

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 575.113:57.084.1

АЛЛОПАРЕНТНАЯ ЗАБОТА И ПОСТНАТАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ ГЕТЕРОЗИГОТНЫХ TRH2 ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ

© 2023 г. А. А. Кибиткина¹*, Е. Р. Василевская¹, Г. С. Толмачева¹, А. М. Зубалий²

¹ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, Москва, Россия

²ФГБУН НЦБМТ ФМБА, Красногорск, Россия

Поступила в редакцию 29.03.2022 г.

После доработки 15.08.2022 г.

Принята к публикации 18.08.2022 г.

Вопрос о взаимосвязи передачи негативного эффекта от матери с депрессией к потомству является одним из приоритетных в современной психиатрии. Мыши с целевым нокаутом гена TRH2 имеют депрессивно-компульсивный фенотип, что делает этих животных высокоточной биомоделью для изучения роли серотонина в организме. У потомства таких животных были изучены репродуктивные параметры: созревание детенышей (физиологическое развитие) и сенсорные и моторные рефлексы. Было установлено, что у гетерозиготных мышей по гену TRH2 снижена материнская забота и повышен каннибализм, направленный на потомство. В материнском поведении также были выявлены отклонения и нарушения в возвращении детенышей в гнездо. Некоторое отставание в развитии гетерозиготного потомства наблюдалось после 10 суток постнатального онтогенеза. Гомозиготные детеныши (KO) имели меньшую массу, чем гетерозиготные (Het) и дикого типа (Wt), тем не менее скорость отлипания ушной раковины, прорезывания верхних резцов, открытия глаз и опускания семенников у мышат KO проявлялась в те же сроки, что и у мышей Wt и Het.

Ключевые слова: серотонин мозга, триптофан гидроксилаза-2 (TRH2), детеныши мышей, двигательная функция, сенсорный рефлекс, репродукция, разведение

DOI: 10.31857/S1027813323010090, **EDN:** DUJOQJ

ВВЕДЕНИЕ

В послеродовой период организм матери претерпевает огромные физиологические и поведенческие изменения, направленные на поддержание и заботу о потомстве. Материнство является социально мотивированным поведением и предполагает пластичность многих нейромодуляторных систем мозга (серотонина (5-НТ), дофамина, гамма-аминомасляной кислоты и норадреналина). Однако прямое действие серотонина недооценивается, и в настоящее время не хватает данных, подтверждающих роль этого нейротрансмиттера на таких этапах жизни, как беременность и материнство. Вопрос о взаимосвязи передачи негативного эффекта от депрессивной матери к потомству является одним из приоритетных в современной психиатрии. Известно, что при проявлении депрессивных расстройств наблюдаются нарушения в серотонинергической иннервации. Поскольку серотонин (5-НТ) является нейромедиатором и нейромодулятором мозга, он также участвует в регуляции широкого спектра основных физиологических функ-

ций, включая процессы развития, синаптическую пластичность, метаболический гомеостаз, нейроэндокринную функцию, аппетит, затраты энергии, частоту дыхания и сон [1–4].

Распространенность депрессивных заболеваний среди беременных и послеродовых женщин составляет примерно 10–20% [2]. Часто материнская психопатология очень динамична и может протекать в субклинической форме, что затрудняет диагностику психических расстройств. Исходя из этого, возникает проблема: как можно изучать аномальное материнское поведение и последующее развитие детей? Существующие экспериментальные данные о функциональной роли серотонинергической нейромодуляции показывают большую вариабельность, в основном в концентрации 5-НТ в мозге, которая зависит от вида и времени взятия биопробы [1].

Для изучения уровня 5-НТ в мозге был разработан ряд моделей животных с мутациями в генах, участвующих в передаче 5-НТ и формировании серотонинергических нейронов. Одной из высокоточных моделей являются мыши-нокауты триптофан гидроксилазы-2 (TRH2), которая кодирует одноименный фермент и отвечает за ско-

* Адрес для корреспонденции: 109316 Москва, ул. Талалихина, д. 26, тел. +7 (495) 676-95-11 (доб. 128), e-mail: a.kibitkina@fncps.ru.

рость синтеза 5-НТ из триптофана с использованием кислорода и тетрагидробиоптерина (ВН4) в качестве субстратов и железа в качестве кофактора [5, 6]. Фермент TRH2 экспрессируется нейронами в ядре шва головного мозга и играет роль в когнитивной деятельности и проявлении обсессивно-компульсивного расстройства [7].

Поскольку необходимым условием репродуктивного успеха у млекопитающих и незаменимым компонентом выживания и развития потомства является проявление инстинкта материнской заботы, в данной работе мы рассмотрели, как фенотип TRH2-дефицитных мышей влияет на развитие постнатальных нейроповеденческих рефлексов у потомства. В настоящее время фенотипический профиль гомозиготных TRH2-нокаутных мышей с полным отсутствием серотонина в мозге изучен достаточно полно, и доказано, что отсутствие этого гена приводит к проявлению сопутствующих нарушений при депрессивном расстройстве, таких как дисбаланс эмоциональной регуляции, тревожность и импульсивность. Для гетерозиготного TRH2 также достаточно изучен молекулярный цикл серотонина в мозге, показано, что его содержание снижено на 10–20% [8, 9]. В предыдущих исследованиях поведенческий профиль гетерозиготных нокаутных TRH2 мышей был изучен недостаточно, однако были опубликованы данные, свидетельствующие о появлении у мышей повышенной импульсивности и чрезмерной агрессии в условиях стресса [9, 10]. Ранее было показано, что материнский стресс негативно влияет на развитие мозга плода, приводя к неблагоприятным когнитивным, поведенческим и психосоциальным последствиям в младенчестве и взрослом возрасте [11].

В данной работе мы рассмотрели, как частичный недостаток серотонина в мозге матери у гетерозиготных особей влияет на постнатальное развитие рефлексов у потомства, что дополнит характеристику пенетрантности гена TRH2 и расширит область применения мышей TRH2 для исследования депрессии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Эксперимент проводился в Экспериментальной клинике-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения (Федеральный исследовательский центр пищевых систем им. В.М. Горбатова). Родительский штамм гетерозиготных мышей TRH2, содержащий последовательности loxP-наполнителя Cre, нацеленные на экзон 5, был получен на смешанном генетическом фоне 129 Sv и C57BL/620.28 и скрещен с чистым генетическим фоном мышей C57BL/6J в лаборатории доктора Леша в отделе молекулярной психиатрии Центра психического здоровья, Университет Вюрцбурга в мае 2019 г. (Вюрцбург, Германия) [12].

Животных содержали и тестировали со свободным доступом к пище и воде в индивидуально вентилируемых клетках Bio A.S. (Vent II, EHRET, Германия) типа 2L (размер 350 × 200 × 140 мм). Самцов мышей содержали в группах по 2–3 особи, а самок — по 4–5 особей. Условия содержания животных были стандартизированы: температура — 20 ± 3°C, влажность — 35 ± 2%, приточно-вытяжная вентиляция — 95 ± 5 м³/ч, режим освещения день/ночь с 6.00 до 18.00/с 18.00 до 6.00. В качестве подстилки использовался кукурузный наполнитель (“Золотой кот”, Россия). На протяжении всего эксперимента животные потребляли гранулированный корм для разведения лабораторных грызунов (“Лабораторкорм”, Россия).

Для изучения репродуктивной функции мышей C57BL/6J генотипа TRH2 случайным образом были отобраны гетерозиготные животные: 17 самцов и 34 самки в возрасте 12–30 недель. Количество пар для размножения рассчитывалось, исходя из размера целевой группы по 17 животных на генотип, а также на основе равновесия Харди–Вайнберга, соотношения полов 1 : 2 и предполагаемого коэффициента репродуктивного успеха 75%.

Исследование материнского поведения было проведено на 18 примипарных самках дикого типа (Wt) и 18 примипарных гетерозиготных TRH2 самках (TRH2 Het). Исследование постнатального развития проводилось на потомстве, полученном от TRH2 Het мышей ($n = 60$), с учетом генотипа: гомозиготный нокаут — TRH2 KO (TRH2^{-/-}, $n = 11$), гетерозиготный нокаут — TRH2 Het (TRH2^{+/-}, $n = 29$) и дикий тип — Wt (TRH2^{+/+}, $n = 20$). Размер помета при рождении не нормировался на количество детенышей разных генотипов, пола или общий размер помета, что связано с более высокой смертностью потомства, полученного от гетерозиготных нокаутных мышей.

Разведение. Эструс самок из групп TRH2 Het и Wt определяли визуально путем осмотра вульвы и цитологически путем микроскопического анализа вагинальных мазков по Miglierini [4] в течение 20 дней (до разведения). Вагинальный секрет отбирали с помощью автоматической пипетки (Thermo Fisher Scientific, США) после добавления физиологического раствора (0.9% NaCl) в объеме 15 мкл при температуре 22 ± 3°C. Вагинальную секрецию изучали с помощью микроскопа Axio A1 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении ×40. Для синхронизации эструса 2 г подстилочного материала, пропитанного мочой самцов, брали из клеток самцов, отобранных для спаривания, и добавляли в домашние клетки самок согласно Auth [5]. После 72 ч воздействия феромонов и подтверждения эструса у самок их помещали в клетки самцов (гаремная группа [трио] — 1 самец и 2 самки). Для регистрации акта спаривания регистрировали наличие вагинальных пробок. После подтверждения бере-

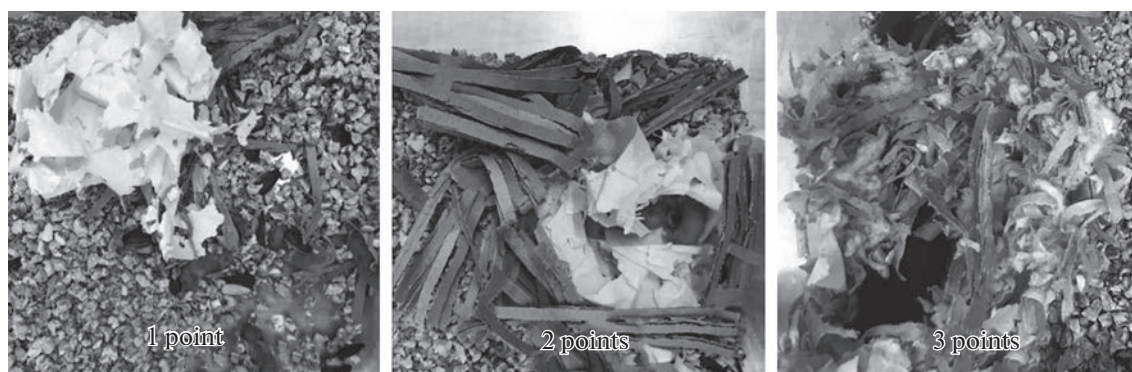


Рис. 1. Оценка гнездостроения экспериментальных мышей.

менности (примерно на 14-й день беременности, путем визуального осмотра и пальпации) самцов и самок разделили по разным клеткам [13]. Далее гнезда проверяли на наличие детенышей один раз в день. День рождения был обозначен как послеродовой день (PD0). Эффективность спаривания животных оценивалась по способности самок и самцов к оплодотворению как процентное соотношение беременных самок/плодовитых самцов к общему количеству подсаженных самок/самцов [14].

Чтобы минимизировать стресс [10], после подтверждения беременности всех самок помещали в одинаковые клетки с гнездовым материалом из измельченной бумаги и бумажных трубочек. Для минимизации каннибализма к стандартному рациону разведения ежедневно добавляли корм для беременных и кормящих собак (Royal Canin, Польша) (1 г на мыш) и нежареные семена подсолнечника (1 г на мыш).

Материнское поведение. Определение уровня материнского инстинкта оценивалось по следующим показателям: обустройство гнезда, “поисковый тест”, кормление и каннибализм.

Оценку обустройства гнезда у подопытных мышей проводили с помощью модифицированной шкалы [15, 16], разделенной на две категории для предотвращения необъективных наблюдений — оценка точки организации гнезда и измерение глубины и ширины гнезда. На PD0 использовалась 3-балльная шкала организации гнезда (рис. 1): “1” балл — материал гнезда (НМ) не тронут более чем на 70%, частично разорван; “2” балла — НМ в основном раздавлен, но не идентифицируется как гнездо, менее 50% НМ остается нетронутым, но менее 90% находится в пределах четверти площади пола клетки, НМ не собран в гнезде, а разбросан по всей клетке; “3” балла — используется более 90% НМ, и гнездо представляет собой глубокую чашу. Глубина и ширина гнезд также измерялись линейкой.

Группировку детенышей оценивали по “поисковому тесту” [17, 18], адаптированному для мы-

шей. Для этого детенышей равномерно распределяли по домашней клетке и в течение 10 минут регистрировали их возвращение самкой в гнездо. Если детеныши оставались нетронутыми самкой, материнское поведение оценивалось в “0” баллов. Если детенышей перетаскивали в одно место вне гнезда, то ставили “1” балл. Хаотичное группирование детенышей в гнезде оценивалось в “2” балла, а сгруппированные детеныши в гнезде — в “3” балла. Также регистрировалось время группировки всех детенышей из помета.

Кормление детенышей оценивали на PD2—PD12 каждые 3 дня по наличию молочных пятен в желудке.

Проявлением материнского каннибалистического поведения считали появление мертвых детенышей со следами укусов или травм. Пометы проверяли ежедневно на PD0—PD21. При установлении факта каннибализма погибших детенышей удаляли, а клетку и подстилочный материал заменяли новыми.

Также определяли средний размер помета, количество живых и мертвых новорожденных, рассчитывали выживаемость от 0 до 25 дней жизни (отношение количества детенышей, доживших до 25 суток, к количеству живорожденных), соотношение самцов и самок. Помет отлучали от матери в возрасте 21 суток (PD21).

Оценка развития потомства. Физиологическое развитие потомства оценивали путем определения массы тела детенышей на 3, 7, 14, 21, 28 и 35-й дни жизни с помощью электронных весов DX-2000 (A&D Company Ltd., Япония) и ежедневного наблюдения с PD0 по PD40 с фиксацией следующих параметров: период отлипания ушных раковин, появление первичного волосяного покрова, прорезывание резцов, открытие глаз, опускание семенников и открытие влагалища [15].

Для выявления сенсорных рефлексов у детенышей [18—21] были проведены следующие тесты: плайсинговая реакция передних и задних конечностей, плайсинг вибриссный и визуальный

Таблица 1. Тестирование созревания сенсорных и моторных рефлексов

Тестирование/сутки	Описание	Оценивание реакции животных
Сенсорные рефлексы		
Плайсинг передних и задних конечностей/PD10, PD15	К передним и задним конечностям подносится тупой предмет [10]	0 – отсутствие реакции 1 – наличие реакции
Вибриссный плайсинг	Касание тонкого стержня вибрисс [13]	0 – отсутствие реакции 1 – наличие реакции
Визуальный плайсинг	Расположение животного к краю поверхности [14]	0 – отсутствие реакции 1 – наличие реакции
Флексинг передних и задних конечностей	Касание тонкого стержня тыльной стороны кисти и стопы [10]	0 – отсутствие реакции 1 – наличие реакции
Моторные рефлексы		
Амбулаторная активность	Определение двигательной активности животных [10]	0 – отсутствие движения 1 – ползание с асимметричным движением конечностей, 2 – медленное ползание, но симметричное движение конечностей 3 – быстрое ползание/ходьба
Скоринг задних конечностей	Размещение животного вверх ногами в конической трубке (объем 50 мл), задние конечности и хвост остаются вне трубки [15]	0 – сцепленные задние конечности, хвост опущен 1 – задние конечности в сжатом положении, хвост поднят 2 – задние конечности не соприкасаются, хвост наклонен в сторону 3 – задние конечности не соприкасаются, хвост поднят
Мышечная сила	Размещение животного на проволочной сетке (размерячек 1×1 мм) с последующим переворачиванием на 180° [9]	0 – удерживание менее 15 секунд 1 – удерживание 15 и более секунд
Поверхностное выпрямление	Переворачивание на конечности из положения лежа на спине [10]	“+” – менее 60 секунд “–” – более 60 секунд фиксировали общее время
Отрицательный геотаксис	Переворачивание из положения вниз головой при наклоне 45° [10]	“+” – менее 60 секунд “–” – более 60 секунд фиксировали общее время до переворачивания
Подвеска передних конечностей	Фиксация животного на натянутой проволоке передними конечностями [15]	Фиксировали общее время до падения животного

(табл. 1). Также потомство тестировали для определения нейроповеденческого моторного развития (табл. 1). Все манипуляции проводились в течение четырехчасового периода до полудня, чтобы исключить различия в поведении в зависимости от времени суток. Последовательность неонатальных моторных тестов была адаптирована с использованием батареи тестов Фокса и включала: рефлекс выпрямления, отрицательный геотаксис и тест на мышечную силу. Также проверялись амбулация, сила передних конечностей и задних конечностей.

Генотипирование. Генотипирование детенышей проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР РВ) ДНК из фрагмента кончика хвоста (3 ± 1 мм) [18]. Биоматериал, полученный от каждой особи, помещали в отдельную пробирку (1.5 мл) с присвоенным индивидуальным номером, после чего помещали в морозильную камеру при температуре $-40 \pm 1^\circ\text{C}$. Для разрушения костной ткани и облегчения процедуры выделения ДНК образец хвоста обрабатывали жидким азотом. Выделение ДНК проводи-

ли с помощью набора Сорб-ГМО-В (Синтол, Москва, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Для ПЦР РВ использовали праймеры: TRH2 F KO 5' CACCCACCTTTG-CAGAAATGTTTA 3', длина ампликона — 387; TRH2 F WT 5' TGGGGCATCTCAGGACGTAG-TAGTAGT 3', длина ампликона — 437; и TRH2 R 5' TGGGGCCTGCCGATAGTAACAS 3' [5]. ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе АНК-32 (SYNTOL, Россия). Реакционная смесь (25 мкл) содержала праймеры (300 нМ), 2.5× реакционную смесь с красителем EvaGreen (Синтол, Россия) (10 мкл) и выделенную ДНК (2 мкл). Режим реакции ПЦР был следующим: денатурация (95°C/5 мин), затем 40 циклов амплификации (95°C/15 с, 64°C/30 с и 72°C/10 с). Для идентификации проводили отдельные реакции: для выявления аллеля “дикого типа” — с парой праймеров TRH2 F WT и TRH2 R, для выявления мутантного аллеля — с TRH2 F KO и TRH2 R. Реакционные смеси без добавления ДНК использовались в качестве отрицательного контроля.

Статистика. Статистический анализ проводили с использованием пакета программ Statistica 10.0 (Statsoft, США). Нормальность распределения данных анализировали с помощью тестов Шапиро–Уилка и Колмогорова–Смирнова, равенство вариаций определяли с помощью критерия Левена. Для проверки различий между двумя выборками парных и независимых измерений по уровню количественного признака использовали односторонний ANOVA с критериями Вилкоксона и Манна–Уитни. Анализ выживаемости потомства проводили в программе SPSS Windows, Version 24.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) с использованием метода анализа Каплана–Майера с критерием Log-rang. Данные с нормальным распределением представлены в виде среднего со стандартным отклонением ($M \pm SD$), а также в виде диапазонов min–max (минимальное и максимальное значения измеряемой величины), медианы (ME) с межквартильным интервалом ([P25–P75]), в долях (процентах) или в абсолютных числах. Для оценки результатов, полученных в тесте “поиск”, проводился корреляционный и регрессионный анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Размножение. Средняя продолжительность эстрального цикла у самок TRH2 Het составила 4.5 [3.8–4.9] дня. Анализ мазков показал более длительные стадии эструса и диэструса у 82.6% самок по сравнению с эстральным циклом самок Wt со средней продолжительностью 4.0 [3.7–4.9] дня. После помешения самок в клетки с самцами на первые 3 дня, вагинальная пробка наблюдалась у 78.5% самок TRH2 Het и у 86.9% самок Wt. Наблюдения за самками во время беременности не

выявили никаких различий в их социальном поведении или внешнем виде.

Эффективность спаривания достигала 64.3% среди TRH2 Het и 72.7% среди Wt групп. Средняя продолжительность беременности у самок TRH2 Het составила 19.0 ± 2.0 дней, у самок Wt — 19.0 ± 0.8 дней. Смертность, связанная с родами, среди самок не зарегистрирована.

Среднее количество мышат в помете TRH2 Het составило 6.0 [5.0–8.0], при соотношении самцов и самок 46/54. Средний размер помета у самок Wt составил 7.0 [7.0–8.0] мышат, при соотношении самцов и самок 42/57. Такие результаты являются нормальными для животных этой линии [8]. Генотипирование показало, что соотношение мышат по генотипу близко к нормальному менделевскому распределению (1 : 2 : 2) с гетерозиготным разведением KO/Het/Wt — 18/48/34 (1 : 2.7 : 1.9).

Материнское поведение. Оценка гнездостроения у самок TRH2 Het и WT показала идентичные результаты между двумя генотипами, средний балл составил 2.63 ± 0.52 и 2.73 ± 0.44 ($p = 0.69$) соответственно. Как показано на рис. 2а, глубина и ширина гнезд между двумя генотипами мышей практически не различались. Однако анализ материнского поведения в “поисковом тесте” выявил ряд различий (рис. 2б). В среднем, в группе TRH2 Het потребовалось на 34% ($p = 0.08$) больше времени, чтобы вернуть весь помет в гнездо: 159.0 [155.0–169.0] с для самок TRH2 Het и 97.0 [80.0–159.0] с для самок Wt. Корреляция между числом детенышей в помете и временем, затраченным на возвращение детенышей в гнездо, у самок Wt прямая и сильная ($r = 0.73$), а у самок TRH2 Het обратная и слабая ($r = -0.14$).

Для потомства самок Wt 1-й день был критическим — причиной гибели детенышей было заглатывание плаценты самками во время родов и единичные случаи (5.9%) рождения детенышей в амниотической оболочке, что привело к гибели от гипоксии, как показано на диаграмме на рис. 3. Каких-либо нарушений в способности к кормлению детенышей среди самок TRH2 Het и Wt групп не наблюдалось. Молочное пятно присутствовало у 75.0% детенышей, за исключением каннибализированных. Тем не менее, отсутствие кормления и игнорирование помета на PD0 было зарегистрировано среди 25.0% матерей TRH2 Het, что привело к гибели 100.0% детенышей в помете, в то время как каннибализм не был зарегистрирован в клетках самок Wt.

Мониторинг в послеродовой период самок TRH2 Het (от PD0 до PD25) выявил каннибализм в 66.7% случаев смерти — причиной смерти детенышей был направленный инфантицид, в то время как в 50.0% случаев самки убивали весь помет. Отмечено, что критическими были первые 3 суток после рождения и 8-й день жизни детенышей

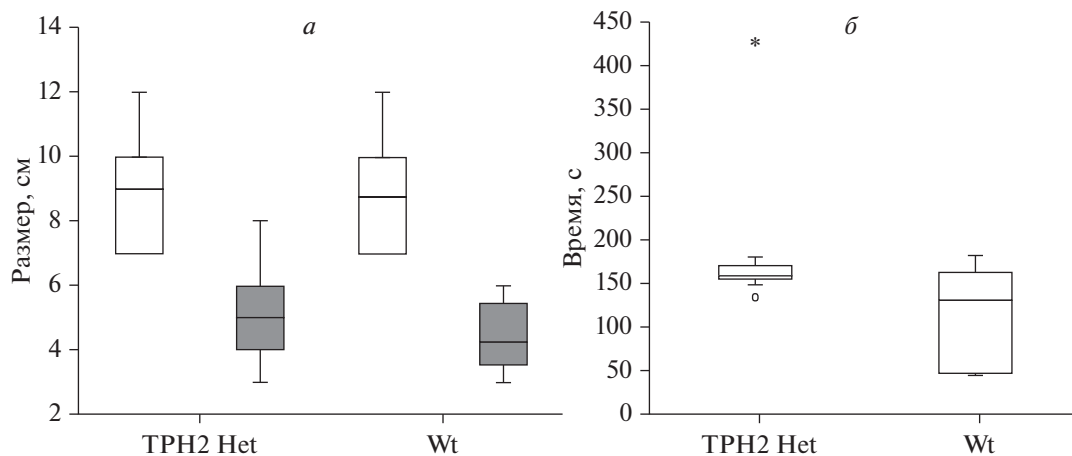


Рис. 2. Материнское поведение. Обозначения: *a* — ширина (белые квадраты) и глубина (серые квадраты) гнезд; *б* — результаты “поискового теста”. Данные представлены в виде графика качелей с границами P25–P75 и отметками минимальных и максимальных значений набора данных.

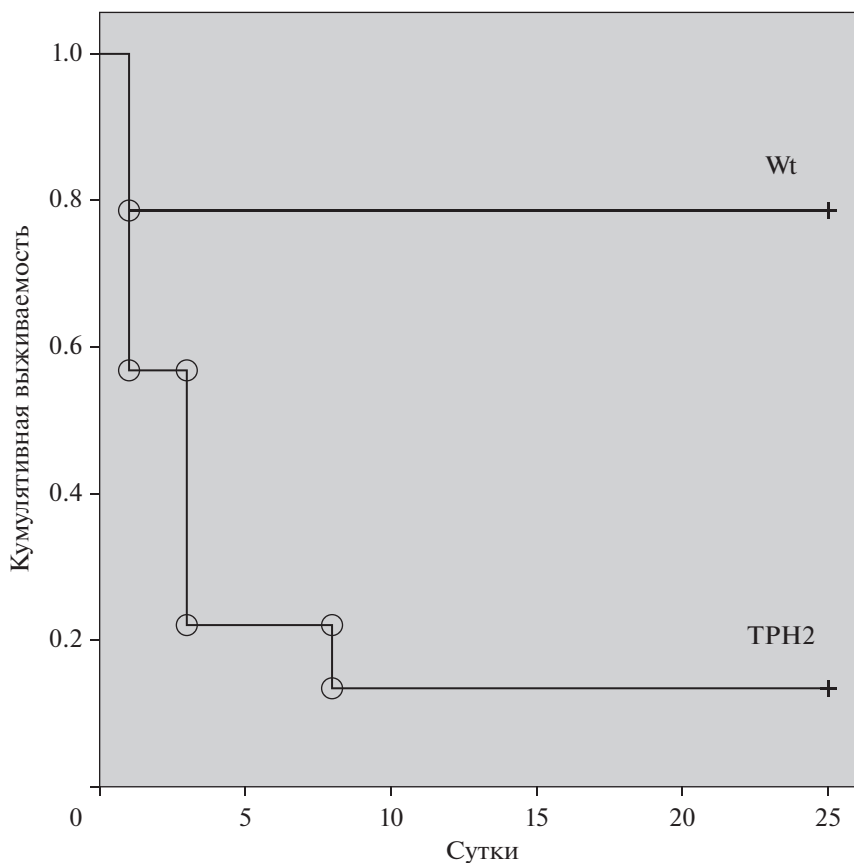


Рис. 3. Анализ выживаемости потомства по Каплану–Майеру.

(рис. 3). Исследование мертвых детенышей от TPH2 Het матерей показало, что в большинстве случаев было нанесен ущерб передней поверхности тела (передняя или брюшная части тела) — 23% случаев, а в 76% от детенышей оставалась

только область головы. Случаев 100% каннибализации тела детенышей не зарегистрировано. Среди каннибализированного потомства 64.7% принадлежали к генотипу Het, 29.4% — к КО и 5.9% — к Wt (КО/Het/Wt — 5.0/11.0/1.0). Равенство распре-

деления выживаемости для генотипов Wt и Het составило 0.0004.

Корреляционный анализ зависимости процента каннибализированных детенышей в помете TPN2 Het от оценки построения гнезда составил $r = 0.95$ ($p = 0.0001$), тогда как для группы Wt корреляция не была обнаружена.

Оценка развития потомства. Комплексная оценка морфологических и функциональных параметров постнатального онтогенеза потомства мышей выявила несколько важных различий (рис. 4). Наблюдалась значительная разница в массе тела детенышей между генотипами WT и KO. На PD7 эта разница составила 18.5% ($p = 0.01$), на PD14 – 40.1% ($p = 0.04$), PD21 – 45.2% ($p = 0.001$), PD28 – 36.9% ($p = 0.001$) и на PD35 – 27.1% ($p = 0.001$). Различий в массе тела между детенышами генотипов WT и Het обнаружено не было (рис. 4). Также наблюдалась статистическая разница в массе тела между мышатами генотипов Het и KO на PD14 – 39.6% ($p = 0.05$), PD21 – 44.3% ($p = 0.001$), PD28 – 35.4% ($p = 0.001$) и PD35 – 25.1% ($p = 0.01$). Прирост веса мышат на PD35 по сравнению с PD3 составил: для группы Wt – 16.1 [14.6–17.9] г, для группы Het – 14.9 [9.0–17.2] г и для группы KO – 11.90 [9.0–12.7] г.

Анализ физиологического развития потомства (табл. 2) показал, что у нокаутных особей появление первичного волосяного покрова, прорезывание верхних резцов и открытие влагалища наблюдалось на сутки раньше, чем у животных Wt и Het. У 84.6% детенышей Het открытие глаз было зарегистрировано на 14 день, в то время как детеныши KO и Wt открыли глаза на 15 день (16.7 и 42.8% соответственно) и на 16 день (83.3 и 57.1% соответственно).

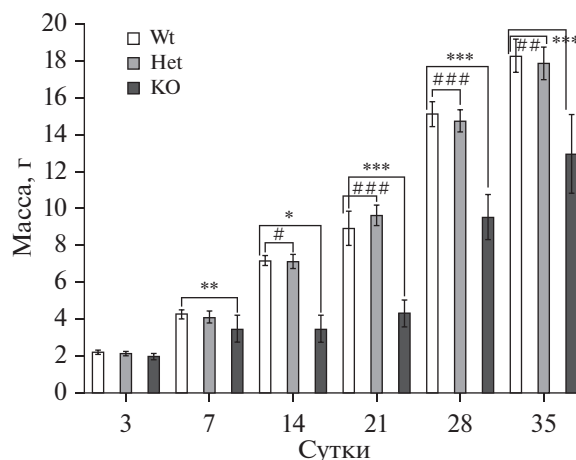


Рис. 4. Масса тела потомства от самок TPN2 Het. (Примечания: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ и *** $p \leq 0.001$ для KO по отношению к Wt; # $p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$ и ### $p \leq 0.001$ для Het по отношению к Wt). Белый столбец представляет Wt; серый – Het; темно-серый – KO.

Анализ реакции постановки передней конечности не выявил существенных различий между исследуемыми мышатами (рис. 5a): у трех генотипов созревание рефлекса было зарегистрировано на PD5. Однако потомство Wt и KO показали худшие результаты в реакции постановки задней конечности по сравнению с мышатами Het на PD5 и PD10 (рис. 5б). У нокаутных животных был самый низкий результат на PD5 (0.20 ± 0.11 балла при отсутствии реакции у 50.0% особей), что было ниже, чем в группах Wt и Het на 66.7% ($p = 0.273$) и 67.7% ($p = 0.285$) соответственно. На PD10 потомство Het набирало 0.94 ± 0.18 балла (среди них 61.5% не проявляли реакцию). Эти значения были ниже, чем в группах Wt и KO на 17.5% ($p = 0.179$) и

Таблица 2. Физическое развитие потомства

Регистрируемый показатель	Wt		TPN2 Het		TPN2 KO	
	PD	% pups	PD	% pups	PD	% pups
Отлипание ушной раковины	3	100.0	3	100.0	3	100.0
Первичный волосяной покров	5	28.6	5	76.9	5	100.0
	6	100.0	6	100.0		
Прорезывание нижних резцов	7	100.0	7	100.0	7	100.0
Прорезывание верхних резцов	11	28.6	11	81.8	11	100.0
	12	100.0	12	100.0		
Открытие глаз	15	42.8	14	84.6	15	16.7
	16	100.0	15	100.0	16	100.0
Опускание семенников	28	50.0	28	50.0	28	50.0
	29	100.0	29	100.0	29	100.0
Открытие влагалища	37	100.0	35	66.7	35	100.0
			36	33.3		

Сокращения: PD – постнатальный день.

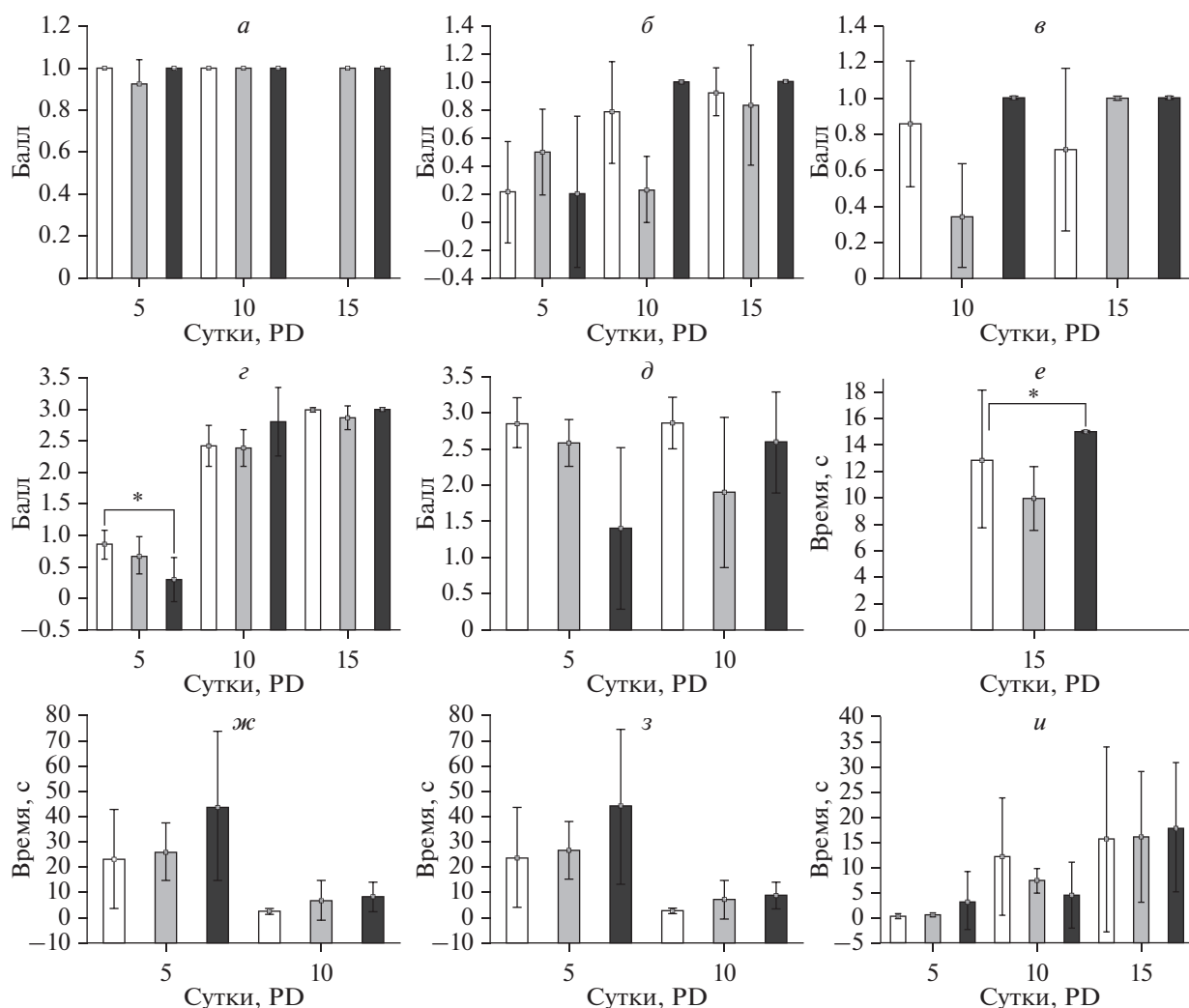


Рис. 5. Анализ постнатальных рефлексов детенышей. (Примечания: *a* – реакция плейсинга передних конечностей; *б* – реакция плейсинга задних конечностей; *в* – плейсинг вибриссный; *г* – амбуляция; *д* – скоринг; *е* – мышечная сила; *жс* – поверхностное выпрямление; *з* – отрицательный геотаксис; *и* – подвешивание передних конечностей). Данные представлены в виде графика колебаний с границами P25–P75 и отметками минимальных и максимальных значений набора данных. Белая рамка представляет Wt; серая рамка представляет Het; темно-серая рамка представляет КО. * $p \leq 0.05$ для детенышей Wt по отношению к детенышам КО.

10.6% ($p = 0.108$) соответственно. На PD15 реакция наблюдалась у всех генотипов.

При оценке реакции размещения вибрисс было отмечено, что 100% мышат Wt не имели реакции до PD10, в то время как 84.6% мышат Het и 30.0% мышат КО имели сниженную реакцию (различия недостоверны). Размещение вибрисс было полностью сформировано на PD15 у детенышей всех генотипов (рис. 5в).

При оценке двигательных рефлексов на PD5 у мышат Wt был выявлен высокий амбуляционный ответ (рис. 5г), превышающий показатели КО группы на 33.3% ($p = 0.067$) и Het группы на 22.2% ($p = 0.057$). Однако на PD10 мышата КО имели самый высокий показатель (2.8 ± 0.45), который превышал значения Wt и Het групп на 14.3% ($p = 0.345$

и $p = 0.361$ соответственно). У детенышей всех генотипов реакция была полностью сформирована на PD15 и характеризовалась плавным движением без асимметрии.

При оценке силы в тесте оценки задней конечности (рис. 5д) на PD5, у нокаутных мышат минимальный балл был на 51.7% ($p = 0.079$) ниже, чем в группе Wt. Значения в группе Het были на 10.3% ниже, чем в группе Wt ($p = 0.361$). На PD10 максимальный балл также наблюдался в группе Wt, причем он был на 24.1% выше, чем в группе Het ($p = 0.079$) и на 10.3% выше, чем в группе КО ($p = 0.592$). На PD5 по сравнению с PD10 средний балл у мышат Het снижался на 15.4% ($p = 0.361$), что может указывать на некоторый дефицит мышечной силы задних конечностей.

Время удержания на перевернутом экране у мышат Het составило 9.92 ± 4.01 с, что на 34.0% ниже, чем у Wt и КО ($p = 0.043$ и $p = 0.067$), и также подтверждает недостаток мышечной силы у мышат генотипа Het (рис. 5e).

В тесте на поверхностное выпрямление также были выявлены различия (рис. 5ж). Возвращение в исходное положение тела на PD5 у детенышей КО превышало этот показатель у детенышей Wt на 52.7% ($p = 0.108$) и у детенышей Het на 45.3% ($p = 0.067$). На PD10 максимальное время было выявлено у мышат КО, которое превышало таковое в группе Het на 35.1% ($p = 0.500$) и в группе Wt на 72.2% ($p = 0.067$). В то же время в группе Het эти показатели превышали значения группы Wt на 70.8% ($p = 0.067$).

При анализе результатов теста отрицательного геотаксиса (рис. 5з) были обнаружены некоторые изменения вестибулярной функции у нокаутных мышат на PD5 и PD10: время, затраченное на возвращение в положение “голова вверх”, было больше, чем в группе Het на 36.8% ($p = 0.144$) и 24.7% ($p = 0.685$), а в группе Wt на 48.6% ($p = 0.059$) и 70.7% ($p = 0.465$) соответственно. При этом время поворота у детенышей Het на PD5 превышало показатели Wt группы на 22.9% ($p = 0.172$).

Сила передних конечностей, оцененная в тесте подвешивания на PD10, оказалась ниже как в группе Het, так и в группе КО на 38.8% ($p = 0.204$) и на 78.5% ($p = 0.361$) и составила 7.38 ± 3.88 с и 2.60 ± 0.89 с соответственно по сравнению с Wt мышатами (рис. 5и). Разница в силе передних конечностей между генотипами Het и КО составила 64.8% ($p = 0.177$). На PD15 максимальное время висения было отмечено в группе Het (19.18 ± 4.82 с), что превышало значения групп КО (14.21 ± 8.22 с) и Wt (8.17 ± 4.17 с) на 25.6% ($p = 0.592$) и 18.3% ($p = 0.892$) соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

Репродуктивные показатели при разведении гетерозиготных TRH2 мышей характеризовались как нормальные, за исключением эффективности спаривания, которая была снижена на 10.3% по сравнению со средним показателем (75.0%) у мышей дикого типа, что может быть связано с аверсивным поведением самок с дефицитом серотонина [4, 9].

Анализ материнского поведения выявил некоторые отклонения среди самок TRH2 Het, которые включали нарушения в возвращении детенышей в гнездо и повышенный процент детоубийств. Средний балл за гнездовое поведение был близок к максимальному значению, а нарушений в поведении при кормлении детенышей обнаружено не было. Наши результаты также подтверждаются другим исследованием этой генетической модели

с дефицитом серотонина [18]. Как упоминалось ранее, основной причиной гибели детенышей был направленный каннибализм со стороны матерей, что может указывать на участие серотониновой сигнализации в проявлении этого поведения.

Беременность и роды являются стрессовой ситуацией [22], провоцирующей постнатальную депрессию у подопытных мышей. Этот вывод можно сделать на основании 67% смертности детенышей из-за материнского каннибализма и плохого гнездования TRH2 Het самок. Важно отметить, что эти два фактора наблюдались только у самок TRH2 Het. Ранее было показано, что самки TRH2 КО каннибализируют в основном детенышей КО, и что выживаемость детенышей Wt была выше, когда их воспитывали самки КО [23]. В нашей работе мы наблюдали повышенный процент каннибализма в отношении детенышей гетерозиготного генотипа. Похоже, что эти результаты не могут быть объяснены только влиянием генотипа матери или детеныша, и поэтому фактор отсутствия гена TRH2 может быть причиной более сложных взаимодействий [24, 25]. Мы не нашли объяснений тому, что самки TRH2 Het каннибализируют своих детенышей, преимущественно гетерозиготного генотипа, но можем отметить, что все детеныши родились живыми, и у них не было проблем с кормлением. Необходимо дополнительные исследования, чтобы понять, действительно ли это процесс каннибализма или детоубийства.

При изучении постнатального развития на 35 день с момента рождения было обнаружено отставание развития детенышей-нокауты по весу от детенышей Het и Wt. В свете плейотропного эффекта серотонина, выявленная выраженная гипофагия у нокаутных мышей может быть объяснена двумя основными неисключительными причинами: пищевой и/или метаболической. Поскольку вес детенышей трех генотипов не отличался до PD3, можно сделать вывод, что недостаток серотонина в мозге не влияет на рост и развитие плода, а скорее сказывается на раннем неонатальном развитии [12].

Несмотря на существующие данные о задержке физиологического развития мышей TRH2 КО [12, 22], в проведенных экспериментах такие основные показатели, как отлипание ушной раковины, прорезывание верхних резцов, открытие глаз и опускание семенников у мышей гомозиготного генотипа TRH2 КО наблюдались в те же сроки, что и у Wt и Het. Кроме того, такие показатели неонатального развития, как появление первичного волосяного покрова, прорезывание верхних резцов и открытие влагалища у нокаутных мышей были зафиксированы на день раньше по сравнению с детенышами других генотипов (Wt и Het). Такое быстрое развитие может быть вызвано сочетанием явлений патологической акселерации и

ретардации, эти эффекты часто диагностируются при психических заболеваниях [27], но для подтверждения этой гипотезы необходима дополнительная серия экспериментов с использованием большей выборки животных.

Тестирование нейроповеденческих рефлексов дает прогностические характеристики аномального развития и созревания коры головного мозга, что может быть важно в условиях, когда очевидной невропатологии не наблюдается [12]. При отсутствии экспрессии гена TRH2 у гомозиготных нокаутных мышей нарушение синтеза серотонина в нейронах имеет место уже в пренатальный период [26], тогда как у гетерозиготных нокаутных мышей снижение содержания серотонина ниже только на 10–20% по сравнению с мышами дикого типа [9].

При изучении нейроповеденческого развития новорожденных мышей мы обнаружили незначительную задержку на PD5 в появлении некоторых неврологических рефлексов (амбуляция, отрицательный геотаксис, подвешивание передних конечностей, скоринг и плейсинг вибрисс) у детенышей нокаутного генотипа TRH2, что также показано в других исследованиях [12, 28]. Результаты повторных тестов на PD10 свидетельствуют об усилении рефлекса с наличием импульсивных реакций, за которым следует полное развитие исследуемых рефлексов на PD15. Полученные данные могут указывать на прямую связь между уровнем серотонина и ранним развитием рефлексов у новорожденных [29].

Мы также выявили некоторые отклонения в развитии двигательных рефлексов у детенышей с генотипом TRH2 Het. Так, в проявлении постуральных рефлексов (отрицательный геотаксис и поверхностное выпрямление) и в тестах, определяющих мышечную силу детенышей (подвешивание передних конечностей, скоринг и удержание на экране), результаты детенышей генотипа Het были значительно хуже, чем у Wt, начиная с PD10. В развитии сенсорных рефлексов (постановка задних конечностей) у мышей Het также были отмечены отклонения на PD10, тогда как к PD15 эти показатели нормализовались. Такая нейроповеденческая динамика, вероятно, отражает корреляцию между изменениями в постнатальном развитии и дефицитом серотонинергической иннервации мозга потомства, что требует дальнейших исследований.

С трансляционной точки зрения результаты, полученные в данном исследовании, могут свидетельствовать как о нарушении взаимодействия между депрессивной матерью и ее ребенком [11], так и нарушении его развития.

ВЫВОДЫ

Репродуктивные показатели при разведении гетерозиготных TRH2 мышей характеризовались как нормальные, однако у TRH2 Het самок была обнаружена пониженная выживаемость помета и дефицит материнского поведения. При отсутствии явных признаков измененного поведения при гнездовании было обнаружено снижение общей характеристика материнского поведения, включая нарушение в возвращении детенышей в гнездо и повышенный процент инфантицида.

На ранних стадиях постнатального развития (до PD5) поведенческие паттерны моторного и сенсорного развития мышей гомозиготного генотипа с целевым нокаутом гена TRH2 (TRH2 KO) характеризовались как задержанные. Однако результаты моторных и сенсорных тестов тех же животных на PD10 указывали на усиление рефлекса с присутствием импульсивных реакций, за которым следовало полное развитие рефлексов к PD15. Развитие двигательных рефлексов у детенышей гетерозиготного генотипа (TRH2 Het) на PD5 существенно не отличалось от показателей животных дикого типа. Однако, начиная с PD10, у мышей генотипа Het наблюдалось некоторое отставание в развитии: результаты ряда тестов, проведенных в эти периоды, были значительно ниже, чем у мышей TRH2 Wt и TRH2 KO. Таким образом, дефицит гена TRH2 вносит вклад в нарушение поведенческого и эмоционального благополучия матери и ребенка. Аномалии поведения, направленные на потомство, наблюдаемые у самок, влияют на последующее развитие потомства, особенно у гомозиготных мышей. Наши данные подтверждают гипотезу о влиянии аномального материнского поведения, обусловленного нарушением системы 5-НТ в мозге, на развитие потомства.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Статья опубликована в рамках темы НИР № FNEN-2019-0008 государственного задания ФГБНУ “ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова” РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрено Комитетом по этике Федерального исследовательского центра пищевых систем им. В.М. Горбатова Российской академии наук (протокол № 11/2020 от 27 января 2021 г.).

Вклад авторов. Концептуализация: Е.Р. Василевская, курирование данных: Е.Р. Василевская, формальный анализ: Е.Р. Василевская и А.М. Зубалий, исследование: А.А. Кибиткина и Г.С. Толмачева, методо-

логия: А.А. Кибиткина, написание — первоначальный проект: А.А. Кибиткина и Г.С. Толмачева, написание — рецензирование и редактирование: Е.Р. Василевская, А.М. Зубалий. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Corchs F., Nutt D.J., Corchs F., Hince D.A., Bernik M. et al. // J. Psychopharmacol. 2015. V. 29. P. 61–69.
2. Pawluski J.L., Li M., Lonstein J.S. // Front. Neuroendocrinol. 2019. V. 53. № 100742. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2019.03.001>
3. Gabriele S., Sacco R., Persico A.M. // Eur. Neuropsychopharmacol. 2014. V. 24. P. 919–929.
4. Cordner Z.A., Marshall-Thomas I., Boersma G.J., Lee R.S., Potash J.B. et al. // Neurobiol. Stress. 2021. V. 15. № 100392.
5. Migliarini S., Pacini G., Pelosi B., Lunardi G., Pasqualetti M. // Mol. Psychiatry. 2013. V. 18. P. 1106–1118.
6. Auth C.S., Weidner M.T., Strekalova T., Schmitt-Böhrer A.G., Popp S. et al. // Eur. Neuropsychopharmacol. 2018. V. 12. P. 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2018.07.103>
7. Pratelli M., Pasqualetti M. // Biochem. J. 2019. V. 161. P. 3–14.
8. Angoa-Perez M., Kane M.J., Briggs D.I., Herrera-Mundo N., Sykes C.E. et al. // ACS Chem. Neurosci. 2014. V. 5. № 10. P. 908–919.
9. Mosienko V., Bert B., Beis D., Matthes S., Fink H. et al. // Transl. Psychiatry. 2012. V. 2. № 122. <https://doi.org/10.1038/tp.2012.44>
10. Strekalova T., Svirin E., Waider J., Gorlova A., Cespuglio R. et al. // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2021. V. 108. № 110155.
11. Orso R., Creutzberg K.C., Wearick-Silva L.E., Wendt V.T. et al. // Front. Behav. Neurosci. 2019. V. 13. № 197. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00197>
12. Alenina N., Kikic D., Todiras M. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. № 25. P. 10332–10337.
13. Heyne G., Plisch E.H., Melberg C.G., Sandgren E.P., Peter J.A. et al. // J. Am. Assoc. Lab. Anim. 2015. V. 54. № 4. P. 368–371.
14. Mironov A.N. // Guidelines for preclinical studies of drugs. M.: Grif and K. M.: Grif and K. 2013. 944 c.
15. Windsor Z. // Heliyon. 2019. V. 5. № 7. P. 14–28.
16. Stepanichev M.Y., Nedogreeva O.A., Klimanova M.A. et al. // Neurosci. Behav. Physi. 2022. V. 71. № 3. P. 370–386.
17. Umemura S., Imai S., Mimura A., Fujiwara M., Ebihara S. // PLoS One. 2015. V. 10. № 8. P. e0136016.
18. Martin-Sanchez A., Valera-Marin G., Hernandez-Martinez A., Lanuza E., et al. // Front. Neurosci. 2015. V. 9. P. 197–223.
19. Heyser C.J. // Curr. Protoc. Neurosci. 2004. V. 25. № 8. P. 18.
20. Pinto L.H., Enroth-Cugell C. // Mamm. Genome. 2000, V. 11. № 7. P. 531–536.
21. Feather-Schussler D.N., Ferguson T.S. // J. Vis. Exp. 2016. V. 117. P. 1–9.
22. Yun H., Park E.S., Choi S., Shin B., Yu J. et al. // PLoS Gen. 2019. V. 15. № 6. P. e1008214.
23. Muzerelle A., Soiza-Reilly M., Hainer C., Ruet P.L. et al. // Sci. Rep. 2021. V. 11. № 1. P. 6004.
24. Brajon S., Morello G.M., Capas-Peneda S., Hultgren J. et al. // Animals 2021. V. 11. № 8. P. 2327.
25. Weber E.M., Algers B., Hultgren J., Olsson I.A. // Acta Vet. Scand. 2013. V. 55. № 1. P. 83.
26. Pelosi B., Migliarini M., Pacini S., Pasqualetti M. // PLoS One. 2015. V. 10. № 8. P. e0136422.
27. Wolkowitz O.M., Reus V.I., Mellon S.H. // Dialogues in Clinical Neuroscience. 2011. V. 13. № 1. P. 25–39.
28. Horvath G., Reglodi D., Farkas J., Vadasz G. et al. // Adv. Neurobiol. 2015. V. 10. P. 149–167.
29. Mosienko V., Alenina N. // Behav. Brain Res. 2018. V. 277. P. 405–420.

Alloparental Care and Postnatal Development of Heterozygous TPH2 Transgenic Mice

A. A. Kibitkina^a, E. R. Vasilevskaya^a, G. S. Tolmacheva^a, and A. M. Zubalii^b

^aGorbatov Federal Research Center for Food Systems, Moscow, Russia

^bScientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Krasnogorsk, Russia

The issue of the relationship between the transmission of a negative effect from a depressed mother to her offspring is one of the priorities in modern psychiatry. Mice with the knocked-out tryptophan hydroxylase-2 (TPH2) gene have a depressive-compulsive phenotype, which makes these animals a highly appropriate bio-model for studying the role of serotonin in the body. In the offspring of such animals the following reproductive parameters were studied: pups maturation (physiological development) and sensory and motor reflexes. It was found that in the heterozygous mice, maternal care was reduced by the TPH2 gene knockout and cannibalism directed at offspring was increased. Deviations and violations in the return of pups to the nest were revealed in maternal behavior. Some deficiency in the development of heterozygous offspring was observed after 10 days. The homozygous (KO) pups had a lower body mass than the heterozygous (Het) and wild-type (Wt) pups. The rate of detachment of the auricle, eruption of the upper incisors, opening of the eyes, and lowering of the testes in the KO pups were observed at the same time as in the Wt and Het pups.

Keywords: brain serotonin, tryptophan hydroxylase-2 (TPH2), mice pups, motor function, sensory reflex, reproduction, breeding