

## ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МАЛЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В СПЕРМАТОЗИДАХ КАК ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ТРАНСГЕНЕРАЦИОННОЙ ПЕРЕДАЧИ ЭФФЕКТОВ ОТЦОВСКОГО СТРЕССА: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

© 2023 г. О. В. Мальшева<sup>1, 2, \*</sup>, С. Г. Пивина<sup>1</sup>, Е. Н. Пономарева<sup>2</sup>, Н. Э. Ордян<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, 199034 Россия

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, 199034 Россия

\*E-mail: omal99@mail.ru

Поступила в редакцию 06.09.2022 г.

После доработки 29.09.2022 г.

Принята к публикации 10.10.2022 г.

Доказано, что стресс отца может влиять на фенотип потомков, вызывая соматические, поведенческие, гормональные и молекулярные изменения. Одним из гипотетических механизмов, ответственных за передачу отцовских эффектов потомству, может быть изменение спектра регуляторных некодирующих РНК в сперматозоидах. В настоящей работе мы исследовали влияние стресса отца в моделях посттравматического стрессового расстройства (ПТСР) и депрессии на представленность малых РНК (микро- и piwiРНК) в сперме стрессированных животных. Самцов крыс линии Wistar подвергали стрессу в двух парадигмах (“стресс–рестресс” и “выученная беспомощность”), что приводит к развитию у модельных животных ПТСР-подобного и депрессивно-подобного состояний соответственно. Через 48 суток после рестресса получали препараты сперматозоидов, из которых выделяли РНК. Спектр малых РНК исследовали методом NGS-секвенирования. У самцов с ПТСР-подобным состоянием по сравнению с группой контроля было выявлено изменение экспрессии 27 piwiРНК и 77 микроРНК. Среди мишеней этих miРНК можно выделить гены, продукты которых могут быть вовлечены в такие механизмы передачи отцовских эффектов потомству, как изменения метилирования ДНК, модификации гистонов и РНК-интерференции (*Dnmt3a*, *Setd5*, *Hdac1*, *Mllt10*, *Mtdh*), а также гены, связанные с функционированием инсулиноподобного фактора роста 2, экспрессия гена которого, как было показано ранее, изменена в ЦНС у потомства самцов с ПТСР-подобным состоянием (*Igf2*, *Igf2bp2*, *Igf2r*). У самцов со смоделированным депрессивно-подобным состоянием изменений представленности малых РНК не зарегистрировано. Полученные результаты свидетельствуют о выраженном влиянии стресса отца на спектр коротких некодирующих РНК в сперматозоидах у крыс, однако это влияние зависит от характера стрессового воздействия.

**Ключевые слова:** стресс отца, депрессия, посттравматическое стрессовое расстройство, сперма, малые некодирующие РНК, микроРНК, piwiРНК, крыса

DOI: 10.31857/S0041377123010078, EDN: GLBGPN

Последнее десятилетие ознаменовалось резким ростом интереса к идее о том, что условия окружающей среды предков могут влиять на фенотип будущих поколений. Очевидно, что матери играют гораздо большую роль в обеспечении раннего развития, чем отцы, особенно у млекопитающих (Sharma, 2013; Yan, 2014). Возможность отцовского вклада в потомство у многих видов ограничена сперматозоидами, благодаря чему могут быть созданы контролируемые условия эксперимента для исследования механизмов, ответственных за трансгенерационную

передачу эффектов влияния окружающей среды (Rando, 2012; Harker et al., 2018; Duffy et al., 2021).

Эпидемиологические и ретроспективные исследования, проведенные на различных выборках, подтверждают идею о том, что у человека отцовский стресс также может влиять на реактивность гипофизарно-адреноренальной системы, риск развития посттравматического стрессового расстройства (ПТСР), физическое и ментальное здоровье (Yehuda et al., 2007a, 2007b; Rodgers, Bale, 2015). Основными экспериментальными моделями, используемыми для изучения связи воздействий окружающей среды на отца с фенотипическими признаками потомства, являются особенности питания (Dimofski et al., 2021) и различ-

**Принятые сокращения:** ДПС – депрессивно-подобное состояние; ПТСР – посттравматическое стрессовое расстройство; ИФА – иммуноферментный анализ.

ные психологические стрессовые состояния. Примерами последних может служить хронический перманентный стресс (Rodgers et al., 2013) и стресс социального поражения (Dietz et al., 2011).

В качестве потенциальных эпигенетических механизмов передачи отцовских эффектов могут выступать изменение паттернов метилирования генома (в том числе нарушения импринтинга), конденсации хроматина, гистоновой кода. Также важную роль могут играть регуляторные некодирующие РНК, как длинные, так короткие (Yan, 2014; Rodgers et al., 2015; Yeshurun, Hannan, 2019). Зрелые сперматозоиды у млекопитающих изобилуют малыми РНК разных классов, в связи с чем этот тип молекул рассматривается как один из наиболее вероятных объектов, обеспечивающих влияние отцовского стресса на потомство (Fullston et al., 2013; Huang et al., 2013; Jodar et al., 2013; Kiani, Rassoulzadegan, 2013; Chen et al., 2016). В ряде работ доказана роль микроРНК сперматозоидов в передаче эффектов отцовского стресса потомству (Rodgers et al., 2013; Short et al., 2016).

Задача настоящей работы заключалась в сравнение спектра малых некодирующих РНК в сперме самцов крыс контрольных и крыс с сформированным ПТСР-подобным и депрессивно-подобным состоянием (ДПС), а также анализ возможных мишеней дифференциально экспрессирующихся микроРНК.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Животные.** Работа проведена на крысах линии Вистар (аутбредная линия) из ЦКП “Биоколлекция Института физиологии им. И.П. Павлова РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем”. Использовали самцов крыс в возрасте 3-х мес. и весом 250–280 г. с соблюдением рекомендаций по этике работы с животными, утвержденными правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по гуманному обращению с животными Института Физиологии им. И.П. Павлова РАН. Животных содержали в пластиковых клетках (по 5 животных в клетку) на стандартной диете (гранулированный комбикорм) при свободном доступе к воде и пище и 12-часовом режиме смены дня и ночи.

**Экспериментальные группы животных.** Было сформировано 3 группы животных: 1) с ПТСР-подобным состоянием, 2) с ДПС и 3) контрольная группа (интактные самцы). В каждую группу вошли 5 животных. Самцов группы 1 подвергали стрессу с использованием парадигмы “стресс–рестресс” (модель ПТСР). Вначале применяли комбинированное стрессовое воздействие, состоящее из 2-часовой иммобилизации в узких пластиковых пеналах, 20-минутного плавания в стеклянных цилиндрах диаметром 40 см и глубиной 60 см, заполненных водой при температуре  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ , и далее после небольшой паузы эфирный стресс в течение 1 мин. Далее через 7 сут

самцов подвергали повторному стрессу (рестрессу) в виде 30-минутной иммобилизации с целью развития стойкого ПТСР-подобного состояния (Пивина и др., 2015). Критерием включения в группу было снижение уровня кортикостерона в крови на 10-е сут после рестресса по сравнению с контрольной группой. У самцов группы 2 вырабатывали ДПС в парадигме “выученная беспомощность” (Czén et al., 2016). Самцов подвергали неизбежному и неконтролируемому электрокожному раздражению в клетке с токопроводящим полом размером  $30 \times 18 \times 20$  см. Удары электрического тока (1 мА, 50 Гц) длительностью 15 с подавались 60 раз в течение 1 ч с длительностью интервала между ударами током от 15 до 54 с. Критерием включения в группу служило повышение уровня кортикостерона в крови на 10-е сут после действия стресса. Контрольных самцов ( $n = 5$ ) оставляли интактными.

**Оценка уровня кортикостерона.** Кровь для анализа на содержание кортикостерона отбирали на 10-е сутки после рестресса или неизбежного электрокожного раздражения из хвостовой вены у животных всех групп. Образцы крови центрифугировали 10 минут при 2500 об./мин, полученную плазму хранили при  $-20^\circ\text{C}$ . Уровень кортикостерона определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов в соответствии с инструкцией производителя (ХЕМА, Россия) и анализатора Multiskan FS (Thermo Fisher Scientific, Финляндия).

Для статистического анализа содержания кортикостерона в крови использовали однофакторный ANOVA и последующие парные *post-hoc* сравнения (тест Тьюки) значений для каждой группы животных. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0.05$ .

**Получение сперматозоидов.** Через 48 сут после стрессовых процедур (период, необходимый для полного цикла созревания сперматозоидов) самцов всех групп подвергали действию диэтилового эфира в течение 3 мин, а затем декапитировали.

Сразу после забоя у самцов извлекали оба каудальных эпидидимуса, которые помещали в нагретый до  $37^\circ\text{C}$  стерильный сосуд с 1 мл 1-кратного PBS, содержащий 1% бычьего сывороточного альбумина. Эпидидимисы надрезали и инкубировали в течение 30 мин при температуре  $37^\circ\text{C}$ , позволяя подвижным сперматозоидам свободно всплыть. С целью исключения загрязнения образцов соматическими клетками жидкость, полученную после инкубации эпидидимисов и содержащую сперматозоиды, подвергали очистке в градиенте суспензии силиконовых частиц SupraSperm System и среды для подготовки сперматозоидов Sperm Preparation®Medium (оба производства ORIGIO, Дания) согласно инструкции производителя. Чистоту препаратов и число полученных сперматозоидов оценивали в камере Горяева под световым микроскопом после окраски 1%-ным

водным раствором эозина. Число выделенных подвижных сперматозоидов составило  $5.5 \pm 0.5$  млн на образец, а статистически значимых различий по этому показателю между группами самцов не было.

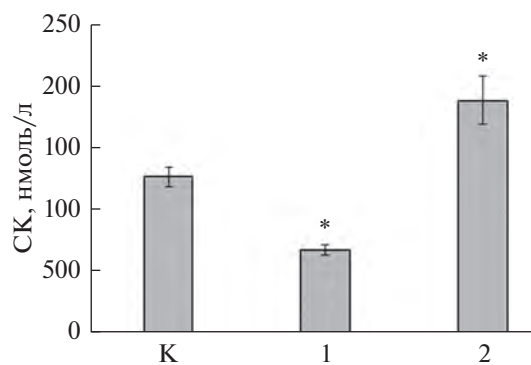
**NGS-секвенирование.** Полученные сперматозоиды помещали в Trizol (ThermoFisher) и хранили при  $-70^\circ\text{C}$  до выделения РНК. Тотальную РНК выделяли стандартным методом (гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции), качество выделенной РНК (RIN) оценивали на TapeStation (Agilent, США). Для приготовления и очистки библиотек кДНК использовали кит QIAseq miRNA Library Kit (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя. Для приготовления библиотек использовали 200 нг тотальной РНК от каждого образца. Секвенирование было проведено на платформе Illumina HiSeq по протоколу, рекомендованному для малых РНК (однонаправленное секвенирование, длина прочтения 50 п.н., глубина секвенирования 1–5 млн прочтений на образец). Приготовление библиотек и секвенирование нового поколения (NGS) было проведено одновременно для всех образцов.

Для каждого образца было получено от 2623091 до 3881243 прочтений, после биоинформатической фильтрации по качеству количество прочтений на образец в среднем составило 1600000. После выравнивания в среднем 32.5% прочтений были аннотированы как известные малые РНК разных классов (микроРНК, piwiРНК, тРНК), еще 30.5% прочтений были охарактеризованы как фрагменты рРНК и мРНК. Оставшиеся прочтения были аннотированы как картированные не охарактеризованные фрагменты. Для анализа дифференциальной экспрессии использовали матрицу количества чтений на ген без нормализации. Для оценки дифференциальной экспрессии коротких РНК использовали пакет DESeq2 R (Love et al., 2014). Оценку дифференциальной экспрессии в DESeq2 проводили только для микроРНК и piwiРНК с суммарным числом считываний  $\geq 15$  по всем образцам. Заключение о дифференциальной экспрессии микроРНК и piwiРНК производили, если абсолютное значение  $\log_2$ -кратного изменения ( $\log_2$  fold change) было  $>0.5$ , а значение  $p$ , с учетом поправки на множественные сравнения, было  $<0.05$ .

**Реактивы.** Использовали силиконовые частицы SupraSperm System, среду для подготовки сперматозоидов Sperm Preparation@Medium (ORIGIO, Дания), Тризол (ThermoFisher, США), набор для приготовления и очистки библиотек кДНК QIAseq miRNA Library Kit (Qiagen, Германия), ИФА-набор для определения кортикостерона в сыворотке крови (ХЕМА, Россия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 представлено содержание кортикостерона в плазме крови контрольных самцов, самцов с моделированным ПТСР или моделированной де-

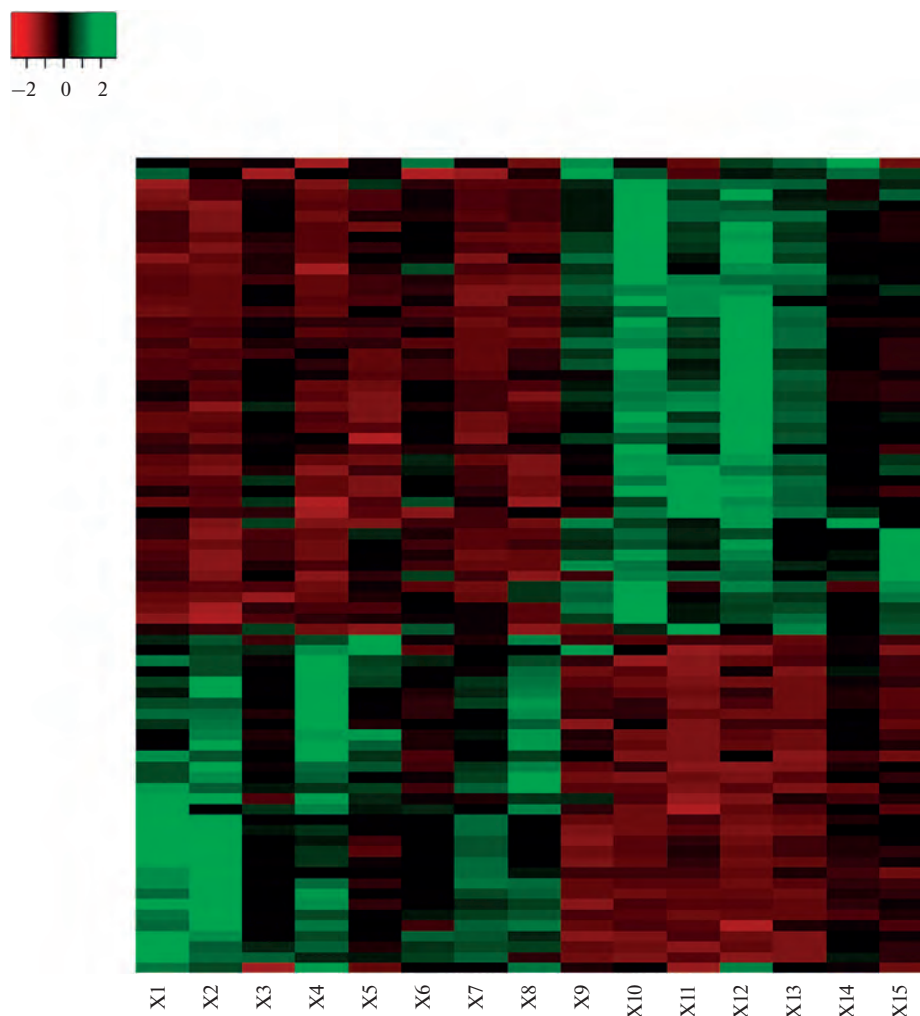


**Рис. 1.** Содержание кортикостерона (СК, нмоль/л) в крови самцов крыс контрольной группы (К), самцов с моделированным ПТСР (1) и самцов с моделированной депрессией (2) через 10 сут после стрессорного воздействия. Различия с контрольной группой достоверны при  $*P < 0.001$  (тест Тьюки).

прессией на 10-е сут после действия стресса. Однофакторный ANOVA показал статистически значимое влияние фактора группа животных на уровень кортикостерона ( $F_{2, 14} = 23.3$ ,  $p < 0.0001$ ). Дополнительный анализ *post-hoc* выявил, что у самцов с моделированным ПТСР наблюдается сниженный уровень кортикостерона в крови, тогда как у самцов с моделированной депрессией, напротив, уровень кортикостерона повышается по сравнению с контрольными самцами, что соответствует ПТСР-подобному или ДПС соответственно.

В трех группах животных (модель ПТСР, модель депрессии, контрольная группа) было проведено NGS-секвенирование коротких РНК, выделенных из сперматозоидов. После фильтрации по качеству в каждом образце было обнаружено в среднем 1600000 прочтений, из которых 14% были аннотированы как микроРНК, 7.5% – как piwiРНК, 26% – как фрагменты рРНК, 11% – как фрагменты тРНК, 4.5% – как фрагменты мРНК, что в целом соответствует данным литературы о содержании коротких РНК в сперматозоидах (Peng et al., 2012; Short et al., 2016). Всего в образцах было обнаружено 335 видов piwiРНК и 635 микроРНК. В результате дальнейшего анализа нам удалось выявить сходные изменения экспрессии микро- и piwiРНК во всех образцах группы с моделированным ПТСР по сравнению с контрольной группой ( $p < 0.05$ ). Дифференциальная экспрессия была выявлена для 27 piwiРНК (экспрессия 8 piwiРНК была понижена, 19 – повышена) и для 77 микроРНК (повышена экспрессия у 32 микроРНК и понижена – у 45 микроРНК) (рис. 2). Список коротких РНК, экспрессия которых в наибольшей степени изменена в сперматозоидах самцов с сформированным ПТСР-подобным состоянием, представлен в табл. 1.

Различия между группой животных с ДПС и контрольной группой оказались крайне незначительны-



**Рис. 2.** Тепловая карта дифференциально экспрессирующихся коротких некодирующих РНК у крыс экспериментальных и контрольной групп. В верхнем левом углу показана цветовая шкала дифференциальной экспрессии. Животные: X1–X5 – животные с ПТСР-подобным состоянием, X6–X10 – группа с депрессивно-подобным состоянием, X11–X15 – группа контроля. Хорошо видно, что группа с моделированной депрессией неоднородна: животные X6, X7 и X8 по паттерну экспрессии похожи на группу с ПТСР, а X9 и X10 – на группу контроля.

ми. Достоверные отличия были выявлены только для двух piwiРНК (*rno\_piR\_019288* и *rno\_piR\_016741*), экспрессия которых была повышена в группе ДПС. В целом образцы, полученные от животных этой группы, оказались неоднородными – экспрессия коротких РНК в трех образцах (X6, X7 и X8) была схожа с наблюдаемой в группе самцов с ПТСР, а еще два образца (X9 и X10) демонстрировали паттерн экспрессии, сходный с группой контроля (рис. 2). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о выраженном влиянии ПТСР-подобного состояния самцов на паттерн экспрессии коротких РНК в сперматозоидах по сравнению с контрольной группой, и отсутствию однозначного влияния ДПС на этот показатель.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время накоплено большое количество экспериментальных и эпидемиологических данных, указывающих на влияние отцовского стресса на физиологические функции и поведение потомков. На лабораторных грызунах в ряде экспериментов, использующих различные модели стрессовых воздействий, было установлено, что у потомков стрессированных самцов усиливается ДПС и тревожное поведение (Franklin et al., 2010; Dietz et al., 2011). Отметим, что в этих исследованиях самцов подвергали действию стрессов, которые у лабораторных грызунов формируют депрессивно-подобное состояние, проявляющееся не только в соответствующих изменениях поведения, но и в повышенной

**Таблица 1.** МикроРНК и piwiРНК, дифференциально экспрессирующиеся в сперматозоидах самцов крыс с моделированным ПТСР-подобным состоянием по сравнению с самцами контрольной группы

| Тип РНК и изменение экспрессии в группе с ПТСР | Название                     | Кратность изменения (log2 fold change) | Padj      |        |
|--|------------------------------|--|-----------|--------|
| piwiРНК, повышение экспрессии                  | rno_piR_005879               | 2.96                                   | 0.0004    |        |
|  | rno_piR_005900               | 1.915                                  | 5.038e-05 |        |
|  | rno_piR_000753               | 1.83                                   | 0.0007    |        |
|  | rno_piR_001415               | 1.84                                   | 0.0002    |        |
|  | rno_piR_005552               | 1.74                                   | 9.6e-05   |        |
|  | rno_piR_001414               | 1.69                                   | 5.04e-05  |        |
|  | rno_piR_005595               | 1.74                                   | 0.0003    |        |
|  | rno_piR_005901               | 1.69                                   | 2.9e-05   |        |
|  | rno_piR_035999               | 3.32                                   | 0.033     |        |
|  | rno_piR_033897               | 3.3                                    | 0.046     |        |
|  | rno_piR_013610               | 1.75                                   | 0.013     |        |
|  | rno_piR_015975               | 1.46                                   | 0.037     |        |
|  | rno_piR_038396               | 1.34                                   | 0.0015    |        |
|  | rno_piR_008131               | 1.31                                   | 0.0003    |        |
|  | rno_piR_001199               | 1.27                                   | 0.0067    |        |
|  | rno_piR_000194               | 1.30                                   | 0.0031    |        |
|  | rno_piR_000934               | 1.27                                   | 0.032     |        |
|  | rno_piR_005567               | 1.11                                   | 0.0031    |        |
|  | rno_piR_022621               | 0.79                                   | 0.030     |        |
|  | piwiРНК, снижение экспрессии | rno_piR_030373                         | -1.5318   | 0.009  |
| rno_piR_000552                                 |                              | -1.5734                                | 2.9e-05   |        |
| rno_piR_021540                                 |                              | -2.0849                                | 0.0002    |        |
| rno_piR_028038                                 |                              | -2.0892                                | 0.024     |        |
| rno_piR_010135                                 |                              | -1.3756                                | 0.038     |        |
| rno_piR_015914                                 |                              | -0.93                                  | 0.033     |        |
| rno_piR_011541                                 |                              | -1.02                                  | 0.022     |        |
| rno_piR_000219                                 |                              | -1.1                                   | 0.033     |        |
| микроРНК, повышение экспрессии                 |                              | rno-miR-375-3p                         | 1.70152   | 0.0007 |
|  |                              | rno-miR-106b-3p                        | 1.67601   | 0.002  |
|  | rno-let-7a-5p                | 1.65067                                | 0.0002    |        |
|  | rno-let-7d-5p                | 1.59074                                | 0.0045    |        |
|  | rno-miR-3596b                | 1.54832                                | 0.0021    |        |
|  | rno-let-7c-5p                | 1.08706                                | 0.0045    |        |
|  | rno-let-7b-5p                | 1.13304                                | 0.007     |        |
|  | rno-let-7e-5p                | 1.01823                                | 0.011     |        |
|  | rno-miR-34c-5p               | 1.38827                                | 0.017     |        |
|  | rno-miR-30d-5p               | 0.90920                                | 0.032     |        |
|  | rno-miR-103-3p               | 0.89165                                | 0.009     |        |
|  | rno-miR-185-5p               | 0.83723                                | 0.012     |        |
|  | rno-miR-98-5p                | 1.03522                                | 0.014     |        |
|  | rno-miR-26a-5p               | 0.61820                                | 0.041     |        |
|  | rno-miR-3596a                | 1.35                                   | 0.00024   |        |
|  | rno-miR-149-3p               | 1.23                                   | 0.0092    |        |
|  | rno-miR-425-5p               | 1.21                                   | 0.007     |        |
|  | rno-miR-132-3p               | 1.16                                   | 0.041     |        |
|  | rno-let-7b-3p                | 1.1                                    | 0.014     |        |
|  | rno-miR-3102                 | 1.07                                   | 0.041     |        |
|  | rno-miR-34b-3p               | 1.05                                   | 0.037     |        |
|  | rno-miR-331-3p               | 1.05                                   | 0.033     |        |
|  | rno-miR-196b-5p              | 1.04                                   | 0.022     |        |
|  | rno-miR-98-5p                | 1.035                                  | 0.014     |        |
|  | rno-miR-34c-3p               | 0.97                                   | 0.037     |        |
|  | rno-miR-7a-1-3p              | 0.93                                   | 0.031     |        |

Таблица 1. Окончание

| Тип РНК и изменение экспрессии в группе с ПТСР | Название                | Кратность изменения (log2 fold change) | Padj     |
|--|-------------------------|--|----------|
| микроРНК,<br>снижение экспрессии               | rno-miR-146b-5p         | 0.91                                   | 0.0044   |
|  | rno-miR-103-3p/107-3p   | 0.89                                   | 0.0099   |
|  | rno-miR-342-3p          |  |          |
|  | rno-miR-369-3p          | 0.86                                   | 0.025    |
|  | rno-let-7g-5p           | 0.74                                   | 0.033    |
|  | rno-let-7i-5p           | 0.71                                   | 0.035    |
|  | rno-miR-148b-3p         | 0.63                                   | 0.044    |
|  |                         | 0.60                                   | 0.026    |
|  | rno-miR-411-3p          | -1.63                                  | 1.05e-05 |
|  | rno-miR-503-3p          | -1.69                                  | 0.0012   |
|  | rno-miR-207             | -1.70                                  | 0.00017  |
|  | rno-miR-142-5p          | -1.71                                  | 0.027    |
|  | rno-miR-539-3p          | -1.87                                  | 0.012    |
|  | rno-miR-30a-3p          | -0.73                                  | 0.013    |
|  | rno-miR-185-3p          | -0.79                                  | 0.0145   |
|  | rno-miR-30e-3p          | -1.08                                  | 0.0073   |
|  | rno-miR-101a-3p         | -1.32                                  | 0.0002   |
|  | rno-let-7a-1-3p/7c-2-3p | -0.94                                  | 0.0198   |
|  | rno-miR-29b-3p          |  |          |
|  | rno-miR-3556b           | -0.80                                  | 0.0166   |
|  | rno-miR-743b-3p         | -0.63                                  | 0.0032   |
|  | rno-miR-3587            | -0.73                                  | 0.037    |
|  | rno-miR-672-5p          | -0.84                                  | 0.009    |
|  | rno-miR-126a-5p         | -0.90                                  | 0.037    |
|  | rno-miR-27b-3p          | -0.91                                  | 0.0031   |
|  | rno-miR-203a-3p         | -0.91                                  | 0.0036   |
|  | rno-miR-3065-5p         | -0.92                                  | 0.0070   |
|  | rno-miR-497-5p          | -0.97                                  | 0.034    |
|  | rno-miR-758-3p          | -0.97                                  | 0.0062   |
|  | rno-miR-27a-3p          | -0.97                                  | 0.039    |
|  | rno-miR-3542            | -1.00                                  | 0.012    |
|  | rno-miR-503-5p          | -1.03                                  | 0.021    |
|  | rno-miR-210-3p          | -1.07                                  | 0.036    |
|  | rno-miR-3583-3p         | -1.08                                  | 0.006    |
|  | rno-miR-3590-5p         | -1.09                                  | 0.027    |
|  | rno-miR-130a-3p         | -1.10                                  | 0.032    |
|  | rno-miR-3574            | -1.14                                  | 0.014    |
|  | rno-miR-29c-3p          | -1.15                                  | 0.0053   |
|  | rno-miR-3072            | -1.19                                  | 1.4e-05  |
|  | rno-miR-203b-5p         | -1.19                                  | 0.016    |
|  | rno-miR-24-2-5p         | -1.25                                  | 0.0066   |
|  | rno-miR-149-5p          | -1.29                                  | 0.046    |
|  | rno-miR-301a-3p         | -1.3                                   | 0.0056   |
|  | rno-miR-532-5p          | -1.3                                   | 0.023    |
|  | rno-miR-592             | -1.31                                  | 0.00023  |
|  | rno-miR-203a-5p         | -1.32                                  | 0.011    |
|  | rno-miR-542-3p          | -1.32                                  | 0.0045   |
|  | rno-miR-31a-3p          | -1.33                                  | 0.0070   |
|  | rno-miR-126a-3p         | -1.35                                  | 0.0036   |
|  | rno-miR-224-3p          | -1.35                                  | 0.0004   |
| rno-miR-322-5p                                 | -1.36                   | 0.024                                  |          |
| rno-miR-3357                                   | -1.45                   | 0.018                                  |          |
|  | -1.45                   | 0.0062                                 |          |

Padj – значение *P* с поправкой на множественные сравнения.

секреции глюкокортикоидов, что также характерно для больных депрессией (Czén et al., 2016).

Экспериментальные исследования на человеке не проводятся по очевидным причинам, однако в эпидемиологических исследованиях также была обнаружена связь между стрессом отца и физиологическими и психологическими особенностями потомства. Показано, что в семьях больных ПТСР наблюдается усиление ПТСР-подобных симптомов у их потомков, хотя такие потомки воздействию какого-либо травматического стресса не подвергались. (Yehuda et al., 2007a, 2007b). Таким образом, можно считать доказанным то, что психопатология отца, связанная со стрессовым воздействием, оказывает специфическое влияние на потомков.

В настоящее время в качестве основного механизма передачи эффектов отцовского стресса потомкам рассматривается эпигенетическая модификация генома в сперматозоидах, связанная с метилированием ДНК, модификацией гистонов и экспрессией некодирующих РНК, в том числе микро- и piwiРНК (Rodgers et al., 2015; Morgan et al., 2019, 2020; Xavier et al., 2019). Такие модификации с большей вероятностью могут происходить только в зреющих сперматозоидах на стадиях от сперматогониев до сперматид (Lu et al., 2015). В настоящей работе мы сосредоточились на анализе влияния модельной психопатологии отца на содержание в сперме коротких РНК, играющих важнейшую роль в регуляции экспрессии генов и обеспечивающих нормальный сперматогенез.

МикроРНК играют критическую роль в регуляции экспрессии большого числа генов, действуя в основном на пост-транскрипционном уровне, хотя не исключена возможность их воздействия на структуру хроматина, и, следовательно, транскрипционную активность генов. В настоящий момент у человека аннотировано 2656, у мыши – 1978 и у крысы (*R. norvegicus*) – 764 микроРНК (<http://www.mirdb.org/statistics.html>). МикроРНК регулируют ключевые процессы в эмбриональном развитии и дифференцировке; продукты некоторых генов, регулируемых микроРНК, играют важную роль в процессах сперматогенеза. Дисрегуляция продукции микроРНК в процессе созревания сперматозоидов рассматривается как одна из причин мужского бесплодия (Kamalidehghan et al., 2020). Кроме того, нормальный паттерн экспрессии микроРНК в сперме имеет особое значение в контроле транскриптомного гомеостаза зиготы (Yuan et al., 2016; Guo et al., 2017). Важно, что измененный паттерн экспрессии микроРНК в сперме может быть передан потомству (Godia et al., 2018).

Другой класс малых некодирующих РНК, обильно представленный в сперматозоидах – это piwiРНК. Данный тип РНК обнаруживаются преимущественно в клетках зародышевой линии и в сперматозоидах; они несколько длиннее, чем микроРНК

(26–32 нуклеотида). Биогенез piwiРНК до конца не изучен. Основная функция, которую выполняет этот класс молекул, действуя совместно с белками PIWI, по которым они получили свое название – это пост-транскрипционный сайленсинг транспозонов (Czech et al., 2108; Ozata et al., 2019). Считается, что piwiРНК могут выполнять какие-то регуляторные функции, однако точные механизмы этого остаются неизвестными.

Выраженные статистически значимые отличия содержания в сперме микро- и piwiРНК мы обнаружили у самцов с моделированным ПТСР при сравнении их с группой контроля. Дифференциальная экспрессия была выявлена для 27 piwiРНК и для 77 микроРНК. В наибольшей степени (более чем в 3 раза) была повышена экспрессия микроРНК gno-miR-375-3p, gno-miR-106b-3p, gno-let-7a-5p, gno-let-7d-5p; среди микроРНК с наиболее значимым снижением экспрессии можно выделить gno-miR-539-3p, gno-miR-142-5p, gno-miR-207, gno-miR-503-3p (см. табл. 1). Различия между группой ДПС и контрольной группой были крайне незначительными. Достоверные отличия были выявлены только для двух piwiРНК (gno\_piR\_019288 и gno\_piR\_016741), экспрессия которых была повышена в группе ДПС. Стоит заметить, что результаты этой группы оказались весьма неоднородными (рис. 2). Два образца (X9 и X10) по паттерну экспрессии коротких РНК напоминали образцы группы контроля, а остальные три образца были похожи на группу с моделированным ПТСР.

Нельзя исключить того, что при действии стресса в парадигме выученной беспомощности не все самцы развивают классическое ДПС, и без дополнительного контроля не только уровня кортикостерона в крови, но и какого-то еще признака из ДПС, например, изменений поведения стрессированных самцов, нам не удалось создать однородную группу экспериментальных животных. С другой стороны, мы показали ранее, что эффекты отцовской психопатологии значительно менее выражены в группе с ДПС, и возможно, что при стрессовом воздействии такого рода изменение экспрессии коротких РНК в сперме может иметь вероятностный характер. В целом, ПТСР-подобное состояние самцов оказывает несомненное воздействие на паттерн экспрессии коротких РНК в сперматозоидах, в то время как влияние ДПС отца на этот показатель нуждается в уточнении.

Ранее в ряде исследований других авторов были предприняты попытки оценить влияние стресса самцов на содержание в сперматозоидах некоторых микроРНК. Так, в одном из исследований, (Rogers et al., 2013), с использованием метода ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией (ПЦР-РВ-ОТ) авторы обнаружили в сперме самцов мышей, подвергнутых хроническому умеренному стрессу в период сперматогенеза, повышение содержания 9

микроРНК (miR29-a, miR30-a, miR30c, miR32, miR193, miR204, miR375, miR532-3p, miR698). В другой работе, в которой изучали последствия хронического введения самцам мышей кортикостерона, показано увеличение в сперме содержания других микроРНК (miR98, miR144, miR190b) (Short et al., 2016). В исследовании с помощью NGS экспрессии микроРНК в сперме взрослых мышей, подвергнутых длительному отъему от матери, авторы обнаружили повышение в ней miR-200b-3p, miR-672-5p, miR-375-3p, miR-375-5p, miR-46-5p (Gapp et al., 2014).

Следует отметить, что эти исследования были проведены на мышах, геном которых аннотирован гораздо лучше, чем у крыс, а авторы использовали различные системы анализа экспрессии коротких РНК (ПЦР-РВ-ОТ и NGS). Тем не менее, мы обнаружили частичное совпадение полученных нами результатов с этими данными из литературы. Так, по нашим данным, в наибольшей степени в сперме самцов с ПТСР-подобным состоянием увеличена экспрессия miR-375-5p, что было выявлено и в упомянутых выше работах (Rogers et al., 2013; Gapp et al., 2014). Повышение экспрессии miR-30 (в нашей работе, прежде всего, gno-miR-30d-5p) тоже было отмечено другими авторами (Rogers et al., 2013). Таким образом, несмотря на различия модельных объектов, используемых типов стрессовых воздействий и других деталей, изменение экспрессии некоторых микроРНК при отцовском стрессе может носить универсальный характер.

Список некоторых из предполагаемых генов-мишеней для микроРНК, экспрессия которых изменяется в сперматозоидах самцов с моделированным ПТСР, представлен в табл. 2. Анализируя возможные мишени, мы выделили две группы генов, которые, с нашей точки зрения, представляют особый интерес. Это, во-первых, гены, продукты которых участвуют в метилировании ДНК (*Dnmt3a*), модификациях гистонов через метилирование и деацетилирование (*Setd5*, *Hdac1*, *Mllt10*) и в регуляции РНК-интерференции (*Tnrc6b*, *Mtdh*). Для нашего исследования эти гены представляют значительный интерес, потому что все они вовлечены в гипотетические механизмы передачи отцовских эффектов потомству, а установленные в гаметах или в раннем эмбрионе эпигенетические метки, влияющие на их работу, способны привести к очень широкому спектру последствий.

Другую группу, выделенную нами, составили гены, связанные с функционированием инсулиноподобного фактора роста 2 (*Igf2*, *Igf2bp2*, *Igf2r*). Ранее мы показали, что экспрессия гена *Igf2* изменена в ЦНС у потомства самцов с ПТСР-подобным состоянием (Ordyan et al., 2020; Ордян и др., 2021a, 2021б).

В их регуляции задействованы многочисленные микроРНК семейств let-7, а также miR-30 и miR-185. Мы обнаружили кооперативное повышение экспрессии микроРНК семейства let-7, которое может иметь широкий спектр последствий, так как эти молекулы вовлечены в регуляцию гомеостаза глюкозы и чувствительности к инсулину, а также в регуляцию метилирования гистонов через ген *Mllt10*. Известно, что повышенная экспрессия микроРНК из семейства let-7 у мышей снижает размер тела и его массу вследствие уменьшения массы жира и ухудшении толерантности к глюкозе (Frost et al., 2011). В свою очередь, мы выявили ранее торможение соматического развития в ранний неонатальный период у потомков отцов с моделированным ПТСР (Ordyan et al., 2021). Вопрос о том, может ли изменение экспрессии микроРНК семейства let-7 в сперматозоидах самцов оказать влияние на соматическое развитие потомков, остается открытым и нуждается в дальнейшем исследовании. Принципиальная возможность влияния микроРНК, введенных в зиготу, на фенотип потомков, была доказана (Rodgers et al., 2015).

Таким образом, мы показали, что ПТСР-подобное состояние самцов, которое моделировали в парадигме “стресс–рестресс”, влияет на спектр малых РНК (микроРНК и piwiРНК) в сперме. Выявленные отдельные совпадения с изменениями спектра коротких РНК у других авторов при использовании других моделей стрессовых воздействий и других видов животных и человека свидетельствует об универсальном характере изменения экспрессии некоторых микроРНК вследствие отцовского стресса. Дальнейшие исследования в этом направлении, в том числе с использованием спермы человека, могут способствовать выявлению специфических биомаркеров в сперме, которые будут свидетельствуют о неблагоприятном прогнозе для здоровья потомства и смогут служить диагностическим критерием нежелательности зачатия при воздействии стрессов на отца.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Государственного задания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (тема № 0134-2019-0002) и Института акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта (тема ФНИ № АААА-А19-119021290033-1).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работу проводили с соблюдением рекомендаций по этике работы с животными, утвержденными правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по гуманному обращению с животными Института Физиологии им. И.П. Павлова РАН.



**Таблица 2.** Предсказанные мишени для некоторых микроРНК, дифференциально экспрессированных в сперме самцов с моделированным ПТСР по сравнению с группой контроля

| микроРНК                 | Гены-мишени          |                     |                      |                     |                      |                    |                    |                       |                     |
|--------------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|---------------------|
|                          | <i>Dnmt3a</i><br>(а) | <i>Setd5</i><br>(а) | <i>Turc6b</i><br>(а) | <i>Hdac1</i><br>(а) | <i>Mllt10</i><br>(а) | <i>Mtdh</i><br>(а) | <i>Igf2</i><br>(б) | <i>Igf2bp2</i><br>(б) | <i>Igf2r</i><br>(б) |
| с повышенной экспрессией |                      |                     |                      |                     |                      |                    |                    |                       |                     |
| let-7-a-5p               |                      |                     |                      |                     |                      |                    |                    |                       |                     |
| let-7-b-5p               |                      |                     |                      |                     |                      |                    |                    |                       |                     |
| let-7-c-5p               |                      |                     |                      |                     |                      |                    |                    |                       |                     |
| let-7-d-5p               |                      |                     |                      |                     |                      |                    |                    |                       |                     |
| let-7-g-5p               |                      |                     |                      |                     |                      |                    |                    |                       |                     |
| let-7-i-5p               |                      |                     |                      |                     |                      |                    |                    |                       |                     |
| rno-miR-30d-5p           |                      |                     |                      |                     |                      |                    |                    |                       |                     |
| rno-miR-34c-5p           |                      |                     |                      |                     |                      |                    |                    |                       |                     |
| с пониженной экспрессией |                      |                     |                      |                     |                      |                    |                    |                       |                     |
| let7a-1-3p/let-7c-2-3p   |                      |                     |                      |                     |                      |                    |                    |                       |                     |
| rno-miR-29b-3p           |                      |                     |                      |                     |                      |                    |                    |                       |                     |
| rno-miR-30a-3p           |                      |                     |                      |                     |                      |                    |                    |                       |                     |
| rno-miR-30e-3p           |                      |                     |                      |                     |                      |                    |                    |                       |                     |
| rno-miR-30b-3p           |                      |                     |                      |                     |                      |                    |                    |                       |                     |
| rno-miR-101a-3p          |                      |                     |                      |                     |                      |                    |                    |                       |                     |
| rno-miR-185-3p           |                      |                     |                      |                     |                      |                    |                    |                       |                     |
| rno-miR-185-5p           |                      |                     |                      |                     |                      |                    |                    |                       |                     |
| rno-miR-98-5p            |                      |                     |                      |                     |                      |                    |                    |                       |                     |
| rno-miR-103-3p           |                      |                     |                      |                     |                      |                    |                    |                       |                     |

(а) — Гены, вовлеченные в регуляцию хроматина, метилирования, процессинга микроРНК; (б) — гены, вовлеченные в регуляцию инсулиноподобного фактора роста 2. Цветом выделены ячейки, показывающие возможные взаимодействия между дифференциально экспрессированными микроРНК и генами-мишенями, предсказанными с использованием базы микроРНК (<http://www.mirdb.org/>).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ордян Н.Э., Малышева О.В., Холова Г.И., Акулова В.К., Пивина С.Г. 2021а. Зависимое от пола влияние стресса самцов крыс на память и экспрессию гена инсулиноподобного фактора роста 2 в мозге потомков. Журнал высшей нервной деятельности. Т. 71. № 3. С. 387. (Ordyan N.E., Malysheva O.V., Holova G.I., Akulova V.K., Pivina S.G. 2021. Sex-dependent influence of male rat stress on the memory and expression of the insulin-like growth factor 2 gene in the offspring brain. Zhurnal Vysshei Nervnoi Deyatelnosti imeni I. P. Pavlova. V. 71. № 3. P. 387.) <https://doi.org/10.31857/S0044467721030060>
- Ордян Н.Э., Малышева О.В., Акулова В.К., Холова Г.И., Пивина С.Г. 2021б. Нарушение когнитивных функций потомков самцов крыс, подвергнутых стрессированию в парадигмах “стресс—рестресс” или “выученная беспомощность”: роль инсулиноподобного фактора роста 2. Интегративная физиология. Т. 2. № 1. С. 61. (Ordyan N.E., Malysheva O.V., Akulova V.K., Kholova G.I., Pivina S.G. 2021b. Cognitive impairment in the offspring of male rats exposed to stress in “stress — restress” or “learned helplessness” paradigms: The role of insulin-like growth factor 2. Integrative Physiology. V. 2. № 1. P. 61.) <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-61-70>
- Пивина С.Г., Ракицкая В.В., Акулова В.К., Ордян Н.Э. 2015. Активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы пренатально стрессированных самцов крыс в экспериментальной модели посттравматического стрессового расстройства. Бюллетень экспер. биол. мед. Т. 160. № 11. С. 542. (Pivina S.G., Rakitskaya V.V., Akulova V.K., Ordyan N.E. 2015. Activity of the hypothalamic—pituitary—adrenal system in prenatally stressed male rats on the experimental model of post-traumatic stress disorder. Bull. Exper. Biol. Med. V. 160. P. 601.) <https://doi.org/10.1007/s10517-016-3227-3>
- Chen Q., Yan M., Cao Z., Li X., Zhang Y., Shi J., Feng G., Peng H., Zhang X., Zhang Y., Qian J., Duan E., Zhai Q., Zho Q. 2016. Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. Science. V. 351. P. 397. <https://doi.org/10.1126/science.aad7977>
- Czech B., Munafó M., Ciabrelli F., Eastwood E.L., Fabry M.H., Kneuss E., Hannon G.J. 2018. piRNA-guided genome defense: from biogenesis to silencing. Annu. Rev. Genet. V. 52. P. 131. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120417-031441>

- Czén B., Fuchs E., Wiborg O., Simon M. 2016. Animal models of major depression and their clinical implications. *Progress Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*. V. 64. P. 293. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.04.004>
- Dietz D.M., LaPlant Q., Watts E.L., Hodes G.E., Russo S.J., Feng J., Oosting R.S., Vialou V., Nestler E.J. 2011. Paternal transmission of stress-induced pathologies. *Biol. Psychiatry*. V. 70. P. 408. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.05.005>
- Dimofski P., Meyre D., Dreumont N., Leininger-Muller B. 2021. Consequences of paternal nutrition on offspring health and disease. *Nutrients*. V. 13. P. 2818. <https://doi.org/10.3390/nu13082818>
- Duffy K.A., Bale T.L., Epperson C.N. 2021. Germ cell drivers: transmission of preconception stress across generations. *Front. Hum. Neurosci.* V. 15. P. 642762. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2021.642762>
- Franklin T.B., Russig H., Weiss I.C., Gräff J., Linder N., Michalon A., Vizi S., Mansuy I. 2010. Epigenetic transmission of the impact of early stress across generations. *Biol. Psychiatry*. V. 68. P. 408. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.05.036>
- Frost R.J.A., Olson E.N. 2011. Control of glucose homeostasis and insulin sensitivity by the Let-7 family of microRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 108. P. 21075. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118922109>
- Fullston T., Ohlsson Teague E.M., Palmer N.O., DeBlasio M.J., Mitchell M., Corbett M., Owens M. 2013. 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. *FASEB J.* V. 27. P. 4226. <https://doi.org/10.1096/fj.12-224048>
- Gapp K., Jawaid A., Sarkies P., Bohacek J., Pelczar P., Prados J., Farinell L., Miska E., Mansuy I. 2014. Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice. *Nat. Neurosci.* V. 17. P. 667. <https://doi.org/10.1038/nn.3695>
- Godia M., Swanson G., Krawetz S.A. 2018. A history of why fathers' RNA matters. *Biol. Reprod.* V. 99. P. 147. <https://doi.org/10.1093/biolre/iyo007>
- Guo L., Chao S.-B., Xiao L., Wang Z.-B., Meng T.-G., Li Y.-Y., Han Z.-M., Ouyang Y.-C., Hou Y., Sun Q.-Y., Ou X.-H. 2017. Sperm-carried RNAs play critical roles in mouse embryonic development. *Oncotarget*. V. 8. P. 67394. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18672>
- Harker A., Carroll C., Raza S., Kolb B., Gibb R. 2018. Preconception paternal stress in rats alters brain and behavior in offspring. *Neurosci.* V. 388. P. 474. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.06.034>
- Huang Y., Zhang J.L., Yu X.L., Xu T.S., Wang Z., Bin Z., Chao X. 2013. Molecular functions of small regulatory noncoding RNA. *Biochemistry*. V. 78. P. 221. <https://doi.org/10.1134/S0006297913030024>
- Jodar M., Selvaraju S., Sendler E., Diamond M.P., Krawetz S.A. 2013. The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs. *Hum. Reprod. Update*. V. 19. P. 604. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmt031>
- Kamalideghan B., Habibi M., Afjeh S.S., Shoai M., Alidoost S., Ghal R.A., Eshghifar N., Poursmaeili F. 2020. The importance of small non-coding RNAs in human reproduction: a review article. *Application Clinical Genetics*. V. 13. P. 1. <https://doi.org/10.2147/TACG.S207491>
- Kiani J., Rassoulzadegan M. 2013. A load of small RNAs in the sperm – how many bits of hereditary information? *Cell Res.* V. 23. P. 18. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.181>
- Love M.I., Huber W., Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* V. 15. P. 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Ly L., Chan D., Trasler J.M. 2015. Developmental windows of susceptibility for epigenetic inheritance through the male germline. *Seminars Cell Devel. Biol.* V. 43. P. 96. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2015.07.006>
- Morgan C.P., Chan J.C., Bale T.L. 2019. Driving the next generation: paternal lifetime experiences transmitted via extracellular vesicles and their small RNA cargo. *Biol. Psychiatry*. V. 85. P. 164. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.09.007>
- Morgan C.P., Shetty A.C., Chan J.C., Berger D.S., Ament S.A., Epperson C.N., Bale T.L. 2020. Repeated sampling facilitates within- and between-subject modeling of the human sperm transcriptome to identify dynamic and stress-responsive sncRNAs. *Scientific Reports*. V. 10. P. 17498. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73867-7>
- Ordyan N.E., Malysheva O.V., Akulova V.K., Pivina S.G., Kholova G.I. 2020. The capability to learn and expression of the insulin-like growth factor II gene in the brain of male rats whose fathers were subjected to stress factors in the “stress–restress” paradigm. *Neurochem. J.* V. 14. P. 191. <https://doi.org/10.1134/S1819712420020075>
- Ordyan N.E., Pivina S.G., Akulova V.K., Kholova G.I. 2021. Changes in the nature of behavior and the activity of the hypothalamic-adrenocortical system in the offspring of paternal rats subjected to stress in the stress–restress paradigm before mating. *Neurosci. Behav. Physiol.* V. 51. P. 528. <https://doi.org/10.1007/s11055-021-01100-7>
- Ozata D.M., Gainetdinov I., Zoch A., O'Carroll D., Zamore P.D. 2019. PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions. *Nat. Rev. Genet.* V. 20. P. 89. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0073-3>
- Peng H., Shi J., Zhang Y., Zhang H., Liao S., Li W., Lei L., Han C., Ning L., Cao Y., Zhou Q., Chen Q., Duan E. 2012. A novel class of tRNA-derived small RNAs extremely enriched in mature mouse sperm. *Cell Res.* V. 22. P. 1609. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.141>
- Rando O.J. 2012. Daddy issues: paternal effects on phenotype. *Cell*. V. 151. P. 702. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.020>
- Rodgers A.B., Morgan C.P., Bronson S.L., Revello S., Bale T.L. 2013. Paternal stress exposure alters sperm microRNA content and reprograms offspring HPA stress axis regulation. *J. Neurosci.* V. 33. P. 9003. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0914-13.2013>
- Rodgers A.B., Bale T.L. 2015. Germ cell origins of posttraumatic stress disorder risk: the transgenerational impact of parental stress experience. *Biol. Psychiatry*. V. 78. P. 307. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.03.018>
- Rodgers A.B., Morgan C.P., Leu N.A., Bale T.L. 2015. Transgenerational epigenetic programming via sperm microRNA recapitulates effects of paternal stress. *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. USA. V. 112. P. 13699.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1508347112>
- Sharma A. 2013. Transgenerational epigenetic inheritance: Focus on soma to germline information transfer. *Progress Biophysics Mol. Biology*. V. 113. P. 439.  
<https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2012.12.003>
- Short A.K., Fennell K.A., Perreau V.M., Fox A., O'Bryan M.K., Kim J.H., Bredy T.W., Pang T.Y., Hannan A.J. 2016. Elevated paternal glucocorticoid exposure alters the small non-coding RNA profile in sperm and modifies anxiety and depressive phenotypes in the offspring. *Transl. Psychiatry*. V. 6. P. e837. Ye
- Xavier M.J., Roman S.D., Aitken R.J., Nixon B. 2019. Transgenerational inheritance: how impacts to the epigenetic and genetic information of parents affect offspring health. *Hum. Reprod. Update*. V. 25. P. 518.  
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmz017>
- Yan W. 2014. Potential roles of noncoding RNAs in environmental epigenetic transgenerational inheritance. *Mol. Cell. Endocrinol.* V. 398. P. 24.  
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.09.008>
- Yehuda R., Blair W., Labinsky E., Bierer L.M. 2007a. Effects of parental PTSD on the cortisol response to dexamethasone administration in their adult offspring. *Am. J. Psychiatry*. V. 164. P. 163.  
<https://doi.org/10.1176/ajp.2007.164.1.163>
- Yehuda R., Teicher M.H., Seckl J.R., Grossman R.A., Morris A., Bierer L.M. 2007b. Parental posttraumatic stress disorder as a vulnerability factor for low cortisol trait in offspring of Holocaust survivors. *Archiv. Gen. Psychiatry*. V. 64. P. 1040.  
<https://doi.org/10.1001/archpsyc.64.9.1040>
- Yeshurun S., Hannan A.J. 2019. Transgenerational epigenetic influences of paternal environmental exposures on brain function and predisposition to psychiatric disorders. *Mol. Psychiatry*. V. 24. P. 536.  
<https://doi.org/10.1038/s41380-018-0039-z>
- Yuan S., Schuster A., Tang C., Yu T., Ortogero N., Bao J., Zheng H., Yan W. 2016. Sperm-borne miRNAs and endo-siRNAs are important for fertilization and preimplantation embryonic development. *Develop.* V. 143. P. 635.  
<https://doi.org/10.1242/dev.131755>

## Changes in the Content of Small Non-Coding RNAs in Spermatozoa as a Possible Mechanism of Transgenerational Transmission of the Effects of Paternal Stress: Experimental Research

O. V. Malysheva<sup>a, b, \*</sup>, S. G. Pivina<sup>a</sup>, E. N. Ponomareva<sup>b</sup>, and N. E. Ordyan<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Science, St. Petersburg, 199034 Russia*

<sup>b</sup>*Ott Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductology, St. Petersburg, 199034 Russia*

\*e-mail: [omal99@mail.ru](mailto:omal99@mail.ru)

It has been proven that the stress of the father can affect the phenotype of offspring, causing somatic, behavioral, hormonal and molecular changes. One of the hypothetical mechanisms responsible for the transmission of paternal effects to offspring may be a change in the spectrum of regulatory non-coding RNAs in spermatozoa. In this paper, we investigated the effect of paternal stress in models of post-traumatic stress disorder (PTSD) and depression on the representation of small RNAs (micro- and piwiRNAs) in the sperm of stressed animals. Male Wistar rats were subjected to stress in two paradigms (“stress–restress” and “learned helplessness”), which leads to the development of PTSD-like and depressive-like states in model animals, respectively. 48 days after the restress, sperm preparations were received and RNA was isolated. The spectrum of small RNAs was studied by NGS sequencing. In males with a PTSD-like condition, a change in the expression of 27 piwi RNAs and 77 microRNAs was detected compared with the control group. Among the targets of these miRNAs, it is possible to identify genes whose products may be involved in such mechanisms of transmission of paternal effects to offspring as changes in DNA methylation, histone modifications and RNA interference (*Dnmt3a*, *Setd5*, *Hdac1*, *Mllt10*, *Mtdh*), as well as genes associated with the functioning of insulin-like growth factor 2, the expression of which as previously shown, it is altered in the central nervous system in the offspring of males with a PTSD-like condition (*Igf2*, *Igf2bp2*, *Igf2r*). No changes in the representation of small RNAs were registered in males with a simulated depression-like state. The results indicate a pronounced effect of paternal stress on the spectrum of short non-coding RNAs in sperm cells in rats, however, it depends on the nature of the stress effect.

**Keywords:** paternal stress, depression, post-traumatic stress disorder, sperm, small noncoding RNAs, microRNAs, piwiRNAs, rat