

УДК 577.25

НЕОНАТАЛЬНЫЙ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С НЕЙРОВОСПАЛЕНИЕМ, В ГИППОКАМПЕ КРЫС

© 2021 А.А. Квичанский*, Л.В. Третьякова, М.Н. Волобуева,
А.О. Манолова, М.Ю. Степаничев, М.В. Онуфриев,
Ю.В. Моисеева, Н.А. Лазарева, А.П. Большаков, Н.В. Гуляева

*Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
117485 Москва, Россия; электронная почта: al.kvichans@gmail.com*

Поступила в редакцию 24.02.2021

После доработки 26.03.2021

Принята к публикации 27.03.2021

Исследовали дифференциальное влияние неонатального провоспалительного стресса (НПС) на развитие нейровоспаления в гиппокампе и депрессивно-подобного поведения у ювенильных и взрослых самцов и самок крыс. Индукция НПС при помощи введения бактериального липополисахарида в неонатальном периоде вызывает повышение экспрессии мРНК генов *Il6* и *Tnf* на фоне формирования депрессивно-подобного поведения у взрослых самцов крыс. У ювенильных самцов крыс НПС повышает экспрессию мРНК фракталкина и его рецептора в вентральном гиппокампе, однако этот эффект не сопровождается повышением экспрессии провоспалительных цитокинов и растворимой формы белка фракталкина. В дорсальном гиппокампе ювенильных самцов НПС снижает экспрессию мРНК фракталкина. У самок не было обнаружено достоверного влияния НПС на исследованные показатели. Таким образом, НПС индуцирует сложные долговременные изменения экспрессии генов, ассоциированных с нейровоспалением в разных областях гиппокампа, приводящие в конечном счёте к индукции нейровоспаления, которое, по-видимому, ассоциировано с развитием депрессивно-подобного поведения у самцов крыс.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: депрессия, нейровоспаление, цитокины, гиппокамп, межполовые различия.

DOI: 10.31857/S0320972521060075

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время большое депрессивное расстройство является одним из наиболее распространённых в мире заболеваний [1]. Во многих экспериментальных исследованиях, посвящённых механизмам патогенеза депрессии, экспериментальных животных помещают в условия неизбежного стресса различной модальности, что приводит к индукции депрессивно-подобных состояний [2]. Модель неонатального провоспалительного стресса (НПС) является примером альтернативного подхода. В этой модели животных подвергают действию провоспалительных факторов в раннем постнатальном возрасте (на 3 и 5 постнатальные дни (ПНД)), что

программирует развитие тревожно-подобных и депрессивно-подобных нарушений поведения во взрослом возрасте [3, 4].

Механизмы программирования депрессивно-подобного состояния у взрослых животных при помощи НПС остаются не до конца понятными [5]. Известно, что бактериальный липополисахарид (ЛПС) активирует рецептор TLR-4, запуская неспецифический иммунный ответ. Этот же рецептор участвует в запуске нейровоспаления в мозге крыс, подвергшихся стрессу в модели выученной беспомощности [6]. НПС приводит к развитию периферического воспаления и нейровоспаления и вызывает ответ органов гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси у новорождённых животных [7]. В настоящее время известно, что НПС может приводить к нарушению функционирования иммунной системы у подопытных животных [8, 9]. Можно предположить, что в условиях несформированного гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) воспаление, перенесённое в раннем постнатальном онтогенезе, индуцирует склонность к нейровоспалению у взрослеющих и взрослых особей.

Принятые сокращения: ВГ – вентральный гиппокамп; ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; ДГ – дорсальный гиппокамп; ЗФ – зубчатая фасция; ЛПС – бактериальный липополисахарид; НПС – неонатальный провоспалительный стресс; ПНД – постнатальные дни; ПС – поведенческий стресс; ТВП – тест вынужденного плавания; ТПС – тест предпочтения сахарозы; ФСБ – фосфатно-солевой буфер.

* Адресат для корреспонденции.

Нейровоспаление является специфической для нервной системы реакцией, сходной с классическим воспалением по набору участвующих молекулярно-клеточных механизмов. Данную реакцию характеризует повышение экспрессии провоспалительных медиаторов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО α) в тканях ЦНС и функциональная активация клеток микроглии. Такая реакция впервые была описана как ответ на различные повреждения мозга, такие как травмы, токсические повреждения, гипоксия и инфекции, однако позже было показано, что нейровоспалительная реакция может запускаться и внутренними мозговыми стимулами [10]. В частности, нейровоспаление наблюдают как в моделях депрессии на животных [11], так и у пациентов, страдающих большим депрессивным расстройством [12]. Предполагается, что индукция нейровоспаления приводит к формированию депрессивно-подобного поведения у подопытных животных [13].

За последние 10 лет накоплено большое число данных о регуляции нейровоспаления. Установлена важность баланса концентрации в тканях мозга провоспалительных (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО α) и противовоспалительных (ИЛ-10 и другие) цитокинов, вырабатываемых клетками как иммунной, так и нервной систем [10]. ИЛ-1 β и ФНО α могут экспрессироваться большинством типов клеток, представленных в мозге, в зависимости от условий их функционального статуса и микроокружения. Ключевыми продуцентами ИЛ-6 в ЦНС интактных здоровых мышей являются активированные клетки микроглии в головном мозге и клетки эпендимы спинного мозга [14]. Наличие мРНК *Il10* в тканях ЦНС является предметом для дискуссии, но секретируемый белок представлен в мозге и является мощным противовоспалительным медиатором [15]. Особая роль принадлежит системе фракталкина (CX3CL1). Этот сигнальный белок синтезируется главным образом в нейронах, но показан его синтез и в других клетках ЦНС [14]. Рецептор фракталкина экспрессируется в мозге в основном клетками микроглии [14]. Фракталкин регулирует формирование зрелой микроглии в ходе формирования мозга (в т.ч. гиппокампа и соматосенсорной коры) в эмбриональном и раннем постнатальном периоде, а также миграцию макрофагов в ЦНС у взрослых животных [16–20]. Кроме того, в зрелом мозге фракталкин выполняет функции противовоспалительного медиатора, обеспечивающего отрицательную обратную связь от нейронов к микроглии [21].

Гиппокамп является одной из ключевых структур мозга, страдающих при депрессивных

состояниях [22, 23]. При этом гиппокамп и особенно зубчатая фасция (ЗФ), неоднородны вдоль продольной (септо-темпоральной — у людей и дорсо-вентральной — у мелких млекопитающих) оси. В результате воздействия кортико-стероидов происходит изменение синаптической пластичности нейронов гиппокампа, при этом дорсальный гиппокамп (ДГ) и вентральный гиппокамп (ВГ) демонстрируют различную чувствительность к стрессу [24, 25]. При моделировании депрессии у животных, помимо нарушения синаптической пластичности нейронов, в ЗФ гиппокампа нарушается нейрогенез [22, 26, 27]. Так, в работе Zhang et al. [28] было показано, что в условиях обогащенной среды дорсальная и вентральная части гиппокампа реагируют неодинаково — в дорсальной части нейрогенез активнее и транскрипционный профиль также значительно отличается от вентральной. Транскриптомные и протеомные исследования показали, что реакция на стресс в дорсальной и вентральной частях гиппокампа различаются [29]. В предыдущих работах мы также показали, что НПС может вызывать изменения экспрессии генов, специфичные для ДГ и ВГ [30, 31].

Самцы и самки по-разному реагируют на стресс. В частности, Tenk et al. [32] показали, что самцы, подвергнутые НПС, сильнее теряют массу после повторной инъекции ЛПС во взрослом возрасте, чем самки после аналогичного воздействия. Между самцами и самками крыс в этой парадигме не было выявлено разницы по концентрации медиаторов воспаления и глюкокортикостероидов (ГКС), но наблюдали зависимость от пола реакцию микроглии — снижение количества микроглиоцитов в гиппокампе самцов и повышение — в гиппокампе самок [7]. Можно предположить, что этот эффект лежит в основе дифференциальной предрасположенности самцов и самок к развитию депрессивно-подобных нарушений во взрослом возрасте [33].

Ранее мы показали, что введение ЛПС в раннем постнатальном периоде самцам крыс приводит к повышению тревожности у самцов ювенильных крыс (ПНД 30–36) в тестах открытого поля и приподнятого крестообразного лабиринта. У взрослых самцов крыс (ПНД 101–107), но не у ювенильных животных, наблюдали проявление депрессивно-подобного поведения [4]. Исходя из этих данных, мы посвятили работу изучению влияния НПС на экспрессию генов, ассоциированных с нейровоспалением (*Il1b*, *Il6*, *Tnf*, *Cx3cl1*, *Cx3cr1*), в гиппокампе взрослых животных обоего пола. Также мы изучили влияние НПС на морфологию микроглии в ДГ и ВГ ювенильных крыс обоего пола.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. В эксперименте использовали потомство крыс линии Wistar, полученных из питомника «Столбовая». Животных содержали в индивидуальных клетках со свободным доступом к пище и воде при 12-часовом световом цикле (свет 8:00–20:00). День родов считали постнатальным днём 0 (ПНД 0). После родов ограничивали численность выводка 9 особями. В возрасте ПНД 21 отсаживали родившую самку, выводок разделяли на самцов и самок и содержали по пометам. Для экспериментов брали как самцов, так и самок.

Экспериментальные процедуры. Выводки случайным образом делили на экспериментальные и контрольные. На ПНД 3 и ПНД 5 животных из экспериментальных выводков подвергали неонатальному провоспалительному стрессу путём введения подкожно стерильного раствора ЛПС в изотоническом растворе NaCl (10 мкл/г массы тела; 0,05 мг/кг ЛПС из *Escherichia coli*; серотип O26:B6, «Sigma-Aldrich», США). Крысам из пометов контрольной группы (Контроль) вводили соответствующий объём изотонического стерильного раствора NaCl. Выбранная доза ЛПС не вызывала гибели подопытных животных. Было проведено две серии экспериментов (рис. 1).

В первой серии экспериментов животных, достигших возраста 3 мес., подвергали хендлингу в течение 4-х дней, после чего делили на две подгруппы. С животными одной подгруппы проводили тесты предпочтения сахарозы (ТПС) и вынужденного плавания (ТВП). Другую подгруппу крыс оставляли в домашних клетках. Через 30 мин после завершения ТВП 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.

Крыс второй серии в возрасте 1 мес. выводили из эксперимента путём декапитации под хлоралгидратным наркозом. У части крыс брали мозг для исследования реакции микроглии в гиппокампе, а мозг остальных животных брали для изучения экспрессии генов (правое полушарие) и проведения иммуноферментного анализа (левое полушарие).

Исследование поведения. Тест предпочтения сахарозы (ТПС). Процедура состояла из двух сеансов. В ходе первого сеанса крыс приучали к потреблению раствора сахарозы в условиях, сходных с условиями теста. Для этого животных помещали в индивидуальные клетки, где после 2 мин привыкания им предъявляли две поилки. В одной из поилок была вода, в другой — 20%-ный раствор сахарозы [34]. Приучение длилось 15 мин. На следующий день животных помещали в те же клетки, где после 2 мин привыкания им предъявляли предварительно взвешенные поилки, а через 1 ч фиксировали изменение массы поилок. Предпочтение сахарозы оценивали, исходя из индекса, рассчитываемого по формуле: индекс = (масса выпитого раствора сахарозы/масса выпитого раствора сахарозы + масса выпитого раствора воды) × 100%. Оба сеанса проводили в вечернее время (17:00–20:00).

Тест вынужденного плавания (ТВП). Тестирование поведения проводили в прозрачных цилиндрах высотой 40 см и диаметром 20 см («Открытая наука», Россия), наполненных водой ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) через 2 дня после ТПС. В первый день ТВП крыс запускали в цилиндры на 15 мин, после чего вынимали, вытирали полотенцем, высушивали под струёй тёплого воздуха и после этого возвращали в домашние клетки. На следующий день крыс помещали в цилиндры на 5 мин. Поведение крыс записывали с помощью видеокамеры. Анализ поведения прово-

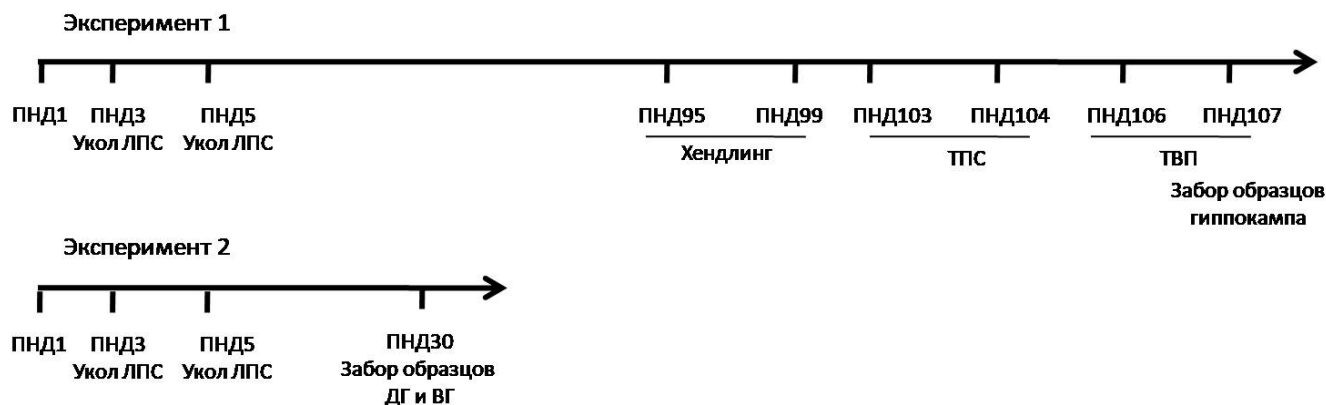


Рис. 1. Схема экспериментов

дили по видеозаписям, оценивая время пассивного плавания (иммобильности). Под иммобильностью понимали такое положение животных, при котором они не совершали плавательных движений, за исключением тех, что были необходимы для поддержания головы над поверхностью воды. Стоит отметить, что ТВП, сам по себе, является стрессирующей парадигмой для подопытных животных. Перенесённый поведенческий стресс (ПС) может вызывать изменения экспрессии генов и морфологии микроглии [35].

Биохимический и молекулярно-биологический анализ. Подготовка ткани мозга для изучения экспрессии генов. Через 30 мин после последнего поведенческого теста крыс декапитировали под хлоралгидратным наркозом, мозг вынимали, промывали в ледяном изотоническом растворе NaCl, выделяли гиппокампы (цельные, или ДГ и ВГ по отдельности) из правого полушария и замораживали их в жидком азоте. ДГ считали дорсальную половину гиппокампа вдоль дорсально-вентральной оси, ВГ — вентральную четверть. В случае выделения ДГ и ВГ остатки 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 («Thermo Fisher Scientific», 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 РНКазы RNase Inhibitor («New England Biolabs», США) в соответствии с рекомендациями производителей. Использовали эквимольную смесь случайного декапраймера («Евроген», SB002) и олиго(dT)₁₅-праймера («Евроген», SB001), концентрация каждого праймера в реакционной системе составляла 1 мкМ. После обратной транскрипции полученный продукт разводили 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) при помощи станции для количественной ПЦР CFX384 Touch («Bio-Rad», США). Праймеры подбирали на основе последовательностей из базы данных NCBI в программном пакете Lasergene PrimerSelect. Последовательности праймеров, использованных в работе, приведены в таблице.

В качестве нормировочного гена использовали праймеры к кДНК гена *Hprt*, выбранного

Последовательности праймеров, использованных в работе

Ген	Последовательности праймеров (5'–3')	
	Прямой	Обратный
<i>Il1b</i> NM_031512.2	TCTGTGACTCGTGGGATGAT	CACTTGTTGGCTTATGTTCTGTC
<i>Il6</i> NM_012589.2	GCCACTGCCTTCCCTACTTCAC	GACAGTGCATCATCGCTGTTCATAC
<i>Tnf</i> NM_012675.3	GTCCAACTCCGGGCTCAGAAT	ACTCCCCCGATCCACTCAG
<i>Il10</i> NM_012854.2	GACAATAACTGCACCCACTTCC	GCATCACTTCTACCAGGTAAACTTG
<i>Cx3cl1</i> NM_134455.2	ATCACCACCATCACCACCAAC	GAGGAACACTTTAAACCTCAGACA
<i>Cx3cr1</i> NM_133534.2	GGACCTCACCATGCCTACCT	CACCAACAGATTCCCCACCAG
<i>Hprt</i> NM_012583.2	CGTCGTGATTAGTGATGATGAAC	CAAGTCTTTCAGTCCTGTCCATA

по результатам анализа транскриптома гиппокампа крысы [36]. Относительную представленность транскриптов оценивали по методу $E^{\Delta\Delta Ct}$. 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. Отделы мозга гомогенизировали на льду в буфере для экстракции растворимых белков (1%-ный NP-40 («Sigma-Aldrich», США) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ, «ПанЭко», Россия), pH 7,5) при помощи гомогенизатора Поттера 10 ударами пестика при 1000 об./мин. Гомогенат центрифугировали 20 мин при 4 °С и 13 200 g. Супернатант отбирали и хранили при –20 °С. Концентрацию белка в пробах измеряли при помощи набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit («Thermo Fisher Scientific»). Концентрацию растворимой фракции фракталикина, ИЛ-6 и ИЛ-1β в пробах определяли при помощи наборов Rat CX3CL1/Fractalkine DuoSet ELISA, Rat IL-6 Quantikine ELISA Kit и Rat IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA («R&D Systems», США) в соответствии с рекомендациями производителя. Каждую пробу дублировали, сигнал детектировали при помощи планшетного ридера Hidex Sense («Hidex», Финляндия).

Изучение реакции микроглии в гиппокампе. Мозг крысы фиксировали погружением в 50 мл 4%-ного раствора параформальдегида в ФСБ, pH 7,5 на 1 ч. Затем заменяли фиксатор на свежий и инкубировали в нем следующие 24 ч.

Для иммуногистохимического окрашивания готовили фронтальные срезы толщиной 50 мкм на вибрационном микротоме Leica VT1200 S («Leica Biosystems», Германия). Срезы помещали в криопротекторную среду (ФСБ/глицерин/этиленгликоль = 1/0,75/0,75 (v/v)) и хранили при –20 °С до обработки. Перед окрашиванием срезы трижды промывали в 0,3%-ном (w/v) Triton X-100 («Serva», Германия) в ФСБ (ФСБТ), и блокировали неспецифичное связывание антител, для чего инкубировали в 5%-ной нормальной козьей сыворотке («Sigma-Aldrich», США) в ФСБТ. Затем срезы в течение ночи ин-

кубировали с первичными поликлональными антителами Rabbit anti-Iba1 IgG («Wako», Япония) в разведении 1/1000 при температуре 4 °С. На следующий день после трех отмывок в ФСБТ срезы инкубировали (2 ч при комнатной температуре) со вторичными антителами Goat anti-Rabbit IgG (H+L), конъюгированными с Alexa488 («Thermo Fisher Scientific»). После трех отмывок в ФСБ срезы заключали под покровные стекла в среду для заливки препаратов ProLong Gold («Thermo Fisher Scientific»), препятствующую выгоранию, с подкрашиванием клеточных ядер DAPI («Invitrogen», США) и хранили при –20 °С до использования.

Для проведения морфологического анализа микроглиальных клеток получали z-стеки с помощью микроскопа Zeiss Axio Imager Z2, оснащённого объективом EC Plan-NEOFLUAR 40× (NA = 0,75) и цифровой камерой MRm («Carl Zeiss», Германия). Количество изображений в z-стеке было фиксированным (17), расстояние между ними было установлено оптимальным (0,61 мкм). Фотографировали поля CA1 и CA3 гиппокампа и хилус зубчатой фасции, используя следующие координаты: для дорсального гиппокампа AP 2,80–3,80 мм и для вентрального – AP 4,80–5,30 мм, согласно атласу мозга [37]. Для каждого животного было получено по два изображения из каждой области.

Для последующей обработки изображений, подсчёта числа клеток и оценки степени активации микроглии использовали программное обеспечение Fiji (NIH, США). Для подсчёта клеток микроглии из z-стека получали проекцию максимальной интенсивности. Подсчитывали количество Iba1-позитивных клеток, содержащих чётко очерченную сому клетки и не менее двух отростков. Клетки, сома которых пересекала левую или нижнюю границы изображения, не учитывали. Для оценки активации микроглии рассчитывали фрактальную размерность контура отдельных клеток с использованием плагина FracLac для Fiji [33]. Чтобы получить контур микроглиальной клетки использовали последовательность преобразования изображений, предложенную Young и Morrison [38], с некоторыми модификациями [39]. Вкратце, эта последовательность включала в себя следующие шаги: 1 – получение проекции максимальной интенсивности; 2 – преобразования, усиливающие контрастность изображения и оптимизирующие соотношение сигнал/шум; 3 – вырезание из изображения отдельных клеток микроглии (с каждого изображения брали по три клетки с чётко видимой сомой и отростками); 4 – бинаризация изображений отдельных клеток; 5 – получение контура отдельных клеток из

бинаризованного изображения. Всего было проанализировано по шесть клеток у каждого животного в каждом из исследованных отделов гиппокампа. Фрактальная размерность контура объекта тем выше, чем сильнее его извилистость. Так, например, для такого простого объекта, как окружность, фрактальная размерность равна 1. Для амебоидной микроглии фрактальная размерность, как правило, составляет $\sim 1,2$, а для разветвлённой рамифицированной микроглии — $1,5$. Таким образом, оценку фрактальной размерности можно использовать для оценки степени активированности микроглии.

Статистическая обработка данных. Данные о поведении крыс и о морфологии клеток гиппокампа на графиках представлены в виде наложения столбчатых диаграмм (среднее $\pm$ SE) и точечных диаграмм, во всех группах $n \geq 5$. Данные об 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 переменных в выборке оценивали на соответствие нормальному с помощью критерия Шапиро–Уилка. Достоверность различий в исследовании поведения и морфологии клеток гиппокампа определяли двухфакторным дисперсионным анализом с последующим апостериорным анализом по методу Фишера или Тьюки в зависимости от применимости методов в программном пакете Statistica 12. В качестве факторов для независимых переменных использовали «пол» и «НПС». В исследованиях экспрессии мРНК и концентрации белков распределение переменных не соответствовало нормальному по критерию Шапиро–Уилка, поэтому достоверность различий между ДГ и ВГ определяли по методу Уилкоксона, достоверность различий между экспериментальными группами выявляли по методу Манна–Уитни с поправкой Бонферрони (3 гипотезы, $\alpha = 0,017$) в программном пакете Statistica 12.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование поведения взрослых крыс. Перенесённый НПС приводил к появлению признаков депрессивно-подобного поведения у взрослых крыс в тесте вынужденного плавания. Было выявлено взаимодействие факторов «пол» и «НПС» $F(1, 35) = 4,81$, $p = 0,034$. Апостериорное сравнение средних выявило повышение времени пассивного плавания у самцов, подвергнутых НПС (тест Тьюки, $p = 0,036$), но не выявил значимых изменений поведения у самок (рис. 2). Таким образом, самцы демонстри-

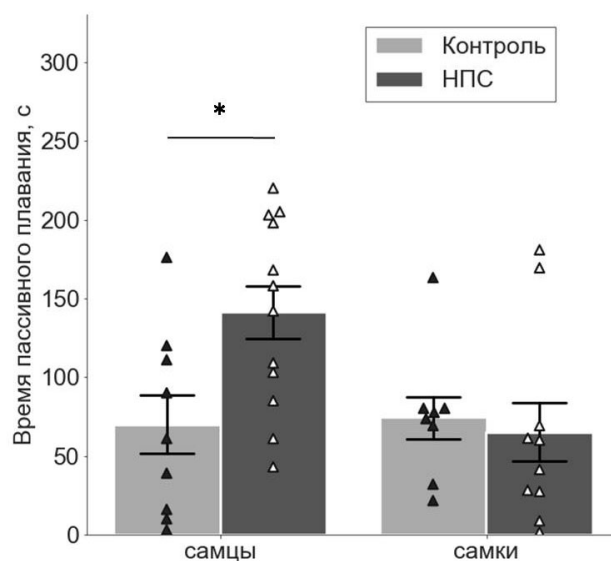


Рис. 2. Индукция депрессивно-подобного поведения НПС у взрослых самцов и самок крыс. * $p < 0,05$, тест Тьюки

ровали развитие так называемого «поведения отчаяния», которое зачастую интерпретируют как депрессивно-подобное, тогда как самки демонстрировали относительную устойчивость к развитию депрессивно-подобного поведения.

Не было выявлено достоверного влияния пола, НПС и взаимодействия факторов на потребление сахарозы взрослыми крысами (данные не представлены).

Экспрессия генов, ассоциированных с нейровоспалением, в гиппокампе взрослых крыс. Влияние перенесённого НПС на экспрессию мРНК *Il1b*, *Il6*, *Tnf*, *Cx3cl1* и *Cx3cr1*, а также на концентрацию белка ИЛ-6 было исследовано в гиппокампе взрослых самцов и самок крыс, которые либо оставались в домашних клетках, либо принимали участие в ТВП. Мы обнаружили, что в гиппокампе взрослых самцов крыс, перенёвших НПС, экспрессия мРНК *Il6* была выше, чем у контрольных животных независимо от того, были они подвергнуты испытанию в ТВП или нет ($p = 0,008$ и $p = 0,003$ соответственно; тест Манна–Уитни, рис. 3, а). Однако этот эффект не сопровождался изменением концентрации белка ИЛ-6 в гиппокампе взрослых самцов (рис. 3, в). Не было выявлено влияния НПС, ПС и их сочетания на экспрессию мРНК этого цитокина у самок (рис. 3, б), однако, парадоксально, ПС приводил к снижению концентрации ИЛ-6 у самок, подвергнутых НПС ($p = 0,014$, рис. 3, г). Кроме того, НПС не приводил к достоверному повышению экспрессии мРНК *Tnf*, хотя была выявлена тенденция к снижению этого параметра под действием ПС у самцов, подвергнутых НПС ($p = 0,027$, тест

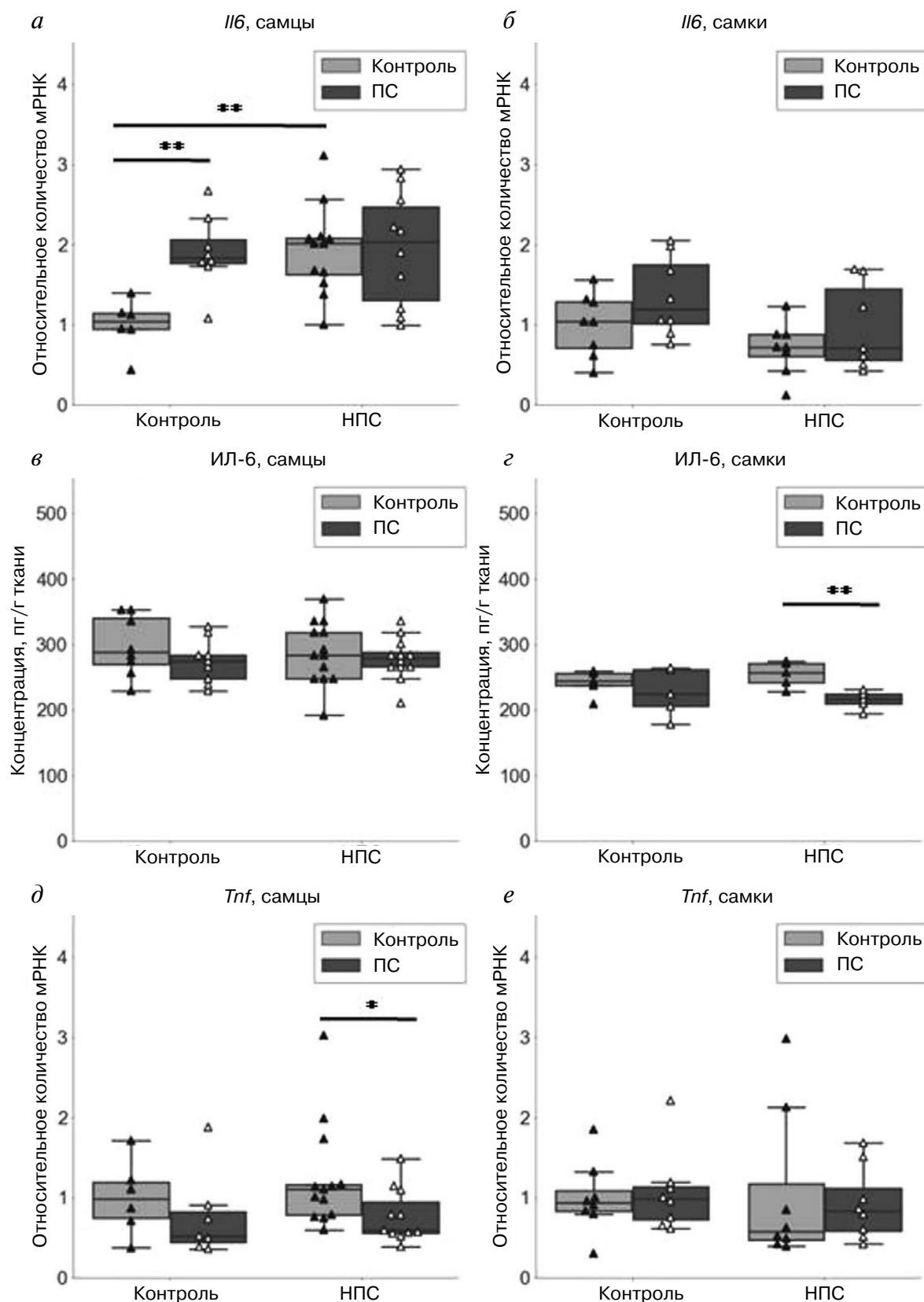


Рис. 3. Экспрессия генов, ассоциированных с нейровоспалением в гиппокампе взрослых крыс. *а* – Экспрессия мРНК *Il6* в гиппокампе самцов, *б* – экспрессия мРНК *Il6* в гиппокампе самок, *в* – концентрация ИЛ-6 в гиппокампе самцов, *г* – концентрация ИЛ-6 в гиппокампе самок, *д* – экспрессия мРНК *Tnf* в гиппокампе самцов, *е* – экспрессия мРНК *Tnf* в гиппокампе самок. * $p < 0,05$, ** $p < 0,017$, тест Манна–Уитни

Манна–Уитни, рис. 3, д). Не было выявлено влияния НПС и ПС на экспрессию мРНК *Tnf* в гиппокампе самок (рис. 3, е). Таким образом, мы обнаружили, что НПС и ПС индуцируют экспрессию мРНК *Il6* в гиппокампе самцов крыс на фоне развития депрессивно-подобного поведения.

Не было выявлено влияния НПС и ПС на экспрессию мРНК *Il1b*, *Cx3cl1* и его рецептора *Cx3cr1* в гиппокампе взрослых крыс (данные не представлены).

Экспрессия генов, ассоциированных с нейровоспалением, в ДГ и ВГ ювенильных крыс. Для изучения возможных механизмов, участвующих в формировании предрасположенности к депрессивно-подобному поведению, мы изучили влияние НПС на экспрессию генов, ассоцииро-

ванных с нейровоспалением в ДГ и ВГ самцов и самок ювенильных крыс.

Мы обнаружили, что во всех экспериментальных группах наблюдается больший уровень экспрессии мРНК *Il1b* в ВГ по сравнению с ДГ (в 4,7 раза у самцов и в 3,4 раза у самок) и меньший уровень экспрессии мРНК *Tnf* (в 1,9 раза у крыс обоего пола) в этих же структурах (тест Вилкоксона, $p < 0,05$). Было выявлено снижение экспрессии мРНК *Cx3cl1* в ДГ ювенильных самцов под действием НПС ($p = 0,005$, тест Манна–Уитни). Кроме того, было выявлено повышение экспрессии мРНК этого хемокина ($p = 0,005$, тест Манна–Уитни) и тенденция к повышению экспрессии мРНК его рецептора *Cx3cr1* ($p = 0,03$, тест Манна–Уитни) в ВГ ювенильных самцов под действием НПС. Однако

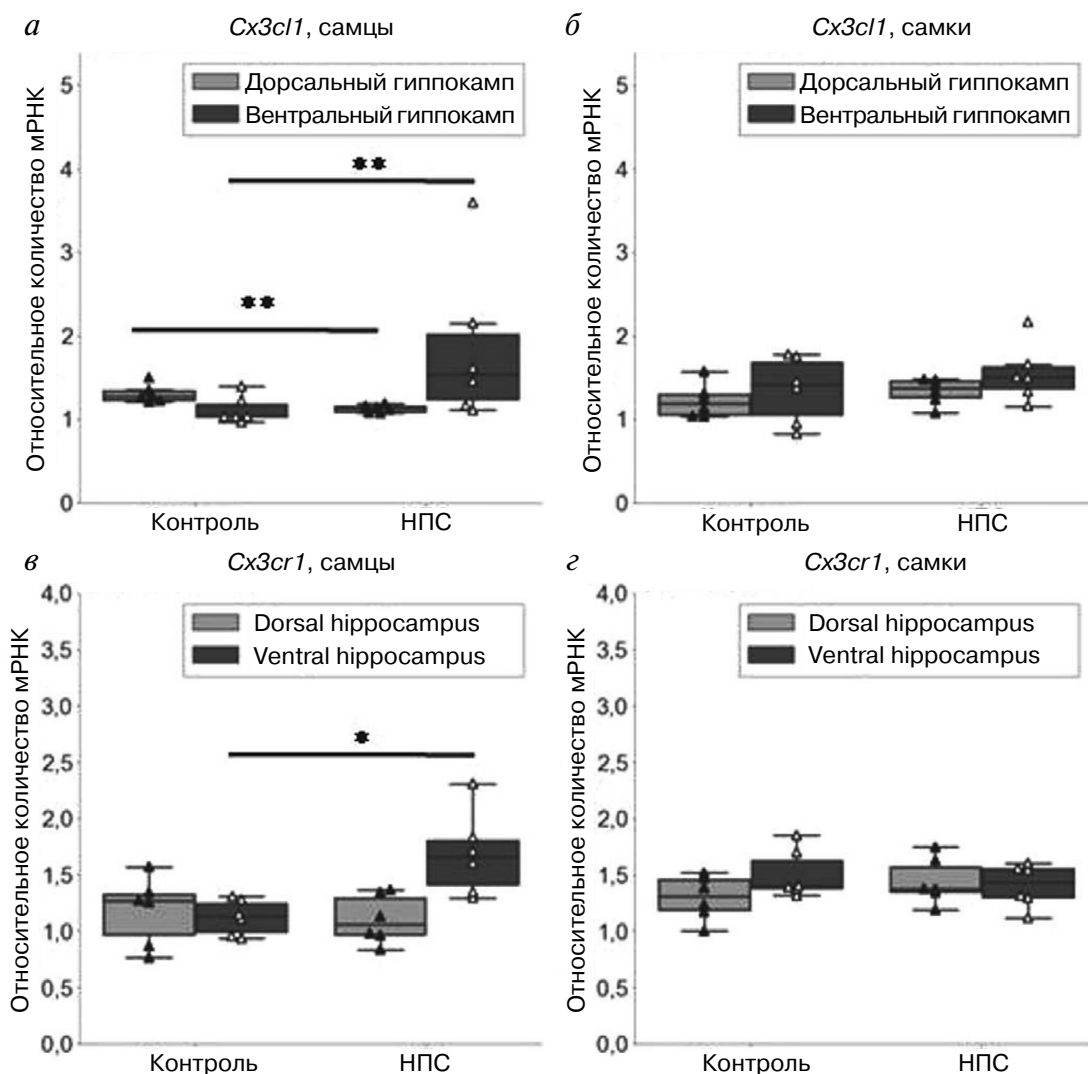


Рис. 4. Влияние НПС на экспрессию генов, ассоциированных с нейровоспалением в ДГ и ВГ ювенильных крыс. а – экспрессия мРНК *Cx3cl1* в ДГ и ВГ самцов, б – экспрессия мРНК *Cx3cl1* в ДГ и ВГ самок, в – экспрессия мРНК *Cx3cr1* в ДГ и ВГ самцов, г – экспрессия мРНК *Cx3cr1* в ДГ и ВГ самок. * $p < 0,05$, ** $p < 0,017$, тест Манна–Уитни

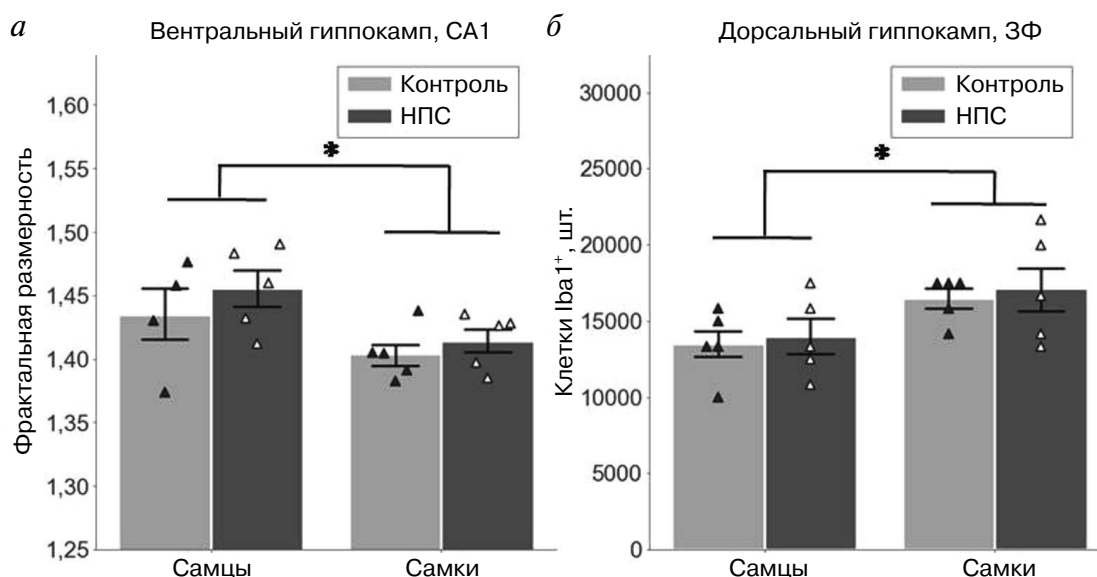


Рис. 5. Влияние НПС на морфологию клеток микроглии в ДГ и ВГ ювенильных крыс. *а* – Фрактальная размерность Iba1-позитивных клеток в области СА1 ВГ, *б* – количество клеток Iba1+ в 3Ф ДГ. * $p < 0,05$, тест Фишера

эти эффекты не сопровождалось изменениями экспрессии провоспалительных цитокинов и растворимой формы белка фракталкина. У самок не было обнаружено достоверных изменений, вызванных НПС (рис. 4). Уровень экспрессии мРНК *Il10* был ниже порога детекции (данные не представлены). Таким образом, не было обнаружено признаков нейровоспалительной реакции в ДГ и ВГ ювенильных крыс, подвергнутых НПС. Однако были выявлены специфичные для отделов гиппокампа изменения экспрессии мРНК фракталкина и его рецептора.

Исследование морфологии микроглии в ДГ и ВГ ювенильных крыс. Выявлена достоверно большая фрактальная размерность клеток микроглии в СА1 ВГ самцов по сравнению с самками ($F(1, 15) = 6,36$, $p = 0,016$, критерий Фишера, рис. 5, *а*). Кроме того, в 3Ф ДГ самцов наблюдали большее число Iba1-позитивных клеток ($F(1, 16) = 6,95$, $p = 0,015$, критерий Фишера, рис. 5, *б*). Влияния НПС, взаимодействия пола и НПС и достоверных различий в СА3 не выявлено (данные не представлены). Таким образом, нельзя заключить, что НПС влияет на морфологию клеток микроглии в гиппокампе ювенильных крыс.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мы продемонстрировали формирование депрессивно-подобного поведения в ТВП у взрослых самцов, но не у самок крыс, подвергнутых НПС. Вместе с тем не было выявлено

влияния НПС на потребление сахарозы экспериментальными животными. Можно предположить, что нарушения, развившиеся у подопытных животных, затрагивают системы мозга, ответственные за реакцию на стресс, но не ответственные за гедонистическое поведение.

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. ПС вызывал повышение экспрессии мРНК *Il6* в гиппокампе самцов, не подвергнутых НПС, до уровня, наблюдаемого у животных, подвергнутых НПС, но не подвергнутых ПС. Эти данные хорошо согласуются с данными о повышении экспрессии мРНК данного цитокина в микроглии под действием хронического стресса [40]. В то же время не было выявлено влияния НПС и ПС на концентрацию белка ИЛ-6 в гиппокампе взрослых крыс. Можно предположить, что синтез этого 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 [41]. Важным свойством ИЛ-6 может оказаться его способность сдвигать соотношение субпопуляций Treg/Th17-лимфоцитов в сторону Th17, которые осуществляют провоспалительную функцию [42]. Показана связь накопления в мозге

Th17-лимфоцитов с развитием депрессии, вызванной хроническим стрессом [43].

Не было выявлено влияния собственно НПС на экспрессию мРНК *Tnf* у взрослых животных обоего пола, а дополнительный стресс, связанный с ТВП, парадоксально приводил к снижению экспрессии мРНК *Tnf* в гиппокампе взрослых самцов, подвергнутых НПС. Можно предположить, что острый стресс, ассоциированный с вынужденным плаванием, вызывал активацию неизвестных противовоспалительных механизмов, подавлявших экспрессию мРНК *Tnf* у этих животных.

Мы обнаружили повышение экспрессии мРНК фракталкина и его рецептора у ювенильных самцов в ВГ через месяц после НПС, однако фрактальная размерность и количество клеток микроглии у этих животных не отличались от контрольных. Можно предположить, что у этих животных усиленно работает отрицательная обратная связь от нейронов к микроглии, направленная на подавление провоспалительной активности [21]. Отсутствие изменения концентрации растворимого фракталкина не является строгим доказательством отсутствия повышения синтеза белкового продукта гена *Cx3cl1*. Этот белок 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 [44]. Трансмембранная форма фракталкина недоступна для иммуноферментного анализа и не была исследована в нашей работе. Предполагают, что в зрелом мозге фракталкин является противовоспалительным медиатором, обеспечивающим отрицательную обратную связь от нейронов к микроглии. В то же время известно, что рецептор фракталкина регулирует миграцию моноцитов через ГЭБ и их активацию в ходе развития нейровоспалительной реакции в некоторых моделях патологий, и подавление этого про-

цесса снижает интенсивность нейровоспаления [16–20]. В прямом эксперименте введение в гиппокамп растворимого фракталкина вызывает активацию микроглии [45]. Таким образом, наблюдается двойственный характер регуляции нейровоспалительной реакции фракталкином. Можно предположить, что растворимая форма фракталкина может выступать в качестве локального провоспалительного агента, привлекающего клетки иммунной системы в очаг воспаления через ГЭБ, в то время как трансмембранная форма может выступать в качестве негативного иммунного регулятора. Можно предположить, что повышение экспрессии мРНК *Cx3cr1* является признаком изменения свойств микроглии, а повышение экспрессии *Cx3cl1* – попыткой ткани мозга скомпенсировать нарастающие нарушения. Сходные эффекты детектируют в ДГ крыс, подвергнутых стрессу иммобилизации, также индуцирующему депрессивно-подобное поведение [46]. Небольшое по амплитуде, но достоверное снижение экспрессии мРНК фракталкина в ДГ может указывать на неизвестные механизмы регуляции нейровоспаления, отличающиеся в ДГ и ВГ. Можно предположить, что в дальнейшем изменения свойств микроглии приводят к программированию склонности к развитию нейровоспаления у взрослых крыс.

Финансирование. Исследование поведения животных поддержано средствами государственного бюджета в соответствии с государственным заданием Министерства образования и науки Российской Федерации. Исследование морфологии микроглии поддержано Российским научным фондом (грант № 19-75-00063).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все принятые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kupfer, D. J., Frank, E., and Phillips, M. L. (2012) Major depressive disorder: new clinical, neurobiological, and treatment perspectives, *Lancet*, **379**, 1045-1055, doi: 10.1016/S0140-6736(11)60602-8.
2. Stepanichev, M., Dygalo, N. N., Grigoryan, G., Shishkina, G. T., and Gulyaeva, N. (2014) Rodent models of depression: Neurotrophic and neuroinflammatory biomarkers, *Biomed Res. Int.*, **2014**, 932757, doi: 10.1155/2014/932757.
3. Bilbo, S., and Schwarz, J. (2009) Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system, *Front. Behav. Neurosci.*, **3**, 14, doi: 10.3389/neuro.08.014.2009.
4. Tishkina, A., Stepanichev, M., Kudryashova, I., Freiman, S., Onufriev, M., et al. (2016) Neonatal proinflammatory challenge in male Wistar rats: effects on behavior, synaptic plasticity, and adrenocortical stress response, *Behav. Brain Res.*, **304**, 1-10, doi: 10.1016/j.bbr.2016.02.001.
5. Spencer, S. J., and Meyer, U. (2017) Perinatal programming by inflammation, *Brain Behav. Immun.*, **63**, 1-7, doi: 10.1016/j.bbi.2017.02.007.
6. Cheng, Y., Pardo, M., Armini, R., Martinez, A., Mouhsine, H., et al. (2016) Stress-induced neuroinflammation is mediated by GSK3-dependent TLR4 signaling that promotes susceptibility to depression-like behavior,

- Brain. Behav. Immun.*, **53**, 207-222, doi: 10.1016/j.bbi.2015.12.012.
7. Claypoole, L. D., Zimmerberg, B., and Williamson, L. L. (2017) Neonatal lipopolysaccharide treatment alters hippocampal neuroinflammation, microglia morphology and anxiety-like behavior in rats selectively bred for an infantile trait, *Brain Behav. Immun.*, **59**, 135-146, doi: 10.1016/j.bbi.2016.08.017.
8. Barth, C. R., Luft, C., Funchal, G. A., Oliveira, J. R., de Porto, B. N., and Donadio, M. V. F. (2016) LPS-induced neonatal stress in mice affects the response profile to an inflammatory stimulus in an age and sex-dependent manner, *Dev. Psychobiol.*, **58**, 600-613, doi: 10.1002/dev.21404.
9. Walker, F. R., Hodyl, N. A., and Hodgson, D. M. (2009) Neonatal bacterial endotoxin challenge interacts with stress in the adult male rat to modify KLH specific antibody production but not KLH stimulated ex vivo cytokine release, *J. Neuroimmunol.*, **207**, 57-65, doi: 10.1016/j.jneuroim.2008.11.012.
10. Estes, M. L., and McAllister, A. K. (2014) Alterations in immune cells and mediators in the brain: it's not always neuroinflammation! *Brain Pathol.*, **24**, 623-630, doi: 10.1111/bpa.12198.
11. Kubera, M., Obuchowicz, E., Goehler, L., Brzeszcz, J., and Maes, M. (2011) In animal models, psychosocial stress-induced (neuro)inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **35**, 744-759, doi: 10.1016/j.pnpbp.2010.08.026.
12. Setiawan, E., Wilson, A. A., Mizrahi, R., Rusjan, P. M., Miler, L., et al. (2015) Role of translocator protein density, a marker of neuroinflammation, in the brain during major depressive episodes, *JAMA Psychiatry*, **72**, 268, doi: 10.1001/jamapsychiatry.2014.2427.
13. Wang, Y., Cui, X. L., Liu, Y. F., Gao, F., Wei, D., et al. (2011) LPS inhibits the effects of fluoxetine on depression-like behavior and hippocampal neurogenesis in rats, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **35**, 1831-1835, doi: 10.1016/j.pnpbp.2011.07.004.
14. Zeisel, A., Hochgerner, H., Lönnerberg, P., Johnsson, A., Memic, F., et al. (2018) Molecular architecture of the mouse nervous system, *Cell*, **174**, 999-1014.e22, doi: 10.1016/j.cell.2018.06.021.
15. Pisanu, A., Lecca, D., Mulas, G., Wärdas, J., Simbula, G., et al. (2014) Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokines in microglia after PPAR- γ agonist neuroprotective treatment in the MPTP mouse model of progressive Parkinson's disease, *Neurobiol. Dis.*, **71**, 280-291, doi: 10.1016/j.nbd.2014.08.011.
16. Tremblay, M. E., and Sierra, A. (2014) *Microglia in Health and Disease. Chapter 1. Introduction*, doi: 10.1007/978-1-4939-1429-6.
17. Tang, Z., Gan, Y., Liu, Q., Yin, J. X., Liu, Q., Shi, J., and Shi, F. D. (2014) CX3CR1 deficiency suppresses activation and neurotoxicity of microglia/macrophage in experimental ischemic stroke, *J. Neuroinflammation*, **11**, 26, doi: 10.1186/1742-2094-11-26.
18. Lee, S., Varvel, N. H., Konerth, M. E., Xu, G., Cardona, A. E., et al. (2010) CX3CR1 deficiency alters microglial activation and reduces beta-amyloid deposition in two Alzheimer's disease mouse models, *Am. J. Pathol.*, **177**, 2549-2562, doi: 10.2353/ajpath.2010.100265.
19. Hellwig, S., Brioschi, S., Dieni, S., Frings, L., Masuch, A., et al. (2016) Altered microglia morphology and higher resilience to stress-induced depression-like behavior in CX3CR1-deficient mice, *Brain. Behav. Immun.*, **55**, 126-137, doi: 10.1016/j.bbi.2015.11.008.
20. Ridderstad Wollberg, A., Ericsson-Dahlstrand, A., Juréus, A., Ekerot, P., Simon, S., et al. (2014) Pharmacological inhibition of the chemokine receptor CX3CR1 attenuates disease in a chronic-relapsing rat model for multiple sclerosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 5409-5414, doi: 10.1073/pnas.1316510111.
21. Rogers, J. T., Morganti, J. M., Bachstetter, A. D., Hudson, C. E., Peters, M. M., et al. (2011) CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity, *J. Neurosci.*, **31**, 16241-16250, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3667-11.2011.
22. Boldrini, M., Santiago, A. N., Hen, R., Dwork, A. J., Rosoklija, G. B., et al. (2013) Hippocampal granule neuron number and dentate gyrus volume in antidepressant-treated and untreated major depression, *Neuropsychopharmacology*, **38**, 1068-1077, doi: 10.1038/npp.2013.5.
23. Gulyaeva, N. V. (2015) Ventral hippocampus, stress and psychopathology: translational implications, *Neurochem. J.*, **9**, 85-94, doi: 10.1134/S1819712415020075.
24. Maggio, N., and Segal, M. (2012) Steroid modulation of hippocampal plasticity: switching between cognitive and emotional memories, *Front. Cell Neurosci.*, **6**, 12, doi: 10.3389/fncel.2012.00012.
25. Gulyaeva, N. V. (2019) Functional neurochemistry of the ventral and dorsal hippocampus: stress, depression, dementia and remote hippocampal damage, *Neurochem. Res.*, **44**, 1306-1322, doi: 10.1007/s11064-018-2662-0.
26. Mahar, I., Bambico, F. R., Mechawar, N., and Nobrega, J. N. (2014) Stress, serotonin, and hippocampal neurogenesis in relation to depression and antidepressant effects, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **38**, 173-192, doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.11.009.
27. Podgorny, O. V., and Gulyaeva, N. V. (2020) Glucocorticoid-mediated mechanisms of hippocampal damage: contribution of subgranular neurogenesis, *J. Neurochem.*, doi: 10.1111/jnc.15265.
28. Zhang, T. Y., Keown, C. L., Wen, X., Li, J., Vousden, D. A., Anacker, C., et al. (2018) Environmental enrichment increases transcriptional and epigenetic differentiation between mouse dorsal and ventral dentate gyrus, *Nat. Commun.*, **9**, 1-11, doi: 10.1038/s41467-017-02748-x.
29. Floriou-Servou, A., Ziegler, L., von Stalder, L., Sturman, O., Privitera, M., et al. (2018) Distinct proteomic, transcriptomic, and epigenetic stress responses in dorsal and ventral hippocampus, *Biol. Psychiatry*, **84**, 531-541, doi: 10.1016/j.biopsych.2018.02.003.
30. Kvichansky, A. A., Volobueva, M. N., Manolova, A. O., Bolshakov, A. P., and Gulyaeva, N. V. (2017) Neonatal proinflammatory stress alters the expression of genes of corticosteroid receptors in the rat hippocampus: septo-temporal differences, *Neurochem. J.*, **11**, 255-258, doi: 10.1134/S1819712417030059.
31. Kvichansky, A. A., Volobueva, M. N., Manolova, A. O., Bolshakov, A. P., and Gulyaeva, N. V. (2018) 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.*, **12**, 180-183, doi: 10.1134/s1819712418020083.
32. Tenk, C. M., Kavaliers, M., and Ossenkopp, K. P. (2008) Sexually dimorphic effects of neonatal immune system activation with lipopolysaccharide on the behavioural response to a homotypic adult immune challenge, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **26**, 331-338, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2008.01.001.
33. Walker, A. K., Nakamura, T., Byrne, R. J., Naicker, S., Tynan, R. J., et al. (2009) Neonatal lipopolysaccharide and adult stress exposure predisposes rats to anxiety-like behaviour and blunted corticosterone responses: implications for the double-hit hypothesis, *Psychoneuroendocrinology*, **34**, 1515-1525, doi: 10.1016/j.psyneuen.2009.05.010.
34. Sarkisova, K. Y., Kulikov, M. A., Kudrin, V. S., Midzyanovskaya, I. S., and Birioukova, L. M. (2014) Age-

- related changes in behavior, in monoamines and their metabolites content, and in density of D1 and D2 dopamine receptors in the brain structures of WAG/Rij rats with depression-like pathology, *Zhurn. Vyss. Nervn. Deyatelnosti Im. I. P. Pavlova*, **64**, 668-685, doi: 10.7868/S0044467714060094.
35. Ma, L., Xu, Y., Wang, G., and Li, R. (2019) What do we know about sex differences in depression: a review of animal models and potential mechanisms, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **89**, 48-56, doi: 10.1016/j.pnpbp.2018.08.026.
 36. Dobryakova, Y. V., Kasianov, A., Zaichenko, M. I., Stepanichev, M. Y., Chesnokova, E. A., et al. (2018) Intracerebroventricular administration of 192IgG-saporin alters expression of microglia-associated genes in the dorsal but not ventral hippocampus, *Front. Mol. Neurosci.*, **10**, doi: 10.3389/fnmol.2017.00429.
 37. Paxinos, G., Watson, C., Diego, S., Boston, L., and York, N. (1997) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates Academic Press*, available at: <http://www.apnet.com> (accessed on 9 February 2021).
 38. Young, K., and Morrison, H. (2018) Quantifying microglia morphology from photomicrographs of immunohistochemistry prepared tissue using imagej, *J. Vis. Exp.*, **2018**, 57648, doi: 10.3791/57648.
 39. Stepanichev, M. Y., Goryakina, T., Manolova, A., Lazareva, N., Kvichanskii, A., et al. (2021) 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.*, **1**, 3, doi: 10.1007/s00429-020-02199-z.
 40. Ramirez, K., Shea, D. T., McKim, D. B., Reader, B. F., and Sheridan, J. F. (2015) Imipramine attenuates neuroinflammatory signaling and reverses stress-induced social avoidance, *Brain. Behav. Immun.*, **46**, 212-220, doi: 10.1016/j.bbi.2015.01.016.
 41. Verboogen, D. R. J., Revelo, N. H., Ter Beest, M., and van der Bogaart, G. (2019) Interleukin-6 secretion is limited by self-signaling in endosomes, *J. Mol. Cell Biol.*, **11**, 144-157, doi: 10.1093/jmcb/mjy038.
 42. Kimura, A., and Kishimoto, T. (2010) IL-6: regulator of Treg/Th17 balance, *Eur. J. Immunol.*, **40**, 1830-1835, doi: 10.1002/eji.201040391.
 43. Hong, M., Zheng, J., Ding, Z.-Y., Chen, J.-H., Yu, L., et al. (2013) Imbalance between Th17 and Treg cells may play an important role in the development of chronic unpredictable mild stress-induced depression in mice, *Neuroimmunomodulation*, **20**, 39-50, doi: 10.1159/000343100.
 44. Sheridan, G. K., and Murphy, K. J. (2013) Neuron-glia crosstalk in health and disease: fractalkine and CX3CR1 take centre stage, *Open Biol.*, **3**, 130181, doi: 10.1098/rsob.130181.
 45. Hughes, P. M., Botham, M. S., Frentzel, S., Mir, A., and Perry, V. H. (2002) Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, during acute and chronic inflammation in the rodent CNS, *Glia*, **37**, 314-327, doi: 10.1002/glia.10037.
 46. Bollinger, J. L., Collins, K. E., Patel, R., and Wellman, C. L. (2017) Behavioral stress alters corticolimbic microglia in a sex- and brain region-specific manner, *PLoS One*, **12**, doi: 10.1371/journal.pone.0187631.

NEONATAL PROINFLAMMATORY STRESS AND EXPRESSION OF GENES ASSOCIATED WITH NEUROINFLAMMATION IN THE HIPPOCAMPUS OF RATS

**A. A. Kvichansky*, L. V. Tret'yakova, M. N. Volobueva, A. O. Manolova, M. Yu. Stepanichev,
M. V. Onufriev, Y. V. Moiseeva, N. A. Lazareva, A. P. Bolshakov, and N. V. Gulyaeva**

*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences,
117485 Moscow, Russia; e-mail: al.kvichans@gmail.com*

Differential effect of the neonatal proinflammatory stress (NPS) on the development of neuroinflammation in the hippocampus and induction of the depressive-like behavior in juvenile and adult male and female rats was studied. NPS induction by bacterial lipopolysaccharide in the neonatal period upregulated expression of the *Il6* and *Tnf* mRNAs accompanied by the development of depressive-like behavior in the adult male rats. NPS increased expression of the mRNAs for fractalkine and its receptor in the ventral hippocampus of the juvenile male rats, but did not affect expression of mRNAs for the proinflammatory cytokines and soluble form of fractalkine. NPS downregulated expression of fractalkine mRNA in the dorsal hippocampus of juvenile males. No significant effects of NPS were found in the female rats. Therefore, the NPS induces long-term changes in the expression of neuroinflammation-associated genes in different regions of the hippocampus, which ultimately leads to the induction of neuroinflammation and development of depressive-like behavior in male rats.

Keywords: depression, neuroinflammation, cytokines, hippocampus, sex differences