На правах рукописи

Шалагинова Ирина Геннадьевна

МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ПОСТСТРЕССОРНЫХ НАРУШЕНИЯХ ПОВЕДЕНИЯ У ЛИНИЙ КРЫС С КОНТРАСТНОЙ ВОЗБУДИМОСТЬЮ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

1.5.5 – Физиология человека и животных

Автореферат

диссертации на соискание ученой

степени кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2023

Работа выполнена в лаборатории генетики высшей нервной деятельности Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук

Научный руководитель:	**Дюжикова Наталья Алековна,** доктор биологических наук,
Официальные оппоненты:	**Абдурасулова Ирина Николаевна**, кандидат биологических наук, заведующая Физиологическим отделом им. И.П. Павлова, заведующая лабораторией нейробиологии интегративных функций мозга ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» **Сарапульцев Алексей Петрович,** доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией иммунопатофизиологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН

Защита диссертации состоится «_____» _____ _2023 года в _____ на заседании Диссертационного совета 24.1.137.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН (199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН (199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6) и на сайте http://www.infran.ru_ _

Автореферат разослан «_____» _____2023 года

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук Ордян Наталья Эдуардовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Рост распространенности психических расстройств, таких как депрессия, посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР), патологическая тревога, отмечается во многих странах мира. Так, по данным мета-анализа, депрессией страдают от 7,2 до 12,9 % популяции и данное заболевание выходит на первое место среди всех причин потери трудоспособности в мире [Lim et al., 2018]. Нейробиологические основы развития этих психопатологий на сегодняшний день не ясны. Отсутствуют объективные маркеры данных состояний, которые можно было бы использовать для диагностики и оценки риска.

Одна из рабочих гипотез, объясняющих патогенез психических расстройств – гипотеза «стресс-диатез» [Baharikhoob, Kolla, 2020], где под диатезом имеется в виду наличие биологической (генетической) уязвимости, которая может привести к манифестации заболевания при действии стрессоров. В данной модели термин «диатез» является синонимом уязвимости, которая делает более или менее вероятным то, что у индивида произойдет манифестация психопатологии, если организм столкнется с определенным стрессом [Sigelman, Rider, 2011]. Подразумевается, что «диатезы» включают генетические, биологические, физиологические, когнитивные и личностные факторы.

Предстоит понять не только то, какие генетические уязвимости связаны с развитием той или иной патологии, но и то, каким образом стресс приводит к нарушениям функций центральной нервной системы (ЦНС).

Известно, что воспаление – естественная реакция здоровой ткани на повреждение [Шилов, 2006]. Однако при отклонении от нормального протекания, воспалительные реакции могут приводить к нарушению адаптации. Так, в последние годы нейровоспаление рассматривается как один из механизмов, посредством которого стрессорная реакция меняет молекулярную, эпигенетическую и, в конечном итоге, клеточную пластичность, таким образом, что нарушается функция нервной ткани и, как следствие, поведение [Evrensel, Ünsalver, Ceylan, 2020; Rhie, Jung, Shim, 2020].

Исследования связи нейровоспаления с психическими расстройствами приобретают особую актуальность в связи с пандемией COVID-19 [Tang, Helmeste, Leonard, 2021]. Так называемый «постковидный синдром» включает в себя множество неврологических и психических симптомов, в том числе депрессию и патологическую тревогу [Saikarthik и др., 2022].

Понимание того, как постстрессорное нейровоспаление может вызвать нарушение функций ЦНС, позволит разработать эффективные методы лечения и профилактики постстрессорных патологий.

Степень разработанности темы исследования

Иммуносупрессивная роль стресса была показана уже в исследованиях Г. Селье [Selye, 1936]. Сегодня известно, что глюкокортикоиды (ГК) могут так же оказывать и провоспалительное действие в зависимости от дозы. Низкие уровни ГК вызывают провоспалительную реакцию на периферии, в то время как высокие или фармакологические дозы оказывают противовоспалительное действие [Dantzer, 2018]. Действие ГК в головном мозге и на периферии неодинаково. Базальные уровни ГК, достигаемые во время физиологической реакции на острый стресс, индуцируют противовоспалительные реакции и снижают воспалительную цитотоксичность в головном мозге. Длительный же или очень интенсивный стресс и, соответственно, высокий уровень ГК, усиливают проявления воспаления в центральной нервной системе [Sorrells, Sapolsky, 2007]. При этом увеличивается экспрессия провоспалительных цитокинов интерлейкина 1β (interleukin-1 β, IL1β) и фактора некроза опухоли (tumour necrosis factor, TNF) как на уровне мРНК, так и на уровне белка в различных структурах мозга [Dinkel, MacPherson, Sapolsky, 2003; Pablos de et al., 2006; Munhoz et al., 2006].

Показана возможная причастность постстрессорного нейровоспаления к патогенезу психических расстройств, таких как депрессия, тревожные расстройства [Miller, Raison, 2016]. При депрессии было продемонстрировано увеличение количества лейкоцитов, моноцитов и нейтрофилов в периферической крови пациентов, а также повышенные уровни циркулирующих провоспалительных цитокинов [Toben, Baune, 2018]. Периферическое воспаление

может «транслироваться» в ЦНС, приводя к активации микроглии и астроцитов в результате инфильтрации моноцитов или из-за проникновения провоспалительных сигналов через поврежденный гематоэнцефалический барьер [Miller, Raison, 2016; Wohleb, Delpech, 2017]. Медиаторы воспаления, высвобождаемые микроглией и эндотелиальными клетками головного мозга, могут подавлять нейротрансмиссию.

Вопрос, который еще предстоит выяснить, заключается в том, как вышеупомянутые нейроиммунные взаимодействия могут быть активированы в головном мозге в отсутствие явного воспаления и инфекции и какие генетические факторы, делают организм более уязвимым к тяжелому течению нейровоспаления и, как следствие, к более выраженным поведенческим нарушениям.

Среди таких индивидуальных факторов риска особый интерес представляет возбудимость нервной системы. В Институте физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук в результате длительного отбора были получены две линии крыс с разным уровнем возбудимости нервной системы [Vaido et al., 2018]. Было показано, что линии различаются по своим поведенческим реакциям на длительное эмоционально-болевое стрессирование и характеризуются различными молекулярными и клеточными особенностями нервной ткани. У крыс с низкой возбудимостью (высокий порог, линия ВП) стресс вызывает депрессивно-подобные поведенческие симптомы, в то время как у крыс с высокой возбудимостью (низкий порог, линия НП) наблюдается и появление компульсивных движений [Вайдо и др., 2018]. В связи с чем, использование данных животных как моделей для исследования генетически детерминированных факторов риска постстрессорных расстройств представляется перспективным.

Кроме того, микробиота кишечника сегодня рассматривается как фактор, активно влияющий на функциональное состояние мозга и поведение. Выясняются молекулярные механизмы нейровоспаления, модулируемого микробиотой. Показано, что метаболиты кишечной микробиоты ингибируют гистондеацетилазы хозяина (histone deacetylases, HDACs), посттрансляционные модификаторы гистонов, тем самым влияя на активацию транскрипции генов организма-хозяина [Alam, Abdolmaleky, Zhou, 2017; Paul et al., 2015]. Известно, что стресс изменяет

состав кишечной микробиоты [Jašarević и др., 2017; Marin и др., 2017; Tsilimigras и др., 2018] Знание точных таксономических изменений микробного сообщества под воздействием стрессоров поможет оценить возможность использования соответствующих пробиотиков для коррекции нейровоспаления и лечения постстрессорных психических расстройств.

Цель исследования: изучить ряд признаков нейровоспаления и состав микробиоты кишечника, их возможную роль в процессах адаптации /дезадаптации к длительному эмоционально-болевому стрессу в связи с наследственно обусловленным высоким и низким уровнем возбудимости нервной системы у крыс.

Задачи исследования

У крыс линий с высокой и низкой возбудимостью нервной системы:

1. Оценить краткосрочные и долгосрочные эффекты длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия на выраженность тревожно-подобного поведения.

2. Оценить степень выраженности ряда признаков нейровоспаления в мозге.

3. Изучить долгосрочную динамику постстрессорной воспалительной реакции в крови.

4. Оценить краткосрочные и долгосрочные изменения уровня мРНК гена *bdnf* нейротрофического фактора BDNF в мозге.

5. Определить степень разнообразия микробиоты кишечника и сравнить динамику постстрессорных изменений представленности микроорганизмов.

Научная новизна

В данной работе впервые на линиях крыс с контрастной возбудимостью нервной системы были изучены краткосрочное и долгосрочное влияние длительного эмоционально-болевого стресса на выраженность периферического воспаления и нейровоспаления в структурах мозга, вовлеченных в развитие постстрессорных нарушений. Впервые выявлена специфическая динамика протекания постстрессорного нейровоспаления у крыс с разной возбудимостью нервной системы. Показано, что высоковозбудимые животные линии НП демонстрируют выраженное нейровоспаление в ответ на хронический стресс -

увеличение числа микроглиальных клеток во всех изученных областях гиппокампа через 7 дней после стрессирования и повышение уровня мРНК гена *il1β* провоспалительного цитокина IL1β по сравнению с контролем к 24му дню после окончания действия стрессора в гиппокампе и миндалине. Низковозбудимые животные линии ВП демонстрируют менее выраженные по сравнению с высоковозбудимыми признаки нейровоспаления: увеличение количества микроглиальных клеток наблюдается только в зоне CA1 гиппокампа, а увеличение экспрессии гена *il1β* отмечено только в гиппокампе.

Впервые проанализированы постстрессорные изменения уровня мРНК гена *bdnf* у животных с разной возбудимостью нервной системы. У высоковозбудимых крыс линии НП длительное эмоционально-болевое стрессирование приводит к снижению уровня мРНК гена *bdnf* в префронтальной коре через сутки после окончания стрессирования и такое снижение сохраняется на протяжении одной недели.

Кроме того, впервые получены данные о разнообразии и составе микробиоты кишечника у крыс с разной возбудимостью нервной системы, а также изменения в микробиоте происходящие у животных двух линий в ответ на хроническое стрессорное воздействие. Выявлено, что интактные животные с низкой возбудимостью нервной системы (линия ВП) имеют более разнообразный микробный состав кишечника, по сравнению с высоковозбудимой линией (НП), при этом стресс вызывает более динамичные изменения в представленности микроорганизмов у низковозбудимой линии ВП, по сравнению с НП.

Теоретическая и практическая значимость работы

Данная работа посвящена одной из фундаментальных проблем нейробиологии, связанной с механизмами развития постстрессорных психических дисфункций. Полученные данные позволяют подтвердить, что генетически детерминированный уровень возбудимости нервной системы может являться фактором риска развития постстрессорных поведенческих нарушений. Знание о генетических рисках развития выраженного постстрессорного нейровоспаления

позволит разработать более эффективные способы ранней диагностики и профилактики постстрессорных расстройств.

Результаты анализа постстрессорных изменений микробиоты кишечника крыс свидетельствуют в пользу того, что более высокие показатели микробного разнообразия обнаруживаются у животных с низким уровнем возбудимости (линия ВП), которые и в своей реакции на стресс демонстрировали менее выраженные поведенческие симптомы и признаки нейровоспаления. В перспективе, полученные данные будут способствовать поиску новых методов лечения постстрессорных нарушений путем коррекции микробиоты кишечника с учетом индивидуально-типологических особенностей нервной системы.

Полученные результаты используются в курсах лекций «Генетика поведения» и «Биологические основы психических расстройств», читаемых для студентов бакалавриата и специалитета БФУ им. И. Канта, а также размещенных на открытой платформе stepik.org.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Генетически детерминированные особенности крыс с высоким и низким уровнем возбудимости нервной системы определяют специфику долгосрочных тревожно-подобных нарушений поведения в ответ на длительное эмоционально-болевое стрессорное воздействие.

2. Генетически детерминированные особенности крыс с высоким уровнем возбудимости нервной системы повышают риск развития постстрессорных воспалительных реакций.

3. У низковозбудимых крыс по сравнению с высоковозбудимыми большее разнообразие микробиоты и более специфические ее изменения под влиянием длительного эмоционально-болевого стрессирования.

Апробация результатов

Основные результаты диссертации были представлены на 6 российских и международных конференциях: FENS-Hertie Winter School: Genetic and epigenetic mechanisms underlying brain disorders, Obergurgl, Austria, 2019; VII Молодёжной школе-конференции по молекулярной и клеточной биологии, Санкт-Петербург,

2020; Всероссийская конференция «Интегративная физиология», Санкт-Петербург, 2020 – 2021; The Thirteenth International Multiconference, Novosibirsk, Russia, 2022; VIII Съезд физиологов СНГ. - Сочи, 2022.

По материалам работы опубликовано 6 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ / в изданиях входящих в базы Scopus и Web of Science.

Личное участие автора в получении результатов

Автором выполнены все основные части работы: написан обзор литературы, разработана гипотеза, дизайн эксперимента. Автор работы выполнял все этапы экспериментов лично, однако пользовался неоценимой помощью сотрудников лаборатории генетики высшей нервной деятельности Института физиологии им. И.П. Павлова.

Структура и объем диссертации

Диссертация построена по традиционной схеме и содержит разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений», «Список литературы». Диссертация выполнена на 143 листах, список литературы содержит 210 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

В исследовании использовались самцы крыс двух линий ВП (высокий порог, низкая возбудимость) и НП (низкий порог, высокая возбудимость) в возрасте 5 месяцев. Данные линии крыс – результат длительной селекционной работы, проводимой в Институте физиологии им. И. П. Павлова РАН с 70-х годов прошлого века. Животных отбирали по порогу возбудимости большеберцового нерва к действию электрического тока [Вайдо, Ситдиков, 1976], линии различаются и по возбудимости других периферических и центральных отделов нервной системы [Вайдо, 2000]. Линии включены в биоколлекцию Института физиологии им. И. П. Павлова РАН (патенты на селекционное изобретение № 10769 и 10768 от 15 января 2020 года). Экспериментальные и контрольные животные содержались в стандартных условиях вивария при режиме свет/темнота 12/12 ч, температуре 20–

23 ˚С, на стандартном пищевом рационе, с постоянным доступом к воде и пище. Все эксперименты на животных проводились в соответствии с директивами Совета Европейского сообщества (86/609/EEC) об использовании животных для экспериментальных исследований. Протокол был одобрен Комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. П. П. Павлова РАН.

Метод длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия

Экспериментальные животные подвергались психогенному длительному эмоционально-болевому стрессированию (ДЭБС) по протоколу К. Гехта: каждый день в течение 15 дней животные подвергались воздействию 6 неподкрепляемых (по 10 секунд каждый) и 6 подкрепляемых током (2,5 мА, 2 мс) световых сигналов. Межсигнальный интервал равнялся 1 минуте. Согласно схеме, комбинации условных и безусловных стимулов не повторялись, а чередовались с вероятностью 0,5, что не позволяло животным выработать условный рефлекс.

Стрессированных животных и соответствующие контрольные группы декапитировали через 24 часа; через 7, 24 и 60 дней после воздействия стресса, анализ поведенческих симптомов стресса оценивали в этих же временных точках после ДЭБС.

Оценка поведенческих симптомов стресса

Влияние ДЭБС на поведение оценивали в тестах «Открытое поле» (ОП) и «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ). Общее количество животных в поведенческих тестах n=128 (по 64 крысы каждой лини).

Оценка динамики соотношения нейтрофилов и лимфоцитов в мазках крови

Для оценки изменений соотношения нейтрофилов и лимфоцитов производили забор крови из хвостовой вены крыс контрольных и опытных групп обеих линий через 24 часа, 7 и 24 дня после стресса. Соотношение нейтрофилов и лимфоцитов оценивали в мазке крови, окрашенном по Романовскому-Гимзе. Количество животных в каждой группе составляло от 9 до 11 особей, всего было протестировано 162 крысы обеих линий (линия НП n=60 и линия ВП n=62)

Иммунофлуоресцентное окрашивание

Для оценки числа микроглиальных клеток в мозге крыс использовали иммунофлуоресцентное окрашивание на микроглиальный маркер Iba1 - (ионизированная кальций-связывающая адапторная молекула 1, Ionized calcium Binding Adapter molecule 1), принадлежащий к группе кальций связывающих белков. Количество микроглиальных клеток оценивали в префронтальной коре и гиппокампе крыс.

Пробоподготовка. Мозг крыс препарировали в ледяном фосфатно-буферном физиологическом растворе (PBS, pH=7,4) и фиксировали в 4% параформальдегиде (PFA) для иммуногистохимии на протяжении суток при температуре +4°C. Далее ткань промывали в PBS, погружали в 5% агарозу (Dia-m, LM) и делали срезы на вибротоме (7000 Campden Instruments LTD, Великобритания). Получали последовательные срезы толщиной 50 мкм.

Иммунофлуоресцентная детекция. В исследовании использовались первичные поликлональные антитела, (козьи) анти Iba1 (Goat polyclonal to Iba1, Abcam ab5076). В качестве вторичных использовали антитела, конъюгированные с AlexaFluor488 (Abcam, 50129). Срезы монтировали на предметные стекла с использованием монтажной среды Fluoroshield (Abcam, 104135) и исследовали под флуоресцентным микроскопом Axio imager A2 (Carl Zeiss, Германия) с программным обеспечением ZEN.

Клетки подсчитывали при увеличении 40×. Были проанализированы три области интереса в гиппокампе (CA1, CA3 и DG) на трех фронтальных срезах от каждого животного на уровнях -2.30, -3.30 и -4.80 от брегмы [Paxinos, Watson, 2006] а также в префронтальной коре (3.20 от брегмы, не выделяя отдельных областей). Клетки были подсчитаны в 3 полях зрения в каждой области интереса. Количество клеток микроглии рассчитывали на 3 срезах от каждого животного. В данном эксперименте были проанализированы данные по 74 животным обеих линий (линия ВП n=38, линия НП n=36), в каждой контрольной и экспериментальной группе было от 5 до 8 животных.

ПЦР в реальном времени для изучения уровня экспрессии целевых генов

Суммарную РНК из образцов извлекали с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) по протоколу производителя. Для определения концентрации экстрагированной РНК проводили тест методом спектрофотометрии (NanoDrop IMPLEN). Синтез комплементарной ДНК производился с использованием олиго (dT)-праймера и обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей Молони (MMLV, Евроген, Россия). Для ПЦР-анализа были использованы ген-специфические праймеры для генов *il1β, tnf* и *bdnf*, подобранные с помощью литературы и проверенные в базе NCBI (BLAST primer).

Праймеры к участкам генов:

il1β прямой (5’- GCAATGGTCGGGACATAGTT-3’)

обратный (5’-GTAAGTGGTTGCCTGTCAGAG-3’),

tnf прямой (5’-GCAGGTCTACTTTGGAGTCATT-3’)

обратный (5’-TGTGTTTCTGAGCATCGTAGTT-3’)

bdnf прямой (5’-CTGTCGCACGGTCCCCATT-3’)

обратный (5’-TTCTCGTCTGCCCCAAAGCA-3’)

референс глицеральдегид3-фосфат дегидрогеназа (gapdh)

прямой (5’- GTTTGTGATGGGTGTGAACC-3’)

обратный (5’-TCTTCT GAGTGGCAGTGATG-3’)

Для ртПЦР использовали амплификатор BioRad CFX96. В качестве флуоресцентной метки использовался интеркалирующий агент SYBR Green 1, входящий в состав реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR (Евроген). Для проверки специфичности полученных продуктов амплификации производили анализ кривых плавления продуктов реакции. Результаты ПЦР-анализа интерпретировались с помощью метода ΔΔCt, который основан на оценке уровня экспрессии целевого гена по отношению к референсному [Livak, 2001]. Экспериментальные группы в каждой временной точке включали по 6 животных каждой линии. Объединенная контрольная группа линии ВП (контрольные крысы - по 4-6 животных в каждой из 4-х временных точек) включала 19 животных, линии НП – 22. Общее количество животных в данном эксперименте составило 89.

Секвенирование гена 16S рРНК для оценки микробного разнообразия

Образцы кала, собранные от 24 животных (по 12 крыс каждой линии), хранились при -80°C. В каждой контрольной и экспериментальной группе каждой линии было по 6 животных, сбор кала во всех группах производили в трех временных точках: до стресса, через 7 и 24 дня после окончания стрессирования (всего 72 образца кала). Для оценки микробиоты проводили экстракцию бактериальной ДНК из стула животных. Подготовка библиотек фрагментов бактериальной ДНК, содержащих области V4 гена, кодирующего 16S рРНК, для широкомасштабного секвенирования на платформе Illumina Miseq проводилась посредством получения ампликонов в ходе однократной полимеразной цепной реакции с кастомными праймерами (Lumiprobe). Биоинформатический анализ проводили с помощью пакета программ Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME2).

Статистическая обработка полученных результатов

Статистическую обработку результатов производили в программах SPSS Statistics 21 и Prism 7. Для анализа нормальности распределения переменных использовался критерий Колмогорова–Смирнова или Шапиро-Уилка. Для статистической обработки при распределении, отличающемся он нормального использовали тест Краскела-Уоллиса, U-тест Манна-Уитни и тест частоты ложных открытий (FDR), тест Уилкоксона, тест Фридмана. В случае нормального распределения использовали одномерный дисперсионный анализ ANOVA с использованием метода коррекции Гринхауза-Гейссера и t-тест. Порог значимости был установлен на уровне $p < 0,05$ для всех статистических тестов.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние длительного эмоционально-болевого стрессирования на поведение крыс с контрастной возбудимостью нервной системы в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт»

У крыс линии ВП значимые изменения поведения проявляются только через 2 месяца после окончания действия стрессора, в то время как крысы линии НП

демонстрировали более выраженную поведенческую реакцию на стресс на ранних сроках (рис.1, 2).

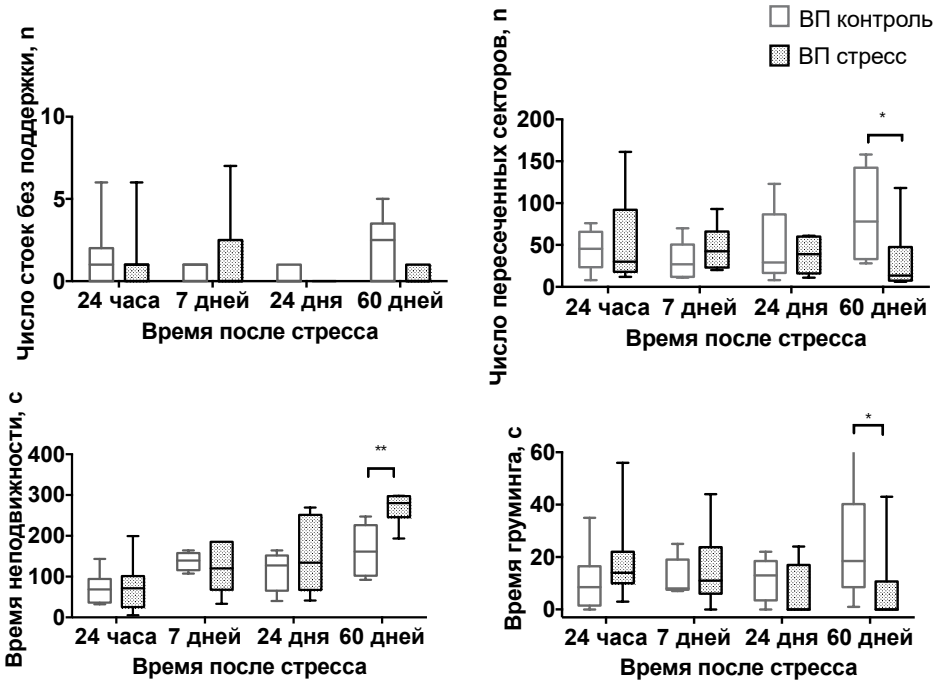

Рисунок 1. Влияние длительного эмоционально-болевого стрессирования на активность крыс линии ВП в открытом поле. *ВП контроль - линия ВП контрольная группа, ВП стресс - линия ВП стрессированная группа; здесь и далее на рис. 2, 3: n=12 в контрольных и экспериментальных группах через 24 часа после стрессирования, и n = 6-8 в контрольных и экспериментальных группах в остальных временных точках; графики представляют медианы, границы квартилей и максимальные и минимальные значения; ** p< 0,01, * p< 0,05, критерий Манна-Уитни.*

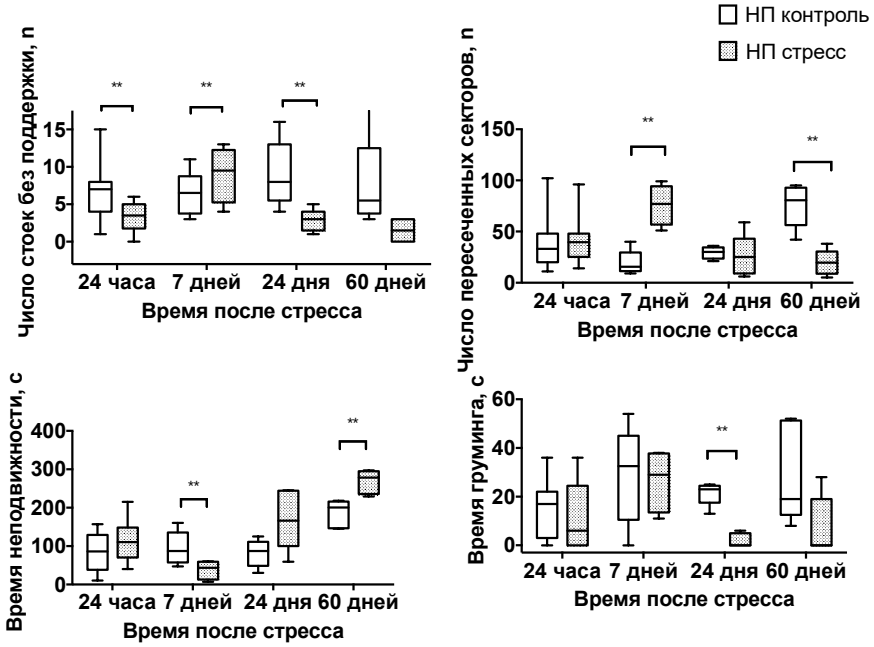

Рисунок 2. Влияние длительного эмоционально-болевого стрессирования на активность крыс линии НП в открытом поле. *НП контроль - линия НП контрольная группа, НП стресс - линия НП стрессированная группа; ** p< 0,01, критерий Манна-Уитни.*

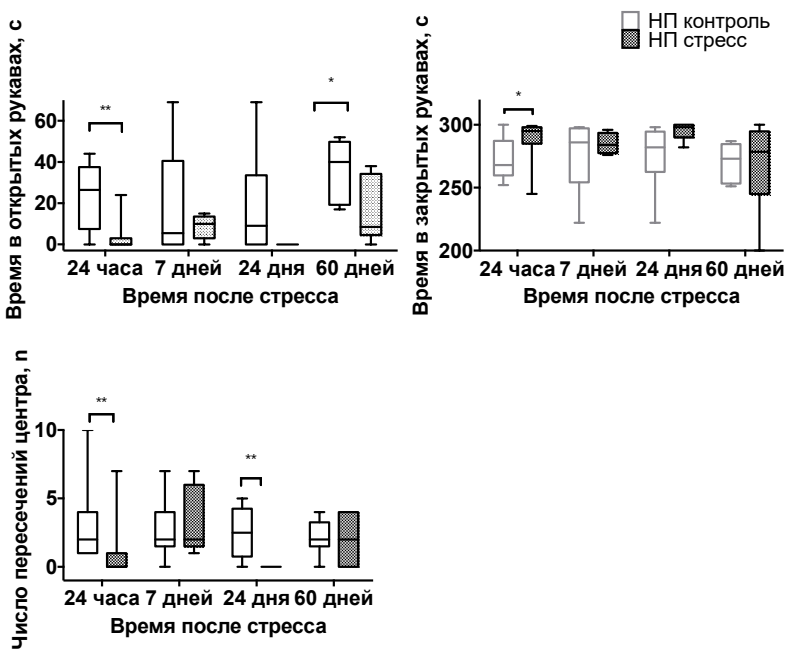

Рисунок 3. Влияние длительного эмоционально-болевого стрессирования на активность крыс линии НП в приподнятом крестообразном лабиринте. ** *p<0,01,* * *p<0,05, тест Манна-Уитни. Уитни.*

В тесте ПКЛ эффект стресса не проявлялся в группе линии ВП ни в одной временной точке, при этом высоковозбудимые крысы линии НП (Рис. 3) демонстрировали тревожно подобные симптомы уже через 24 часа после окончания стрессирования. К 7-му дню данные симптомы исчезают, однако некоторые из них появляются вновь на сроке 24 и 60 дней.

Таким образом, несмотря на то, что интактные крысы линии НП обычно проявляют меньшую тревожность в стандартных поведенческих тестах, чем животные линии ВП [Вайдо и др., 2018], они более уязвимы к хроническому стрессу в исследуемые временные точки после стрессового воздействия, поскольку поведенческие изменения начинают проявляться на более ранних сроках после стресса и сохраняются на сроках до 60 дней в виде отдельных тревожно-подобных симптомов.

Соотношение нейтрофилов и лимфоцитов у крыс с контрастной возбудимостью нервной системы в разные сроки после длительного эмоционально-болевого стрессирования

Внутри группы стрессированных крыс линии НП мы наблюдали значимое увеличение соотношения N:L через 24 часа и на 7е сутки после воздействия стресса. В экспериментальной группе линии ВП соотношение N:L было снижено через 24 часа после воздействия стресса, а затем восстановилось до его начальных

значений к 7-м суткам. Таким образом, у высоковозбудимых животных линии НП мы наблюдали сдвиг лейкоцитарной формулы крови, свидетельствующий о развитии воспаления.

Влияние длительного эмоционально-болевого стрессирования на число микроглиальных клеток в префронтальной коре и гиппокампе крыс с контрастной возбудимостью нервной системы

Значимый эффект стресса на число Iba1+ окрашенных клеток в префронтальной коре не выявлен ни у одной из линий крыс.

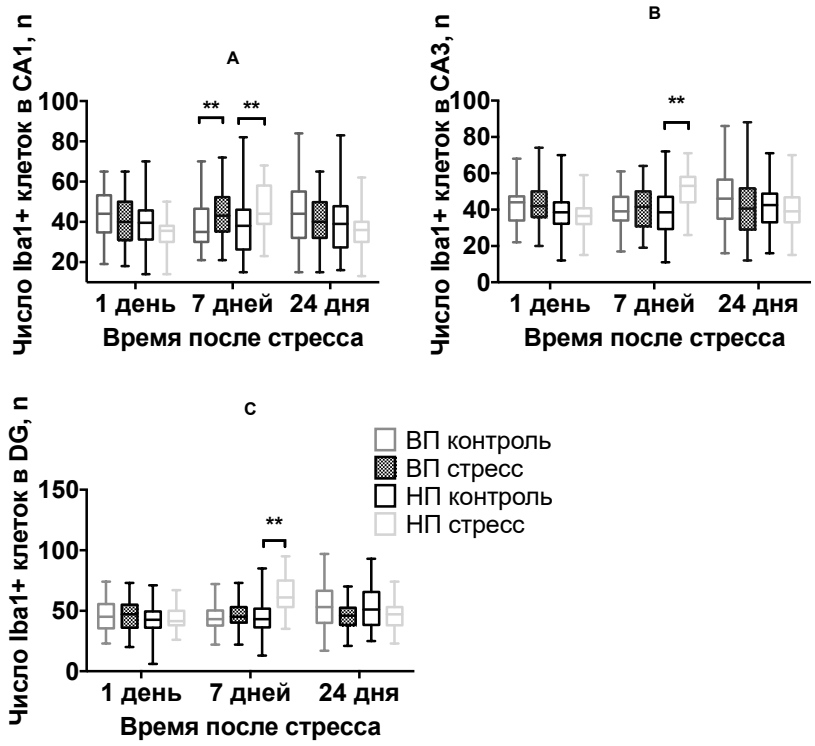

Рисунок 4. Влияние длительного эмоционально-болевого стрессирования на количество микроглиальных клеток в гиппокампе у крыс линий ВП и НП. *(A) в области CA1 гиппокампа, (B) – в области CA3 и (C) – в зубчатой извилине (DG); n=5-12 в группе; графики представляют медианы, границы квартилей, максимальные и минимальные значения анализируемых данных; **p<0,01, критерий Манна-Уитни.*

У крыс группы ВП стресс мы обнаружили значимое увеличение количества клеток микроглии только в области CA1, а у НП во всех трех областях гиппокампа через 7 дней после окончания стрессирования (по сравнению с контролем) (рис. 4).

Таким образом, высоковозбудимые крысы линии НП могут быть более уязвимы к развитию выраженного постстрессорного нейровоспаления в гиппокампе по сравнению с низковозбудимой линией ВП.

Постстрессорные изменения экспрессии генов *il1β* и *tnf* провоспалительных цитокинов IL1 β и TNF в мозге животных с разным уровнем возбудимости нервной системы

В префронтальной коре значимых постстрессорных изменений уровня мРНК генов исследуемых цитокинов не обнаружено ни у одной из линий. В гиппокампе через 24 дня после стрессового воздействия уровень мРНК *il1β* значимо повысился в экспериментальных группах по сравнению с контрольными животными, независимо от уровня возбудимости нервной системы (Рис. 5). Значимых постстрессорных изменений в экспрессии гена *tnf* у обеих линий не наблюдалось ни в одной временной точке.

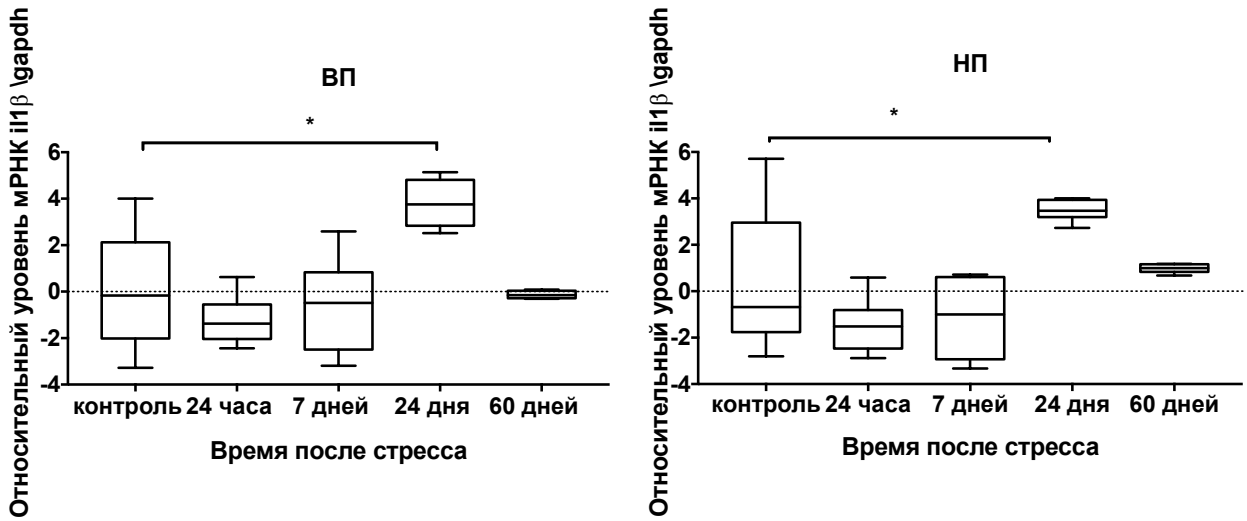

Рисунок. 5. Уровень мРНК генов *il1β* в гиппокампе крыс линий ВП и НП. *Здесь и далее по вертикальной оси - относительное изменение уровня мРНК (-ΔΔCt); графики представляют медианы, границы квартилей, максимальные и минимальные значения; n=6 в каждой экспериментальной группе, объединенный контроль ВП - n=22, НП - n=18; *p<0,05 критерий Краскела-Уоллиса, критерий Манна-Уитни, поправка FDR.*

В миндалине у крыс линии НП стресс приводил к увеличению экспрессии гена *il1β* через 24 дня после окончания стрессового воздействия (рис. 6). У низковозбудимых животных линии ВП постстрессорных изменений уровня мРНК исследуемых цитокинов в миндалине не наблюдали ни в одной временной точке. Изменений в экспрессии гена *tnf* в миндалине у экспериментальных животных обеих линий по сравнению с контролем не наблюдалось ни в одной временной точке.

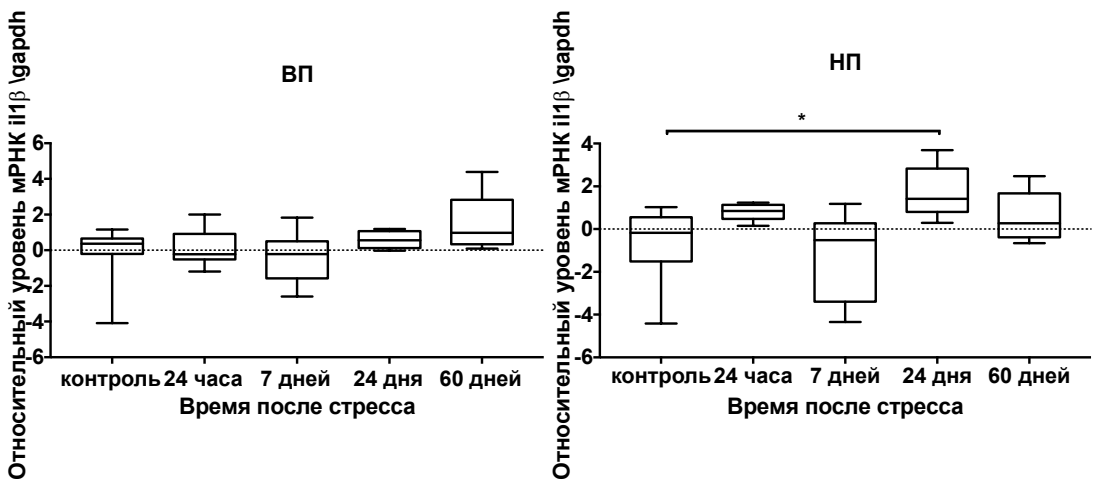

Рис. 6. Уровень мРНК генов *il1β* в миндалине крыс линий ВП и НП в разные сроки после длительного эмоционально-болевого стрессирования. *Обозначения и размер групп как на Рис. 5; *p<0,05 критерии Краскела-Уоллиса, Манна-Уитни, поправка FDR.*

Анализ экспрессии генов провоспалительных цитокинов в крови интактных животных показал значимо более высокий уровень мРНК гена *il1β* у высоковозбудимых животных линии НП по сравнению с низковозбудимыми крысами ВП, межлинейных различий в уровне мРНК гена *tnf* в крови не обнаружено. Анализ постстрессорных изменений в крови показал значимое снижение уровня мРНК гена *il1β* через 24 часа после окончания стрессорного воздействия и только у высоковозбудимых животных линии НП (Рис.7). Во всех остальных временных точках влияния стресса на уровень мРНК исследуемых провоспалительных цитокинов не обнаружено ни у одной из линий животных.

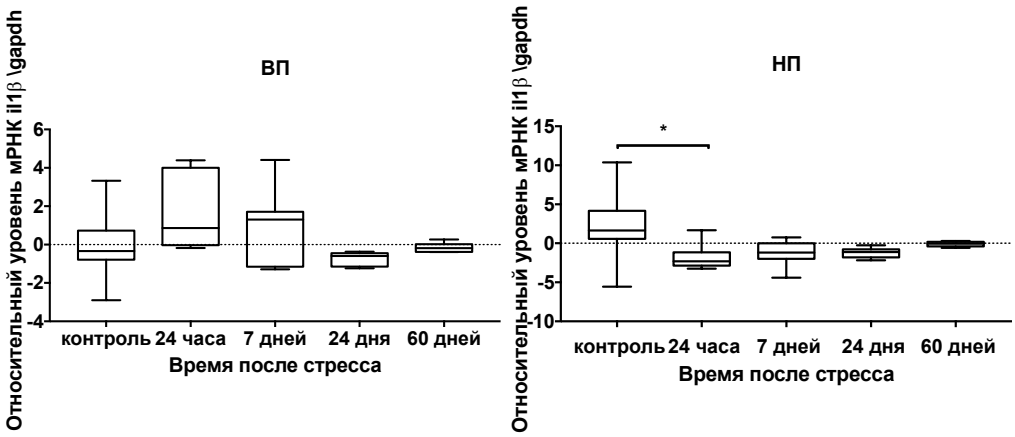

Рис. 7. Уровень мРНК генов *il1β* в крови крыс линий ВП и НП в разные сроки после длительного эмоционально-болевого стрессирования. *Обозначения и размер групп как на Рис. 5; *p<0,05 критерии Краскела-Уоллиса, Манна-Уитни, поправка FDR.*

Таким образом, увеличение уровня мРНК провоспалительных цитокинов не только в гиппокампе, но и в миндалине через 24 дня после стресса у крыс линии НП свидетельствует в пользу наличия связи повышенного риска развития постстрессорного нейровоспаления с генетическими особенностями высоковозбудимых животных линии НП.

Экспрессия гена *bdnf* нейротрофического фактора BDNF в мозге крыс с контрастной возбудимостью нервной системы

В префронтальной коре обнаружено значимое снижение уровня мРНК *bdnf* через сутки и 7 дней после стресса у высоковозбудимой линии НП, у низковозбудимой линии ВП статистически значимых различий уровня мРНК в экспериментальных группах на разных сроках после воздействия по сравнению с контролем выявлено не было (Рис. 8).

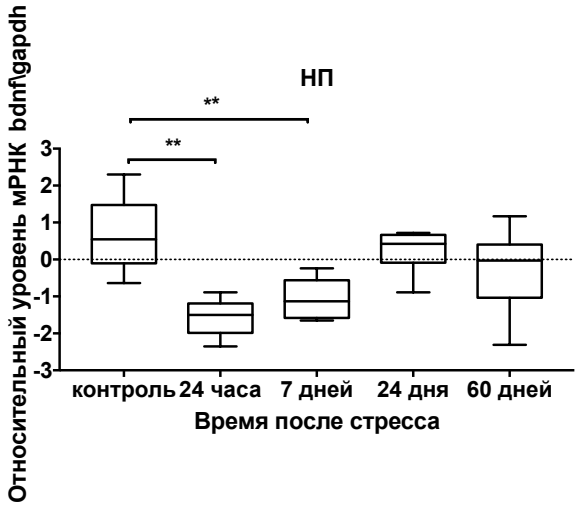

Рис. 8. Уровень мРНК гена *bdnf* в префронтальной коре крыс линии НП в разные сроки после длительного эмоционально-болевого стрессирования. *Обозначения и размер групп как на Рис. 5; **p<0,01 критерий Краскела-Уоллиса, критерий Манна-Уитни, поправка FDR.*

Значимые постстрессорное снижение уровня мРНК *bdnf* в гиппокампе отмечается у линии НП через 60 дней после стресса. Линия ВП значимых изменений экспрессии в гиппокампе данного трофического фактора не имеет ни в одной временной точке. В миндалине стресс значимо не влиял на уровень экспрессии *bdnf* у крыс обеих линий.

Таким образом, полученные нами результаты позволяют предположить, что генетически детерминированные особенности высоковозбудимых животных определяют ослабленные адаптационные возможности их нервной системы, а сниженный уровень мРНК нейротрофина BDNF в ответ на стресс можно

рассматривать в качестве одного из маркеров подобного ослабления.

Разнообразие микробиоты кишечника крыс на разных сроках после длительного эмоционально-болевого стрессирования

Сравнительный анализ индексов альфа разнообразия микробиоты в контрольных группах животных с контрастной возбудимостью нервной системы (Рис. 9), свидетельствует о значимо более низком значении обоих индексов у высоковозбудимых животных (линия НП) по сравнению с низковозбудимой линией ВП.

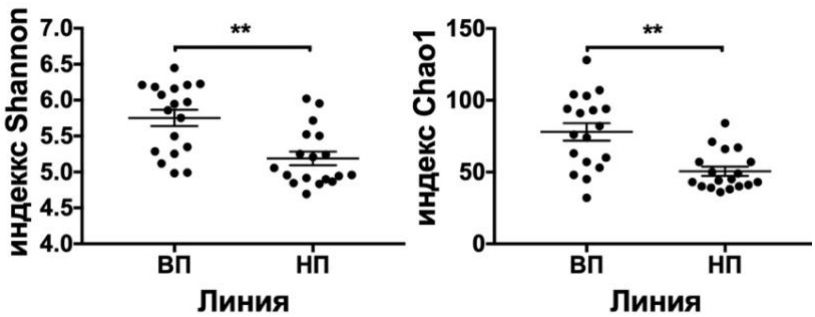

Рисунок 9. Сравнительный анализ индексов микробного разнообразия в стуле интактных животных линий ВП и НП. *n=18 в каждой группе, графики представляют среднее и SEM, **p<0,01, непарный t-тест.*

До стресса у крыс обеих линий представленность рода *Firmicutes* преобладает над всеми остальными. После стресса (на 7-й день) у животных линии ВП представители рода *Firmicutes (31%)* вытесняются бактериями рода *Bacteroidetes* (68%), но на том же сроке (7 дней после стресса) у животных линии НП *Firmicutes* по-прежнему преобладают над *Bacteroidetes.* Под действием длительного эмоционально-болевого стрессирования у низковозбудимых животных линии ВП возрастает доля микроорганизмов рода *Faecalibacterium* и рода *Prevotella*. Постстрессорное снижение представленности микроорганизмов рода *Lactobacillus* происходит у животных обеих линий.

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что микробиота кишечника линии ВП в норме более разнообразна и менее подвержена изменениям с течением времени, а под влиянием стрессора, изменения в составе микробиома более динамичные, чем у животных с высокой возбудимостью нервной системы (НП).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании выявлены специфичные для линий крыс с разной возбудимостью поведенческие эффекты стресса: у низковозбудимых животных (ВП) отсутствовали какие-либо постстрессорные поведенческие симптомы на протяжении большей части периода наблюдений. У высоковозбудимых животных линии НП наблюдаются выраженные поведенческие эффекты стресса уже через сутки после стресса.

Наряду с большей выраженностью поведенческих нарушений в ответ на стресс у высоковозбудимых животных линии НП наблюдается более выраженный провоспалительный постстрессорный ответ по сравнению с низковозбудимой линией ВП как в крови, так и в мозге.

Микробиота стула низковозбудимых животных (ВП) не подверженных стрессу характеризуется большим разнообразием по сравнению с высоковозбудимыми (НП) и под воздействием стресса, микробиота стула животных линии ВП, меняется более динамично по сравнению с линией НП.

На рисунке 10 обобщены результаты исследования. Можно предполагать, что исходно большее разнообразие микробиоты кишечника низковозбудимых животных линии ВП является одним из факторов, способных регулировать экспрессию генов провоспалительных цитокинов в крови, возможно, посредством выделения короткоцепочечных жирных кислот, ингибирующих гистондеацетилазы хозяина (HDACs), тем самым влияя на активацию транскрипции генов хозяина. Это позволяет сдерживать развитие постстрессорного нейровоспаления, что, по-видимому, обеспечивает большие адаптивные возможности низковозбудимым животным линии ВП, которые в ответ на стресс показывают менее выраженные тревожно-подобные симптомы по сравнению с высоковозбудимой линией НП.

Высоковозбудимая линия НП *Низковозбудимая линия ВП*

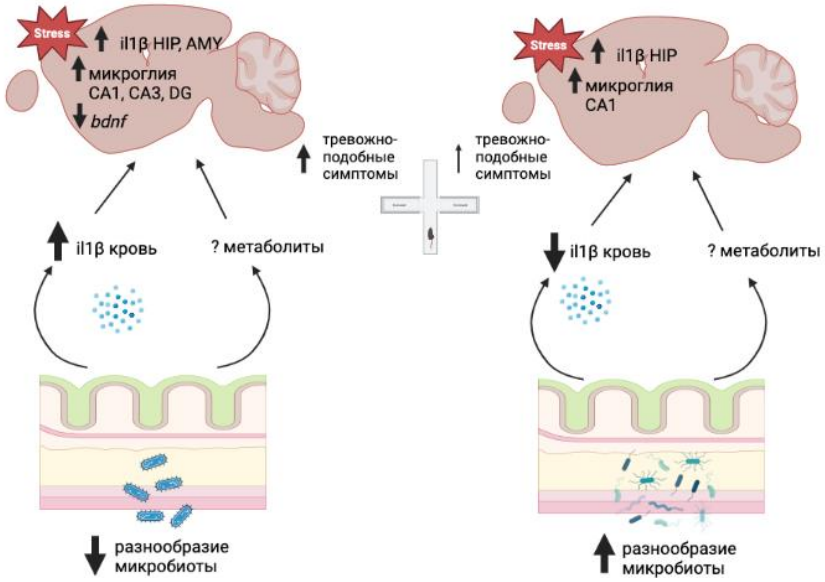

Рисунок 10. Возможные нейроиммунные механизмы различной устойчивости к стрессу у крыс с генетически детерминированным высоким и низким уровнем возбудимости нервной системы. *HIP – гиппокамп, AMY – миндалина, CA1,3, DG – соответствующие области гиппокампа.*

Для прояснения механизмов различной уязвимости к психоэмоциональному стрессу, проявляющейся в постстрессорных нарушениях поведения и развитии ряда признаков нейровоспаления у животных с генетически детерминированным контрастным уровнем возбудимости нервной системы необходимо исследование не только провоспалительных цитокинов, но и активности противовоспалительного звена иммунитета, не только на уровне экспрессии генов, но и на уровне содержания белка. Требуется провести транскриптомный анализ, который позволит пролить свет на дифференциальную экспрессию у животных с разной возбудимостью не только генов, связанных с нейровоспалением, но и других, важных для поддержания гомеостаза ЦНС. Зная о влиянии стресса на микробиоту кишечника как высоковозбудимых, так и низковозбудимых животных, и возможностях микроорганизмов-симбионтов модулировать функциональное состояние ЦНС, необходимо проверить, будут ли целенаправленные изменения состава микробного сообщества, либо содержания микробных метаболитов, оказывать антивоспалительное действие в нервной ткани и способно ли такое вмешательство нормализовать поведение животных.

Выводы

1. Длительное эмоционально-болевое стрессорное воздействие вызывает специфические долгосрочные тревожно-подобные поведенческие нарушения, ассоциированные с генетически детерминированным высоким и низким уровнем возбудимости нервной системы крыс.
2. Признаки постстрессорного нейровоспаления более выражены у высоковозбудимых крыс (линия НП) по сравнению с низковозбудимыми (линия ВП).
3. У высоковозбудимых крыс (линия НП) длительное эмоционально-болевое стрессирование не оказывает влияния на экспрессию генов провоспалительных цитокинов IL1β и TNF в крови, но приводит к сдвигу лейкоцитарной формулы, свидетельствующему о развитии воспаления.
4. У высоковозбудимых крыс линии НП длительное эмоционально-болевое стрессирование приводит к снижению уровня мРНК гена *bdnf* нейротрофического фактора BDNF в префронтальной коре через сутки после окончания стрессирования и такое снижение сохраняется на протяжении одной недели.
5. У низковозбудимых крыс линии ВП микробиота характеризуется большим разнообразием по сравнению с высоковозбудимыми (линия НП), и под действием длительного эмоционально-болевого стрессирования у них возрастает доля микроорганизмов рода *Faecalibacterium* и рода *Prevotella*. Постстрессорное снижение представленности микроорганизмов рода *Lactobacillus* происходит у животных обеих линий.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ СТАТЕЙ:

1. Тучина О.П., Сидорова М.В., Туркин А.В., Шалагинова И.Г., Ваколюк И.А. Молекулярные механизмы инициации и развития нейровоспаления в модели посттравматического стрессового расстройства // Гены и клетки. – 2018. – Т. 13., №2. - С. 47–55.

2. Шалагинова И.Г., Мацкова Л.В., Гуницева Н.М., Ваколюк И.А. Эпигенетический механизм влияния микробиоты кишечника на развитие постстрессорного нейровоспаления // Экологическая генетика. - 2019. - Т. 17., №4. - С. 91-102.

3. Шалагинова И.Г., Шеремет В.В., Хлебаева Д.А.А., Вайдо А.И., Дюжикова Н.А. Влияние длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия на лейкоцитарный состав крови крыс с различным уровнем возбудимости нервной системы // Медицинский академический журнал. - 2019. - Т. 19., № 4. - С. 67-74.

4. Shalaginova, I. G., Tuchina, O. P., Sidorova, M. V., Levina, A. S., Khlebaeva, D. A., Vaido, A. I., & Dyuzhikova, N. A. Effects of psychogenic stress on some peripheral and central inflammatory markers in rats with the different level of excitability of the nervous system // PloS one. – 2021. - Т. 16., №7. - e0255380.

5. Шалагинова И.Г., Зачепило Т.Г., Дюжикова Н.А. Влияние длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия на экспрессию гена *bdnf* в мозге крыс с контрастной возбудимостью нервной системы // Медицинский академический журнал. - 2023. - Т. 1., №1. – С. 5-12.

6. Шалагинова, И. Г., Тучина, О. П., Туркин, А. В., Вылегжанина, А. Э., Нагуманова, А. Н., Зачепило, Т. Г., Павлова, М. Б., Дюжикова, Н. А. Влияние длительного эмоционально-болевого стресса на экспрессию генов провоспалительных цитокинов у крыс с высокой и низкой возбудимостью нервной системы // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. - 2023. - Т. 109., №4. - С. 545–558.