunology*. – 2018. – V. 9. – P. 2721.
185. Rasmussen S. J., Eckmann L., Quayle A. J., Shen L., Zhang Y. X., Anderson D. J., Fierer J., Kagnoff M. F. Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to Chlamydia infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis // *The Journal of clinical investigation*. – 1997. – V. 99. – №. 1. – P. 77-87.
186. Ribeiro C. M., Silva E. J., Hinton B. T., Avellar M. C. W.  $\beta$ -defensins and the epididymis: contrasting influences of prenatal, postnatal, and adult scenarios // *Asian journal of andrology*. – 2016. – V. 18. – №. 2. – P. 323.



187. Riccioli A., Starace D., Galli R., Fuso A., Scarpa S., Palombi F., Cesaris P., Ziparo E., Filippini A. Sertoli cells initiate testicular innate immune responses through TLR activation // *The Journal of Immunology*. – 2006. – V. 177. – №. 10. – P. 7122-7130.

188. Riley J. K., Heeley J. M., Wyman A. H., Schlichting E. L., Moley K. HTRAIL and KILLER are expressed and induce apoptosis in the murine preimplantation embryo // *Biology of reproduction*. – 2004. – V. 71. – №. 3. – P. 871-877.

189. Robertson S. A., Allanson M., Mau V. J. Molecular regulation of uterine leukocyte recruitment during early pregnancy in the mouse // *Placenta*. – 1998. – V. 19. – P. 101-119.

190. Robertson S. A., Care A. S., Moldenhauer L. M. Regulatory T cells in embryo implantation and the immune response to pregnancy // *The Journal of clinical investigation*. – 2018. – V. 128. – №. 10. – P. 4224-4235.

191. Robertson S. A., Chin P. Y., Femia J. G., Brown H. M. Embryotoxic cytokines—Potential roles in embryo loss and fetal programming // *Journal of reproductive immunology*. – 2018. – V. 125. – P. 80-88.

192. Robertson S. A., Chin P. Y., Glynn D. J., Thompson J. G. Peri-conceptual cytokines—setting the trajectory for embryo implantation, pregnancy and beyond // *American Journal of Reproductive Immunology*. – 2011. – V. 66. – P. 2-10.

193. Robertson S. A., Mayrhofer G., Seamark R. F. Uterine epithelial cells synthesize granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 in pregnant and nonpregnant mice // *Biology of reproduction*. – 1992. – V. 46. – №. 6. – P. 1069-1079.

194. Robertson S. A., Mau V. J., Tremellen K. P., Seamark R. F. Role of high molecular weight seminal vesicle proteins in eliciting the uterine inflammatory response to semen in mice // *Reproduction*. – 1996. – V. 107. – №. 2. – P. 265-277.

195. Robertson S. A., Sharkey D. J. Seminal fluid and fertility in women // *Fertility and sterility*. – 2016. – V. 106. – №. 3. – P. 511-519.
196. Robertson S. A. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract // *Cell and tissue research*. – 2005. – V. 322. – №. 1. – P. 43-52.
197. Robertson S. A., Sjöblom C., Jasper M. J., Norman R. J., Seamark R. F. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes glucose transport and blastomere viability in murine preimplantation embryos // *Biology of Reproduction*. – 2001. – V. 64. – №. 4. – P. 1206-1215.
198. Rodgers A. B., Morgan C. P., Bronson S. L., Revello S., Bale T. L. Paternal stress exposure alters sperm microRNA content and reprograms offspring HPA stress axis regulation // *Journal of Neuroscience*. – 2013. – V. 33. – №. 21. – P. 9003-9012.
199. Rodgers A. B., Morgan C. P., Leu N. A., Bale T. L. Transgenerational epigenetic programming via sperm microRNA recapitulates effects of paternal stress // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – V. 112. – №. 44. – P. 13699-13704.
200. Rokade S., Kishore U., Madan T. Testicular Immune Privilege: A Recently Discovered Domain of Collectins // *The Collectin Protein Family and Its Multiple Biological Activities*. – 2021. – P. 165-183.
201. Roldan E. R. S., Gomendio M., Vitullo A. D. The evolution of eutherian spermatozoa and underlying selective forces: female selection and sperm competition // *Biological Reviews*. – 1992. – V. 67. – №. 4. – P. 551-593.
202. Sanocka D., Jędrzejczak P., Szumała- Kaękol A., Frączek M., Kurpisz, M. Male genital tract inflammation: The role of selected interleukins in regulation of prooxidant and antioxidant enzymatic substances in seminal plasma // *Journal of Andrology*. – 2003. – V. 24. – №. 3. – P. 448-455.
203. Sar M., Lubahn D. B., French F. S., Wilson E. M. Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues // *Endocrinology*. – 1990. – V. 127. – №. 6. – P. 3180-3186.

204. Sarkar P., Bergman K., O'Connor T. G., Glover V. Maternal antenatal anxiety and amniotic fluid cortisol and testosterone: possible implications for fetal programming // *Journal of neuroendocrinology*. – 2008. – V. 20. – №. 4. – P. 489-496.
205. Sarkar O., Bahrainwala J., Chandrasekaran S., Kothari S., Mathur P. P., Agarwal A. Impact of inflammation on male fertility // *Front Biosci (Elite Ed)*. – 2011. – V. 3. – P. 89-95.
206. Sarkey S., Azcoitia I., Garcia-Segura L. M., Garcia-Ovejero D., DonCarlos L. L. Classical androgen receptors in non-classical sites in the brain // *Hormones and behavior*. – 2008. – V. 53. – №. 5. – P. 753-764.
207. Schjenken J. E., Robertson S. A. Seminal fluid signalling in the female reproductive tract: implications for reproductive success and offspring health // *The male role in pregnancy loss and embryo implantation failure*. – 2015. – P.127-158.
208. Schjenken J. E., Robertson S. A. The female response to seminal fluid // *Physiological reviews*. – 2020. – V. 100. – №. 3. – P. 1077-1117.
209. Schjenken J. E., Glynn D. J., Sharkey D. J., Robertson, S. A. TLR4 signaling is a major mediator of the female tract response to seminal fluid in mice // *Biology of reproduction*. – 2015. – V. 93. – №. 3. – P. 68, 1-13.
210. Scott J. L., Ketheesan N., Summers P. M. Spermatozoa and seminal plasma induce a greater inflammatory response in the ovine uterus at oestrus than dioestrus // *Reproduction, Fertility and Development*. – 2009. – V. 21. – №. 7. – P. 817-826.
211. Seiler P., Cooper T. G., Yeung C.H., Nieschlag E. Regional variation in macrophage antigen expression by murine epididymal basal cells and their regulation by testicular factors // *Journal of andrology*. – 1999. – V. 20. – №. 6. – P. 738-746.
212. Serre V., Robaire B. Distribution of immune cells in the epididymis of the aging Brown Norway rat is segment-specific and related to the luminal content // *Biology of reproduction*. – 1999. – V. 61. – №. 3. – P. 705-714.

213. Shaner P. J. L., Yu A. Y., Ke L., Li S. H. Spacing behaviors and spatial recruitment of a wild rodent in response to parasitism // *Ecosphere*. – 2017. – V. 8. – №. 4. – P. e01780.
214. Shang Y., Myers M., Brown M. Formation of the androgen receptor transcription complex // *Molecular cell*. – 2002. – V. 9. – №. 3. – P. 601-610.
215. Sharkey D. J., Tremellen K. P., Jasper M. J., Gemzell-Danielsson K., Robertson S. A. Seminal fluid induces leukocyte recruitment and cytokine and chemokine mRNA expression in the human cervix after coitus // *The Journal of Immunology*. – 2012. – V. 188. – №. 5. – P. 2445-2454.
216. Sharkey D. J., Glynn D. J., Schjenken J. E., Tremellen K. P., Robertson, S. A. Interferon-gamma inhibits seminal plasma induction of colony-stimulating factor 2 in mouse and human reproductive tract epithelial cells // *Biology of reproduction*. – 2018. – V. 99. – №. 3. – P. 514-526.
217. Sharkey D. J., Macpherson A. M., Tremellen K. P., Robertson S. A. Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells // *Molecular human reproduction*. – 2007. – V. 13. – №. 7. – P. 491-501.
218. Sharma U., Conine C. C., Shea J. M., Boskovic A., Derr A. G., Bing X. Y., Belleannee C., Kucukural A., Serra R.W., Sun F., Song L., Carone B.R., Ricci E.P., Li X.Z., Fauquier L., Moore M.J., Sullivan R., Mello C.C., Garber M., Rando O. J. Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals // *Science*. – 2016. – V. 351. – №. 6271. – P. 391-396.
219. Shirakata Y., Hiradate Y., Inoue H., Sato E., Tanemura K. Histone h4 modification during mouse spermatogenesis // *Journal of Reproduction and Development*. – 2014.
220. Silva E. J., Ribeiro C. M., Mirim A. F., Silva A. A., Romano R. M., Hallak J., Avellar M. C. W. Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid differentially modulate epididymal cytokine and chemokine profiles and sperm parameters in

experimental acute epididymitis // *Scientific reports*. – 2018. – V. 8. – №. 1. – P. 1-12.

221. Siqueira L. G., Tribulo P., Chen Z., Denicol A. C., Ortega M. S., Negrón-Pérez V. M., Kannampuzha-Francis J., Pohler K.G., Rivera R.M., Hansen P. J. Colony-stimulating factor 2 acts from days 5 to 7 of development to modify programming of the bovine conceptus at day 86 of gestation // *Biology of reproduction*. – 2017. – V. 96. – №. 4. – P. 743-757.

222. Siu M. K. Y., Cheng C. Y. Dynamic cross-talk between cells and the extracellular matrix in the testis // *Bioessays*. – 2004. – V. 26. – №. 9. – P. 978-992.

223. Siu M. K. Y., Lee W. M., Cheng C. Y. The interplay of collagen IV, tumor necrosis factor- $\alpha$ , gelatinase B (matrix metalloprotease-9), and tissue inhibitor of metalloproteases-1 in the basal lamina regulates Sertoli cell-tight junction dynamics in the rat testis // *Endocrinology*. – 2003. – V. 144. – №. 1. – P. 371-387.

224. Siu E. R., Wong E. W., Mruk D. D., Porto C. S., Cheng C. Y. Focal adhesion kinase is a blood–testis barrier regulator // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2009. – V. 106. – №. 23. – P. 9298-9303.

225. Sjöblom C., Wikland M., Robertson S. A. Granulocyte–macrophage colony-stimulating factor promotes human blastocyst development *in vitro* // *Human Reproduction*. – 1999. – V. 14. – №. 12. – P. 3069-3076.

226. Sjöblom C., Roberts C. T., Wikland M., Robertson S. A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor alleviates adverse consequences of embryo culture on fetal growth trajectory and placental morphogenesis // *Endocrinology*. – 2005. – V. 146. – №. 5. – P. 2142-2153.

227. Starace D., Galli R., Paone A., Cesaris P. D., Filippini A., Ziparo E., Riccioli A. Toll-like receptor 3 activation induces antiviral immune responses in mouse Sertoli cells // *Biology of reproduction*. – 2008. – V. 79. – №. 4. – P. 766-775.

228. Stearns S. C. The evolution of life histories // 1<sup>st</sup> edn. New York: Oxford University Press. – 1992. – №. 575 S81.

229. Suh J. H., Gong E. Y., Hong C. Y., Park, E., Ahn R. S., Park, K. S., Lee K. Reduced testicular steroidogenesis in tumor necrosis factor- $\alpha$  knockout mice // The Journal of steroid biochemistry and molecular biology. – 2008. – V. 112. – №. 1-3. – P. 117-121.

230. Sun W., Dong H., Becker A.S., Dapito D.H., Modica S., Grandl G., Opitz L., Efthymiou V, Straub L.G., Sarker G., Balaz M., Balazova L., Perdikari A., Kiehlmann E., Bacanovic S., Zellweger C., Peleg-Raibstein D., Pelczar P., Reik W., Burger I.A., Meyenn F., Wolfrum C. Author Correction: Cold-induced epigenetic programming of the sperm enhances brown adipose tissue activity in the offspring // Nature medicine. – 2018. – V. 24. – №. 11. – P. 1776-1776.

231. Syed V., Stephan J. P., Gérard N., Legrand A., Parvinen M., Bardin C. W., Jegou B. Residual bodies activate Sertoli cell interleukin-1 alpha (IL-1 alpha) release, which triggers IL-6 production by an autocrine mechanism, through the lipoxygenase pathway // Endocrinology. – 1995. – V. 136. – №. 7. – P. 3070-3078.

232. Terashima M., Barbour S., Ren J., Yu W., Han Y., Muegge K. Effect of high fat diet on paternal sperm histone distribution and male offspring liver gene expression // Epigenetics. – 2015. – V. 10. – №. 9. – P. 861-871.

233. Thomas F., Teriokhin A. T., Budilova E. V., Brown, S. P., Renaud F., Guegan J. F. Human birthweight evolution across contrasting environments // Journal of evolutionary biology. – 2004. – V. 17. – №. 3. – P. 542-553.

234. Thompson J. G., Kind K. L., Roberts C. T., Robertson S. A., Robinson J. S. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: short-and long-term consequences for the health of children conceived through assisted reproduction technology: more reason for caution? // Human reproduction. – 2002. – V. 17. – №. 11. – P. 2783-2786.

235. Turner T. T., Jones C. E., Howards S. S., Ewing L. L., Zegeye B., Gunsalus G. L. On the androgen microenvironment of maturing spermatozoa // *Endocrinology*. – 1984. – V. 115. – №. 5. – P. 1925-1932.
236. Turner J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease // *Nature reviews immunology*. – 2009. – T. 9. – №. 11. – P. 799-809.
237. Tsai M. J., O'Malley B. W. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members // *Annu Rev Biochem*. – 1994. – V. 63. – P. 451-486.
238. Tzanoulinou S., García-Mompó C., Castillo-Gómez E., Veenit V., Nacher J., Sandi C. Long-term behavioral programming induced by peripuberty stress in rats is accompanied by GABAergic-related alterations in the Amygdala // *PloS one*. – 2014. – V. 9. – №. 4. – P. e94666.
239. Velando A., Drummond H., Torres R. Senescent birds redouble reproductive effort when ill: confirmation of the terminal investment hypothesis // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2006. – V. 273. – №. 1593. – P. 1443-1448.
240. Voisin A., Whitfield M., Damon-Soubeyrand C., Goubely C., Henry-Berger J., Saez F., Kocer A., Drevet J.R., Guiton, R. Comprehensive overview of murine epididymal mononuclear phagocytes and lymphocytes: unexpected populations arise // *Journal of reproductive immunology*. – 2018. – V. 126. – P. 11-17.
241. Voisin A, Saez F., Drevet J. R., Guiton R. The epididymal immune balance: a key to preserving male fertility // *Asian journal of andrology*. – 2019. – V. 21. – №. 6. – P. 531.
242. Walker W. H. Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2010. – V. 365. – №. 1546. – P. 1557-1569.
243. Walsh S. V., Hopkins A. M., Nusrat A. Modulation of tight junction structure and function by cytokines // *Advanced drug delivery reviews*. – 2000. – V. 41. – №. 3. – P. 303-313.

244. Wang F., Liu W., Jiang Q., Gong M., Chen R., Wu H., Han R., Chen Y., Han, D. et al. Lipopolysaccharide-induced testicular dysfunction and epididymitis in mice: a critical role of tumor necrosis factor alpha // *Biology of reproduction*. – 2019. – V. 100. – №. 3. – P. 849-861.

245. Wang R. S. Yeh S., Chen L. M., Lin H. Y., Zhang C., Ni, J., Wu C. C., Sant'Agnese A, Mesy-Bentley K. L., Tzeng C. R., Chang C. Androgen receptor in Sertoli cell is essential for germ cell nursery and junctional complex formation in mouse testes // *Endocrinology*. – 2006. – V. 147. – №. 12. – P. 5624-5633.

246. Wang R. S. Yeh S., Tzeng, C. R., Specific androgen receptor knockout mice // *Endocrine reviews*. – 2009. – V. 30. – №. 2. – P. 119-132.

247. Warner C. M., Gollnick S. O. Expression of H-2K major histocompatibility antigens on preimplantation mouse embryos // *Biology of reproduction*. – 1993. – V. 48. – №. 5. – P. 1082-1087.

248. Watanabe N., Yamamoto M. Neural mechanisms of social dominance // *Frontiers in neuroscience*. – 2015. – V. 9. – P. 154.

249. Watkins A. J. et al. Paternal diet programs offspring health through sperm-and seminal plasma-specific pathways in mice // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2018. – V. 115. – №. 40. – P. 10064-10069.

250. Watkins A. J., Sinclair K. D. Paternal low protein diet affects adult offspring cardiovascular and metabolic function in mice // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. – 2014. – V. 306. – №. 10. – P. H1444-H1452.

251. Watkins A. J. Sirovica S., Stokes B., Isaacs M., Addison O., Martin, R. A. Paternal low protein diet programs preimplantation embryo gene expression, fetal growth and skeletal development in mice // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. – 2017. – V. 1863. – №. 6. – P. 1371-1381.

252. Weber E. M. Algers B., Würbel H., Hultgren J., Olsson, I. A. S. Influence of strain and parity on the risk of litter loss in laboratory mice // *Reproduction in Domestic Animals*. – 2013. – V. 48. – №. 2. – P. 292-296.



253. Weiss L. M., Dubey J. P. Toxoplasmosis: A history of clinical observations // *International journal for parasitology*. – 2009. – V. 39. – №. 8. – P. 895-901.
254. Whitaker J., Moy S. S., Godfrey V., Nielsen J., Bellinger D., Bradfield J. Effects of cage size and enrichment on reproductive performance and behavior in C57BL/6Tac mice // *Lab animal*. – 2009. – V. 38. – №. 1. – P. 24-34.
255. Williams G. C. Natural selection, the costs of reproduction, and a refinement of Lack's principle // *The American Naturalist*. – 1966. – V. 100. – №. 916. – P. 687-690.
256. Willis C., Poulin R. Preference of female rats for the odours of non-parasitised males: the smell of good genes? // *Folia parasitologica*. – 2000. – V. 47. – №. 1. – P. 6-10.
257. Winnall W. R., Muir J. A., Hedger M. P. Rat resident testicular macrophages have an alternatively activated phenotype and constitutively produce interleukin- 10 in vitro // *Journal of leukocyte biology*. – 2011. – V. 90. – №. 1. – P. 133-143.
258. Winnall W. R., Muir J. A., Liew S., Hirst J. J., Meachem S. J., Hedger, M. P. Effects of chronic celecoxib on testicular function in normal and lipopolysaccharide- treated rats // *International journal of andrology*. – 2009. – V. 32. – №. 5. – P. 542-555.
259. Wira C. R., Fahey J. V., Sentman C. L., Pioli P. A., Shen L. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions // *Immunological reviews*. – 2005. – V. 206. – №. 1. – P. 306-335.
260. Wong C. H., Cheng C. Y. The blood- testis barrier: its biology, regulation, and physiological role in spermatogenesis // *Current topics in developmental biology*. – 2005. – V. 71. – P. 263-296.
261. Wong C. L., Chan O. C., Lee K. H., Chow P. H. Absence of paternal accessory sex glands dysregulates preimplantation embryo cell cycle and causes early oviductal-uterine transit in the golden hamster in vivo // *Fertility and sterility*. – 2008. – V. 89. – №. 4. – P. 1021-1024.

262. Wong C. L., Lee K. H., Lo K. M., Chan O. C., Goggins W., Chow, P. H. Ablation of paternal accessory sex glands imparts physical and behavioural abnormalities to the progeny: an in vivo study in the golden hamster // *Theriogenology*. – 2007. – V. 68. – №. 4. – P. 654-662.

263. Wong C., Mruk D. D., Lui W. Y., Cheng C. Y. Regulation of blood-testis barrier dynamics: an in vivo study // *Journal of cell science*. – 2004. – V. 117. – №. 5. – P. 783-798.

264. Wong C., Mruk D. D., Siu M. K., Cheng, C. Y. Blood-testis barrier dynamics are regulated by  $\alpha$ 2-macroglobulin via the c-Jun N-terminal protein kinase pathway // *Endocrinology*. – 2005. – V. 146. – №. 4. – P. 1893-1908.

265. Wong E. W. P., Mruk D. D., Cheng C. Y. Biology and regulation of ectoplasmic specialization, an atypical adherens junction type, in the testis // *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 2008. – V. 1778. – №. 3. – P. 692-708.

266. Wu L., Lu Y., Jiao Y., Liu B., Li S., Li Y., Li F., Chen D, Liu J., Xiong Y. Gu, J. Lu X., Li, X. et al. Paternal psychological stress reprograms hepatic gluconeogenesis in offspring // *Cell metabolism*. – 2016. – V. 23. – №. 4. – P. 735-743.

267. Xia W., Cheng C. Y. TGF- $\beta$ 3 regulates anchoring junction dynamics in the seminiferous epithelium of the rat testis via the Ras/ERK signaling pathway: an in vivo study // *Developmental biology*. – 2005. – V. 280. – №. 2. – P. 321-343.

268. Xia W., Mruk D. D., Lee W. M., Cheng, C. Y. Differential interactions between transforming growth factor- $\beta$ 3/T $\beta$ R1, TAB1, and CD2AP disrupt blood-testis barrier and Sertoli-germ cell adhesion // *Journal of Biological Chemistry*. – 2006. – V. 281. – №. 24. – P. 16799-16813.

269. Xia W., Wong E. W., Mruk D. D., Cheng C. Y. TGF- $\beta$ 3 and TNF $\alpha$  perturb blood-testis barrier (BTB) dynamics by accelerating the clathrin-mediated endocytosis of integral membrane proteins: a new concept of BTB regulation during spermatogenesis // *Developmental biology*. – 2009. – V. 327. – №. 1. – P. 48-61.

270. Yan H. H. N., Cheng C. Y. Blood–testis barrier dynamics are regulated by an engagement/disengagement mechanism between tight and adherens junctions via peripheral adaptors // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2005. – V. 102. – №. 33. – P. 11722-11727.

271. Yan H. H. N., Mruk D. D., Lee W. M., Yan Cheng, C. Blood- testis barrier dynamics are regulated by testosterone and cytokines via their differential effects on the kinetics of protein endocytosis and recycling in Sertoli cells // *The FASEB journal*. – 2008. – V. 22. – №. 6. – P. 1945-1959. a.

272. Yan H. H. N., Mruk D. D., Lee W. M., Cheng, C. Y. Ectoplasmic specialization: a friend or a foe of spermatogenesis? // *Bioessays*. – 2007. – V. 29. – №. 1. – P. 36-48.

273. Yan H. H. N., Mruk D. D., Lee W. M., Cheng Y. C. Blood- testis barrier dynamics are regulated by testosterone and cytokines via their differential effects on the kinetics of protein endocytosis and recycling in Sertoli cells // *The FASEB journal*. – 2008. – V. 22. – №. 6. – P. 1945-1959. b.

274. Yan M., Zhang, X., Pu, Q., Huang, T., Xie, Q., Wang, Y., Gu H., Huang T., Li Z., Gu, J. Immunoglobulin G expression in human sperm and possible functional significance // *Scientific reports*. – 2016. – V. 6. – №. 1. – P. 1-8.

275. Zagoskin M. V., Davis R. E., Mukha D. V. Double stranded RNA in human seminal plasma // *Frontiers in genetics*. – 2017. – V. 8. – P. 154.

276. Zala S. M., Potts W. K., Penn D. J. Scent-marking displays provide honest signals of health and infection // *Behavioral Ecology*. – 2004. – V. 15. – №. 2. – P. 338-344.

277. Zhong T. Y., Arancibia S., Born R., Tampe R., Villar J., Del Campo M., Manubens A., Becker M. I. Hemocyanins stimulate innate immunity by inducing different temporal patterns of proinflammatory cytokine expression in macrophages // *The Journal of Immunology*. – 2016. – V. 196. – №. 11. – P. 4650-4662.

278. Ziebe S., Loft A., Povlsen B. B., Erb K., Agerholm I., Aasted M., Gabrielsen A., Hnida C., Zobel D.P., Munding B., Bendz S. H., Robertson, S. A. A randomized clinical trial to evaluate the effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in embryo culture medium for *in vitro* fertilization // Fertility and sterility. – 2013. – V. 99. – №. 6. – P. 1600-1609.

279. Zuk M., McKean K. A. Sex differences in parasite infections: patterns and processes // International journal for parasitology. – 1996. – V. 26. – №. 10. – P 1009-1024.