Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук

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

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук Дюжикова Наталья Алековна

Санкт-Петербург 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 4

ВВЕДЕНИЕ 5

Актуальность исследования 5
Степень разработанности темы исследования 6
Цель работы 9
Методология и методы исследования 9
Научная новизна 11
Теоретическая и практическая значимость работы 12
Основные положения, выносимые на защиту 13
Апробация результатов 14
Личное участие автора в получении результатов 15
Структура и объем диссертации 15
Финансовая поддержка и благодарности 16

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 17

1.1. Механизмы нейроиммунных взаимодействий 17
1.2. Роль микроглиальных клеток в центральной нервной системе 19
1.3. Основные провоспалительные цитокины 26
1.3.1. Семейство интерлейкинов 1 (IL1) 26
1.3.2. Фактор некроза опухоли (TNF) 28
1.4. Механизмы развития постстрессорного воспаления 29
1.4.1. Влияние катехоламинов на иммунные клетки 30
1.4.2. Роль глюкокортикоидов в развитии нейровоспаления 32
1.4.3. Влияние иммунных дисфункций на нервную систему 37
1.4.4. Нейровоспаление в патогенезе связанных со стрессом психических расстройств 42
1.5. Роль микробиоты кишечника в генерации и поддержании постстрессорного нейровоспаления 49
1.5.1. Микробиота кишечника 49
1.5.2. Механизмы влияния микробиоты ЖКТ на развитие и функционирование мозга 51
1.5.3. Микробиота и постстрессорное воспаление 54
1.6. Генетически детерминированная возбудимость нервной системы как фактор риска развития постстрессорных патологий 56

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 61

2.1. Материал исследования 61
2.2. Метод длительного эмоционально-болевого стрессирования 62
2.3. Методы исследования поведения 63
2.4. Оценка динамики соотношения нейтрофилов и лимфоцитов в мазках крови 64
2.5. Иммуногистохимическое окрашивание 65
2.6. Метод ПЦР в реальном времени для оценки уровней мРНК провоспалительных цитокинов и гена bdnf 66
2.7. Секвенирование гена 16S рРНК для оценки микробного разнообразия 69
2.8. Статистический анализ 72

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ 73

3.1. Межлинейные различия в уровне возбудимости 73
3.2. Влияние длительного эмоционально-болевого стрессирования на поведение крыс с контрастной возбудимостью нервной системы в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт» 73
3.3. Характеристики воспаления у крыс с контрастной возбудимостью нервной системы в разные сроки после длительного эмоционально-болевого воздействия 79
3.3.1. Соотношение нейтрофилов и лимфоцитов у крыс с контрастной возбудимостью в разные сроки после длительного эмоционально-болевого воздействия 79
3.3.2. Число микроглиальных клеток в префронтальной коре и гиппокампе крыс с контрастной возбудимостью нервной системы в разные сроки после длительного эмоционально-болевого воздействия 81
3.3.3. Уровень мРНК провоспалительных цитокинов в мозге и крови крыс с контрастным уровнем возбудимости нервной системы в норме и на разных сроках после длительного эмоционально-болевого воздействия 85
3.3.4. Уровень мРНК гена bdnf в мозге крыс с контрастной возбудимостью нервной системы в норме и на разных сроках после длительного эмоционально-болевого стресса 92
3.4. Показатели разнообразия и представленность микроорганизмов в стуле крыс с контрастной возбудимостью нервной системы в норме и в разные сроки после длительного эмоционально-болевого стрессирования 103
3.4.1. Показатели разнообразия микробиоты у интактных крыс 103
3.4.2. Разнообразие микробиоты кишечника крыс на разных сроках после длительного эмоционально-болевого воздействия 104
3.4.3. Таксономическое разнообразие микробиоты стула крыс с контрастной возбудимостью нервной системы на уровне рода в норме и в разные сроки после длительного эмоционально-болевого воздействия 105

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 114

ВЫВОДЫ 122

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 123

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

5-НТ - серотонин
АКТГ - адренокортикотропный гормон гипофиза
ВП – линия крыс с низкой возбудимостью нервной системы (высокий порог)
ГАМК - гамма-аминомасляная кислота
ГГАКС - гипоталамо-гипофизарно-адрено-кортикальная система
ГК – глюкокортикоиды
ГР - рецепторы к глюкокортикоидам
ГР - рецепторы к глюкокортикоидам
ГЭБ – гемато-энцефалический барьер
ДЭБС - длительное эмоционально-болевое стрессирование
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
ИГХ – иммуногистохимия
КРГ - кортикотропин-рилизинг гормон
КЦЖК - короткоцепочечные жирные кислоты
ЛПС – липополисахарид
МР – минералокортикоидные рецепторы
НП – линия крыс с высокой возбудимостью нервной системы (низкий порог)
ОП – тест открытое поле
ПВЯ - паравентрикулярное ядро
ПКЛ – тест приподнятый крестообразный лабиринт
ПТСР - посттравматическое стрессовое расстройство
ПФК – префронтальная кора
ртПЦР – полимеразная цепная реакция в реальном времени
цАМФ - циклический аденозинмонофосфат
ЦНС - центральная нервная система
BDNF - нейротрофический фактор мозга (brain-derived neurotrophic factor)
CRP - С-реактивный белок (C-reactive protein)
DAMPs - сигналы, связанные с повреждением (Damage-associated molecular patterns)
GWAS - полногеномный поиск ассоциаций (genome-wide association studies)
HDACs - гистондеацетилазы (histone deacetylases)
Iba1 - ионизированная кальций-связывающая адапторная молекула 1 (Ionized calcium Binding Adapter molecule 1)
IDO - индоламин 2,3-диоксигеназа
IL1β - интерлейкин 1β (interleukin-1 β)
iNOS - индуцируемая NO-синтаза (inducible nitric oxide synthase)
LTP – долговременная потенциация (long-term potentiation)
PAMPs - сигналы, связанные с патогеном (Pathogen-associated molecular patterns)
TNF - фактор некроза опухоли (tumour necrosis factor)

ВВЕДЕНИЕ

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]. Ситуация осложняется тем, что 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. Эффективность фармакотерапии ограничена, около 1/3 пациентов не реагируют на применяемые препараты.

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 – это 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

С одной стороны, иммуносупрессивная роль стресса, в частности роль в инволюции тимуса и других лимфоидных органов, была показана уже в исследованиях Г. Селье [Selye, 1936]. С другой стороны, известно, что глюкокортикоиды (ГК) могут оказывать провоспалительное действие при определенных условиях, и их действие зависит 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]. Хронический стресс или повышенная циркуляция ГК оказывает провоспалительное действие и увеличивает экспрессию провоспалительных цитокинов интерлейкина 1β (interleukin-1 β, IL1β) и фактора некроза опухоли (tumour necrosis factor, TNF) в префронтальной коре

[Pablos de et al., 2006]. Длительный стресс повышает уровни TNF, IL1β и индуцируемой NO-синтазы (inducible nitric oxide synthase, iNOS) не только на уровне экспрессии генов, но и на уровне белка в гиппокампе и коре головного мозга грызунов [Dinkel, MacPherson, Sapolsky, 2003; Munhoz et al., 2006].

Показана возможная причастность постстрессорного нейровоспаления к развитию 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 и белков острой фазы [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.

Известно, что хроническое нейровоспаление может привести к активации нейродегенеративных процессов в мозге. Аномальные уровни нейротрофического фактора мозга (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) могут быть связаны с хроническим воспалительным состоянием мозга при определенных расстройствах, известно, что нейровоспаление влияет на несколько сигнальных путей, связанных с BDNF [Lima Giacobbo et al., 2019].

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. Например, было 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]. Стойкие изменения в кишечной микробиоте могут привести к увеличению выработки провоспалительных цитокинов, вызывая повышенную проницаемость кишечника [Konjevod et al., 2021]. Это может способствовать увеличению транзита липополисахаридов и нейроактивных бактериальных метаболитов в кровоток, которые в конечном итоге достигают мозга и вызывают нейровоспаление [Tinkov et al., 2021].

Известно, что стресс изменяет состав кишечной микробиоты, в частности, уменьшая относительную численность представителей родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* [Marin et al., 2017; Tsilimigras et al., 2018] у лабораторных животных и увеличивает количество бактерий родов *Odoribacter, Mucisprillum* [Jašarević et al., 2017] и *Clostridium* [Bailey et al., 2011]. Знание точных таксономических изменений микробного сообщества под воздействием стрессоров поможет оценить возможность использования соответствующих пробиотиков для коррекции нейровоспаления и лечения постстрессорных психических расстройств.

Цель работы

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 *bdnf* нейротрофического фактора BDNF в мозге.

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

Методология и методы исследования

В исследовании использовались 5-ти месячные самцы крыс двух линий с контрастной возбудимостью нервной системы. Данные линии – 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 при действии прямоугольных электрических импульсов длительностью 2мсек [Вайдо, Ситдиков, 1976]. Таким образом были получены линии крыс с контрастной возбудимостью нервной системы: линия ВП (высокий порог, низкая возбудимость) и НП (низкий порог,

высокая возбудимость). 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. Выбор данных модельных животных обусловлен тем, что они обладают контрастными значениями порога возбудимости нервной системы и могут быть использованы для изучения генетически детерминированных индивидуальных факторов риска развития постстрессорных патологий.

Экспериментальные животные подвергались психогенному длительному эмоционально-болевому стрессу (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.

Стрессированных животных и соответствующие контрольные группы декапитировали через 24 часа, через 7, 24 и 60 дней после воздействия стресса.

Влияние стресса на поведение оценивали в тестах «Открытое поле» (ОП) и «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ), изменения в поведении отслеживали в тех же 4х временных точках.

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 рутинным методом в мазке крови, окрашенном по Романовскому-Гимзе [Lindstrom и др., 2015].

Для оценки числа микроглиальных клеток в мозге крыс использовали метод иммуногистохимического окрашивания на микроглиальный маркер Iba1. Количество микроглиальных клеток оценивали в префронтальной коре и гиппокампе крыс. Выбор данных структур обусловлен тем, что они вовлечены в патогенез постстрессорных расстройств [Khan et al., 2020]. 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).

Для исследования уровней мРНК генов *il1β и tnf* животных декапитировали через 24 часа, 7, 24 и 60 дней после окончания длительного эмоционально-болевого стрессирования. Для изучения экспрессии целевых генов был использован метод количественной ПЦР в реальном времени (ртПЦР). Оценку изменений относительной экспрессии мРНК целевых генов у экспериментальных животных по сравнению с контролем проводили с помощью метода ΔΔCt.

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).

Статистическую обработку результатов производили в программах SPSS Statistics 21 и Prism 7. Для анализа нормальности распределения переменных использовался критерий Колмогорова–Смирнова или Шапиро-Уилка. В зависимости от задач использовали следующие критерии: Краскела-Уоллиса, U-тест Манна-Уитни и тест частоты ложных открытий (FDR), тест Уилкоксона (с поправкой FDR, тесты Фридмана и Уилкоксона, 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.

Научная новизна

В данной работе впервые на линиях крыс с контрастной возбудимостью нервной системы были изучены краткосрочные и долгосрочные эффекты хронического 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. 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 провоспалительного цитокина *il1β* по сравнению с контролем к 24му дню после окончания действия стрессора в гиппокампе и миндалине. Низковозбудимые животные 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 *bdnf* у животных с разной возбудимостью нервной системы. У высоковозбудимых крыс линии НП длительное эмоционально-болевое стрессирование приводит к снижению уровня мРНК *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 ЖКТ 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, 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 постстрессорного нейровоспаления и 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 ЖКТ крыс свидетельствуют в пользу того, что более высокие показатели микробного разнообразия обнаруживаются у животных с низким уровнем возбудимости, 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 стрессорного воздействия.

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:

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.

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. Участие автора в анализе литературы - 90%, все этапы экспериментов 90%, в статистической обработке результатов – 100%, подготовке статей и тезисов докладов – 90%, написании диссертации и автореферата –100%.

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 включает 210 источников.

Финансовая поддержка и благодарности

Автор выражает глубокую признательность и благодарность своему научному руководителю Дюжиковой Наталье Алековне за неоценимую помощь и наставничество на каждом из этапов работы, за передачу культуры проведения физиологических экспериментов и поддержание оптимистического настроя вне зависимости от количества сложностей, с которыми сталкивался автор в ходе работы.

Также хотелось бы поблагодарить сотрудников лаборатории генетики высшей нервной деятельности Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Зачепило Т.Г., Павлову М.Б., Левину А.С, Хлебаеву Д.А-А.). Неоценимый вклад внес Вайдо А.И., без чьих работ по селекции крыс с высоким и низким порогом возбудимости эти и многие другие эксперименты не были бы возможны. Кроме того, за помощь в освоении методов, использованных в исследовании, хотелось бы поблагодарить сотрудников лаборатории синтетической биологии БФУ им. И. Канта Тучину О.П., Сидорову М.В. и Туркина А.В. За реализацию части исследования, связанной с оценкой микробиоты кишечника крыс автор выражает признательность магистрантке ИЖС БФУ им. И. Канта Шевченко А. и аспиранту Кацерову Д.

Данная работа не была бы возможна без финансовой поддержки со стороны администрации БФУ им. И. Канта (в лице Демина М.В., Шушариной Н.Н.), а также директора Института живых систем БФУ им. И. Канта Бабич О.О.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Нормальное функционирование организма зависит от скоординированной работы многих систем органов. Взаимодействие нервной и иммунной систем изучается как в физиологическом состоянии, так и при различных патологиях. Нейроиммунные взаимодействия осуществляются посредством нейротрансмиттеров, нейропептидов, цитокинов. Иммунные клетки способны отвечать на сигналы нервных клеток благодаря наличию рецепторов к молекулам, производимым нейронами и, наоборот, нервные клетки экспрессируют рецепторы к сигналам иммунных клеток [Godinho-Silva, Cardoso, Veiga-Fernandes, 2019].

1.1. Механизмы нейроиммунных взаимодействий

Иммунный ответ может модулироваться периферическими нервами, в основном автономной нервной системы [ThyagaRajan, Priyanka, 2012]. Симпатический отдел автономной нервной системы с помощью катехоламинов регулирует функционирование, выживание, пролиферацию, циркуляцию и трафик иммунокомпетентных клеток [Godinho-Silva, Cardoso, Veiga-Fernandes, 2019]. Иммунные клетки экспрессируют адренорецепторы и через адренэргический сигналинг регулируют экспрессию рецепторов и цитокинов, необходимых для координации работы иммунной системы.

Невыясненным остается вопрос о том, какие лимфоидные органы иннервируются парасимпатическим отделом. Предполагают, что такая иннервация ограничена только лимфоидной тканью кишечника [Dantzer, 2018].

На системном уровне, нейротрансмиттеры и гормоны могут выделяться в кровеносное русло ЦНС в ответ на факторы среды, а выброс иммунными клетками цитокинов в системный кровоток может регулировать нейрональные функции [ThyagaRajan, Priyanka, 2012].

В конце XX века сформировалась модель так называемого «противовоспалительного рефлекса», афферентной дугой которого является выработка активированными тканевыми макрофагами провоспалительных

цитокинов, которые через симпатический блуждающий нерв достигают мозга. А эфферентная дуга представляет собой ответную активацию холинэргических эфферентов, снижающих выработку провоспалительных цитокинов иммунокомпетентными клетками [Tracey, 2002]. Современная модель противовоспалительного рефлекса включает активацию селезеночного нерва, который рекрутирует ацетилхолин-продуцирующие Т-клетки, которые и подавляют воспаление (Рис. 1) [Dantzer, 2018].

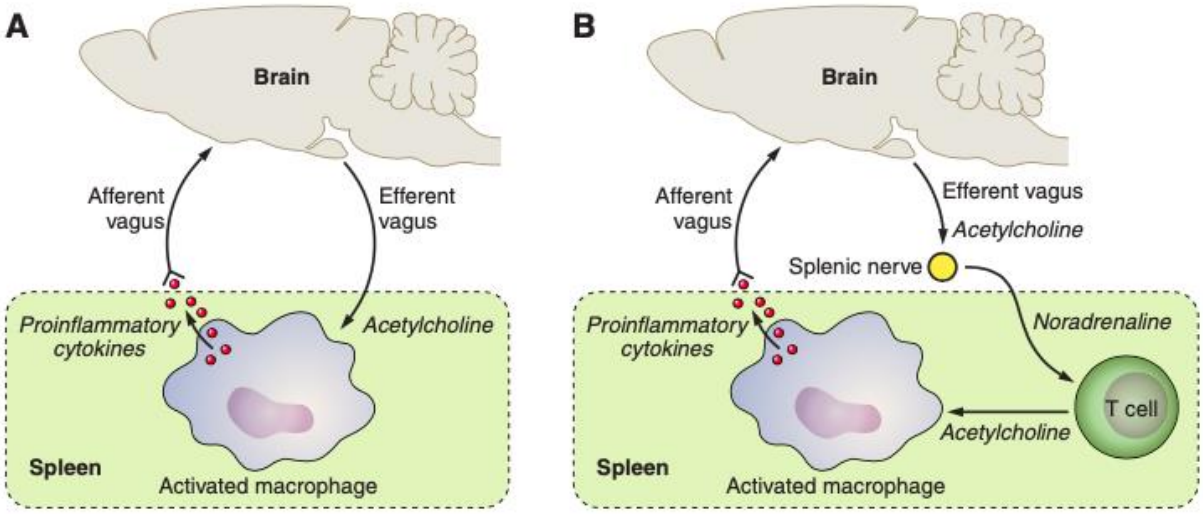

Рис.1. Модель противовоспалительного рефлекса. А: первоначальная модель; Б: современные представления [Dantzer, 2018].

Экспериментально показано, что электростимуляция вагусного нерва значительно снижает выработку TNF макрофагами селезенки и смертность животных в мышиной модели септического шока снижается [Borovikova et al., 2000]. Последующие эксперименты показали, что блуждающий нерв напрямую взаимодействует с симпатическими нейронами, иннервирующими селезенку в превертебральных узлах, включая чревные узлы [Murray, Reardon, 2018].

Нейроиммунные взаимодействия активно изучаются как на уровне взаимоотношений нейронов автономной нервной системы с иммунными клетками периферических тканей (жировая ткань, легкие, кишечник) так и на уровне иммунной регуляции гомеостаза в центральной нервной системе [Norris, Kipnis, 2019].

Уникальность мозга заключается в том, что его паренхима фактически не взаимодействует с периферической иммунной системой и защита ткани мозга в основном обеспечивается клетками микроглии. При этом в последние годы стало ясно, что менингеальные области мозга не «отрезаны» от циркуляции периферических иммунных клеток.

1.2. Роль микроглиальных клеток в центральной нервной системе

В общем виде функцию иммунной системы можно описать как поддержание гомеостаза и не только за счет борьбы с микроорганизмами, но и за счет ответа на «стерильные» повреждения, когда иммунокомпетентные клетки могут отвечать на сигналы, связанные с повреждением (DAMPs, Damage-associated molecular patterns) [Pradeu, Cooper, 2012].

Микроглия обеспечивает неспецифический иммунный ответ в мозге. Будучи тканевыми макрофагами, микроглиальные клетки имеют множество функций, включая поддержание нормальной нейрональной активности, быстрый ответ на повреждение тканей (DAMPs) и сигналы связанные с патогенами (PAMPs, Pathogen-associated molecular patterns), поглощение синапсов во время нормального развития нервной ткани [Norris, Kipnis, 2019].

Как и все прочие макрофаги, микроглиальные клетки происходят от миелоидных предшественников, которые мигрируют в мозг из кровяных островков желточного мешка во время раннего пренатального развития (E8) [DiSabato, Quan, Godbout, 2016]. Однако от других макрофагов микроглия отличается тем, что популяция микроглиальных клеток не пополняется макрофагами с периферии [Hoeffel, Ginhoux, 2015]. Микроглия появляется в мозге раньше чем астроциты и даже раньше, чем начинается нейрогенез кортикальных нейронов (12й день эмбрионального развития) [Miller, Gauthier, 2007]. Следующий факт позволяет оценить возможную значимость микроглиальных клеток для эмбрионального развития ЦНС: инвазия и колонизация мозга предшественниками микроглии практически совпадает с первой волной нейрогенеза и синаптогенеза и появляется

все больше данных свидетельствующих в пользу того, что клетки микроглии могут способствовать этим процессам [Savage, Carrier, Tremblay, 2019].

Одним из механизмов, который направляет миграцию микроглии в мозг считают IL-34 сигналинг, так как микроглиальные клетки имеют рецепторы к нему (M-CSF-R) и экспериментально показано, что блокада этих рецепторов или удаление его лиганда приводят к дефициту микроглии [Ulland, Wang, Colonna, 2015]. Так же на zebrafish было показано, что сигналом для инфильтрации микроглии в мозг во время развития является АТФ, появление которой в большом количестве сопровождает гибель нейральных клеток-предшественников, таким образом выделение АТФ может также быть сигналом для миграции микроглии [Casano, Albert, Peri, 2016].

В эволюционном происхождении микроглии остается много не выясненного, однако есть доказательства наличия врожденных макрофагов головного мозга у некоторых беспозвоночных: кольчатых червей, моллюсков и у некоторых членистоногих. Тем не менее не во всех простых нервных системах присутствуют клетки, похожие на микроглию.

В зрелом мозге в физиологических условиях микроглиальные клетки имеют небольшое тело и несколько длинных разветвленных отростков, которые обычно занимают гораздо большую площадь, чем сома [Jinno et al., 2007].

Существует ряд фенотипов микроглии, которые отличны от описанной выше. Ранее использовали термины «активация» или «гиперреактивность» микроглии, однако сегодня их можно считать устаревшими, поскольку известно, что микроглия представляет собой гетерогенную клеточную популяцию, морфология и функции клеток этой популяции меняются в зависимости от контекста [Ransohoff, 2016]. Более того, выявлены региональные различия в плотности и морфологии микроглии, особенно заметные между серым и белым веществом [Lawson et al., 1990].

В дополнение к этой региональной гетерогенности, морфология микроглии резко меняется с возрастом — микроглия в развивающейся ЦНС представлена гораздо больше амебоидным, фагоцитарным фенотипом по сравнению со зрелой

ЦНС, а различные микроглиальные дистрофии становятся более распространенными в стареющем мозге [Tay et al., 2017].

Разветвленная (Ramified) микроглия является наиболее распространенным фенотипом микроглии, описанным в физиологических условиях в зрелой ЦНС. Ранее они описывались как «покоящиеся» но, как теперь известно, они невероятно динамичны. Они постоянно вытягивают и втягивают тонкие, разветвленные отростки, когда сканируют свое непосредственное окружение, устанавливают временные контакты с телами нейронов, кровеносными сосудами и астроцитами [Savage, Carrier, Tremblay, 2019]. Такой фенотип микроглии выполняет нейропротекторную функцию, реагирует на аберрантное возбуждение нейронов в эксайтотоксических условиях.

Амебоидная микроглия морфологически очень похожа на другие макрофаги в остальных тканях. Это округлые клетки, с более крупными телами, чем обычно наблюдается в разветвленной микроглии, и кажутся лишенными отростков при исследовании с помощью световой микроскопии. Однако с помощью электронной микроскопии у них могут быть обнаружены тонкие филоподии. Микроглия у эмбриона и на ранних стадиях постнатального онтогенеза часто имеет амебоидную морфологию и, как предполагается, играет определенную роль в нормальном миелогенезе. В ответ на острые повреждения микроглия также может принимать такой фенотип [Savage, Carrier, Tremblay, 2019]. Фактически, микроглия может изменить морфологию с разветвленной на амебоидную в течение 30-60 мин в очаге повреждения или в месте введения АТФ в коре головного мозга взрослой мыши in vivo [Davalos et al., 2005].

Указанные функции разветвленной и амебоидной микроглии подтверждены транскриптомным анализом, разветвленный фенотип клеток, выделенных из мозолистого тела крысы экспрессирует в основном гены, связанные с созреванием нейронов и синаптической передачей, а амебоидный – гены, вовлеченные в регуляцию клеточного цикла, миграцию и фагоцитоз [Parakalan et al., 2012].

Гипертрофированная микроглия, которую в классической литературе часто

описывают как “активированную” или “гиперреактивную”, имеет больший чем другие фенотипы размер сомы, а также большее количество коротких и толстых отростков. Такие клетки обнаружены в мозге у людей с болезнью Альцгеймера, болезнью Гентингтона, в животных моделях инсульта, ускоренного старения, депрессии и черепно-мозговых травм [Tay et al., 2017]. Предполагают, что такой тип микроглии представляют собой «праймированные» каким-либо фактором клетки, которые проявляют повышенный ответ на провоспалительные стимулы [Savage, Carrier, Tremblay, 2019].

Палочковидные клетки принимают участие в удалении синапсов (прунинг), они имеют очень маленькие ядра и мало (или даже полное отсутствие) радиальных отростков. Они обычно соседствуют с нейронами, и в ответ на черепно-мозговую травму в мышиной модели они иногда образуют “поезда” из нескольких палочковидных клеток, лежащих вдоль одного аксона или дендрита. Количество этих клеток увеличивается с возрастом, они обнаруживаются в мозге пациентов с эпилепсией, энцефалитом и болезнью Альцгеймера, а также в мышиных моделях черепно-мозговой травмы и инсульта [Ziebell et al., 2012].

Дистрофические (стареющие) микроглиальные клетки характеризуются сферическими утолщениями их отростков, отложениями липофусцина и расширением эндоплазматического ретикулума. Дистрофическая микроглия была в изобилии выявлена в случае нормального старения (без выраженных когнитивных расстройств). Предполагается, что эти стареющие клетки по своим функциям находятся в прямой оппозиции к гипертрофированной микроглии, - проявляют сниженный ответ на провоспалительные сигналы [Savage, Carrier, Tremblay, 2019]. В большом количестве дистрофический фенотип обнаруживается около скоплений β-амилоидных бляшек в посмертных срезах мозга пациентов с болезнью Альцгеймера [Streit et al., 2009].

Повышенная плотность дистрофической микроглии, наблюдаемая при прогрессировании нейродегенеративных заболеваний, подтверждает гипотезу о том, что микроглия также подвергается дегенерации в процессе патологического

старения, теряя свои нейропротекторные или фагоцитарные функции [Savage, Carrier, Tremblay, 2019].

Сателлитная микроглия непосредственно соседствует с клеточными телами нейронов. Около 3% кортикальных нейронов имеют сателлитную микроглию, большинство из таких микроглиальных клеток располагаются около начального сегмента аксона (проксимальная часть аксона, прилегающая к аксонному холмику, является начальным сегментом).

Сателлитных клеток много у взрослых животных, и они гораздо чаще встречаются в коре, чем в подкорковых областях [Savage, Carrier, Tremblay, 2019].

Исследования показывают, что транскрипционная программа микроглии уникальна и отличается от транскриптома других тканеспецифичных макрофагов [Cronk et al., 2018]. При различных патологиях и в ходе старения меняется как транскрипционный профиль микроглии, так и ее поверхностные маркеры [Mrdjen et al., 2018].

Макрофаги, которые инфильтруются в мозг и происходят из периферических моноцитов имеют отличные от микроглии особенности: иную морфологию, более высокую скорость удлинения отростков в ответ на повреждение и уникальную транскрипционную программу как в физиологическом состоянии так и при нарушениях [Cronk et al., 2018].

Эпигенетический профиль микроглиальных прекурсоров вероятно тоже отличается от такового периферических моноцитов, однако этот вопрос еще мало изучен [Norris, Kipnis, 2019].

Выявлены специфические сигнальные молекулы (АТФ, калий, фракталкин) и рецепторы к ним, с помощью которых в норме микроглия тесно контактирует с нейронами.

Например, в ответ на острое повреждение «включается» ось АТФ-P2RY 12, однако она не связана с активностью микроглии в «надзорном» состоянии [Norris, Kipnis, 2019]. При этом такая базовая подвижность микроглии управляется калием и калиевыми каналами THIK-1, которые широко экспрессируются в микроглиальных клетках [Madry et al., 2018].

Центральная функция тканеспецифичных макрофагов – фагоцитоз, который в физиологическом состоянии активно идет во многих органах (легких, печени, селезенке, кишечнике) [Gordon, Plüddemann, 2017]. Фагоцитирующая функция так же типична для микроглиоцитов, особенно важной она является на ранних стадиях развития мозга, когда активно происходит регуляция числа нейронов и синаптических контактов [Norris, Kipnis, 2019].

Есть данные о фагоцитарной функции микроглии во взрослом мозге мыши в субвентрикулярной зоне гиппокампа и обонятельных луковицах. В этих областях идет нейрогенез во взрослом мозге и микроглиоциты поглощают нейрональные клетки-предшественники [Ribeiro Xavier et al., 2015].

Также микроглиальные клетки способны поглощать нейрональные отростки, например это показано во время развития зрительных сенсорных путей у мыши в критический период онтогенеза, когда в течение 30 постнатальных дней количество входов от сетчатки на таламические нейроны сокращается с 10 до 1-2 и это зависит от активности нейронов [Hooks, Chen, 2006]. Во взрослом мозге так же показано, что отсутствие активности отдельных нейронов приводит к тому, что микроглия фагоцитирует эти слабые пресинаптические входы, в то время как увеличение стимуляции нервных клеток снижает количество поглощенного микроглиоцитами материала [Schafer et al., 2012].

Однако микроглия не единственные фагоцитирующие клетки в развивающемся мозге, известно, что астроциты способны поглощать в 5-10 раз больше синаптического материала [Jung, Chung, 2018].

При нейродегенеративных патологиях хронические дистрофические изменения в нейронах провоцируют активацию микроглиальных клеток. В последующем это усиливает нарушение функций нейронов и может привести к их гибели. Система комплемента, которая во время развития имеет решающее значение для удаления нежелательных нейрональных соединений, также вносит определенный вклад в случае патологии. Показано, что в случае экспериментального повреждения зрительного нерва наблюдается усиление

фагоцитирующей функции микроглии, которая не зависит от активности нейронов, а связана с системой комплемента [Norris, Kipnis, 2019].

Определенная роль системы комплемента и иммунной активации также обсуждается в контексте шизофрении, поскольку полногеномный поиск ассоциаций (GWAS) указывает на главный комплекс гистосовместимости как регион с высоким генетическим риском для данной патологии [Ripke et al., 2014].

Интересны экспериментальные данные о том, что введение ингибиторов рецептора колониестимулирующего фактора 1 (CSF1R) приводит к исчезновению 99% микроглии во взрослом мозге мыши. При этом такой тотальный дефицит микроглии никак не влияет на когнитивную функцию [Elmore et al., 2014], что ставит вопрос о том, что если микроглия является таким ключевым игроком в поддержании гомеостаза ЦНС, то почему ее исчезновение не влияет на когнитивную функцию?

Предположительно, полное отсутствие микроглии на самом деле может быть гораздо меньшим гомеостатическим возмущением, чем глобальная или даже специфичная для региона микроглиальная трансформация в фенотипы, поддерживающие нейровоспаление. Это может быть связано с тем, что микроглия сама по себе является не причиной воспаления, а скорее «часовыми», настроенными на мониторинг и быстрое реагирование на гомеостатические возмущения со стороны нейронов и других глиальных клеток. Тогда, если нет стимулов, вызывающих воспаление, удаление микроглии будет доброкачественным [Norris, Kipnis, 2019].

Таким образом, негативные последствия наблюдаются только в том случае, если микроглия удаляется в период, когда в мозге есть какие-либо проявления нейрональной дисфункции или во время развития, когда микроглиоциты вовлечены в физиологический клиренс синапсов [Han, Harris, Zhang, 2017]. А в физиологическом состоянии во взрослом мозге микроглия выполняет скорее сторожевую функцию, обеспечивая готовность к действию в случае патологических процессов в нервной ткани и возможно не отвечает непосредственно за поддержание гомеостаза ЦНС.

1.3. Основные провоспалительные цитокины

Цитокины – это небольшие белки (<40 кДа), которые вырабатываются клетками для регуляции иммунного ответа [Takeuchi, Akira, 2010]. Высвобождение провоспалительных цитокинов приведет к активации иммунных клеток и к продукции, а также к высвобождению дополнительных цитокинов. Поэтому первоначально, когда возник термин «цитокиновый шторм», он описывал воспаление как внезапное высвобождение цитокинов, которые усиливают воспалительный процесс. Однако недавние исследования показывают, что при любом иммунном ответе происходит одновременное высвобождение про- и противовоспалительных цитокинов [Kany, Vollrath, Relja, 2019].

Разные клеточные популяции могут продуцировать один и тот же цитокин. Эффекты цитокинов зависят от клетки-мишени, что делает их плейотропными. Кроме того, различные цитокины могут оказывать одинаковое действие, то есть являются избыточными. Однако они могут также оказывать синергетический эффект.

В исследованиях нейровоспаления из всех провоспалительных цитокинов наиболее часто детектируются повышенные уровни интерлейкина 1 β (IL1β) и фактора некроза опухоли (TNF).

1.3.1. Семейство интерлейкинов 1 (IL1)

Интерлейкин-1α (IL-1α) и IL1β были первыми цитокинами, открытыми в 1974 году, и с тех пор являются одними из самых широко изучаемых. IL-1α и IL1β кодируются разными генами, но могут связываться с одним и тем же рецептором к IL-1 (IL-1R) [Dinarello, Goldin, Wolff, 1974].

В то время как IL-1α обладает более высоким сродством к IL1-R1, IL1β обладает более высоким сродством к растворимому IL-1R2. Оба интерлейкина транслируются как белок-предшественник массой 31 кДа и расщепляются на более мелкие формы массой 17 кДа, хотя и с разными аминокислотными последовательностями [Kany, Vollrath, Relja, 2019].

IL1R1 представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 80 кДа, связывание IL-1 с внеклеточным доменом IL1R1 способствует рекрутированию вспомогательного белка рецептора IL-1, что приводит к передаче сигнала, опосредованной цитоплазматическими доменами рецепторов IL1R1 и IL1R2. Рецептор IL-1 типа 2 (IL1R2) не способен инициировать передачу сигналов и действует только как рецептор-приманка [Vasilyev, Silkov, Sennikov, 2015].

Предшественник IL-1α обычно обнаруживается во внутриклеточном пространстве. Даже в случаях тяжелой инфекции во внеклеточном пространстве обнаруживаются относительно низкие концентрации. При таких стимулах, как окислительный стресс или воздействие цитокинов, например, других цитокинов семейства IL-1, экспрессия мРНК IL-1α увеличивается [McCarthy et al., 2013].

Первичными источниками IL1β являются гемопоэтические клетки, такие как моноциты, макрофаги, микроглия дендритные клетки при активации PAMPs или DAMPs.

В отличие от IL-1α, предшественник IL1β не является биологически активным, поскольку для его активации требуется протеолитическая стадия с помощью фермента, превращающего IL1β, например, каспазы-1 в составе мультипротеинового инфламмасомного комплекса.

Повышенное содержание IL1β в крови обнаружено у пациентов с различными воспалительными и аутоиммунными заболеваниями, инфекциями, раком и травмами. Кроме того, на крысах показано, что IL1β экспрессируется в головном мозге, особенно в гиппокампе и гипоталамусе [Lechan et al., 1990]. В головном мозге IL1β синтезируется и высвобождается главным образом микроглией и астроцитами [Savage, Carrier, Tremblay, 2019]. Исследования на животных показали, что физиологические уровни IL1β способствуют поддержанию долговременной потенциации (Long-term potentiation, LTP) и формированию памяти [Yirmiya, Winocur, Goshen, 2002], тогда как его высокие уровни могут воздействовать на нейроны гиппокампа, ингибируя синаптическое усиление и LTP [Katsuki et al., 1990].

Периферический IL1β, также может оказывать свое воздействие на мозг. Эти эффекты, вероятно, обусловлены двумя разными путями. Нервный путь представлен первичными афферентными нейронами, а гуморальный включает диффузию цитокинов из крови в мозг через циркумвентрикулярные органы и сосудистое сплетение [Konsman, Parnet, Dantzer, 2002].

1.3.2. Фактор некроза опухоли (TNF)

По неизвестным причинам TNF все еще упоминается как TNF-α в большинстве даже недавно опубликованных научных работ, хотя прошло уже 2 десятилетия как цитокин был переименован. В 1975 году Карсвелл и его коллеги выделили TNF из сыворотки крови человека и идентифицировали его как фактор, ответственный за некроз в различных опухолях у мышей. Выявление гомологии TNF и ранее открытого цитотоксического фактора лимфотоксина в 1985 году привела к переименованию TNF в TNF-α, а лимфотоксина в TNF-β. Однако в 1993 году был обнаружен близкий гомолог лимфотоксина - лимфотоксин-β. Впоследствии, в 1998 году название “TNF-β” было изменено на “лимфотоксин-α”. Одновременно “TNF-α” стал термином, значение которого ничем не отличается от первоначального термина “TNF”, который и был восстановлен в качестве официального названия цитокина [Grimstad, 2016]. Таком образом, в нашем исследовании мы будем пользоваться установленной номенклатурой – TNF.

TNF - это плейотропный цитокин, продуцируемый иммунными клетками, а также микроглией и астроцитами в виде предшественника размером 26 кДа, закрепленного на мембране. Такая форма называется трансмембранным TNF (tmTNF). После расщепления tmTNF ферментом металлопротеиназой образуется растворимая форма (solTNF) размером 17 кДа, которая высвобождается во внеклеточное пространство. Как растворимые, так и трансмембранные формы TNF опосредуют различные физиологические и патологические функции посредством активации рецепторов TNF 1-го и 2-го типов (TNFR1 и TNFR2) [Probert, 2015]. solTNF избирательно связывается и передает сигналы через TNFR1, в то время как

tmTNF может приводить как к активации TNFR1, так и TNFR2. Из-за их различного сродства к связыванию, клеточные процессы, активируемые двумя рецепторами, часто противоположны: TNFR1 в первую очередь опосредует апоптоз и хроническое воспаление, и наоборот, TNFR2 способствует выживанию клеток, разрешению воспаления, иммунитету и репарации. Позитивные или негативные эффекты зависят от активации сложных внутриклеточных сигнальных путей [Raffaele et al., 2020].

Несколько исследований показали, что TNF повышается в активированной микроглии на транскрипционном и трансляционном уровне [Hanisch, 2002], в частности, при воздействии цитокина интерферона гамма (IFN-γ), и он сам способен регулировать реакцию микроглии. Эксперименты in vitro показали, что TNF оказывает эффект на микроглию путем активации сигнального пути NF-κB, а также путем усиления экспрессии медиаторов воспаления и продукции цитокинов, включая интерлейкин -6 (IL-6), IL1β и молекулу межклеточной адгезии-1 (ICAM-1) [Kong et al., 2019]. Напротив, лечение ингибиторами TNF снижает активацию микроглии, индуцируемую липополисахаридами (ЛПС), и косвенно влияет на выработку цитокинов и хемокинов [McCoy et al., 2006].

1.4. Механизмы развития постстрессорного воспаления

Воспаление – это адаптивная реакция, которая вызывается повреждающими факторами, такими как инфекция или нарушения целостности тканей [Majno, Joris, 2004]. Сущностью периферического воспаления является реакция организма на местное повреждение, основной биологический смысл данного ответа – устранение повреждающего агента и запуск регенеративных процессов в тканях. Реакция развивается преимущественно локально – в очаге воспаления. Под системным воспалением понимают мультисиндромный патологический процесс, развивающийся при системном повреждении и характеризующийся тотальной воспалительной реактивностью эндотелиоцитов, плазменных и клеточных факторов крови, соединительной ткани, а на заключительных этапах и

микроциркуляторными расстройствами в жизненно важных органах и тканях [Гусев, Черешнев, 2012].

Нейровоспалением называют специфическую форму воспалительного процесса, характерного для ЦНС. В первую очередь его изучали как следствие различных повреждений головного мозга: травмы, токсические и инфекционные поражения, гипоксия [Kvichansky et al., 2019]. Последние исследования показывают, что некоторые признаки нейровоспаления можно наблюдать в физиологических условиях [Estes, McAllister, 2014].

Исследования модуляции иммунной системы психологическими факторами ведутся с 1920х годов с использованием модели Павловского условного рефлекса и к 1970м стало ясно, что психологические стрессоры способны вызывать иммуносупрессию [Ader, 1975]. В последующие десятилетия и до настоящего момента предпринимаются попытки выявить сигнальные пути, посредством которых нервная и иммунная системы взаимодействуют. В 1980е годы была установлена способность IL1β активировать гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему (ГГАКС) и индуцировать физиологические изменения у мышей [Besedovsky et al., 1986].

На сегодняшний день считают, что действия психологического стресса на иммунную систему опосредовано либо цитокинами, и\либо нейротрансмиттерами, которые выделяются нервными окончаниями в первичных или вторичных лимфоидных органах. Открытие способности иммунокомпетентных клеток мозга выделять нейроэндокринные факторы и нейромедиаторы сместила фокус нейробиологов к изучению реакции микроглиальных клеток на стрессоры [Dantzer, 2018].

1.4.1. Влияние катехоламинов на иммунные клетки

Клетки врожденного иммунитета экспрессируют β2, α1 и α2 подтипы адренорецепторов, в то время как клетки адаптивного иммунитета экспрессируют в основном β2 рецепторы.

Активация β2 рецепторов включает сигнальный каскад с участием циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), который активирует протеинкиназу А (ПКА) или другие протеины, активируемые цАМФ (так называемые EPACs). ПКА активирует цитоплазматические киназы и транскрипционные факторы (МАРК или CREB). EPACs передает сигналы через ГТФазы (Rap family of small Ras-like GTPases). Связывание лиганда с β2 рецептором также активирует β-аррестины, которые связаны со множеством сигнальных путей, включая NF-κB [Dantzer, 2018].

Стимуляция β2 обычно подавляет Т-клеточный иммунитет, хотя в литературе описаны и эффекты активации. Действие на CD4+ Т клетки норадреналином in vitro снижает выработку IL-2 в ответ на поликлональную активацию анти-CD3 моноклональными антителами [Ramer-Quinn et al., 2000]. Однако норадреналин также способствует дифференцировке CD4+ клеток в Th1 клетки, которые начинают вырабатывать больше интерферона-гамма, чем не обработанные норадреналином клетки [Swanson, Lee, Sanders, 2001].

В случае В-клеток, сигнальный путь, активируемый β2 адренорецепторами, включает ПКА-зависимый (протеинкиназа А зависимый), CREB-управляемый путь [Padro, 2014].

Макрофаги имеют не только β2-, но и α1-2 адренорецепторы, поэтому их ответ на действие адреналина более сложный. Продукция провоспалительных цитокинов подавляется при стимуляции β2 адренорецепторов, и усиливается при стимуляции рецепторов типа α1 и α2. В модели социального поражения на мышах показано, что активация β2 адренорецепторов приводит к трафику моноцитов в мозг, что вызывает длительную активацию микроглии и развитие тревожно-подобного поведения [Wohleb, Delpech, 2017]. В то же время, активация β2 адренорецепторов усиливает удержание лимфоцитов в лимфоидных органах через хемокиновые рецепторы, что, как показано на мышах, быстро приводит к развитию лимфопении [Nakai et al., 2014].

1.4.2. Роль глюкокортикоидов в развитии нейровоспаления

В исследованиях Г. Селье была показана иммуносупрессивная роль стресса, в частности инволюция тимуса и других лимфоидных органов [Selye, 1936]. Последующие работы доказали, что медиаторами этого эффекта стресса являются глюкокортикоиды [Dantzer, 2018].

Секреция глюкокортикоидов из фасцикулярной зоны коры надпочечников находится под контролем адренокортикотропного гормона гипофиза (АКТГ), синтез которого, в свою очередь, зависит от кортикотропин-рилизинг гормона (КРГ), выделяемого нейросекреторными клетками паравентрикулярного ядра (ПВЯ) в гипоталамусе. Физические стрессоры непосредственно активируют нейроны, синтезирующие КРГ через восходящие нейрональные проекции ствола головного мозга. Психологические стрессоры сначала обрабатываются в высших областях мозга для оценки, принятия решений и выбора стиля преодоления стрессора [Kloet, Meijer, 2019].

Глюкокортикоиды считаются типичными гормонами, которые вырабатываются и высвобождаются в общий кровоток корой надпочечников для воздействия на отдаленные органы - мишени. Поэтому открытие внепочечной продукции и высвобождения ГК, действующих локально в качестве паракринных или аутокринных коммуникационных сигналов, было неожиданным [Talabér, Jondal, Okret, 2013]. Самым первым органом, в котором был выявлен стероидогенез, был тимус. Это противоречило общепринятому мнению о том, что тимус является основной мишенью для глюкокортикоидов, вырабатываемых надпочечниками. У мыши тимус обычно реагирует на глюкокортикоиды массивным апоптозом тимоцитов и инволюцией. Однако все элементы, необходимые для местного производства и высвобождения кортикостерона, присутствуют в эпителиальных клетках тимуса мышей. Кроме того, совместное культивирование эпителиальных клеток тимуса с тимоцитами индуцировало апоптоз тимоцитов. Этот эффект был заблокирован антагонистом ГР, а также ингибиторами ферментов, участвующих в выработке кортикостерона.

Глюкокортикоиды тимуса локально не только регулируют развитие тимоцитов, но и образование Т-клеток и выход их на периферию. Эта функция глюкокортикоидов тимуса дополняет роль ГК надпочечников в регуляции сильных и системных иммунных реакций [Dantzer, 2018].

Синтез глюкокортикоидов также был обнаружен в эпителиальных клетках кишечника. Образующиеся здесь ГК играют как ингибирующую, так и стимулирующую роль в активации Т - клеток кишечника [Cima et al., 2004]. На основании наблюдения, что экспрессия стероидогенных генов снижается в толстой кишке пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, было высказано предположение, что местный синтез глюкокортикоидов важен для контроля воспаления в ЖКТ и иммунных реакций [Coste et al., 2007].

Рецепторы к глюкокортикоидам (ГР) обычно располагаются в цитозоле в форме протеинового комплекса с белками теплового шока и в отсутствии лиганда не способны связываться с ДНК. Связывание с глюкокортикоидными гормонами приводит к диссоциации комплекса, в результате ГР перемещается в ядро, где регулирует транскрипцию ряда генов. Показано, что противовоспалительный эффект связан с репрессией таких транскрипционных факторов как NF-kB, активирующий белок – 1, регуляторный фактор интерферона 3 [Vandevyver et al., 2013]. Подавление активности этих генов ингибирует экспрессию провоспалительных молекул.

Роль такого иммуносупрессивного действия глюкокортикоидов пытались объяснить через важность для организма экономить энергию в условиях стресса. Однако позже выяснили, что ингибирование иммунитета связано в данном случае с апоптозом иммунокомпетентных клеток, что никак нельзя назвать энергетически экономичным путем, так как запрограммированная клеточная смерть требует активного синтеза белка и клеточного ремоделирования [Sorrells, Sapolsky, 2007].

Однако глюкокортикоиды при определенных условиях могут оказывать провоспалительный эффект на периферии. Есть данные, свидетельствующие в пользу того, что их действие зависит от дозы, физиологические дозы глюкокортикоидов вызывают провоспалительный ответ (увеличивают продукцию

факторов, подавляющих миграцию макрофагов), в то время как высокие или фармакологические дозы – противовоспалительный эффект [Dantzer, 2018]. Биологический смысл такого противоположного действия разных доз гормонов стресса связывают с тем, что на поздних стадиях противовоспалительный ответ нужен для восстановления организма после активации иммунитета сразу после действия стрессора [Sorrells, Sapolsky, 2007].

И в мозге и на периферии существуют два типа рецепторов к кортикостероидам: минералокортикоидные (MP) и глюкокортикоидные рецепторы (ГР), при этом афинность к ГК выше у MP и оба типа рецепторов широко представлены в нейронах лимбической системы [Kloet De et al., 1998; Kloet, Meijer, 2019]. На базальном уровне все циркулирующие ГК связаны с MP, длительный и\или сильный стресс приводит к тому, что выделяется дополнительное количество гормонов и они начинают оккупировать ГР, таким образом, MP отвечают за большую часть эффектов базальных и низких уровней стресса (т. е. низкая концентрация ГК), в то время как ГР-сигналинг в значительной степени опосредует эффекты высоких уровней стресса (высокого уровня ГК).

Что касается негеномных действий, MP опосредует быстрое и преходящее увеличение миниатюрных возбуждающих постсинаптических токов (mEPSC) после введения кортикостерона. Предполагают, что мембранные MP локализованы пресинаптически и увеличивают вероятность высвобождения глутамата. Быстрые эффекты исчезают после делеции гена MP или с помощью антагонистов к этим рецепторам [Karst et al., 2005]. Однако мембранный MP—несмотря на большие усилия – еще не был физически продемонстрирован [Kloet, Meijer, 2019].

Эффект ГК в мозге и на периферии не одинаков. Показано, что действие ГК снижает количество циркулирующих лейкоцитов в крови и может индуцировать апоптоз [Yoshimura et al., 2001]. Однако более пристальный взгляд показывает, что пролиферация и выживаемость нейтрофилов, напротив усиливаются под действием ГК и что отмеченное снижение числа лейкоцитов может фактически отражать их экстравазацию в место повреждения, а не гибель клеток [Sorrells, Sapolsky, 2007]. Такое усиление миграции лейкоцитов из кровотока в ткани под

действием острого стресса может быть имитирована либо физиологической дозой кортикостерона, либо агонистом ГР (но не МР-агонистом), и блокируется адреналэктомией или ингибированием синтеза ГК [Dhabhar et al., 1996].

Хронический стресс не оказывает такого же влияния на перераспределение лейкоцитов и вместо этого уменьшает их общее количество [Dantzer, 2018].

Таким образом, ГК могут оказывать как про – так и противовоспалительное влияние на периферии. Их концентрация, время воздействия и состояние активации иммунной системы до стресса – имеет важное значение. В целом, усиление воспаления наблюдается при низких дозах ГК, остром воздействии и присутствии ГК до воспаления (прайминг). В то время как высокие дозы, хроническое воздействие и присутствие ГК после воспаления, как правило, оказывают противовоспалительное действие. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что ГК, сопровождающие стресс реакцию, играют сложную роль в организации оптимального и своевременного реагирования иммунной системы. Более поздние эффекты, связанные с хроническим действием стрессора, по-видимому, призваны обеспечить контроль над потенциально разрушительными последствиями чрезмерно активного иммунного ответа в острой фазе.

Противовоспалительное действие ГК в ЦНС было многократно продемонстрировано, однако есть исследования, показывающие, что в некоторых случаях ГК не оказывают противовоспалительного действия, а, напротив, усиливают воспаление [Sorrells, Sapolsky, 2007]. Известно, что ГК довольно эффективны для снижения цитотоксичности воспалительной реакции в головном мозге. Например, лечение дексаметазоном снижает iNOS-опосредованную токсичность микроглии [Golde et al., 2003]. Прямая инъекция ЛПС в префронтальную кору грызунов вызывает некротическую гибель клеток и сопровождается обширной воспалительной реакцией [Sorrells, Sapolsky, 2007], что обычно используется для моделирования неврологических расстройств, для которых нейровоспаление играет ведущую роль в патогенезе.

Обнаружено, что введение ГК в количестве, схожем с уровнем данных гормонов при остром стрессе, является необходимым и достаточным условием для уменьшения повреждений, вызванных прямой инфузией ЛПС в мозг [Nadeau, Rivest, 2003].

Таким образом, базальные уровни ГК и физиологическая реакция на острый стресс являются противовоспалительными и снижают воспалительную цитотоксичность.

Длительный или очень интенсивный стресс и, соответственно, высокие уровни ГК, по-видимому, усугубляют проявления воспаления на клеточном уровне. Хроническое введение кортикостерона в высоких дозах усиливает в гиппокампе животных воспаление, вызванное эксайтотоксичностью или ишемическим повреждением [Dinkel, MacPherson, Sapolsky, 2003].

В парадигме хронического непредсказуемого стресса (ХНС) животных подвергают воздействию разных стрессоров ежедневно, и крысы, подвергнутые ХНС после прямой инфузии ЛПС в префронтальную кору, демонстрируют заметное усиление гибели нейронов и астроглии. Такой эффект стресса отменяется блокированием ГР, что доказывает то, что ГР-сигнализация является критическим звеном задействованным в провоспалительном действии ХНС [Pablos de et al., 2006].

Эти результаты контрастируют с вышеупомянутым защитным антивоспалительным эффектом физиологического уровня ГК и низкого уровня стресса. Физиологические уровни ГК также снижают выработку провоспалительных цитокинов в мозге в различных моделях повреждений ЦНС [Sorrells, Sapolsky, 2007].

При этом хронический стресс или повышение циркуляции ГК в мозге оказывают провоспалительный эффект и на уровне сигнальных молекул. Так в отличие от описанного выше протекторного действия небольших доз ГК, стрессирование животных (ХНС) не подавляет повышенную экспрессию IL1β и TNF после инъекции ЛПС в префронтальную кору [Pablos de et al., 2006]. Так же есть данные о том, что ХНС увеличивает уровни белка TNF, IL1β и iNOS в

гиппокампе и коре головного мозга при периферическом введении ЛПС [Munhoz et al., 2006]. Аналогичным образом, высокие концентрации кортикостерона при стрессе усиливают вызванное эксайтотоксином повышение уровня IL1β и TNF (как мРНК так и белка, in vivo и in vitro) [Dinkel, MacPherson, Sapolsky, 2003].

Интересно, что зависимость провоспалительного эффекта от дозы ГК имеет вид перевернутой U-образной кривой, то есть промежуточные концентрации больше всего усиливают воспаление. Таким образом, умеренные уровни стресса даже более «провоспалительны», чем высокие, по крайней мере в отношении усиления экспрессии TNF и iNOS in vitro и in vivo [Munhoz et al., 2006].

Таким образом, на периферии базальные концентрации ГК и концентрации в диапазоне умеренного стресса оказывают провоспалительное действие, в то время как высокие уровни стресса и ГК являются противовоспалительными. В ЦНС хронический стресс и высокие уровни ГК не всегда обладают противовоспалительным эффектом и могут усиливать воспаление; это выражается как на клеточном уровне (активация микроглии, астроцитов), так и на уровне воспалительных мессенджеров и активации факторов транскрипции. При повреждениях мозга провоспалительными являются высокие уровни стресса и\или ГК, в то время как базальные или низкие уровни стресса оказывают традиционное противовоспалительное действие; это противоположно тому, что наблюдается на периферии.

1.4.3. Влияние иммунных дисфункций на нервную систему

Для обнаружения влияния иммунной системы на ЦНС потребовалось больше времени, чем на выявление нейроэндокринных влияний на иммунную систему. Причина в том, что молекулярная природа иммунных сигналов (цитокинов) не была понятна до 1980 - х годов, и эти молекулы были недоступны для физиологических исследований.

Как обсуждалось выше, цитокины – это сигнальные белки, секретируемые в основном клетками иммунной системы, включая моноциты, макрофаги (например,

клетки Купфера, микроглия), лимфоциты (B- и T-клетки) и эндотелиальные клетки сосудов, которые сигнализируют об обнаружении патогенов и активируют клеточные каскады для инициации соответствующих иммунологических реакций. В нервной ткани, цитокины также секретируются астроцитами и в некотором количестве нейронами.

Выявлена последовательность событий, приводящих к выработке воспалительных цитокинов клетками врожденного иммунитета в ответ на патогенные микроорганизмы. Специализированные мембранные Toll-подобные рецепторы моноцитов/макрофагов распознают специфические молекулярные сигналы патогенов - PAMPs. Активация Toll-подобных рецепторов с помощью PAMPs и DAMPs, которые высвобождаются поврежденными клетками хозяина, запускает сигнальный каскад, который завершается синтезом и высвобождением провоспалительных цитокинов [Dantzer, 2018]. ЛПС, например, активирует Toll-подобный рецептор-4 (TLR4) на моноцитах и макрофагах. Активация TLR4 активирует два пути, MyD88-зависимый путь и независимый от MyD88. MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) рекрутирует киназы, ассоциированные с рецептором IL-1, и молекулы-адаптеры, ассоциированные с рецептором TNF, которые приводят к активации как протеинкиназ, p38, а также ядерного фактора транскрипции - kappaB (NF-kB). Протеинкиназы активируют транскрипционный фактор cAMP response element-binding protein (CREB) и активаторный белок 1 (AP1). CREB, AP1 и NF-kB важны для синтеза провоспалительных цитокинов. Независимый от MyD88 путь рекрутирует молекулы, ассоциированные с рецептором TNF и индуцирует передачу сигналов интерферон-регуляторного фактора (IRF3), приводящую к экспрессии интерферонов типа I и генов, индуцируемых интерфероном [O'Neill, Golenbock, Bowie, 2013].

Изменения в поведении, которые развиваются у животных, которым вводят ЛПС или цитокины, повторяют те, которые наблюдаются у больных людей. Интенсивность и продолжительность болезненного поведения измеряют по снижению исследовательского поведения [Kent et al., 1992]. Более сложные

поведенческие параметры включают снижение мотивации в задачах вознаграждения, нарушение когнитивных способностей в задачах, основанных на распознавании нового объекта, приобретении контекстно-зависимой реакции, обусловленной страхом, и пространственной памяти [Czerniawski et al., 2014].

Воспалительные сигналы, которые опосредуют поведение при лихорадке, передаются в мозг нервными афферентами, которые иннервируют участок тела, в котором происходит воспалительная реакция. Когда ЛПС вводят в перитонеальную полость, блуждающий нерв является преобладающим нервным путем, как показано в экспериментах по ваготомии [Bluthe et al., 1996]. Кроме того, макрофагоподобные клетки активируются в окружающих тканях за счет циркуляции PAMPS и DAMPS. Активация макрофагов приводит к выбросу цитокинов, которые диффундируют в нервную систему через повреждения в гемато-энцефалическом барьере (ГЭБ), активно рекрутируя макрофаги и микроглию [Dantzer, 2018].

Кроме того, известно, что лейкоциты способны перемещаться через неповрежденный ГЭБ во время периферического воспаления. Считается, что это происходит за счет активации церебрального эндотелия в присутствии провоспалительных сигналов. Эндотелиальные клетки экспрессируют факторы адгезии, которые имеют решающее значение для рекрутирования моноцитов в мозг. Есть данные, что TNF может иметь решающее значение в стимулировании лейкоцитарно–эндотелиальных взаимодействий посредством микроглиальной экспрессии белка-хемоаттрактанта [Galic, Riazi, Pittman, 2012].

Таким образом, периферическое воспаление проецируется в ЦНС, а последствия этого процесса зависят от интенсивности последующего нейровоспаления и того, какие структуры оно затрагивает.

Конкретные области мозга, которые опосредуют поведение при болезни, было трудно определить. Для этого есть несколько причин, начиная с диффузного характера активации микроглии в головном мозге в ответ на системное воспаление, о чем свидетельствует позитронно - эмиссионная томография с лигандами белка TSPO у обезьян и людей, которым вводили эндотоксин [Hannestad et al., 2012;

Sandiego et al., 2015]. TSPO экспрессируется на внешней митохондриальной мембране микроглии и заметно повышается в ответ на воспаление. Его уровень экспрессии в норме у микроглии обычно низкий, но быстро возрастает в случае воспаления. Это объясняет, почему визуализирующая экспрессия TSPO используется в качестве маркера нейровоспаления, несмотря на многие ограничения доступных в настоящее время радиотрейсеров TSPO [Dantzer, 2018].

Цитокины экспрессируются в мозге не только в ответ на периферические иммунные стимулы (блуждающий нерв, попадание провоспалительных сигналов от активированных макрофагов через регионы мозга, где проницаем ГЭБ), но также они присутствуют в мозге конститутивно. Хотя уровень такой экспрессии невысок, известно, что она играет важную роль в синаптческой пластичности. В качестве примера можно привести участие TNF, выделяемого глиальными клетками в регуляции экспрессии AMPA-рецепторов в гиппокампальных нейронах. В культуре и на срезах гиппокампа показано, что TNF увеличивает количество AMPA-рецепторов на синаптической мембране [Beattie et al., 2002] . Естественно такое увеличение рецепторов к глутамату приводит к быстрым изменениям возбудимости и синаптической пластичности. Другие провоспалительные цитокины не показали похожего эффекта [Stellwagen et al., 2005]. Интересно, что TNF также приводит к усилению эндоцитоза ГАМКа рецепторов, что приводит к снижению ингибиторных сигналов. Описанные выше эффекты TNF справедливы для гиппокампа и корковых пирамидальных нейронов и мотонейронов. Нейроны стриатума напротив, показывают интернализацию AMPA-рецепторов и снижение силы кортико-стриальной синаптической связи в ГАМКэргических нейронах дорсолатерального стриатума [Lewitus et al., 2014].

TNF действует не только на нейроны, но и на астроциты. Конститутивный TNF способен контролировать выброс глутамата астроцитами: TNF или TNF-рецептор нокаутные мыши демонстрируют неспособность астроцитов выбрасывать глутамат в ответ на активацию АТФ P2Y1 рецепторов. В результате нарушается процесс глиотрансмиссии: недостаток астроцит-зависимой активации

пресинаптических NMDA-рецепторов снижает и синаптическую передачу и силу связи на уровне глутаматэргических синапсов [Dantzer, 2018].

Особый интерес в рамках нашей работы представляет роль цитокинов в патологической возбудимости нервной системы. В настоящее время имеются неопровержимые доказательства того, что эпилепсия связана с воспалением и повышенным уровнем цитокинов. Практически все провоспалительные цитокины повышены в тканях или спинномозговой жидкости у пациентов с хроническими судорожными расстройствами. Например, некоторые виды медикаментозно трудноизлечимой эпилепсии, возникающие в результате фокальных пороков развития коры головного мозга, связаны как с повышенной экспрессией генов, так и с повышенным уровнем провоспалительных цитокинов в ЦНС [Aronica, Crino, 2011]. Более того, в образцах хирургических тканей пациентов с эпилепсией височной доли, у которых имеются патологические признаки склероза гиппокампа (состояние глиоза и потери нейронов), обнаружена активация микроглии и увеличение цитокинов [Ravizza et al., 2008].

Экспериментальные исследования на грызунах также показали сильную связь между повышенным уровнем цитокинов в ЦНС или повышенной экспрессией мРНК цитокинов и высокой склонностью к припадкам. Судороги у крыс, вызванные конвульсантами сопровождаются повышением уровня цитокинов в ЦНС и/или экспрессии их генов [Galic, Riazi, Pittman, 2012].

Однако данные о том, что экспрессия цитокинов и их рецепторов увеличивается в связи с судорожной активностью, не обязательно свидетельствуют о том, что они вносят вклад в инициацию или усиление повышенной возбудимости ЦНС. Однако есть исследования, которые показали, что цитокины уже повышены к моменту начала приступов [Vezzani et al., 2011]. Прямые доказательства были получены на трансгенных животных, в нервной системе которых чрезмерно экспрессируются цитокины. У таких мышей наблюдались припадки в отсутствие токсинов [Campbell et al., 1998].

Таким образом, хотя прямое воздействие экзогенных цитокинов на мозг in vivo обычно не вызывает судорожной активности, оно, как правило, облегчает развитие припадка при других нарушениях. Аналогичным образом, периферическое воспаление и нейровоспаление также усиливает судороги или снижает порог возбудимости [Galic, Riazi, Pittman, 2012]. Что еще более важно, блокада действия цитокинов в головном мозге, например, при экзогенном применении IL-1ra (естественного антагониста IL1β) или путем усиления его эндогенной экспрессии, препятствует судорогам или уменьшает их тяжесть [Rodgers et al., 2009].

1.4.4. Нейровоспаление в патогенезе связанных со стрессом психических расстройств

Из-за двунаправленной связи между мозгом и иммунной системой и зависимости каждой из этих систем от сходных сигнальных молекул, любое изменение в одной из систем может повлиять на функционирование другой. Одна из современных гипотез в отношении механизмов патогенеза многих психических расстройств – гипотеза «стресс-диатез» [Baharikhoob, Kolla, 2020], которая рассматривает генетическую уязвимость к психопатологии как «диатез», который в сочетании с действием стрессоров может приводить к манифестации таких патологий как депрессия, тревожные расстройства, ПТСР. Таким образом, в данной модели термин «диатез» является синонимом уязвимости, которая делает более или менее вероятным то, что индивид поддастся развитию психопатологии, если столкнется с определенным стрессом [Sigelman, Rider, 2011]. Подразумевается, что диатезы включают генетические, биологические, физиологические, когнитивные и личностные факторы.

Нейровоспаление - один из возможных путей, посредством которых стресс может приводить к структурным и функциональным нарушениям в нервной ткани, что в свою очередь провоцирует появление поведенческих нарушений как у человека, так и у животных.

Так вклад постстрессорного нейровоспаления активно изучается в связи с депрессией. Учитывая, что антидепрессанты – это лекарства, которые увеличивают

синаптическую доступность серотонина и других моноаминов в ЦНС, депрессию обычно рассматривают как результат дефицита этих нейромедиаторных систем. Однако моноаминергическая теория депрессии не может объяснить все особенности депрессии и реакции на лекарства. Современная нейробиология депрессии подчеркивает роль нейротрофических факторов и синаптической пластичности, считая депрессию результатом долгосрочных изменений силы синаптической связи в областях мозга, которые регулируют настроение, при этом нейротрофический фактор мозга (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) является ключевой мишенью эффекта антидепрессантов [Dantzer, 2018].

При депрессии выявлены признаки активации моноцитарного и лимфоцитарного звеньев клеточного иммунитета, что выражается в увеличении количества лейкоцитов, моноцитов и нейтрофилов в периферической крови и повышением циркулирующих уровней воспалительных цитокинов и белков острой фазы [Toben, Baune, 2018].

Исследование причинно-следственной связи воспаления и депрессии активно изучается. Эпидемиологические исследования подтвердили, что взрослые с высоким уровнем циркулирующего IL6 имеют более высокую вероятность развития тяжелого депрессивного расстройства в течение 11-16 лет [Kivimäki et al., 2014]. То же самое было показано для детей в возрасте 9 лет при обследовании на наличие психических расстройств в возрасте 18 лет [Khandaker et al., 2014]. Исследования на животных так же подтверждают наличие такой связи, поскольку поведенческие изменения, которые развиваются у грызунов, которым вводят ЛПС, напоминают ангедонию и сниженную чувствительность к вознаграждению, характерные для депрессии. В частности, у крыс, которым вводили ЛПС, наблюдалось снижение предпочтения в еде, уменьшение потребления сахарина и подавление сексуального поведения. Все эти реакции были смягчены хроническим, но не острым лечением имипрамином, типичным антидепрессантом [Yirmiya, 1996].

Индоламин 2,3-диоксигеназа (IDO) является первым и лимитирующим скорость ферментом катаболизма триптофана по кинурениновому пути.

Экспрессия IDO индуцируется интерфероном-гамма. Триптофан необходим для выживания патогенов, а активность фермента IDO разрушает их.

Интенсивность симптомов депрессии коррелирует с признаками активации фермента IDO [Capuron et al., 2002]. Причинное участие этого метаболического пути в патогенезе депрессии, вызванной воспалением, было подтверждено у мышей, которым вводили LPS в дозе, активирующей IDO. У этих мышей развилось депрессивное поведение, характеризующееся повышенной неподвижностью в тесте на принудительное плавание и в тесте подвешивания за хвост, а также снижением предпочтения сахарозы. Фармакологическая или генетическая блокада активации IDO приводила к исчезновению депрессивного поведения у мышей, получавших ЛПС [O'Connor et al., 2009].

Первоначальная гипотеза для объяснения роли IDO в вызванной воспалением депрессии заключалась в том, что его активация снижает биодоступность триптофана для синтеза нейротрансмиттера серотонина головного мозга. Эта гипотеза имела преимущество, поскольку соответствовала моноаминергической теории депрессии. Однако детальный анализ уровней метаболитов триптофана в крови и спинномозговой жидкости пациентов, получавших интерферон-альфа, показал, что триптофан снижался только в крови, но не в спинномозговой жидкости, тогда как кинуренин и его метаболиты увеличивались в обоих локализациях [Raison et al., 2010]. Эти результаты означают, что мозг может компенсировать снижение уровня периферического триптофана, вероятно, увеличивая его транспорт в мозг [Dantzer, 2018].

Кинуренин в головном мозге далее метаболизируется в нейротоксичные метаболиты иммуноиндуцируемым ферментом кинуренинмонооксигеназой, который присутствует в микроглии. Одним из таких нейротоксичных метаболитов кинуренина является хинолиновая кислота, агонист NMDA-рецептора. При активации в ответ на иммунную стимуляцию микроглия также экстрасинаптически высвобождает глутамат. Кроме того, астроциты, которые обычно поглощают глутамат для его рециркуляции через цикл глутамат - глутамин, в условиях воспаления становятся гораздо менее эффективными. Конечным результатом

является выброс глутамата в экстрасинаптическое пространство, который в сочетании с хинолиновой кислотой активирует экстрасинаптический NMDA-рецептор. Это объясняет, почему блокада NMDA-рецепторов кетамином способна отменить депрессивное поведение, вызванное ЛПС у мышей. Важно отметить, что существование подобного глутаматергического пути не исключает роли серотонина в депрессии, вызванной воспалением [Dantzer, 2018].

Независимо от этого пути медиаторы воспаления, высвобождаемые микроглией и эндотелиальными клетками головного мозга, также могут подавлять дофаминергическую нейротрансмиссию посредством окислительного стресса и митохондриальной дисфункции (Рис. 2).

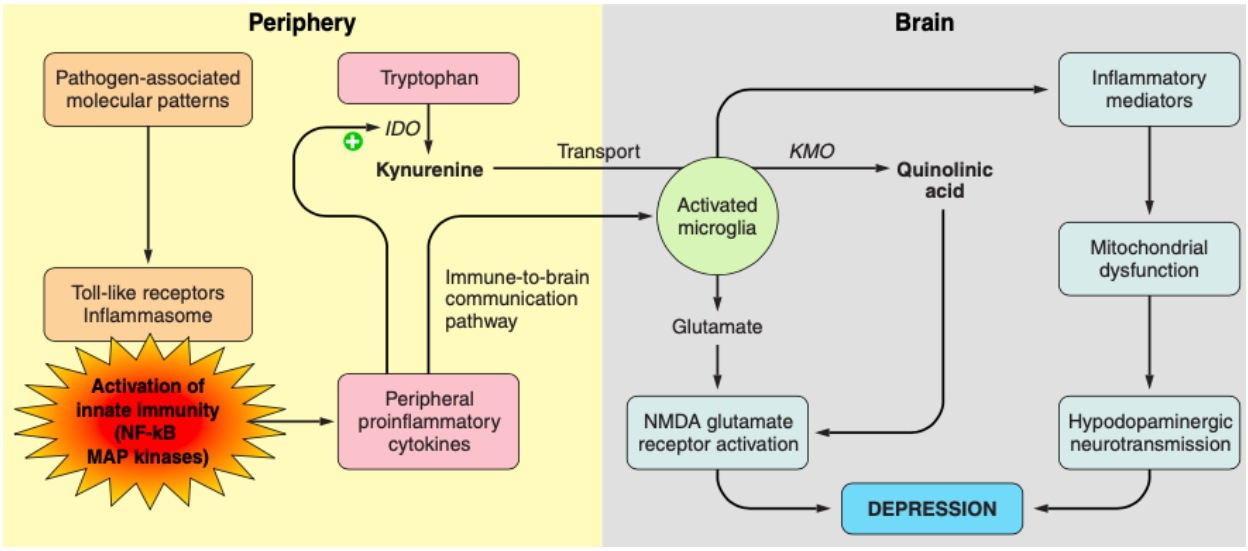

Рис. 2. Механизм депрессии, индуцированной воспалением [Dantzer, 2018].

Вопрос, который все еще нуждается в исследовании, заключается в том, как описанные выше нейроиммунные взаимодействия могут быть активированы в мозге при отсутствии явного воспаления, каковы факторы риска. На клиническом уровне имеются доказательства того, что даже относительно незначительные стрессоры, такие как социальный стресс может привести к увеличению производства IL6 [Rohleder, Aringer, Boentert, 2012]. Такое же повышение уровня циркулирующего IL6 наблюдается у лиц, подвергающихся хроническому стрессу. Вопрос о том, происходит ли этот IL6 из иммунных или неиммунных источников

также пока открыт. Интересно, что вызванное стрессом повышение уровня IL6 выше у испытуемых, испытавших стресс в раннем возрасте [Carpenter et al., 2010]. Тот факт, что эти состояния связаны с не очень тяжелым, но хроническим воспалением и активацией сигнальных путей, связывающих иммунитет с мозгом [Nusslock, Miller, 2016], делает весьма вероятным, что вызванный психосоциальным стрессом IL6 высвобождается активированными врожденными иммунными клетками, возможно, через β2-адренергическую сигнализацию [Dantzer, 2018].

Большинство исследований на животных, в которых рассматривается вопрос о том, как неиммунные стрессоры могут активировать врожденную иммунную систему, используют парадигму социального поражения, в которой постоянный самец мыши подвергается нападениям и поражению со стороны агрессора, другого самца мыши. Социальное поражение повторяется ежедневно в течение нескольких дней, и в некоторых из этих экспериментов мышь содержат в одной клетке со своим агрессором после того, как ее атаковали, хотя она защищена от дальнейших атак прозрачной перегородкой, разделяющей клетку на два отсека. Мыши, подвергшиеся повторному социальному поражению, демонстрируют социальное избегание при тестировании с незнакомым самцом и сниженную двигательную активность в поведенческих тестах. Несмотря на то, что эти симптомы больше напоминают тревогу, чем депрессию, эти изменения в поведении устраняются хроническим, но не острым лечением антидепрессантами [Golden et al., 2011]. Кроме того, они ассоциированы со сниженной синаптической пластичностью, ремоделированием хроматина и активацией транскрипции, которые также регулируются антидепрессантами. Эпизоды поражения, являясь стрессором, приводят к интенсивной активации ГГАКС и симпатической нервной системы. Такие стрессированные грызуны демонстрируют повышенное количество миелоидных клеток в кровеносном русле. Известно, что высвобождение миелоидных клеток опосредуется активацией β2-адренергических рецепторов. Так же показано, что миелоидные клетки рекрутируются в мозг хемокинзависимым образом [Wohleb et al., 2013]. Это приводит к активации резидентных клеток

микроглии и локальной продукции воспалительных цитокинов, которые отрицательно влияют на синаптическую пластичность [Wohleb et al., 2016].

Существуют индивидуальные различия в реакции на социальное поражение. Примерно у двух третей мышей развивается восприимчивый поведенческий фенотип, в то время как другие устойчивы. Животных можно охарактеризовать как восприимчивых или устойчивых на основании их цитокиновой реакции на первый эпизод социального поражения: те, у кого был более высокий уровень циркулирующего IL6, демонстрировали большую уязвимость, чем те, у кого был более низкий уровень IL6 [Hodes et al., 2014]. Это повышение уровня циркулирующего IL6 было обусловлено более высоким количеством циркулирующих лейкоцитов и повышенной реактивностью на стимуляцию ЛПС.

Тревожные расстройства также часто ассоциируются с хроническим стрессом. Данные о наличии признаков воспаления у пациентов с тревожными расстройствами противоречивы, наиболее вероятная причина противоречий – вариабельность методик оценки, разные подходы к формированию выборок. Тем не менее, большинство доказательств свидетельствуют в пользу того, что патологическая тревога может быть связана с усилением воспаления [Michopoulos et al., 2017].

В исследовании большой когорты людей с диагнозом паническое расстройство, агорафобия и генерализованное тревожное расстройство обнаружено увеличение уровня С-реактивного белка (C-reactive protein, CRP), который повышается в ответ на секрецию IL-6 [Vogelzangs et al., 2013]. Также было выявлено снижение интерлейкина 4 (interleukin 4, IL-4), который обладает противовоспалительным эффектом [Vieira et al., 2010]. Уровень TNF также повышен у пациентов с генерализованным тревожным расстройством и наблюдаются изменения в экспрессии других генов, связанных с иммунитетом [Wingo, Gibson, 2015]. В различных исследованиях сообщалось, что провоспалительные цитокины, включая IL1β, IL6 и TNF повышаются у пациентов с паническим расстройством [Hoge et al., 2009].

Есть убедительные данные в отношении наличия признаков нейровоспаления при ПТСР у человека и в животных моделях данного расстройства (мыши, крысы). В большинстве исследований оценивают уровни провоспалительных цитокинов в крови пациентов с ПТСР, постмортальные исследования на срезах головного мозга человека единичны, поскольку связаны с множеством технических сложностей. Обнаружено, что в крови у пациентов с ПТСР по сравнению с контролем и с лицами, перенесшими травму без развития ПТСР значимо повышены уровни таких провоспалительных цитокинов как IL1β, IL6 и TNF, а также с CRP. При этом, уровни CRP положительно коррелируют с тяжестью симптомов ПТСР [Deslauriers, Powell, Risbrough, 2017].

Эти данные говорят о том, что периферическое воспаление присутствует при ПТСР, но не свидетельствуют о его роли в патогенезе заболевания. Тем не менее, есть сведения, что более высокие уровни провоспалительных цитокинов, выявленные в плазме крови военных перед их участием в боевых действиях, были связаны с повышенным риском развития ПТСР после их возвращения из горячих точек [Eraly et al., 2014]. Кроме того, более высокий уровень глюкокортикоид-зависимой продукции цитокинов и Т-клеточной пролиферации перед военными действиями, связан с повышенной выраженностью симптомов ПТСР у солдат, после возвращения из зоны боевых действий [Zuiden van et al., 2012].

Однако отсутствие убедительных данных о признаках нейровоспаления в мозге пациентов, перенесших ПТСР, не позволяет однозначно ответить на вопрос о том, насколько уровень периферических цитокинов отражает вовлеченность нейроиммунных процессов в патогенез ПТСР, а также других психопатологий, связанных со стрессом.

Использование животных моделей позволит прояснить данный вопрос. Так, в мышиной модели на 8й день после стрессового воздействия выявлено увеличение уровня циркулирующих в крови моноцитов и усиление тревожности в поведенческих тестах. На 24й день после стрессового воздействия тревожное поведение и повышенный уровень мРНК генов провоспалительных цитокинов в микроглиальных клетках мозга (*il1β, tnf и il6*) все еще наблюдался, при этом

периферические признаки воспаления отсутствовали [Wohleb et al., 2014]. Так же есть данные о повышенной экспрессии этих же цитокинов в гиппокампе крыс в модели ПТСР, причем данный эффект сохраняется через 2 недели после воздействия стресса [Deslauriers, Powell, Risbrough, 2017].

Таким образом, нервная система и иммунная система не функционируют независимо друг от друга. Центральная нервная система использует клеточные и молекулярные элементы иммунной коммуникации для реализации своих функций, в то время как иммунный ответ частично регулируется нейроэндокринными медиаторами. Сложные взаимодействия между этими двумя системами играют важную роль в патогенезе психических расстройств.

1.5. Роль микробиоты кишечника в генерации и поддержании постстрессорного нейровоспаления

1.5.1. Микробиота кишечника

Термином «микробиота кишечника» обозначают совокупность всех микроорганизмов кишечника животного. Этот термин следует отличать от понятия «микробиом», под которым понимают весь набор генов этих микроорганизмов [Dave et al., 2012]. Наибольшее количество микроорганизмов находятся в кишечнике (до 80%), общее число бактерий, населяющих организм человека превышает число его собственных клеток, а микробиом содержит в 12 раз больше генов, чем геном хозяина [Eckburg et al., 2005].

Микробный состав кишечника очень динамично меняется на протяжении всей жизни организма, известно, что ЖКТ начинает заселяться первыми микроорганизмами еще во время пренатального развития, когда бактерии могут проникать через амниотическую жидкость или пуповинную кровь [Jiménez et al., 2005; Satokari et al., 2009].

Но основной этап формирования кишечной микробиоты человека происходит во время постэмбрионального развития. Во время и сразу после родов

новорожденный контактирует с микробиотой матери, а также окружающей среды и приобретает ряд комменсальных бактерий, заселяющих ЖКТ [Hooper, Littman, Macpherson, 2012]. Исследования показывают, что первые годы жизни – критический период для формирования «здоровой экосистемы» кишечника [Clarke et al., 2014].

Согласно гипотезе «Старых друзей» (“Old friends”), такой симбиоз между организмом человека и множеством микроорганизмов, населяющих его кишечник – результат длительной совместной эволюции [Rook, Lowry, Raison, 2013]. Накоплено достаточно доказательств того, что микробиота кишечника выполняет ряд важнейших функций в организме-хозяине. Она участвует в создании и поддержании целостности интерстициального барьера, стимулирует регенерацию клеток эпителия кишечника, стимулирует продукцию слизи клетками эпителия и питает слизистую оболочку ЖКТ, выделяя некоторые метаболиты [Koh et al., 2016].

Кишечная микрофлора вовлечена в созревание иммунной системы хозяина благодаря стимуляции врожденного иммунитета на ранних стадиях онтогенеза. Она влияет на развитие связанной с кишечником лимфоидной ткани, активирует адаптивный иммунитет благодаря стимуляции местного и системного иммунного ответа [Macpherson, Harris, 2004], а также участвует в синтезе некоторых нутриентов, гормонов и витаминов, играет важную роль в удалении токсинов.

В нормальных условиях микробиота способна стимулировать иммунную систему, приводя к состоянию низкоинтенсивного физиологического воспаления (паравоспаления). Существует гипотеза о том, что такая стимуляция иммунитета увеличивает толерантность организма хозяина к повреждающему действию патогенных микробов [Rakoff-Nahoum et al., 2004].

Но экосистема кишечника крайне уязвима к действиям неблагоприятных факторов. Сложившийся баланс микроорганизмов может быть нарушен как психоэмоциональными факторами (стресс, в т.ч. и в пренатальный период), так и диетой, приемом медикаментов [Petra et al., 2015].

1.5.2. Механизмы влияния микробиоты ЖКТ на развитие и функционирование мозга

К настоящему моменту накоплено достаточно данных о связи качественных и количественных показателей микробиоты кишечника с выраженностью тревожных и депрессивных симптомов, как у человека, так и у грызунов [Foster, Neufeld, 2013; Rackers et al., 2018].

Длительное исследование, проведенное после вспышки бактериального гастроэнтерита в Канаде, показало, что выраженная тревога и депрессия являются факторами риска сохранения кишечных симптомов на протяжении 8 лет после первичной инфекции [Marshall et al., 2010].

Взаимодействие между мозгом и кишечной микрофлорой часто описывают в литературе как ось «микробиота-кишечник-мозг» [Foster, Neufeld, 2013; Rackers et al., 2018]. Такая коммуникация осуществляется через нейроанатомические пути, эндокринную и иммунную системы, а также через выделение бактериями определенных метаболитов, способных оказывать влияние на нервную систему [Wang, Wang, 2016].

Автономная нервная система кишечника и блуждающий нерв обеспечивают один из путей влияния микробиоты кишечника на мозг. Показано, что метаболиты бактерий стимулируют афферентные нейроны энтеральной нервной системы [Abot, Cani, Knauf, 2018].

С 1930х годов известно, что в эпителии кишечника присутствуют энтероэндокринные клетки. Они электровозбудимы, но до последнего времени считали, что эти клетки не способны формировать синапсы с черепными нервами. В недавнем исследовании [Kaelberer et al., 2018] был идентифицирован тип сенсорных эпителиальных клеток кишечника, которые имеют синапсы с чувствительными нейронами узловатого ганглия (nodose ganglia) блуждающего нерва. Авторы назвали эти клетки «нейроподными» (neuropod cells) так как, являясь эндокринными, они имеют способность формировать нейроэпителиальные

сети. С помощью глутаматергических синапсов с блуждающим нервом нейроподные клетки соединяют просвет кишечника напрямую со стволом мозга. Существование таких нервных сетей позволяет мозгу в течение нескольких миллисекунд получить информацию из просвета кишечника.

Известно, что в патогенез постстрессорных патологий большой вклад вносят нарушения в работе гипоталамуса, гипофиза и надпочечников, составляющих ГГАКС ось [Schumacher et al., 2019]. Новейшие данные свидетельствуют о существенной роли микробиоты кишечника в нарушениях работы этих структур и, следовательно, в нейроэндокринной дисрегуляции [Sudo et al., 2004].

У мышей без микробиоты (germ free – GF-мыши) стресс, вызванный длительным обездвиживанием, приводит к значимо большему выбросу кортикостерона и адренокортикоктропного гормона (АКТГ) по сравнению с контрольными животными, имеющими нормальную микрофлору. Такой чрезмерный ответ на стресс может быть частично нормализован с помощью предварительной трансплантации стула от контрольных мышей и полностью восстановлен заселением в кишечник индивидуальной бактерии вида *Bifidobacterium infantis* [Desbonnet et al., 2010].

Один из возможных механизмов такого влияния бактерий на функцию ГГАКС заключается в воздействии их метаболитов на работу глутаматэргических и серотонинэргических синапсов. У GF-мышей обнаружено значимое снижение экспрессии рецепторов к глутамату (NMDA-рецепторов) и серотонину (5-HT_1A рецепторов) в гиппокампе и коре по сравнению с SPF-мышами (specific pathogen free). Дефициты глутаматэргической и серотонинэргической передачи могут приводить к нарушениям работы ГГАКС, действуя на секрецию кортикотропин-рилизинг-гормона (КРГ) в гипоталамусе. Длительное воздействие повышенных концентраций КРГ приводит к развитию состояния дистресса, выраженным депрессивным симптомам, бессоннице, хронической тревоге, истощению, понижению либидо [Wang, Wang, 2016].

Показано, что стрессор, влияя на работу ГГАКС, может приводить к изменению состава микробиоты. Например, у новорожденных крысят ранняя разлука с матерью приводит не только к долговременным изменениям в работе ГГАКС, но и оказывает длительный эффект на состав микробиоты у потомства [O'Mahony et al., 2011].

Подобные взаимодействия наблюдаются и при стрессировании взрослых животных. Состав микробиоты у мышей в модели хронического психоэмоционального стресса и у нестрессированных мышей значимо отличается [Bangsgaard Bendtsen et al., 2012]. Показано, что стресс снижает представленность бактерий рода *Bacteroides* в слепой кишке и увеличивает представленность рода *Clostridium* [Deng et al., 2018].

Еще один механизм, посредством которого микробиота может влиять на состояние и функции нервной системы – иммунные взаимодействия. Важную роль в коммуникации между бактериями и хозяином играют Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptor, TLRs), которые экспрессируются на эпителиальных клетках, моноцитах, макрофагах, дендритных клетках, нейтрофилах и натуральных киллерах, а также широко представлены в нейронах и глиальных клетках [McKernan et al., 2011]. Они распознают консервативные структуры микроорганизмов и являются важным звеном врожденной иммунной системы. После активации TLRs связываются с адаптерными белками и способны индуцировать синтез цитокинов.

Микрофлора кишечника продуцирует нейротрансмиттеры и других регуляторные молекулы, которые способны влиять на мозг и поведение. К таким веществам относят гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК), серотонин (5-НТ), дофамин, короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК) [Bourassa et al., 2016].

КЦЖК – продукты метаболизма микробиоты кишечника, клетки организма хозяина используют их как источник энергии для синтеза АТФ. В то же время, некоторые из солей таких кислот (пропионат, бутират) вовлечены в

эпигенетические модификации в клетках млекопитающих. Так, бактерии из родов *Clostridium, Eubacterium* и *Butyrivibrio* способны синтезировать и поставлять бутират из неперевариваемых волокон в просвет желудочно-кишечного тракта. Бутират оказывает ингибирующее действие на гистондеацетилазы (HDACs) и, таким образом, участвует в эпигенетической модификации гистонов [Bourassa et al., 2016].

1.5.3. Микробиота и постстрессорное воспаление

В последнее время в качестве одного из факторов возникновения ряда психиатрических и неврологических заболеваний рассматривают взаимодействие между микробиотой ЖКТ и мозгом, что предполагает взгляд на человека как на супер-организм или голобионт во всей его сложности [Sandoval-Motta и др., 2017].

В перинатальный период функциональное развитие мозга млекопитающих подвержено как внутренним, так и внешним сигналам. Эпидемиологические исследования обнаружили связь между микробными болезнетворными инфекциями в этот период и распространенными нарушениями развития нервной системы, такими как аутизм и шизофрения [Schmidt, 2015]. На модели грызунов было показано, что воздействие микробных патогенов в ранние постнатальные периоды развития, вызывает нарушение когнитивных функций и способствует развитию симптомов тревоги [Bilbo et al., 2005].

Большинство исследований оси «микробиота-кишечник-мозг» были сфокусированы на животных моделях. Свободные от микробов (germ free, GF) линии мышей позволили оценить влияние микробиоты на поведение, а также выяснить эффект конкретных бактерий или изменения диеты на взаимодействие микробиоты, кишечника и мозга. Установлено, что наиболее выраженными особенностями таких мышей являются нарушения в функционировании иммунной системы. Похожие нарушения наблюдаются у пациентов с поведенческими симптомами тревоги [Minakova, Warner, 2018].

GF-мыши имеют признаки нейровоспаления в тех структурах мозга, которые вовлечены в патогенез связанных со стрессом расстройств [Alam, Abdolmaleky, Zhou, 2017]. Повышенный уровень провоспалительного IL1β в миндалине GF-животных выявляют наряду со снижением нейротрофического фактора мозга BDNF [Gur et al., 2017].

Было показано, что КЦЖК, продуцируемые микрофлорой кишечника, влияют на нейроиммунную регуляцию через модуляцию состояния и функционирования микроглиальных клеток мозга. Данные метаболиты могут ингибировать HDACs, то есть регулировать эпигенетические изменения на системном уровне, что сочетается с изменением фенотипа микроглиальных клеток с активированного на противовоспалительный [Vinolo et al., 2011].

Фолаты, бутираты, ацетаты, производимые бактериями, участвуют в процессах метилирования ДНК в клетках организма-хозяина. Например, фолаты (продукт жизнедеятельности *Bifidobacterium spp*.) необходимы для синтеза S-аденозилметионина - донора метильной группы А для ДНК-метилтрансфераз [Takahashi, 2014].

Эти данные поддерживают гипотезу о воздействии микробиоты кишечника на физиологические процессы организма-хозяина посредством влияния на эпигенетическую модификацию генома хозяина.

Таким образом, известно, что состав микробиоты кишечника влияет на функционирование микроглиальных клеток мозга и, в целом, на поведение экспериментальных животных. Изучение взаимодействия микробиоты, кишечника и мозга является перспективным направлением исследований в биологической психиатрии.

Благодаря активному развитию высокопроизводительных технологий секвенирования генома состав микробиоты ЖКТ человека и лабораторных животных изучен достаточно детально. Формируется представление о таксономическом распределении и разнообразии микробных сообществ кишечника в норме и при различных патологиях. Некоторые метаболиты

микробиоты кишечника могут влиять на эпигенетические модификации генома клеток организма-хозяина. Выяснение роли микробиоты в развитии нейровоспаления углубит понимание механизмов постстрессорных патологий и позволит выделить новые мишени для их терапии.

1.6. Генетически детерминированная возбудимость нервной системы как фактор риска развития постстрессорных патологий

Как обсуждалось выше, постстрессорные психические патологии сегодня рассматривают как результат взаимодействия факторов среды (например, стрессоров) и генетической уязвимости организма. Генетически детерминированный уровень возбудимости, являясь базовым параметром функционального состояния нервной системы, может быть критичным для реализации многих поведенческих признаков, в том числе и патологической реакции на стресс [Вайдо, 2000].

В современной научной литературе возбудимость определяется как способность нервных клеток генерировать и передавать электрические импульсы в ответ на различные стимулы [Rossini et al., 2015]. Данное определение полностью совпадает с идеями И.П. Павлова. Им же впервые была подчеркнута роль генетически детерминированной возбудимости в реализации нормального и патологического поведения [Павлов, Быков, 2022].

Исследования Л.В. Крушинского легли в основу концепции об уровне возбудимости мозга как модификаторе поведения, что в последствии позволило создать широко используемую сегодня в исследованиях линию крыс Крушинского-Молодкиной, у которой ослаблен тормозный процесс и преобладают процессы возбуждения. Эти животные гиперчувствительны к звуку и демонстрируют специфические патологические симптомы: судороги, интенсивную (по выраженности и длительности) «постиктальную» каталепсию, нарушения мозгового кровообращения после длительной экспозиции звука [Полетаева и др., 2017].

Для оценки возбудимости нервной системы применяются различные подходы, включая измерение двигательной активности, порога нервно-мышечной возбудимости, скорости проведения нервных импульсов и биоэлектрической активности мозга и его структур. Определение порога является основным методом измерения возбудимости, и его величина зависит от функционального состояния ткани и свойств раздражителя.

В лаборатории генетики высшей нервной деятельности Института физиологии им. И.П. Павлова в 70-х годах XX века была запущена селекционная программа, результатом которой стало создание двух линий крыс с контрастной возбудимостью нервной системы. Полученные из популяции крыс Вистар, данные линии отличаются по порогу нервно-мышечной возбудимости при раздражении электрическим током большеберцового нерва (n. tibialis) [Вайдо, 2000]. На сегодняшний день поддерживаются две линии, величина порогов у которых различается в 4 раза, причем как у самцов, так и у самок: низковозбудимая линия с высоким порогом (ВП) и высоковозбудимая линия с низким порогом (НП) [Вайдо и др., 2018].

Поскольку отбор производили по величине порога нервно-мышечного возбуждения важно было проверить воспроизводятся ли различия по порогу возбудимости других отделов нервной системы у данных линий крыс. Эксперименты свидетельствуют о том, что различия в возбудимости сохраняются и в ЦНС, например, в отношении порога реакции активации ЭЭГ в ретикулярной формации среднего мозга [Вайдо, 2000], величины пост-тетанической потенциации гиппокампа [Вайдо и др., 1992]. Кроме того, частота фоновой импульсации нейронов базолатеральной миндалины так же значимо выше у высоковозбудимых крыс линии НП по сравнению с низковозбудимой линией (ВП) [Сиваченко и др., 2020]. Таким образом, несмотря на то что отбор вели по возбудимости нервно-мышечного звена нервной системы, соответствующие различия в порогах возбудимости наблюдаются и в структурах ЦНС, вовлеченных в патогенез постстрессорных расстройств (миндалина, гиппокамп).

Целью дальнейших исследований было выявить межлинейные различия

гормональной регуляции, функционировании нейромедиаторных систем, а также генетические, эпигенетические и, наконец, поведенческие особенности каждой линии как в физиологических условиях, так и в ответ на стресс.

На сегодняшний день известно, что крысы высоковозбудимой линии имеют повышенную активность щитовидной железы, ГГАКС - (высокий базальный уровень кортикостерона), высокий уровень дофамина в миндалине, более высокие содержание кальция в мозге и кальмодулина в гиппокампе по сравнению с линией ВП [Дюжикова, 2016].

В поведенческих тестах высоковозбудимые животные (НП) проявляют высокую эмоциональность (тревожно-подобные симптомы в тестах Открытое поле и Приподнятый крестообразный лабиринт), низкий порог агрессивного поведения, повышенная способность к выработке условного рефлекса пассивного избегания, высокий уровень стереотипии поведения. Для низковозбудимых (ВП) крыс характерны низкая эмоциональность в поведенческих тестах, высокий порог агрессивного поведения, повышенная способность к выработке условного рефлекса активного избегания [Вайдо и др., 2018].

Активно изучаются не только межлинейные различия ЦНС и поведения у интактных животных, но и действие хронического стресса на крыс с контрастной возбудимостью. Так, в модели длительного эмоционально-болевого воздействия (ДЭБС) у крыс линии ВП (высокий порог возбудимости, низкая возбудимость) длительный стресс вызывал депрессивно-подобные поведенческие симптомы, повышение агрессивности, в то время как у крыс НП (низкий порог возбудимости, высокая возбудимость) - появление и сохранение типичных компульсивных движений [Вайдо и др., 2018].

Генетически обусловленный уровень возбудимости нервной системы также влияет на эпигенетические модификации, которые имеют различную динамику в областях мозга, связанных с эмоциональным контролем.

У низковозбудимых животных линии ВП в ответ на ДЭБС на длительный период (до 2 месяцев) снижалась площадь регионов гетерохроматина в нейронах области CA3 гиппокампа, что сопровождалось активацией транскрипции

(увеличение уровня общей РНК в клетках). Активирующие транскрипцию модификации гистонов (ацетилирование H3K9/14) также обнаружены в нейронах различных структур мозга низковозбудимой линии ВП в ответ на длительный стресс. У высоковозбудимых крыс НП – менее выраженные разнонаправленные изменения [Вайдо и др., 2018].

Безусловно, линии крыс с контрастной возбудимостью – не единственная модель, созданная путем селекции для изучения влияния генетического фона на структурные и функциональные особенности нервной системы и формирование постстрессорных психических расстройств. Например, существуют две так называемые «римские линии крыс» с различными эмоциональными и мотивационными профилями, которые были выведены путем отбора животных с высоким (RHA) и низким уровнем избегания (RLA) (Roman high- and low-avoidance rat strains) [Moreno et al., 2010]. Эти линии демонстрируют устойчивые различия в эндокринных и поведенческих реакциях на стресс, например, в тесте «Открытое поле» [Carrasco et al., 2008] и «Приподнятый крестообразный лабиринт» [López-Aumatell et al., 2009]. Крысы линии RLA демонстрируют повышенную тревожность в поведенческих тестах и повышенную активацию ГГАКС в ответ на стрессор по сравнению с животными линии RHA [Carrasco и др., 2008]. При этом крысы линии RHA проявляют повышенную импульсивность по сравнению с крысами RLA, о чем свидетельствует увеличение преждевременных реакций в специфических поведенческих тестах. Есть данные показывающие, что эти различия в импульсивности связаны с базальными нейрохимическими различиями в моноаминах полосатого тела и прилежащего ядра, обнаруженными между двумя линиями [Moreno et al., 2010]. Эти результаты характеризуют линии римских крыс как достоверную модель для изучения различных аспектов импульсивного поведения и для анализа механизмов, вовлеченных в индивидуальную предрасположенность к импульсивности и связанным с ней психопатологиям. Однако, в данном случае отбор все же производился по поведенческим характеристикам животных, которые сложно оценивать объективно и интерпретировать однозначно. В этом отношении, селекция по порогу нервно-

мышечной возбудимости, которая позволила создать линии крыс с контрастной возбудимостью нервной системы, отличающиеся друг от друга и по поведенческим, и по физиологическим реакциям на стресс, на наш взгляд являются более удобной моделью для изучения механизмов постстрессорных патологий.

Генетически детерминированный уровень возбудимости нервной системы может определять особенности функционирования мозга на разных уровнях, начиная с молекулярно-генетического, заканчивая поведенческим. В связи с этим, исследование роли возбудимости нервной системы в развитии постстрессорных патологий представляется перспективным и поможет не только пролить свет на неясные на сегодняшний день механизмы развития данных расстройств, но и в перспективе разработать методы ранней диагностики риска их развития и прогноза течения.

Особенный интерес представляет исследование эффектов стресса на выраженность нейровоспаления. Несмотря на то, что на сегодняшний день накоплены убедительные доказательства участия нейровоспаления в патогенезе постстрессорных психических и нейродегенеративных расстройств, точные механизмы влияния нейро-иммунных дисфункций на адаптационный потенциал организма не выяснены, большинство исследований не учитывают долгосрочные эффекты стресса (до 2 месяцев). Определение специфики протекания постстрессорного нейровоспаления у линий крыс с разной возбудимостью позволит приблизиться к пониманию роли генетически детерминированных индивидуальных различий нервной системы в адаптации к действию хронического стресса.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материал исследования

В исследовании использовались самцы крыс двух линий в возрасте 5 месяцев. Крысы были ранее селектированы в Институте физиологии им. И.П. Павлова по порогу возбудимости нервной системы – линии ВП (высокий порог возбудимости, низкая возбудимость) и НП (низкий порог возбудимости, высокая возбудимость). Линии включены в биоколлекцию Института физиологии им. И. П. Павлова РАН (№GZ 0134-2018-0003, патенты на селекционное изобретение № 10769 и 10768, выданные Государственной комиссией Российской Федерации по Тестированию и защите селекционных изобретений, зарегистрированных в государственном реестре охраняемых селекционных изобретений 15 января 2020 года).

Исходным материалом были крысы Вистар. Отбор проводился по значению порога нервно - мышечной возбудимости в тесте на раздражение электрическим током большеберцового нерва- n. tibialis (прямоугольные электрические импульсы длительностью 2 мс). В первых 2 поколениях были скрещены полные сиблинги. Начиная с 3-го поколения, внутрилинейное скрещивание проводилось в случайном порядке. Начиная с 10-го поколения, размножение достигло плато. В то же время 4-кратные различия между линиями значительно превышали внутрилинейную изменчивость [Вайдо и др., 2018].

Все животные содержались в стандартных условиях (23 ± 2°C; 12 ч/12 ч цикла темнота/свет) на стандартном пищевом рационе, с водой и пищей *ad libitum* в виварии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. 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.

2.2. Метод длительного эмоционально-болевого стрессирования

Экспериментальные животные подвергались психогенному длительному эмоциональному и болевому стрессированию по протоколу К. Гехта [Вайдо и др., 2018]: 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 в три временные точки (для анализа количества микроглиальных клеток в мозге):

1) через 24 часа после воздействия стресса;

2) через 7 дней после воздействия стресса;

3) через 24 дня после воздействия стресса;

При анализе уровня мРНК цитокинов и трофического фактора BDNF декапитацию проводили в указанные выше временные точки, а также через 60 дней после воздействия стресса.

Таким образом, последствия длительного эмоционально-болевого стрессирования изучали как в короткие сроки, так и спустя длительное время после окончания стрессирования. Наиболее серьезные нарушения физиологических функций у млекопитающих наблюдаются к концу стадии тревоги (39 ч после эмоциогенной нагрузки). Компенсаторные процессы в организме развиваются в начале стадии резистентности (с 4-го – 7-го дня после воздействия) [Alekseeva et al., 2019; Korneva et al., 2018]. Однако, поскольку многие поведенческие эффекты стресса наблюдаются на более длительных сроках и возможно, соответствуют фазе истощения общего адаптационного синдрома, мы также включили в анализ сроки 24 дня и 60 дней после окончания ДЭБС.

Все контрольные животные не подвергались стрессу. В случае отсутствия значимых различий между изучаемыми параметрами в контрольных группах, декапитированных в разные сроки, сравнение с экспериментальными группами проводили с объединенным контролем (анализ уровня мРНК цитокинов и нейротрофического фактора BDNF).

2.3. Методы исследования поведения

Все поведенческие тесты проводились в отдельном помещении в утренние часы. Все лабиринты были тщательно очищены 70% - ным этанолом перед каждым тестируемым животным. Приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ) использовался для оценки тревожного поведения. Оценивали время, которое животные провели в открытых и закрытых рукавах лабиринта, количество входов в центр, время груминга, количество стоек с поддержкой и без.

Локомоция измерялась в тесте Открытое поле (ОП) (1,5 м в диаметре и 40 см в высоту). Были рассчитаны латентность первого движения, входы в центр, количество пересеченных секторов, продолжительность неподвижности и время груминга, количество стоек с поддержкой и без. В обоих испытаниях животных помещали в камеры и позволяли свободно передвигаться в течение 5 мин и проводили видеорегистрацию поведения в тестах. Общее количество животных в поведенческих тестах n=128 (по 64 крысы каждой лини). Число животных в каждой группе в поведенческих тестах указано на рисунке 3.

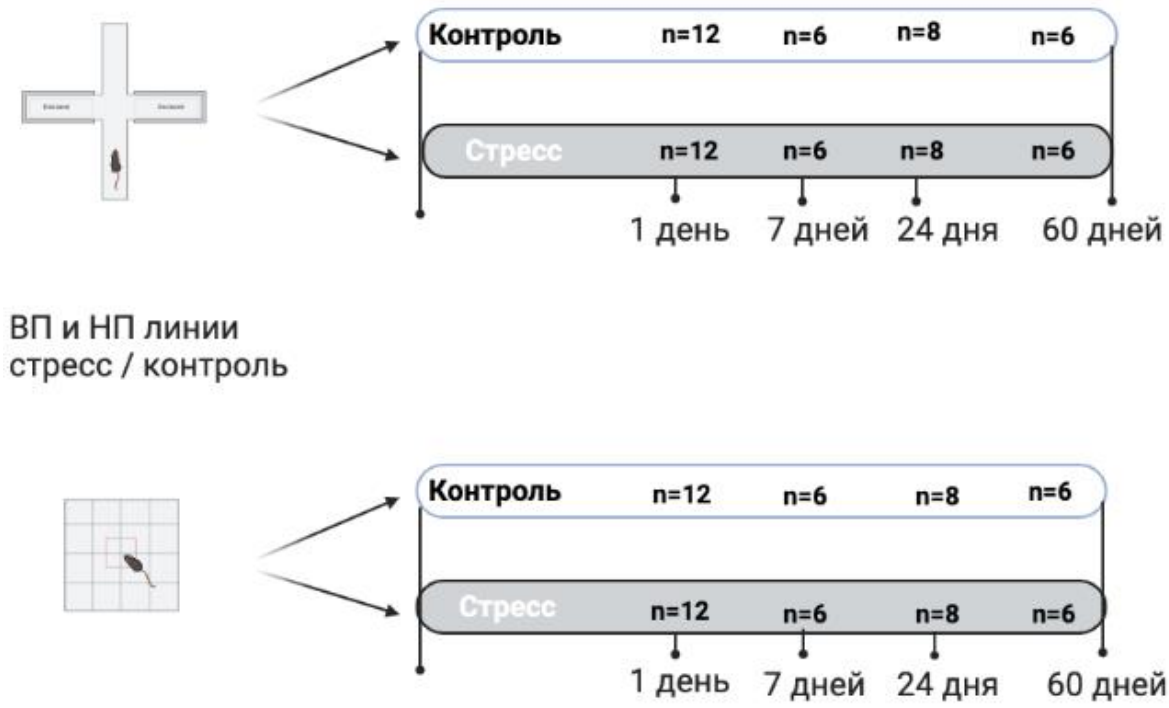

Рис. 3. Временные точки и размер групп в поведенческих тестах.

2.4. Оценка динамики соотношения нейтрофилов и лимфоцитов в мазках крови

Для оценки изменений соотношения нейтрофилов и лимфоцитов были выбраны четыре временных точки: до стресса и через 24 часа, 7 дней и 24 дня после воздействия стрессора. Забор крови производили в утренние часы из хвостовой вены крыс всех контрольных и опытных групп. 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).

Соотношение нейтрофилов и лимфоцитов оценивали с помощью подсчета 200 клеток в мазке крови, окрашенного по Гимзе, а фенотип клеток крови определяли в соответствии с рекомендациями по гематологической оценке у крыс [Lindstrom et al., 2015]. Нами не производилась идентификация на палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы, а также на подтипы лимфоцитов. Дифференциальный подсчет лейкоцитов производился на световом микроскопе

Zeiss, используя иммерсионный объектив на увеличении x40. N:L индекс определяли как отношение нейтрофилов\лимфоцитов в мазке каждого животного.

2.5. Иммуногистохимическое окрашивание

Для оценки изменения числа микроглиальных клеток в мозге стрессированных крыс по сравнению с контролем, животных каждой линии декапитировали через 24 часа, 7 и 24 дня после стресса. 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.

Из известных в настоящее время маркеров микроглиальных клеток два используются чаще всего и полностью подходят для структурного анализа микроглиоцитов как в нормальных условиях, так и при наличии патологических изменений в нервной ткани - Iba1 (Ionized calcium Binding Adapter molecule 1, ионизированная кальций-связывающая адапторная молекула 1) и Cd11b (Integrin alpha M, интегрин альфа-М) [Korzhevskii, Kirik, 2016]. Нами был выбран Iba1 - (Ionized calcium Binding Adapter molecule 1) принадлежащий к группе кальций связывающих белков. Было показано, что этот белок принимает участие в реорганизации цитоскелета и изменении конфигурации плазмалеммы – процессах, происходящих при фагоцитозе, соответственно его часто рассматривают как маркер активированной микроглии [Paolicelli и др., 2022].

Мозг 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 2 раза 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. Агарозу, окружающую каждую секцию, удаляли перед иммуногистохимическим окрашиванием. Серийные срезы помещали в 12-луночные планшеты в PBS с 0,1% азидом натрия.

Перед началом ИГХ протокола окрашивания на микроглиальный маркер Iba1, каждую серию срезов промывали в PBS 3 раза в течение 10 мин и инкубировали в блокирующем растворе, содержащем 3% ослиной сыворотки (Abcam, ab7475) и 0,3% тритона X-100 (Sigma-Aldrich, лот: 2725C289) в течение ночи на шейкере при температуре +4°C. В исследовании использовались первичные антитела, (козьи) анти Iba1 (Abcam, ab5076). Срезы инкубировали с первичными антителами (в концентрации 1:1000) в течение 48 ч на шейкере при температуре +4°C, затем промывали в PBS с 1% ослиной сывороткой и затем инкубировали с антителами, конъюгированными с AlexaFluor488 (Abcam, 50129) (1:1000) на шейкере в течение 24 ч при температуре +4°C. После окрашивания все срезы промывали 3 раза в PBS в течение 10 мин, монтировали на стеклянные 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 с применением программы анализа изображений ImageJ.

2.6. Метод ПЦР в реальном времени для оценки уровней мРНК провоспалительных цитокинов и гена *bdnf*

Нейровоспаление характеризуется выработкой провоспалительных цитокинов, включая интерлейкины: IL1β, интерлейкин 6 (interleukin-6, IL6), интерлейкин 18 (interleukin-18, IL18) и TNF, хемокины, простагландины и оксид азота (NO), а также активных форм кислорода, основным источником которых в мозге являются микроглиальные и астроцитарные клетки [Rauf et al., 2022]. Нами для выявления признаков нейровоспаления были выбраны

основные провоспалительные цитокины: IL1β и TNF, оценивали постстрессорное изменение уровня мРНК данных цитокинов в цельной крови и трех структурах мозга (префронтальная кора, гиппокамп, миндалина), которые вовлечены в патогенез постстрессорных расстройств [Khan et al., 2020].

Забор материала (кровь и мозг) для определения уровня экспрессии генов интерлейкина-1β (*il1β*), фактора некроза опухоли (*tnf*) и *bdnf* был произведен при декапитации, проведенной через 24 часа, 7, 24 и 60 дней после стрессирования. 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 составило 89.

Сразу после декапитации из мозга выделяли префронтальную кору, гиппокамп и миндалину и сразу помещали в пробирку, содержащую 500 мкл реагента ExtractRNA (Евроген, BC032), который является монофазным водным раствором фенола и гуанидин-изотиоцианата. Далее выделение РНК из образцов крови и мозга проводили по протоколу производителя.

После этапа выделения суммарной РНК проводились измерения концентрации экстрагированной РНК для каждого отдельного образца методом спектрофотометрии (NanoDrop IMPLEN).

Синтез комплементарной ДНК производился с использованием олиго (dT)-праймера, выступающего в качестве затравки для обратных транскриптаз. Концентрация праймера в реакционной системе составляла 1 мкМ. Также в процессе обратной транскрипции была использована обратная транскриптаза вируса лейкемии мышей Молони (MMLV, Евроген). После обратной транскрипции полученный продукт разводили в 8 раз деионизованной водой.

Для изучения экспрессии целевых генов был использован метод количественной ПЦР. 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 флуоресцирующей метки использовался интеркалирующий агент SYBR Green 1, входящий в состав реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR (Евроген). В ее состав также входил HS Taq ДНК-полимераза, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, ионы магния и реакционный буфер, необходимые для постановки ПЦР-реакции. Каждую пробу тестировали в трех технических повторностях, кроме того, для каждой пробы и каждого гена ставили контроль «без обратной транскрипции» (негативный контроль). Протокол ПЦР: 1. 95°C – 5 минут, 2. 95°C – 15 секунд, 3. 59°C – 15 секунд, 4. 72°C – 15 секунд, далее циклы 2 – 4 повторяли 40 раз.

Результаты ПЦР-анализа интерпретировались с помощью метода ΔΔCt, который основан на оценке уровня экспрессии целевого гена по отношению к референсному [Livak, 2001].

Для проверки специфичности полученных продуктов амплификации производили анализ кривых плавления продуктов реакции.

2.7. Секвенирование гена 16S рРНК для оценки микробного разнообразия

Протокол экстракции бактериальной ДНК из стула крыс был основан на рекомендациях проекта «International Human Microbiome» и СОПе «IHMS_SOP 006 V2» и адаптирован с учетом технической базы Института живых систем БФУ им.И.Канта. Буферные растворы и спин-колонки для осаждения ДНК взяты из специализированного набора «QIAamp DNA Stool Mini kit» (51504, QIAGEN). Для механической деструкции клеточных стенок использовалась смесь стеклянных шариков (G8893, G9268, Sigma-Aldrich) с размерами «<106 мкм» (3 части) и «425-600 мкм».

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 выделения бактериальной ДНК было взвешено 150–200 мг стула каждого образца, которые помещались в пробирки, содержащие стеклянные шарики, после чего в пробирки добавлялся 1 мл лизирующего буфера «ASL». Содержимое пробирок подвергалось механическому перемешиванию на приборе «Вортекс» в течение 20 секунд, и нагреванию в течение 20 минут при 95°C. После чего образцы подвергались механическому лизису в два этапа при 3000 об/мин, с перерывом 30 секунд между запусками. Далее, образцы центрифугировались на 16000g при +4°C в течение 10 минут на центрифуге. Следующим этапом был перенос 950 мкл супернатанта, в ранее подготовленные пробирки «DNA LoBind». Супернатант осторожно отбирали, не захватывая осадок. К осадку, оставшемуся в пробирках со стеклянными шариками, добавлялись 300 мкл буфера «ASL» и повторялись этапы инкубирования, гомогенизирования и центрифугирования, для более полной экстракции ДНК. После чего супернатант переносился в пробирки «DNA LoBind» в объеме 250 мкл. Для отделения белков от ДНК, белки из лизата осаждали добавлением ~350 мкл охлажденного ацетата аммония до конечной концентрации

2М и инкубированием на льду в течение 10 минут. После чего образцы центрифугировались на 16000g при +4°С в течение 10 минут в центрифуге. Супернатант разделялся на равные порции в 2 пробирки, в которые добавляли равный объём изопропанола (95–100%). Образцы инкубировались на льду 30 минут или хранились в морозильнике на -20°С, до проведения следующего этапа.

Бактериальная ДНК осаждалась центрифугированием и образовывала видимый белый или прозрачный осадок. Далее, осадок отмывался от бактериальных примесей и солей буферов, используемых на предыдущих этапах, добавлением 500 мкл 70% этилового спирта, после чего образцы инкубировались при комнатной температуре 2 минуты, после, центрифугировались 3 минуты на 16000g при комнатной температуре. Весь спирт отбирался дозатором, не касаясь осадка. Осадок высушивался в течение 5–10 минут при 40°С, до полного исчезновения жидкости. Осадок растворялся с добавлением в каждую пробирку по 100 мкл буфера «AE». Образцы ДНК, выделенные из одного образца, объединялись.

Для удаления РНК, в каждую пробирку с ДНК добавлялось 2 мкл РНКазы А (10 мг/мл) до конечной концентрации 100 мкг/мкл после чего образцы инкубировались 30 минут при 37°С. Далее, для более полного удаления белков из препаратов ДНК, добавлялась 10 мкл протеиназы К (20 мг/мл), до конечной концентрации 500 мкг/ мкл и 200 мкл буфера «AL», содержимое пробирок перемешивалось при встряхивании на «вортексе» 15 секунд и инкубировалось при 70°С на протяжении 15 минут. Для осаждения ДНК к образцам добавлялся равный объём, 200 мкл, этанола (96–100%). Полученные растворы переносились в, отдельные для каждого образца, спин-колонки, снабжённые мембранным фильтром, специфически связывающим ДНК и далее следовали инструкции производителя колонок.

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 полимеразной цепной реакции с кастомными праймерами (Lumiprobe).

После завершения ПЦР проводилась проверка полученных ампликонов в ходе гель-электрофореза. Приготовленные библиотеки собирались (смешивались) в два предпула (смеси) по 36 образцов каждый, эквимолярно. Предпулы замешивались, основываясь на интенсивности флуоресценции комплекса ДНК и этидиум бромида, красителя, специфически связывающего ДНК в ходе электрофореза, анализируемой с использованием программного обеспечения ImageLab (BIO-RAD). Далее, предпулы ДНК повторно подвергались гель-электрофорезу. Оценивалась концентрация ДНК в полученных пулах на флуорометре Qubit (Invitrogen), и замешивание финального эквимолярного пула, который состоял из двух предпулов по 36 образцов, и также подвергался очистке, с помощью проведения гель-электрофореза и набора QIAquick Gel Extraction Kit (250). Затем, проводилось измерение концентрации ДНК в финальном пуле, с использованием флуоресцентного красителя, специфически интеркалирующего в молекулы двухцепочечной ДНК и системы Qubit (Invitrogen). Полученный финальный пул (библиотека) хранился при -20°C, до проведения запуска секвенатора Miseq Illumina.

Запуск секвенатора Miseq Illumina проводился согласно протоколу производителя. Через 20 часов работы прибора были получены данные секвенирования ДНК в формате Fastq, что представляли собой парные прочтения последовательностей фрагментов 16S рРНК гена в прямом и обратном направлении – прямые и обратные прочтения.

Биоинформатический анализ состоял из нескольких этапов – первые этапы подготовки полученных данных для анализа – проверка качества, фильтрация секвенированных последовательностей ДНК (отсеивание прочтений с низким качеством), разделение прочтений по образцам (демультиплексирование), этап анализа данных с помощью пакета программ Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME2), визуализация таксономии с помощью Rstudio, статистическая обработка полученных результатов с помощью GraphPad Prism.

С использованием пакета QIIME2 были рассчитаны показатели микробного разнообразия - индекс Шеннона - параметрический метод оценки, который

учитывает количество видов, занимающих какую-то нишу (богатство) и их относительную численность по отношению друг к другу (равномерность) и Chao1 - Chao1 – непараметрический метод оценки количества видов в сообществе.

Таксономия определялась с помощью базы данных, содержащей последовательности 16S рРНК бактериальных генов, классификатора Greengenes, и плагина «qiime feature-classifier classify-sklearn».

2.8. Статистический анализ

Статистическую обработку результатов производили в программах SPSS Statistics 21 и Prism 7. Для анализа нормальности распределения переменных использовался критерий Колмогорова–Смирнова или Шапиро-Уилка. Тест Краскела-Уоллиса, U-тест Манна-Уитни и тест частоты ложных открытий (FDR) использовались для анализа в случае ненормального распределения при анализе постстрессорных изменений уровней мРНК цитокинов и *bdnf*. Так же U-тест Манна-Уитни применяли при анализе межлинейных различий порогов возбудимости, поведенческих параметров, изменений соотношения нейтрофилов и лимфоцитов при сравнении контроля и стрессированных групп, числа микроглиальных клеток, межлинейных различий в уровнях экспрессии исследуемых генов, а также отличий в представленности бактерий в студен животных контрольных и экспериментальных групп.

Тест Уилкоксона и тест частоты ложных открытий (FDR) для контроля множественного сравнения использовали в случае оценки соотношения нейртрофилов и лимфоцитов, тесты Фридмана и Уилкоксона для анализа постстрессорных изменений в представленности родов бактерий в стуле внутри стрессированных групп в разные временных точках после стресса.

В случае нормального распределения использовали одномерный дисперсионный анализ ANOVA с использованием метода коррекции Гринхауза-Гейссера и t-тест для анализа изменений индексов разнообразия микроорганизмов

в стуле крыс. Порог значимости был установлен на уровне $p < 0,05$ для всех статистических тестов.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Межлинейные различия в уровне возбудимости

Для подтверждения различий в уровне возбудимости нервной системы исследуемых линий крыс было проведено сравнение величины порогов возбудимости интактных животных НП и ВП. Рисунок 4 показывает, что линия ВП имеет более чем в 3 раза значимо больший порог возбудимости по сравнению с линией НП.

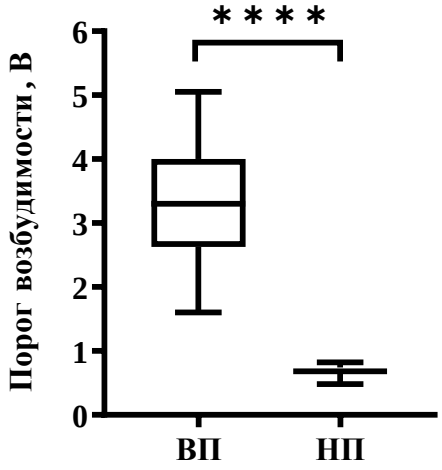

Рисунок 4. Межлинейные различия возбудимости нервной системы крыс линий ВП и НП. *ВП (n=32) и НП (n=34); ****p<0,0001 (критерий Манна Уитни)*.

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

Мы оценили влияние длительного стресса на поведение. 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 строках (рис.5, 6).

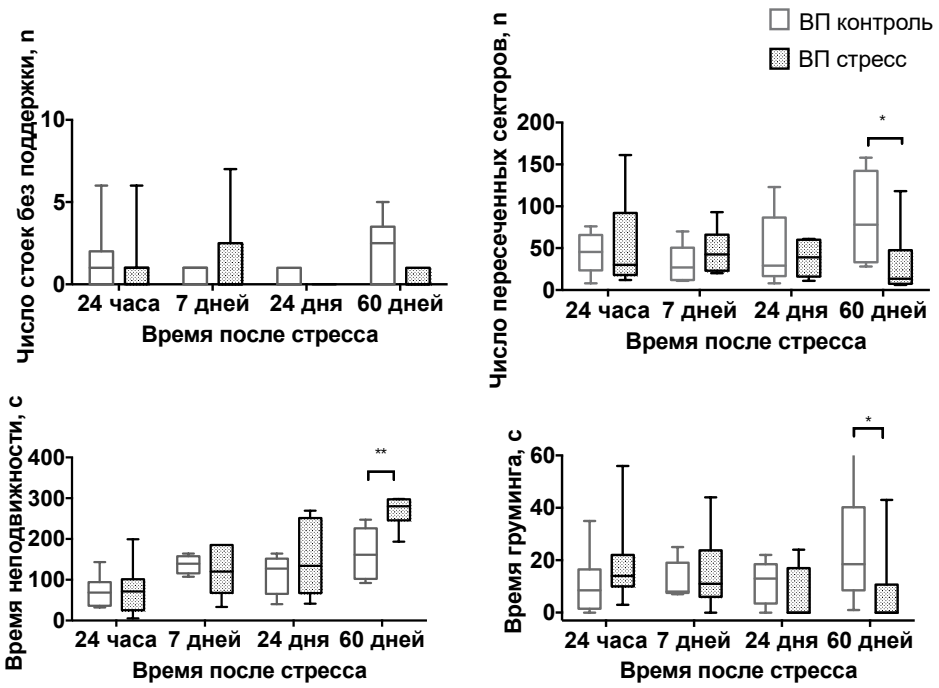

Рисунок 5. Влияние длительного эмоционально-болевого стрессирования на активность крыс линии ВП в открытом поле. *ВП контроль - животные линии ВП контрольная группа, ВП стресс - животные линии ВП стрессированная группа; n=12 в контрольных и экспериментальных группах через 24 часа после стрессирования, и n = 6-8 в контрольных и экспериментальных группах в остальных временных точках; графики представляют медианы, границы квартилей и максимальные и минимальные значения анализируемых данных; ** p< 0,01, * p< 0,05, критерий Манна-Уитни.*

Низковозбудимые животные линии ВП в ответ на стресс демонстрируют значимое снижение моторной активности в тесте ОП только к 60му дню после окончания действия стрессора: снижается количество пересеченных секторов, увеличивается время неподвижности, а также снижается время, затраченное на груминг (Рис 5).

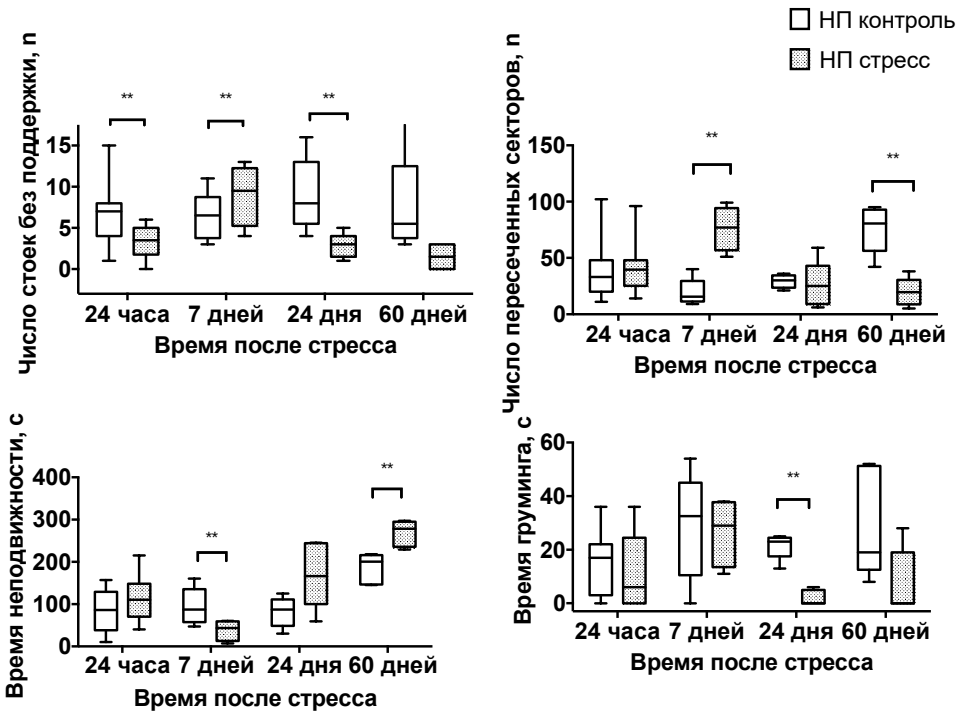

Рисунок 6. Влияние длительного эмоционально-болевого стрессирования на активность крыс линии НП в открытом поле. *НП контроль - животные линии НП контрольная группа, НП стресс - животные линии НП стрессированная группа; n=12 в контрольных и экспериментальных группах через 24 часа после стрессирования, и n = 6 -8 в контрольных и экспериментальных группах в остальных временных точках; графики представляют медианы, границы квартилей и максимальные и минимальные значения анализируемых данных; ** p< 0,01, критерий Манна-Уитни.*

Высоковозбудимые животные линии НП (Рис. 6) уже через 24 часа после окончания стрессирования делают значимо меньшее по сравнению с контролем количество стоек без опоры в ОП, далее к 7му дню демонстрируют увеличение моторной активности (увеличение количества пересеченных секторов и снижение времени неподвижности), но к 24 дню двигательная активность снова снижается и такое снижение сохраняется на сроке 60 дней после стрессирования (снижается количество стоек без опоры, число пересеченных секторов, увеличивается время неподвижности в ОП).

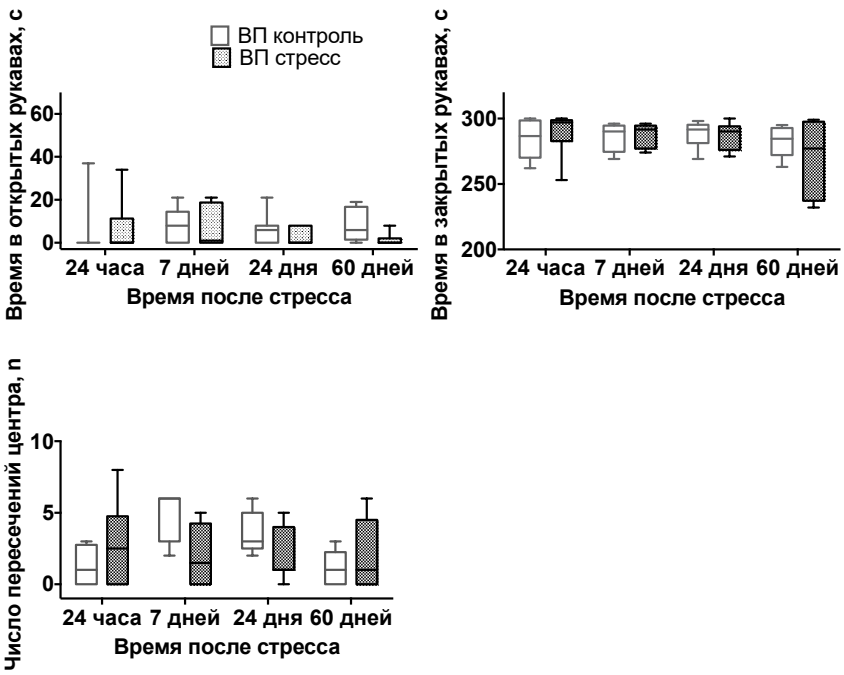

Рисунок 7. Влияние длительного эмоционально-болевого стрессирования на активность крыс линии ВП в приподнятом крестообразном лабиринте. *Обозначения и размер групп как на Рис. 5; критерий Манна-Уитни.*

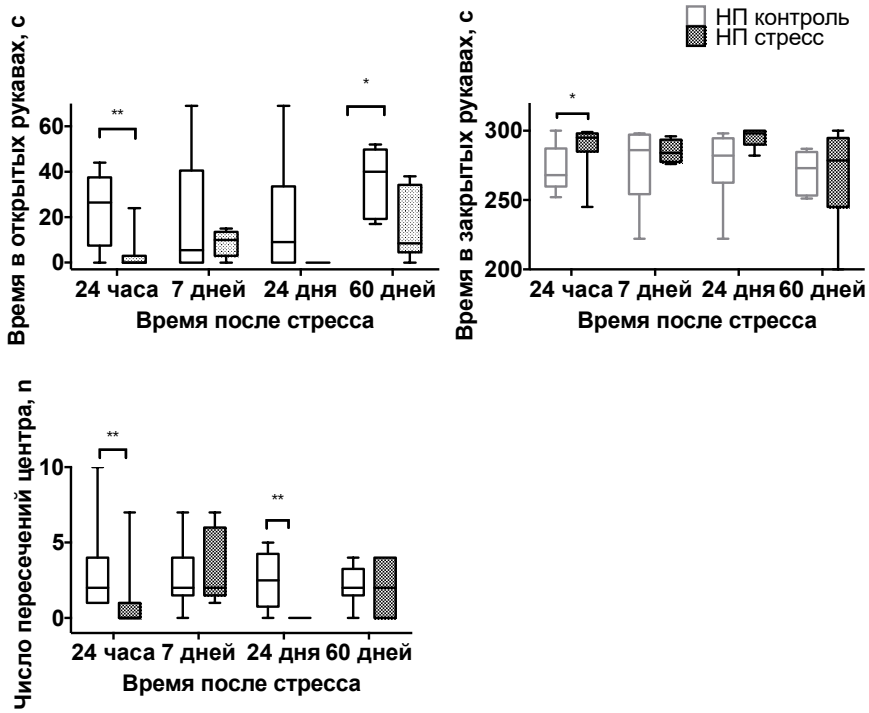

Рисунок 8. Влияние длительного эмоционально-болевого стрессирования на активность крыс линии НП в приподнятом крестообразном лабиринте. *Обозначения и размер групп как на Рис. 6; ** p< 0,01, * p< 0,05, критерий Манна-Уитни.*

В тесте ПКЛ эффект стресса не проявлялся в группе линии ВП ни в одной временной точке (Рис. 7), при этом высоковозбудимые крысы линии НП (Рис. 8) демонстрировали тревожно подобные симптомы уже через 24 часа после окончания стрессирования (значимое снижение времени, проведенного в открытых рукавах и выходов в центр лабиринта, увеличение времени, проведенного в закрытых рукавах). К 7-му дню данные симптомы исчезают, однако появляются вновь на сроке 24 и 60 дней, хотя и в более ограниченном объеме (только снижение количества выходов в центр и снижение времени в открытых рукавах соответственно).

Обсуждение

В нашем исследовании мы использовали в качестве модели стресса методику длительного-эмоционально болевого стрессирования (ДЭБС), которая заключается в предъявлении болевого стимула, появление которого животное не может предсказать. Таким образом, эта схема моделирует не только влияние физического стрессора на организм животного, но и эмоциональное воздействие, связанное с ожиданием непредсказуемого аверсивного стимула.

Мы использовали крыс двух линий, которые различаются возбудимостью нервной системы. Этот признак является более простым, чем, например, какие-либо поведенческие особенности, по которым селектируются животные. В связи с чем такие линии – удобная модель для исследования индивидуальных различий в стрессоустойчивости.

Тест ОП обычно используется для оценки общей двигательной активности животного, в то время как в ПКЛ можно оценить тревожное поведение [Radhakrishnan, Gulia, 2019]. Согласно полученным ранее данным [Levina et al., 2020], в ПКЛ животные с высокой возбудимостью (линия НП) демонстрируют более низкий уровень тревожности и более высокий уровень исследовательского поведения, чем крысы ВП.

Мы наблюдали значимые различия в поведении крыс обеих линий в ответ на хронический стресс. У низковозбудимых животных ВП мы не отмечали каких-либо

связанных со стрессом поведенческих эффектов на протяжении большей части периода наблюдений, однако через 60 дней после окончания стрессирования крысы данной линии демонстрировали значимое снижение локомоции и времени груминга в тесте ОП по сравнению с контролем. В тесте ПКЛ значимых эффектов стресса у низковозбудимых животных ВП не наблюдали ни в одной временной точке.

У крыс линии НП стресс-индуцированные поведенческие изменения имели более сложную динамику. Через один день после воздействия стрессора исследовательское поведение было значимо снижено в обоих тестах, в частности, мы наблюдали уменьшение количества стоек без опоры в ОП, снижение времени, проведенного в открытых рукавах ПКЛ, и количества выходов в центр по сравнению с контролем. Это можно интерпретировать как увеличение тревожно-подобного поведения, которого не было у крыс линии ВП на данном сроке. В то же время у крыс НП наблюдалась повышенная неспецифическая двигательная активность через 7 дней после воздействия стрессора, но при этом тревожные симптомы в тесте ПКЛ исчезли.

Интерпретируя зарегистрированный на сроке 7 дней всплеск локомоции в тесте ОП у стрессированных крыс линии НП нужно иметь в виду, то этот тест оценивает одновременно исследовательское поведение, общую двигательную активность и эмоциональность крыс. Эти элементы поведения не являются независимыми, они взаимодействуют, и поэтому изменение одного из них повлияет на проявление другого. Как мы показали, на сроке 7 дней высоковозбудимые крысы линии НП демонстрируют восстановление исследовательского поведения (нет значимых различий с контролем, хотя на более раннем сроке было снижение), возможно на указанном сроке у НП животных включаются адаптивные механизмы, которые способны привести и к кратковременному усилению двигательной активности.

Через 24 дня после воздействия стрессора исследовательское поведение стрессированных крыс НП снова было значимо снижено по сравнению с контролем. Такое снижение исследовательской активности и локомоции в тесте

ОП и ПКЛ сохранялось у крыс НП и на сроке 60 дней после стресса. Таким образом, какие бы адаптивные механизмы не были задействованы на сроке 7 дней после стресса, они не могут полностью компенсировать эффект ДЭБС и симптомы постстрессорных поведенческих расстройств все равно проявляются у высоковозбудимых животных на поздних сроках.

Вышеизложенное позволяет предположить, что 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.

Известно, что активация медиальной префронтальной коры (мПФК) стимулирует миндалевидное тело и приводит к тревожному поведению у крыс. Исследования [Bi et al., 2013] показали, что электролитические поражения мПФК грызунов снижают тревожное поведение в ПКЛ и увеличивают локомоцию в ОП. Имеются данные о том, что крысы НП имеют более возбудимое миндалевидное тело, поскольку они демонстрируют большую частоту импульсов миндалевидного тела в ответ на электрическую стимуляцию инфралимбической префронтальной коры [Sivachenko et al., 2020]. Возможно, нарушения в функционировании ПФК или ее связи с миндалевидным телом являются основой тревожного поведения и снижения общей двигательной активности крыс НП в ответ на стресс.

3.3. Характеристики воспаления у крыс с контрастной возбудимостью нервной системы в разные сроки после длительного эмоционально-болевого воздействия

3.3.1. Соотношение нейтрофилов и лимфоцитов у крыс с контрастной возбудимостью в разные сроки после длительного эмоционально-болевого воздействия

Различий между интактными животными двух линий в соотношении N:L индекса не было выявлено (рис. 9А). Однако в ответ на стресс значимое изменение соотношения N:L по сравнению с контрольными животными наблюдалось у стрессированных крыс линии ВП через 24 часа после воздействия стрессора (рис. 9Б). Значимых различий между контрольной и экспериментальной группами линии НП не было обнаружено (рис. 9С).

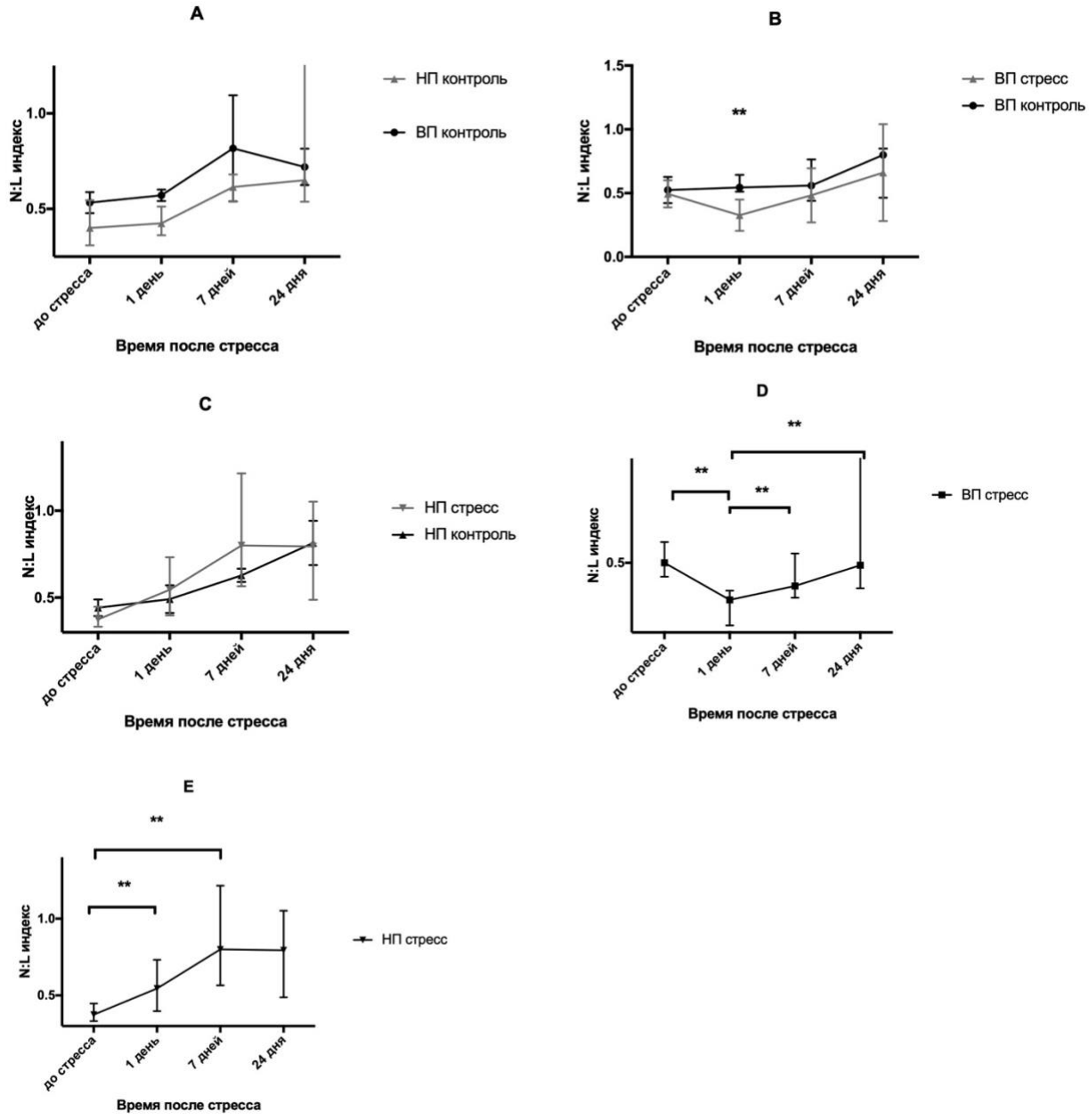

Рисунок 9. Влияние длительного стресса на соотношение нейтрофилов и лимфоцитов (N:L индекс) у крыс линий ВП и НП. *Межлинейное сравнение интактных крыс (А), влияние стресса на соотношение N:L у линии ВП (В), влияние стресса на соотношение N:L у линии НП (С), динамика связанных со*

*стрессом изменений соотношения N:L у линии ВП (D) и у крыс линии НП (E); обозначения групп как на Рис. 4-5; n=9-11; графики представляют медианы и межквартильный размах; B - ** p< 0,01, критерий Манна-Уитни, D-E ** - p< 0,01, критерий Уилкоксона с поправкой FDR.*

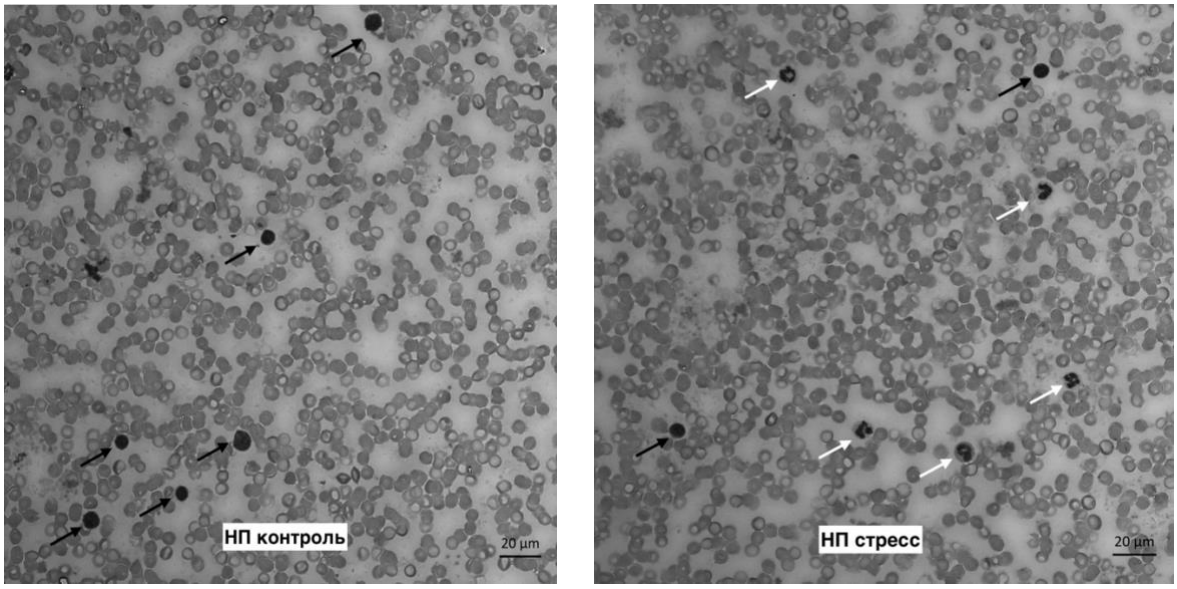

Рисунок 10. Мазки крови крыс линии НП, окрашенные по методу Романовского-Гимзе. *Увеличение* x*40, нейтрофилы (белые стрелки) и лимфоциты (черные стрелки) до стресса (справа) и через 7 дней после стресса (слева).*

Внутри группы стрессированных крыс линии НП мы наблюдали значимое увеличение соотношения N:L через 24 часа и на 7е сутки после воздействия стресса (рис. 9E, 10), но не было существенных изменений по сравнению с группой НП контроль. В экспериментальной группе ВП соотношение N:L было снижено через 24 часа после воздействия стресса, а затем восстановилось до его начальных значений к 7-м суткам (рис. 9).

3.3.2. Число микроглиальных клеток в префронтальной коре и гиппокампе крыс с контрастной возбудимостью нервной системы в разные сроки после длительного эмоционально-болевого воздействия

В префронтальной коре животных с контрастной возбудимостью не обнаружено межлинейных различий в числе микроглиальных клеток (Рис. 11).

Значимый эффект стресса на число Iba1+ окрашенных клеток в этой области мозга так же не выявлен ни у одной из линий крыс (Рис. 12).

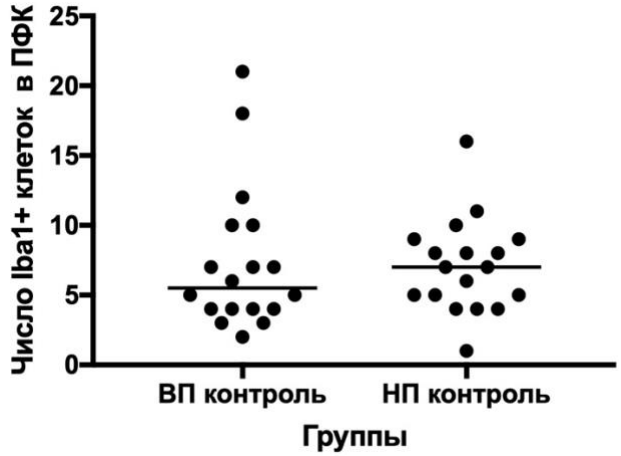

Рисунок 11. Межлинейные различия в количестве Iba1+ клеток в префронтальной коре. *n=6 в каждой группе (точки на графике отражают количество клеток, посчитанных на 1 срезе с каждого животного); горизонтальные линии показывают медианы; критерий Манна-Уитни.*

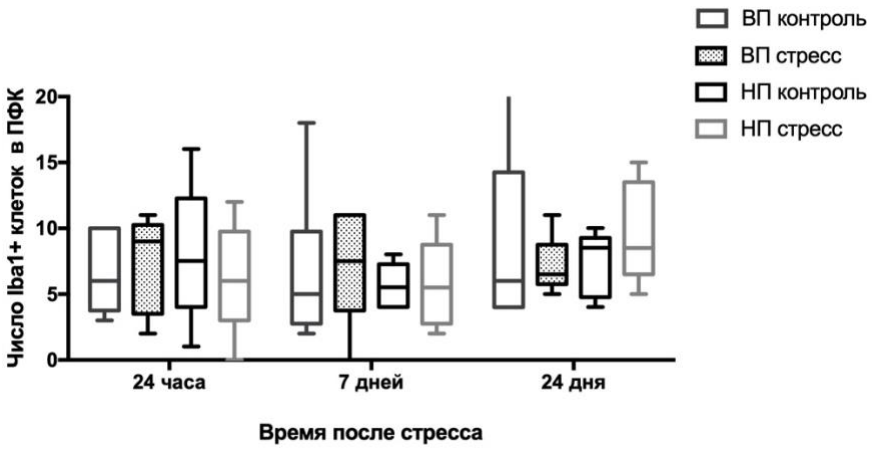

Рисунок 12. Влияние длительного эмоционально-болевого стрессирования на количество микроглиальных клеток в префронтальной коре у крыс линий ВП и НП. *n=6 в каждой группе; на графиках представлены медианы и межквартильный размах; критерий Манна-Уитни.*

Мы выявили значимые различия в количестве клеток микроглии в некоторых областях гиппокампа у крыс с разным уровнем возбудимости. Различия между интактными животными двух линий были обнаружены в областях CA1 (рис. 13A)

и CA3 (рис. 13B). Крысы НП имеют значимо меньшее количество Iba1+ клеток по сравнению с крысами ВП.

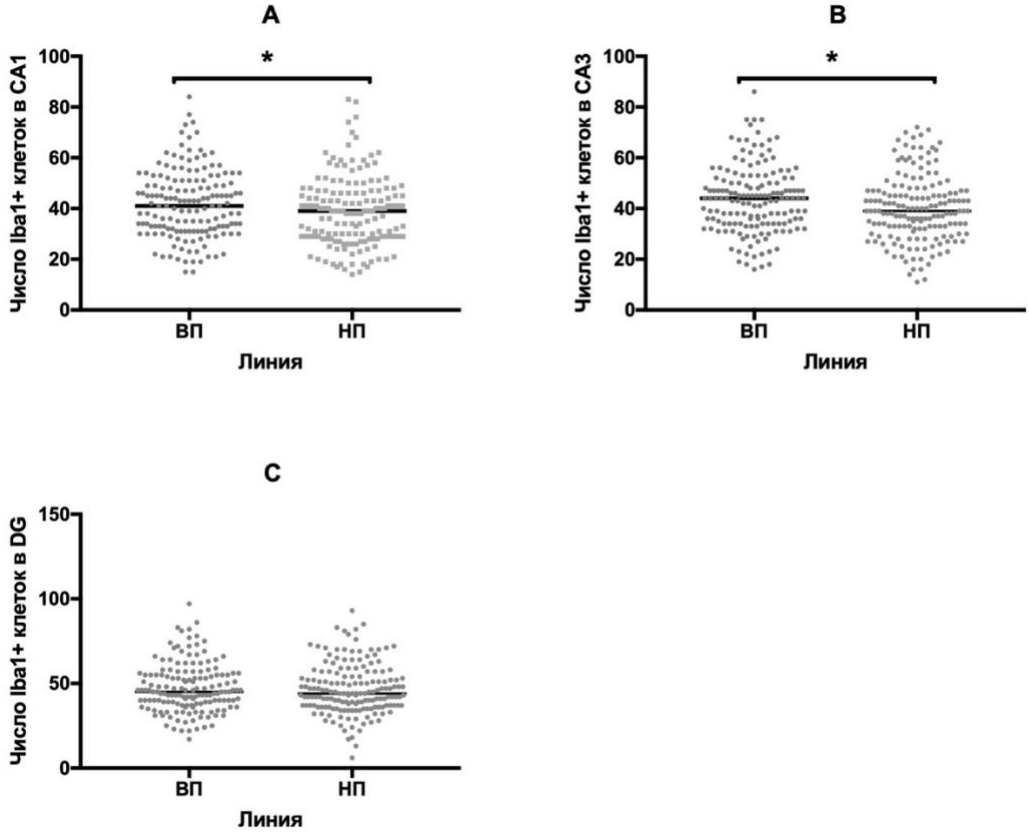

Рисунок 13. Межлинейные различия в количестве Iba1+ клеток в разных областях гиппокампа. *Точки на графике отражают количество клеток, посчитанных на 1 срезе с каждого животного, n=5-12 в группе; горизонтальные линии показывают медианы; *p<0,05, критерий Манна-Уитни.*

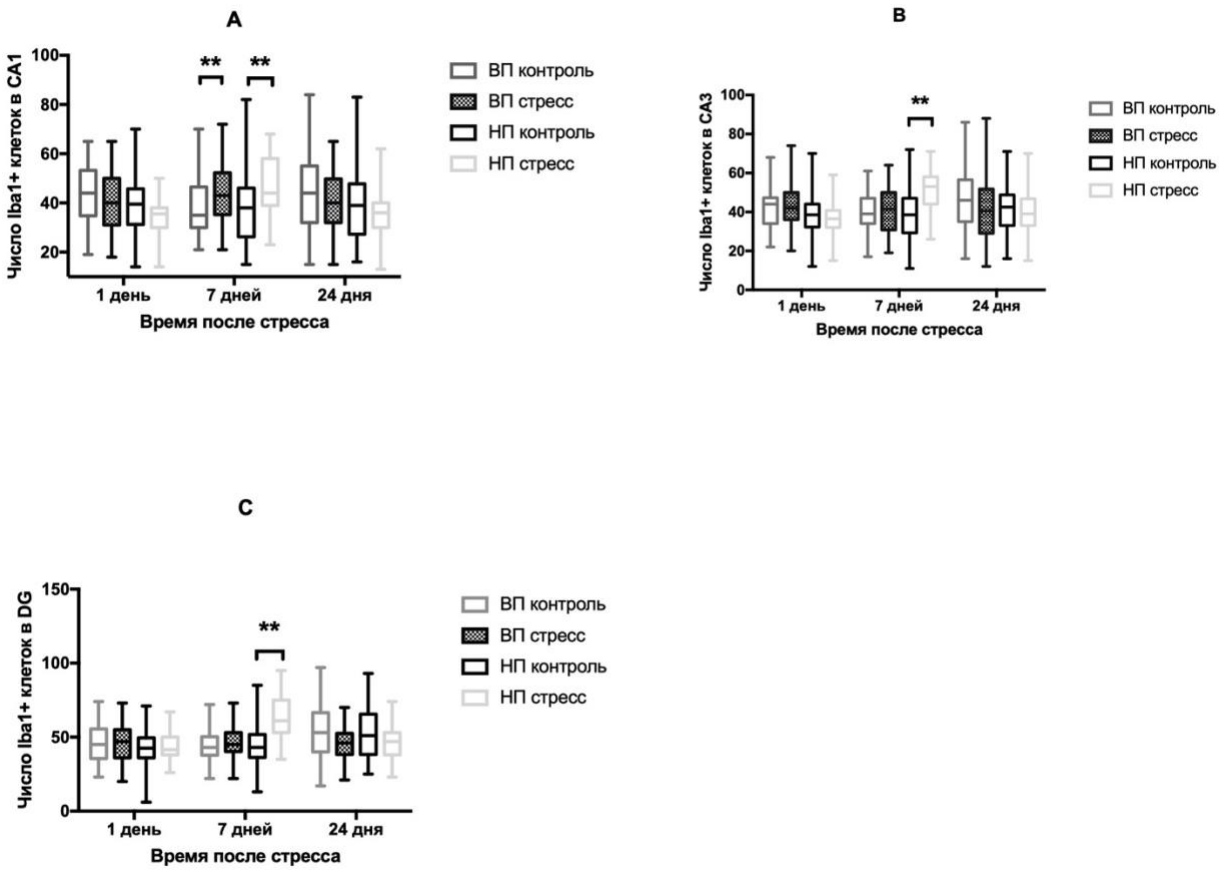

Рисунок 14. Влияние длительного эмоционально-болевого стрессирования на количество микроглиальных клеток в гиппокампе у крыс линий ВП и НП. *(A) Количество Iba1+ клеток в области CA1 гиппокампа, (B) – в области CA3 и (C) – в зубчатой извилине (DG); n=5-12 в группе; графики представляют медианы и межквартильный размах; **p<0,01, критерий Манна-Уитни.*

У крыс группы ВП стресс мы обнаружили значимое увеличение количества клеток микроглии только в области CA1 через 7 дней после окончания стрессирования (по сравнению с контролем) (рис. 14A).

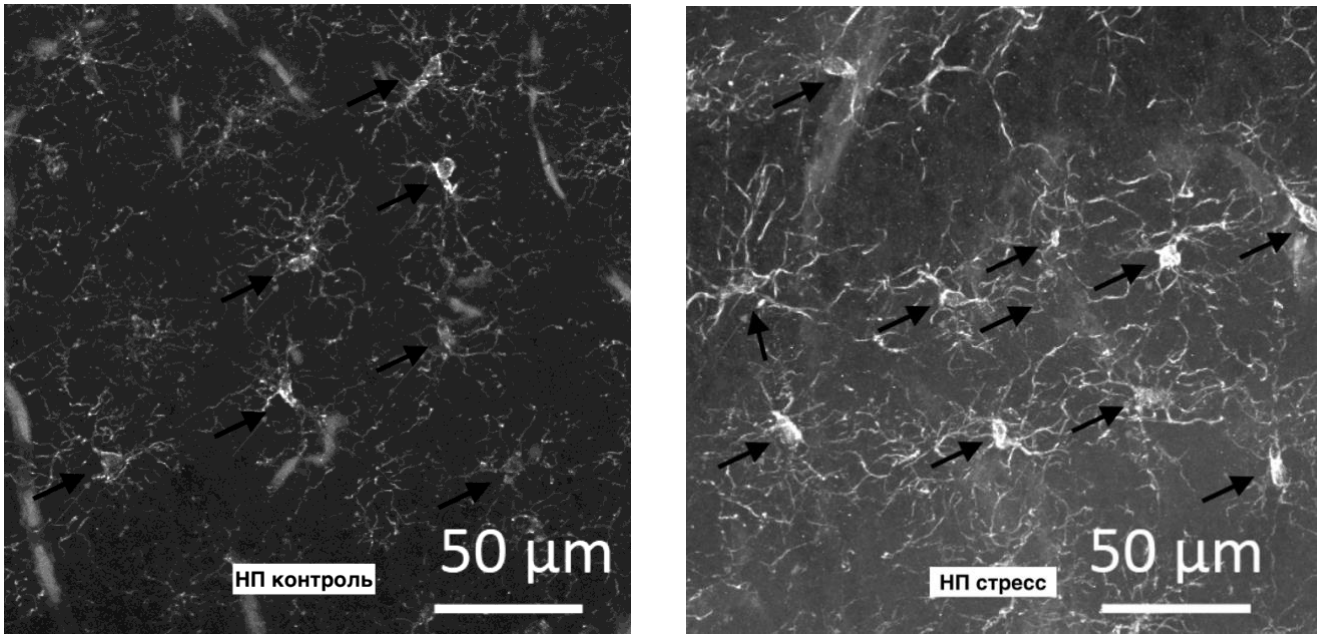

Рисунок 15. Iba1+ клетки в зубчатой извилине гиппокампа групп НП контроль (слева) и НП стресс (справа). *Увеличение* х*40.*

У крыс НП количество микроглиальных клеток во всех исследованных областях гиппокампа значимо увеличилось по сравнению с контролем через 7 дней после длительного стрессирования (рис. 14, 15). Через 24 дня после воздействия стресса количество микроглиальных клеток не отличалось от контроля (рис. 14).

3.3.3. Уровень мРНК провоспалительных цитокинов в мозге и крови крыс с контрастным уровнем возбудимости нервной системы в норме и на разных сроках после длительного эмоционально-болевого воздействия

3.3.3.1. Межлинейные различия в уровне экспрессии генов провоспалительных цитокинов

Для того, чтобы оценить различаются ли уровни экспрессии генов *il1β* и *tnf* провоспалительных цитокинов IL1β и TNF крыс с разным уровнем возбудимости нервной системы, мы проанализировали данные по интактным животным линий ВП и НП (Рис.16, 17).

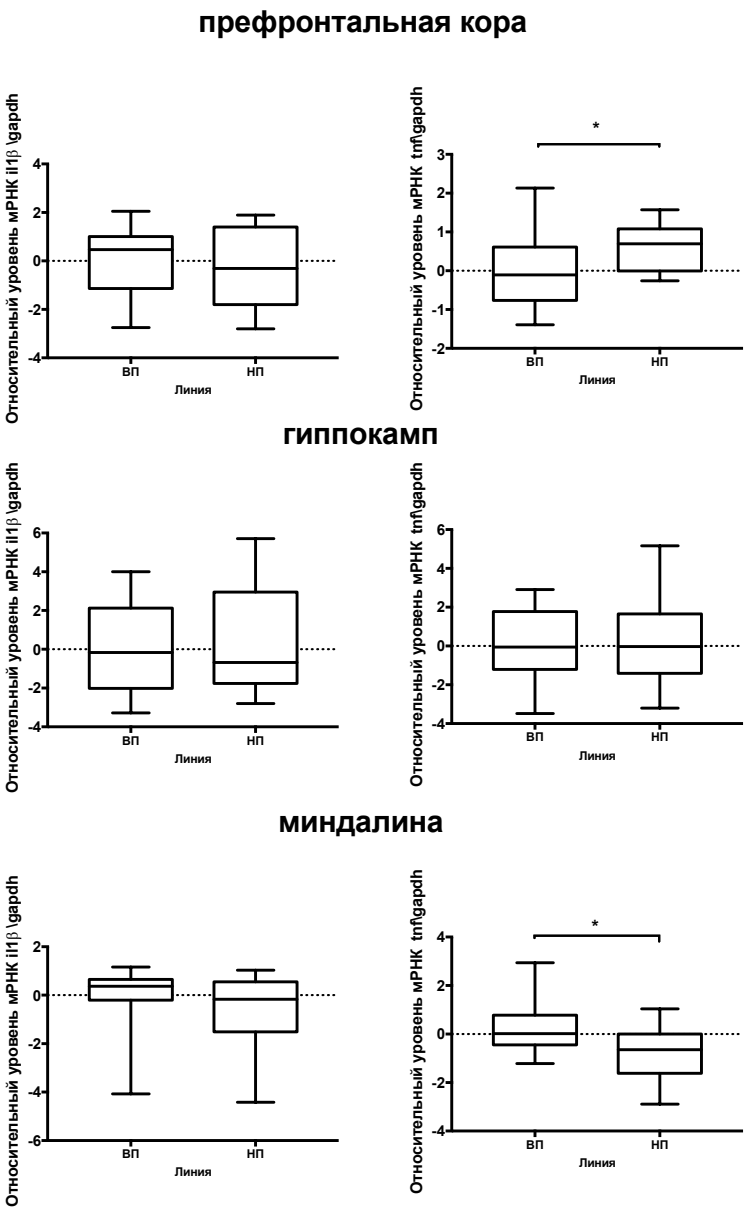

Рис. 16. Уровень мРНК генов *il1β* и *tnf* в мозге интактных крыс линий ВП и НП. *Здесь и далее: (ВП n=22), (НП n=19), по вертикальной оси показано относительное значение изменения уровня мРНК (-ΔΔCt), графики представляют медианы, границы квартилей, а также максимальные и минимальные значения анализируемых данных, *p<0,05, критерий Манна-Уитни.*

Как видно из рис. 16 статистически значимые различия в уровне мРНК *il1β* в мозге крыс НП и ВП линий отсутствуют. Однако в отношении *tnf* межлинейные различия выявлены в миндалине (у высоковозбудимых животных линии НП уровень мРНК значимо ниже, чем у низковозбудимых) и в префронтальной коре

(высоковозбудимые животные имеют повышенный уровень экспрессии гена *tnf* по сравнению с низковозбудимыми).

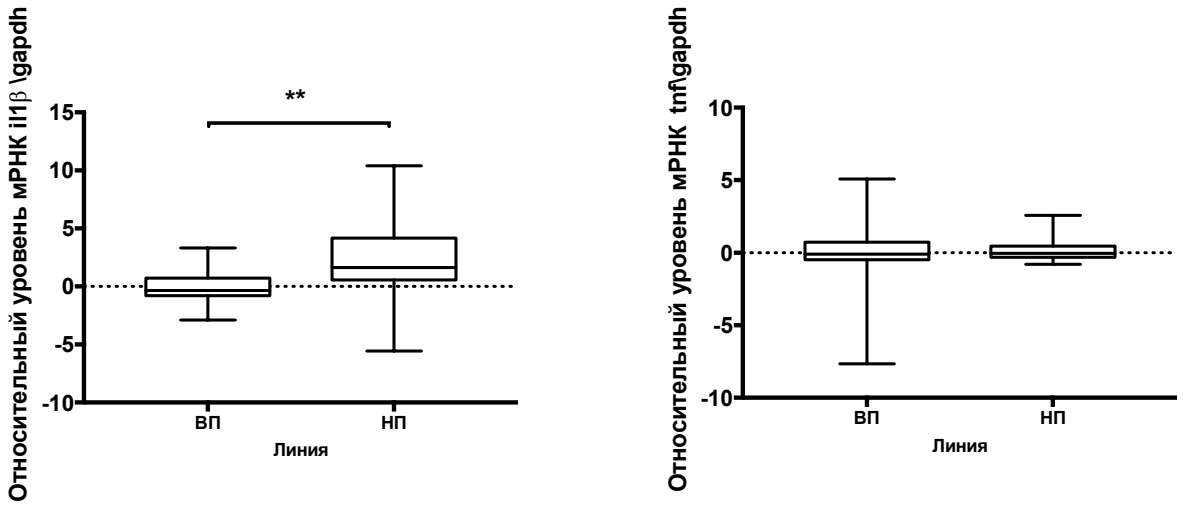

Рис. 17. Уровень мРНК генов *il1β* и *tnf* в крови интактных крыс линий ВП и НП. *Обозначения и размер групп как на Рис. 16; **p<0,01, критерий Манна-Уитни.*

Профиль экспрессии генов провоспалительных цитокинов в периферической крови показывает значимо более высокий уровень мРНК *il1β* у высоковозбудимых животных по сравнению с низковозбудимыми (Рис. 17).

3.3.3.2. Постстрессорные изменения экспрессии генов il1β и tnf в мозге животных с разным уровнем возбудимости нервной системы

Далее сравнение уровня мРНК в крови и в исследованных структурах мозга в каждом временном сроке после стрессового воздействия проводили по отношению к объединенному контролю, так как контрольные животные, декапитированные в разные сроки не отличались по изучаемому параметру (тест Краскела-Уоллиса).

Префронтальная кора

В префронтальной коре значимых постстрессорных изменений уровня мРНК исследуемых цитокинов не обнаружено ни у одной из линий (рис. 18).

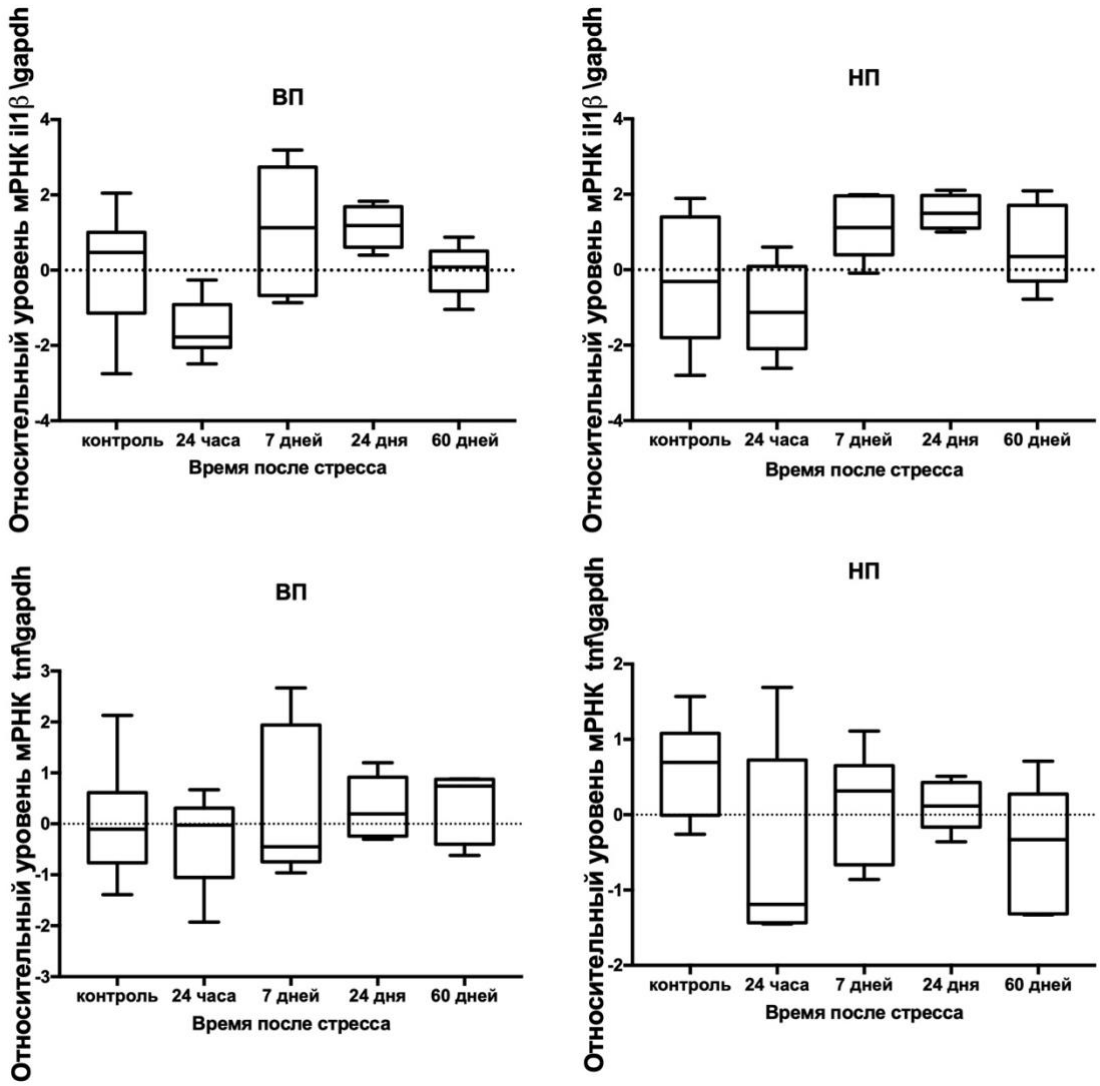

Рис. 18. Уровень мРНК генов *il1β* и *tnf* в префронтальной коре крыс линий ВП и НП в разные сроки после длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия. *Обозначения осей как на Рис. 16; здесь и далее: n=6 в каждой экспериментальной группе в каждой временной точке, объединенный контроль ВП - n=22, НП - n=18; критерий Краскела-Уоллиса, post-hoc анализ критерий Манна-Уитни, поправка FDR.*

Гиппокамп

В гиппокампе через 1 и 7 дней после стресса не было обнаружено значимых различий в уровнях экспрессии генов исследуемых цитокинов по сравнению с контролем ни у одной из линий животных. Через 24 дня после стрессового воздействия уровень мРНК *il1β* в гиппокампе значимо повысился в

экспериментальных группах по сравнению с контрольными животными, независимо от уровня возбудимости нервной системы (рис. 19), однако к 60-му дню после стресса уровень мРНК *il1β* снова не отличался от контроля. Значимых постстрессорных изменений в экспрессии гена *tnf* у экспериментальных животных обеих линий по сравнению с контролем не наблюдалось ни в одной временной точке.

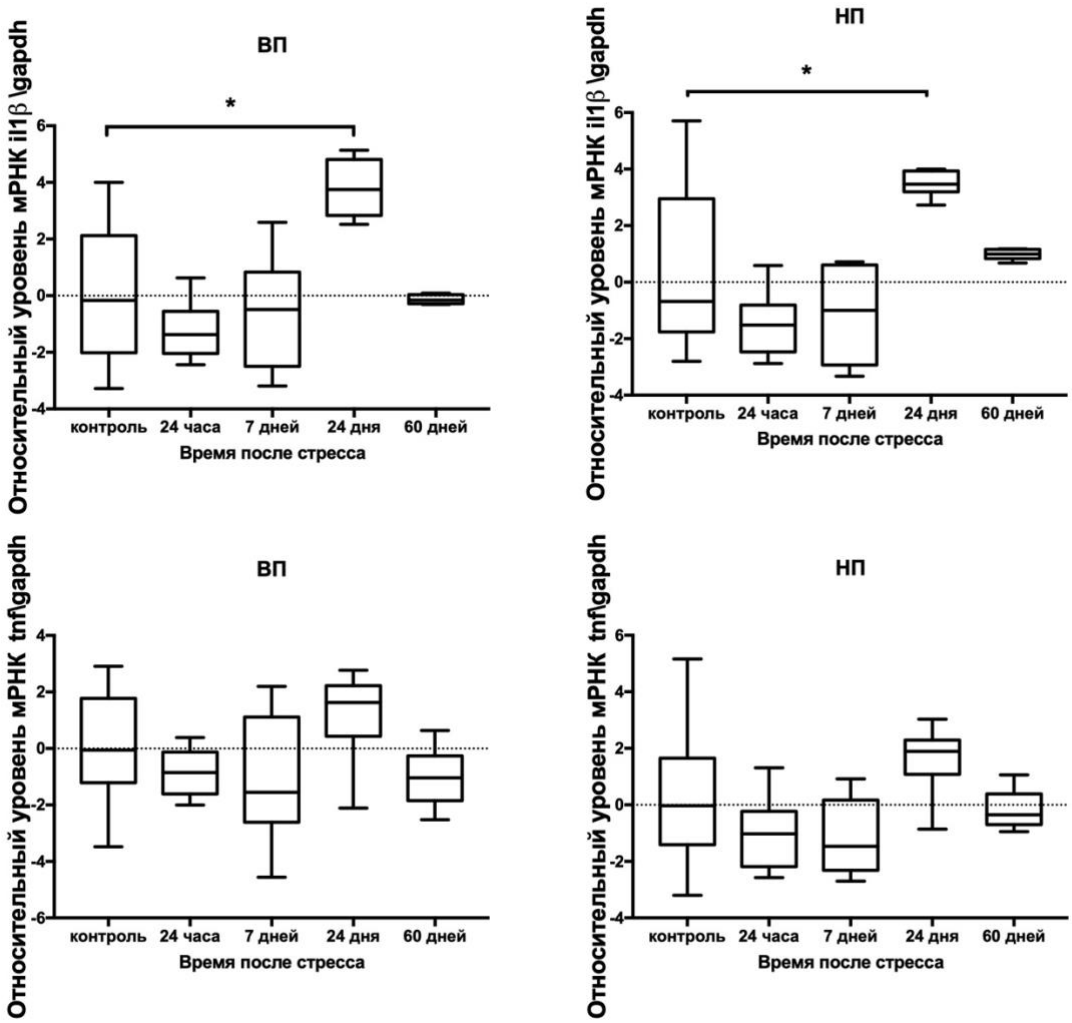

Рис. 19. Уровень мРНК генов *il1β* и *tnf* в гиппокампе крыс линий ВП и НП в разные сроки после длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия. *Обозначения и размер групп как на Рис. 18; *p<0,05, критерий Краскела-Уоллиса, post-hoc анализ критерий Манна-Уитни, поправка FDR.*

Миндалина

У высоковозбудимых крыс линии НП стресс приводил к увеличению экспрессии гена *il1β* через 24 дня после окончания стрессового воздействия (рис. 20). У низковозбудимых животных линии ВП постстрессорных изменений уровня мРНК исследуемых цитокинов в миндалине не наблюдали ни в одной временной точке. Значимых постстрессорных изменений в экспрессии гена *tnf* в миндалине у экспериментальных животных обеих линий по сравнению с контролем не наблюдалось ни в одной временной точке.

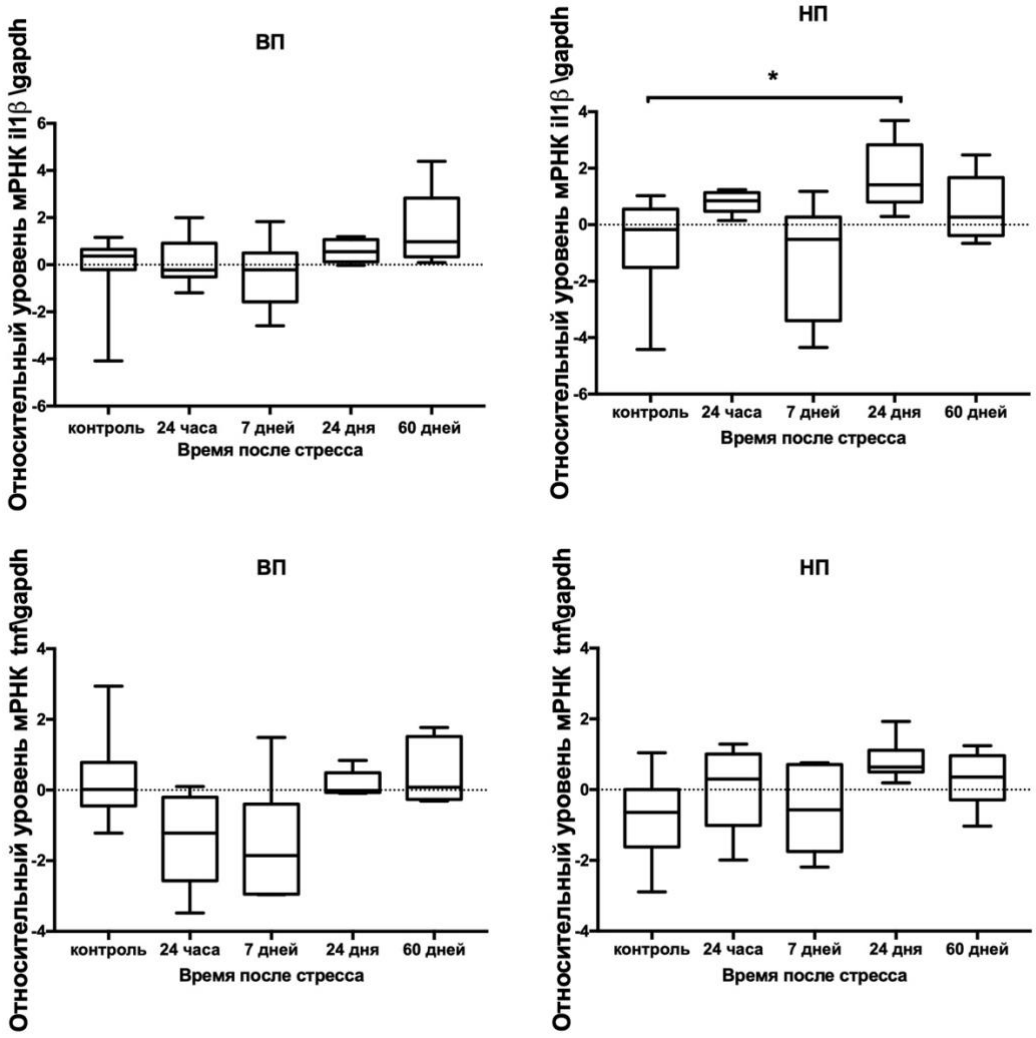

Рис. 20. Уровень мРНК генов *il1β* и *tnf* в миндалине крыс линий ВП и НП в разные сроки после длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия. *Обозначения и размер групп как на Рис. 18; *p<0,05, критерий*

Краскела-Уоллиса, post-hoc анализ критерий Манна-Уитни, поправка FDR.

Кровь

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.21). Во всех остальных временных точках влияния стресса на уровень мРНК исследуемых провоспалительных цитокинов не обнаружено ни у одной из линий животных.

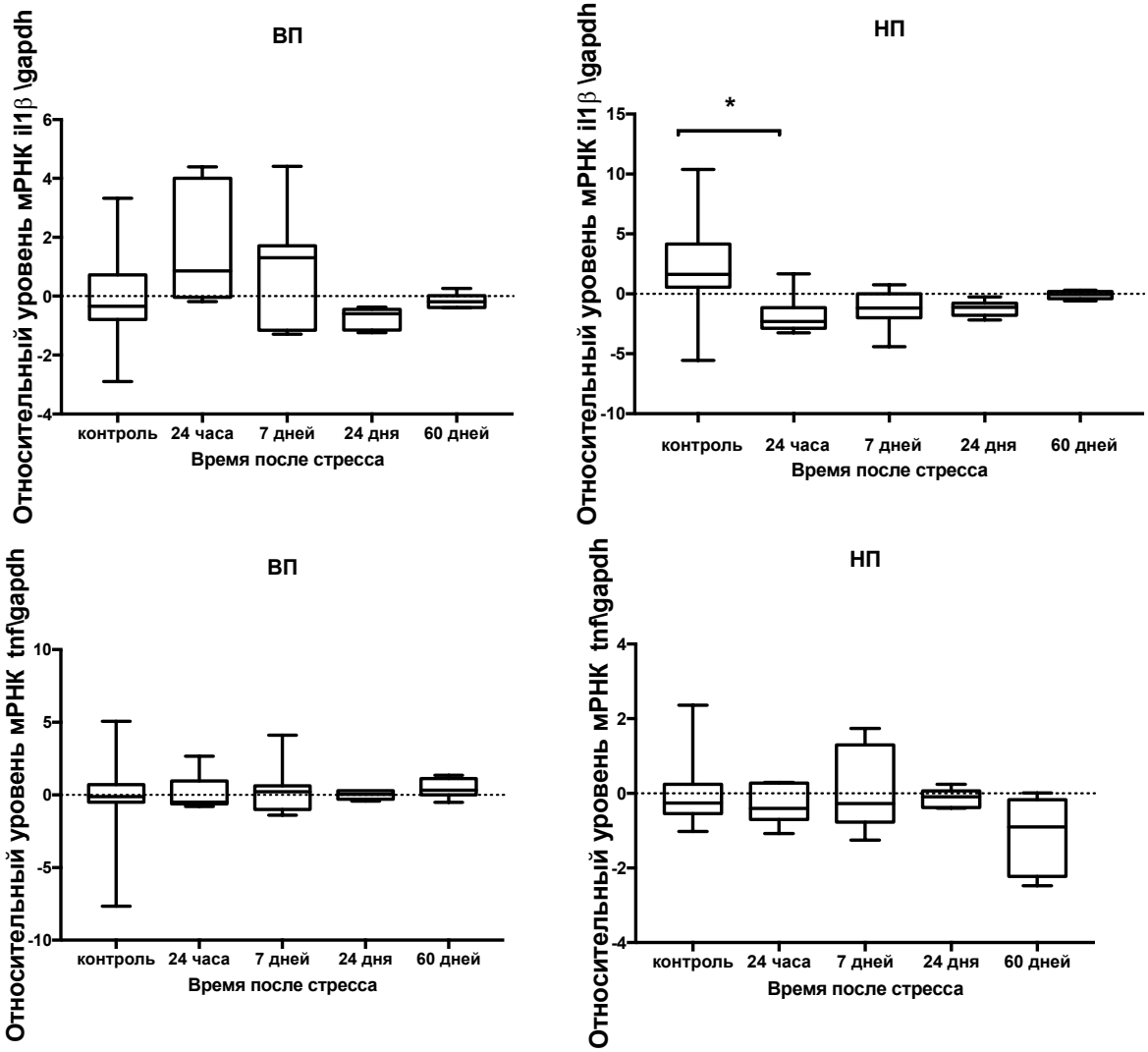

Рис. 21. Уровень мРНК генов *il1β* и *tnf* в крови крыс линий ВП и НП в разные сроки после длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия.

*Обозначения и размер групп как на Рис. 18; *p<0,05, критерий Краскела-Уоллиса, post-hoc анализ критерий Манна-Уитни, поправка FDR.*

3.3.4. Уровень мРНК гена bdnf в мозге крыс с контрастной возбудимостью нервной системы в норме и на разных сроках после длительного эмоционально-болевого стресса

Для оценки межлинейных различий был проанализирован уровень мРНК гена *bdnf* в мозге (ПФК, гиппокамп, миндалина) у интактных животных исследуемых линий (Рис. 22).

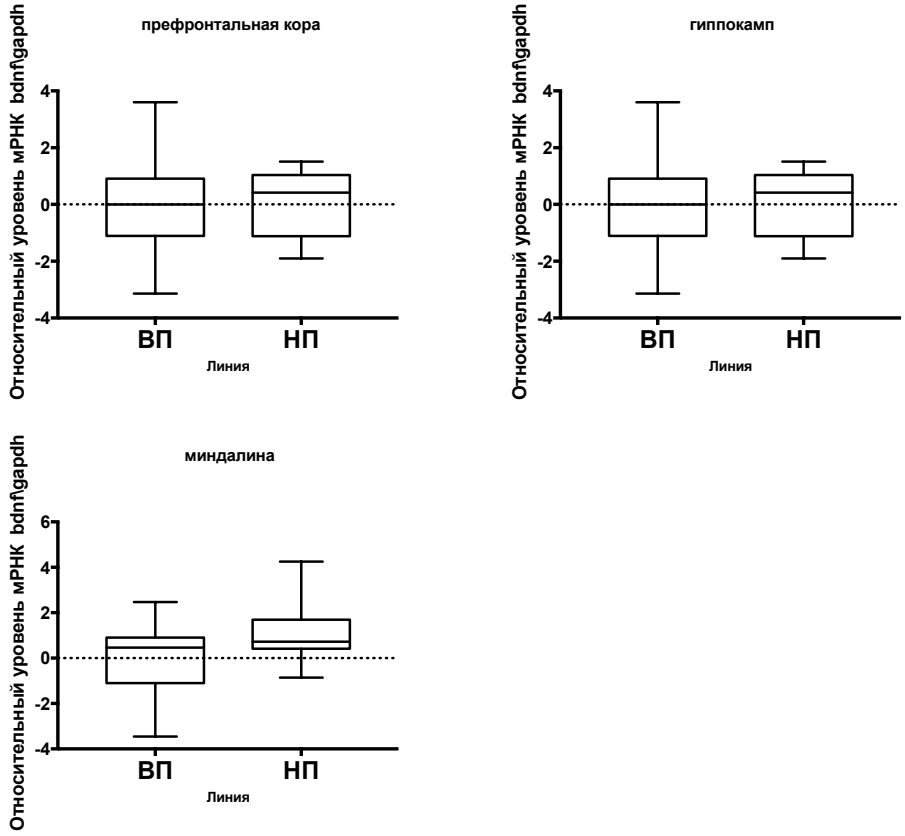

Рис. 22. Уровень мРНК гена *bdnf* в префронтальной коре крыс линий ВП и НП в разные сроки после длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия. *Обозначения и размер групп как на Рис. 16; критерий Манна-Уитни.*

В ПФК 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. 23).

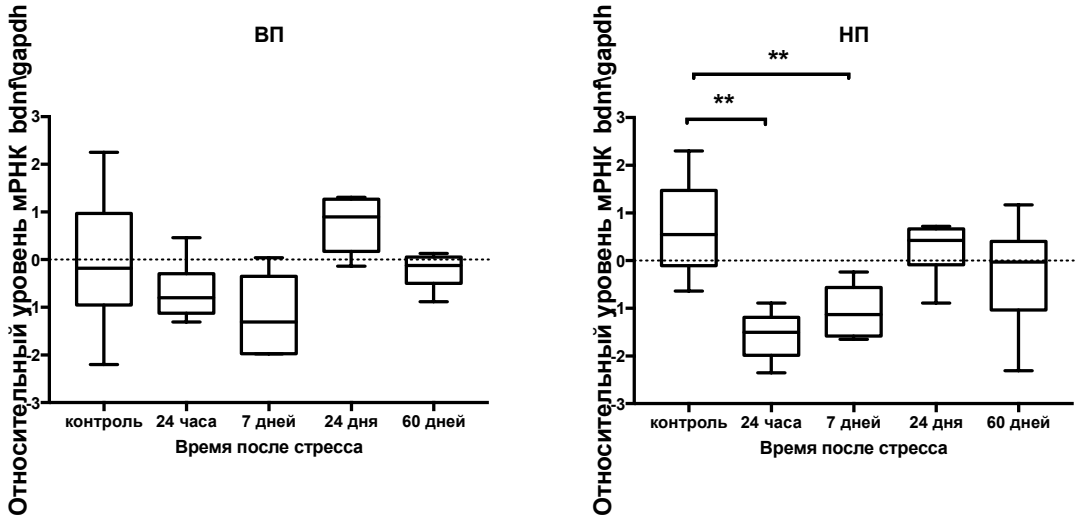

Рис. 23. Уровень мРНК гена *bdnf* в префронтальной коре крыс линий ВП и НП в разные сроки после длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия. *Обозначения и размер групп как на Рис. 18; **p<0,01, критерий Краскела-Уоллиса, post-hoc анализ критерий Манна-Уитни, поправка FDR.*

Рис. 24 показывает, что значимые постстрессорное снижение уровня мРНК *bdnf* в гиппокампе отмечается у высоковозбудимой линии (НП) через 60 дней после стресса. Линия ВП значимых изменений экспрессии в гиппокампе данного трофического фактора не имеет ни в одной временной точке.

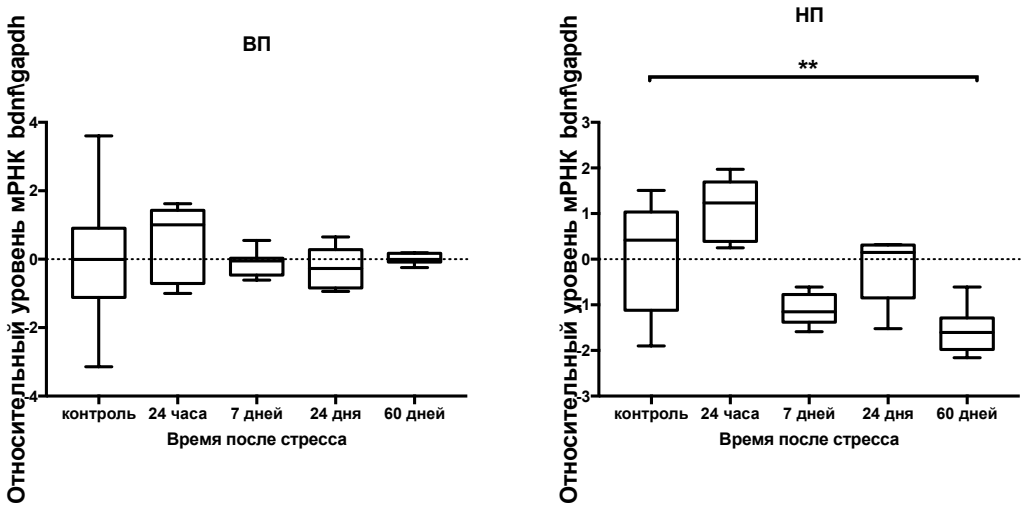

Рис. 24. Уровень мРНК гена *bdnf* в гиппокампе крыс линий ВП и НП в разные

сроки после длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия. *Обозначения и размер групп как на Рис. 18; **p<0,01, критерий Краскела-Уоллиса, post-hoc анализ критерий Манна-Уитни, поправка FDR.*

В миндалине стресс значимо не влиял на уровень экспрессии *bdnf* у крыс обеих линий (Рис. 25).

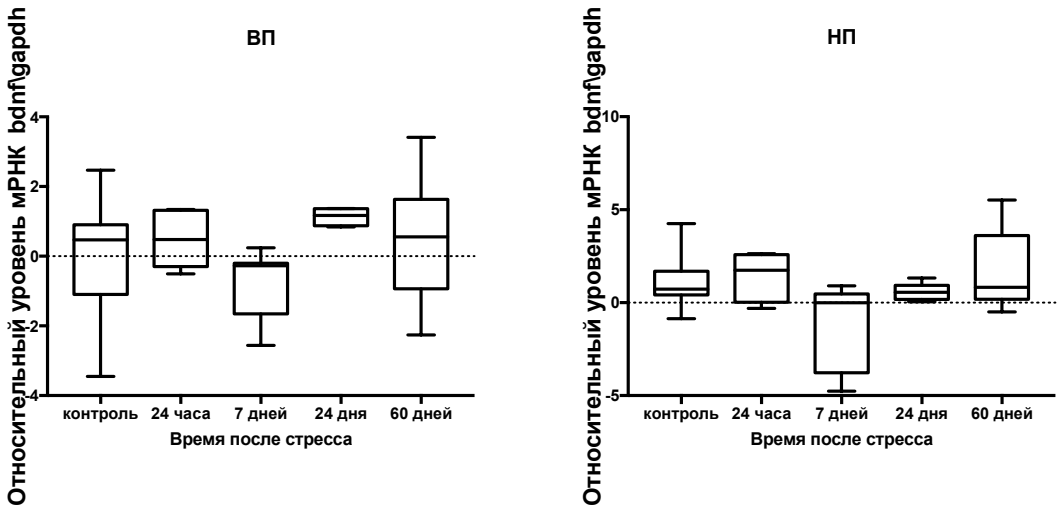

Рис. 25. Уровень мРНК гена *bdnf* в миндалине крыс линий ВП и НП в разные сроки после длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия. *Обозначения и размер групп как на Рис. 18; критерий Краскела-Уоллиса, post-hoc анализ критерий Манна-Уитни, поправка FDR.*

Обсуждение

Для оценки признаков постстрессорного воспаления нами была проведена оценка соотношения нейтрофилов и лимфоцитов у крыс с контрастной возбудимостью в норме и на разных сроках после длительного эмоционально-болевого воздействия. Нейтрофилы – первая линия защиты организма, они быстро мобилизуются во ответ на сигналы о повреждении или вторжении микроорганизма, поглощают чужеродные агенты и выделяют антимикробные факторы и внеклеточные ловушки [Godinho-Silva, Cardoso, Veiga-Fernandes, 2019]. Известно, что симпатическая нервная система ингибирует активацию нейтрофилов.

Норадреналин подавляет хемотаксис нейтрофилов, их активацию и фагоцитирующую функцию при инсультах [Nicholls et al., 2018].

Ноцицепторы, которые активируются некоторыми бактериальными метаболитами выделяют пептид, связанный с геном кальцитонина (CGRP), который снижает активность нейтрофилов и их миграцию в ткани [Baral et al., 2018]. Наш протокол стрессирования связан с длительным болевым воздействием (футшок), возможно сдвиг лейкоцитарной формулы в сторону преобладания нейтрофилов в периферической крови связан с ограничением их миграции в ткани, а не с непосредственной пролиферацией. Нейрональные (ноцицептивные) механизмы иммунного подавления во время бактериальной инфекции или последствия симпатической активации во время стресса, могут быть вредными, но также возможно такая нейромодуляция нейтрофилов является обратной связью для ограничения поражения тканей чрезмерным воспалением [Godinho-Silva, Cardoso, Veiga-Fernandes, 2019].

Животные реагируют на стрессор активацией ГГАКС и высвобождением глюкокортикостероидов из коры надпочечников. Среди многих функций глюкокортикостероиды проявляют гетерогенное воздействие на иммунные клетки: повышенную выживаемость и накопление нейтрофилов в очагах воспаления, индуцируют апоптоз Т - и В-лимфоцитов [Cox, 1995; Flammer, Rogatsky, 2011]. Таким образом, гормоны стресса так же смещают соотношение N:L в сторону увеличения количества нейтрофилов. Известно, что соотношение N:L в периферической крови коррелирует с другими маркерами воспаления (цитокинами, хемокинами), и поэтому индекс сдвига лейкоцитов может быть использован в качестве удобного индикатора как периферического воспаления, так и хронического стресса [Bustan et al., 2018]. Недавние исследования показывают, что он может быть маркером воспалительного процесса, сопровождающего некоторые психические расстройства (депрессия, биполярное расстройство) [Mazza et al., 2018]. Имеются данные о том, что в случае хронического стресса

сдвиг лейкоцитарной формулы является более надежным маркером стресса, чем уровень глюкокортикоидов в крови.

Было показано, что у мышей, крыс и птиц длительный стресс может привести к "адаптации" ГГАКС и снижению уровня глюкокортикоидов в крови, в то время как увеличение соотношения N:L все еще наблюдается даже через неделю после окончания стрессора [Davis, Maney, Maerz, 2008]. Мы не наблюдали каких-либо различий между интактными животными двух линий в соотношении N:L. Таким образом, линии с разной возбудимостью не различаются по исходным соотношениям нейтрофилов и лимфоцитов в периферической крови.

В ответ на стресс значимое изменение соотношения N:L по сравнению с контролем наблюдалось только через 24 часа после воздействия стресса в группе животных линии ВП. Внутри группы стрессированных крыс линии НП наблюдалось значимое увеличение соотношения N:L через 1 и 7 дней после воздействия стресса, а у крыс ВП стресс снижал соотношение N:L через 24 часа после стресса и восстанавливал соотношение до его начальных значений на 7-е сутки.

Животные линии НП характеризуются более высокой возбудимостью не только большеберцового нерва (основной признак для отбора), но и ретикулярной формации среднего мозга, а также миндалевидного тела, которое связано с эмоциональной регуляцией и реакцией на стрессор [Вайдо и др., 2018]. Известно, что подкожное введение кортикостерона мышам в течение 14 дней приводит к гиперактивности миндалины, а также к нарушениям опосредованной миндалиной памяти о травматическом событии [Inagaki, Moriguchi, Fukunaga, 2018]. Ранее было показано, что линия высоковозбудимых крыс НП характеризуется повышенной стрессовой реактивностью ГГАКС, ускоренным развитием гормонального ответа и сниженной чувствительностью ГГАКС к сигналам обратной связи [Ordyan et al., 1998]. Это делает животных этой линии более восприимчивыми к иммунным дисфункциям в ответ на хронический стресс и может привести к чрезмерной активации миндалевидного тела.

При оценке признаков нейровоспаления, нами обнаружено, что у интактных животных высоковозбудимой линии НП было значимо меньше Iba1+ микроглиальных клеток в областях CA1 и CA3 гиппокампа, чем у менее возбудимой линии ВП. При этом, в ПФК межлинейных различий в числе микроглиальных клеток не выявлено. Можно предположить, что в отсутствие стрессора иммунная защита ткани гиппокампа у высоковозбудимых животных ослаблена.

Известно, что клетки микроглии находятся в состоянии покоя в физиологических условиях и сканируют окружающую среду на наличие провоспалительных сигналов [Calcia et al., 2016]. Эти клетки также помогают регулировать функцию мозга, удаляя умирающие нейроны, обрезая нефункциональные синапсы и производя химические сигналы, которые поддерживают выживание нейронов. Есть доказательства того, что клетки микроглии также являются критическими модуляторами нейрональной активности и соответствующих поведенческих реакций у мышей. Микроглия реагирует на активацию нейронов подавлением активности нервных клеток [Badimon et al., 2020]. Таким образом, возможно, снижение количества микроглии в гиппокампе высоковозбудимых животных вносит определенный вклад в повышенную возбудимость их нервной системы.

Не было выявлено никаких изменений в количестве микроглии у крыс ВП стресс по сравнению с контролем, за исключением значимого увеличения числа клеток в области CA1 через 7 дней после стресса (по сравнению с контролем).

У линии высоковозбудимых крыс НП мы наблюдали значимое увеличение количества Iba+ клеток через 7 дней после воздействия стрессора во всех исследованных областях гиппокампа. Для того чтобы определить фенотип этих клеток (относятся ли они к активированной микроглии или к клеткам микроглии “в состоянии покоя”), необходимо изучить другие маркеры нейровоспаления, такие как уровень провоспалительных интерлейкинов, а также оценить морфологию клеток. Из полученных данных мы можем сделать вывод, что, по крайней мере, реакция клеток микроглии на стресс у высоковозбудимых животных более

генерализована и проявляется во всех изученных областях гиппокампа. В литературе есть данные о том, что активированная микроглия стимулирует пресинаптическое высвобождение возбуждающих медиаторов. Было показано, что активированная микроглия также изменяет возбудимость несинаптических мембран в нейронах и синаптическую передачу через фактор некроза опухоли в неокортексе, мозжечке и гиппокампе [Yamamoto et al., 2019]. Возможно, поведенческие аномалии, которые мы наблюдали в ответ на стресс у высоковозбудимых животных, частично связаны с активацией микроглии во всех областях гиппокампа, для проверки данной гипотезы необходимо оценить другие маркеры нейровоспаления, а также морфологические характеристики микроглиальных клеток.

Другим способом оценки признаков постстрессорного воспаления является анализ изменений уровня мРНК основных провоспалительных цитокинов в мозге и крови. Нами обнаружены значимые различия в уровне мРНК цитокинов в крови у интактных животных двух линий, различающихся по уровню возбудимости нервной системы. В крови крыс высоковозбудимой линии (НП) обнаружен более высокий уровень мРНК *il1β* по сравнению с низковозбудимыми животными (ВП). Это согласуется с нашими предшествующими данными о том, что у высоковозбудимых крыс развиваются признаки воспаления в крови в ответ на хронический стресс, что проявляется изменением лейкоцитарной формулы [Shalaginova et al, 2021, Шалагинова и др. 2019].

Мы не обнаружили влияния стресса на экспрессию генов изучаемых цитокинов в крови низковозбудимых крыс линии ВП ни сразу, ни в отдаленные сроки после окончания стрессирования. При этом у высоковозбудимых крыс линии НП значимое снижение уровня мРНК гена *il1β* крови было выявлено через 24 часа после окончания стрессирования по сравнению с контролем. Последнее согласуется с данными о том, что длительный стресс вызывает противовоспалительную реакцию в периферической крови [Sorrells, 2007].

Известно, что связывание глюкокортикоидов (ГК) с глюкокортикоидными

рецепторами (ГР) приводит к изменениям транскрипции нескольких генов, ответственных за противовоспалительный эффект глюкокортикоидов. Было показано, что противовоспалительный эффект комплекса ГК-ГР связан с репрессией таких факторов транскрипции, как NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), активирующий белок - 1 (activating protein-1, AP1) и регуляторный фактор интерферона 3 (Interferon Regulatory Factor 3, IRF3) [Vandevyver, 2013]. Подавление транскрипционной активности этих генов подавляет экспрессию провоспалительных молекул.

Анализ уровня мРНК провоспалительных цитокинов в мозге животных с разной степенью возбудимости показал региональную гетерогенность межлинейных различий и постстрессорных изменений. Так, в гиппокампе нами не выявлено различий в уровнях экспрессии мРНК цитокинов у интактных животных двух линий, при этом через 24 дня после окончания протокола стрессирования уровень мРНК *il1β* увеличился в экспериментальных группах по сравнению с контролем вне зависимости от уровня возбудимости. Полученные результаты хорошо согласуются с имеющимися в литературе данными о том, что в ЦНС, в отличии от периферии, высокие дозы ГК или длительный стресс приводят к усилению выработки медиаторов воспаления и активации микроглии [Dantzer, 2018; Sorrells, Sapolsky, 2007].

Ранее нами показано [Shalaginova et al., 2021], что увеличение количества клеток микроглии наблюдается через 7 дней после стресса в зубчатой извилине (DG), CA1 и CA3 полях гиппокампа у животных линии НП, и в поле CA1- у крыс линии ВП, что не совпадает по времени с увеличением уровня экспрессии гена *il1β* в данной работе, которое происходит только на 24 день, на фоне нормализации количества клеток микроглии. Активация и пролиферация микроглии и трафик моноцитов из крови в мозг, являясь основными источниками IL1β и TNF, происходят с некоторым латентным периодом. С этим может быть связана описанная выше задержка. С другой стороны, возможно на сроке 7 дней, несмотря на увеличение количества микроглии в гиппокампе, адаптивные механизмы позволяют сдерживать экспрессию провоспалительных цитокинов и тормозить

развитие нейровоспаления через экспрессию микроРНК, регулирующих воспаление и/или через экспрессию противовоспалительных цитокинов, например, IL-10, который может стимулировать синтез антагониста IL1β (IL-1Ra). Для детально прояснения данного вопроса необходимо изучение постстрессорных изменений не только про-, но и антивоспалительных сигналов.

В других изученных регионах мозга мы наблюдали иные особенности экспрессии генов цитокинов. В ПФК обнаружены межлинейные различия: у высоковозбудимых животных значимо выше экспрессия гена *tnf* по сравнению с низковозбудимыми. С другой стороны, в миндалине, напротив, высокая возбудимость связана с более низким уровнем мРНК *tnf*. Известно, что TNF, сектетируемый в мозге глиальными клетками, участвует в регуляции экспрессии AMPA-рецепторов в нейронах коры и гиппокампа. В культуре и на срезах гиппокампа показано, что TNF увеличивает количество AMPA-рецепторов на синаптической мембране [Beattie et al., 2002]. Естественно такое увеличение числа рецепторов к глутамату приводит к быстрым изменениям возбудимости и синаптической пластичности. Интересно, что этот цитокин также приводит к усилению эндоцитоза ГАМКа-рецепторов, что приводит к снижению ингибиторных сигналов и также может влиять на возбудимость [Lewitus et al., 2014]. Описанные выше эффекты наблюдаются в гиппокампе и коре, но нейроны стриатума напротив, показывают интернализацию AMPA-рецепторов [Lewitus et al., 2014] в ответ на TNF. Стереотаксические инъекции TNF в миндалину крыс нарушают процессы запоминания страха, действуя, вероятно, через NMDA рецепторы [Jing et al., 2015].

Таким образом, в литературе описаны региональные различия в воздействии цитокинов на одни и те же физиологические процессы, и возможно, что действие TNF в префронтальной коре приводит к повышению возбудимости нейронов, а в миндалине, напротив, к снижению возбудимости. В этом случае можно сформулировать гипотезу о том, что конститутивно более высокий уровень TNF в коре и более низкий уровень в миндалине у животных линии НП по сравнению с ВП способствует более высокой возбудимости первых. Экспериментальная

проверка этой гипотезы представляется многообещающей в связи с тем, что ранее у крыс высоковозбудимой линии НП была обнаружена более высокая фоновая импульсация нейронов миндалины по сравнению с ВП [Sivachenko et al., 2020].

В миндалине в ответ на стресс мы наблюдали повышенный по сравнению с контролем уровень мРНК *il1β* только у высоковозбудимых животных линии НП через 24 дня после стресса. В префронтальной коре значимых изменений уровня мРНК исследованных провоспалительных цитокинов в ответ на стресс не обнаружили ни у одной из линий.

Сравнительный анализ уровня мРНК *bdnf* в префронтальной коре, гиппокампе и миндалине интактных крыс двух линий ВП и НП указывает на отсутствие межлинейных различий в значениях этого показателя.

При этом обнаружено, что длительное эмоционально-болевое стрессорное воздействие оказывает влияние на экспрессию гена *bdnf* в префронтальной коре и гиппокампе высоковозбудимых крыс линии НП. У крыс данной линии в префронтальной коре снижен уровень мРНК *bdnf* по сравнению с контролем через 1 и 7 суток, а в гиппокампе — только через 60 суток после стрессирования. У низковозбудимых животных линии ВП экспрессия гена *bdnf* в изученных структурах мозга в ответ на длительное эмоционально-болевое воздействие не снижалась ни в одной из временных точек после стрессирования.

Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) относится к семейству нейротрофинов и имеет решающее значение для развития мозга, нейрогенеза и синаптической пластичности. Измененный уровень BDNF обнаружен у пациентов с психическими и неврологическими заболеваниями [Chen, Chen, 2017]. Известно, что BDNF может повышать толерантность нервной системы к действию неблагоприятных факторов среды [Баранова, Рыбникова, Самойлов, 2015]. Эффект зависит от отдела мозга, типа клеток, характеристик стимула. При моделировании у крыс тревожно-подобных состояний иммунореактивность к BDNF в нейронах коры и гиппокампа значимо снижается [Баранова, Рыбникова, Самойлов, 2015]. В моделях данных патологий у животных наблюдали и снижение основных

регуляторов экспрессии BDNF — транскрипционных факторов CREB и NF-κB [Ветровой и др., 2014].

Накоплено достаточное количество доказательств тому, что стресс приводит к снижению экспрессии BDNF не только на уровне белка, но и на уровне мРНК [Choy et al., 2008; Grønli et al., 2006; Murakami et al., 2005]. Хроническое воздействие глюкокортикоидов, обычно используемое в качестве редукционистской модели хронического стресса, также приводит к снижению экспрессии *bdnf* [Smith, 1995]. Это свидетельствует о том, что влияние стресса на экспрессию гена *bdnf* определяется специфическим контролем глюкокортикоидных гормонов. Таким образом, полученные нами данные о снижении уровня мРНК *bdnf* в ответ на длительное эмоционально-болевое стрессирование у уязвимых к действию стрессоров высоковозбудимых животных находятся в соответствии с ранними исследованиями, которые показали, что высоковозбудимые животные НП имеют повышенную по сравнению с альтернативной линией ВП стресс-реактивность гипофизарно-адренокортикальной системы, более быстрое развитие гормонального ответа на стрессор и сниженную чувствительность ГГАКС к сигналам обратной связи [Ордян и др., 1998].

При оценке реакции на стресс важно учитывать региональную специфичность ответа. Так, известно, что хронический стресс оказывает противоположное влияние на синаптическую пластичность в гиппокампе и миндалине: в гиппокампе плотность дендритных шипиков и уровень нейротрофина снижаются, а в миндалине — возрастают [Lakshminarasimhan, Chattarji, 2012].

В нашем исследовании стресс не повлиял на уровень мРНК *bdnf* в миндалине ни у одной из исследуемых линий крыс, а в гиппокампе снижение мРНК *bdnf* происходило только у высоковозбудимых крыс линии НП на отдаленном сроке — 60 дней после стрессирования. Возможно, выявленная специфичность связана с особенностями долгосрочных изменений эпигенетической регуляции, обнаруженных ранее в этих отделах мозга крыс при действии длительного

эмоционально-болевого стрессорного воздействия [Дюжикова, Даев, 2018].

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.

Можно заключить, что стресс вызывает более выраженный провоспалительный ответ в ЦНС у животных высоковозбудимой линии (НП) по сравнению с низковозбудимой (ВП), поскольку у высоковозбудимых животных мы наблюдали сдвиг лейкоцитарной формулы крови, свидетельствующий о развитии воспаления, увеличение числа микроглиальных клеток во всех исследуемых зонах гиппокампа через 7 дней после стресса по сравнению с контролем, увеличение уровня мРНК провоспалительных цитокинов не только в гиппокампе, но и в миндалине через 24 дня после стресса. Кроме того, у высоковозбудимых крыс линии НП длительное эмоционально-болевое стрессирование приводит к снижению уровня мРНК *bdnf* в префронтальной коре через сутки после окончания стрессирования и такое снижение сохраняется на протяжении одной недели.

3.4. Показатели разнообразия и представленность микроорганизмов в стуле крыс с контрастной возбудимостью нервной системы в норме и в разные сроки после длительного эмоционально-болевого стрессирования

3.4.1. Показатели разнообразия микробиоты у интактных крыс

Индексы Shennon и Chao1 позволяют оценить альфа разнообразие микробиомов, основываясь на статистическом анализе полученных данных. Сравнительный анализ этих индексов в контрольных группах животных с контрастной возбудимостью нервной системы (Рис. 26), свидетельствует о значимо более низком значении обоих индексов у высоковозбудимых животных (линия НП) по сравнению с низковозбудимой линией ВП.

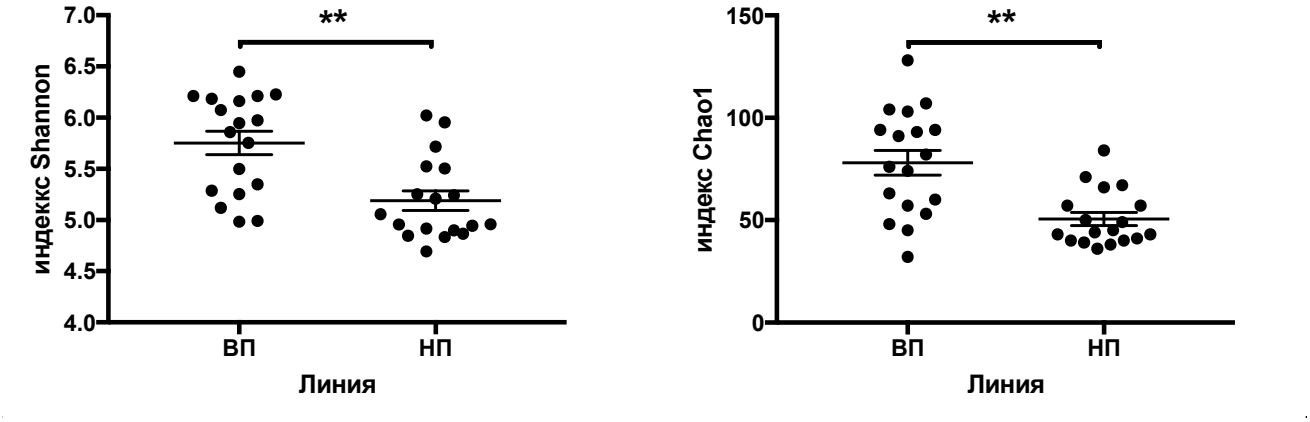

Рисунок 26. Сравнительный анализ индексов микробного разнообразия Shennon и Chao1 в стуле интактных животных линий ВП и НП. *n=18 в каждой группе, графики представляют среднее и SEM, **p<0,01, непарный t-тест.*

3.4.2. Разнообразие микробиоты кишечника крыс на разных сроках после длительного эмоционально-болевого воздействия

Одномерный дисперсионный анализ с повторными измерениями (ANOVA), с использованием метода коррекции Гринхауза-Гейссера не выявил значимых изменений индексов разнообразия в экспериментальных группах на разных сроках после ДЭБС по сравнению с состоянием до стресса ни у одной из линий крыс (Рис. 27).

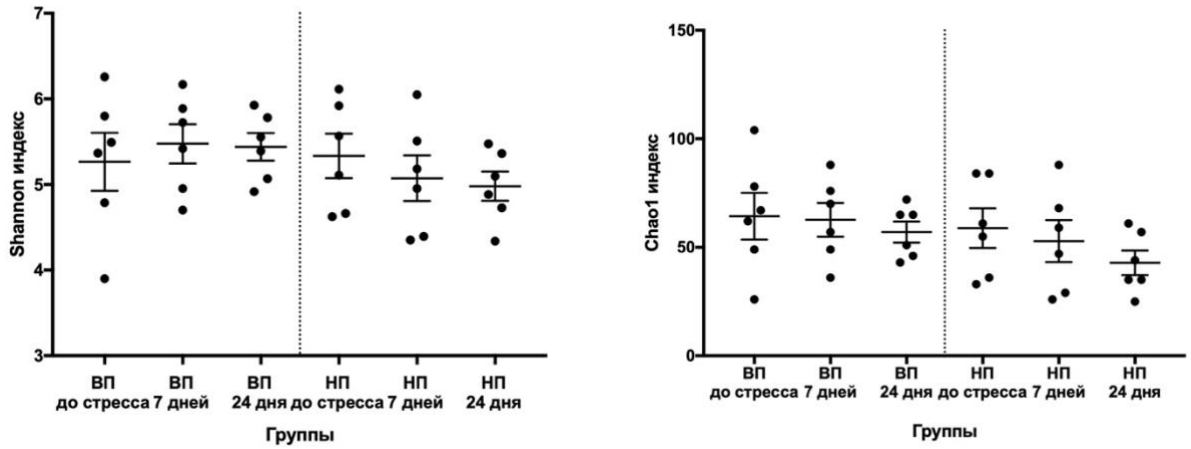

Рисунок 27. Сравнительный анализ индексов микробного разнообразия Shennon и Chao1 в стуле стрессированных животных линий ВП и НП. *n=6 в каждой группе, графики представляют среднее и SEM; одномерный дисперсионный анализ*

с повторными измерениями (ANOVA), с использованием метода коррекции Гринхауза-Гейссера.

3.4.3. Таксономическое разнообразие микробиоты стула крыс с контрастной возбудимостью нервной системы на уровне рода в норме и в разные сроки после длительного эмоционально-болевого воздействия

Микробиом стула животных из группы с высоким порогом возбуждения, не подвергавшихся стрессу, содержал значимо меньше бактерий из родов *Blautia, Collinsella, Methanobrevibacter*, и больше представителей рода *Prevotella*, чем микробиом стула крыс с низким порогом возбудимости нервной системы (Рис. 28).

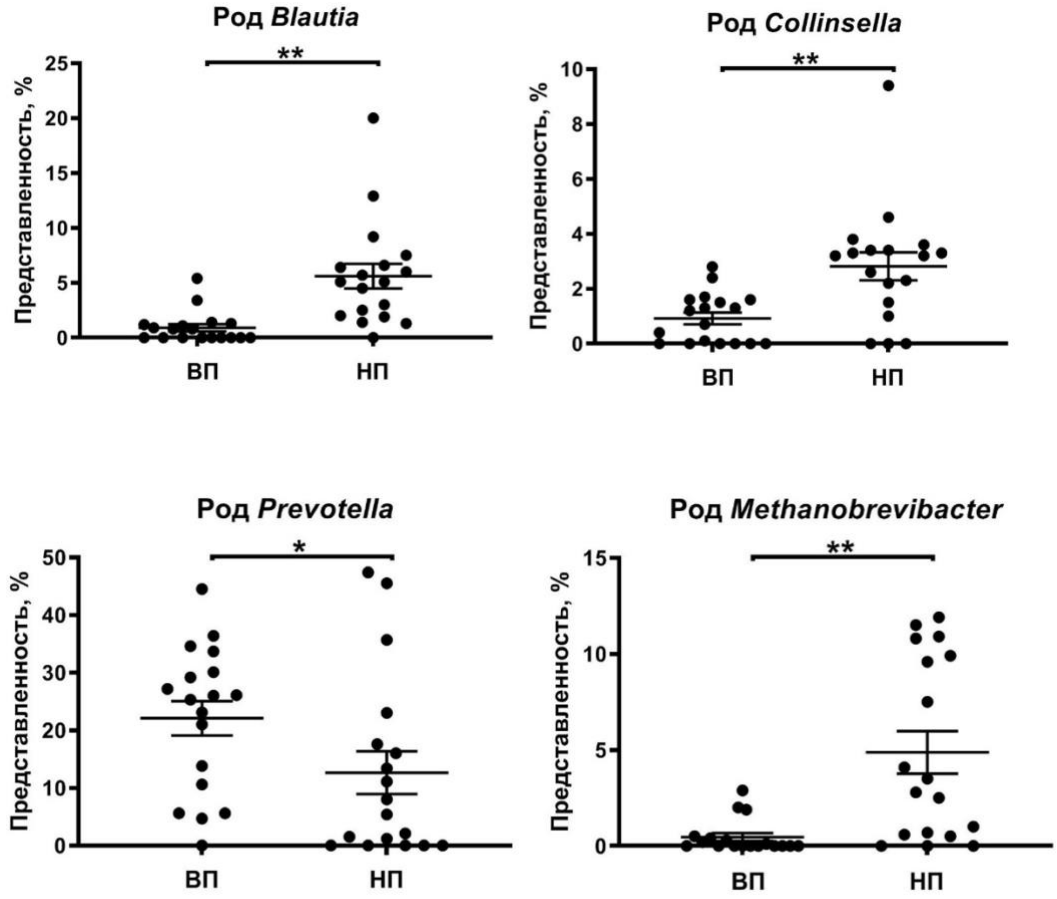

Рисунок 28. Анализ межлинейных различий в содержании некоторых представителей микробного сообщества в стуле интактных животных.

*n=18, графики представляют среднее и SEM, **p<0,01, *p<0,05, критерий Манна-Уитни.*

Поскольку мы оценивали состав кишечной микробиоты в экспериментальных группах до воздействия стресса, было возможно сравнить соответствующие контрольные группы с экспериментальными животными до процедуры ДЭБС. Мы обнаружили, что в некоторых случаях (рис. 29) контрольные группы значимо отличались от экспериментальных групп до воздействия стресса, что делает некорректным сравнение контрольных групп с экспериментальными для оценки эффекта стресса.

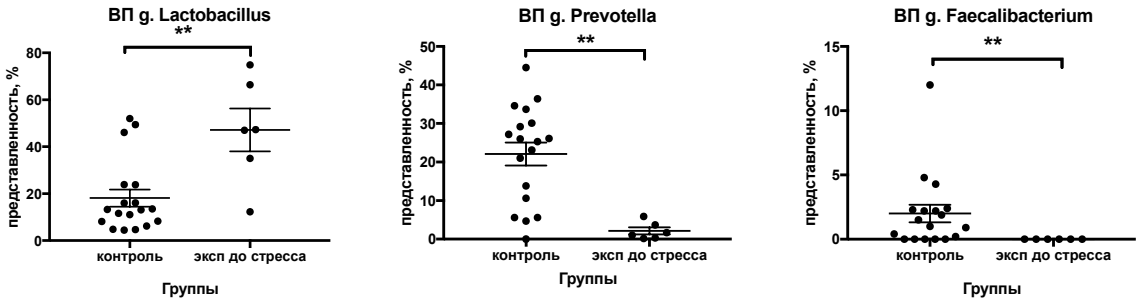

Рис. 29. Значимые различия в показателях представленности бактерий в микробиоме кишечника контрольных крыс линии ВП и соответствующих экспериментальных групп до стресса. *«Эксп до стресса» - экспериментальная группа линии ВП до воздействия стресса, ** - p<0,01, критерий Манна-Уитни.*

Далее мы анализировали постстрессорные изменения показателей представленности бактерий на уровне рода внутри экспериментальных групп каждой линии.

Наибольшие изменения в представленности бактерий в стуле животных с высоким порогом возбудимости и, подвергавшихся стрессу, отмечены для бактерий рода *Lactobacillus*. Содержание бактерий рода *Lactobacillus* в стуле животных линии ВП начинает снижаться к 7-му дню после стресса, однако порога значимости такое снижение достигает к 24-му дню после воздействия стресса.

Также у крыс линии ВП наблюдается значимый рост представителей *Faecalibacterium* на 7й день и *Prevotella* на 7й и 24й дни после стресса (Рис. 30).

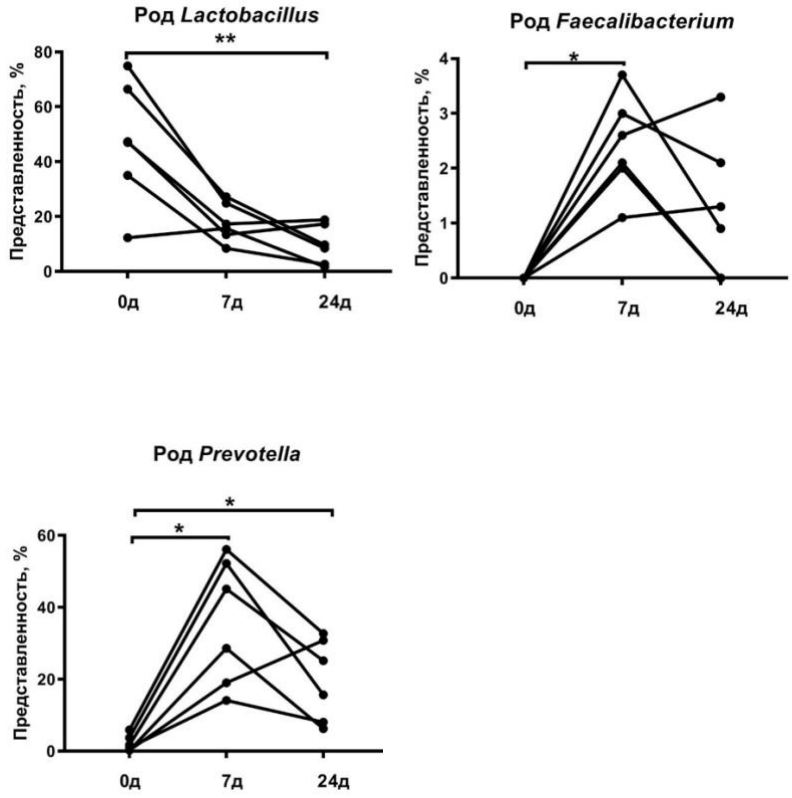

Рисунок 30. Статистически значимые отличия в представленности бактерий в микробиоте стула крыс линии ВП на разных сроках после воздействия стрессора. *Здесь и далее: 0д – экспериментальная группа до воздействия стресса, 7 д и 24 д – экспериментальная группа после окончания стрессирования через 7 и 24 дня соответственно; n=6 в каждой временной точке, **p<0,01, *p<0,05, тесты Фридмана и Вилкоксона.*

В микробиоте стула животных с низким порогом возбудимости, подвергавшихся стрессированию, содержание бактерий из рода *Lactobacillus* так же значимо снижается к 24му дню после окончания действия стресса (Рис. 31). В отношении представленности остальных родов бактерий, значимых постстрессорных изменений в экспериментальной группе не наблюдается.

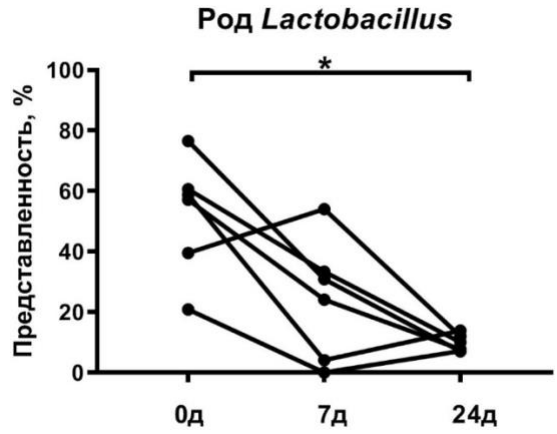

Рисунок 31. Статистически значимые отличия в представленности бактерий в микробиоте стула крыс линии НП на разных сроках после воздействия стрессора. *Обозначения и размер групп как на Рис. 30; **p<0,01, *p<0,05, тесты Фридмана и Вилкоксона.*

Рисунки 32 и 33 также отражают постстрессорные количественные изменения представленности различных родов бактерий в стуле экспериментальных крыс исследованных линий.

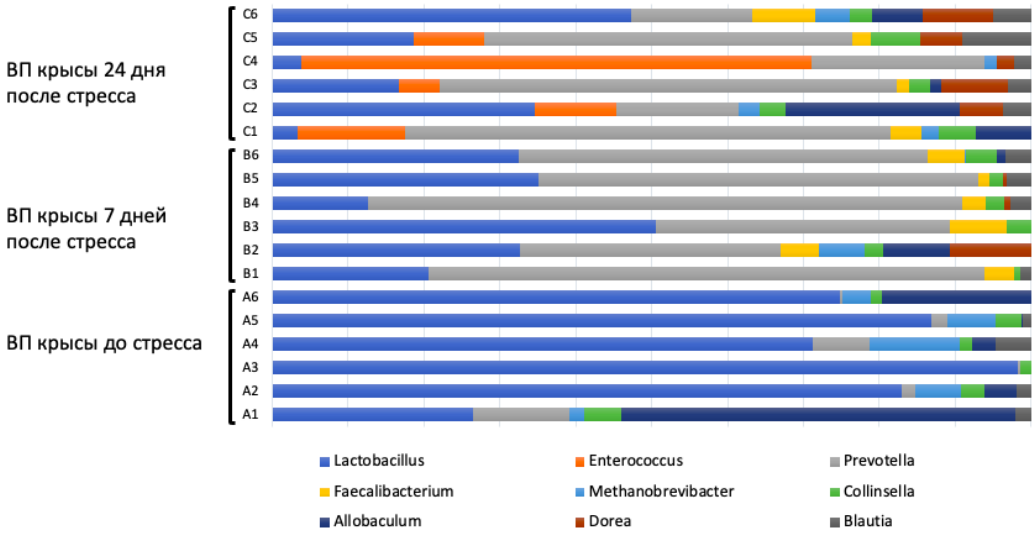

Рисунок 32. Постстрессорные изменения представленности различных родов бактерий в стуле экспериментальных крыс линии ВП. *Здесь и далее: A, B, C – одни и те же животные в разное время после стресса.*

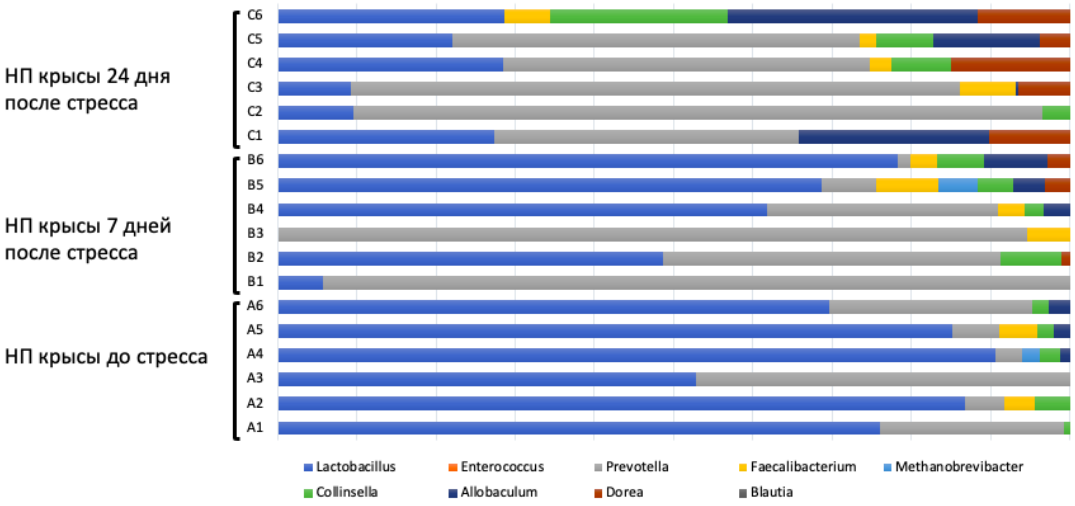

Рисунок 33. Постстрессорные изменения представленности различных родов бактерий в стуле экспериментальных крыс линии НП. *A, B, C – одни и те же животные в разное время после стресса.*

На рис. 34 показаны постстрессорные изменения в микробиоте на уровне типов микроорганизмов у крыс двух линий.

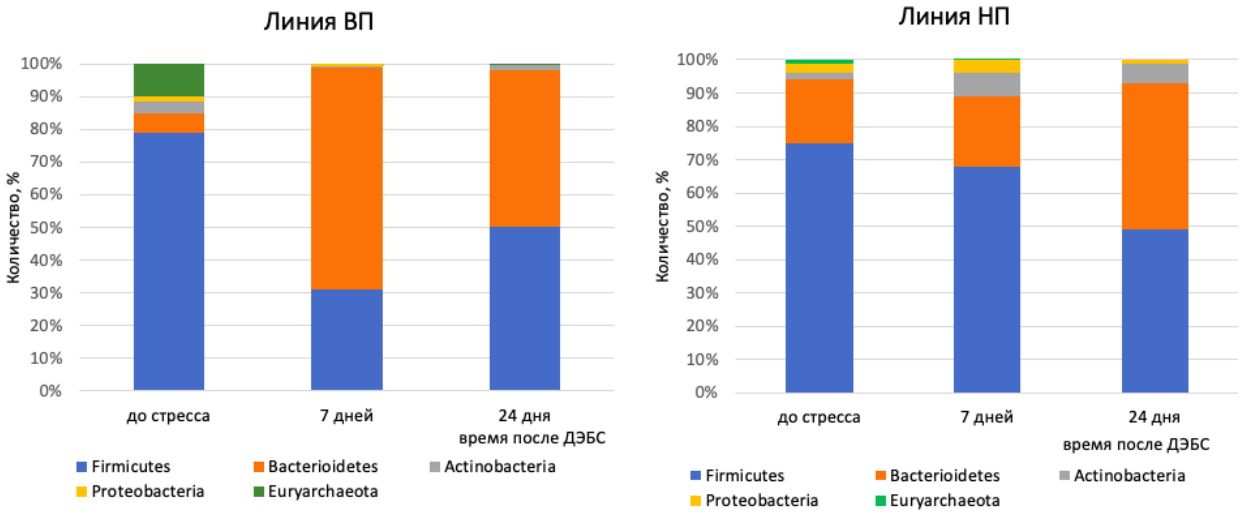

Рисунок 34. Постстрессорные количественные изменения представителей различных типов микроорганизмов у экспериментальных крыс линий ВП и НП.

Как видно из рисунка 34, до стресса у крыс обеих линий представленность *Firmicutes* преобладает над всеми остальными. После стресса (на 7-й день) у животных линии ВП *Firmicutes (31%)* вытесняются *Bacteroidetes* (68%), но на том

же сроке (7 дней после стресса) у животных линии НП *Firmicutes* по-прежнему преобладают над *Bacteroidetes*.

Обсуждение

Микробиота кишечника недавно была идентифицирована как фактор, активно влияющий на развитие нервной системы организма-хозяина, функциональное состояние мозга и поведение. Начали проясняться молекулярные механизмы нейровоспаления, модулируемого микробиотой, действующего как локально, так и системно. Было показано, что метаболиты кишечной микробиоты ингибируют гистондеацетилазы хозяина (HDACs), посттрансляционные модификаторы гистонов, тем самым влияя на активацию транскрипции генов хозяина [Alam, Abdolmaleky, Zhou, 2017, Paul et al., 2015]. Показано, что стойкие изменения в кишечном микробиоме могут привести к увеличению выработки провоспалительных цитокинов, вызывая повышенную проницаемость кишечника [Konjevod et al., 2021]. Это может способствовать увеличению транзита липополисахаридов и нейроактивных бактериальных метаболитов в кровоток, в конечном итоге получая доступ к мозгу и вызывая нейровоспаление [Tinkov et al., 2021].

Дисбактериоз кишечника также может спровоцировать стимуляцию иммунной системы в сочетании с повышенной проницаемостью кишечного барьера, что может привести к локальному и систематическому воспалению наряду с активацией нейроглии, что может привести к патологии альфа-синуклеина и, в конечном итоге, к нейродегенерации.

Известно, что стресс изменяет состав кишечной микробиоты, в частности, уменьшая относительную численность представителей родов *Lactobacillus, Bifidobacterium* [Marin et al., 2017] и увеличивая количество бактерий родов *Odoribacter, Mucisprillum* и *Clostridium* [Galley et al., 2014]. Знание точных таксономических изменений микробного сообщества под воздействием стресса может дать полезные рекомендации по использованию соответствующих пробиотиков.

Повышенный уровень мРНК *il1β* в крови у интактных высоковозбудимых животных линии НП по сравнению с низковозбудимыми согласуется со сниженными показателями альфа-разнообразия (индексы Shannon, Chao1) кишечной микробиоты у первых. В литературе есть данные о том, что высокое альфа разнообразие микробиоты кишечника обычно связано с более низкими уровнями провоспалительных цитокинов в крови и мозге. Так, у людей с высоким альфа разнообразием микробиоты кишечника отмечены более низкие уровни провоспалительных цитокинов в крови, чем у людей с низким альфа разнообразием микробиоты кишечника [Knights и др., 2014].

В другом исследовании [Wong et al., 2016] авторы обнаружили, что активация инфламмасомы может увеличить уровень провоспалительных цитокинов (IL1β и IL-18) в мозге крыс и привести к изменениям в микробиоте кишечника, было обнаружено, что активация инфламмасомы приводит к снижению индекса разнообразия микробиоты.

Вызванные стрессом изменения функций ЦНС связывают с измененными иммунорегуляторными реакциями, которые могут в значительно степени быть связаны с изменениями в микробиоте [Bharwani et al., 2016], как это было продемонстрировано у самцов мышей C57BL/6, которые подвергались хроническому стрессу социального поражения. Также было показано [Brandon-Mong et al., 2020], что травматические повреждения периферических нервов (физический стресс) могут изменять микробное разнообразие и стабильность кишечника, о чем говорят так же снижение индексов Chao1 и Shannon у экспериментальных животных.

Таким образом, существует связь между альфа разнообразием микробиоты кишечника и уровнем провоспалительных цитокинов в крови и мозге как у животных, так и у людей. Однако точная причинно-следственная связь между этими факторами на данный момент не установлена.

В литературе имеются данные, свидетельствующие о том, что генетически детерминированные особенности различных линий грызунов, по-видимому, могут влиять на разнообразие микробиоты кишечника. Так, у мышей линии C57BL/6J

обнаружены более высокие показатели разнообразия и стабильности микробиоты кишечника в нормальных условиях по сравнению с мышами линии BALB/c. Интересно, что при этом линя BALB/c считается более подверженной иммунным дисфункциям [Guo и др., 2022], а так же в ответ на стресс демонстрируют более высокий уровень кортикостерона и большую выраженность тревожно-подобных симптомов по сравнению с мышами C57BL/6J [Priebe и др., 2005].

Мы также обнаружили изменения в относительной представленности в стуле крыс некоторых родов кишечных бактерий в ответ на стресс. Мы наблюдали снижение представленности бактерий рода *Lactobacillus* у животных обеих линий через 24 дня после воздействия стрессора по сравнению с состоянием до стресса.

Это согласуется с данными литературы о том, что воздействие стрессора изменяет состав бактериального сообщества и снижает относительную встречаемость представителей рода *Lactobacillus* [Galley et al., 2014]. Недавно была продемонстрирована способность бактерий рода *Lactobacillus* подавлять экспрессию провоспалительных цитокинов у животных, подвергшихся стрессу [Youn et al., 2021]. Возможно, постстрессорный дефицит данных бактерий связан с выраженной экспрессией провоспалительных цитокинов, которую мы наблюдали у крыс обеих линий, однако более выражено у высоковозбудимых животных НП.

Нами показано, что встречаемость микроорганизмов рода *Prevotella* увеличивается в кишечнике крыс после стресса, но только в группе низковозбудимых животных линии ВП. Ранее было показано, что использование высоких и низких температур в качестве стрессовых факторов вызывало значительное увеличение числа представителей семейства *Prevotellaceae* в кишечнике мышей [Yi et al., 2021]. Род *Prevotella* были значимо более представлен в кишечной микрофлоре крыс в моделях синдрома раздраженного кишечника (СРК), вызванных стрессом [Hu et al., 2021].

Мы наблюдали увеличение встречаемости бактерий рода *Faecabacterium* в стуле низковозбудимых крыс (линия ВП) на 7-й день после стресса по сравнению с состоянием до воздействия. Есть данные, что представители рода *Faecabacterium* оказывают профилактическое и терапевтическое действие на хронические

депрессивные и тревожно-подобные состояния, вызванные стрессом, у крыс [Hao et al., 2019]. Возможно подобное увеличение встречаемости бактерий рода *Faecabacterium* может быть одним из факторов, повышающих адаптационный потенциал линии ВП и отсутствие постстрессорных поведенческих аномалий у животных ВП вплоть до 60го дня, а также меньшую выраженность постстрессорного нейровоспаления по сравнению с более уязвимой линией НП. Тем не менее, к 24-му дню после стресса количество бактерий рода *Faecabacterium* у животных ВП снизилось до исходных значений.

Также нами обнаружено изменение соотношения микроорганизмов, относящихся к типам *Firmicutes* и *Bacteroidetes* в кишечной микробиоте в ответ на длительное эмоционально-болевое стрессирование у крыс обеих линий. До стресса у крыс обеих линий представленность типа *Firmicutes* преобладает над всеми остальными, что согласуется данными литературы о нормальной микробиоте кишечника как грызунов, так и человека [Ley, Peterson, Gordon, 2006; Zhang и др., 2012]. После стресса (на 7-й день) у животных линии ВП бактерии типа *Firmicutes* вытесняются *Bacteroidetes*, но на том же сроке (7 дней после стресса) у животных линии НП *Firmicutes* по-прежнему преобладают над *Bacteroidetes*. Эти результаты соответствуют ранее опубликованным исследованиям, в которых было показано, что стресс может приводить к дисбалансу микробиоты кишечника и изменению соотношения между *Firmicutes* и *Bacteroidetes*. Например, исследование на животных показало, что стресс может увеличивать количество бактерий типа *Bacteroidetes* и снижать представленность типа *Firmicutes* в кишечной микробиоте (Bailey et al., 2011).

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что микробиота кишечника линии ВП в норме более разнообразна и менее подвержена изменениям с течением времени. Под влиянием стрессора, изменения в составе микробиома более динамичные, чем у животных с высокой возбудимостью нервной системы (НП). При этом, как показали наши результаты, линия ВП более устойчива к постстрессорным поведенческим нарушениям, а также у данных животных менее выражены признаки постстрессорного воспаления по сравнению

с линией НП. Можно предположить, что изначальное разнообразие кишечной микрофлоры позволяет компенсировать временные постстрессорные колебания в представленности отдельных родов микробиоты кишечника.

Основываясь на наших результатах, можно предположить, что чем выше разнообразие микробного сообщества кишечника, тем меньше влияние на функции ЦНС оказывают постстрессорные колебания в представленности различных видов бактерий в ЖКТ.

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, однако через 60 дней после окончания стрессирования крысы данной линии демонстрировали значимое снижение локомоции и груминга в тесте ОП по сравнению с контролем. У высоковозбудимых животных линии НП наблюдаются выраженные поведенческие эффекты стресса уже через сутки после стресса: исследовательское поведение и локомоция снижается по сравнению с контролем, затем через 7 дней увеличивается неспецифическая локомоторная активность в открытом поле, однако к 24 дню тревожно-подобные симптомы снова наблюдаются в обоих тестах и сохраняются до 60го дня.

Так же нами впервые показаны различия в динамике и степени выраженности постстрессорного нейровоспаления у крыс с различной возбудимостью нервной системы. Показано, что высоковозбудимые животные демонстрируют увеличение числа микроглиальных клеток на 7 сутки после стрессирования во всех исследованных зонах гиппокампа, при этом уровень мРНК провоспалительного цитокина IL1β у этих животных значимо выше по сравнению с контролем к 24му дню после стресса в гиппокампе и миндалине. Эффект стресса на количество микроглиальных клеток у низковозбудимых крыс менее выражен и заметен только в области CA1 в тот же временной промежуток (7 дней), а увеличение экспрессии

гена *il1β* отмечено только в гиппокампе через 24 дня после окончания стрессирования.

Кроме того, у высоковозбудимых крыс линии НП длительное эмоционально-болевое стрессорное воздействие вызывает снижение экспрессии гена *bdnf* в префронтальной коре и гиппокампе. У низковозбудимых крыс линии ВП изменений уровня мРНК данного нейротрофина не обнаружено ни в одной из исследованных областей мозга.

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

На рисунке 35 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 не только в крови, но и в мозге. 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*

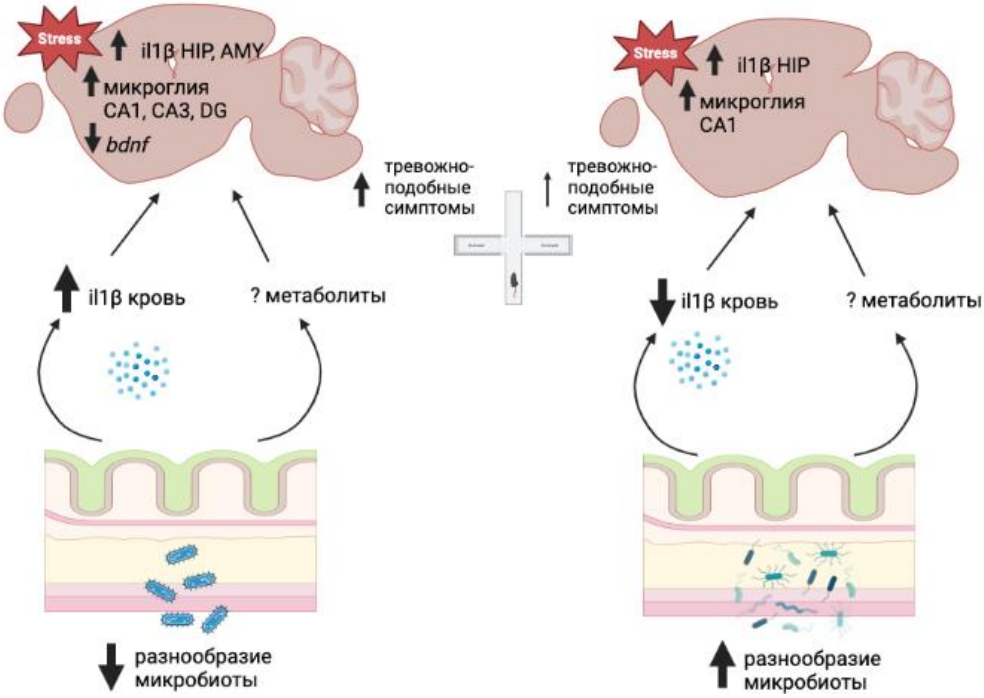

Рисунок 35. Возможные нейроиммунные механизмы различной устойчивости к стрессу у крыс с генетически детерминированным высоким и низким уровнем возбудимости нервной системы. *HIP – гиппокамп, AMY – миндалина, CA1,3, DG – соответствующие области гиппокампа.*

В целом, можно заключить, что низковозбудимая линия, хотя и обладает большим адаптационным потенциалом по сравнению с высоковозбудимой в отношении эффектов стресса на изученные нами параметры (признаки нейровоспаления проявляются в меньшем объеме и в более поздние сроки), все равно демонстрирует некоторое нарушение адаптации к 60му дню после окончания действия стрессора, что проявляется в снижении моторной активности в тесте открытое поле: снижается количество пересеченных секторов, увеличивается время неподвижности, а также снижается время, затраченное на груминг.

Интересно соотнести полученные данные с изученными ранее межлинейными различиями по цитогенетическим и молекулярно-клеточным характеристикам развивающегося и зрелого мозга крыс линий ВП и НП. Так, было показано, что у низковозбудимых животных (ВП) по сравнению с высоковозбудимыми (НП)

отмечается более высокая пролиферативная активность клеток в развивающемся мозге, а так же более высокие относительные показатели числа нейронов в гиппокампе [Дюжикова, 2016]. При этом, в головном мозге у крыс линии ВП обнаруживается значимо более низкое, чем у линии НП количество копий рибосомального гена rpl13a [Дюжикова, 2016], что безусловно влияет на процессы трансляции в нервной ткани.

Кроме того, показано, что длительное эмоционально-болевое стрессорное воздействие ведет к изменению конденсации хроматина в клетках гиппокампа также специфичным для линий образом: у низковозбудимых крыс (ВП) площадь гетерохроматина в ядрах нейронов гиппокампа снижается, у высоковозбудимой линии (НП) данный эффект отсутствует [Дюжикова, 2016]. Такое снижение площади гетерохроматина в ответ на действие стрессора возможно является адаптивной реакцией нервной ткани, так как гипотетически должно приводить к активации экспрессии генов. Это соответствует данным об увеличении содержания РНК в нейронах гиппокампа крыс линии ВП под влиянием длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия [Вайдо и др., 2009].

Таким образом, полученные ранее другими авторами данные свидетельствуют в пользу влияния возбудимости нервной системы на развитие постстрессорной патологии. Результаты же данного исследования дополняют картину сведениями о динамике и выраженности постстрессорного нейровоспаления, которое сегодня рассматривают как один из важнейших механизмов, с помощью которых стрессор, находящийся во внешней среде, оказывает свое влияние на процессы, происходящие в нервной ткани и отражающиеся на функциях мозга.

В целом, наша работа направлена на уточнение механизмов развития психопатологий, так как отсутствие ясности в этом вопросе сдерживает прогресс как в их лечении, так и в ранней диагностике и оценке предрасположенности к их развитию. Накоплены убедительные доказательства того, что стресс может являться фактором, запускающим в центральной нервной системе патологические процессы, приводящие в итоге к нарушениям функций мозга и к проявлению

различных психопатологических симптомов. Несмотря на то, что в современных классификациях болезней представлен целый ряд различных психопатологий, набор симптомов, которые их характеризуют ограничен. Так, большинство психопатологий включают в себя различную комбинацию симптомов тревоги, депрессии, раздражительности, повышенной агрессивности, снижение когнитивных функций, нарушения сна. Более того, ни один из симптомов не является патологическим по своей сути. Тревога – выполняет защитную функцию, являясь сигналом о возможной опасности, снижение активности и эмоционального фона – адаптивная реакция, часть так называемого «sickness behavior», это мотивационное состояние, которое реорганизует приоритеты организма во время острого инфекционного процесса. Патологическими эти симптомы становятся тогда, когда сохраняются слишком долго или выражены чрезмерно, а потому перестают выполнять свою приспособительную функцию.

Развитие постстрессорных психопатологий безусловно имеет не только внешнюю причину (стрессор), но и обусловлено внутренними факторами (генетическая уязвимость организма). Попытки найти ограниченное число генов, вовлеченных в развитие психических расстройств не увенчались успехом, сегодня ясно, что это полигенные заболевания, причины которых нужно искать в сотнях генов, во взаимодействиях между ними и взаимодействии этих генных сетей с окружающей средой.

Возбудимость, являясь генетически детерминированной характеристикой функционального состояния нервной системы, так же полигенна, но при этом доступна для объективного измерения и считается более простым признаком для искусственного отбора, чем поведенческие характеристики лабораторных животных. Уровень возбудимости может являться одним из основных биологических факторов риска развития постстрессорных расстройств, поскольку логичным является предположение о том, что если гипер(гипо)реактивность наблюдается в нервных сетях структур мозга, вовлеченных в психопатологические симптомы в норме, то эти отклонения в реактивности будут выражены еще больше в ответ на действие экстремальных факторов среды.

В научной литературе, вопрос возбудимости ЦНС обсуждается в основном в связи с эпилепсией, в том числе есть работы, которые показывают, что эпилептическая нейрональная активность сочетается с активацией микроглиальных клеток, выбросом провоспалительных сигналов в нервной ткани. Однако вопрос влияния порога возбудимости на выраженность постстрессорных нарушений представляется еще более перспективным, поскольку потенциально позволит выявить универсальную генетически детерминированную «уязвимость», которая может объяснить наблюдаемые сходства и различия симптомов многих психопатологий, что представляет как практический, так и теоретический интерес.

Несмотря на дефицит публикаций по этой теме, американским психиатром M. Binder [Binder, 2021] выдвинута гипотеза «Мульти-сетевой нейронной гипервозбудимости (Multi-Circuit Neuronal Hyperexcitability) как основной причины различных психопатологий. Согласно его предположению, постоянное возбуждение в нервных цепях, связанных с генерацией тревоги приводит к тревожным расстройствам; гипер(гипо)возбуждение в цепях, связанных с пониженным эмоциональным фоном, вызывает стойкие симптомы депрессии; постоянное возбуждение в цепях, вовлеченных в когнитивную обработку, вызывает размышления и навязчивые мысли. Такая патологическая нейрональная активность может быть вызвана неспособностью «уязвимой» нервной системы регулировать свое состояние при воздействии стрессора. Строгих научных доказательств данной гипотезы пока нет, однако, она отчасти подтверждается GWAS исследованиями (полногеномный поиск ассоциаций), которые свидетельствуют о том, в патогенезе большинства психопатологий принимают участие гены, связанные с каналопатиями [Liu et al., 2011]. Предполагают, что задержка реполяризации, которую создают нарушения в каналах, лежит в основе повышенной возбудимости нейронов.

В развитие данной гипотезы можно предположить, что существуют и негативные эффекты аномально низкой возбудимости, когда сниженная нейрональная активность в важных для эмоционального контроля нервных сетях, так же приведет к нарушениям адаптации. Такой подход потенциально обладает

высокой объяснительной силой, помогая понять, почему некоторые индивиды более уязвимы к развитию психиатрических симптомов, чем другие.

Полученные нами данные, не являясь прямыми доказательствами причинно-следственной связи уровня возбудимости с постстрессорными поведенческими нарушениями у крыс, не противоречат высказанным выше предположениям. Мы показали, что животные с контрастной генетически детерминированной возбудимостью нервной системы имеют различную динамику и выраженность как поведенческих нарушений в ответ на стресс, так и процессов нейровоспаления и нейродегенерации.

Мозг – сложный объект и поэтому его необходимо изучать на всех уровнях организации: молекулярно-генетическом, клеточном, на уровне нервных сетей, отдельных структур и целого мозга, а также на уровне поведения и целого организма. Мы рассмотрели влияние длительного стресса на краткосрочную и долгосрочную динамику признаков воспаления как на периферии, так и в ЦНС: изучили постстрессорные изменения экспрессии генов основных провоспалительных цитокинов и нейротрофического фактора мозга (молекулярный уровень), оценили количество микроглиальных клеток в мозге на различных сроках после стресса в структурах, вовлеченных в эмоциональные дисфункции (гиппокамп, префронтальная кора). Принимая во внимание, тот факт, что млекопитающих можно рассматривать как «суперорганизм» из-за огромного влияния на многие функции в том числе и функции мозга микроорганизмов-симбионтов, мы оценили постстрессорные изменения разнообразия микробиоты кишечника крыс в зависимости от их возбудимости. Наконец, мы оценили динамику и тяжесть постстрессорных поведенческих нарушений у исследуемых животных. Полученные нами на всех уровнях данные, свидетельствуют о том, что линии крыс с контрастным уровнем возбудимости нервной системы значимо отличаются друг от друга в реакциях на хронический стресс. При этом, генетически детерминированные особенности крыс с высоким уровнем возбудимости нервной системы повышают риск развития негативных эффектов стресса.

Полученные результаты позволяют сформулировать новые вопросы: каковы генетические и эпигенетические различия линий с высокой и низкой возбудимостью? Какие эпигенетические факторы могут быть потенциальными регуляторами развития постстрессорного воспаления у крыс с разной возбудимостью? Для полноты картины 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. Исследование поведенческих эффектов стресса необходимо дополнить когнитивными тестами и оценкой депрессивно-подобных симптомов. 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 воспаления 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 крови, 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранова К. А., Рыбникова Е. А., Самойлов М. О. Нейротрофин BDNF вовлекается в формирование и предотвращение постстрессовых психопатологий // Нейрохимия. - 2015. - Т. 32. - № 2. - С. 131.
2. Вайдо А. И. и др. Развитие длительной посттетанической потенциации и изменение содержания белка S-100 в срезах гиппокампа крыс с различным функциональным состоянием нервной системы // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 1992. - Т. 113. - № 6. - С. 645–646.
3. Вайдо А. И. Физиолого-генетический анализ возбудимости нервной системы и поведения лабораторной крысы // дис. ... доктор биол. наук: 03.00.13., Санкт-Петербург, 2000 - 260 с.
4. Вайдо А. И. и др. Системный контроль молекулярно-клеточных и эпигенетических механизмов долгосрочных последствий стресса // Генетика. - 2009. - Т. 45. - № 3. - С. 342–348.
5. Вайдо А. И. и др. Селектированные линии крыс с высоким и низким порогом возбудимости: модель для изучения дезадаптивных состояний, зависимых от уровня возбудимости нервной системы // Лабораторные животные для научных исследований. - 2018. - № 3. - С. 12–22.
6. Ветровой О. В. и др. Умеренная гипобарическая гипоксия в режиме посткондиционирования повышает экспрессию hif-1и эритропоэтина в са1 поле гиппокампа крыс, переживших тяжелую гипоксию // Нейрохимия. - 2014. – Т. 31. - № 2. - С. 134.
7. Гусев Е. Ю., Черешнев В. А. Иммунологические и патофизиологические механизмы системного воспаления // Медицинская иммунология. -2012. -Т. 14. - № 1–2. - С. 9–20.
8. Дюжикова Н. А. Цитогенетические и молекулярно-клеточные механизмы постстрессорных состояний // дис. ... доктор биол. наук: 03.00.13., Санкт-Петербург, 2016 - 260 с.

9.
10. Павлов И., Быков К. Лекции о работе больших полушарий головного мозга. Полн. собр. соч. - М.-Л.: Изд. АН СССР, - Т.4. - 451 с.
11. Полетаева И. И. и др. Генетическая линия крыс Крушинского–Молодкиной как уникальная экспериментальная модель судорожных состояний // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2017. - Т. 21. - № 4. - С. 427–434.
12. Сиваченко И. Б. и др. Импульсная активность и нестабильность генома нейронов миндалевидного комплекса у крыс селектированных линий с контрастной возбудимостью нервной системы в нормальных и стрессовых условиях // Журнал высшей нервной деятельности им. ИП Павлова. - 2020. - Т. 70. - № 5. - С. 655–667.
13. Шилов В. Н. Молекулярные механизмы структурного гомеостаза. Москва: издательство "Интерсигнал", 2006. - 286 с.
14. Abot A., Cani P. D., Knauf C. Impact of intestinal peptides on the enteric nervous system: novel approaches to control glucose metabolism and food intake // Front. Endocrinol. (Lausanne). - 2018. - T. 9. - P. 328.
15. Alam R., Abdolmaleky H. M., Zhou J. Microbiome, inflammation, epigenetic alterations, and mental diseases // Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet. - 2017. - T. 174. - № 6. - P. 651–660.
16. Aronica E., Crino P. B. Inflammation in epilepsy: Clinical observations // Epilepsia. 2011. Т. 52. № s3. С. 26–32.
17. Badimon A. и et al. Negative feedback control of neuronal activity by microglia // Nature. 2020.
18. Baharikhoob P., Kolla N. J. Microglial dysregulation and suicidality: a stress-diathesis perspective // Front. psychiatry. - 2020. - T. 11. - P. 781.
19. Bangsgaard Bendtsen K. M. et al. Gut microbiota composition is correlated to grid floor induced stress and behavior in the BALB/c mouse // Plos one. - 2012.
20. Baral P. et al. Nociceptor sensory neurons suppress neutrophil and γδ T cell responses in bacterial lung infections and lethal pneumonia // Nat. Med. - 2018.

21. Beattie E. и др. Control of Synaptic Strength by Glial TNFα // Science. - 80. - 2002. - Т. 295. - № 5563. - P. 2282–2285.
22. Besedovsky H. et al. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones // Science. - 1986. - 233(4764)/ - P. 652-654.
23. Bi L. L. et al. Enhanced excitability in the infralimbic cortex produces anxiety-like behaviors // Neuropharmacology. - 2013. - 72. - P. 148-156.
24. Bilbo S. D. et al. Neonatal infection induces memory impairments following an immune challenge in adulthood. // Behav. Neurosci. - 2005. - Т. 119. -№ 1.- P. 293.
25. Binder M. R. The neuronal excitability spectrum: A new paradigm in the diagnosis, treatment, and prevention of mental illness and its relation to chronic disease // Am. J. Clin. Exp. Med. - 2021. - Т. 9. - № 6. - P. 187–203.
26. Bluthe R.-M. et al. Vagotomy blocks behavioural effects of interleukin-1 injected via the intraperitoneal route but not via other systemic routes // Neuroreport. - 1996. - Т. 7. - № 15.
27. Borovikova L. V et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin // Nature. - 2000. - Т. 405. - № 6785. - P. 458–462.
28. Bourassa M. W. et al. Butyrate, neuroepigenetics and the gut microbiome: can a high fiber diet improve brain health? // Neurosci. Lett. - 2016. - Т. 625. - P. 56–63.
29. Bustan Y. et al. Elevated neutrophil to lymphocyte ratio in non-affective psychotic adolescent inpatients: Evidence for early association between inflammation and psychosis // Psychiatry Res. - 2018. - 262. - P.149-153.
30. Calcia M. A. et al. Stress and neuroinflammation: A systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness // Psychopharmacology (Berl). - 2016.- 233. - P.1637-1650.
31. Campbell I. L. et al. Transgenic models to study the actions of cytokines in the central nervous system // Neuroimmunomodulation. - 1998. - Т. 5. - № 3–4. - P. 126–135.

32. Capuron L. et al. Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy // Mol. Psychiatry. - 2002. - T. 7. - № 5. - P. 468–473.
33. Carpenter L. L. et al. Association between plasma IL-6 response to acute stress and early-life adversity in healthy adults // Neuropsychopharmacology. - 2010. - T. 35. - № 13. - P. 2617–2623.
34. Carrasco J. et al. Characterization of central and peripheral components of the hypothalamus–pituitary–adrenal axis in the inbred Roman rat strains // Psychoneuroendocrinology. - 2008. - T. 33. - № 4. - P. 437–445.
35. Casano A. M., Albert M., Peri F. Developmental Apoptosis Mediates Entry and Positioning of Microglia in the Zebrafish Brain // Cell Rep. - 2016. - 16(4). - P.897-906
36. Choy K. H. C. et al. Combined neonatal stress and young-adult glucocorticoid stimulation in rats reduce BDNF expression in hippocampus: effects on learning and memory // Hippocampus. - 2008. - T. 18. - № 7. - P. 655–667.
37. Cima I. et al. Intestinal epithelial cells synthesize glucocorticoids and regulate T cell activation // J. Exp. Med. - 2004. - T. 200. - № 12. - P. 1635–1646.
38. Clarke G. et al. Priming for health: gut microbiota acquired in early life regulates physiology, brain and behaviour // Acta Paediatr. - 2014. - T. 103. - № 8. - P. 812–819.
39. Coste A. et al. LRH-1-mediated glucocorticoid synthesis in enterocytes protects against inflammatory bowel disease // Proc. Natl. Acad. Sci. - 2007. - T. 104. - № 32.- P. 13098 LP – 13103.
40. Cox G. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. // J. Immunol. - 1995. - 154(9)- P.4719-4725
41. Cronk J. C. и др. Peripherally derived macrophages can engraft the brain independent of irradiation and maintain an identity distinct from microglia // J. Exp. Med. - 2018. - 215(6)- P.1627-1647
42. Czerniawski J. и др. Systemic lipopolysaccharide administration impairs retrieval

of context–object discrimination, but not spatial, memory: Evidence for selective disruption of specific hippocampus-dependent memory functions during acute neuroinflammation // Brain. Behav. Immun. - 2014. - T. 44.

43. Dantzer R. Neuroimmune interactions: From the brain to the immune system and vice versa // Physiol. Rev. - 2018. - 98(1). - P.477-504.
44. Davalos D. et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo // Nat. Neurosci. - 2005. - T. 8. - № 6. - P. 752–758.
45. Dave M. et al. The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions // Transl. Res. - 2012. - T. - 160. - № 4. - P. 246–257.
46. Davis A. K., Maney D. L., Maerz J. C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: A review for ecologists // Funct. Ecol. - 2008. - 22(5). - P.760-772.
47. Deng H. et al. Bacteroides fragilis prevents Clostridium difficile infection in a mouse model by restoring gut barrier and microbiome regulation // Front. Microbiol. - 2018. - T. 9. - P. 2976.
48. Desbonnet L. et al. Effects of the probiotic Bifidobacterium infantis in the maternal separation model of depression // Neuroscience. - 2010. - T. 170. -№ 4. - P. 1179–1188.
49. Deslauriers J., Powell S. B., Risbrough V. B. Immune signaling mechanisms of PTSD risk and symptom development: insights from animal models // Curr. Opin. Behav. Sci. - 2017. - 14. - P.123-132.
50. Dhabhar F. S. и др. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. // J. Immunol. - 1996. - T. 157. - № 4. - P. 1638 LP – 1644.
51. Dinarello C. A., Goldin N. P., Wolff S. M. Demonstration and characterization of two distinct human leukocytic pyrogens // J. Exp. Med. - 1974. - T. 139. - № 6. - P. 1369–1381.
52. Dinkel K., MacPherson A., Sapolsky R. M. Novel glucocorticoid effects on acute inflammation in the CNS // J. Neurochem. - 2003. - T. 84. - № 4. - P. 705–716.
53. DiSabato D. J., Quan N., Godbout J. P. Neuroinflammation: the devil is in the

details // J. Neurochem. - 2016. - 139. - P.136-153.
54. Eckburg P. B. et al. Diversity of the human intestinal microbial flora // Science (80-.). 2005. - T. 308. - № 5728. - P. 1635–1638.
55. Elmore M. R. P. et al. Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain // Neuron. - 2014.- 82(2). - P.380-397.
56. Eraly S. A. и др. Assessment of plasma C-reactive protein as a biomarker of posttraumatic stress disorder risk // JAMA psychiatry. - 2014. - T. 71. - № 4. - P. 423–431.
57. Estes M. L., McAllister A. K. Alterations in Immune Cells and Mediators in the Brain: It's Not Always Neuroinflammation! // Brain Pathol. - 2014. - T. 24. - № 6. - P. 623–630.
58. Evrensel A., Ünsalver B. Ö., Ceylan M. E. Neuroinflammation, gut-brain axis and depression // Psychiatry Investig. - 2020. - T. 17. - № 1. - P. 2.
59. Flammer J. R., Rogatsky I. Minireview: Glucocorticoids in autoimmunity: Unexpected targets and mechanisms // Mol. Endocrinol. - 2011.- 25(7). - P.1075-1086.
60. Foster J. A., Neufeld K.-A. M. Gut–brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression // Trends Neurosci. - 2013. - T. 36. - № 5. - P. 305–312.
61. Galic M. A., Riazi K., Pittman Q. J. Cytokines and brain excitability // Front. Neuroendocrinol. - 2012. - T. 33. - № 1. - P. 116–125.
62. Galley J. D. и др. Exposure to a social stressor disrupts the community structure of the colonic mucosa-associated microbiota // BMC Microbiol. - 2014. - T. 14. - № 1. - P. 189.
63. Godinho-Silva C., Cardoso F., Veiga-Fernandes H. Neuro-Immune Cell Units: A New Paradigm in Physiology // Annu. Rev. Immunol. - 2019. - T. 37. - P. 19–46.
64. Golde S. et al. Decreased iNOS synthesis mediates dexamethasone-induced protection of neurons from inflammatory injury in vitro // Eur. J. Neurosci. - 2003. - T. 18. - № 9. - P. 2527–2537.
65. Golden S. A. et al. A standardized protocol for repeated social defeat stress in

mice // Nat. Protoc. - 2011. - T. 6. - № 8. - P. 1183–1191.
66. Gordon S., Plüddemann A. Tissue macrophages: Heterogeneity and functions // BMC Biol. - 2017. - 15(1). - P.1-18.
67. Grimstad Ø. Tumor Necrosis Factor and the Tenacious α // JAMA Dermatology. - 2016. - T. 152. - № 5. - P. 557.
68. Grønli J. et al. Chronic mild stress inhibits BDNF protein expression and CREB activation in the dentate gyrus but not in the hippocampus proper // Pharmacol. Biochem. Behav. 2006. - T. 85. - № 4. - P. 842–849.
69. Guo J.et al. Characteristics of gut microbiota in representative mice strains: Implications for biological research // Anim. Model. Exp. Med. - 2022. - T. 5. - № 4. - P. 337–349.
70. Gur T. L. et al. Prenatal stress affects placental cytokines and neurotrophins, commensal microbes, and anxiety-like behavior in adult female offspring // Brain. Behav. Immun. - 2017. - T. 64. - P. 50–58.
71. Han J., Harris R. A., Zhang X. M. An updated assessment of microglia depletion: Current concepts and future directions // Mol. Brain. - 2017. - 10(1). - P.1-8.
72. Hanisch U. Microglia as a source and target of cytokines // Glia. - 2002. - T. 40. - № 2. - P. 140–155.
73. Hannestad J. et al. Endotoxin-induced systemic inflammation activates microglia: [11C]PBR28 positron emission tomography in nonhuman primates // Neuroimage. - 2012. - T. 63. - № 1. - P. 232–239.
74. Hodes G. E. et al. Individual differences in the peripheral immune system promote resilience versus susceptibility to social stress // Proc. Natl. Acad. Sci. 2014. - T. 111. - № 45. - P. 16136–16141.
75. Hoeffel G., Ginhoux F. Ontogeny of tissue-resident macrophages // Front. Immunol. - 2015.- 6. - P.486.
76. Hoge E. A. et al. Broad spectrum of cytokine abnormalities in panic disorder and posttraumatic stress disorder // Depress. Anxiety. - 2009. - T. 26. - № 5. - P. 447–455.
77. Hooks B. M., Chen C. Distinct Roles for Spontaneous and Visual Activity in

Remodeling of the Retinogeniculate Synapse // Neuron. - 2006.- 52(2). - P.281-291.

78. Hooper L. V, Littman D. R., Macpherson A. J. Interactions between the microbiota and the immune system // Science (80-.). - 2012. - T. 336. - № 6086. - P. 1268–1273.

79. Inagaki R., Moriguchi S., Fukunaga K. Aberrant Amygdala-dependent Fear Memory in Corticosterone-treated Mice // Neuroscience. - 2018. - 388. - P.448-459.

80. Jašarević E. et al. Stress during pregnancy alters temporal and spatial dynamics of the maternal and offspring microbiome in a sex-specific manner // Sci. Rep. - 2017. - T. 7. - № 1. - P. 1–13.

81. Jiménez E. et al. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section // Curr. Microbiol. - 2005. - T. 51. - № 4. - P. 270–274.

82. Jing H. et al. Intra-amygdala microinjection of TNF-α impairs the auditory fear conditioning of rats via glutamate toxicity // Neurosci. Res. - 2015. - T. 91. - P. 34–40.

83. Jinno S. et al. Spatial arrangement of microglia in the mouse hippocampus: a stereological study in comparison with astrocytes // Glia. - 2007. - T. 55. - № 13. - P. 1334–1347.

84. Jung Y. J., Chung W. S. Phagocytic roles of glial cells in healthy and diseased brains // Biomol. Ther. - 2018. - 26(4). - P.350.

85. Kaelberer M. M. et al. A gut-brain neural circuit for nutrient sensory transduction // Science (80-.). 2018. - T. 361. - № 6408. - P.5236.

86. Kany S., Vollrath J. T., Relja B. Cytokines in Inflammatory Disease // Int. J. Mol. Sci. - 2019. - T. 20. - № 23.

87. Karst H. et al. Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. - 2005. - T. 102. - № 52. - P. 19204–19207.

88. Katsuki H. et al. Interleukin-1β inhibits long-term potentiation in the CA3 region

of mouse hippocampal slices // Eur. J. Pharmacol. - 1990. - T. 181. - № 3. - P. 323–326.

89. Kent S. et al. Sickness behavior as a new target for drug development // Trends Pharmacol. Sci. - 1992. - T. 13. - P. 24–28.

90. Khandaker G. M. et al. Association of serum interleukin 6 and C-reactive protein in childhood with depression and psychosis in young adult life: a population-based longitudinal study // JAMA psychiatry. - 2014. - T. 71. - № 10. - P. 1121–1128.

91. Kivimäki M. et al. Long-term inflammation increases risk of common mental disorder: a cohort study // Mol. Psychiatry. - 2014. - T. 19. - № 2. - P. 149–150.

92. Kloet E. R. De et al. Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease // Endocrine reviews. - 19(3). - P.269-301. - 1998.

93. Kloet E. R. de, Meijer O. C. MR/GR Signaling in the Brain during the Stress Response // Aldosterone-Miner. Recept Cell Biol. Transl. Med. - 2019.

94. Knights D. et al. Rethinking “enterotypes” // Cell Host Microbe. - 2014. - T. 16. - № 4. - P. 433–437.

95. Koh A. et al. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites // Cell. - 2016. -T. 165. - № 6. - P. 1332–1345.

96. Kong X. et al. TNF-α regulates microglial activation via the NF-κB signaling pathway in systemic lupus erythematosus with depression // Int. J. Biol. Macromol. - 2019. - T. 125. - P. 892–900.

97. Konjevod M. et al. Metabolomics analysis of microbiota-gut-brain axis in neurodegenerative and psychiatric diseases // J. Pharm. Biomed. Anal. - 2021. - T. 194. - P. 113681.

98. Konsman J. P., Parnet P., Dantzer R. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications // Trends Neurosci. - 2002. - T. 25. - № 3. - P. 154–159.

99. Korzhevskii D. E., Kirik O. V. Brain microglia and microglial markers // Neurosci. Behav. Physiol. - 2016. - T. 46. - № 3. - P. 284–290.

100. Kvichansky A. A. et al. Expression of mRNAs for IL-1β, IL-6, IL-10,

TNFα, CX3CL1, and TGFβ1 Cytokines in the Brain Tissues: Assessment of Contribution of Blood Cells with and without Perfusion // Biochem. - 2019. - T. 84. - № 8. - P. 905–910.

101. Lakshminarasimhan H., Chattarji S. Stress leads to contrasting effects on the levels of brain derived neurotrophic factor in the hippocampus and amygdala // PLoS One. - 2012. - T. 7. 0 № 1. - e30481–e30481.

102. Lawson L. J. et al. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain // Neuroscience. - 1990. - T. 39. - № 1. - P. 151–170.

103. Lechan R. M. et al. Immunoreactive interleukin-1β localization in the rat forebrain // Brain Res. 1990. - T. 514. - № 1. - P. 135–140.

104. Levina A. S. et al. Hereditary determined diving behaviour in rats as a factor of fitness // Ecol. Genet. 2020.- 18(3) - P.317-328.

105. Lewitus G. M.et al. An Adaptive Role of TNFα in the Regulation of Striatal Synapses // J. Neurosci. - 2014. - T. 34. - № 18. - P. 6146 LP – 6155.

106. Ley R. E., Peterson D. A., Gordon J. I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine // Cell. - 2006. - T. 124. - № 4. - P. 837–848.

107. Lim G. Y.et al. Prevalence of Depression in the Community from 30 Countries between 1994 and 2014 // Sci. Rep. - 2018. - T. 8. - № 1. - P. 2861.

108. Lima Giacobbo B. et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation // Mol. Neurobiol. - 2019. - T. 56. - № 5. - P. 3295–3312.

109. Lindstrom N. M. et al. Hematologic Assessment in Pet Rats, Mice, Hamsters, and Gerbils. Blood Sample Collection and Blood Cell Identification // Vet. Clin. North Am. - Exot. Anim. Pract. - 2015. - T. 18. - № 1. - P. 21–32.

110. Liu Y. et al. Meta-analysis of genome-wide association data of bipolar disorder and major depressive disorder // Mol. Psychiatry. - 2011. - T. 16. - № 1. - P. 2–4.

111. López-Aumatell R. et al. Unlearned anxiety predicts learned fear: a

comparison among heterogeneous rats and the Roman rat strains // Behav. Brain Res. - 2009. - T. 202. - № 1. - P. 92–101.

112. Macpherson A. J., Harris N. L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system // Nat. Rev. Immunol. - 2004. - T. 4. - № 6. - P. 478–485.

113. Madry C. et al. Microglial Ramification, Surveillance, and Interleukin-1β Release Are Regulated by the Two-Pore Domain K+ Channel THIK-1 // Neuron. - 2018.- 97(2). - P.299-312.

114. Majno G., Joris I. Cells, tissues, and disease: principles of general pathology: Oxford University Press, 2004.

115. Marin I. A. et al. Microbiota alteration is associated with the development of stress-induced despair behavior // Sci. Rep. - 2017. - T. 7. - № 1. - P. 43859.

116. Marshall J. K. et al. Eight year prognosis of postinfectious irritable bowel syndrome following waterborne bacterial dysentery // Gut. - 2010. - T. 59. - № 5. - P. 605–611.

117. Mazza M. G. et al. Neutrophil/lymphocyte ratio and platelet/lymphocyte ratio in mood disorders: A meta-analysis // Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry. - 2018.- 84. - P.229-236.

118. McCarthy D. A. et al. Redox-control of the alarmin, Interleukin-1α // Redox Biol. - 2013. - T. 1. - № 1. - P. 218–225.

119. McCoy M. K. et al. Blocking soluble tumor necrosis factor signaling with dominant-negative tumor necrosis factor inhibitor attenuates loss of dopaminergic neurons in models of Parkinson’s disease // J. Neurosci. - 2006. - T. 26. - № 37. - P. 9365–9375.

120. McKernan D. P.et al. Enhanced peripheral toll-like receptor responses in psychosis: further evidence of a pro-inflammatory phenotype // Transl. Psychiatry. - 2011. - T. 1. - № 8. - P. e36–e36.

121. Michopoulos V. et al. Inflammation in fear-and anxiety-based disorders: PTSD, GAD, and beyond // Neuropsychopharmacology. - 2017. - T. 42. - № 1. - P. 254–270.

122. Miller F. D., Gauthier A. S. Timing Is Everything: Making Neurons versus Glia in the Developing Cortex // Neuron. - 2007. - 54(3). - P.357-369.
123. Minakova E., Warner B. B. Maternal immune activation, central nervous system development and behavioral phenotypes // Birth defects Res. - 2018. - T. 110. - № 20. - P. 1539–1550.
124. Moreno M. et al. Impulsivity Characterization in the Roman High- and Low-Avoidance Rat Strains: Behavioral and Neurochemical Differences // Neuropsychopharmacology. - 2010. - T. 35. - № 5. - P. 1198–1208.
125. Mrdjen D. et al. High-Dimensional Single-Cell Mapping of Central Nervous System Immune Cells Reveals Distinct Myeloid Subsets in Health, Aging, and Disease // Immunity. - 2018.- 48(2). - P.380-395.
126. Munhoz C. D. et al. Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor-kappaB in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion // J. Neurosci. - 2006. - T. 26. - № 14. - P. 3813–3820.
127. Murakami S. et al. Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly // Neurosci. Res. - 2005. - T. 53. - № 2. - P. 129–139.
128. Murray K., Reardon C. The cholinergic anti-inflammatory pathway revisited // Neurogastroenterol. Motil. - 2018. - T. 30. - № 3. - P. e13288.
129. Nadeau S., Rivest S. Glucocorticoids play a fundamental role in protecting the brain during innate immune response // J. Neurosci. - 2003. - T. 23. - № 13. - P. 5536–5544.
130. Nakai A. et al. Control of lymphocyte egress from lymph nodes through β2-adrenergic receptors // J. Exp. Med. - 2014. - T. 211. - № 13. - P. 2583–2598.
131. Nicholls A. J. et al. Activation of the sympathetic nervous system modulates neutrophil function // J. Leukoc. Biol. - 2018.- 103(2). - P.295-309.
132. Norris G. T., Kipnis J. Immune cells and CNS physiology: Microglia and beyond // J. Exp. Med. - 2019. - 216(1). - P.60-70.
133. Nusslock R., Miller G. E. Early-life adversity and physical and emotional

health across the lifespan: A neuroimmune network hypothesis // Biol. Psychiatry. - 2016. - T. 80.- № 1. - P. 23–32.

134. O'Connor J. C. et al. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2, 3-dioxygenase activation in mice // Mol. Psychiatry. - 2009. - T. 14. - № 5. - P. 511–522.

135. O'Mahony S. M. et al. Maternal separation as a model of brain–gut axis dysfunction // Psychopharmacology (Berl). - 2011. - T. 214. - № 1. - P. 71–88.

136. O'Neill L. A. J., Golenbock D., Bowie A. G. The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity // Nat. Rev. Immunol. - 2013. - T. 13. - № 6. - P. 453–460.

137. Ordyan N. E. et al. Functioning of hypophysial adrenocortical system in rats selected by the threshold of sensitivity to electrical current // Bull. Exp. Biol. Med. - 1998.- 125. - P.393-395.

138. Pablos R. M. de et al. Stress Increases Vulnerability to Inflammation in the Rat Prefrontal Cortex // J. Neurosci. - 2006. - T. 26. - № 21. - P. 5709 LP – 5719.

139. Paolicelli R. C. et al. Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads // Neuron. - 2022. - T. 110. - № 21. - P. 3458–3483.

140. Parakalan R. et al. Transcriptome analysis of amoeboid and ramified microglia isolated from the corpus callosum of rat brain // BMC Neurosci. - 2012. - T. 13. - № 1. - P. 1–20.

141. Paul B. et al. Influences of diet and the gut microbiome on epigenetic modulation in cancer and other diseases // Clin. Epigenetics. - 2015. - T. 7. - № 1. - P. 1–11.

142. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition : Elsevier, 2006.

143. Petra A. I. et al. Gut-microbiota-brain axis and its effect on neuropsychiatric disorders with suspected immune dysregulation // Clin. Ther. 2015. - T. 37. - № 5. - P. 984–995.

144. Pradeu T., Cooper E. L. The danger theory: 20 years later // Front. Immunol. - 2012.- 3. - P.287.

145. Priebe K. et al. Maternal influences on adult stress and anxiety-like behavior in C57BL/6J and BALB/cJ mice: A cross-fostering study // Dev. Psychobiol. - 2005. - T. 47. - № 4. - P. 398–407.
146. Probert L. TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects // Neuroscience. - 2015. - T. 302. - C. 2–22.
147. Rackers H. S. et al. Emerging literature in the microbiota-brain axis and perinatal mood and anxiety disorders // Psychoneuroendocrinology. - 2018. - T. 95. - C. 86–96.
148. Radhakrishnan A., Gulia K. K. Categories of Wistar Rats Based on Anxiety Traits: A Study Using Factor and Cluster Method // Ann. Neurosci. - 2019.- 25(4). - P.234-240.
149. Raffaele S.et al. TNF Production and Release from Microglia via Extracellular Vesicles: Impact on Brain Functions // Cells. - 2020. - T. 9. - № 10.
150. Raison C. L. et al. CSF concentrations of brain tryptophan and kynurenines during immune stimulation with IFN-α: relationship to CNS immune responses and depression // Mol. Psychiatry. - 2010. - T. 15. - № 4. - C. 393–403.
151. Rakoff-Nahoum S. et al. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis // Cell. - 2004. - T. 118. - № 2. - P. 229–241.
152. Ramer-Quinn D. S. et al. Cytokine production by naive and primary effector CD4+ T cells exposed to norepinephrine // Brain. Behav. Immun. - 2000.- 14(4). - P.239-255.
153. Ransohoff R. M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration // Science. - 2016. - T. 353. - № 6301. - C. 777–783.
154. Rauf A. et al. Neuroinflammatory Markers: Key Indicators in the Pathology of Neurodegenerative Diseases // Molecules. - 2022. - T. 27. - № 10.
155. Ravizza T. et al. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy // Neurobiol. Dis. - 2008. - T. 29. - № 1. - C. 142–160.
156. Rhie S. J., Jung E.-Y., Shim I. The role of neuroinflammation on

pathogenesis of affective disorders // J. Exerc. Rehabil. - 2020. - T. 16. - № 1. - P. 2.

157. Ribeiro Xavier A. L. et al. A distinct population of microglia supports adult neurogenesis in the subventricular zone // J. Neurosci. - 2015. - 35(34). - P.11848-11861.

158. Ripke S. et al. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci // Nature. - 2014.- 511(7510). - P.421-427.

159. Rodgers K. M. et al. The cortical innate immune response increases local neuronal excitability leading to seizures // Brain. - 2009. - T. 132. - № 9. - P. 2478–2486.

160. Rohleder N., Aringer M., Boentert M. Role of interleukin-6 in stress, sleep, and fatigue // Ann. N. Y. Acad. Sci. - 2012. - T. 1261. - № 1. - P. 88–96.

161. Rook G. A. W., Lowry C. A., Raison C. L. Microbial 'Old Friends', immunoregulation and stress resilience // Evol. Med. public Heal. - 2013. - T. 2013. - № 1. - P. 46–64.

162. Rossini P. M.et al. Non-invasive electrical and magnetic stimulation of the brain, spinal cord, roots and peripheral nerves: Basic principles and procedures for routine clinical and research application. An updated report from an IFCN Committee // Clin. Neurophysiol. - 2015. - T. 126. - № 6. - P. 1071–1107.

163. Saikarthik J. et al. Role of neuroinflammation mediated potential alterations in adult neurogenesis as a factor for neuropsychiatric symptoms in Post-Acute COVID-19 syndrome—A narrative review // PeerJ. - 2022. - T. 10. - P. e14227.

164. Sandiego C. M. et al. Imaging robust microglial activation after lipopolysaccharide administration in humans with PET // Proc. Natl. Acad. Sci. 2015. - T. 112. - № 40. - P. 12468 LP – 12473.

165. Sandoval-Motta S. et al. The human microbiome and the missing heritability problem // Front. Genet. - 2017. - T. 8. - P. 80.

166. Satokari R. et al. Bifidobacterium and Lactobacillus DNA in the human placenta // Lett. Appl. Microbiol. - 2009. -T. 48. - № 1. - P. 8–12.

167. Savage J. C., Carrier M., Tremblay M.-È. Morphology of Microglia Across Contexts of Health and Disease BT - Microglia: Methods and Protocols / O. Garaschuk, A. Verkhratsky. New York, NY: Springer New York, 2019. - C. 13–26.

168. Schafer D. P. et al. Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner // Neuron. - 2012. - 74(4). - P.691-705.

169. Schmidt C. Thinking from the Gut // Nature. - 2015. - T. 518. - № 7540. - P. S12–S14.

170. Schumacher S. et al. HPA axis regulation in posttraumatic stress disorder: A meta-analysis focusing on potential moderators // Neurosci. Biobehav. Rev. - 2019. - T. 100. - P. 35–57.

171. Selye H. Studies on adaptation // Nature. - 1936. - T. 1936. - № I. - C. 32.

172. Sigelman C. K., Rider E. A. Life-Span Human Development. : Cengage Learning, 2011.

173. Sivachenko I. B. et al. Impulse activity and genome instability in neurons of the amygdala complex in rats of selected strains with contrast excitability of the nervous system in normal and stress conditions // Zhurnal Vyss. Nervn. Deyatelnosti Im. I.P. Pavlov. - 2020.- 70(5). - P.655-667.

174. Sorrells S. F., Sapolsky R. M. An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS // Brain. Behav. Immun. - 2007. - T. 21. - № 3. - P. 259–272.

175. Stellwagen D. et al. Differential Regulation of AMPA Receptor and GABA Receptor Trafficking by Tumor Necrosis Factor-α // J. Neurosci. - 2005. - T. 25. - № 12. - P. 3219 – 3228.

176. Streit W. J. et al. Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease // Acta Neuropathol. - 2009. - T. 118. - № 4. - C. 475–485.

177. Sudo N. et al. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic–pituitary–adrenal system for stress response in mice // J. Physiol. - 2004. - T. 558. - № 1. - P. 263–275.

178. Swanson M. A., Lee W. T., Sanders V. M. IFN-γ Production by Th1 Cells Generated from Naive CD4 + T Cells Exposed to Norepinephrine // J. Immunol. 2001. - 166(1) - P.232-240.
179. Takahashi K. Influence of bacteria on epigenetic gene control // Cell. Mol. Life Sci. - 2014. - T. 71. - P. 1045–1054.
180. Takeuchi O., Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation // Cell. - 2010. - T. 140. - № 6. - P. 805–820.
181. Talabér G., Jondal M., Okret S. Extra-adrenal glucocorticoid synthesis: Immune regulation and aspects on local organ homeostasis // Mol. Cell. Endocrinol. - 2013. - T. 380. - № 1. - P. 89–98.
182. Tang S. W., Helmeste D., Leonard B. Inflammatory neuropsychiatric disorders and COVID-19 neuroinflammation // Acta Neuropsychiatr. - 2021. - T. 33. - № 4. - C. 165–177.
183. Tay T. L. et al. Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition // J. Physiol. - 2017. - T. 595. - № 6. - P. 1929–1945.
184. ThyagaRajan S., Priyanka H. P. Bidirectional communication between the neuroendocrine system and the immune system: Relevance to health and diseases // Ann. Neurosci. - 2012. - 19(1). - P.40.
185. Tinkov A. A. и др. Gut microbiota as a potential player in mn-induced neurotoxicity // Biomolecules. - 2021. - T. 11. - № 9. - P. 1292.
186. Toben C., Baune B. T. Chapter 7 - The Roles of T Cells in Clinical Depression / под ред. B. T. B. T.-I. and I. in D. Baune. : Academic Press, 2018. - P. 115–133.
187. Tracey K. J. The inflammatory reflex // Nature. - 2002.- 420(6917). - P.853-859.
188. Tsilimigras M. C. B. et al. Interactions between stress and sex in microbial responses within the microbiota-gut-brain axis in a mouse model // Psychosom. Med. - 2018. - T. 80. - № 4. - P. 361–369.
189. Ulland T. K., Wang Y., Colonna M. Regulation of microglial survival and

proliferation in health and diseases // Semin. Immunol. - 2015. - 6. - P. 410-415). Academic Press.

190. Vaido A. et al. Selected Rat Strains Ht, Lt As A Model For The Study Of Dysadaptation States Dependent On The Level Of Excitability Of The Nervous System // Laboratory Anim. Sci. - 2018. - T. 1. - № 3.

191. Vandevyver S. et al. New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: An emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation // Endocrinology. - 2013. - T. 154. - № 3. - P. 993–1007.

192. Vasilyev F. F., Silkov A. N., Sennikov S. V. Relationship between interleukin-1 type 1 and 2 receptor gene polymorphisms and the expression level of membrane-bound receptors // Cell. Mol. Immunol. - 2015. - T. 12. - № 2. - P. 222–230.

193. Vezzani A. et al. The role of inflammation in epilepsy // Nat. Rev. Neurol. - 2011. - T. 7. - № 1. - P. 31–40.

194. Vieira M. M. M. et al. Enhanced Th17 phenotype in individuals with generalized anxiety disorder // J. Neuroimmunol. - 2010. - T. 229. - № 1–2. - P. 212–218.

195. Vinolo M. A. R. et al. Regulation of inflammation by short chain fatty acids // Nutrients. - 2011. - T. 3. - № 10. - P. 858–876.

196. Vogelzangs N. et al. Anxiety disorders and inflammation in a large adult cohort // Transl. Psychiatry. - 2013. - T. 3. - № 4. - C. e249–e249.

197. Wang H.-X., Wang Y.-P. Gut microbiota-brain axis // Chin. Med. J. (Engl). - 2016. - T. 129. - № 19. - C. 2373–2380.

198. Wingo A. P., Gibson G. Blood gene expression profiles suggest altered immune function associated with symptoms of generalized anxiety disorder // Brain. Behav. Immun. - 2015. - T. 43. - P. 184–191.

199. Wohleb E. S. et al. Stress-induced recruitment of bone marrow-derived monocytes to the brain promotes anxiety-like behavior // J. Neurosci. - 2013. - T. 33. - № 34. - P. 13820–13833.

200. Wohleb E. S. et al. Re-establishment of anxiety in stress-sensitized mice is

caused by monocyte trafficking from the spleen to the brain // Biol. Psychiatry. - 2014. - T. 75. - № 12. - P. 970–981.

201. Wohleb E. S. et al. Integrating neuroimmune systems in the neurobiology of depression // Nat. Rev. Neurosci. - 2016. - T. 17. - № 8. - P. 497–511.

202. Wohleb E. S., Delpech J. C. Dynamic cross-talk between microglia and peripheral monocytes underlies stress-induced neuroinflammation and behavioral consequences // Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry. - 2017. - 6. - P. 410-415.

203. Wong M.-L. et al. Inflammasome signaling affects anxiety-and depressive-like behavior and gut microbiome composition // Mol. Psychiatry. - 2016. - T. 21. № 6. - P. 797–805.

204. Yamamoto M. и др. Microglia-Triggered Plasticity of Intrinsic Excitability Modulates Psychomotor Behaviors in Acute Cerebellar Inflammation // Cell Rep. - 2019. - 28(11). - P.2923-2938.

205. Yirmiya R. Endotoxin produces a depressive-like episode in rats // Brain Res. - 1996. - T. 711. - № 1. - P. 163–174.

206. Yirmiya R., Winocur G., Goshen I. Brain interleukin-1 is involved in spatial memory and passive avoidance conditioning // Neurobiol. Learn. Mem. 2002. - T. 78. - № 2. - P. 379–389.

207. Yoshimura C. et al. Glucocorticoids induce basophil apoptosis // J. Allergy Clin. Immunol. - 2001. - T. 108. - № 2. - P. 215–220.

208. Zhang C. et al. Structural resilience of the gut microbiota in adult mice under high-fat dietary perturbations // ISME J. - 2012. - T. 6. - № 10. - P. 1848–1857.

209. Ziebell J. M. et al. Rod microglia: elongation, alignment, and coupling to form trains across the somatosensory cortex after experimental diffuse brain injury // J. Neuroinflammation. - 2012. - T. 9. - № 1. - P. 1–11.

210. Zuiden M. van et al. Glucocorticoid sensitivity of leukocytes predicts PTSD, depressive and fatigue symptoms after military deployment: a prospective study // Psychoneuroendocrinology. - 2012. - T. 37. - № 11. - P. 1822–1836.