

КОМЫШЕВА НАТАЛЬЯ ПЕТРОВНА

**ВЛИЯНИЕ ДОКСИЦИКЛИНА НА ЭКСПРЕССИЮ РЕГУЛЯТОРОВ
НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТИ И ПОВЕДЕНИЕ ЖИВОТНЫХ В НОРМЕ И
УСЛОВИЯХ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ**

03.03.01 - физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск, 2022

Работа выполнена в лаборатории функциональной нейрогеномики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (г. Новосибирск).

Научный руководитель - Галина Трифионовна Шишкина, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории функциональной нейрогеномики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (г. Новосибирск).

Официальные оппоненты:

Татьяна Генриховна Толстикова, д-р биол. наук, зав. лабораторией фармакологических исследований Федерального государственного бюджетного учреждения науки Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН (г. Новосибирск);

Александр Савельевич Ратушняк, д-р биол. наук, зав. лабораторией биомедицинской информатики Федерального исследовательского центра информационных и вычислительных технологий СО РАН (г. Новосибирск).

Ведущая организация - Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН (г. Санкт-Петербург).

Защита диссертации состоится _____ 2022 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.014.02 при ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины» по адресу: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4. Адреса для корреспонденции: 630117, г. Новосибирск, а/я 237; тел. (383)335-98-01, факс (383) 335-97-54, эл. почта: dissovet@neuronm.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИНМ и на сайте <http://www.neuronm.ru>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2022 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
д-р биол. наук

Мельников В. Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Депрессия и тревожность относятся к распространенным психическим расстройствам (МКБ-10), значительно осложняющим жизнь отдельного индивида и общества в целом. Однако имеющиеся терапевтические средства, действие которых направлено преимущественно на изменение нейротрансмиссии моноаминов (Jha and Trivedi, 2018), недостаточно эффективны. Например, до половины пациентов с депрессией не реагируют в желаемой мере на эти препараты (Maslej et al., 2020). Обнаружение дисфункции иммунной системы у части особей с психопатологиями, особенно у субъектов, устойчивых к терапии традиционными антидепрессантами (O'Brien et al., 2007; Chamberlain et al., 2019), способствовало включению провоспалительной активации в патогенез психоэмоциональных нарушений, а также привлекло внимание к препаратам, обладающим противовоспалительными свойствами, как потенциальным новым антидепрессантам и анксиолитикам.

Тетрациклиновый антибиотик доксициклин (ДОКС) широко используется для лечения инфекционных заболеваний, однако у некоторых пациентов после его применения были обнаружены психоэмоциональные эффекты, не связанные с основным направлением терапии. Среди этих эффектов ДОКС отмечались как ухудшение (Atigari et al., 2013), так и улучшение психического состояния больных, замеченное, например, при лечении клещевого боррелиоза (болезни Лайма) (Markeljević et al., 2011) или нейробруцеллеза (Tekin-Koruk et al., 2010). В одном из исследований у пациентов в результате применения ДОКС зафиксировано ослабление негативного памятного следа, что, по мнению авторов, указывает на потенциальную возможность использования антибиотика для профилактики и лечения тревожности, прежде всего, обусловленной посттравматическим стрессом (Vach et al., 2018).

Периферическое введение экспериментальным животным липополисахарида (ЛПС), компонента стенки грамотрицательных бактерий, провоцирует нейровоспаление и развитие психоэмоциональных нарушений (Dantzer et al., 2008), что явилось основанием широкого использования эндотоксина для изучения механизмов, посредством которых активация системного воспаления вызывает психопатологические эффекты, а также поиска средств терапии заболеваний, связанных с нейровоспалением. Среди предполагаемых мишеней влияния противовоспалительных средств на психоэмоциональное поведение находятся собственно факторы нейровоспаления, а также

регуляторы нейропластичности, включающие нейротрофины и анти-апоптозные белки, однако подтверждающих данных *in vivo* пока недостаточно.

Актуальность исследования поведенческих и центральных эффектов ДОКС обусловлена возможностью выявления на животных моделях новых, еще неизвестных механизмов развития и терапии депрессии и тревожности. Эти механизмы могут быть сопряжены с про- и противовоспалительными, про- и анти-апоптозными процессами, значение которых в психоэмоциональных расстройствах остается во многом неясным. Кроме того, какие-либо воздействия, нацеленные на воспалительные процессы, пока еще практически не применяются для коррекции психоэмоциональных нарушений. Поэтому проведенное исследование эффектов таких воздействий в модельных экспериментах на животных является актуальным, а также полезным в теоретическом, а в дальнейшем, возможно, и в практическом плане.

Целью данной работы явилось выяснение влияния ДОКС, широко используемого в клинической практике, обладающего, помимо антибактериального, также противовоспалительным действием, на тревожность и депрессивно-подобное поведение животных в норме и условиях индуцированного ЛПС нейровоспаления, а также оценка роли факторов нейровоспаления и нейропластичности в возможных поведенческих эффектах ЛПС и антибиотика.

Задачи исследования:

1. Исследовать на взрослых самцах крыс влияние ДОКС и ЛПС, вводимых по отдельности и вместе в течение 1 – 14 дней, на тревожное и депрессивно-подобное поведение;
2. Проанализировать провоспалительные ответы на вводимые по отдельности и вместе ЛПС и ДОКС: периферические (по весу селезенки) и центральные (по уровню маркерного белка активированной микроглии Iba-1 и матриксной металлопротеиназы-9 (ММР-9) в головном мозге);
3. Оценить влияние введения ЛПС и ДОКС, отдельно и совместно, на экспрессию регуляторов нейропластичности, включающих анти-апоптозный белок Bcl-xL и мозговой нейротрофический фактор (BDNF);
4. Проверить наличие возможных корреляций между значениями исследованных поведенческих и нейробиологических параметров.

Научная новизна

- Впервые обнаружено, что введение ДОКС в течение 7 дней оказывало транзитное умеренное антидепрессивно-подобное действие в тесте Порсолта,

эффект, который положительно коррелировал с увеличением уровня анти-апоптозного белка Bcl-xL в гиппокампе;

- Впервые показано, что ДОКС может ослаблять индуцированное ЛПС тревожное поведение животных путем подавления активации микроглиальных клеток в ряде областей головного мозга;
- Впервые выявлено влияние ДОКС, ослабляющее индуцированные воздействием провоспалительного фактора проапоптозные изменения в мозге и депрессивно-подобное состояние животных;
- Впервые установлено, что одним из механизмов индукции тревожности введением бактериального эндотоксина может быть увеличение уровня ММР-9 в миндалинах.

Теоретическая и практическая значимость работы

Фундаментальная и практическая ценность полученных результатов обусловлена новыми знаниями о центральных механизмах поведенческих эффектов, индуцируемых провоспалительными воздействиями, а также возможной коррекции этих эффектов с помощью антибиотика ДОКС.

Положения, выносимые на защиту

1. ДОКС оказывает умеренное антидепрессивно-подобное действие, наиболее заметное в условиях нейровоспаления;
2. Антидепрессивно-подобный эффект ДОКС ассоциирован с повышением уровня анти-апоптозного белка Bcl-xL в отделах головного мозга;
3. ДОКС ослабляет вызванные эндотоксином угнетение двигательной активности и повышение тревожности животных путем подавления активации микроглиальных клеток в ряде областей головного мозга;
4. Механизмы индукции эндотоксином тревожного поведения включают увеличение уровня ММР-9 в миндалинах.

Апробация работы

Результаты работы вошли в отчеты по грантам РФФИ и РФФИ, а также были представлены на всероссийских и международных научных конференциях (Международный междисциплинарный конгресс. г. Судак, Крым, Россия; 30 мая – 10 июня 2019 г; II Объединенный научный форум, включающий VI Съезд физиологов СНГ, VI Съезд биохимиков России и IX Российский симпозиум «Белки и пептиды». г. Сочи - Дагомыс, 1-6 октября 2019 г; 32nd ECNP Congress, 7-10 September 2019, Copenhagen, Denmark).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 7 научных статей в российских и зарубежных журналах, входящих в международные базы цитирования (WoS, Scopus), а также 4 тезиса в сборниках трудов конференций.

Объём и структура диссертации

Материал диссертационного исследования изложен на 121 страницах, содержит 27 рисунков. Список литературы содержит 350 источников, включающих публикации в отечественных и международных изданиях. Текст диссертации состоит из введения, обзора литературы, описания методов, результатов работы и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературных источников.

Личный вклад автора

В проведении экспериментов по анализу поведенческих эффектов ДОКС и ЛПС: введение препаратов, контроль прироста веса тела, тестирование животных в приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ), тестах принудительного плавания (тест Порсолта) и потребления сахарозы, определение значений поведенческих параметров на видеозаписях тестов; в определении совместно с к.б.н. А.В. Банновой методом иммуноблотинга уровней маркерного белка (Iba-1), белков MMP-9, BDNF и Vcl-xL в отделах мозга; в статистической обработке полученных поведенческих и нейробиологических данных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Исследования проводили на взрослых самцах крыс линии Вистар в соответствии с инструкциями Минздрава России (приложение к приказу N 267 от 19 июня 2003 г.), Директивой Совета Европы (86/609/ЕЕС) и рекомендациями комиссии по биоэтике ФГБНУ “Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”. Животные содержались в стандартных условиях вивария ИЦиГ СО РАН при температуре 22 – 24 °С, световом режиме 14С:10Т и свободном доступе к воде и корму.

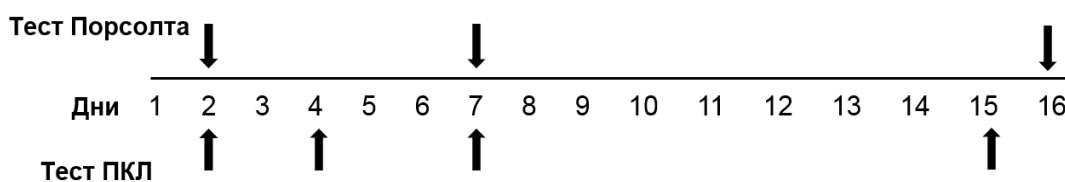
Схемы введения препаратов и поведенческих тестов.

1. Исследовали влияние отдельных, а также совместных введений ДОКС и ЛПС.

Самостоятельное влияние ДОКС оценивали, вводя препарат ежедневно либо с питьевой водой (2 г/л), либо внутривнутрибрюшинно (в/б; 25 мг/кг/мл). Получаемые при этих способах дозы были сопоставимыми, что было выяснено путем взвешивания бутылочек с антибиотиком, который готовили ежедневно. ЛПС вводили внутривнутрибрюшинно (0.5 мг/кг) 1 раз в два дня, максимальное количество инъекций – 7. Отдельно и совместно ДОКС и

ЛПС вводили в течение 1-14 дней. Контрольные животные получали соответствующие инъекции физиологического раствора. Количество животных в группах составляло 11-12.

2. Поведение животных оценивали в общепринятых тестах. Через сутки после последнего введения в тесте ПКЛ определяли уровень тревожности и двигательную активность. Депрессивно-подобное состояние оценивали по потреблению животными сахарозы (показатель, сопоставимый с клиническим симптомом депрессии – ангедонией), а также в тесте Порсолта. В течение экспериментов животных ежедневно взвешивали. Дни поведенческих тестов в отдельных экспериментах указаны на схеме относительно дней введения препаратов:



Через сутки после окончания тестирования животных забивали быстрой декапитацией, в выделенных отделах мозга определяли уровни белков Iba-1, BDNF, Vcl-xL, MMP-9 и уровни мРНК BDNF и Vcl-xL (референсным геном служил бета-актин). В эксперименте с введением ДОКС с питьевой водой в течение 7 дней, уровни мРНК BDNF и Vcl-xL были определены в совместных исследованиях с д.б.н. Калининой Т.С.

Анализ содержания белков методом иммуноблотинга. Уровни целевых белков Iba-1, MMP-9, BDNF и Vcl-xL определяли с помощью метода Вестерн-блот, как было описано ранее (Баннова и др., 2019).

Определение уровня мРНК методом ПЦР в реальном времени. Выделение РНК проводили одностадийным гуанидин-изотиоцианатным методом. Для получения кДНК суммарную РНК инкубировали 90 мин при 42°C в 20 мкл смеси, содержащей 50U ревертазы. Анализ содержания мРНК целевых генов проводили методом ПЦР в реальном времени с использованием набора праймеров/зондов TaqMan® Gene Expression Assays (Rn02531967_s1 для *bdnf*, Rn00437783_m1 для *bclxL*, и Rn00667869_m1 для *actb*; Applied Biosystems, USA) на амплификаторе ABI VIIA™ 7 (“Applied Biosystems”, USA). Уровни транскриптов рассчитывали относительно *actb* по методу $\Delta\Delta C_t$.

Статистическую обработку полученных поведенческих и нейробиологических данных проводили однофакторным и двухфакторным дисперсионным анализом с использованием программы STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., USA). Достоверность различий между группами устанавливали согласно LSD критерию Фишера и t-критерию Стьюдента. Прирост массы тела анализировали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа

для повторных измерений. Наличие корреляционных взаимоотношений оценивали по Пирсону. Уровень значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние ДОКС на прирост веса тела животных, поведение и экспрессию регуляторов нейропластичности в мозге

Анализ ежедневного прироста веса тела животных в течение 15-дневного периода после введения ДОКС показал зависимое от продолжительности введения влияние антибиотика на этот показатель, подтверждаемое достоверным взаимодействием факторов ДОКС и продолжительности введения: $F_{15,150} = 6.66$, $p < 0.001$ (Рис.1). Прирост веса тела снижался в течение первых суток, однако в дальнейшем это снижение быстро нормализовалось и, начиная с 13 дня, ДОКС достоверно ($p < 0.05$) усиливал набор веса тела по сравнению с контрольными животными.

Одним из традиционных оценочных показателей тревожности грызунов в тесте ПКЛ является количество входов в открытые рукава лабиринта. Непродолжительное введение ДОКС с питьевой водой вместе с угнетением прироста веса тела увеличивало тревожность животных, что проявлялось достоверным снижением числа входов в открытые рукава у крыс, получавших антибиотик в течение 4 дней по сравнению с контрольными животными: Student t -test (21) = 3.03; $p < 0.01$ (Рис.2). Этот поведенческий эффект также оказался транзиторным, и после более длительного введения ДОКС, в течение 14 дней, животные достоверно не отличались от контрольных крыс по числу входов в открытые рукава лабиринта: Student t -test (22) = 1.002; $p > 0.1$. Результаты более продолжительного введения согласуются с наблюдениями других авторов, также не обнаруживших изменений в тревожности животных (мышей) в тестах открытого поля, социального взаимодействия или закапывания шариков (Paris et al., 2014) после введения им ДОКС в дозе 100 мг/кг в течение 7 или 14 дней.

Тест принудительного плавания или тест Порсолта является наиболее используемым тестом для оценки про- и антидепрессивных эффектов препаратов и воздействий. В качестве ключевого оценочного показателя депрессивно-подобного состояния используется общая продолжительность пассивного поведения животных в течение 5-минутного тестового периода. В проведенных исследованиях введение ДОКС как однократно, так и в течение 7 и 14 дней не оказывало значительного влияния на общую продолжительность замирания в течение 5-минутного теста (Рис.3-4). Однако, хотя в наших экспериментах животные после введения ДОКС не отличались от контрольных крыс по продолжительности замирания в тесте Порсолта, анализ других видов поведения

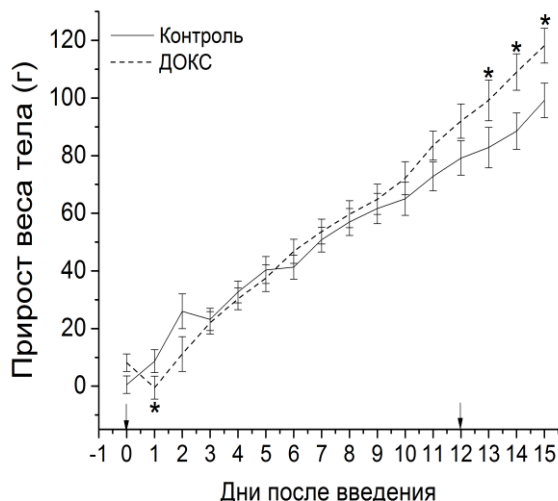


Рис.1. Ежедневный прирост веса тела животных в течение двухнедельного внутрибрюшинного введения ДОКС.

* – $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

Количество входов в открытые рукава

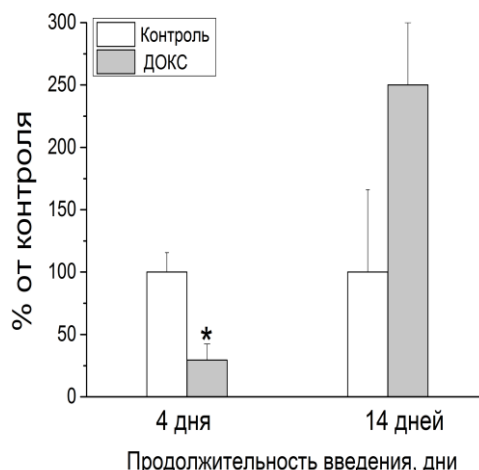


Рис.2. Процент входов в открытые рукава ПКЛ после введения ДОКС в течение 4 (с водой) и 14 дней (в/б).

* – $p < 0.05$ по сравнению с соответствующим контролем.

в этом тесте выявил после введения антибиотика увеличение продолжительности активного плавания, особенно заметное в эксперименте после введения ДОКС с питьевой водой в течение 7 дней: Student t -test (21) = 2.08; $p < 0.05$ (Рис.4).

Общая продолжительность замирания

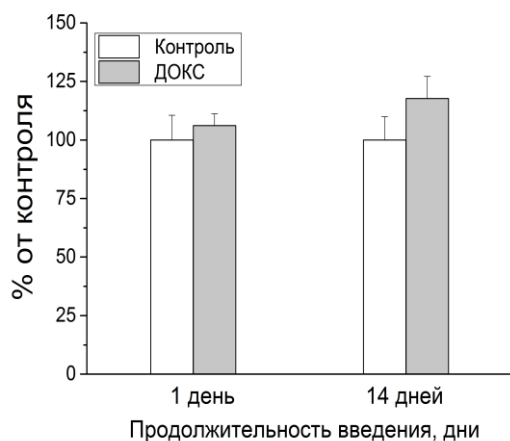


Рис.3. Продолжительность (в процентах к контролю) замирания животных в тесте Порсолта после в/б введения ДОКС однократно и в течение 14 дней.

Отдельные виды поведения в тесте Порсолта

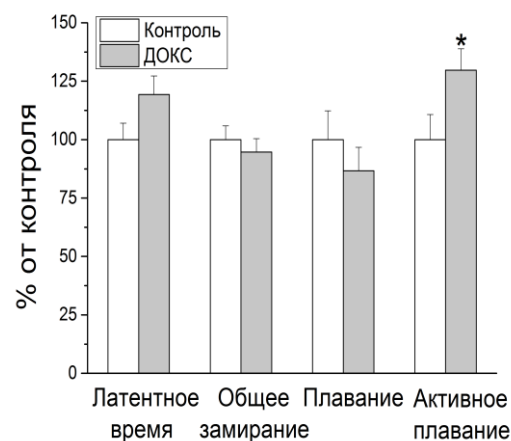


Рис.4. Продолжительность (в процентах к контролю) отдельных видов поведения животных в тесте Порсолта после введения ДОКС (с водой) в течение 7 дней.

* – $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

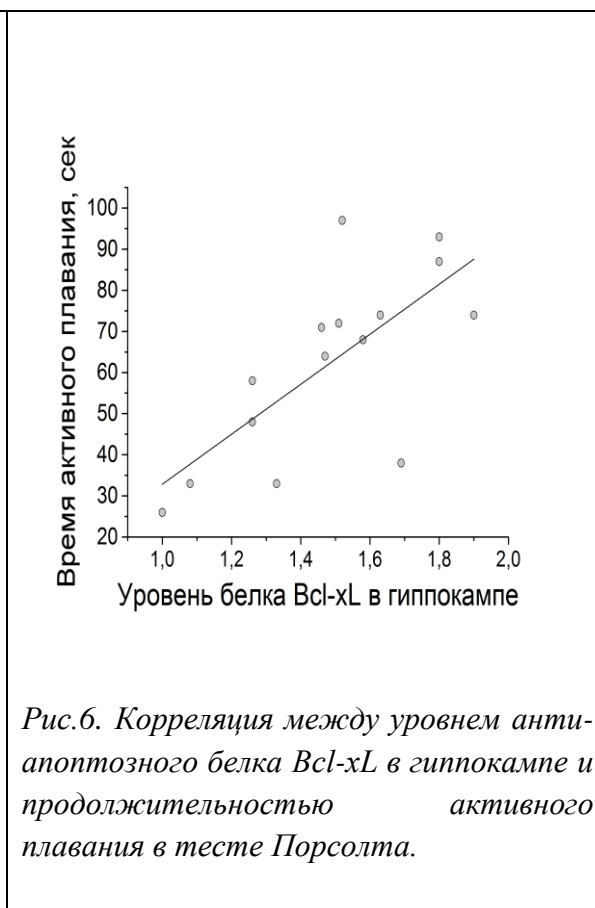
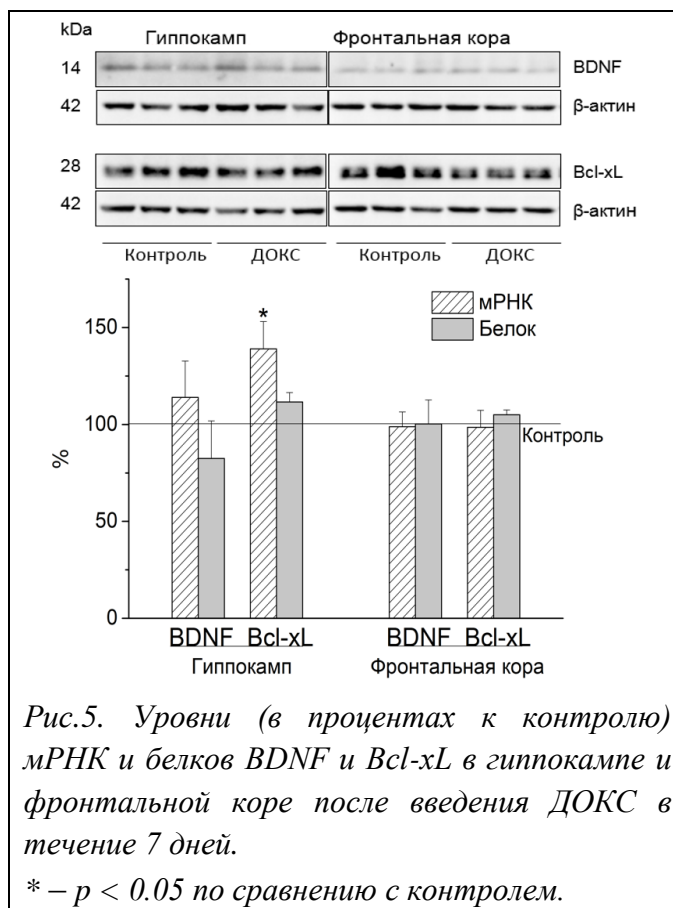
Активация этого специфического для теста Порсолта типа поведения, характеризующегося активным «царапаньем» о стенки сосуда с водой в попытках из него выбраться, рассматривается некоторыми исследователями как свидетельство антидепрессивно-подобного эффекта. Эти результаты о потенциальной способности

ДОКС оказывать антидепрессивно-подобное действие согласуются с данными Mello с соавторами (2013), наблюдавшими снижение продолжительности замирания животных в тесте Порсолта даже после однократной внутривентрикулярной инъекции ДОКС в дозе 25 или 50 мг/кг (Mello et al., 2013).

С целью прояснения механизмов наблюдаемого после ДОКС повышения поведенческой активности, у животных после введения антибиотика в течение 7 дней в гиппокампе и фронтальной коре были промеряны уровни мРНК и белков BDNF и Vcl-xL, являющихся важными регуляторами нейропластичности и вовлекаемых в контроль поведения в тесте Порсолта.

По сравнению с контрольными животными, введение ДОКС в течение 7 дней не повлияло на уровни белка BDNF ни в гиппокампе, ни во фронтальной коре, однако оказало достоверное повышающее влияние на уровень экспрессии мРНК Vcl-xL в гиппокампе: Student *t*-test (11) = 2.75; $p < 0.05$ (Рис.5). Небольшое увеличение уровня белка Vcl-xL в этой структуре, наблюдаемое после ДОКС, не достигало, однако, статистического уровня значимости. Между продолжительностью активного плавания в тесте Порсолта и уровнем белка Vcl-xL в гиппокампе обнаружена достоверная положительная корреляция (Рис.6; $r = 0.71$, $p < 0.01$, $n = 15$), что может свидетельствовать о вовлечении повышения экспрессии антиапоптозного белка в транзиторное увеличение после ДОКС двигательной активности в тесте Порсолта и умеренное антидепрессивное действие антибиотика. Предположение о связи этих двух событий согласуется с результатами работы Jiang с соавторами (2014), в которой ослабление индуцированного хроническим стрессом депрессивно-подробного поведения после введения антидепрессантов сопровождалось повышением уровня белка Vcl-xL в гиппокампе (Jiang et al., 2014). Повышение уровня белка Vcl-xL в гиппокампе может иметь адаптивное значение, увеличивая, например, выживаемость клеток в условиях стресса принудительного плавания и, тем самым, устойчивость к развитию индуцируемой стрессом депрессии (Shishkina et al., 2010; Dygalo et al., 2012).

Результаты этой части работы свидетельствуют, что ДОКС при отдельном введении может умеренно влиять на регуляторы нейропластичности и поведение нормальных животных. Эти эффекты антибиотика наблюдались, как правило, после непродолжительных введений и отсутствовали после более длительных воздействий.



В следующей серии экспериментов выяснялось, может ли ДОКС влиять на поведение и факторы нейропластичности в условиях активированного ЛПС нейровоспаления, рассматриваемого в настоящее время среди причин, провоцирующих психопатологии.

Влияние совместного введения ДОКС и ЛПС на прирост веса тела, поведение животных и показатели периферического и центрального провоспалительного ответов

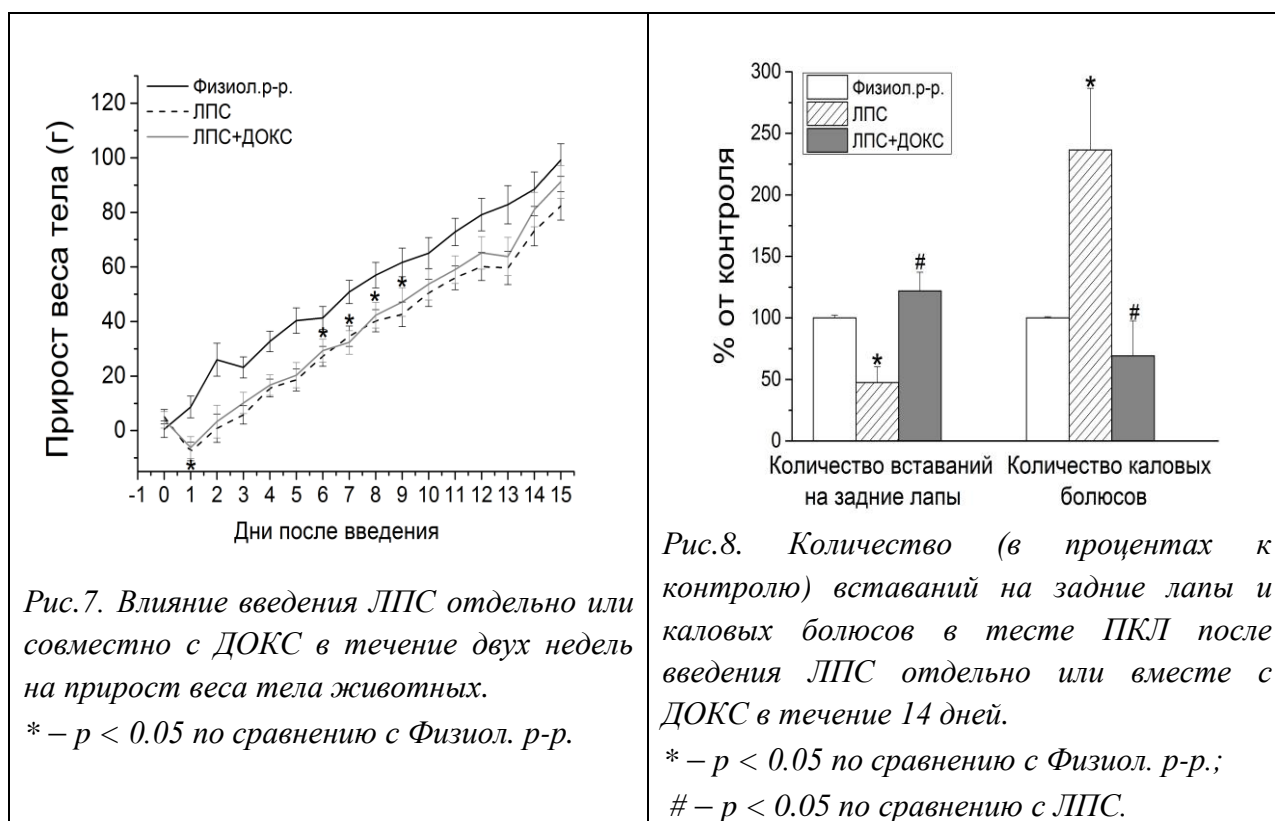
Ежедневный прирост веса тела животных в течение двух недель (Рис.7) достоверно снижался введением в этот период ЛПС - общий эффект ЛПС: $F_{1,22} = 18.23, p < 0.001$. Этот эффект не менялся совместным с ЛПС введением ДОКС - общий эффект ДОКС: $F_{1,22} = 1.02, p > 0.1$; взаимодействие ЛПС и ДОКС: $F_{1,22} = 0.070, p > 0.1$.

Наиболее часто наблюдаемым в многочисленных предшествующих исследованиях поведенческим эффектом после ЛПС является угнетение двигательной активности животных, которое отчетливо проявлялось и в нашем эксперименте в тесте ПКЛ достоверным ($p < 0.05$) снижением числа вставаний на задние лапы в закрытых рукавах лабиринта у животных, получавших эндотоксин в течение двух недель (Рис.8). Совместное с ЛПС введение ДОКС предотвращало снижение значения этого часто

используемого для определения двигательной активности грызунов параметра (Cruz et al., 1994) - общий эффект ДОКС: $F_{1,22} = 7.58, p < 0.05$.

Тест ПКЛ применяется для оценки тревожности животных, классическими показателями которой общепринято считаются количество входов в открытые рукава и продолжительность проведенного на этих рукавах времени. Вместе с тем, эти показатели зависят от двигательной активности животных, изменение которой искажает реальную оценку тревожности. Учитывая выявленное влияние ЛПС и ДОКС на двигательную активность животных, для оценки их тревожности в тесте ПКЛ был выбран не зависящий от двигательной активности, другой, также ассоциированный с уровнем страха показатель – количество дефекаций (каловые болюсы) (Archer, 1973; Clinton et al., 2014). После введения ЛПС у животных в течение тестового периода наблюдалось значительное увеличение количества каловых болюсов ($p < 0.05$), эффект, который ослаблялся совместным с ЛПС введением ДОКС - общий эффект ДОКС: $F_{1,22} = 4.91, p < 0.05$.

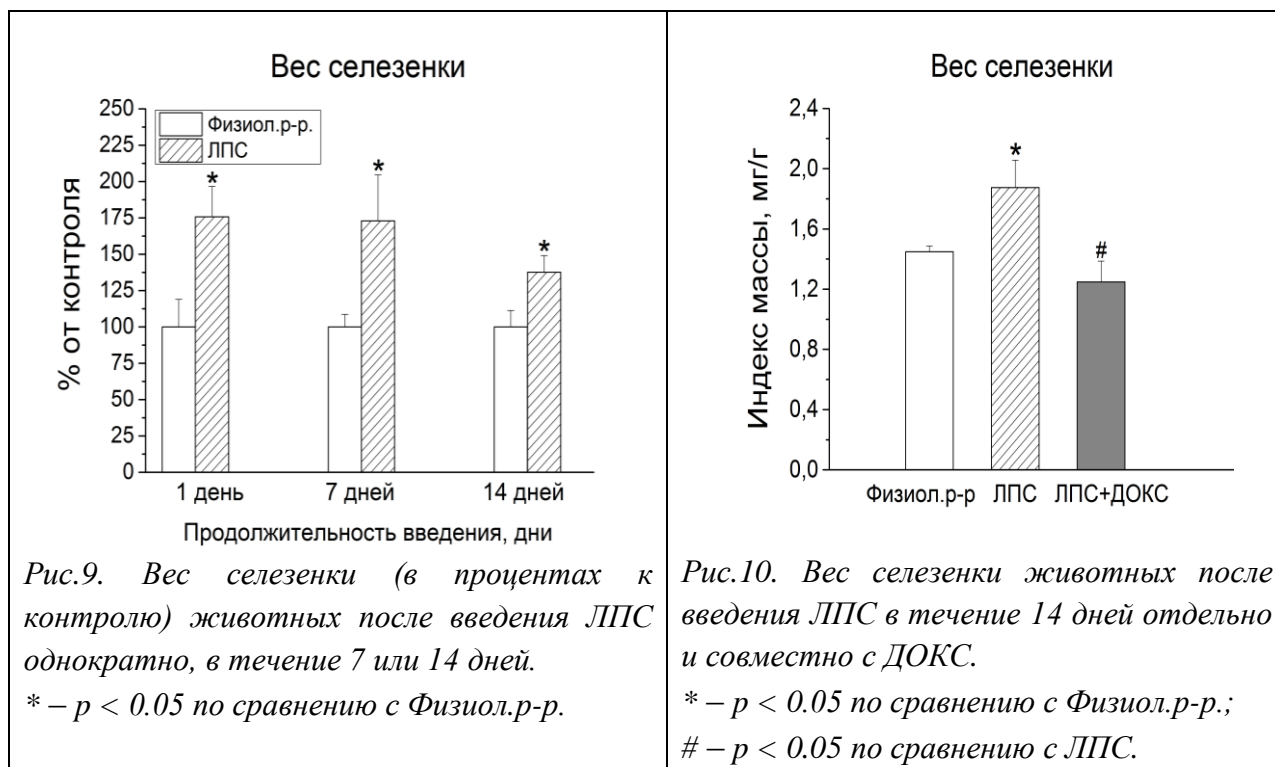
Результаты теста ПКЛ показывают, что поведенческие эффекты эндотоксина, такие как угнетение двигательной активности и повышение тревожности животных, предотвращались совместным с ЛПС введением ДОКС.



Изменение поведения после ЛПС могло быть обусловлено активацией эндотоксином иммунного/нейровоспалительного ответа.

Ключевым органом, отвечающим за общий иммунный ответ организма, в том числе и на ЛПС, является селезенка. Вес селезенки значительно ($p < 0.05$) увеличивался после

ЛПС, независимо от продолжительности введения (однократно, в течение 7 или 14 дней; Рис.9). Сходное увеличение веса этого органа в ответ на повторные введения ЛПС продемонстрировано в работах многих исследователей, например, у мышей после введения ЛПС в течение 13 недель (Krishna et al., 2016). Совместное с ЛПС введение в течение 14 дней ДОКС предотвращало вызванное эндотоксином увеличение веса селезенки животных - общий эффект ДОКС: $F_{1,22} = 25.78, p < 0.01$ (Рис.10).



Помимо активации периферической иммунной системы, на что указывает увеличение веса селезенки, системное введение ЛПС может индуцировать иммунные и провоспалительные ответы также и в центральной нервной системе. Развивающееся в результате этой индукции так называемое нейровоспаление характеризуется активацией микроглии, резидентных иммунных клеток мозга, и увеличением экспрессии цитокинов, полагаемых причиной ослабления нейропластичности и нейродегенеративных нарушений (Block, Hong 2005). Для оценки влияния введения ЛПС в течение 14 дней на активацию нейровоспаления были определены уровни белков Iba-1 (маркерный белок активированной микроглии) и провоспалительного фактора ММР-9. Введение ЛПС значительно повысило ($p < 0.05$) уровень белка Iba-1 в большинстве исследованных отделов мозга: префронтальной коре, миндалинах, гипоталамусе, среднем мозге, стволе, но не в стриатуме и гиппокампе (Рис.11). Данный результат согласуется с работами, где были показаны повышенные уровни белка Iba-1 и провоспалительных цитокинов в отделах мозга животных после острого и хронического введения ЛПС (Dang et al., 2018; Zhao X. et al., 2019; Shishkina et al., 2019). Введение в течение двух недель одного ДОКС не повлияло

на уровень белка Iba-1 в мозге. Вместе с тем, введение антибиотика в течение этого периода совместно с ЛПС значительно ослабило индуцированное эндотоксином повышение уровня белка Iba-1 в ряде областей мозга, включающих миндалину ($F_{1,22} = 8.22, p < 0.01$), гипоталамус ($F_{1,22} = 7.45, p < 0.05$) и средний мозг ($F_{1,21} = 5.21, p < 0.05$). Эти данные согласуются с результатами, полученными на культуре микроглиальных клеток, о способности ДОКС оказывать угнетающее влияние на вызванную ЛПС активацию микроглии (Santa-Cecilia et al., 2016).

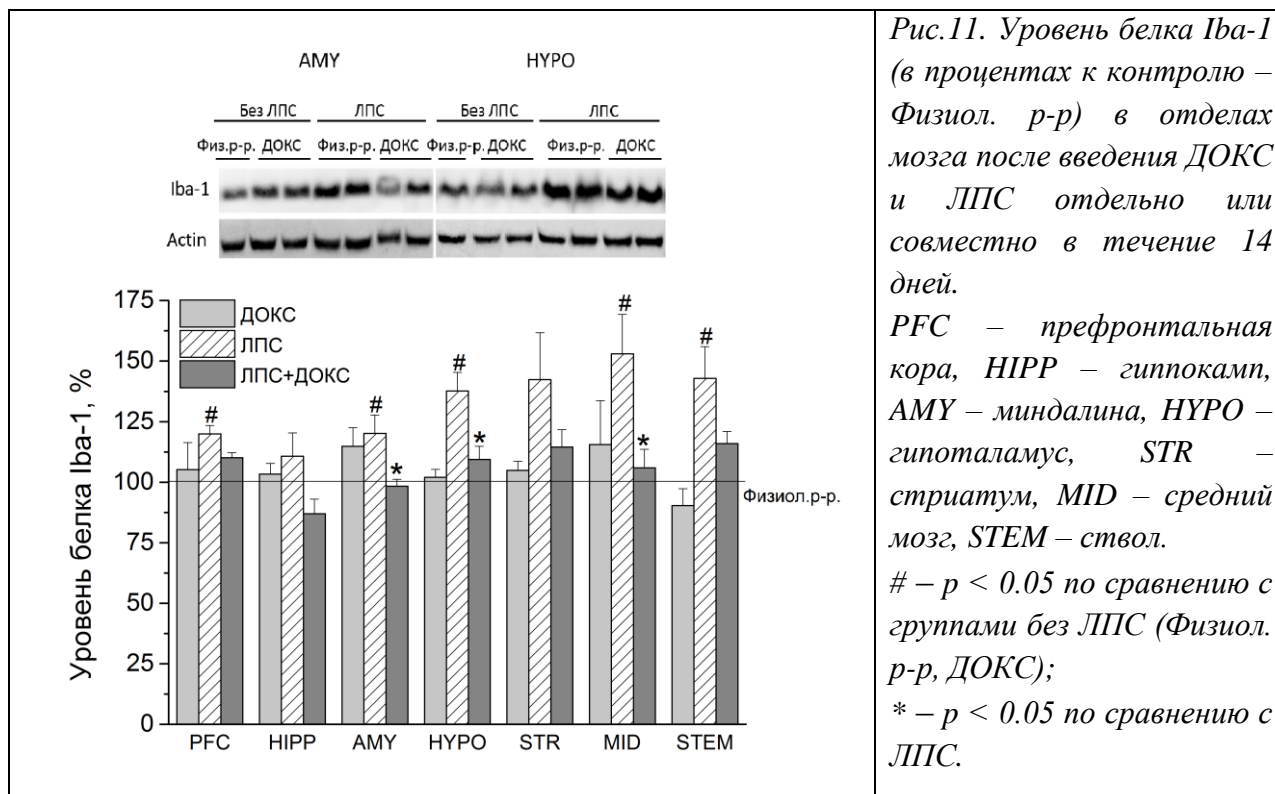


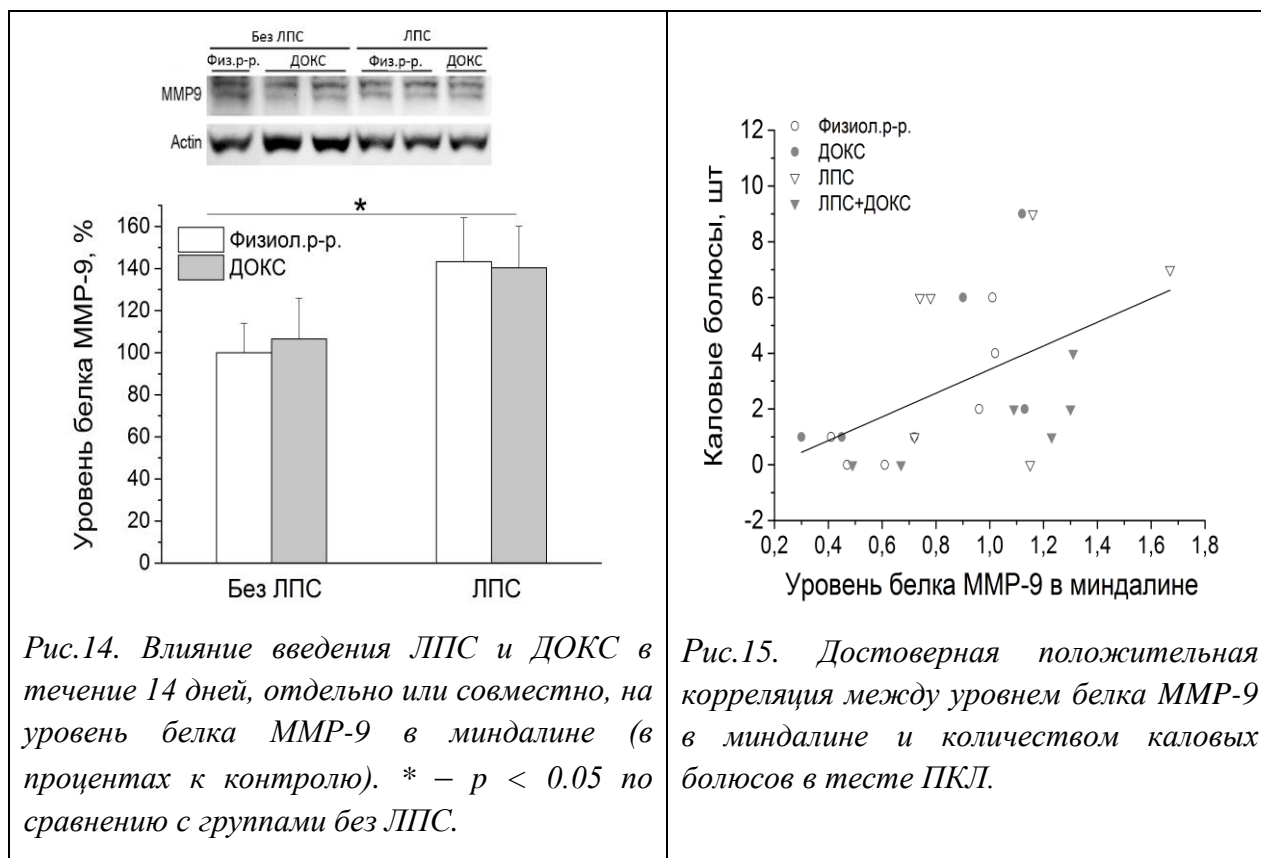
Рис.11. Уровень белка Iba-1 (в процентах к контролю – Физиол. р-р) в отделах мозга после введения ДОКС и ЛПС отдельно или совместно в течение 14 дней.

PFC – префронтальная кора, HIP – гиппокамп, AMY – миндалины, HYPO – гипоталамус, STR – стриатум, MID – средний мозг, STEM – ствол.

– $p < 0.05$ по сравнению с группами без ЛПС (Физиол. р-р, ДОКС);

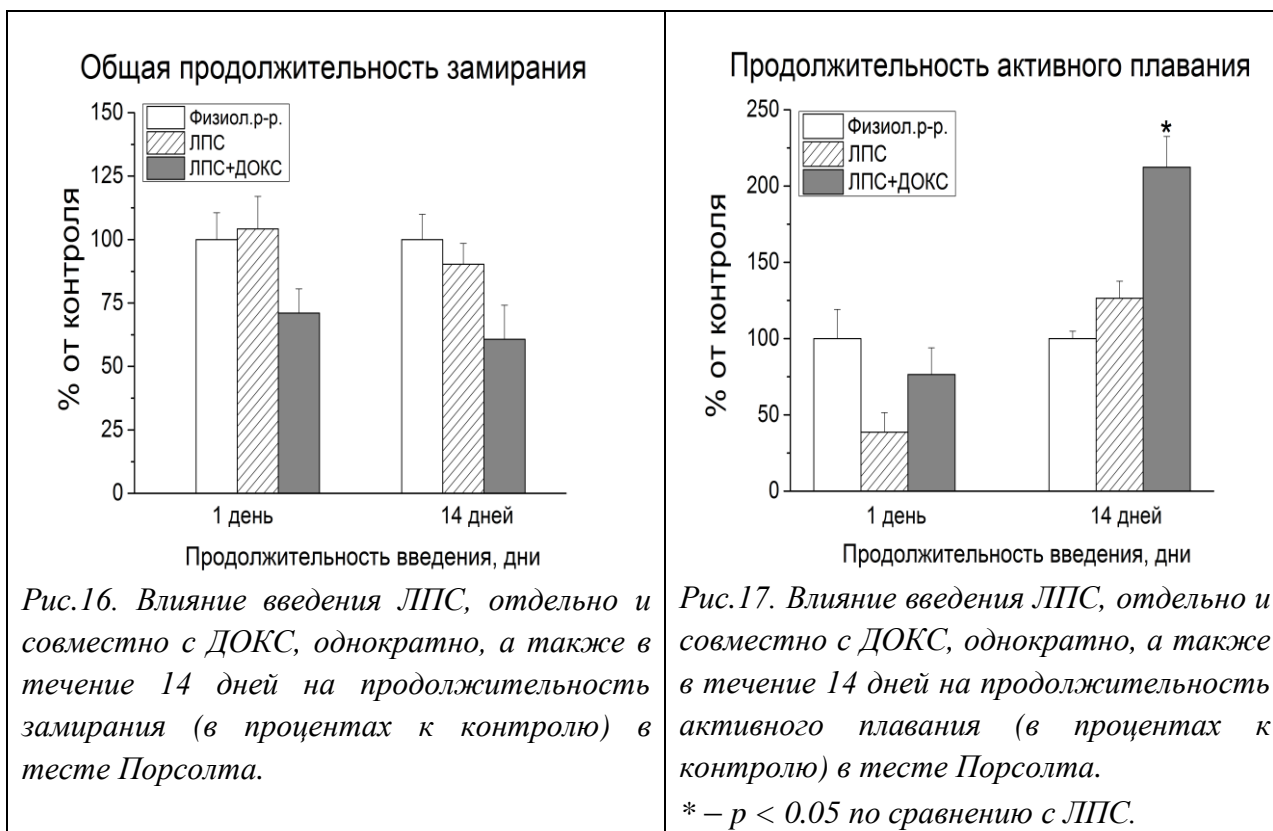
* – $p < 0.05$ по сравнению с ЛПС.

Новым результатом, полученным в работе, являются свидетельства вовлечения активации нейровоспаления, прежде всего в миндалине, играющей ключевую роль в формировании эмоций и, в частности, страха, в угнетение двигательной активности и увеличение тревожности животных после ЛПС. Между значениями этих поведенческих параметров в тесте ПКЛ и уровнем белка Iba-1 в миндалине обнаружены достоверные корреляции: отрицательная – для числа вставаний на задние лапы ($r = 0.44, p < 0.05$) (Рис.12), и положительная корреляция – для количества каловых болюсов ($r = 0.52, p < 0.01$) (Рис.13).



Депрессивно-подобное состояние животных после ДОКС и ЛПС оценивали в общепринятых тестах принудительного плавания (тест Порсолта; выученная беспомощность) и потребления сахарозы (тест на ангедонию).

Развитие депрессивно-подобного состояния в тесте Порсолта увеличением продолжительности замирания после ЛПС, как правило, наиболее отчетливо фиксируется в экспериментах с острым введением эндотоксина. Поведенческие эффекты повторных инъекций изучены недостаточно и противоречивы. В наших экспериментах повторяющиеся введения ЛПС в течение двух недель не повлияли на продолжительность замирания в тесте (Рис.16). Однако, как показано на этом рисунке 16, совместное с ЛПС введение в течение двух недель ДОКС оказало умеренное, на уровне тенденции (Student t -test (9) = 2.0004; $p = 0.076$), понижающее влияние на продолжительность замирания. На антидепрессивно-подобный эффект ДОКС на фоне ЛПС в тесте Порсолта также указывает достоверное ($p < 0.05$) увеличение продолжительности активного плавания (Рис.17). Эти результаты согласуются с опубликованными данными других исследователей (Mello et al., 2013), показавших предотвращение вызванного эндотоксином увеличения продолжительности замирания в тесте Порсолта у мышей однократным до ЛПС введением ДОКС.



С результатами теста Порсолта согласуются и данные теста на ангедонию. В этом тесте снижение потребления воды с сахаром считается проявлением ангедонии у грызунов (Hasler et al., 2004). В нашем эксперименте потребление сахарозы значительно не менялось после однократного или в течение 7 дней введения ЛПС, но было достоверно снижено после введения эндотоксина в течение 14 дней: Student t -test (10) = 3.74; $p < 0.05$ (Рис.18). Эти данные являются важным свидетельством, что введение ЛПС в течение двух недель провоцировало развитие депрессивно-подобного состояния у животных. Полученные результаты согласуются с данными других исследователей (Wang et al., 2011; Biesmans et al., 2016; Guo et al., 2016) об индуцирующем влиянии ЛПС на ангедонию даже в случае отсутствия поведенческого эффекта в тесте Порсолта. Совместное с ЛПС введение ДОКС не повлияло на потребление сахарозы после однократного или в течение 7 дней введения, но, как было обнаружено впервые, предотвращало снижение потребления сахарозы животными после 14-дневного введения ЛПС (Рис.18). По общему объему потребляемой жидкости группы животных не различались ни в один из сроков исследования (Рис.19).

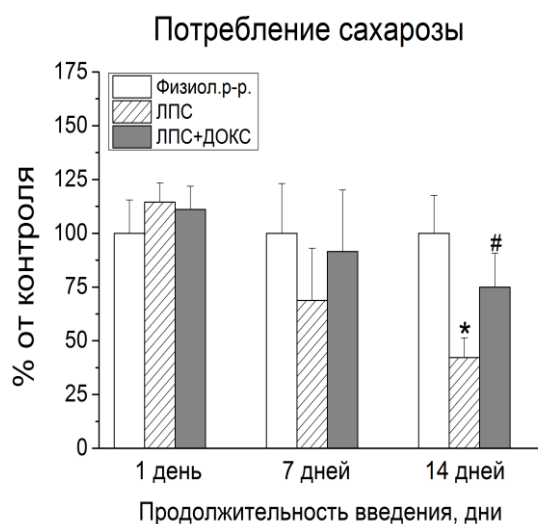


Рис.18. Влияние введения ЛПС, одного и совместно с ДОКС, однократно, а также в течение 7 и 14 дней на процент потребления сахарозы животными;

* – $p < 0.05$ по сравнению с Физиол. р-р.;

– $p < 0.05$ по сравнению с ЛПС.

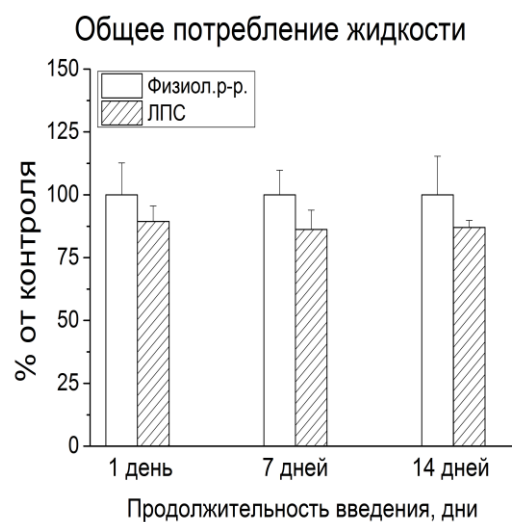


Рис.19. Влияние введения одного ЛПС однократно, а также в течение 7 и 14 дней на общее потребление животными жидкости (в процентах к контролю).

Активация иммунной системы в центральной нервной системе может сопровождаться снижением нейротрофической активности, на что, например, указывает снижение экспрессии гена и белка BDNF в гиппокампе крыс после введения животным ЛПС или провоспалительных цитокинов (Guan and Fang, 2006; Zhang et al., 2015). Однако в нашей работе повторные введения ЛПС не оказали значительного влияния на уровни белка BDNF в отделах мозга, включающих гиппокамп (Рис.20), что может быть обусловлено различиями в условиях экспериментов. В нашей работе также не было обнаружено влияния ДОКС, вводимого как отдельно, так и совместно с ЛПС, на BDNF, что исключает участие нейротрофина в антидепрессивном действии антибиотика. Сходный результат был обнаружен с использованием другого тетрациклинового антибиотика, миноциклина, который также оказывал антидепрессивно-подобное действие, но не влиял на экспрессию BDNF в гиппокампе крыс (Arakawa et al., 2012). Вместе с тем, в работе других исследователей однократное введение ДОКС сопровождалось антидепрессивно-подобным ответом вместе с увеличением уровня белка BDNF в гиппокампе (Mello et al., 2013). Данный эффект может быть специфичным для непродолжительного введения ДОКС и нуждается в дополнительной проверке.

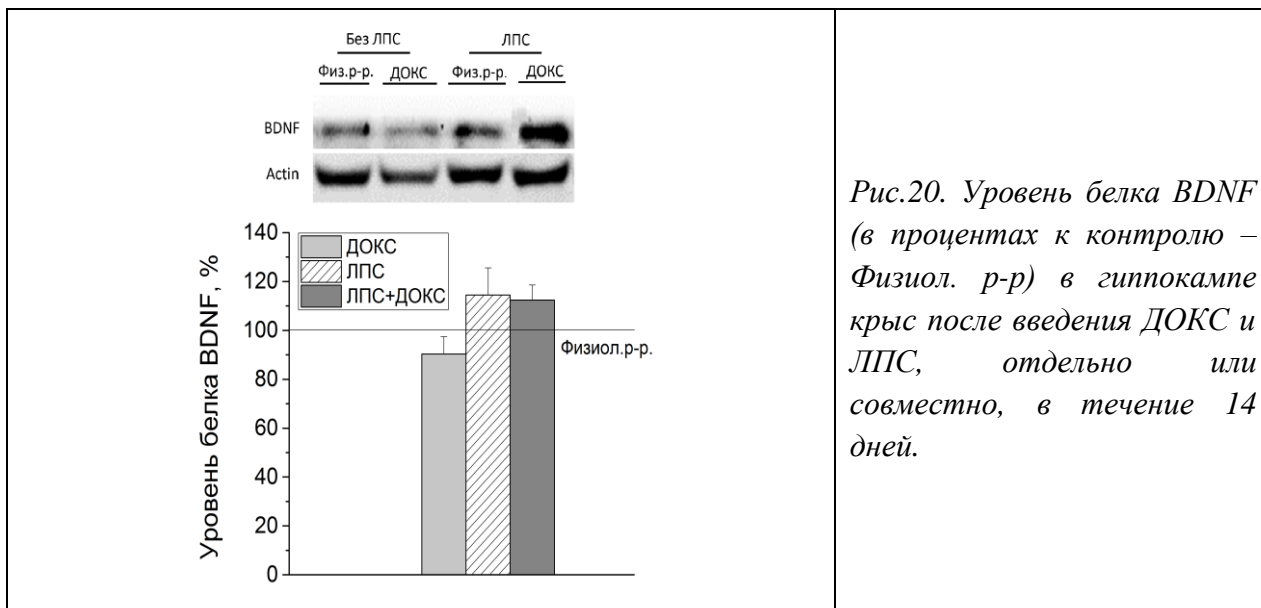


Рис.20. Уровень белка BDNF (в процентах к контролю – Физиол. р-р) в гиппокампе крыс после введения ДОКС и ЛПС, отдельно или совместно, в течение 14 дней.

В отличие от BDNF, уровень белка Vcl-xL, также ассоциируемого с регуляцией нейропластичности, в ответ на введение ЛПС значительно снижался в гипоталамусе и стриатуме, в то время как совместное с ЛПС введение ДОКС предотвращало эти эффекты ЛПС ($F_{1,21} = 13.08$, $p < 0.01$) (Рис.21). Снижение экспрессии анти-апоптозных белков, показано, ослабляет жизнеспособность клеток мозга, что может явиться причиной нейродегенеративных и психоэмоциональных нарушений. Ослабление угнетающего влияния ЛПС на уровень белка Vcl-xL, обнаруженное при его совместном введении с ДОКС, может представлять один из механизмов предотвращения обусловленных эндотоксином негативных психоэмоциональных проявлений.

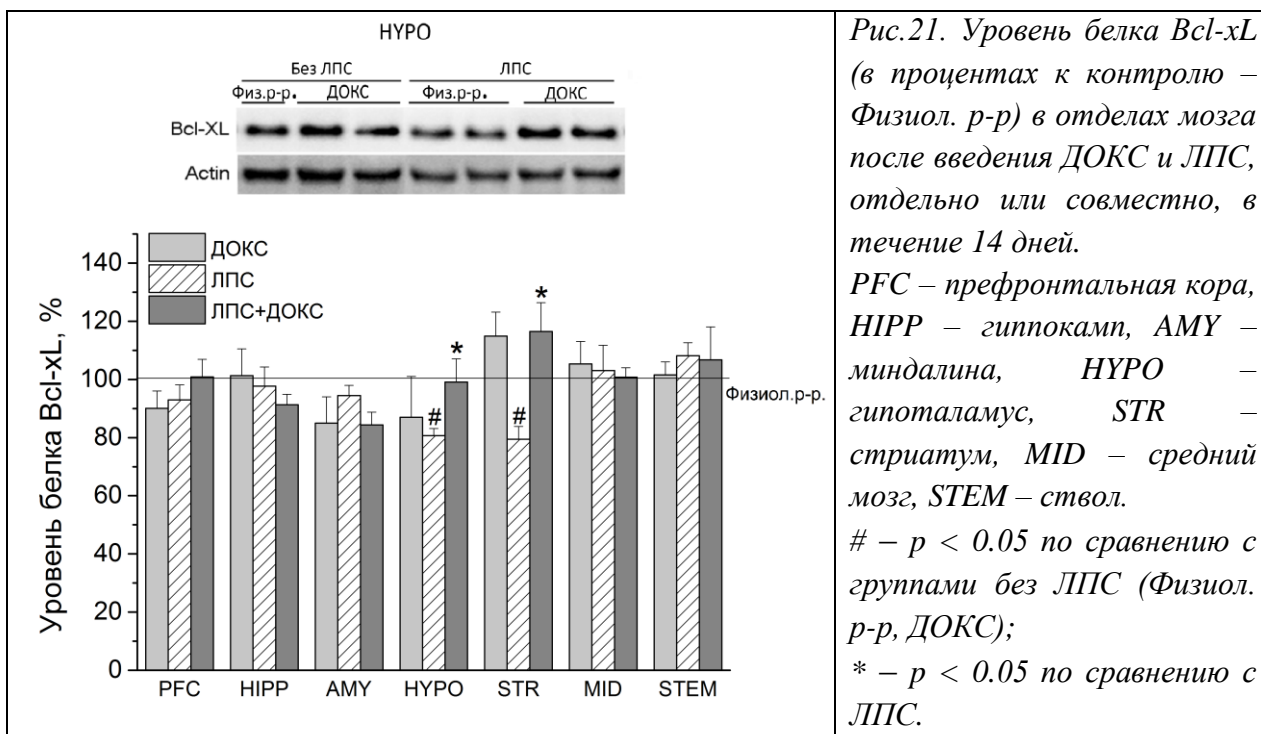


Рис.21. Уровень белка Vcl-xL (в процентах к контролю – Физиол. р-р) в отделах мозга после введения ДОКС и ЛПС, отдельно или совместно, в течение 14 дней.

PFC – префронтальная кора, HIPP – гиппокамп, AMY – миндалина, HYPO – гипоталамус, STR – стриатум, MID – средний мозг, STEM – ствол.
 # – $p < 0.05$ по сравнению с группами без ЛПС (Физиол. р-р, ДОКС);
 * – $p < 0.05$ по сравнению с ЛПС.

Обобщая результаты работы, можно заключить, что поведенческие эффекты препаратов, введенных отдельно, зависели от продолжительности воздействия. Непродолжительное введение одного ДОКС в течение 4 дней вызывало транзиторное повышение тревожности, отсутствующее при более длительном введении. Введение ДОКС в течение 7 дней оказывало также транзиторное, отсутствующее после 14-дневного введения, умеренное антидепрессивно-подобное действие, которое ассоциировалось с увеличением уровней антиапоптозного белка Bcl-xL в гиппокампе. Результаты, полученные после введения ЛПС, в целом согласуются с ранее полученными данными, свидетельствующими об угнетении двигательной активности животных, повышении тревожности и развитии депрессивно-подобного состояния. Эти поведенческие эффекты были ассоциированы с провоспалительной активацией в ряде отделов головного мозга, и, кроме того, судя по снижению уровня белка Bcl-xL в гипоталамусе и стриатуме, с ослаблением антинейродегенеративной защиты. Совместное с ЛПС введение ДОКС в течение 14 дней предотвращало индуцируемые эндотоксином поведенческие изменения, ослабляло активацию микроглии и снижение уровня белка Bcl-xL в структурах мозга. Выявленные корреляции между показателями двигательной активности, а также тревожности и уровнями белка активированной микроглии Iba-1 в ряде отделов мозга, включающих миндалину, указывают на ослабление введением ДОКС индуцированной ЛПС активации микроглии в качестве важного механизма поведенческих эффектов антибиотика в условиях нейровоспаления.

Заключение

В целом в работе впервые обнаружено влияние ДОКС на поведение лабораторных крыс в норме и в условиях активации нейровоспаления. Механизмы этих эффектов могут включать влияние антибиотика на антиапоптозный белок Bcl-xL, а также ослабление индуцируемой провоспалительным стимулом микроглиальной активации. Впервые выявлено участие повышения уровня ММР-9 в миндалине в индуцированном ЛПС повышении тревожности.

ВЫВОДЫ

1. ДОКС оказывал транзиторное, зависимое от продолжительности введения, влияние на тревожность и депрессивно-подобное поведение животных. Введение антибиотика в течение 4 дней увеличивало тревожность, а в течение 7 дней оказывало умеренное антидепрессивно-подобное действие, положительно коррелирующее с увеличением уровня белка Bcl-xL в гиппокампе.

2. Введение ЛПС в течение 14 дней индуцировало у животных нейровоспаление, проявляющееся увеличением уровней белка Iba-1 в большинстве исследованных отделов мозга и уровня ММР-9 в миндалине. Введение ЛПС также активировало периферический иммунный ответ, на что указывало достоверное увеличение веса селезенки животных после однократного, в течение 7 и 14 дней введения эндотоксина. Влияние ЛПС, вводимого в течение двух недель, на уровень белка Iba-1 в миндалине, гипоталамусе и среднем мозге, а также вес селезенки предотвращалось совместным в течение этого периода введением ДОКС.
3. Введение ЛПС в течение 14 дней снижало уровни белка Bcl-xL в гипоталамусе и стриатуме; совместное с ЛПС введение ДОКС предотвращало этот эффект эндотоксина. Введение ДОКС и ЛПС, как отдельно, так и совместно в течение 14 дней не оказывало влияния на уровни белка BDNF.
4. Введение ЛПС в течение 14 дней угнетало двигательную активность и повышало тревожность животных, а также, судя по уменьшению потребления сахарозы, провоцировало развитие у них депрессивно-подобного состояния. Эти эффекты предотвращались совместным с ЛПС введением ДОКС.
5. Между уровнями белка Iba-1 в миндалине и значениями двигательной активности, а также тревожности животных обнаружены достоверные корреляции, отрицательная и положительная, соответственно, что позволяет предполагать угнетение повышенной эндотоксином активности микроглиальных клеток в качестве одного из путей влияния ДОКС на индуцированные ЛПС снижение двигательной активности и увеличение тревожности.
6. Повышение эндотоксином уровня белка ММР-9 в миндалине не корректировалось ДОКС. Достоверная положительная корреляция, выявленная между уровнями ММР-9 и значениями тревожности, свидетельствует об участии этого провоспалительного фактора в провоцировании анксиогенного эффекта в условиях нейровоспаления.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Shishkina G.T., Lanshakov D.A., Bannova A.V., **Agarina N.P.**, Dygalo N.N. Knockdown of Bcl-xL in the rat hippocampus increased immobility in the forced swim test // *European Neuropsychopharmacology*. – 2017. – V. 27. – P. S678.
2. Shishkina G.T., Lanshakov D.A., Bannova A.V., Kalinina T.S., **Agarina N.P.**, Dygalo N.N. Doxycycline Used for Control of Transgene Expression has its Own Effects on Behaviors and Bcl-xL in the Rat Hippocampus // *Cell Mol Neurobiol*. – 2018. – V. 38. – № 1. – P. 281 – 288.

3. Шишкина Г.Т., Булыгина В.В., **Агарина Н.П.**, Дыгало Н.Н. Экспрессия мозгового нейротрофического фактора и триптофангидроксилазы в дорсальном ядре шва крыс в ходе повторяющихся стрессорных воздействий // *Нейрохимия*. – 2018. – Т. 35. – № 2. – С. 151 – 154. Перевод: Shishkina G. T., Bulygina V. V., **Agarina N. P.**, Dygalo N. N. The Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Tryptophan Hydroxylase in the Dorsal Raphe Nucleus during Repeated Stress // *Neurochemical Journal*. – 2018. – V. – 12. – № 2. – P. 152 – 154.
4. Shishkina G.T., Kalinina T.S., Bannova A.V., **Agarina N.P.**, Ayriyants K.A., Dygalo N.N. Common brain changes associated with increased activity in the forced swim test induced by drugs with different mechanisms of action // *European Neuropsychopharmacology*. – 2019. – V. – 29. – № 1. – P. 516 – 517.
5. **Комышева Н. П.**, Шишкина Г. Т., Калинина Т. С., Дыгало Н. Н. Особенности ответов защитных систем мозга взрослых крыс на стрессоры и липополисахарид // *Российский физиологический журнал им. ИМ Сеченова*. – 2020. – Т. 106. – № 6. – С. 756 – 764. Перевод: **Komyшева N. P.**, Shishkina G.T., Kalinina T.S., Dygalo N.N. Features of the Responses of the Protective Systems of the Brain in Adult Rats to Stressors and Lipopolysaccharide // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2021. – V. 51. – № 3. – P. 367 – 371.
6. Shishkina G. T., Bannova A. V., **Komyшева N. P.**, Dygalo N. N. Anxiogenic-like effect of chronic lipopolysaccharide is associated with increased expression of matrix metalloproteinase 9 in the rat amygdala // *Stress*. – 2020. – V. 23. – № 6. – P. 708 – 714.
7. **Комышева Н. П.**, Шишкина Г. Т. Перспективы использования препаратов с противовоспалительными свойствами для терапии депрессии: обзор экспериментальных и доклинических данных // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. – 2021. – Т. 121. – № 6. – С. 124 – 131.