

Квичанский Алексей Андреевич

Возрастная динамика экспрессии генов, ассоциированных с  
нейровоспалением и реакцией на стресс, у крыс в модели неонатального  
провоспалительного стресса

1.5.5 – физиология человека и животных

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН

Научный руководитель:

Большаков Алексей Петрович, к.ф.-м.н., заведующий лабораторией Молекулярной нейробиологии ИВНД и НФ РАН

Научный консультант д.б.н., проф. Гуляева Наталия Валерьевна, заведующая лабораторией Функциональной биохимии нервной системы ИВНД и НФ РАН

Официальные оппоненты:

Дубынин Вячеслав Альбертович, д.б.н., проф., профессор кафедры Физиологии человека и животных Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

Крупина Наталия Александровна, д.б.н., главный научный сотрудник, Федерального государственного бюджетного научного учреждения "НИИ общей патологии и патофизиологии"

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

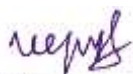
Защита диссертации состоится 28.09 2022 в 14:00 на заседании Диссертационного совета 24.1.046.01 при Институте Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН по адресу: 117485, Москва, ул. Бутлерова 5А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН», а также на сайте ИВНД: <https://ihna.ru>

Автореферат разослан « » \_\_\_\_\_ 2022\_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

д.б.н. Иерусалимский В.Н.



## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность темы исследования.**

В настоящее время большое депрессивное расстройство является одним из наиболее распространенных в мире заболеваний. По данным ВОЗ, каждый третий житель благополучных стран пережил депрессивное расстройство, а до 10% населения находится в состоянии депрессии невротической и психотической степени выраженности. В клинической практике принято диагностировать депрессию по выраженности таких симптомов, как подавленное и сниженное настроение, повышенная утомляемость, двигательная заторможенность, сниженный темп мышления, ангедония, чувство вины, нарушения способности к целесообразной деятельности, нарушения сна (Kupfer, Frank, Phillips, 2012). Эпидемиологические исследования показали вклад неблагоприятных условий среды, в частности, психологического стресса, генетических факторов, коморбидность расстройств депрессивного спектра с рядом соматических заболеваний, такими как хронические воспалительные заболевания, дефицит витамина Д, гипотиреоз, синдром Иценко-Кушинга и ряд других.

В 1950-х годах в ходе «психофармакологической революции» было открыто специфическое антидепрессантное действие ряда соединений, таких как имипрамин и ипрониазид, что позволило начать изучение физиологических механизмов, нарушение работы которых специфически приводит к развитию депрессивных состояний. Достаточно быстро было установлено, что эти соединения приводят к повышению концентрации моноаминовых нейромедиаторов (главным образом, серотонина и норадреналина) путем нарушения обратного захвата этих медиаторов или при помощи ингибирования моноаминоксидазы – фермента, утилизирующего эти вещества. Препараты, влияющие на системы серотонина, норадреналина и дофамина, являются основой антидепрессантной терапии в настоящее время. К сожалению, 20 - 45% пациентов, получающих терапию антидепрессантами, вообще не приходит к состоянию стабильной ремиссии [Kirsch, 2014], что вынуждает искать альтернативные пути патогенеза депрессивных расстройств. По современным представлениям, в патогенезе депрессивных расстройств могут участвовать нарушения системы реакции на стресс (как на уровне ЦНС, так и на периферии), а также нейровоспаления.

Данная работа посвящена изучению развития изменений экспрессии генов, ассоциированных с реакцией на стресс и с нейровоспалением, в ЦНС неполовозрелых,

молодых и взрослых крыс обоего пола, у которых индуцировали депрессивно-подобное состояние неонатальным провоспалительным стрессом (НПС).

**Цель исследования.** Изучить изменения экспрессии стресс-ассоциированных генов в ходе онтогенеза у самцов и самок крыс в модели депрессии, индуцированной НПС.

**Задачи исследования:**

1. Изучить развитие депрессивно-подобного состояния у взрослых самцов и самок крыс, перенесших НПС.
2. Изучить вызванные поведенческим стрессом изменения экспрессии генов, ассоциированных с нейровоспалением и стрессорным ответом, в коре и гиппокампе взрослых самцов и самок крыс, перенесших НПС.
3. Изучить дифференциальное влияние НПС на экспрессию генов, ассоциированных с нейровоспалением и стрессорным ответом, в коре, дорсальном и вентральном гиппокампе самцов и самок крыс в возрасте 18 суток
4. Изучить дифференциальное влияние НПС на экспрессию генов, ассоциированных с нейровоспалением и стрессорным ответом, в коре, дорсальном и вентральном гиппокампе самцов и самок крыс в возрасте 30 суток

**Научная новизна.** Впервые были показаны половые различия в эффективности индукции депрессивно-подобного поведения НПС: в то время, как у самцов развивалось депрессивно-подобное поведение, поведение самок не изменялось.

Впервые в данной модели было продемонстрировано развитие признаков нейровоспаления в виде повышения экспрессии мРНК *Il6* у взрослых самцов на фоне развития депрессивно-подобного поведения под действием НПС. Эти изменения были сходны с развивающимися под действием поведенческого стресса в тесте вынужденного плавания.

Впервые в данной модели было показано, что НПС приводит к изменению характера реакции на острый стресс у взрослых животных: у самцов исчезало влияние поведенческого стресса на экспрессию мРНК *Il6* в гиппокампе, а у самок проявлялось влияние поведенческого стресса на концентрацию глюкокортикоидных рецепторов (ГР) и минералокортикоидных рецепторов (МР) во фронтальной коре.

Впервые в данной модели было показано дифференциальное влияние НПС на экспрессию мРНК *Crh*, *Cx3cl1*, *Cx3cr1* в дорсальном и вентральном отделах гиппокампа молодых самцов и *Nr3c1* в дорсальном и вентральном отделах гиппокампа молодых самок в возрасте, когда депрессивно-подобное поведение еще не проявляется.

**Теоретическая и практическая значимость.** Теоретическая значимость данной работы заключается в расширении современных представлений о патогенезе депрессивных расстройств, наблюдаемых в модели НПС. Была изучена возрастная динамика развития изменений экспрессии мРНК генов, ассоциированных с реакцией на стресс и нейровоспалением, в том числе в возрасте, в котором депрессивно-подобное поведение еще не проявляется. Эти данные могут быть использованы при разработке патогенетически обоснованных методик профилактики, диагностики и лечения расстройств депрессивного спектра.

#### **Положения выносимые на защиту:**

1. У самцов крыс, перенесших неонатальный провоспалительный стресс, в возрасте трех месяцев развивается спонтанное депрессивно-подобное состояние, сопровождающееся хроническим воспалением в гиппокампе.
2. У молодых самцов крыс в возрасте 30 суток, не обнаружено нейровоспаления, но зафиксированы специфичные для отделов гиппокампа изменения экспрессии генов фракталкина и его рецептора, а также генов, сопряженных со стрессорным ответом. Эти изменения могут указывать на механизмы формирования нарушений, которые лежат в основе патогенеза депрессивно-подобного поведения, отмечаемые в более старшем возрасте.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность полученных результатов определяется значительным и достаточным для статистического анализа числом наблюдений, использованием в работе современных методов анализа, в том числе молекулярно-биохимических, применением адекватных методов статистического анализа.

Материалы диссертации были представлены на: XX Школе-конференции молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии ИВНДиНФ РАН (31.10.2016 – 01.11.2016, Москва), конференции «Биомембраны 2018» (01.10.2018 – 05.10.2018, Долгопрудный).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 4 печатных работы в рецензируемых журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при

Министерстве образования и науки Российской Федерации и международных журналах, индексируемых в базе Web of Science/Scopus.

**Личный вклад автора.** Автор участвовал в разработке дизайна и протоколов исследования, постановке задач и обосновании выводов. Автор принимал участие в проведении поведенческого тестирования, подготовке биологического материала, анализе экспрессии мРНК, концентраций кортикостерона, цитокинов, рецепторов глюкокортикостероидов, в структурах мозга крыс. Самостоятельно проведены обработка и статистический анализ полученных данных.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 149 страницах машинописного текста, содержит 3 таблицы и иллюстрирована 50 рисунками. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты исследования, обсуждение результатов исследования, заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений, список публикаций по теме диссертации, список литературы. Библиографический указатель содержит 3 отечественных и 315 зарубежных источников литературы.

## 2. МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ И МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Животные.** В эксперименте использовали потомство крыс линии Wistar, полученных из питомника "Столбовая". Животных содержали в индивидуальных клетках со свободным доступом к пище и воде. Светлое время суток было установлено с 8:00 до 20:00. День рождения крысы считали 1-м днем постнатального периода (ПНД1). После родов, ограничивали численность выводка 9 особями. На ПНД25 отсаживали родившую самку, выводок разделяли на самцов и самок и содержали группами по 4-5 крыс в клетке. Для экспериментов брали как самцов, так и самок. Всего в работе было использовано 111 животных (15 выводков).

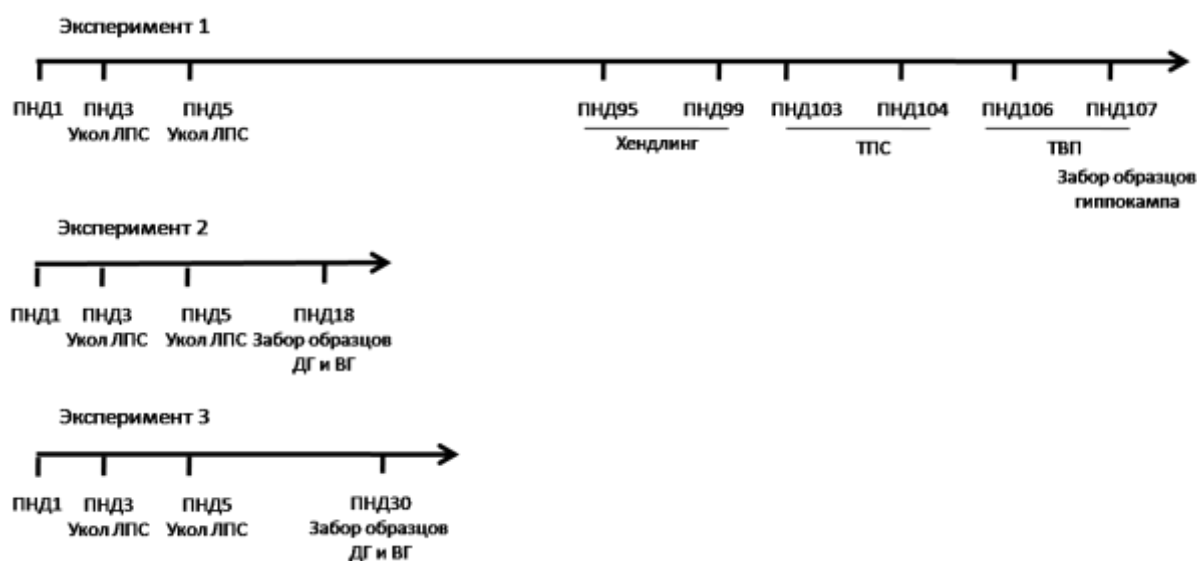
**Экспериментальные процедуры.** Выводки случайным образом разделяли на экспериментальные и контрольные. На ПНД3 и ПНД5 животных из экспериментальных выводков подвергали НПС путем введения подкожно стерильного раствора бактериального липополисахарида (ЛПС) в изотоническом растворе NaCl (10 мкл/г массы тела 0,05 мг/кг ЛПС из *Escherichia coli*; серотип O26:B6, Sigma-Aldrich, USA). Крысам из пометов контрольной группы (Контроль) вводили соответствующий объем изотонического стерильного раствора NaCl. Выбранная доза ЛПС не вызывала гибели подопытных животных. Было проведено три серии экспериментов.

В первой серии взрослых животных из 7 выводков, достигших 3-месячного возраста, подвергали хендлингу в течение 4-х дней, после чего делили на две подгруппы. С животными одной подгруппы проводили тесты предпочтения сахарозы и вынужденного плавания. Другую подгруппу крыс оставляли в домашних клетках. Через 30 мин после завершения теста вынужденного плавания животных выводили из эксперимента путем декапитации под хлоралгидратным наркозом. Животных, не задействованных в поведенческих тестах, декапитировали в это же время. Образцы тканей из правого полушария использовали для изучения экспрессии генов, из левого – для иммуноферментного анализа.

Во второй серии ювенильных крыс из 4-х выводков в возрасте 18 суток выводили из эксперимента путем декапитации под хлоралгидратным наркозом. У крыс брали отделы мозга из правого полушария (фронтальную кору, дорсальный и вентральный гиппокамп) для изучения экспрессии генов.

В третьей серии молодых крыс из 4-х выводков в возрасте 30 суток выводили из эксперимента путем декапитации под хлоралгидратным наркозом. У крыс брали отделы

мозга из правого полушария (фронтальную и соматосенсорную кору, дорсальный и вентральный гиппокамп) для изучения экспрессии генов. Аналогичные отделы мозга из левого полушария брали для биохимического анализа.



**Рисунок 1. Схема эксперимента. ТВП - тест вынужденного плавания; ТПС - тест предпочтения сахарозы; остальные сокращения как в тексте.**

### Исследование поведения

**Тест «предпочтение сахарозы».** Крыс предварительно адаптировали к клеткам, в которых проводили тест в течение 1 дня. После этого предъявляли две поилки (с водой и 1% раствором сахарозы соответственно) и регистрировали поведение животных, как описано ранее (Саркисова и др., 2014).

**Тест «вынужденное плавание».** Тестирование поведения проводили в прозрачных цилиндрах высотой 40 см и диаметром 20 см («Открытая наука», Россия), наполненных водой с температурой  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ . В день 1 крыс запускали в цилиндры на 15 мин, после чего вынимали, вытирали полотенцем и высушивали под струей теплого воздуха. После этого животных возвращали в домашние клетки. В день 2 крыс помещали в цилиндры на 5 мин. и их поведение записывали с помощью видеокамеры. В ходе тестирования регистрировали длительность активного периода плавания до первого эпизода иммобильности, общее время иммобильности и время активного плавания. После окончания теста животных высушивали и декапитировали через 30-40 мин под хлоралгидратным наркозом. Тест вынужденного плавания вызывает острый поведенческий стресс (ПС), что потребовало введения соответствующего контроля.



## Биохимический и молекулярно-биологический анализ

**Подготовка ткани мозга для изучения экспрессии генов.** Через 30 мин после последнего поведенческого теста крысы декапитировали под хлоралгидратным наркозом, мозг вынимали, промывали в ледяном изотоническом растворе NaCl, выделяли гиппокамп, цельный, или по-отдельности дорсальный гиппокамп (ДГ) и вентральный гиппокамп (ВГ) из правого полушария и замораживали их в жидком азоте. В качестве ДГ выделяли дорсальную половину гиппокампа вдоль дорсально-вентральной оси, ВГ – вентральную четверть. В случае выделения ДГ и ВГ остаток ткани гиппокампа не анализировали. Образцы гомогенизировали в реактиве для выделения РНК (ExtractRNA, «Евроген», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя и выделяли фракцию тотальной РНК. РНК в ходе работы хранили в виде раствора в деионизованной воде и долговременно – в виде осадка в 80% этаноле.

**Количественная ПЦР «в реальном времени».** 1 мкг РНК подвергали обработке ДНКазой при помощи набора DNAaseI («ThermoFisherScientific», США) в соответствии с рекомендациями производителя. Половину обработанной РНК использовали для проведения реакции обратной транскрипции при помощи набора реактивов MMLV RT kit («Евроген»), используя ингибитор РНКаз RNase Inhibitor («New England Biolabs», США), в соответствии с рекомендациями производителей. Использовали эквимольную смесь случайного декапраймера («Евроген», SB002, Россия) и олиго(dT)<sub>15</sub>-праймера («Евроген», SB001, Россия), концентрация каждого праймера в реакционной системе составляла 1 мкМ. После обратной транскрипции полученный продукт развели в 8 раз деионизованной водой. Вторую половину РНК, обработанной ДНКазой, использовали в качестве отрицательного контроля «без обратной транскрипции». Экспрессию целевых генов анализировали при помощи набора «Готовая смесь для ПЦР qPCRmix-HS SYBR+LowROX» («Евроген», PK156L, Россия), используя станцию для количественной ПЦР CFX384 Touch («Bio-Rad», США). Праймеры подбирали на основе последовательностей из базы данных NCBI в программном пакете LasergenePrimerSelect.

В качестве нормировочного гена использовали праймеры к кДНКгена *Hprt*, выбранного по результатам анализа транскриптома гиппокампа крысы [Dobryakova и др., 2018]. Эффективность реакции измеряли для каждого рабочего разведения праймеров методом серийных разведений. Во всех экспериментах эффективность реакции находилась в диапазоне 1,8–2,0. Каждую пробу дублировали; кроме того, для каждой пробы и каждого гена ставили контроль «без обратной транскрипции». Для каждой лунки контролировали температуру плавления продукта ПЦР. Данные на графиках

представлены в виде относительного количества:

$$\text{Относительное количество} = \frac{E_i^{\Delta Ct_i}}{E_{Hprt}^{\Delta Ct_{Hprt}}}$$

**Иммуноферментный анализ (ИФА).** Биоматериал выделяли аналогично используемому для изучения экспрессии генов, но из левого полушария. Отделы мозга гомогенизировали на льду в буфере для экстракции растворимых белков (1%-ный NP-40 («Sigma-Aldrich», США) в ФСБ («Пан-Эко», Россия), pH 7,5) при помощи гомогенизатора Поттера 10 ударами пестика при 1000 об./мин. Гомогенат центрифугировали 20 мин при 4 °С и 13200 g. Супернатант отбирали и хранили при –20°С. Концентрацию белка в пробах измеряли при помощи набора Pierce™ BCA ProteinAssayKit («ThermoFisherScientific», США). Концентрацию растворимой фракции фракталкина, ИЛ-6 и ИЛ-1β в пробах определяли при помощи наборов Rat CX3CL1/FractalkineDuoSet ELISA («R&D Systems», США), Rat IL-6 Quantikine ELISA Kit, («R&D Systems», США) и Rat IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA («R&D Systems», США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для определения уровня кортикостерона в сыворотке крови и супернатантах отделов мозга использовали наборы для иммуноферментного анализа (DRG, Германия), с помощью которых детектировали как свободный, так и связанный с транспортными белками кортикостерон методом конкурентного ИФА. Каждую пробу дублировали, сигнал детектировали при помощи планшетного ридера HidexSense («Hidex», Финляндия).

**Вестерн-блоттинг.** Биологический материал выделяли аналогично используемому для ИФА. Образцы супернатантов отделов мозга подвергали электрофоретическому разделению в 8% SDS-PAGE в денатурирующих условиях. Для выявления минерало- (MP) и глюкокортикоидных рецепторов (ГР) мембраны инкубировали с первичными антителами анти-MP (sc-53000, SantaCruz Biotechnology) и анти-ГР (#12041, Cell Signaling). Для контроля вариабельности переноса белка с геля на PVDF мембрану проводили инкубацию с антителами анти-Pan-Actin (4968S, Cell Signaling) на структурный белок актин, который в дальнейшем использовали для пересчета денситометрических данных, полученных для целевых белков. Связывание вторичных антител детектировали с использованием хемилюминесцентной системы SuperSignalWestFemto (ThermoScientific, USA) и интенсивность сигнала определяли в системе гель-документирования MicroChemi4.2 (DNR Bio-ImagingSystems Ltd., Израиль). Денситометрический анализ полученных белковых полос проводили с помощью программного обеспечения к MicroChemi 4.2.

**Статистический анализ.** Данные о поведении крыс в тесте вынужденного плавания представлены в виде наложения столбчатых диаграмм (среднее  $\pm$  SE) и точечных диаграмм, во всех группах  $n \geq 5$ . Данные о потреблении сахарозы, экспрессии генов и концентрации их белковых продуктов на графиках представлены в виде наложения диаграмм размаха и точечных диаграмм, во всех группах  $n \geq 5$ . Распределение значений переменных в выборке оценивали на соответствие нормальному с помощью критерия Шапиро–Уилка. Достоверность различий в исследовании вынужденного плавания определяли двухфакторным дисперсионным анализом с последующим апостериорным анализом по методу Фишера или Тьюки в зависимости от применимости методов. В качестве факторов для независимых переменных использовали «пол» и «НПС». В исследованиях потребления сахарозы, экспрессии мРНК и концентрации белков распределение переменных не соответствовало нормальному по критерию Шапиро–Уилка, поэтому достоверность различий между экспериментальными группами выявляли по методу Манна–Уитни с поправкой Бонферрони (3 гипотезы,  $\alpha = 0,017$ ). Расчеты проводили в пакете MS Excel, статистическую обработку данных проводили в программном пакете scipy языка Python 3.7. Графики построены при помощи пакета Seaborn языка Python 3.7.

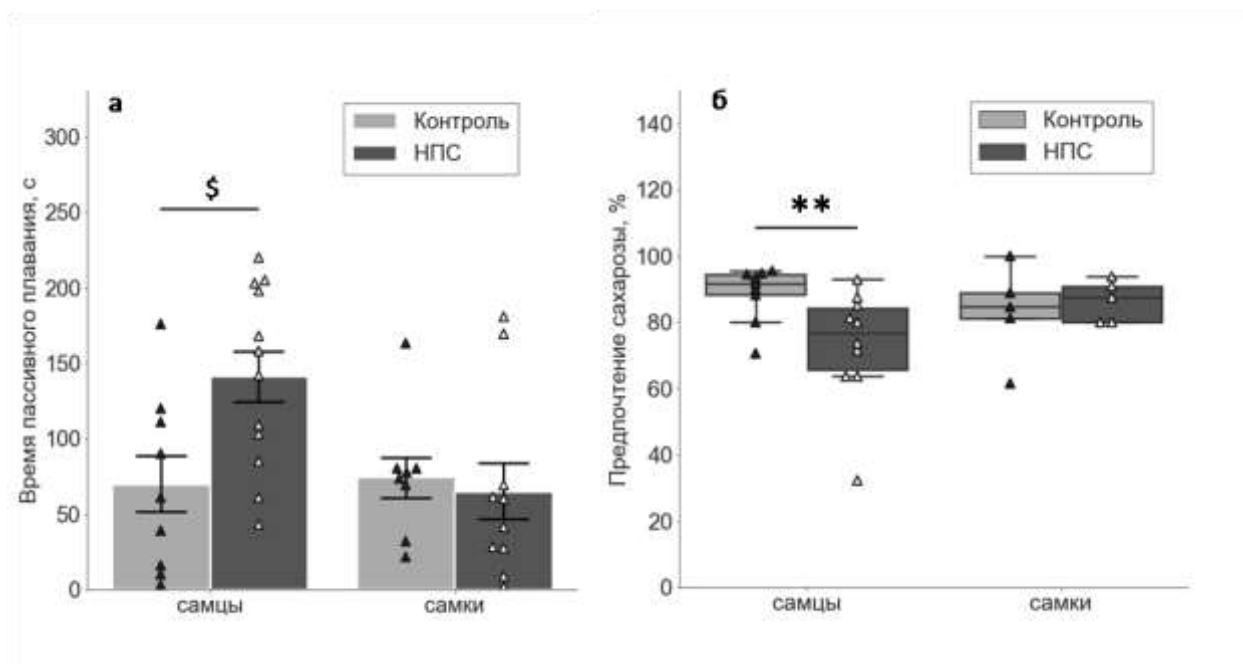
### 3. Результаты и их обсуждение

**Поведение взрослых крыс (ПНД107).** Из предыдущих работ нашей лаборатории известно, что у 1-месячных самцов крыс, подвергнутых НПС, развивается тревожно-подобное поведение, но развития депрессивно-подобного поведения не выявлено; развитие депрессивно-подобного поведения у крыс-самцов наблюдали в возрасте 3 месяцев [Tishkina и др., 2016]. В данном эксперименте мы расширили когорту исследованных животных и включили в нее взрослых крыс обоего пола.

Ангедония является центральным симптомом развития депрессивного состояния. У животных состояние ангедонии может быть выявлено в ходе предъявления вкусного питья или пищи. Предпочтение сладкого раствора сахарозы в ситуации выбора между сладким питьем и водой отражает развитие ангедонии у крыс. Выявлено снижение потребления сахарозы взрослыми самцами, подвергнутыми НПС по сравнению с контрольной группой, однако не было выявлено изменения потребления сахарозы самками (Рисунок 2б).

Перенесённый НПС приводил к повышению времени пассивного плавания у взрослых самцов крыс в тесте вынужденного плавания. У самок значимых изменений

поведения в этом тесте не было выявлено (Рисунок 2а). Таким образом, самцы демонстрировали развитие так называемого «поведения отчаяния», которое зачастую интерпретируют как депрессивно-подобное, тогда как самки демонстрировали относительную устойчивость к развитию депрессивно-подобного поведения.

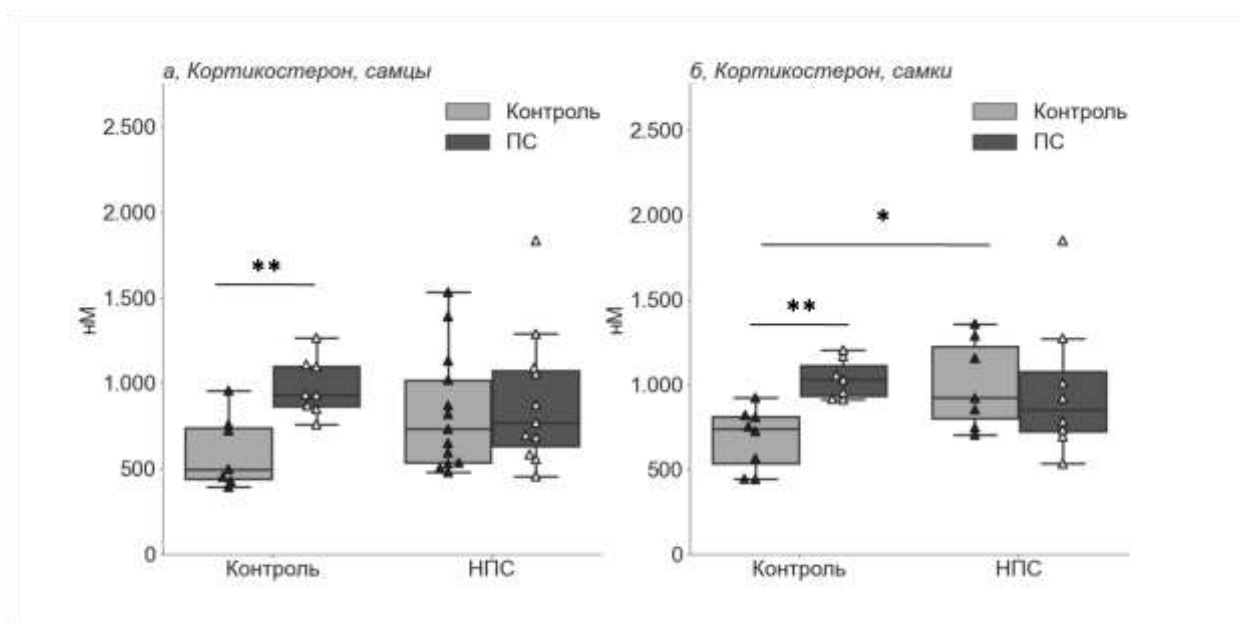


**Рисунок 2. Влияние НПС на депрессивно-подобное поведение взрослых крыс (ПНД107).** а - время пассивного плавания в тесте «вынужденное плавание» у взрослых крыс. \$ -  $p < 0.05$ , тест Тьюки. б - доля выпитого раствора сахарозы (%) самцами и самками взрослых крыс в тесте «предпочтение сахарозы» в первой серии экспериментов. \*\* -  $p < 0.017$ , тест Манна-Уитни,  $n \geq 5$ .

Таким образом, у взрослых крыс выявлены половые различия во влиянии НПС на депрессивно-подобное поведение. НПС вызывает депрессивно-подобное поведение у самцов крыс, заметное как в тесте ВП, так и в тесте предпочтения сахарозы, т.е., у крыс-самцов оказалось нарушены как реакция на неизбежный стресс, так и гедонистическое поведение. Крысы-самки оказались устойчивы к индукции депрессивно-подобного поведения в результате НПС.

**Влияние неонатального провоспалительного стресса и острого поведенческого стресса на концентрацию кортикостерона в крови, гиппокампе и фронтальной коре взрослых крыс (ПНД107).** Кортикостерон является одним из важнейших медиаторов ГГНО, участвующим в реакции на стресс. Крысы обоих полов демонстрировали повышение концентрации кортикостерона в сыворотке крови в ответ на острый поведенческий стресс, вызванный помещением животных в ТВП. НПС не приводил к изменениям концентрации кортикостерона в сыворотке самцов крыс. В

отличие от самцов, у самок была выявлена тенденция к увеличению концентрации кортикостерона в сыворотке под действием НПС. В то же время, НПС изменял реакцию ГГНО на острый стресс и предотвращал повышение концентрации кортикостерона в сыворотке крыс обоих полов (Рисунок 3). Эти данные позволяют предположить, что поведенческие тесты, применяемые для выявления депрессивно-подобного поведения, могут быть неадекватны при применении к самкам, поскольку реакция на стресс у них была нарушена, но нарушения поведения не были выявлены.

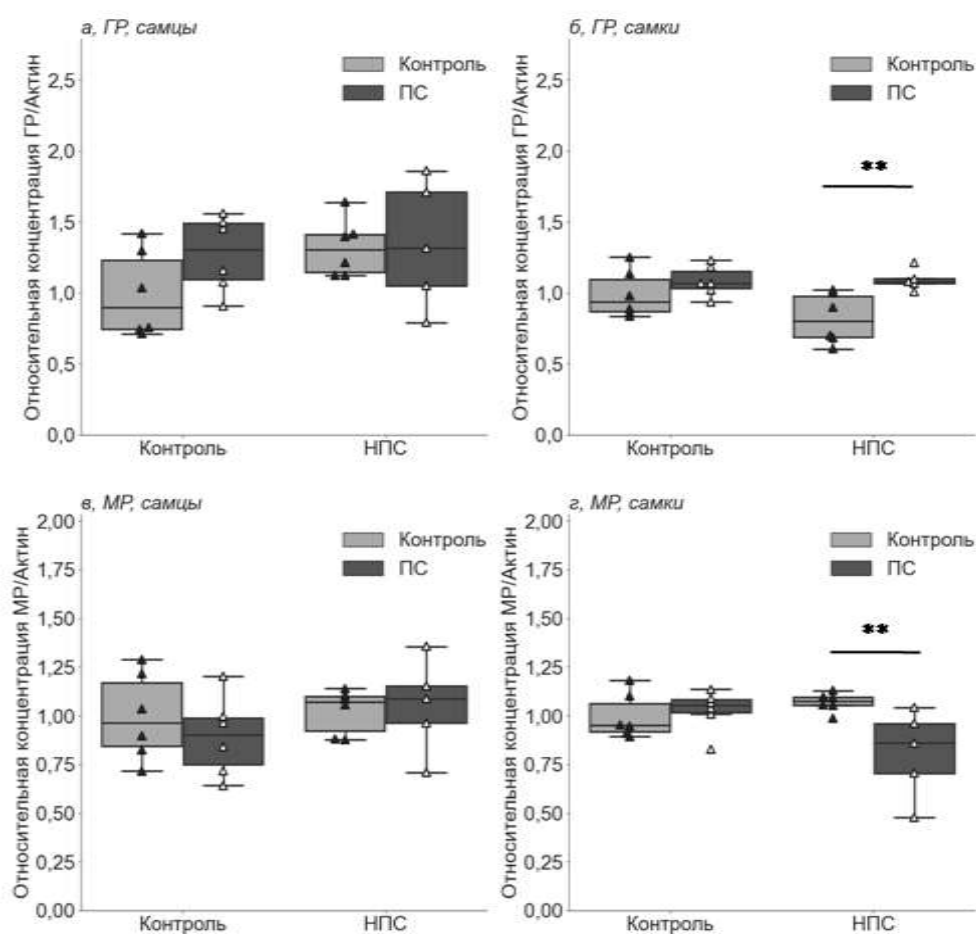


**Рисунок 3. Влияние НПС и поведенческого стресса (ПС) на концентрацию кортикостерона в крови взрослых самцов и самок крыс (ПНД107).** \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,017$ , тест Манна-Уитни,  $n \geq 7$ .

Несмотря на изменения концентрации кортикостерона в сыворотке крови в результате НПС и ответа на острый стресс, концентрация кортикостерона в исследованных отделах мозга подопытных животных не изменялась. Можно предположить, что системы контроля проникновения в мозг кортикостероидов и их метаболизма нивелировали эффекты изменения концентрации кортикостерона в крови.

**Влияние неонатального провоспалительного стресса и острого поведенческого стресса на экспрессию генов, сопряженных со стрессорным ответом, в гиппокампе и фронтальной коре взрослых крыс (ПНД107).** НПС и поведенческий стресс сами по себе не влияли на экспрессию мРНК и белка обоих генов рецепторов кортикостероидов у взрослых животных. В то же время НПС привел к изменению реакции на стресс у подопытных животных, выраженной в появлении влияния поведенческого

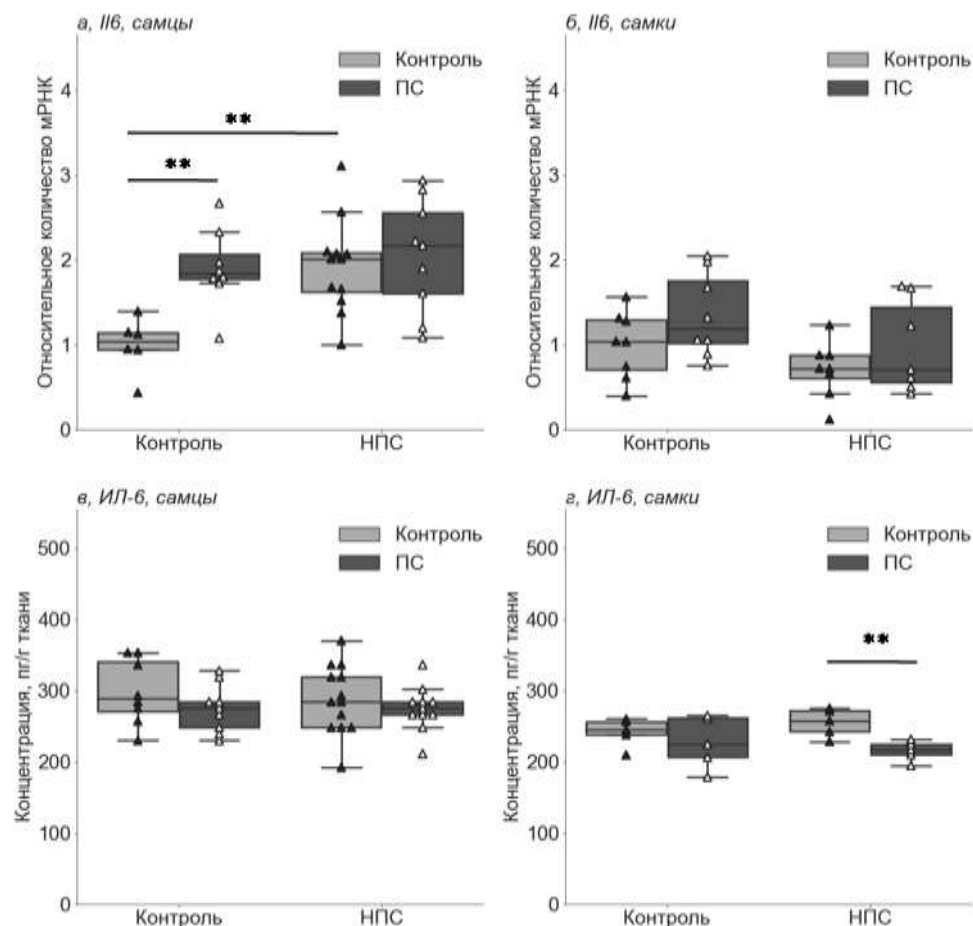
стресса на концентрацию белков ГР и МР во фронтальной коре самок: концентрация ГР увеличивалась, а концентрация МР уменьшалась под действием поведенческого стресса (Рисунок 4б,г). Эти данные вступают в определенные противоречия с данными литературы; напр. в работе McCormick и соавт.[1995] в сходной модели с пренатальным стрессом не отмечено повышения экспрессии ГР во фронтальной коре самок в ответ на стресс. Выявленные изменения концентрации ГР и МР у самок происходят на фоне тенденции к повышению концентрации кортикостерона в крови. Можно предположить, что у взрослых самок крыс нарушена регуляция ГГНО, что приводит к выявленным изменениям.



**Рисунок 4. Влияние НПС и поведенческого стресса (ПС) на концентрацию ГР и МР во фронтальной коре взрослых самцов и самок крыс(ПНД107). \*\* - $p < 0,017$ , тест Манна-Уитни,  $n \geq 5$ .**

Не было выявлено достоверного влияния НПС и поведенческого стресса на экспрессию генов *Crh*, *Crhr1*, *Crhr2*в гиппокампе и фронтальной коре самцов и самок крыс.

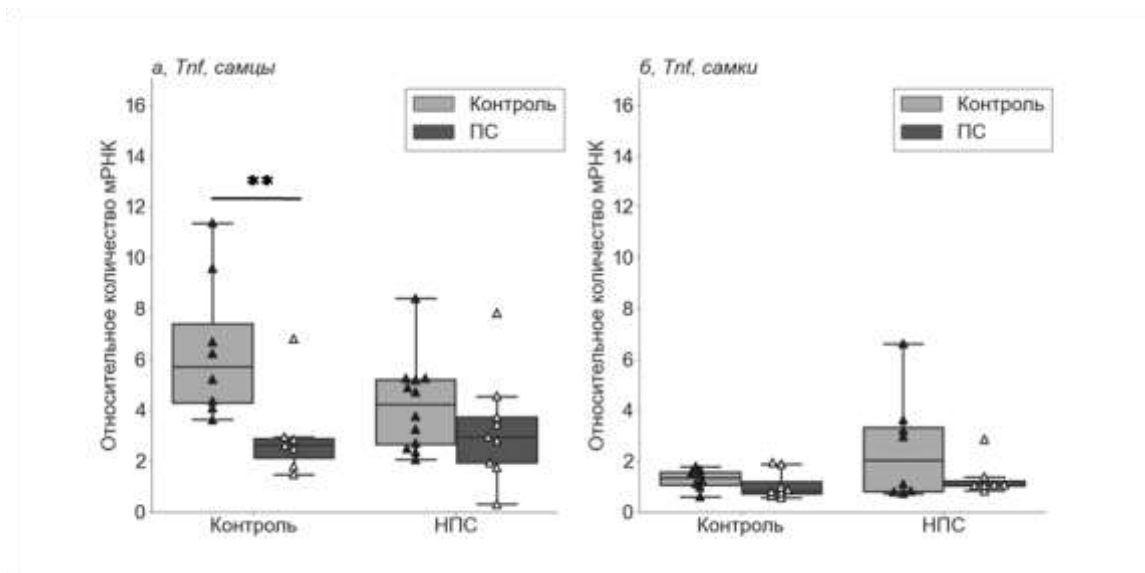
**Влияние неонатального провоспалительного стресса и острого поведенческого стресса на экспрессию генов, сопряженных с нейровоспалением, в гиппокампе и фронтальной коре взрослых крыс(ПНД107).** Экспрессия мРНК *Il6* была повышена в гиппокампе взрослых самцов, подвергнутых НПС; у самок аналогичного эффекта выявлено не было. Это может указывать на развитие хронического нейровоспаления у самцов, приводящего к депрессивно-подобному состоянию. Поведенческий стресс вызывал повышение экспрессии мРНК *Il6* в гиппокампе контрольных самцов до уровня, наблюдаемого у животных, подвергнутых НПС (Рисунок 5а). Эти данные хорошо согласуются с данными о повышении экспрессии мРНК данного цитокина в микроглии под действием хронического стресса и участия ИЛ-6 в индукции депрессивно-подобных состояний у животных [Ramirez и соавт., 2015; Sukoff Rizzo и соавт., 2012]. В то же время не было выявлено влияния НПС и поведенческого стресса на концентрацию белка ИЛ-6 в гиппокампе взрослых самцов крыс (Рисунок 5в). Можно предположить, что синтез данного цитокина происходит локально, с быстрой секрецией и утилизацией комплекса ИЛ-6 и его рецепторов клетками-мишенями. Кроме того, для данного цитокина известно активное вторичное использование клетками иммунной системы, что не требует повышения средней концентрации ИЛ-6 в ткани [Verboogen и др., 2019]. У взрослых самок НПС приводил к снижению концентрации ИЛ-6 под действием поведенческого стресса (Рисунок 5г).



**Рисунок 5.** Влияние НПС и поведенческого стресса (ПС) на экспрессию ИЛ-6 в гиппокампе взрослых самцов и самок крыс (ПНД107). а, б – мРНК *Il6*; в, г – белок ИЛ-6. \*\*\* -  $p < 0,017$ , тест Манна-Уитни,  $n \geq 5$ .

Не было выявлено влияния НПС на экспрессию мРНК *Tnf* у взрослых животных обоих полов. В то же время поведенческий стресс приводил к парадоксальному снижению экспрессии мРНК *Tnf* во фронтальной коре самцов (Рисунок 6а). Сходные данные были получены Cotrone и соавт. [2021] для экспрессии *Tnf* в микроглии крыс, в модели посттравматического стрессорного расстройства. Можно предположить, что поведенческий стресс вызвал активацию противовоспалительных механизмов, подавивших экспрессию мРНК *Tnf* у этих животных. С учетом данных о повышении экспрессии мРНК *Il6*, можно предположить, что поведенческий стресс вызвал повышение локальной концентрации ИЛ-6 в гиппокампе, что приводило к зависимому от NFκB снижению экспрессии мРНК *Tnf* [Wang и соавт., 2017]. Вероятно, клетками мишенями в данном случае выступали микроглиоциты, поскольку для родственных им дендритных клеток такой эффект четко показан [Hegde, Pahne, Smola-Hess, 2004].





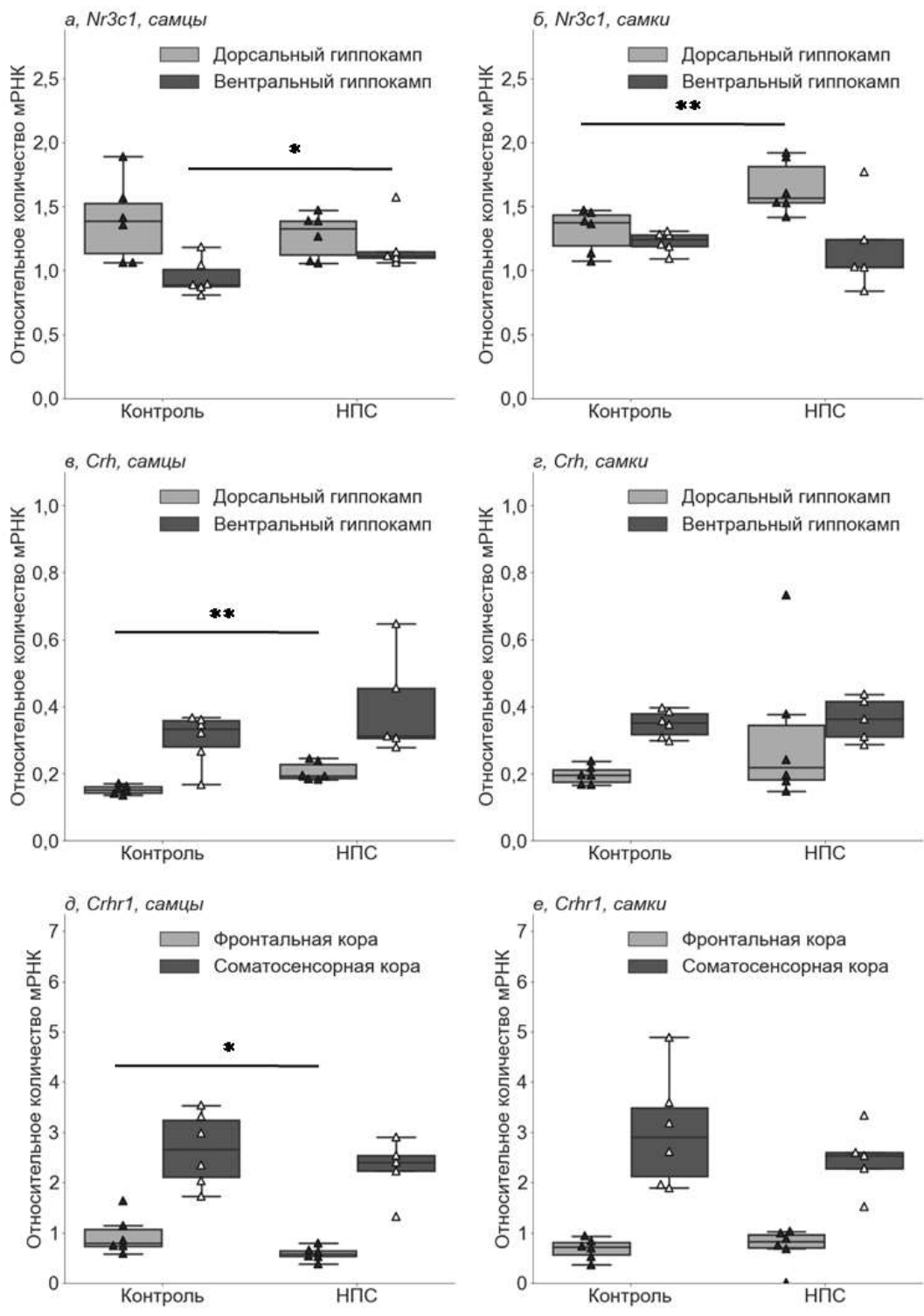
**Рисунок 6.** Влияние НПС и поведенческого стресса (ПС) на экспрессию мРНК*Tnf* во фронтальной коре взрослых самцов и самок крыс(ПНД107). \*\* - $p < 0,017$ , тест Манна-Уитни,  $n \geq 7$

Таким образом, НПС предотвращал вызванное стрессом повышение концентрации кортикостерона в сыворотке крови взрослых крыс обоих полов, что может указывать на измененное функционирование ГГНО у этих животных. В то же время, влияние НПС на ткань мозга было специфично для самцов и самок. В то время, как у самцов НПС вызывал депрессивно-подобное поведение и развитие признаков хронического нейровоспаления в гиппокампе, у самок НПС не вызывал изменений поведения в тестах вынужденного плавания и предпочтения сахарозы, но изменял реакцию на острый стресс в виде изменений концентрации ГР и МР во фронтальной коре.

Для изучения возможных механизмов лежащих в основе обнаруженных изменений, мы изучили экспрессию тех же генов в дорсальных и вентральных гиппокампах, а также во фронтальной и соматосенсорной коре крыс в возрасте 18 и 30 суток, подвергнутых НПС.

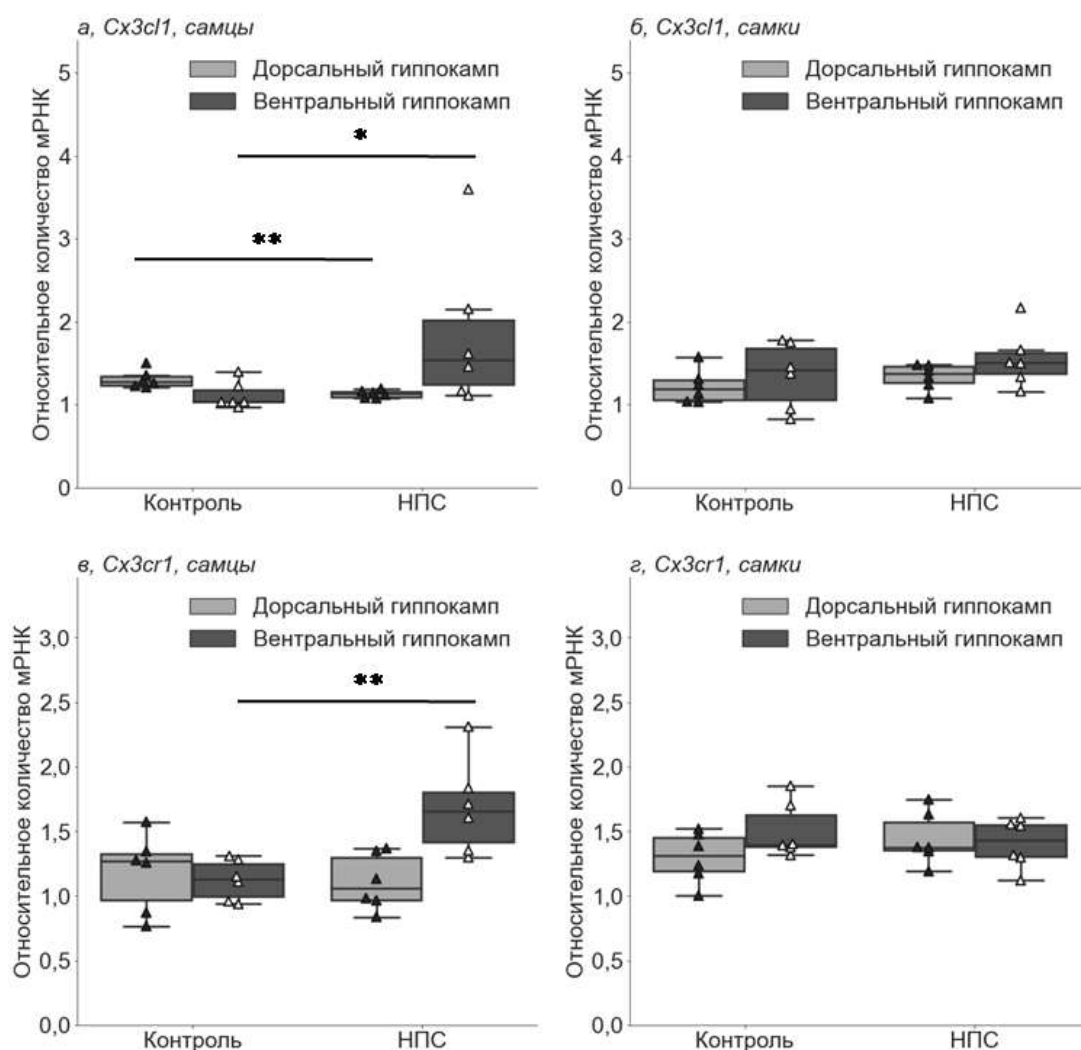
**Эффекты неонатального провоспалительного стресса у неполовозрелых животных в возрасте 18 суток.** Не было выявлено влияния НПС на экспрессию изученных генов в отделах гиппокампа и фронтальной коре самцов и самок крыс в возрасте 18 суток. Это может указывать на то, что изменения, развивающиеся у крыс более старшего возраста, не являются непосредственно вызванными воспалением, связанным с инъекцией ЛПС, а представляют из себя проявления процессов, запущенных в раннем детстве и не являющихся прямо опосредованными экспрессией изученных генов.

**Влияние неонатального провоспалительного стресса на экспрессию генов, сопряженных со стрессорным ответом, в дорсальном и вентральном отделах гиппокампа, а также во фронтальной и соматосенсорной коре молодых крыс (ПНД30).** Повышение экспрессии *Nr3c1* в ДГ под действием НПС было единственным выявленным изменением экспрессии исследованных генов у молодых самок (Рисунок 7б). В модели раннего стресса - отлучения от матери самки демонстрировали повышение иммунореактивности ГР в ДГ в результате дополнительного стрессирования во взрослом возрасте [Renard, Rivarola, Suárez, 2010]. По-видимому, самки, как и самцы, находятся в стрессированном состоянии, однако, в силу половых различий, исследованные нами гены не участвуют в патогенезе будущих нарушений секреции кортикостероидов в кровь и изменений поведения, не выявляемых тестами вынужденного плавания и потребления сахарозы у самок. Молодые самцы демонстрировали повышение экспрессии мРНК *Crh* в ДГ в ответ на НПС, несмотря на то, что они не были подвергнуты поведенческому стрессу (Рисунок 7в). В предыдущей работе нашей лаборатории было показано, что самцы крыс в этом возрасте демонстрируют больший уровень тревожности под действием НПС [Tishkina и соавт., 2016]. Этот результат хорошо согласуется с данными о важности сигнализации через CRHR1 в ДГ для реализации тревожно-подобного поведения у мышей [Bertagna и соавт., 2021]. По-видимому, механизмы формирования нарушений поведения, запущенные НПС, приводили к повышению экспрессии данного сигнального белка, что приводит к повышению тревожности у крыс. Во фронтальной коре молодых самцов была выявлена тенденция к снижению экспрессии мРНК *Crhr1* под действием НПС (Рисунок 7д). Аналогичное снижение экспрессии было показано для мышей в модели хронического умеренного стресса [Lisowski и соавт., 2013]. Таким образом, молодые самцы демонстрировали биохимические признаки того, что они находились в состоянии стресса, вероятно, ассоциированным с НПС.



**Рисунок 7. Влияние НПС на экспрессию мРНК генов, ассоциированных со стрессорным ответом, в ДГ, ВГ, фронтальной и соматосенсорной коре самцов и самок молодых крыс (ПНД30). а, б – мРНК *Nr3c1* в ДГ и ВГ; в, г – мРНК *Crh* в ДГ и ВГ; д, е – мРНК *Crhr1* во фронтальной и соматосенсорной коре. \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,017$ , тест Манна-Уитни,  $n \geq 5$**

**сопряженных с нейровоспалением, в дорсальном и вентральном отделах гиппокампа, а также во фронтальной и соматосенсорной коре молодых крыс (ПНД30).** Мы обнаружили повышение экспрессии мРНК фракталкина и его рецептора у молодых самцов в ВГ через 3 недели после НПС (Рисунок 8а, в). Можно предположить, что у этих животных усиленно работает отрицательная обратная связь от нейронов к микроглии, направленная на подавление нейровоспалительной активности [Rogers и соавт., 2011]. Отсутствие изменения концентрации растворимого фракталкина не является строгим доказательством отсутствия повышения синтеза белкового продукта гена *Cx3cl1*, поскольку фракталкин экспонируется на поверхности клеток в виде функционально активного трансмембранного белка, который может подвергаться протеолитическому расщеплению с образованием растворимой формы, вероятно, без изменения способности активировать его рецептор [Sheridan, Murphy, 2013]. Трансмембранная форма фракталкина недоступна для иммуноферментного анализа и не была исследована в нашей работе, но существует вероятность, что именно она определяла наблюдаемые эффекты. НПС вызывал снижение экспрессии мРНК *Cx3cl1* в ДГ молодых самцов (Рисунок 8а). Сходные эффекты обнаружены в ДГ крыс, подвергнутых стрессу иммобилизации, также индуцирующим депрессивно-подобное поведение [Bollinger и соавт., 2017]. Ранее в нашей лаборатории было показано, что самцы крыс в возрасте 1 месяц демонстрируют большой уровень тревожности под действием НПС [Tishkina и соавт., 2016]. Сходная ассоциированность изменений экспрессии фракталкина и нарушения поведения была показана в ДГ мышей, подвергнутых хроническому умеренному стрессу [Vega-Rivera и соавт., 2020]. По-видимому, снижение экспрессии мРНК *Cx3cl1* в ДГ самцов под действием НПС является признаком нарушения работы систем, контролирующих отрицательную связь от нейронов к микроглии, что может быть связано с повышением тревожности.



**Рисунок 8. Влияние НПС на экспрессию мРНК генов, ассоциированных с нейровоспалением, в ДГ и ВГ самцов и самок молодых крыс (ПНД30). а, б – *Cx3cl1*; в, г – *Cx3cr1*. \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,017$ , тест Манна-Уитни,  $n \geq 5$**

Совместно, данные о системах кортикотропин-релизинг-гормона и фракталкина указывают на то, что несмотря на отсутствие провокации поведенческим стрессом, молодые самцы демонстрируют комплекс поведенческих изменений и изменений экспрессии генов в ДГ и фронтальной коре, характерный для животных, подвергнутых стрессу. В ВГ наблюдаются изменения, характерные для устойчивого депрессивно-подобного состояния. Таким образом, исходя из двойственной роли фракталкина, можно предположить, что изменение уровня экспрессии генов системы фракталкина указывает на механизмы, которые приведут к развитию хронического нейровоспаления, ассоциированного с депрессивно-подобным состоянием у крыс более старших возрастов. Можно предположить, что повышение экспрессии мРНК *Cx3cr1* в ВГ является признаком

изменения свойств микроглии, а повышение экспрессии *Cx3cl1* в ВГ – попыткой ткани мозга скомпенсировать нарастающие нарушения.

#### 4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе было исследовано влияние НПС на возрастную динамику экспрессии генов, ассоциированных с реакцией на стресс и с нейровоспалением. Для верификации модели было подтверждено развитие депрессивно-подобного поведения у взрослых самцов крыс и изменение характера ответа ГГНО в ответ на поведенческий стрессу крыс обоего пола.

У животных в возрасте 18 суток не было выявлено влияния НПС на экспрессию исследованных генов в отделах гиппокампа и во фронтальной коре.

У молодых животных в возрасте 30 суток были выявлены зависимое от пола влияние НПС на экспрессию генов, участвующих в реакции на стресс в ДГ. У самцов была повышена экспрессия мРНК *Crh*, а у самок была повышена экспрессия мРНК *Nr3c1*. Кроме того, у молодых самцов не было выявлено признаков нейровоспаления, но была изменена экспрессия мРНК фракталкина и его рецептора.

У взрослых самцов в возрасте 107 суток было выявлено развитие депрессивно-подобного поведения на фоне развития признаков хронического нейровоспаления под действием НПС. У самок того же возраста не было выявлено изменений поведения и развития нейровоспаления в результате НПС, но НПС привел к изменению реакции фронтальной коры самок на поведенческий стресс в виде изменения концентрации ГР и МР.

Полученные данные, в сопоставлении с предыдущими данными, полученными в лаборатории, указывают на то, что у самцов крыс под действием НПС последовательно развиваются изменения поведения, сопровождающиеся изменениями экспрессии генов, ассоциированных с реакцией на стресс. Были выявлены изменения, характерные для крыс в латентном периоде, до развития депрессивно-подобного поведения.

Полученные данные могут быть использованы для разработки методик диагностики склонности к развитию депрессивно-подобного поведения и его профилактики.

## 5 Выводы

- 1 НПС вызывает развитие депрессивно-подобного поведения у взрослых самцов крыс, но не вызывает изменений поведения у самок крыс того же возраста. При этом НПС изменяет характер реакции ГГНО на поведенческий стресс у взрослых крыс обоего пола.
- 2 НПС не вызывает изменений экспрессии исследованных генов во фронтальной коре, дорсальном и вентральном гиппокампе самцов и самок крыс в возрасте 18 суток.
- 3 У молодых самцов и самок в возрасте 30 суток НПС вызывает специфичные для отделов гиппокампа изменения экспрессии мРНК генов *Nr3c1* и *Crh*, ассоциированных с реакцией на стресс.
- 4 У молодых самцов в возрасте 30 суток НПС вызывает специфичное для отделов гиппокампа изменения экспрессии мРНК генов *Cx3cl1* и *Cx3cr1*, ассоциированных с нейровоспалением.
- 5 НПС вызывает изменения в экспрессии генов, сходные с хроническим нейровоспалением, в гиппокампе взрослых самцов крыс в возрасте 107 суток (повышение экспрессии мРНК *Il6*) и изменяет реакцию ткани фронтальной коры на острый непродолжительный стресс (предотвращает снижение экспрессии мРНК *Tnf*).
- 6 НПС изменяет характер реакции ткани фронтальной коры (повышение концентрации ГР и снижение концентрации МР) и гиппокампа (снижение концентрации ИЛ-6) взрослых самок крыс на острый поведенческий стресс.

## 7 Список сокращений

ДГ – дорсальный гиппокамп;

ВГ – вентральный гиппокамп;

ПС – острый поведенческий стресс;

НПС – неонатальный провоспалительный стресс;

ГГНО – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось;

ГР – глюкокортикоидный рецептор;

МР – минералокортикоидный рецептор;

ПС – острый поведенческий стресс;

ЛПС – бактериальный липополисахарид;

ПНД – постнатальный день;

ТПС – тест предпочтения сахарозы;

ТВП – тест вынужденного плавания;

ИФА – иммуноферментный анализ;

ФСБ – фосфатно-солевой буфер.

### **Список публикаций по теме диссертации**

1. Квичанский А. А., Волобуева М.Н., Манолова А.О., Большаков А.П., Гуляева Н.В. Неонатальный провоспалительный стресс изменяет экспрессию генов кортикостероидных рецепторов в гиппокампе крыс: септо-темпоральные различия //Нейрохимия. – 2017. – Т. 34. – №. 3. – С. 257-260.
2. Квичанский А. А., Третьякова Л.В, Волобуева М.Н., Манолова А.О., Степаничев М.Ю., Онуфриев М.В, Моисеева Ю.В., Лазарева Н.А., Большаков А.П, Гуляева Н.В. Неонатальный провоспалительный стресс и экспрессия генов, ассоциированных с нейровоспалением, в гиппокампе крыс //Биохимия. – 2021. – Т. 86. – №. 6. – С. 845-856.
3. Kvichansky A.A., Volobueva M.N., Manolova A.O., Bolshakov A.P., Gulyaeva N. V. The Influence of Neonatal Pro-Inflammatory Stress on the Expression of Genes Associated with Stress in the Brains of Juvenile Rats: Septo-Temporal Specificity // Neurochem. J. 2018. Т. 12. № 2. С. 180–183.
4. Stepanichev M.Y., Goryakina T., Manolova A., Lazareva N., Kvichanskii A., Tretyakova L., Volobueva M., Gulyaeva N. Neonatal proinflammatory challenge evokes a microglial response and affects the ratio between subtypes of GABAergic interneurons in the hippocampus of juvenile rats: sex-dependent and sex-independent effects // Brain Struct. Funct. 2021. V. 226. №2. P. 563-574.