

## **Изменение транскриптома генов гиппокампа мышей в модели депрессии при интраназальном введении биоактивных факторов M2 макрофагов**

**Шевела Е.Я.<sup>1</sup>, Маркова Е.В.<sup>1,2</sup>, Княжева М.А.<sup>1</sup>, Проскурина А.С.<sup>3</sup>,  
Ефремов Я.Р.<sup>2,3</sup>, Молодцов В.В.<sup>2,4</sup>, Селедцов И.А.<sup>4</sup>, Останин А.А.<sup>1</sup>,  
Богачев С.С.<sup>3</sup>, Колчанов Н.А.<sup>3</sup>, Черных Е.Р.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия

<sup>2</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

<sup>3</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

<sup>4</sup>Softberry Inc., Нью-Йорк, США

**Аннотация.** В работе изучено влияние биоактивных факторов M2 макрофагов на транскриптом генов гиппокампа у мышей с депрессивно-подобным состоянием, вызванным социальным стрессом. Используя в качестве матрицы поли-А мРНК, выделенную из анатомически резектированного гиппокампа, получена RNAseq библиотека экспрессирующихся транскриптов. Сравнительный анализ транскриптов доминантно экспрессирующихся/репрессированных генов гиппокампа у особей, получавших интраназально кондиционную среду M2 макрофагов, и мышей контрольной группы, получавших физиологический раствор, свидетельствует, что купирование синдрома депрессивно-подобного состояния коррелирует с восстановлением баланса АТФ/аденозин. В структуре событий, определяющих позитивные изменения поведенческих реакций депрессивных мышей, обнаруживается смена фенотипа микроглии с провоспалительного на противовоспалительный фенотип и связанное с этим восстановление нарушенных трансмиссивных систем глутамата и каннабиноидов.

**Ключевые слова:** АТФ, каннабиноидная система, глутамат, микроглия, нейроны, RNAseq.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Широкая изменчивость симптомов и клинических проявлений разных подтипов депрессии указывает на то, что депрессия не является гомогенным расстройством, а представляет собой спектр связанных расстройств. Считается, что депрессивные синдромы связаны с нарушениями передачи сигнала между нейронами [1]. Эти нарушения могут быть обусловлены: а) деструктивными молекулярными процессами в самих нейронах и б) специфическими сигналами со стороны глии, и, в частности, микроглии.

Несколько сигнальных систем с различными биологическими функциями в конкурентных условиях или в синергизме регулируют механизмы клеточного взаимодействия и поддержания гомеостаза в головном мозге. Пуринергическая система

является одной из основных систем сигнализации, которая регулирует взаимодействие нейронов и поведение глиальных клеток, и в первую очередь микроглии. Аденозин трифосфат (АТФ) относится к пуринергической сигнальной системе, которая включает рецепторы P2X, P2Y и P1, белки, участвующие в АТФ секреции и внеклеточной деградации АТФ, а также молекулы, которые распознают пурины в качестве лиганда.

Проведенный анализ источников позволил сформулировать заключение, что одной из основных причин возникновения воспаления в центральной нервной системе (ЦНС) является нарушения метаболизма АТФ, связанного с накоплением трифосфата и дефицита аденозина.

В настоящее время считается, что нуклеотиды и нуклеозиды являются истинными медиаторами воспаления [2–8]. Концентрация нуклеотидов/нуклеозидов во внеклеточном пространстве поддерживается на низком уровне эктонуклеотидазами и переносчиками аденозина. Однако при механическом стрессе, повреждении клеток или воспалении эти молекулы могут накапливаться в околоклеточной среде.

Внеклеточный АТФ относится к молекулам, индуцирующим воспаление, и действует как «сигнал опасности», инициируя врожденный иммунный ответ. Появление в клеточном микроокружении высокой концентрации АТФ вследствие нарушения его метаболизма, возникающего при любых инициирующих процессах, приводит к развитию акселеративной петли воспаления. Известно, что этот нуклеотид индуцирует секрецию макрофагами провоспалительных цитокинов (IL-1 и IL-6) и супероксидных радикалов [2, 9–11]. В свою очередь, продукт распада АТФ, аденозин, ограничивает воспаление, подавляя провоспалительную активность иммунных клеток [2, 9, 12].

Не смотря на низкий репаративный потенциал центральной нервной системы (ЦНС) в тканях мозга происходит обновление клеточного состава за счет апоптоза/пролиферации. При различных деструктивных процессах количество апоптотических клеток увеличивается, что сопровождается появлением в межклеточном пространстве молекул АТФ [13]. Кроме того, известно, что высвобождение АТФ во внеклеточную среду может быть обусловлено активацией NMDA-рецепторов дендритными отростками нейронов [14].

При балансе воспалительных и противовоспалительных клеток, АТФ внеклеточной среды утилизируется до аденозина эктонуклеотид гидролазами, расположенными на цитоплазматической мембране клеток микроглии [15]. При избытке АТФ во внеклеточной среде через ионотропные рецепторы P2X, P2Y и P1 в микроглие запускаются провоспалительные процессы, ведущие к нейротоксическим эффектам [16]. Воспаление является пусковым механизмом патологического процесса при большинстве нейродегенеративных заболеваний. И это именно такое воспаление, которое связано с нарушениями метаболизма АТФ и исчезновением из внеклеточной среды аденозина [15, 17]. Свободный аденозин является одной из главных триггерных молекул, запускающих множественные сигнальные каскады в нейронергических системах, микроглии, астроглии, клетках эндотелия церебральных капилляров, которые положительно регулируют процессы передачи нейронального импульса и поддерживают гомеостаз в ЦНС.

Нехватка аденозина индуцирует различные нейродегенеративные процессы и в первую очередь воспаление микроглии. Хроническое течение воспалительного процесса поддерживается нарушением проницаемости плотных контактов эндотелия мозговых капилляров. Это приводит к экстравазации воспалительных лейкоцитов из периферической крови [18], что потенцирует воспалительный процесс в мозге.

В ЦНС основными воспалительными Т-клетками являются Т-хелперы 17, опосредующие патогенные свойства через секрецию провоспалительных цитокинов (IL-17, IFN- $\gamma$  и GM-CSF) и хемокина CCL2, который обеспечивает их миграцию в ЦНС [19]. Астроциты экспрессируют эктогидролазы, обеспечивая локальный гидролиз АТФ.

Аутокринное поглощение аденозина способствует секреции астроцитами CCL2 – основного хемоаттрактанта лейкоцитов, что при общем нарушении метаболизма АТФ обеспечивает миграцию воспалительных клеток в ткани мозга [20]. Индуцированные к воспалению клетки секретируют провоспалительные факторы, и воспалительный процесс становится хроническим.

Известно, что при воспалении микроглиальные макрофаги приобретают M1 фенотип [7, 16]. Установлено, что M1 микроглия дефектна в гидролизе экстраклеточного АТФ, что связано с нарушением процессов синтеза экто-аденозилтрифосфат гидролазы [2]. Торможение или полная остановка процесса гидролиза внеклеточного АТФ до аденозина, связанное с поляризацией микроглии в M1 фенотип, становится причиной накопления АТФ и дефицита свободного аденозина во внеклеточной среде различных отделов мозга. Первое акселеративно стимулирует начатое воспаление, второе запускает каскад нейротоксических процессов.

При недостатке аденозина возникают многочисленные патологические процессы в клеточных системах головного мозга, связанные с разрывом активационной цепи рецептор (например, ADORA2A)/лиганд (аденозин), которые включают ADORA2A глутаматергическую метаболическую систему, каннабиноидную систему сигналинга, активацию клеточного синтеза через G-белок/цАМФ-Pr, миграцию иммунных клеток, энергетический и ионный потенциал клеток головного мозга. Одним из основных рецепторов, активируемых аденозином, является аденозиновый рецептор ADORA2A [21]. Этот рецептор в большом количестве экспрессируется в воспаленных участках мозговой ткани на различных типах клеток: нейронах, микроглии, астроглии, олигодендроцитах, клетках эндотелия мозговых капилляров [18, 20, 21]. Мы полагаем, что описанная в цитируемых работах повышенная экспрессия рецептора – это компенсаторная мера, которая определяется нехваткой свободного аденозина вследствие нарушения синтеза молекул эктогидролаз провоспалительными макрофагами микроглии, общего падения метаболизма АТФ и необходимостью утилизации возможного остаточного аденозина, необходимого для функционирования клеток.

В настоящем исследовании проведен сравнительный анализ сверхэкспрессирующихся/репрессированных генов и связанных с ними генных платформ умеренно экспрессирующихся/репрессированных генов гиппокампа в двух группах мышей с депрессивноподобным состоянием, вызванным социальным стрессом (ДСС). В экспериментальной группе мышам интраназально вводили кондиционную среду M2 макрофагов, в контрольной группе – физиологический раствор. На уровне изменения экспрессии специфических генов и генных платформ приводятся доказательства возникновения компенсаторного механизма восстановления разбалансированной оси метаболизма АТФ как основного триггера воспалительного процесса и нейродегенеративных изменений в головном мозге мышей с ДСС. Полученные результаты находятся в согласии с предложенной гипотезой о том, что одной из основных причин возникновения воспаления в ЦНС является нарушение метаболизма АТФ, связанного с накоплением трифосфата и дефицита аденозина.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Генерация M2 макрофагов из крови здоровых доноров

M2 макрофаги генерировали из прилипающей фракции моноклеарных клеток, выделенных из гепаринизированной венозной крови здоровых доноров [22]. Моноклеарные клетки ( $3-5 \times 10^6$ /мл) инкубировали в течение 18–24 ч при 37°C и 5 % CO<sub>2</sub> во флаконах в среде RPMI-1640, содержащей 0.05 mM 2-меркаптанола, 2 mM пирувата натрия, 0.3 mg/ml L-глутамина, 1 % раствора незаменимых аминокислот, 100 µg/ml гентамицина, 2 % аутоплазмы и рекомбинантный GM-CSF человека (rhGM-

CSF, 50 нг/мл, R&D Systems). Затем фракция неприкрепившихся к пластику клеток была удалена, а фракция адгезивных клеток ( $\approx 90\text{--}95\%$  CD14+ моноцитов) культивировалась в среде RPMI-1640 (в том же составе) в течение 7 сут. После этого, от полученных таким образом M2 макрофагов была собрана кондиционная среда в стерильные флаконы, которые были заморожены при  $-80^\circ\text{C}$  до исследования.

### **Оценка секрета M2 макрофагов**

Для оценки секрета генерированные в течение 7 суток M2 макрофаги культивировались в стандартизированных условиях (50 тыс. клеток/лунку 96-лучочного планшета в среде RPMI-1640 с 10 % FCS в течение 24 ч). Методом проточной флуориметрии на 2-х лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) в собранных культуральных супернатантах оценивалось содержание 47 анализитов с использованием коммерческих Human Cytokine тест-систем в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Были оценены следующие группы цитокинов: про-/противовоспалительные цитокины (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, MIF, IFN- $\alpha$ 2, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-6, IL-10, IL1-га, TRAIL); иммунорегуляторные Th1, Th2, Th9, Th17 цитокины (IL-12p40, IL-12p70, IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-15, IL-17, IL-2R $\alpha$ (CD25)); ростовые и нейротрофические факторы (SCF, SCGF- $\beta$ , IL-3, M-CSF, GM-CSF, G-CSF, IL-7, HGF, LIF,  $\beta$ -NGF, FGF- $\beta$ , PDGF, VEGF); хемокины (IL-16, GRO- $\alpha$ , IL-8, IP-10, MCP-1, MCP-3, MIG, SDF-1 $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , Rantes, Eotaxin).

### **Формирование депрессивноподобного состояния у мышей (CBAxС57BL/6)F1**

Депрессивноподобное состояние у мышей-самцов (CBAxС57BL/6)F1 с пассивным типом поведения в «открытом поле» было сформировано под влиянием длительного социального стресса методом парного дистантного сенсорного контакта (модель депрессии, вызванной социальным стрессом, ДСС). В экспериментальной группе интраназальное введение растворимых факторов M2 макрофагов осуществлялось курсом в течение шести дней, по 60 мкл дважды в день на одно животное (поочередное закапывание в левый/правый носовые ходы по 10 мкл). В контрольной группе вместо растворимых факторов M2 макрофагов использовался физиологический 0.9 % раствор хлорида натрия в таких же объемах и с такой же кратностью введения.

### **Поведенческое фенотипирование мышей с ДСС**

Поведенческое фенотипирование и изучение когнитивных функций мышей на фоне терапии проводилось с помощью автоматической системы регистрации Noldus (Noldus Information Technology) в тестах «открытое поле» (локомоторная и исследовательская активность), приподнятый крестообразный лабиринт (уровень тревожности, оценка риска), принудительного плавания (депрессивноподобное поведение), социального распознавания в трех-отсечной камере, социального взаимодействия на нейтральной арене. Ангедония была оценена в тесте на предпочтение раствора сахарозы с использованием клеток для мониторинга поведения IntelliCage (TSE). Социальное вознаграждение было оценено в тесте социально обусловленного предпочтения места.

### **Нормативно-юридическая база исследования**

Исследования с животными проводились в соответствии с законодательством Российской Федерации, положениями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях, а также требованиями и рекомендациями Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных.

## РНК секвенирование

Для характеристики паттерна экспрессии генов использовался метод RNAseq на высокопроизводительном секвенаторе IlluminaMiSeq (США) образцов гиппокампа (эксперимент/контроль) после проведения курса терапии. Для этого из образцов тканей была выделена поли-А РНК, которая использовалась для приготовления библиотек для секвенирования согласно протоколу TruSeq RNA Library Prep Kit v2 (Illumina). Концентрация кДНК была определена методом количественной ПЦР на приборе CFX-96 (Bio-Rad, США) с использованием набора Library Quantification Kit (CepivaBiosystems, ЮАР). Секвенирование проводилось с использованием набора MiSeq Reagent Kit v3 150 cycles (Illumina, США). В результате были получены двухконцевые прочтения индексных последовательностей по 75 пар нуклеотидов, которые затем были демультимплексированы и записаны в отдельные файлы формата FASTQ для последующего биоинформационного анализа.

## Биоинформационный анализ прочтений. Общая логика анализа

Полученные прочтения (риды) были очищены от: а) адаптерных последовательностей с помощью пакета TrimGalore (Babraham Institute, США); б) коротких прочтений (менее 20 нуклеотидов), образовавшихся после триммирования, и картированы (с учетом парности) на целевые последовательности с использованием пакета ReadsMap (Softberry Inc., США) в режиме solid. В данном режиме короткие целевые последовательности объединялись в единый контиг, оставаясь при этом разделенными вставками  $(N)_n$ , где  $N$  – маска нуклеотида («masked sequence»), которая не используется программой для выравнивания,  $n$  – задаваемая длина вставки (определяется размером окна при секвенировании во избежание ошибочных выравниваний парных прочтений на разные целевые последовательности). В качестве целевых последовательностей были использованы все известные варианты транскриптов мРНК генов мыши (*Mus musculus*), доступные для скачивания на сайте Genomic Institute, University of California, Santa Cruz (KnownGeneMrna.txt).

Прочтения выравнивались в жестких условиях (не более одной вставки/делеции на выравнивание) и из полученного набора выравниваний были отобраны лучшие по «покрытию» для каждой пары прочтений. В ходе анализа полученных выравниваний для каждой целевой последовательности были определены следующие данные: 1) полнота покрытия прочтениями, т.е. доля целевой последовательности, покрытая прочтениями (в случае, когда вся последовательность покрыта прочтениями полностью, значение равнялось единице); 2) общее число парных прочтений, выравнивающихся на данную последовательность, и число уникальных выравниваний (прочтения, выравнивающиеся только на эту целевую последовательность); 3) индекс FPKM (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads – фрагменты на 1000 нуклеотидов на миллион картированных прочтений) и 4) распределение покрытия по длине целевой последовательности.

Для сравнения относительной экспрессии генов у контрольных и экспериментальных животных были использованы нормированные данные. Данные нормировались в соответствии с общим количеством прочтений, использованных для картирования. Правильность нормирования определялась сравнением трех генов домашнего хозяйства – *Gapdh* (соотношение между контролем и экспериментом 1.01), *Actb* (соотношение между контролем и экспериментом 1.21) и *Rpl30* (соотношение между контролем и экспериментом 1.03). Относительные изменения в экспрессии генов определялись простым отношением количества прочтений, выровненных на определенный ген, в контроле к таковому в эксперименте в соответствии с формулой:

$C = N_{ctrl}/N_{exp}$ , где  $C$  – относительное изменение экспрессии,  $N_{ctrl}$  – нормированное количество прочтений, выровненных на данный ген в контрольной группе, а  $N_{exp}$  –



нормированное количество прочтений, выравненных на данный ген в экспериментальной группе. Поскольку была проведена только одна процедура секвенирования, и мы не могли использовать общепринятые инструменты статистического анализа, то было принято «волевое» решение рассматривать только те гены, для которых суммарное количество уникальных прочтений (т. е. общее количество прочтений, «упавших» на данный ген, и в контроле, и в эксперименте), было 20 и более (например, минимум 4 прочтения в контроле и 16 в эксперименте). Кроме того, в силу указанной причины, для начального анализа мы рассматривали только гены с различиями в экспрессии в 3 раза и более.

На первом этапе для определения биологических процессов и сигнальных и метаболических путей, вовлеченных в процессы купирования депрессивного состояния мышей с ДСС, был проведен онтологический анализ полученных генов, экспрессия которых была повышена, с использованием инструментов с открытым доступом (String, DAVID и Enrichr). К сожалению, полученные результаты не позволили сформулировать логическую концепцию, раскрывающую причины позитивных изменений когнитивных функций мышей с ДСС после проведенного лечения. В этой связи были проанализированы доступные в свободной печати литературные источники, дающие представление о функциональной активности каждого из рассматриваемых генов.

В результате проведенного анализа были выделены метаболические пути, в которых принимают участие гены, РНК которых сверхэкспрессируется в гиппокампе мышей после лечения кондиционной средой M2 макрофагов. Эти гены являются главными маркерами сигнальных систем, на которые воздействуют факторы, присутствующие в кондиционной среде M2 макрофагов. Далее в основной части анализа возможное участие генов, демонстрирующих сверхэкспрессию, было вписано в общую структуру метаболического процесса, к которому были отнесены отобранные транскрипты. Для оставшихся генов, демонстрирующих высокую экспрессию, было определено место в структуре событий, определяющих направление метаболической активности сверхэкспрессирующихся генов. Вместе эти гены составили функциональное ядро сигнального метаболического каскада. Умеренно экспрессирующиеся гены также были проанализированы в рамках выбранной логики. Уровень экспрессии транскрипционных факторов считался высоким при их простом определении как «экспрессирующиеся в гиппокампе», независимо от числового значения прочтений.

При сравнении уровней экспрессии генов количество прочтений, «упавших» на определенный локус, полученное от мышей с ДСС после лечения кондиционной средой M2 макрофагов, сравнивалось с количеством прочтений, «упавших» на тот же самый локус мышей с ДСС. То есть сравнение было проведено с уровнем экспрессии РНК генов в гиппокампе, полученном от мышей с ДСС. Это означает, что уровень экспрессии анализируемых генов у мышей с ДСС был не нулевой и представлял собой базовый уровень экспрессии, с которым проводилось сравнение данных RNAseq мышей после лечения кондиционной средой M2 макрофагов (например, если гены сверхэкспрессируются с показателем «упавших» прочтений (например, +201), то это означает, что этот показатель во столько раз выше, чем количество прочтений, «упавших» на тот же самый район хромосомы у мышей с ДСС. Аналогично это относится и к доминантно репрессированным генам. Если этот показатель во столько раз ниже, чем количество прочтений, «упавших» на тот же самый район хромосомы у мышей с ДСС (например, -212), то это означает, что уровень экспрессии данного гена во столько раз ниже, чем у ДСС мышей. И, таким образом, количество «упавших» прочтений является показателем «возможности экспрессии» РНК данного гена в условиях воздействия кондиционной среды M2 макрофагов. Анализ доминантно экспрессированных генов проведен в первой части работы. Доминантно репрессированные гены проанализированы во второй части исследования.

## Общая характеристика модели исследования

В Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (Новосибирск, Россия) разработан оригинальный протокол получения M2 макрофагов человека и технология интраназального применения их растворимых факторов для лечения психоневрологических расстройств различной этиологии. Интраназальный путь введения позволяет обеспечить доставку растворимых факторов в ткани мозга через ольфакторный и тригеминальный путь, минуя гематоэнцефалический барьер. Доклинические исследования на модели мышей с ДСС продемонстрировали безопасность технологии и ее противотревожный и антидепрессивный эффект. Ограниченные клинические исследования у взрослых с неврологическим дефицитом вследствие церебрального инсульта или хронической ишемии головного мозга показали хорошую переносимость растворимых факторов M2 макрофагов и неврологическое улучшение:

- снижение выраженности неврологических расстройств,
- снижения уровня тревоги и депрессии (по Госпитальной шкале тревоги и депрессии HADS);
- улучшение устойчивости и походки (по шкале Фугл-Мейера FMA),
- улучшение когнитивных функций (по Монреальской когнитивной шкале MoCa).

Ограниченные клинические исследования у детей с перинатальной патологией (синдромом задержки речи, в том числе в сочетании с расстройствами аутистического спектра) продемонстрирована безопасность и клиническую эффективность активных компонентов кондиционной среды в виде достоверного возрастания уровня речевого развития (по шкале Л.И. Переслени и Т.А. Фотековой) и социальной адаптации, а также снижения аутистических симптомов (по Рейтинговой шкале детского аутизма CARS).

Модель мышей с ДСС была выбрана по причине ее симптоматического сходства с синдромом большой депрессии человека и синдромом задержки речи, связанным с расстройствами аутистического спектра. Поскольку, как считается, основная причина развития анализируемых нозологий находится в анатомическом отделе мозга гиппокампе, для анализа была взята РНК, выделенная из гиппокампа мышей с ДСС и мышей с ДСС после лечения кондиционной средой M2 макрофагов. Был проведен анализ экспрессии генов на уровне мРНК гиппокампа мышей контрольной и экспериментальной групп.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Часть первая. Доминантно экспрессирующиеся гены

*Краткая характеристика сверхэкспрессирующихся генов. Место белковых продуктов сверхэкспрессирующихся генов в структуре метаболических процессов, отвечающих за возникновение депрессивного состояния*

Отобранные гены были разбиты на 3 группы: сверхэкспрессирующиеся ( $\geq 60$ ) (Приложение 1, табл. 1), сильно экспрессирующиеся (20–60) и умеренно (4–20) экспрессирующиеся гены (Приложение 1, табл. 2). После этого были выделены метаболические пути, в которых принимают участие гены, РНК которых сверхэкспрессируется в гиппокампе мышей после лечения кондиционной средой M2 макрофагов. Эти гены маркируют сигнальные системы, на которые воздействуют факторы, присутствующие в кондиционной среде. В целом в работе была предпринята попытка ответить на три главных вопроса: 1) какие факторы кондиционной среды M2 макрофагов, участвуя 2) в каких механизмах клеточных процессов ЦНС могут

индуцировать 3) какие события, в результате которых происходит восстановление когнитивных способностей у мышей с ДСС?

Существуют выраженные системы головного мозга, изменения в функционировании которых, согласно совокупности экспериментальных наблюдений, могут являться причиной нарушения взаимодействия нейронов и возникновения депрессивного состояния. Гены, активированные или выключенные в рамках этих систем, являются молекулярными маркерами состояния этих систем. Анализ экспрессии этих генов может указать на клиническое направление развития синдрома.

В группу сверхэкспрессирующихся генов, экспрессия которых была детектирована в результате анализа прочтений тотального секвенирования РНК, выделенной из гиппокампа, вошли гены: *Slc4a5* +201; *Shox2* +122; *Adora2a* +114; *Ttr* +99; *Cd4* +92; *Abhd12b* +78; *Sh3rf2* +72; *Gm5741* +66; *Tmem72* +66 (Приложение 1, табл. 1).

Как было сказано выше, сверхэкспрессирующиеся гены являются принципиальным маркером активности сигнальных систем, на которые воздействуют факторы, присутствующие в кондиционной среде М2. Три наиболее сильно экспрессирующихся гена, *Slc4a5*, *Shox2*, *Tmem*, связаны с клеточным метаболизмом и манифестируют предельную степень синтетической активности в клетке. Другие четыре сверхэкспрессирующихся гена принадлежат к метаболическим путям аденозина (*Adora2A*), каннабиноидов (*Adhd12*), сигнальной G-белок системе «вторичного посредника» цАМФ-Pr (*Gm*) и системе метаболизма ретинола и транспорта тиреоидного гормона (*Ttr*). *Adora2A*, *Adhd12* и *Gm* были проанализированы в разрезе их участия в процессах, оркестрирующих пути к которым они принадлежат, и в первую очередь в рамках глутаматергической системы. Активная экспрессия маркера CD4, как предполагается, в большей степени отражает состояние микроглии и оценивалась в рамках процессов, протекающих в ней. Так же была оценена возможная связь этого маркера с противовоспалительными клетками микроглии несущими маркеры CD3–CD4+CD11+CD45intermedium/low.

Для более полного представления места этих генов в структуре указанных метаболических процессов были проанализированы детали функционирования сигнальных путей глутамата и каннабиноидов, системы «вторичного посредника» цАМФ и микроглии, как сообщества клеток, определяющего воспалительные процессы.

### ***Общая характеристика метаболических систем глутамата и каннабиноидов и сопряженного с ними G-цАМФ механизма. Характеристика микроглии как основного источника воспаления в головном мозге***

Нарушения синаптической передачи нейронов гиппокампа являются, по-видимому, основным фактором различных патологических синдромов и, депрессий в частности. Предположительно, гиппокамп выделяет и удерживает в потоке внешних стимулов важную информацию социально значимого характера, выполняет функцию кратковременной памяти, и функцию последующего ее перевода в долговременную. Совокупность входящих сигналов влияет на генерацию потенциала действия принимающими пирамидальными нейронами гиппокампа. Предполагается, что развитие депрессивно-подобного поведения (в частности у мышей) происходит в результате нарушения механизма синаптической пластичности нейронов гиппокампа, то есть возможности изменения силы синапса (величины изменения трансмембранного потенциала клетки-мишени в ответ на воздействие определенной силы на пресинаптический нейрон). В первую очередь этот процесс связан с доминированием тормозного синаптического механизма. Ингибиторные синапсы на входе постсинаптического нейрона, содержат ГАМК-рецепторы и используют тормозной нейромедиатор ГАМК. Их активация вызывает тормозной постсинаптический потенциал (IPSP, гиперполяризация клетки-мишени). Возбудительные синапсы



содержат NMDA-рецепторы и AMPA-рецепторы, реагирующие на глутамат, и при активации вызывают возбуждающий постсинаптический потенциал (EPSP, деполяризация клетки мишени). IPSP снижают вероятность «срабатывания» пирамидальной клетки, EPSP, увеличивают эту вероятность. Также известно, что активирование или ингибирование дофаминергических нейронов разнонаправленно действует на поляризацию нейрона и может индуцировать как тормозной, так и возбуждающий постсинаптический потенциал [23, 24].

Активация рецепторов может быть представлена в виде следующей механистической схемы. С рецепторами соединены каналы в полупроницаемой постсинаптической мембране, которые контролируют движение ионов через мембрану. В покое нейрон обладает электрическим потенциалом в 70 милливольт (потенциал покоя), при этом внутренняя сторона мембраны заряжена отрицательно по отношению к наружной. Медиаторы взаимодействуют с рецептором, что приводит к изменению потока ионов через мембрану. Хотя существуют различные медиаторы, все они оказывают на постсинаптический нейрон либо возбуждающее, либо тормозное действие. Возбуждающее влияние реализуется через усиление потока определенных ионов, главным образом натрия и калия, через мембрану. В результате отрицательный заряд внутренней поверхности уменьшается и происходит деполяризация. Тормозное влияние осуществляется в основном через изменение потока хлоридов, в результате отрицательный заряд внутренней поверхности становится больше, чем в покое, и происходит гиперполяризация. Как правило активация нейронов зависит от G-белок-цАМФ сигнальной системы, с которой функционально связаны трансмиттерные рецепторы [25].

Можно следующим образом охарактеризовать процессы, которые приводят к разбалансировке трансмиттерных систем гиппокампа и возникновению когнитивных патологий.

Исследования показывают, что длительное потенцирование возбуждающей синаптической передачи сопровождается длительной депрессией ингибирующего синапса в пирамидных нейронах CA1 гиппокампа. Установлено, что этот процесс запускается после активации постсинаптических, NMDA-рецепторов, группы I, метаботропных глутаматных рецепторов (mGluR), повышенной и длительной секрецией глутамата и одновременного роста внутриклеточного  $Ca^{++}$  и регулируется канобиноидной системой [25–27].

Гиперактивация ионотропных рецепторов глутамата, непрерывно секретлируемым глутаматом, приводит к резкому возрастанию трансмембранного кальциевого тока внутрь клетки с последующим высвобождением  $Ca^{++}$  из внутриклеточных депо, деполяризацией цитоплазматической мембраны нейрона и, как следствие, длительным повышением количества  $Ca^{++}$  в цитоплазме. Высокое содержание  $Ca^{++}$  в нейронах запускает нейротоксические процессы, связанные с активацией протеолитических ферментов и разрушением клеточных структур, что в конечном итоге приводит к усилению синтеза оксида азота, активации перекисного окисления липидов и, как следствие, к окислительному стрессу, нарушению синтеза нейротрофических факторов, а также к апоптозу нейронов. Этот эффект носит название глутаматная эксайтотоксичность. При этом нужно помнить, что апоптоз индуцирует выброс в окружающую среду молекул АТФ [28, 29].

Известен еще один механизм, индуцирующий нейродеструктивные процессы зависящий от секреции глутамата и связанный с гипофункцией NMDA-системы. Глутаматергическая система оказывает тормозящее влияние на дофаминергическую систему (секреция глутамата сдерживает выброс дофамина). В свою очередь, дофаминергическая система оказывает влияние на активность глутаматергической системы. Эти нейротрансмиттерные системы с помощью сложных механизмов

взаимодействуют между собой, обеспечивая при этом оптимальное функционирование нейрональных сетей. Сбой в глутаматергической системе, например, вследствие регулярного приема каннабиса и блокирования CB1 и 2, искажает взаимодействие других систем нейромедиаторов, в частности, проявляется синдромом гиперактивности дофаминергической системы, который характеризуется продуктивной психотической симптоматикой. Гиперактивность дофаминергической системы (длительный выброс дофамина) способна на протяжении длительного времени вызывать гипофункцию NMDA-системы и ухудшать трансмиссию (акцепцию постсинаптическим нейроном) глутамата. В этом случае непрерывное усиление активности глутаматергической системы (например, за счет связывания аденозина ADORA2A рецептором) и отсутствия компенсаторного механизма активности NMDA-системы, приведет к снижению синтеза постсинаптических протеинов, тем самым снизит жизнеспособность нейронов. При этом нейроны не погибают, а входят в обратимую анаргию. Этот эффект, как предполагается, определяет развитие синдромов различных депрессий [30]. Это означает, что разбалансировка метаболизма аденозина, как основной триггерной молекулы запускающей секрецию глутамата через аденозин-связывающие рецепторы (например, ADORA2A, ген *Adora2A* +114) будет приводить или к депрессии, связанной с длительным потенцированием возбуждения (гиперфункция NMDA-системы), или к депрессии, связанной с отсутствием активации транзиттерных сигнальных систем (гипофункция NMDA-системы) при нарушении секреции глутамата при дефиците аденозина и избытке АТФ. При этом избыток АТФ будет усиливать воспаление микроглии, что усугубит способность микроглиальных макрофагов синтезировать экто 5 нуклеотидгидролазу, и что приведет к акселеративному усилению деструктивного процесса [31, 32]. Также это означает, что действие факторов каннабиноидной системы (например, ADHD12b, ген *Adhd12b* +78), может изменить сложившуюся разбалансировку активирующего влияния глутамата, что будет способствовать восстановлению нейронных связей и купированию депрессивного синдрома.

Обе системы функционируют при возникновении контакта лиганд/рецептор и передаче инициирующего импульса системе «вторичного посредника» G-белок–цАМФ (например, GM, ген *Gm5741* +66). В результате активируется механизм фосфорилирования многочисленных активных молекул, что сопровождается активацией разнообразных генных платформ (например, с участием SHOX2, ген *Shox2* +122, регулятора транскрипции) и запуску специфических клеточных ответов.

Обще принято, что активность всех метаболических процессов определяется энергетическим потенциалом клетки и в первую очередь активностью митохондрий. При этом известно, что развитие психических нарушений, таких как депрессия, биполярное расстройство, связано с дефектами митохондрий. В этой связи высокая активность трансмембранных плазматических и митохондриальных переносчиков ионов (например, генов семейства *Slc4a5* +201 или *Tmem72* +66) [33], отражает высокий энергетический обмен в гиппокампе и, в частности, в постсинаптических нейронах.

И наконец, микроглия определяет процесс воспаления. Изменения в этой клеточной системе, связанные с воспалительным процессом, сопряжены с разбалансировкой транзиттерных сигнальных векторов, нарушением плотных контактов эндотелия капилляров мозга, изменением метаболизма в астроглии и олигодендроцитах. Высокая экспрессия *Cd4* +92 может свидетельствовать о появлении *Cd4* субпопуляции клеток микроглии с активированным (CD45intermedium) или покоящимся фенотипом (CD45low) активных на этапах восстановления и после восстановления церебрального воспаления (экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита [34]).

Для более полного представления места сверхэксперсирующихся генов и сопряженных с ними умеренно эксперсирующихся генов, в структуре метаболических процессов, отвечающих за возникновение депрессивного состояния, были

проанализированы детали функционирования сигнальных систем глутамата, каннабиноидов, а также микроглии, как сообщества клеток, определяющего воспалительные процессы.

### **Глутаматергическая система**

Глутамат является основным медиатором, регулирующим и активирующим процессы возбуждения у млекопитающих; регулирует пластичность синапсов, рост и развитие нейронов, принимает участие в процессах запоминания, обучения и регуляции движений [35–37]. Синтез глутамата осуществляется ферментом глутаминазой. Большая часть глутамата, высвобождаемая нейронами, захватывается глиальными клетками и превращается здесь в глутамин, который затем вновь возвращается в нейроны, превращаясь в глутамат. Рецепторы, чувствительные к глутамату, делятся на два типа: ионотропные (быстро действующие NMDA, PCP, AMPA) и метаботропные (замедленного действия рецепторы I–III группы).

Одним из основных рецепторов глутамата, представляющий центральный компонент глутаматергической системы, считается NMDA-рецептор. С функцией этого рецептора связаны: усиление синаптической передачи между двумя нейронами, сохраняющееся на протяжении длительного периода времени после воздействия на синапс возбуждение (долговременная потенция) в гиппокампе, способность воспринимать повреждающие действия через ноцицепторы (ноцицепция, формирование электрической активности головного мозга в виде острых волн или пиков), а также эксайтотоксические эффекты глутамата [38].

Структурно NMDA-рецептор представляет собой гетеротетрамер двух субъединиц – NR1 и NR2. В неактивированной форме канал рецептора закрыт ионом магния. Ион магния удаляется при деполяризации постсинаптической мембраны, на которой находится рецептор. Одновременно с этим для функционирования рецептора должен поступить в синаптическую щель глутамат. Такая активация рецептора вызывает открытие ионного канала, селективного к катионам, что ведёт к притоку в клетку  $\text{Na}^+$  и в небольшом количестве  $\text{Ca}^{++}$ , а  $\text{K}^+$  покидает клетку. Ионы кальция, вошедшие через канал, активируют протеинкиназу CaMK-II. Происходит ее аутофосфорилирование и фосфорилирование ряда белков нейрона-реципиента. Этот процесс играет ключевую роль в синаптической пластичности, а, следовательно, и в процессах обучения и памяти [39].

Проведенный анализ свидетельствует, что сбой в глутаматергической системе приводит к возникновению глутаматной эксайтотоксичности и развитию депрессивного синдрома.

### **ADORA2A – базовый фактор, модулирующий секрецию глутамата**

Нейроны и глия участвуют в образовании аденозина. Биологическая активность аденозина проявляется через его связь с аденозиновыми рецепторами. Одним из основных рецепторов, активируемых аденозином, является аденозиновый рецептор ADORA2A, ген *Adora2A* +114 [21]. Этот рецептор при активации лигандом, индуцирует высвобождение глутамата из пресинаптических нейронов. ADORA2A, ассоциирован с G-белком и в большом количестве экспрессируется на различных типах клеток: нейронах, как пред-, так и постсинаптических, микроглии, астроглии, дендроцитах, клетках эндотелия мозговых капилляров. Рецептор вовлечен в контроль нейротрансмиттерных процессов (регулирует возбудимость нейронов, высвобождение и захват нейромедиаторов, изменение синаптической пластичности) в тесном контакте с дофаминовыми рецепторами ГАМК-эргических нейронов и каннабиноидной системой гиппокампа [18, 20, 21]. В случае воспаления экспрессия рецептора повышается и, как было отмечено, может рассматриваться как компенсаторная мера,

которая определяется нехваткой свободного аденозина вследствие нарушения синтеза молекул эктогидролаз воспаленными макрофагами микроглии, общего падения метаболизма АТФ и необходимости утилизации возможно доступного свободного аденозина для функционирования клеток.

Дисбаланс в аденозиновой системе может возникнуть в результате нескольких обстоятельств: недостаток/избыток свободного аденозина или недостаток/избыток функциональности аденозин связывающих рецепторов. Предшествующие процессы являются триггерами дисбаланса, а последующие процессы – результатом дисбаланса, и в общей структуре обстоятельств индуцируют депрессивный синдром [21].

Как было сказано, гиперактивность глутаматергической системы и постоянный избыток в синаптической щели глутамата являются предшественником и манифестатором патологических проявлений, связанных с дисфункцией мозга. А повышение экспрессии факторов, стимулирующих гиперактивность глутаматергической системы, является показателем идущего патологического процесса. У мышей с ДСС после лечения кондиционной средой M2 макрофагов, достоверно детектируется сверхвысокий уровень синтеза мРНК *Adora2A*, основного рецептора аденозина, отвечающего за секрецию глутамата. И, как следует из проведенного анализа, должно было наблюдаться сохранение основного симптома. Однако, лечение сопровождалось стойким восстановлением когнитивных функций и полным купированием синдрома ДСС. В этой связи был более подробно проанализирован паттерн генов, которые могли бы компенсировать активность глутаматергических пресинаптических нейронов и утилизировать избыток глутамата. В первую очередь, это было отнесено к ионотропным рецепторам глутамата, рецепторам-определяющим поток ионов через синаптическую мембрану, других факторов, свидетельствующих о стремительном повышении и поддержании возбуждения глутаматергической системы. При этом, как предполагается, если все элементы системы одновременно повысили свою активность, то произойдет не разрушение функции, а смена направления дегенеративных реакций и повышенной инертности, проявляющейся в замедленности когнитивных процессов (брадифрения) в сторону активации когнитивных функций, что было отмечено в группе мышей с ДСС после лечения кондиционной средой M2 макрофагов.

Оказалось, что помимо *Adora2A* значительно повышен уровень экспрессии генов рецепторов глутамата и других систем генов, компенсирующих высокую экспрессию главного активатора секреции глутамата. Такая гармоничная активация глутаматергической трансмиссивной системы отменяет патологически активный тормозной трансмиссивный вектор и потенцирует возбуждение, восстанавливая когнитивный баланс.

*Гены, принадлежащие к системе метаболизма глутамата. Системы генов, сопряженные с активностью Adora2A. Активность генов, компенсирующая сверхэкспрессию Adora2A*

*Система генов утилизации глутамата.* Появление системы утилизации секретирующегося глутамата является показателем восстановления баланса глутаматергического нейротрансмиссивного пути. Ионотропные рецепторы глутамата и факторы с ними сопряженные. Факторы внутрисинаптической передачи сигнального импульса: *Grid2* +16; *Grid2ip* +16; *Slc17a7* +15; *Syndig11* +10; *CaMK-4* +5; *CaMK2n1* +4; *Cplx3* +13; *Ppp1r1b* +21 (Приложение 1, табл. 3).

Высокая экспрессия ГАМК и дофаминовых рецепторов совместно с высокой экспрессией глутаматных быстрых рецепторов может подразумевать восстановление трансмиссивного баланса. Сопряженные с глутаматергическими рецепторами факторы основных трансмиссивных систем: *Folr1* +39; *Gabrd*, *Gabbr2* +36; *Drd1* +17; *Chrna5* +10;



*Ramp3* +15; *Ppp1r1b* +21; *Colq* +9; *Syndig11* +10; *Robo3* +10; *Meis2* +15; *Musk* +24; *Prr32* +43; *Rtn* группа генов +4-8 (Приложение 1, табл. 4).

*Система генов, формирующих электрохимический потенциал клетки.* Высокая экспрессия группы генов, формирующих электрохимический потенциал нейронов, митохондрий, и их количество однозначно свидетельствуют о существовании высокого электрохимического потенцирования в гиппокампе мышей с ДСС после лечения кондиционной средой M2 макрофагов. Система генов, формирующая электрохимический потенциал нейронов. Гены энергетической систем клетки (митохондрий): *Slc4a5* +201; *Scn4b* +49; *Aqp1* +34; *Kcnh3* +16; *Kcnj13* +16; *Kcne2* +16; *Sln* +15; *Ano2* +15; *Mrv1* +13; *Slc9a4* +12; *Car12* +10; *Chrna5* +10; *Colq* +9; *Trpv* группа генов +4-7; *Tmem* группа генов +5-66; *Cox8b* +12; *Gckr* +16; *Cyp* группа генов +4-6; *TnnT1* +40 (Приложение 1, табл. 5).

#### *Аденилатциклазная мессенджерная система и метаболическая ось DARPP-32-PPP1CA-РКА*

цАМФ сигнальная система. В аденилатциклазной мессенджерной системе задействовано пять хорошо изученных белков: 1) рецептор активатора-лиганда; 2) фермент аденилатциклаза, выполняющая функцию синтеза циклического АМФ (цАМФ); 3) G-белок, осуществляющий связь между аденилатциклазой и рецептором; 4) цАМФ-зависимая протеинкиназа, катализирующая фосфорилирование внутриклеточных ферментов или белков-мишеней, соответственно изменяя их активность; 5) фосфодиэстераза, которая вызывает распад цАМФ и тем самым прекращает (обрывает) действие сигнала (Приложение 1, табл. 6). Связывание гормона, трансмиттера или другой активной молекулы с эргическим рецептором приводит к структурным изменениям внутриклеточного домена рецептора, что в свою очередь обеспечивает взаимодействие рецептора со вторым белком сигнального пути – ГТФ-связывающим. Генная платформа активации (фосфорилирования), опосредуемая активностью сигнальных молекул G-белок-аденилат циклаза (цАМФс), приводящих в движение всю синтетическую машину клетки: *GPR88* +19; *Gm5741*, *Gm* группа генов +4-66; *Adra2b* +14; *Drd1* +17; *Ppp1r1b* +21; *Gpr151* +17; *Gpr88* +19; *Rab* группа генов +6-12; *Chrm* группа генов +4-10; *Endou* +11; *Adra2b* +14; *Cort* +21; *Arpp* группа генов +4-8; *Adc4* +4 (Приложение 1, табл. 6).

Метаболическая ось DARPP-32-PPP1CA-РКА отвечает за ингибирование PPP1CA фосфатазы и протеинкиназы РКА. Регулируемый дофамином и цАМФ, фосфопротеин DARPP-32 при фосфорилировании киназой РКА в положении Thr-34 ингибирует активность фосфатазы PPP1CA, а при фосфорилировании в положении Thr-75 ингибирует собственный активатор РКА. И таким образом этот фосфопротеин может регулировать дофаминовую, глутаматную, серотониновую ось активации нейрона.

Дофаминергические нейроны играют критическую роль в множественных функциях мозга, а аномальная передача сигналов через дофаминергические пути вовлечена в ряд основных неврологических и психических расстройств. Стимуляция дофаминергического и глутаматергического (NMDA) рецепторов регулирует степень фосфорилирования DARPP32, но, как предполагается, в противоположных направлениях [40, 41]. Стимуляция рецептора дофамина D1 через G-белок усиливает образование цАМФ, что приводит к фосфорилированию DARPP32; фосфорилированный DARPP32 является мощным ингибитором протеин-фосфатазы-1 (PPP1CA). Стимуляция NMDA-рецептора повышает внутриклеточный кальций, что приводит к активации кальциневрина и дефосфорилированию фосфо-DARPP32, тем самым снижая ингибирующую фосфатазу-1 активность DARPP32 [42–44].

И таким образом в системе метаболической активности PPP1R1B (DARPP-32) сопряжены два трансмиттерных сигнальных пути – дофаминовый и глутаматный



(Приложение 1, табл. 7). Показано, что РНК обоих типов рецепторов (дофамина и глутамата) и самого PPP1R1B (DARPP-32) находятся в группах сильно и умеренно экспрессирующихся молекул. Система генов метаболической активности PPP1R1B (DARPP-32): *Drd1* +17; *Grid2* +16; *Ppp1r1b* +21 (Приложение 1, табл. 7).

Можно предположить, что в процессе лечения у мышей сформировалось сопряжение двух систем активации/репрессии внутриклеточных механизмов, определяющих интенсивность синтетических клеточных процессов, что оказало положительное влияние на восстановление когнитивных функций экспериментальных животных.

### *Транскрипционные факторы, внутриклеточные модификаторы*

Сверхэкспрессия генов многочисленных транскрипционных факторов и внутриклеточных модификаторов свидетельствует о высокой транскрипционной и белок синтетической активности клетки (Приложение 1, табл. 8, 9). В некоторых случаях при корректировке фосфорилирования факторами, указанными в таблицах, происходит ингибирование активности аденилат циклазы и разрыв фосфорилирования определенного молекулярного каскада. Гены транскрипционных факторов и регуляторов транскрипции: *Otx2* +9; *Emx1* +10; *Nkx3-1* +11; *Msx1* +10; *Epop* +11; *Egr3* +12; *Tbr1* +13; *Shox2* +122; *Neurod* группа генов +4-7; *Erg* группа генов +4-12; *Meis2* +15; *Nr4a* +4 (Приложение 1, табл. 8). Гены общеклеточной синтетической машины: *Mei1* +9; *Serpinb8* +10; *Fap* +10; *Rab37* +12; *Impg1* +13; *Oca2* +13; *Ramp3* +15; *Steap1* +19; *Igfn1* +20; *Serpina9* +22; *Folr1* +39; *Tsf* группа генов +5-66; *Steap* группа генов +4-18; *Gpr* группа генов +5-19; *Ptpm* +8; *Pras* группа генов +5-14; *Perked* группа генов +6-22; *Camk* +5; *Arhgap* группа генов +6-6; *Fam* группа генов +4-6; *Slc52a3* +10; *Aqp1* +33; *Ttr* +99 (Приложение 1, табл. 9).

Среди прочих систем можно отметить гены, обеспечивающие восстановление связей плотных контактов эндотелиоцитов капилляров мозга, и гены, участвующие в формировании каркасной структуры нейрона, и регуляторы процесса ремоделирования комплексов филаментов (Приложение 1, табл. 10, 11). Гены, белковые продукты которых участвуют в восстановлении связей плотных контактов эндотелиоцитов капилляров мозга: *Lrrc10b* +11; *Coll17a1* +13; *Itga5* +13; *Cdh3* +22; *Cldn1, 2* +5; *Krt12* +26; *F5* +30; *Krt* группа генов +5-26; *Itga* группа генов +4-13. Гены, участвующие в формировании каркасной структуры: *Myl1* +11; *Tcap* +11; *Myl* группа генов +7-10; *Tnnt1* +41.

Проведенный анализ предполагает следующую картину компенсаторных процессов, восстанавливающих деструктивные нарушения в глутаматергической системе, которые, как предполагается, и явились причиной развития депрессий. На рисунке 1 показана общая механистическая схема событий, связанных с нарушением баланса АТФ/аденозин в гиппокампе мышей в норме, с ДСС и с ДСС после лечения кондиционной средой М2 макрофагов.

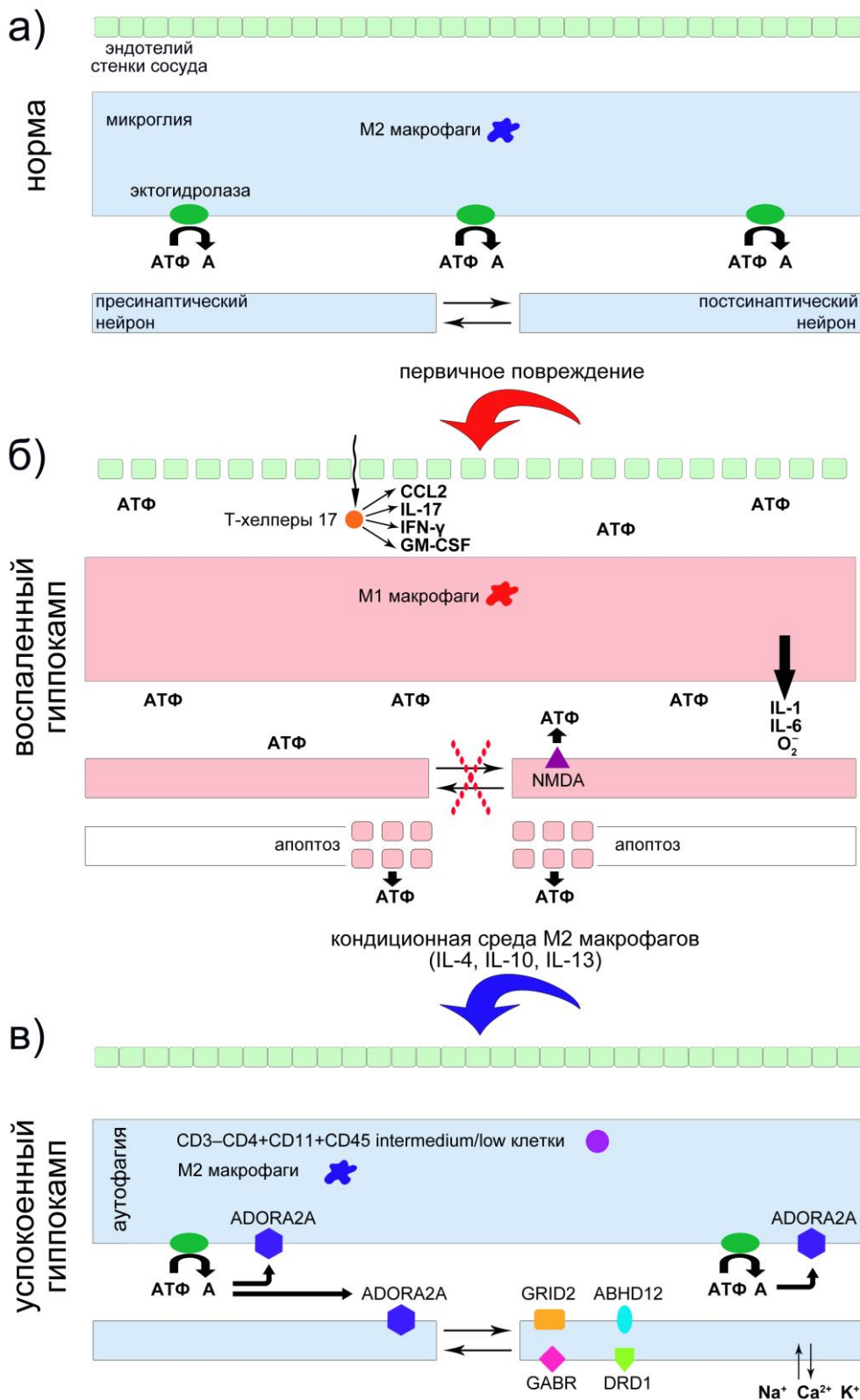
На рисунке 1,а отмечены основные клеточно-тканевые компоненты гиппокампа мыши в норме, а также причинные молекулярные факторы, определяющие сбалансированность процесса метаболизма АТФ. Внеклеточный АТФ относится к молекулам, индуцирующим воспаление, и действует как сигнал опасности, инициируя врожденный иммунный ответ. В свою очередь, продукт распада АТФ, аденозин, ограничивает воспаление, подавляя провоспалительную активность иммунных клеток. Баланс этих факторов в гиппокампе определяет физиологическую норму реакции ЦНС экспериментальных мышей.

На рисунке 1,б показан воспаленный гиппокамп. Одной из основных причин возникновения воспаления в гиппокампе является нарушение метаболизма АТФ, связанного с накоплением трифосфата, который является истинным медиатором воспаления. Концентрация нуклеотидов/нуклеозидов во внеклеточном пространстве поддерживается на низком уровне эктонуклеотидазами и переносчиками аденозина. При

механическом стрессе, повреждении клеток или воспалении макрофаги микроглии приобретают М1 фенотип. М1 микроглия дефектна в гидролизе экстраклеточного АТФ, что связано с нарушением процессов синтеза экто-аденозилтрифосфат-гидролазы. Торможение или полная остановка процесса гидролиза внеклеточного АТФ до аденозина, связанные с поляризацией микроглии в М1 фенотип, становится причиной накопления АТФ и дефицита свободного аденозина во внеклеточной среде. Кроме того, при различных деструктивных процессах количество апоптотизирующих клеток в тканях гиппокампа увеличивается, что сопровождается появлением в межклеточном пространстве дополнительных молекул АТФ. И, наконец, высвобождение экстрамолекул АТФ во внеклеточную среду может быть обусловлено активацией NMDA-рецепторов дендритными отростками нейронов. Развитие акселеративной петли воспаления, где нуклеотид, будучи истинным медиатором воспаления, дополнительно индуцирует секрецию макрофагами провоспалительных цитокинов (IL-1 и IL-6) и супероксидных радикалов, приводит к тому, что воспалительный процесс становится хроническим. Хроническое течение воспаления поддерживается нарушением проницаемости плотных контактов эндотелия мозговых капилляров. Появление межклеточной эндотелиальной щели приводит к экстравазации воспалительных Т-хелперов 17 из периферической крови, что дополнительно потенцирует воспалительный процесс в мозге через секрецию Т-хелперами 17 провоспалительных цитокинов (IL-17, IFN- $\gamma$  и GM-CSF) и хемокина CCL2. Вместе с тем при недостатке аденозина возникают многочисленные нейротоксические патологические процессы в клеточных системах гиппокампа, связанные с разрывом активационной цепи рецептор (например, ADORA2A)/лиганд (аденозин), которые включают ADORA2A глутаматергическую метаболическую систему, каннабиноидную систему сигналинга, активацию клеточного синтеза через G-белок/цАМФ-Pr, энергетический и ионный потенциал клеток. В нейротрансмиттерной системе гиппокампа в результате указанных событий происходит разрушение механизмов синаптической передачи сигналов и разбалансировка основных возбуждающих/тормозящих нейротрансмиттерных векторов. При отсутствии сбалансированности глутаматергических, дофаминергических и ГАМКергических метаболических осей формируется дисбаланс в сторону тормозной реакции, что приводит к развитию ДСС.

На рисунке 1, в изображен успокоенный гиппокамп. Нейродегенеративный ДСС является следствием М1 поляризации микроглии и непрерывно текущим хроническим воспалением. Факторы кондиционной среды М2 макрофагов (IL-4, IL-10, IL-13) супрессируют воспалительный процесс в гиппокампе мышей с ДСС. Происходит М2 реполяризация макрофагов микроглии, что связано с индукцией аутофагии, вызванной активацией системы убиквитинилирования и белковой деградации. В микроглии появляются клетки с фенотипом CD3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CD11<sup>+</sup>CD45<sup>intermedium/low</sup>, несущие противовоспалительные функции. IL-4 одновременно с индукцией М2 поляризации макрофагов активирует синтез и экспонирование на цитоплазматической мембране микроглиальных клеток нуклеотид-гидролаз. Фермент метаболизирует АТФ до аденозина, снижая доступное количество свободных молекул АТФ. Одновременно активно экспрессируется ген основного аденозинового рецептора *Adora2A*, что предполагает появление избыточного количества молекул рецептора. В системе гиппокампа в одно и то же время появляются две метаболические активности, способные быстро утилизировать как внеклеточный АТФ, так и возникший в результате эктогидролиза АТФ аденозин, и восстановить баланс метаболической оси АТФ/аденозин. Свободный аденозин, связываясь с ADORA2A/CB2 тандемом микроглиальных макрофагов, приводит к ослаблению воспаления и дополнительно способствуют М2 поляризации микроглии. На эндотелиальных клетках взаимодействие свободного аденозина с

ADORA2A сопровождается восстановлением непроницаемости плотных контактов и приводит к остановке миграции Т-хелперов 17 через межклеточную щель.



**Рис. 1.** Общая механистическая схема событий, связанных с нарушением баланса АТФ/аденозин в гиппокампе мышей: а) в норме, б) с депрессивным синдромом, вызванным социальным стрессом и в) с депрессивным синдромом, вызванным социальным стрессом, после лечения кондиционной средой M2 макрофагов.

В нейрональной системе гиппокампа происходит восстановление глутаматергического трансмиссерного пути. Индуцируется секреция глутамата из пресинаптических нейронов, а на постсинаптических нейронах экспрессируются ионотропные акцепторы глутамата (GRID2), ГАМК (GABR) и дофаминовые рецепторы (DRD1), активируется система разнонаправленного ионного потока и белкового синтеза, что совместно свидетельствует о восстановлении нейротрансмиссерного баланса. Активируется синаптическая каннабиноидная система (ABHD12). Ее ретроградная активность регулирует секрецию тормозных нейротрансмиссеров, за счет чего создается баланс между количеством выделяемых нейропептидов и их рецепторов на постсинаптических нейронах. Следствием этих процессов является создание равновесия между возбуждающим/тормозящим потенциалами, восстановление разбалансированных когнитивных нейронных связей и, в результате, купирование ДСС.

ГАМК система представлена активным рецептором, экспрессия гена которого, в большей степени, свидетельствует о норме физиологической активности тормозной системы. О том же свидетельствует экспрессия гена дофаминового рецептора. При этом активна секреция глутамата и система акцепции глутамата, что подтверждается высокой экспрессией РНК гена Adora2A, рецептора глутамата и сопряженных с ним генов. Сочетание активной экспрессии Adora2 и глутамат-акцепторной системы генов свидетельствует о ее внутреннем сбалансированном состоянии. В целом, купирование депрессивно-подобного синдрома предполагает восстановление баланса торможение/возбуждение. Этот процесс сопровождается агрессивной активацией разнонаправленных ионных потоков, формирующих условия для передачи активирующего синаптического сигнала. И, наконец, идет масштабное фосфорилирование факторов сигнальных путей, определяющих активный синтез белков, в котором принимает непосредственное участие реорганизация цитоскелета. Такая палитра систем доминантно экспрессирующихся генов свидетельствует о развитии активирующего потенциала возбуждения и нормализации активности сопряженных с глутаматергической системой основных трансмиссерных систем.

### ***Характеристика каннабиноидной системы и ее участие в регуляции нейронных связей***

Каннабиноиды являются факторами нейротрансмиссерной системы нейронов, определяющих их ретроградную активность. Описаны несколько форм эндоканнабиноид-опосредованной синаптической пластичности с участием эндоканнабиноидов в качестве ретроградных мессенджеров. Это подавление ингибирования, индуцированное деполяризацией; подавление возбуждения, вызванное деполяризацией; подавление ингибирования, индуцированного метаботропом; подавление возбуждения, индуцированного метаботропом (MSE) (также известный как синаптически вызванное подавление ингибирования/возбуждения (SSE0/SSI) или эндоканнабиноид-опосредованная краткосрочная депрессия (eCB-STD) и эндоканнабиноид-опосредованная долгосрочная депрессия.

Каннабиноидная система ЦНС представлена двумя наиболее изученными каннабиноидными рецепторами CB1 и CB2 и доминирующими эндоканбиноидами анандамидом и 2-арахиноилглицерин (2-AG).

CB1-рецепторы, располагающиеся на нервных окончаниях, модулируют высвобождение возбуждающих и тормозных медиаторов, усиливая или угнетая, таким образом, передачу соответствующих сигналов (ретроградная активность). Особенно плотно CB1 распределены около синапсов, области контакта двух нейронов. В мозге основным местом локализации CB2 рецепторов являются резидентные макрофаги микроглии. Активность CB2 рецептора, как и CB1, сопряжена с цАМФ-протеинкиназной системой посредством G-белка.

В организме вырабатываются два основных лиганда каннабиноидных рецепторов анандамид (от санскритского слова «ананда» – блаженство) и 2-арахидоноил-глицерол (2-АГ), представляющие собой эндоканнабиноиды.

Анандамид образуется в процессе гидролиза N-арахидонилфосфатидилэтаноламина при участии фосфолипазы D. Анандамид проявляет свойства частичного агониста каннабиноидных рецепторов с аффинитетом преимущественно к CB1-типу. Имеются сведения о том, что анандамид взаимодействует, помимо каннабиноидных, с другими рецепторами. Показан ингибирующий стимулирующий эффект анандамида на синаптическую передачу, регулируемую NMDA-рецепторами. Получены данные о прямом ингибирующем влиянии каннабиноидов на 5-HT<sub>3</sub> рецепторы (блокаторы серотониновых рецепторов). В клетках анандамид, гидролизуется с образованием арахидоновой кислоты и этаноламина посредством гидролазы амида жирных кислот.

2-Арахидоноил-глицерин является лигандом для CB2. Проявляет незначительное сродство к CB1. Биосинтез 2-арахидонил-глицерина (2-АГ) осуществляется при участии того же каскада ферментов, что катализирует образование инозитолтрифосфата и диацилглицерина, DAG. Фосфолипаза C, воздействуя на фосфатидилинозитолбифосфат, способствует образованию DAG, который под влиянием DAG-липазы переходит в 2-АГ. Последний может быть образован также посредством гидролиза лизофосфолипидов или триацилглицеринов. После высвобождения 2-АГ может подвергаться обратному захвату с помощью транспортера анандамида и в последующем – гидролизу.

Оба соединения выполняют функции нейромодулятора и нейромедиатора при взаимодействии с CB1 рецептором. Обычные нейротрансмиттеры – это растворимые в воде вещества, хранящиеся в везикулах в тонких окончаниях аксона (пресинаптических терминалах). Когда нейрон генерирует импульс, посылая по аксону электрический сигнал к пресинаптическим терминалам, нейротрансмиттеры высвобождаются из везикул, диффундируют через узкое межклеточное пространство (синаптическую щель) и взаимодействуют с рецепторами на поверхности нейрона-реципиента (постсинаптического нейрона). Эндоканнабиноиды же представляют собой липиды, которые не накапливаются в синаптических везикулах постсинаптических нейронов, а быстро синтезируются из компонентов клеточной мембраны по мере надобности. При повышении уровня кальция в нейроне или активации определенных рецепторов, сопряженных с G-белком, они высвобождаются наружу из всех частей клеток и связываются с CB1 на пресинаптическом нейроне (преимущественно анандамид), блокируя секрецию нейротрансмиттера, (ретроградная активность нейронов). 2-АГ является агонистом CB2, который доминантно экспрессируется микроглией.

Активация пресинаптических CB1-рецепторов, приводящая к снижению секреции медиатора, отражает фундаментальную роль эндоканнабиноидной системы в регулировании процессов нейромедиации. Агонисты CB1-рецепторов угнетают глутаматергическую передачу, и снижают действие эффекта «долговременной потенциации», рассматриваемый как модель глутамат-зависимой нейрональной пластичности. Предполагается, что снижение выделения медиатора в глутаматергических синапсах вследствие активной секреции каннабиноида из постсинаптического нейрона, может быть основой нейропротекторного действия агонистов CB1-рецепторов.

CB1 сосредоточены на нейронах, высвобождающих гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК) являющуюся главным тормозным нейротрансмиттером головного мозга (под влиянием ГАМК нервные клетки прекращают генерировать электрические импульсы). Снижение эффективности ретроградной функции каннабиноидов в этих нейронах приводит к ингибированию нервного импульса.

Предполагается связь между каннабиноидной и дофаминовой системами. Известно, что в базальных ганглиях и некоторых полях коры головного мозга (относящихся к



ключевым анатомическим структурам контроля локомоции – перемещения в пространстве) содержится высокая плотность СВ1-рецепторов. Такое распределение рецепторов служит анатомическим субстратом для функционального взаимодействия между эндоканнабиноидной системой и восходящими дофаминергическими путями. Известно, что при активации дофаминовых D2-рецепторов усиливается высвобождение анандамида, с высокой тропностью к СВ1. То есть формируется сбалансированная функциональная петля. Таким образом СВ1 и эндогенные каннабиноиды, и в первую очередь анандамид, составляют одну из главенствующих нейромодулирующих систем ЦНС [25–27].

### ***Микроглия как источник воспаления в ЦНС. Механизм сопряжения каннабиноидной системы сигналинга и микроглии***

Существует мнение, что патологическим признаком нейродегенеративных заболеваний является хроническое воспаление. Воспалительный процесс отрицательно модулирует синаптотрансмиттерную систему нейронов. Исследования показали, что за воспалительный процесс в мозге в первую очередь ответственна микроглия. При инфекции, ишемии, инсульте, а также при возбуждении или механических повреждениях в ЦНС активированная микроглия в большом количестве секретирует один из главных медиаторов воспаления IL-1 [45, 46].

В зависимости от активного состояния микроглии представлена двумя типами макрофагов M1 и M2 фенотипа. Нейровоспаление сопутствует начальным стадиям нейродегенеративных заболеваний и может вносить существенный вклад в процессы гибели нейронов. Воспалительная реакция микроглии сопровождается активацией экспрессии генов, связанных с разнообразными неврологическими и психическими заболеваниями: шизофренией, расстройствами аутистического спектра, лобно-височной деменцией. Нарушения в работе микроглии выявляются в случаях рассеянного склероза. Воспалительный процесс запускается M1 макрофагами и сопряжен с выбросом провоспалительных медиаторов, таких как простагландин E, лейкотриены, (ось арахидоновой кислоты), С-реактивный белок, провоспалительные цитокины (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12, IL-23, IFN типа I, CXCL1-3, CXCL-5 и CXCL8-10).

Макрофаги M2 фенотипа участвуют в репарации и секретируют противовоспалительные цитокины, такие как IL-4, IL-10, IL-13. Решающими участниками этого процесса являются ядерный фактор (NF) каппа В, белок-активатор 1 и рецепторы пероксидазы (PPAR) - $\gamma$ , (Pparg +6) которые взаимодействуют друг с другом и определяют фенотип микроглии. Макрофаги M2 характеризуются повышенной активностью Dectin-1, DC-SIGN, рецептора маннозы, рецептора акцептора А, рецептора акцептора В-1, CD163, CCR2, CXCR1 и CXCR2 [47–49].

Как было сказано, СВ2 каннабиноидный рецептор в большом количестве присутствует в микроглии и активируется своим основным лигандом эндоканнабиноидом 2-АГ. Такая активация индуцирует нейропротекторную поляризацию резидентных макрофагов ЦНС [50–52]. Рецептор обнаруживается на других типах иммунокомпетентных клеток. Наибольшее количество мРНК рецептора было обнаружено в селезенке и миндалинах человека. Максимальный уровень СВ2 наблюдался на В-лимфоцитах, НК-клетках, в меньшей степени в моноцитах и полиморфно-ядерных лейкоцитах, Т8- и Т4-лимфоцитах. СВ2 были обнаружены на В-лимфоцитах селезенки и лимфоузлов, Пейеровых бляшек, а также на тучных клетках, где, как предполагается его связывание с лигандом ингибирует выделение гистамина. Активация микроглии через СВ2 рецептор сопровождается усилением миграции макрофагов и лейкоцитов, а активация СВ2 рецептора на спленоцитах через его связь с 2-АГ блокирует пролиферацию этого типа клеток [53–56].

Избыток или недостаток каннабиноидов или их рецепторов в нейрональной системе приводит к разбалансировке передачи нервного импульса и развитию патологических нейродегенеративных процессов. Процессы, определяющие изменение количества свободных и внутриклеточных каннабиноидов и комплекса генов, участвующего в этих процессах, достаточно хорошо охарактеризован [26, 27, 54, 57–59]. Общая схема метаболизма факторов каннабиноидной системы, расположенной на нейронах, выглядит следующим образом. Высвободившийся в синаптическое пространство глутамат стимулирует свои метаболитные и ионотропные рецепторы на постсинаптических нейронах. При высоком уровне  $Ca^{++}$  через контакт с G белком и активацией в связи с этим масштабного фосфорилирования происходит немедленное высвобождение эндоканнабиноидов, что вызывает ретроградную синаптическую депрессию и блокирование секреции нейротрансмиттера [25–27]. При этом известно, что микроглия, независимо от нейронов, экспрессирует как CB2, так и CB1, и продуцирует эндоканнабиноиды 2-АГ и анандамид. Это означает, микроглия как самостоятельная функциональная структура, по-видимому, содержит полностью сформированную систему эндогенных каннабиноидных лигандов и родственных рецепторов [56].

Регуляция количества основных факторов каннабиноидной системы в нейронах и клетках микроглии, а также в межклеточном пространстве отделов головного мозга, является одним из доминирующих процессов, необходимых для нормальной работы всех нейротрансмиттерных систем.

Анализ экспрессии генов гиппокампа мышей с ДСС, полученных в RNAseq, позволят определить основные участки сигнальных процессов, связанных с активностью каннабиноидной сигнальной системы, которые положительно ответили при лечении мышей с ДСС факторами кондиционной среды, полученной от макрофагов M2 фенотипа.

*Abhd12 – базовый фактор, модулирующий количество доминирующего внеклеточного 2-АГ эндоканнабиноида и его сопряжение с генами системы каннабиноидов*

Анализ РНК транскриптов гиппокампа мышей с купированным ДСС выявил факт сверхэкспрессии одного из причинных генов метаболизма каннабиноидной системы – *Abhd12*. Эффективность экспрессии генов, участвующих в метаболизме каннабиноидов, является условием сбалансированного функционирования нейротрансмиттерных сигнальных каскадов и каннабиноидной ретроградной регуляции этого процесса. Анандамид и частично 2-АГ синаптического пространства связывают и активируют рецептор CB1. Анандамид гидролизуется ферментом аминогидролазой жирных кислот (ФААН), и частично происходит окисление циклооксигеназой-2 (ЦОГ-2) с образованием простагландинов. Интернализированный во внутреннее пространство нейрона 2-АГ гидролизуется MAGL (моноацилглицериновой липазой) и ABHD6 (оба фермента цитоплазматической ориентации). Внутриклеточный MAGL превращает моноацилглицеролы в свободную жирную кислоту и глицерин. Под действием фермента фосфолипазы A2 при расщеплении жирной кислоты образуется арахидоновая кислота. Арахидоновая кислота гидролизуется до эйкозаноидов, метаболиты которых являются мощными воспалительными молекулами. Несколько ферментов, а именно циклооксигеназы-1 и -2 (простагландин G/H-синтазы 1 и 2, PTGS1 и PTGS2), 5-липоксигеназа, 15-липоксигеназы-1 и 2 (ALOX15, ALOX15B), 12-липоксигеназа (ALOX12) (промежуточные метаболиты HPETE, HETE), метаболируют арахидоновую кислоту до медиаторов воспаления, воспалительных молекул простагландинов, лейкотриенов [55]. Фосфолипаза PLA 2 активируется связыванием лиганда с рецепторами, включая: 5-HT2 рецепторы, mGLUR1, рецептор bFGF, IFN- $\alpha$  рецептор, рецептор IFN- $\gamma$ . Кроме того, любой агент, увеличивающий внутриклеточный кальций, может вызывать активацию некоторых форм PLA2. Рецепторы, которые активируют

путь синтеза арахидоновой кислоты из диацилглицерина (DAG), включают в себя: рецептор A1, рецептор D2,  $\alpha$ -2 адренергический рецептор, 5-HT1 рецептор. PLA также может быть активирована киназой MAP. Активаторы этого пути включают PDGF и FGF.

ABHD12 является интегральным мембранным ферментом с активным центром, ориентированным во внеклеточные компартменты клетки и гидролизует 2-АГ синаптического пространства. 2-АГ – единственный известный субстрат для ABHD12. Этот факт означает, что ABHD12 является важнейшим фактором, регулирующим внеклеточный уровень 2-АГ и передачу сигналов СВ рецепторам. Активность именно этой гидролазы может определять судьбу нейронного трансмиссерного сигнала [53, 54] и «воспаленное» состояние микроглии [60] (рис. 1).

Баланс между продукцией и инактивацией эндоканнабиноидов определяет степень накопления их в ткани и активацию соответствующего каннабиноидного рецептора. Соединения, ингибирующие FAAH или MAGL, приводят к накоплению анандамида или 2-АГ и частичной или полной активации каннабиноидных рецепторов соответственно. И таким образом, если сигнальный каскад метаболизма каннабиноидов нарушен, то могут развиваться воспалительные процессы или нарушится глутаматергическая синаптическая передача импульса [53, 54, 61, 62]. И, таким образом, сверхэкспрессия гена гидролазы *Abhd12* и синтез этого мембранного белка, утилизирующего 2-АГ в околосинаптической среде и синаптическом пространстве нейронов, будет приводить к прогрессивному снижению количества молекул лиганда в синаптической щели и околосинаптическом нейронном пространстве. За счет этого снижается давление на пресинаптические и микроглиальные СВ рецепторы. При этом анандамид получает преимущество и активирует пресинаптические СВ1. При снятии гиперактивации сразу двумя лигандами происходит снижение интенсивности высвобождения нейротрансмиттеров из пресинаптических нейронов и в зависимости от направления потенциала нейрона происходит регулировка оси возбуждение / торможение. Это означает, что активированная каннабиноидная система способствует регуляции секреции трансмиссеров разнонаправленного действия и способствует нормализации синаптических связей.

Сверхэкспрессия гена гидролазы *Abhd12* и синтез этого мембранного белка, утилизирующего 2-АГ в микроглии, так же, как и в случае с нейрональной системой, будет приводить к прогрессивному снижению концентрации лиганда в околосинаптическом пространстве глиальных макрофагов. Также за счет этого снижения будет ослабевать давление на СВ рецепторы, и в первую очередь, СВ2 микроглии. Снижение активности СВ2 сигнала в микроглии за счет утилизации 2-АГ гидролазой ABHD12 будет приводить усилению воспалительной реакции, связанной с секрецией гистамина, а также сопровождаться снижением миграционной способности иммунных клеток микроглии [26, 27, 54, 55, 57–59, 63]. Эти изменения в целом противоречат результатам положительных клинических изменений у мышей с ДСС после лечения кондиционной средой M2 макрофагов. В этой связи необходимо отметить, что в эксперимент была взята вся масса гиппокампа, без деления на клеточные сообщества. Это означает, что экспрессию генов гиппокампа, полученную при анализе, необходимо оценивать с позиции двух клеточных структур, нейронов и микроглии. Анализ с позиции простого объединения эффектов, к которым может приводить сверхэкспрессия генов активных факторов, будет искажать реальную картину происходящих событий.

Предполагаемым компенсаторным механизмом воспалительных реакций, определяемых сверхэкспрессией гена гидролазы *Abhd12*, может быть активность рецептора ADORA2A, ген которого также сверхэкспрессируется в гиппокампе.

Результаты, полученные в работах в последнее время, свидетельствуют о важном потенциале микроглиальных аденозиновых рецепторов в нейропротекции, поскольку они ослабляют воспаление и способствуют поляризации M2 [2, 60]. Более того,

установлено, что аденозиновый рецептор A2A находится в физическом контакте с каннабиноидным рецептором CB2. Известно, что активация каннабиноидной системы макрофагов микроглии супрессирует воспалительные процессы, индуцируемые провоспалительным цитокином TNF $\alpha$ , и блокирует активность NF- $\kappa$ B. При этом антагонистическое блокирование активности ADORA2A рецептора восстанавливает течение воспалительного процесса. То есть активность каннабиноидной системы в синергизме с активностью Adora2A метаболического сигнального каскада блокирует развитие воспалительного процесса [60].

#### *Доминантно экспрессирующиеся гены, относящиеся к каннабиноидной системе*

В данном разделе следует отметить, что рецепторы каннабиноидов CB1 и CB2 осуществляют свою активность через G-белок-цАМФ-РК модулирующую систему. Это означает, что все гены этой группы, учтенные в разделе анализа экспрессии генов, сопряженных с активностью *Adora2A*, также относятся и к настоящему разделу. Так же система транскрипционных факторов, группа генов характеризующая энергетический потенциал и гены общеклеточного метаболизма должны рассматриваться в применении к любой искусственно выделенной, для удобства анализа, функциональной системе гиппокампа (как в данном случае каннабиноидной системе). Гены каннабиноидной метаболической системы: *Enpp2* +9; *Prkcd* +22; *Abhd12* +122; *Alox* группа генов +4-7; *Htr* группа генов +4-7; *Inf2* +7; *Plb1* +6; *Ptgs* +4 (Приложение 1, табл. 12).

Проведенный анализ доминантно экспрессирующихся генов свидетельствует, что основными мишенями воздействия факторов кондиционной среды M2 макрофагов являются две фундаментальных метаболических системы гиппокампа: система оборота аденозина и каннабиноидная система.

#### ***Факторы поляризации. Характеристика иммунных свойств микроглии***

Как было отмечено выше, патологическим признаком нейродегенеративных заболеваний является хроническое воспаление, при этом за воспалительный процесс в мозге в первую очередь ответственна микроглия в которой в большом количестве секретирует гистамин и один из главных медиаторов воспаления IL-1 [45, 46]. Проведенные исследования по фенотипированию мышей с ДСС свидетельствуют, что факторы кондиционной среды M2 макрофагов супрессируют воспалительный процесс в ЦНС мышей с ДСС, что сопровождается восстановлением баланса возбуждение/торможение и купированием дегенеративных симптомов. Считается, что такое действие связано со сменой провоспалительной активности микроглии на противовоспалительную (M2 поляризация). Дизайн исследования предполагал, что изменения в экспрессии определенных генов и групп генов произошедшие в результате проведенного лечения позволят ответить на вопрос связаны ли процессы восстановления когнитивных способностей с M2 поляризацией микроглии.

Анализ экспрессии генов, проведенный в первых разделах работы показал, что две метаболических системы ЦНС, а именно, глутаматэргическая и каннабиноидная, в первую очередь ответственны за положительные изменения в поведении мышей с ДСС после лечения кондиционной средой M2 макрофагов.

Следующим принципиальным вопросом исследования был вопрос, через какой механизм происходит смена провоспалительной активности микроглии на противовоспалительную (M2 фенотип), и какие метаболические пути после такой трансформации определяют восстановление баланса глутамата и системы каннабиноидного сенсинга, обеспечивая восстановление когнитивной функции больных мышей.

Для понимания механизмов, индуцирующих поляризацию микроглии к M2 фенотипу необходимо было определить основные активные компоненты кондиционной среды.



Для этого был проведен Plex анализ растворимых компонентов супернатанта М2. Ниже приводится список факторов, находящихся в кондиционной среде, полученной в результате культивирования макрофагов М2 фенотипа: NGF; BDNF; CCL2; CCL3; CCL4; CCL5; CCL7; CCL11; CXCL1; CXCL8; CXCL9; CXCL10; CXCL12; CSF1; CSF2; CSF3; IL1A; IL2; IL3; IL4; IL5; IL6; IL7; IL9; IL10; IL12; IL13; IL15; IL16; IL17A; IL18; EPO; IFNA2; IFNG; LIF; MIF; TNF; TNFSF10; LTA; KITLG; EGF; FGF2; FGF3; VEGFA; HGF; IGFbp2; IGFbp4; IGFbp6; IGFn1; PDGF (Приложение 2, табл. 1, 2).

Оказалось, что гены некоторых цитокинов присутствующих в кондиционной среде и рецепторов к ним начинают транскрибироваться в гиппокампе в ответ на обработку той же самой средой. Это факторы: NGF +5; BDNF +5; IL1A +4; KITLG +5; FGF3 +16; IGFbp2 +7; IGFbp4 +4; IGFbp6 +5; IGFn1 +19 и рецепторы: NTRK1 +6; ACKR2 +8; IL17RA +12; TNFRSF25 +5.

Анализ исследований последних лет предполагает, что основными претендентами на роль активаторов поляризации микроглии являются содержащиеся в кондиционной среде М2 макрофагов IL-4, IL-10 и IL-13. Установлено, что IL-4 и IL-13 индуцируют аутофагию в воспаленной микроглии, поляризуют макрофаги в М2 фенотип и снижают воспаление [49, 64–68]. В этом процессе задействованы системы белковой деградации, и в первую очередь системы убиквитинилирования белков [69]. Основным действующим фактором системы убиквитинилирования является убиквитин-протеин-лигаза E3 (*Sh3rf2* +72). Дополнительно можно сказать, что с этой осью активации связаны координирующие метаболический процесс кофакторы: (*Asb11* +18), кофактор комплекса E3 который ингибирует активность фосфатазы PPP1CA. Фактор (*Tmem* +66) доминантно присутствующий на мембранах аппарата Гольджи, лизосом, митохондрий. Гены, участвующие в убиквитинизации и имеющие отношение к аутофагии: *Asb11* +18; *Ecrq4* +17; *Tmem72* +66; *Sh3rf2* +72 (Приложение 1, табл. 13).

Кроме того, оказалось, что IL-4 также усиливает пролиферацию стволовых прогениторов. Гены стволовости активированные в гиппокампе в результате обработки кондиционной средой М2 макрофагов: *Sostdc1* +11; *Fgf3* +16; *Wnt* группа генов +4-6. (Приложение 1, табл. 14).

При воспалительной патологии метаболизм системы утилизации АТФ нарушен. Избыток трифосфата в околочелочной среде поддерживает индуцированное воспаление [2, 15]. Установлено, что IL-4 одновременно с индукцией М2 поляризации микроглии индуцирует синтез и экспонирование на цитоплазматической мембране нуклеотид гидролаз (ecto-nucleotidase CD73, CD39) [70]. Фермент превращает АТФ в АДФ, затем в АМФ и аденозин, снижая доступное количество свободных молекул АТФ. Гены, относящиеся к системе метаболизма АТФ/аденозин активированные в гиппокампе в результате обработки кондиционной средой М2 макрофагов: *Muh3* +10; *Atp6ap11* +10; *Oas2* +12; *Arl4d* +7; *Abcc12* +7; АК группа генов +5 (Приложение 1, табл. 15).

Одновременно при обработке мышей кондиционной средой М2 макрофагов происходит активная экспрессия гена основного аденозинового рецептора Adora2A, что предполагает появления избыточного количества молекул рецептора. Этот факт означает, что одновременно появляются две метаболические активности, способные быстро утилизировать как внеклеточный АТФ, так и возникший в результате эктогидролиза АТФ аденозин, и восстановить баланс АТФ/аденозин. Одновременно происходит восстановление глутаматергического трансмиссерного пути по механизму, описанному в соответствующем разделе.

Необходимо остановиться на высоком уровне экспрессии гена *Cd4* +92. Интегральный мембранный гликопротеин. Корцептор, взаимодействует одновременно с Т-клеточным рецептором (TCR) и МНС класса II, представленными антигенпрезентирующими клетками. Экспрессируется на Т-лимфоцитах, В-клетках, макрофагах и гранулоцитах некоторых отделов мозга. Проведенный анализ возможного



отношения высокой экспрессии данного гена к одной из субпопуляций Т4 лимфоцитов не выявил известных маркёров, характерных для Т лимфоцитов, как поверхностной локализации, так и транскрипционных факторов [19, 71, 72]. Было найдено несколько умеренно экспрессирующихся генов, которые могли бы свидетельствовать о репрограммировании Т4-17 лейкоцитов в регуляторный подтип (*Foxp1* +5, *Foxg1* +6, *Nr4a3* +4) [19, 73]. Тем не менее все три фактора могут экспрессироваться самими нейронами [74–76]. С большей долей вероятности можно считать, что экспрессия CD4 фактора опосредована активированными противовоспалительными клетками микроглии, несущими маркеры CD3–CD4+CD11+CD45intermedium/low (рис. 1,в). Показано, что именно субпопуляция клеток микроглии с активированным (CD45intermedium) или покоящимся фенотипом (CD45low) на этапах восстановления и после восстановления индуцированной ЕАЕ (экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, являются CD4+ [34]. Гены, предположительно относящиеся к метаболическим путям иммунных клеток микроглии активированные в гиппокампе в результате обработки кондиционной средой М2 макрофагов: *Il17re* +12; *Prss16* +15; *H2-Ob* +15; *Col* группа генов +6-9; *Foxp1* +5; *Foxg1* +5; *Nr4a3* +4; *Cd4* +92 (Приложение 1, табл. 16).

Именно такой сценарий наиболее реально отражает начальный механизм коррекции разрушенных когнитивных связей у мышей с ДСС.

Анализ транскриптома показал, что в целом ткань гиппокампа восприимчива к основной массе факторов, содержащихся в кондиционной среде М2 макрофагов, что означает, что данные факторы свободно достигают и проникают в гиппокамп.

К определенному числу факторов среды обнаружена повышенная экспрессия соответствующих рецепторов (NGF BDNF-NGFR-NTRK1, NTRK2 (+6); CXCL12-ACKR3 (+8); IL17RC-IL17RA (+12); IL16-CD4 (+92); TNFSF10-TNFRSF10B (+5); KITLG-KIT (+5); IGF1-IGF1R (+[4-19])). Для других факторов многочисленными исследованиями также показано детектируемое влияние на микроглию гиппокампа [49, 64–68]. Кроме того, в ответ на обработку кондиционной средой М2 макрофагов сам гиппокамп начинает экспрессировать гены определенных иммунных факторов (Приложение 2, табл. 1, 2).

Одним из возможных подтверждений того, что факторы из кондиционной среды достигают гиппокампа и активируют соответствующие рецепторы, может служить тот факт, что экспрессия различных рецепторов и многочисленных активных молекул, полученных в исследовании, характерна именно для гиппокампа. И более того, с позиции здравого смысла укладывается в общую парадигму воздействия на нейродегенеративные патологии.

### ***Общая схема взаимодействия доминантно экспрессирующихся генов, участвующих в коррекции метаболизма глутамата***

Для анализа необходимо разделить две обособленные морфологически, но функционально связанные системы, нейротрансмиттерную и микроглию. Только при такой оценке событий можно обнаружить вероятные причины, возникающих депрессивных синдромов.

### ***Разбалансированность процессов***

При развитии синдрома доминирует следующая ситуация. В начале событий при кратковременной воспалительной реакции может сформироваться необратимая самоподдерживающаяся петля хронического воспалительного процесса. В этом случае микроглия будет выделять провоспалительные факторы. Апоптотирующие клетки различных типов будут источником свободного АТФ в межклеточной среде. Также возбужденные постсинаптические нейроны будут секретировать в околочлеточную

среду свободный АТФ. Воспаленная микроглия содержит пониженную активность эктогидролаз и свободный АТФ в качестве дополнительного медиатора воспаления становится еще одним фактором, поддерживающим воспалительный процесс.

В нейротрансмиттерной системе при отсутствии сбалансированности глутаматергических, дофаминергических и ГАМКергических метаболических векторов, формируется дисбаланс в сторону тормозной реакции. Именно этот фактор является основополагающим в развитии ДСС мышечей (рис. 1,б).

*Общее начало процесса восстановления происходит через микроглию*

При интраназальном введении мышам кондиционной среды M2 макрофагов происходит активация структур гиппокампа. IL-4 и IL13 кондиционной среды M2 макрофагов поляризуют воспаленную M1 микроглию, формируя микроглию с активированным (CD45<sup>intermedium</sup>) или покоящимся (CD45<sup>low</sup>) M2 фенотипом [2, 49]. Поляризация происходит через индуцированную аутофагию в активированной M1 микроглии [49]. На мембранах микроглиальных макрофагов активируются экто-5-аденозингидролазы. Немедленно осуществляется гидролиз избытка воспалительного внеклеточного АТФ до аденозина. Появляется свободный аденозин в достаточном количестве [2]. Снижается влияние воспалительного АТФ стимула на микроглию, что укрепляет действие IL-4, IL13. Активируется экспрессия CD4 на микроглии, как показатель восстановления воспалительного раздражения [34]. Возможно, одновременно происходит репрограммирование T4-17 лимфоцитов в подтип регуляторных клеток [19]. Микроглия успокаивается (рис. 1,в).

*События, связанные со сверхэкспрессией определенных генов гиппокампа и восстановлением баланса АТФ/аденозин*

Сверхэкспрессируется ген и, по-видимому, появляется большое количество рецептора ADORA2A как в нейронной системе, так и в микроглии. Рецептор активируется свободным аденозином.

В микроглии свободный аденозин связывается с ADORA2A, который на макрофагах расположен в непосредственном контакте с CB2. Синергичное действие тандема приводит к ослаблению воспаления и дополнительно способствуют поляризации микроглии к M2.

На эндотелиальных клетках взаимодействие свободного аденозина с ADORA2A сопровождается восстановлением непроницаемости плотных контактов и приводит к остановке миграции T4-17 лимфоцитов через межклеточную щель.

В нейронной системе индуцируется секреция глутамата из пресинаптических нейронов.

Одновременно на постсинаптических нейронах экспрессируются ионотропные акцепторы глутамата. Активируется система разнонаправленного ионного потока и белкового синтеза. Упорядочивается тормозная система и создается потенциация возбуждения.

Активируется синаптическая каннабиноидная система. Ее ретроградная активность регулирует секрецию тормозных нейротрансмиттеров, за счет чего создается баланс между количеством выделяемых нейропептидов и их рецепторов на постсинаптических нейронах. Следствием этих процессов является создание равновесия между возбуждающим/тормозящим потенциалами и восстановление разбалансированных когнитивных нейронных связей.

ADORA2A +114, связавшись с аденозином на пресинаптических нейронах, запускает секрецию глутамата. Одновременно усиливается синтез ионотропного рецептора глутамата GRID2 +16 и белка аксессуара GRID2IP +16, связывающего рецептор глутамата с актином, и контролирующего активность GRID2. Происходит

восстановление баланса соотношения лиганд/рецептор. Глутамат связывается с NMDA и AMPA ионотропными рецепторами на постсинаптическом нейроне. Происходит восстановление передачи трансмиссивного сигнала.

Эндоканнабиноидная эктогидролаза ADHD12 +78 постсинаптического нейрона в синергизме с ADORA2A +114 гидролизует избыток внеклеточного 2-АГ синаптической щели, предотвращая сверхактивацию предсинаптических CB1 и развития длительного потенцирования возбуждающей синаптической передачи сопровождающейся длительной депрессией ингибирующего синапса в пирамидных нейронах CA1 гиппокампа. Одновременно освобождается место для секреции ананамида и его взаимодействия с тропным CB1 на предсинаптическом нейроне, что способствует нормализации секреции глутамата.

Активация сигнальной системы G-белка (*Gm5741* +66) (Приложение 1, табл. 6) свидетельствует о возбуждении передачи внутриклеточного сигнала фосфорилирования интермедиатов и активации различных генных платформ через активные G-белок ассоциированные рецепторы и в частности через ADORA2A и ADHD12. Происходит активация различных киназ, фосфатаз, транскрипционных факторов и других модифицирующих белков (Приложение 1, табл. 6–9), что в целом свидетельствует об увеличении общеклеточного синтетического процесса в клетках гиппокампа. В нормализации передачи сигнала принимают участие многие другие G-белок ассоциированные рецепторы (Приложение 1, табл. 6), о чем свидетельствует повышенная экспрессия РНК этих генов.

Остальные многочисленные активированные гены сопровождают этот глобальный процесс восстановления баланса энергического потенцирования в гиппокампе.

Активация многочисленных сигнальных путей, обеспечивающих ионно-электрический потенциал нейрона, свидетельствует о нормализации прохождения нервного импульса в рамках глутаматергического сигнального пути. Восстанавливается глутаматергическое сбалансированное потенцирование, затухают воспалительные реакции микроглии. Успокоенные постсинаптические глутаматергические нейроны перестают секретировать АТФ. Происходит балансировка скорости появления свободной АТФ и скорости ее превращения в аденозин гидролазами микроглии. Снижается апоптоз индуцированный воспалением, вследствие чего также снижается содержание экстраклеточной АТФ. Происходит восстановление когнитивных связей и коррекция ДСС мышей.

Кондиционная среда M2 макрофагов является активной субстанцией, содержащей многие иммуноактивные компоненты. Мы считаем, что воздействие на микроглию этими компонентами является первопричиной купирования ДСС. Микроглия с активированным (CD45intermedium) или покоящимся фенотипом (CD45low) создает метаболический фон возбуждения в нейронных сетях и восстановления когнитивных связей. Одновременно воздействие факторов кондиционной среды на эндотелиальные клетки капилляров сопровождается закрытием плотных контактов высоко экспрессирующимися белками клеточной адгезии.

Проведенный анализ свидетельствует, что в структуре ответа на терапию задействован один основной фактор, позитивно изменяющий симптоматику ДСС мышей. Это всеохватывающая активация реакции возбуждения в синаптическом сопряжении нейронов гиппокампа и угнетение или нормализация процессов торможения. Имунная система ЦНС в виде микроглии модулирует происходящие в нервной системе процессы и также принимает участие в структуре ответа на терапию.

## **Часть вторая. Доминантно репрессированные гены**

В первой части работы были проанализированы гены, демонстрирующие высокий уровень РНК-экспрессии в гиппокампе, входящие в метаболические пути, активация

которых коррелирует с купированием ДСС. Основным выводом анализа является заключение, что одной из основных причин возникновения воспаления в ЦНС является нарушение метаболизма АТФ, связанное с накоплением трифосфата и дефицитом аденозина. Общая логика анализа доминантно экспрессирующихся генов предполагает, что изменение когнитивных реакций у мышей с ДСС, произошедших в результате проведенного лечения, связано с перенастройкой сопряженных нейрональных метаболических систем, глутаматергической метаболической системы и каннабиноидной системы сигналинга и изменений в микроглии, которые определяли развитие и поддержание воспалительного процесса, и как следствие разбалансировку указанных транзиттерных сигнальных векторов гиппокампа.

Развернутый список доминантно репрессированных генов (негативная регуляция) в структуре ответа на воздействие кондиционной среды М2 макрофагов свидетельствует о том, что в клетках гиппокампа активировались системы запрета на синтез РНК этих генов, что связано с эффектом воздействия факторов кондиционной среды. Логично предположить, что репрессия соответствующего набора генов в гиппокампе должна создавать дополнительные условия для развития и проявления новых когнитивных реакций, свидетельствующих о купировании ДСС.

Идеология сравнения генов описана в начальной части работы и предполагает, что уровень экспрессии анализируемых репрессированных генов у ДСС мышей был не нулевой и представлял собой базовый уровень экспрессии, с которым проводилось сравнение данных RNAseq мышей с ДСС после лечения кондиционной средой М2 макрофагов. Это может означать, что «←» гены у ДСС мышей давали продукт РНК, то есть экспрессировались с вероятностью синтеза соответствующего полипептида.

Для проведения анализа, как и в случае доминантно экспрессирующихся генов, доминантно репрессированные гены были разбиты на группы: сверхрепрессированные (−[212-50]); сильно репрессированные (−[50-20]); умеренно репрессированные (−[20-9]) и слабо репрессированные (−[9-5]) (Приложение 3, табл. 1). В конечном итоге слабо репрессированные гены не анализировались, поскольку, на наш взгляд, отражали картину изменений, не определяющих создание новой когнитивной архитектуры гиппокампа. Дополнительно, анализируемые гены, были разбиты на группы по их функциональным особенностям, и было определено их возможное отношение к описанной в первой части обзора структуре когнитивного ответа.

Оказалось, что из 107 сверх, сильно и умеренно репрессированных генов доминантное давление терапии оказано на секретируемую составляющую гиппокампа. 17 генов прогормонов, гормонов и нейропептидов оказались репрессированными, причем глубина репрессии доходит до −212. Как было сказано выше, полученные результаты могли бы означать, что у мышей с индуцированным ДСС существует базовый уровень синтеза РНК указанных коротких секретируемых факторов. Это в свою очередь могло бы означать, что экспрессия этих РНК и секреция пептидов связаны с возникновением и протеканием заболевания. И, следовательно, обязательное отсутствие экспрессии секретируемых факторов, определенных в работе, является залогом купирования болезни при терапии кондиционной средой М2 макрофагов. Ниже приведен список генов нейропептидов, гормонов и профакторов, доминантно репрессированных в гиппокампе. Гены гормонов, пептидов и пропептидов, репрессированных в гиппокампе мышей с ДСС после лечения кондиционной средой М2 макрофагов: *Npvf* −212; *Tshb* −171; *Avp* −138; *Ghrh* −122; *Hcrt* −121; *Oxt* −77; *Agpr* −59; *Pmch* −42; *Pomc* −41; *Gal* −36; *Qrfp* −29; *CartPT* −21; *Gpr101* −20; *Trh* −19; *Adcyap1* −15; *Nms* −15; *Ucn3* −11 (Приложение 3, табл. 2).

Был проведен анализ литературы, который показал следующие результаты. Помимо нашего исследования, гены *CartPT* −21, *Pomc* −41 и *Gal* −36, *Gpr101* −20; *Hcrt* (orexin A,



В) –121 также были определены как экспрессирующиеся в небольшом количестве в гиппокампе в других работах [77–80].

Определение транскриптов этих генов в гиппокампе предполагает существование белковых продуктов этих генов (Приложение 3, табл. 2). Нейроанатомические связи гиппокампа с другими отделами мозга таковы, что главные афферентные проекционные пути в гиппокамп исходят из энторинальной коры, ипсилатеральных и контрлатеральных субгиппокампальных нейронных областей, отростки нейронов которых образуют синапсы на дендритах главных клеток гиппокампа. При этом важной особенностью строения гиппокампа является упорядоченность проводящих путей внутри этой структуры головного мозга с формированием замкнутых кругов циркуляции возбуждения [81]. Возможно, что минимальная секреция перечисленных нейропептидов клетками гиппокампа у больных мышей создает определенный локальный аутокринно/паракринный фон, формирующий и укрепляющий патологические реакции, ограниченные когнитивными процессами замкнутого контура гиппокампа. Вместе с тем проявленная экспрессия генов пропептидов и прогормонов у мышей с ДСС и их доминантная репрессия у мышей с купированным ДСС, по-видимому, не имеет распространенного влияния, поскольку указанный набор гормонов и нейропептидов в большом количестве доставляется в гиппокамп проекцией аксонов других отделов головного мозга.

Основной особенностью приведенного списка секретлируемых факторов гиппокампа является тот факт, что практически все отмеченные, гормоны и пептиды (а также многие рецепторы) участвуют в пищевом поведении мышей, причем одновременно могут регулировать нейротрансмиттерные процессы. Так, например, охарактеризована взаимосвязь факторов, кодируемых генами *AgRP*–59, *Pomc*–41, *Magel2*–19, *CartPT*–21, *Ghsr*–61, *Gabre*–55 и *Gabrq*–37, связанных с когнитивными реакциями, определяющими пищевое поведение. Нейроны POMC/CART продуцируют угнетающие аппетит гормоны проопиомеланокортин (POMC) и кокаин- и амфетамин-регулируемый транскрипт CART (–21), и влияют на энергетический обмен всего тела. Нейроны NPY/AgRP продуцирует орексигенные нейропептиды, стимулирующие аппетит, к которым относится агути связанный белок AGRP (–59) и нейропептид Y (NPY (–1)). Во время отрицательного энергетического баланса (голод) нейроны NPY/AgRP непосредственно активируются гормоном грелином (через GHSR (–61) и повышением уровня свободных жирных кислот. После активации нейроны NPY/AgRP высвобождают ГАМК, контролирующую когнитивные реакции, причем частично путем ингибирования нейронов POMC/CART. Активность NPY/AgRP оси стимулирует потребление пищи, в то время как активность POMC/CART оси уменьшает его. Таким образом ингибирование гена POMC будет способствовать стремлению к поглощению пищи. Потеря экспрессии MAGEL2 (–19) нарушает опосредованную лептином деполяризацию нейронов POMC в следствие чего теряется контроль потребления пищи, регулируемый лептином (эффект насыщения). Физиологическое последствие потери экспрессии члена семейства MAGEL2 (и разрушение трансммиттерного пути POMC) характеризуется эндокринной дисфункцией, одним из проявлений которой является чрезмерное увеличение веса и ожирение.

Если считать, что гены секретлируемых факторов, экспрессирующиеся в гиппокампе мышей с ДСС, имеют отношение к развитию патологии, то их репрессия будет способствовать или определять направление новых положительных в плане купирования синдрома когнитивных реакций. При купировании синдрома ДСС гены *Pomc*, *Cart* и *Magel2*, экспрессирующиеся у мышей, репрессированы. В этом случае репрессия *Pomc*, *Cart* и *Magel2* гиппокампа будет приводить к изменению пищевого поведения *в направлении стимуляции потребления пищи* (сопровождающееся чрезмерным увеличением веса). С другой стороны, нарушение NPY/AgRP взаимодействия



вследствие репрессии синтеза обоих нейропептидов и рецептора лиганда-активатора грелина GHSR (-61) в гиппокампе может иметь противоположное направление когнитивной реакции, а именно *отсутствие стимула к потреблению пищи*. С этим соображением может быть связано также доминантное репрессирование генов рецепторов ГАМК *Gabre* -55 и *Gabrq* -37, что должно приводить к нечувствительности нейронов POMC/CART и ингибированию POMC/CART транзиттерного сигнала даже в случае эндокринной проекции не гипоталамических аксонов. Интересным является факт, что дефицит GHSR (-61) ослабляет депрессивные симптомы хронического стресса, что связывает факт репрессии указанных генов и когнитивных позитивных изменений в поведении мышей с индуцированным ДСС после проведенной терапии [82–87].

Важным обстоятельством проведенного анализа является тот факт, что транскрипция гена *Cart* и *Pomc* в гиппокампе выявлена при анализе данных RNAseq другими авторами [77–80]. В этой связи можно предположить, что система нейрональных связей POMC/CART является одной из мишеней проведенной терапии, приводящей к ее блокированию в гиппокампе, что сопровождается развитием новых когнитивных связей, проявлением голодного поискового стимула и купированием ДСС.

Ранее охарактеризовано несколько других генов нейропептидов, экспрессирующихся в гиппокампе и отмеченных в настоящем анализе [77]. Это *Gal* -36, *Gpr101* -20; *Hcrt*-121 (orexin A, B). Для них так же показано участие в когнитивных реакциях, определяющих разнонаправленное пищевое поведение [77, 88]. Так, например, утрата сигнального пути орексина наблюдается при морбидном ожирении. Дефицит галанина и его рецептора GALR1 (-11) сопровождается развитием безразличного отношения к пище. Таким образом анализ репрессированных генов нейропептидов, гормонов и прогормонов предполагает, что основным вектором репрессии является воздействие на когнитивные связи гиппокампа, определяющие пищевое поведение мышей с купированным ДСС.

Анализ глубоко репрессированных генов рецепторов свидетельствует, что многие агонисты гуморальных факторов пищевой линии поведения также репрессированы вследствие действия кондиционной среды M2. Это относится как к рецепторам, непосредственно взаимодействующим с лигандами, так и к рецепторам, участвующим в гомеостазе сахаров, липидов и общем энергетическом потенциале. Гены рецепторов, репрессированных в гиппокампе мышей с ДСС после лечения кондиционной средой M2 макрофагов: *Calcrl* -71; *Gpr50* -65; *Ghsr* -61; *Gabre* -55; *Irs4* -54; *Chrm5* -47; *Gabrq* -37; *Nr0b1* -35; *Pgr15l* -28; *Brs3* -22; *Tnfrsf8* -14; *P2rx2* -13; *Avpr1a* -12; *Gpr179* -11; *Deup1* -11; *Npbwr1* -11; *Galr1* -11; *Prokr1* -11; *GlrA4* -10; *Gpr165* -10; *Rxfp3* -10 (Приложение 3, табл. 3).

Так доминантно репрессированы следующие гены рецепторов, участвующие в метаболических процессах, связанных с пищевым поведением: *Irs4* -54 – гомеостаз глюкозы, *Gpr50* -65 – энергетический гомеостаз, регуляция веса тела, *Gabre* -55 и *Gabrq* -37 – охарактеризованы выше, пищевое поведение, *Brs3* -22 – регуляция экзо-эндокринных процессов, обмена веществ и поведения, *Gpr101* -20 – регуляция экзо-эндокринных процессов в желудочно-кишечном тракте, *Magel2* -19 – описан выше, пищевое поведение, *Apoc* -15 – обмен жиров, *Avpr1a* -12, *Oxt* -77 – множественная регуляция, включая энергетический гомеостаз [89, 90], *Rrad* -9 – энергетический гомеостаз, ингибирование гликолиза. Некоторые из репрессированных рецепторов связаны с нейрогенезом и нейротрансмиссией: *Pitx2* -19, *Dlk1* -15, *Baiap3* -17, *P2rx2* -13, *Sim2* -12.

В отдельную группу выделены несколько генов (*Chrm5*, *Adcyap1*, *P2rx2*), относящихся к сигнальному каскаду метаболизма аденозина и участвующих в АТФ зависимых реакциях. *Chrm5* -47 индуцирует ингибирование аденилатциклазной активности клетки, *Adcyap1* -15 пропептид, стимулирует аденилатциклазную

активность, повышает уровень циклического АМФ, регулирует транскрипционную активность генов мишеней и является ключевым медиатором нейроэндокринных реакций на стресс. Репрессия *Chrm5* и *Adcyap1* будет иметь разнонаправленные последствия. *P2rx2* –13 – пуринергический рецептор для АТФ. При связывании с лигандом (АТФ), обеспечивает синаптическую передачу между нейронами (Ионный канал, управляемый внеклеточной АТФ, участвует в передаче возбуждающего сигнала в сенсорных нейронах). Как было сказано в первой части работы, длительное потенцирование возбуждения (эксайтотоксичность), усиливающееся избытком АТФ при нарушении секреции глутамата и при дефиците аденозина, приводит к гиперфункции трансмиссерной системы, что сопровождается развитием депрессии. На наш взгляд репрессия синтеза пуринергического рецептора АТФ является одним из дополнительных стабилизирующих механизмов, предотвращающих негативные последствия избытка АТФ во внеклеточной среде гиппокампа.

Кроме того, в клетках гиппокампа доминантно репрессированы следующие транскрипционные факторы: *Sim1* –94 и *Sim2* –12 – активность генов связана с когнитивными нарушениями и нарушениями энергетического гомеостаза, *Vsx* –58 – участвует в процессах нейрогенеза, активатор РОМС нейротрансмиссерной оси, *Lhx5* –28, *Hnf1b* –19, *Pitx2* –19, *Nkx2-1* –13, *Ebf3* –12, *Sox14* –10, *Lhx1* –10 и *Uncx* –10 – транскрипционные факторы, участвующие в различных процессах нейрогенеза (Приложение 3, табл. 4).

Совокупный анализ доминантно репрессированных генов предполагает, что основное тормозное давление терапии направлено на подавление звена активности гиппокампа, связанного с контролем потребления пищи. При этом, как следует из проведенного анализа, анализируемые гены могут принимать участие в разнонаправленных когнитивных процессах, связанных с пищевым поведением.

Кроме того, доминантно репрессированы гены, относящиеся к сигнальному каскаду метаболизма аденозина и участвующие в АТФ зависимых реакциях, что является дополнительным стабилизирующим механизмом, предотвращающим негативные последствия избытка АТФ во внеклеточной среде гиппокампа.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ экспрессии сверхэкспрессирующихся генов в гиппокампе мышей с ДСС свидетельствует, что главными функциональными доменами, на которые идет воздействие биоактивных факторов М2 макрофагов, является система метаболизма глутамата и каннабиноидная система. Обнаруженная доминантная экспрессия генов свидетельствует о том, что идет агрессивная активация синаптического метаболизма глутамата и активация каннабиноидного механизма регуляции высвобождения и акцепции трансмиссеров. С этими двумя определяющими сигнальными путями сопряжена высокая экспрессия других функциональных групп генов, сопровождающих мажорные метаболические пути и формирующих активированную платформу энергетических и синтетических механизмов, таких как электрохимический потенциал нейронов; систему активации (фосфорилирования) сигнальных молекул, приводящих в движение всю синтетическую машину клетки (цАМФс); белковый синтез; общую транспортную систему, включая митохондриальный и клеточный мембранный транспорт; внутрисинаптическую передачу сигнального импульса и скелетную структуру нейрона. Со стороны микроглии наблюдаются изменения в сторону ее «успокоения».

Одновременно негативно регулируются нейроэндокринные генные платформы, определяющие формирование новых когнитивных реакций в направлении смены пищевого поведения. Мы полагаем, что последовательная (в ходе проведения терапии) перенастройка возбуждающих трансмиссерных реакций, связанная с воздействием

компонентов кондиционной среды М2 макрофагов, приводит к активации компенсаторных программ репрессии.

Таким образом, оба вектора изменений экспрессии генов влекут за собой изменения когнитивной архитектуры гиппокампа и купирование ДСС.

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории функциональной нейрогеномики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» н.с. Сухаревой Екатерине Викторовне и с.н.с. Ланшакову Дмитрию Александровичу за плодотворные дискуссии при написании статьи.

Работа была выполнена при поддержке бюджетного проекта в рамках государственного задания N 0324-2019-0042-С-01 (рег. N АААА-А17-117071240065-4).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lux V., Kendler K.S. Deconstructing major depression: A validation study of the DSM-IV symptomatic criteria. *Psychol. Med.* 2010. V. 40. P. 1679–1690.
2. Zanin R.F., Braganhol E., Bergamin L.S., Campesato L.F.I., Filho A.Z., Moreira J.C.F., Morrone F.B., Sévigny J., Schetinger M.R.C., de Souza Wyse A.T., Battastini A.M.O. Differential macrophage activation alters the expression profile of NTPDase and ecto-5'-nucleotidase. *PLoS One.* 2012. V. 7. Article No. e31205.
3. Di Virgilio F., Ceruti S., Bramanti P., Abbracchio M.P. Purinergic signalling in inflammation of the central nervous system. *Trends Neurosci.* 2009. V. 32. P. 79–87.
4. Abbracchio M.P., Ceruti S. P1 receptors and cytokine secretion. *Purinergic Signal.* 2007. V. 3. P. 13–25.
5. Yegutkin G.G., Henttinen T., Samburski S.S., Spychala J., Jalkanen S. The evidence for two opposite, ATP-generating and ATP-consuming, extracellular pathways on endothelial and lymphoid cells. *Biochem. J.* 2002. V. 367. P. 121–128.
6. Linden J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2001. V. 41. P. 775–787.
7. Wang Y.-M., Liu Z.-Y., Ai Y.-H., Zhang L.-N., Zou Y., Peng Q.-Y. Blocking the CD38/cADPR pathway plays a double-edged role in LPS stimulated microglia. *Neuroscience.* 2017. V. 361. P. 34–42.
8. Cauwels A., Rogge E., Vandendriessche B., Shiva S., Brouckaert P. Extracellular ATP drives systemic inflammation, tissue damage and mortality. *Cell Death Dis.* 2014. V. 5.
9. Bours M.J.L., Swennen E.L.R., Di Virgilio F., Cronstein B.N., Dagnelie P.C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol. Ther.* 2006. V. 112. P. 358–404.
10. Solle M., Labasi J., Perregaux D.G., Stam E., Petrushova N., Koller B.H., Griffiths R.J., Gabel C.A. Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 125–132.
11. Coutinho-Silva R., Perfettini J.L., Persechini P.M., Dautry-Varsat A., Ojcius D.M. Modulation of P2Z/P2X7 receptor activity in macrophages infected with Chlamydia psittaci. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 2001. V. 280.
12. Haskó G., Cronstein B.N. Adenosine: An endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol.* 2004. V. 25. P. 33–39.
13. Yamaguchi H., Maruyama T., Urade Y., Nagata S. Immunosuppression via adenosine receptor activation by adenosine monophosphate released from apoptotic cells. *Elife.* 2014. V. 3. Article No. e02172.
14. Dissing-Olesen L., LeDue J.M., Rungta R.L., Hefendehl J.K., Choi H.B., MacVicar B.A. Activation of neuronal NMDA receptors triggers transient ATP-mediated microglial

- process outgrowth. *J. Neurosci.* 2014. V. 34. P. 10511–10527.
15. Calovi S., Mut-Arbona P., Sperlágh B. Microglia and the Purinergic Signaling System. *Neuroscience.* 2019. V. 405. P. 137–147.
  16. Janks L., Sharma C.V.R., Egan T.M. A central role for P2X7 receptors in human microglia. *J. Neuroinflammation.* 2018. V. 15. Article No. 325.
  17. Tay T.L., Savage J.C., Hui C.W., Bisht K., Tremblay M.É. Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition. *J. Physiol.* 2017. V. 595. P. 1929–1945.
  18. Liu Y., Alahiri M., Ulloa B., Xie B., Sadiq S.A. Adenosine A2A receptor agonist ameliorates EAE and correlates with Th1 cytokine-induced blood brain barrier dysfunction via suppression of MLCK signaling pathway. *Immun. Inflamm. Dis.* 2018. V. 6. P. 72–80.
  19. Korn T., Kallies A. T cell responses in the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* 2017. V. 17. P. 179–194.
  20. Ogawa Y., Furusawa E., Saitoh T., Sugimoto H., Omori T., Shimizu S., Kondo H., Yamazaki M., Sakuraba H., Oishi K. Inhibition of astrocytic adenosine receptor A2A attenuates microglial activation in a mouse model of Sandhoff disease. *Neurobiol. Dis.* 2018. V. 118. P. 142–154.
  21. Vuorimaa A., Rissanen E., Airas L. *In Vivo* PET Imaging of Adenosine 2A Receptors in Neuroinflammatory and Neurodegenerative Disease. *Contrast Media Mol. Imaging.* 2017. V. 2017. Article No. 6975841.
  22. Sakhno L.V., Shevela E.Y., Tikhonova M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. The Phenotypic and Functional Features of Human M2 Macrophages Generated Under Low Serum Conditions. *Scand. J. Immunol.* 2016. V. 83. P. 151–159.
  23. Tye K.M., Mirzabekov J.J., Warden M.R., Ferenczi E.A., Tsai H.-C., Finkelstein J., Kim S.-Y., Adhikari A., Thompson K.R., Andalman A.S. et al. Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. *Nature.* 2013. V. 493. P. 537–541.
  24. Garcia-Garcia M., Yordanova J., Kolev V., Domínguez-Borràs J., Escera C. Tuning the brain for novelty detection under emotional threat: the role of increasing gamma phase-synchronization. *Neuroimage.* 2010. V. 49. P. 1038–1044.
  25. Iannotti F.A., Di Marzo V., Petrosino S. Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders. *Prog. Lipid Res.* 2016. V. 62. P. 107–128.
  26. Xu J.-Y., Chen C. Endocannabinoids in synaptic plasticity and neuroprotection. *Neuroscientist.* 2015. V. 21. P. 152–168.
  27. Heifets B.D., Castillo P.E. Endocannabinoid Signaling and Long-Term Synaptic Plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* 2009. V. 71. P. 283–306.
  28. Maragakis N.J., Rothstein J.D. Glutamate transporters in neurologic disease. *Arch. Neurol.* 2001. V. 58. P. 365–370.
  29. Szydłowska K., Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium.* 2010. V. 47. P. 122–129.
  30. Миронова Ю.С., Жукова Н.Г., Жукова И.А., Алифирова В.М., Ижболдина О.П., Латышова А.В. Болезнь Паркинсона и глутаматергическая система. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2018. V. 118. P. 138–142.
  31. Krishnadas R., Cavanagh J. Depression: An inflammatory illness? *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2012. V. 83. P. 495–502.
  32. Dantzer R., O'Connor J.C., Freund G.G., Johnson R.W., Kelley K.W. From inflammation to sickness and depression: When the immune system subjugates the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 2008. V. 9. P. 46–56.
  33. Babenko V.N., Smagin D.A., Galyamina A.G., Kovalenko I.L., Kudryavtseva N.N.



- Altered Slc25 family gene expression as markers of mitochondrial dysfunction in brain regions under experimental mixed anxiety/depression-like disorder. *BMC Neurosci.* 2018. V. 19. Article No. 79.
34. Almolda B., Costa M., Montoya M., González B., Castellano B. CD4 microglial expression correlates with spontaneous clinical improvement in the acute Lewis rat EAE model. *J. Neuroimmunol.* 2009. V. 209. P. 65–80.
  35. Lau A., Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch.* 2010. V. 460. P. 525–542.
  36. Olney J.W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science.* 1969. V. 164. P. 719–721.
  37. Petkova A.T., Leapman R.D., Guo Z., Yau W.-M., Mattson M.P., Tycko R. Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer’s beta-amyloid fibrils. *Science.* 2005. V. 307. P. 262–265.
  38. Paoletti P., Bellone C., Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: Impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2013. V. 14. P. 383–400.
  39. Brecht D.S., Nicoll R.A. AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron.* 2003. V. 40. P. 361–379.
  40. Halpain S., Girault J.A., Greengard P. Activation of NMDA receptors induces dephosphorylation of DARPP-32 in rat striatal slices. *Nature.* 1990. V. 343. P. 369–372.
  41. Nishi A., Bibb J.A., Snyder G.L., Higashi H., Nairn A.C., Greengard P. Amplification of dopaminergic signaling by a positive feedback loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. P. 12840–12845.
  42. Belkhiry A., Zhu S., El-Rifai W. DARPP-32: from neurotransmission to cancer. *Oncotarget.* 2016. V. 7. P. 17631–17640.
  43. Yagishita S., Hayashi-Takagi A., Ellis-Davies G.C.R., Urakubo H., Ishii S., Kasai H. A critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines. *Science.* 2014. V. 345. P. 1616–1620.
  44. Nair A.G., Bhalla U.S., Hellgren Kotaleski J. Role of DARPP-32 and ARPP-21 in the Emergence of Temporal Constraints on Striatal Calcium and Dopamine Integration. *PLoS Comput. Biol.* 2016. V. 12. Article No. e1005080.
  45. Chen Z., Trapp B.D. Microglia and neuroprotection. *J. Neurochem.* 2016. V. 136. P. 10–17.
  46. Masuda T., Sankowski R., Staszewski O., Prinz M. Microglia Heterogeneity in the Single-Cell Era. *Cell Rep.* 2020. V. 30. P. 1271–1281.
  47. Wang N., Liang H., Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance. *Front. Immunol.* 2014. V. 5. Article No. 614.
  48. Zhang L., Zhang J., You Z. Switching of the Microglial Activation Phenotype Is a Possible Treatment for Depression Disorder. *Front. Cell. Neurosci.* 2018. V. 12. Article No. 306.
  49. Tang R.-H., Qi R.-Q., Liu H.-Y. Interleukin-4 affects microglial autophagic flux. *Neural Regen. Res.* 2019. V. 14. P. 1594–1602.
  50. Navarro G., Borroto-Escuela D., Angelats E., Etayo Í., Reyes-Resina I., Pulido-Salgado M., Rodríguez-Pérez A.I., Canela E.I., Saura J., Lanciego J.L. et al. Receptor-heteromer mediated regulation of endocannabinoid signaling in activated microglia. Role of CB1 and CB2 receptors and relevance for Alzheimer’s disease and levodopa-induced dyskinesia. *Brain. Behav. Immun.* 2018. V. 67. P. 139–151.
  51. Navarro G., Morales P., Rodríguez-Cueto C., Fernández-Ruiz J., Jagerovic N., Franco R. Targeting cannabinoid CB2 receptors in the central nervous system. Medicinal chemistry approaches with focus on neurodegenerative disorders. *Front. Neurosci.* 2016. V. 10. Article No. 406.
  52. Reyes-Resina I., Navarro G., Aguinaga D., Canela E.I., Schoeder C.T., Załuski M., Kieć-

- Kononowicz K., Saura C.A., Müller C.E., Franco R. Molecular and functional interaction between GPR18 and cannabinoid CB2 G-protein-coupled receptors. Relevance in neurodegenerative diseases. *Biochem. Pharmacol.* 2018. V. 157. P. 169–179.
53. Muccioli G.G., Xu C., Odah E., Cudaback E., Cisneros J.A., Lambert D.M., López Rodríguez M.L., Bajjalieh S., Stella N. Identification of a novel endocannabinoid-hydrolyzing enzyme expressed by microglial cells. *J. Neurosci.* 2007. V. 27. P. 2883–2889.
  54. Blankman J.L., Simon G.M., Cravatt B.F. A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem. Biol.* 2007. V. 14. P. 1347–1356.
  55. Cabral G.A., Raborn E.S., Griffin L., Dennis J., Marciano-Cabral F. CB 2 receptors in the brain: Role in central immune function. *Br. J. Pharmacol.* 2008. V. 153. P. 240–251.
  56. Walter L., Franklin A., Witting A., Wade C., Xie Y., Kunos G., Mackie K., Stella N. Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J. Neurosci.* 2003. V. 23. P. 1398–1405.
  57. Cristino L., Bisogno T., Di Marzo V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat. Rev. Neurol.* 2020. V. 16. P. 9–29.
  58. Lu H.C., MacKie K. An introduction to the endogenous cannabinoid system. *Biol. Psychiatry.* 2016. V. 79. P. 516–525.
  59. Savinainen J.R., Saario S.M., Laitinen J.T. The serine hydrolases MAGL, ABHD6 and ABHD12 as guardians of 2-arachidonoylglycerol signalling through cannabinoid receptors. *Acta Physiol. (Oxf).* 2012. V. 204. P. 267–276.
  60. Franco R., Reyes-Resina I., Aguinaga D., Lillo A., Jiménez J., Raïch I., Borroto-Escuela D.O., Ferreira-Vera C., Canela E.I., Sánchez de Medina V. et al. Potentiation of cannabinoid signaling in microglia by adenosine A2A receptor antagonists. *Glia.* 2019. V. 67. P. 2410–2423.
  61. Chanda P.K., Gao Y., Mark L., Btsh J., Strassle B.W., Lu P., Piesla M.J., Zhang M.-Y., Bingham B., Uveges A. et al. Monoacylglycerol lipase activity is a critical modulator of the tone and integrity of the endocannabinoid system. *Mol. Pharmacol.* 2010. V. 78. P. 996–1003.
  62. Schlosburg J.E., Blankman J.L., Long J.Z., Nomura D.K., Pan B., Kinsey S.G., Nguyen P.T., Ramesh D., Booker L., Burston J.J. et al. Chronic monoacylglycerol lipase blockade causes functional antagonism of the endocannabinoid system. *Nat. Neurosci.* 2010. V. 13. P. 1113–1119.
  63. Szabó G.G., Lenkey N., Holderith N., Andrási T., Nusser Z., Hájos N. Presynaptic calcium channel inhibition underlies CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor-mediated suppression of GABA release. *J. Neurosci.* 2014. V. 34. P. 7958–7963.
  64. Gordon S., Martinez F.O. Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. *Immunity.* 2010. V. 32. P. 593–604.
  65. Zhou J., Chen J., Xu W., Liu Y., Song Z., Wen Z., Jian X., Yu J., Ma X., Wang Z. et al. Common variants in SATB2 are associated with schizophrenia in Uygur Chinese population. *Psychiatr. Genet.* 2019. V. 29. P. 120–126.
  66. Kawahara K., Suenobu M., Yoshida A., Koga K., Hyodo A., Ohtsuka H., Kuniyasu A., Tamamaki N., Sugimoto Y., Nakayama H. Intracerebral microinjection of interleukin-4/interleukin-13 reduces  $\beta$ -amyloid accumulation in the ipsilateral side and improves cognitive deficits in young amyloid precursor protein 23 mice. *Neuroscience.* 2012. V. 207. P. 243–260.
  67. Jin M.-M., Wang F., Qi D., Liu W.-W., Gu C., Mao C.-J., Yang Y.-P., Zhao Z., Hu L.-F., Liu C.-F. A Critical Role of Autophagy in Regulating Microglia Polarization in Neurodegeneration. *Front. Aging Neurosci.* 2018. V. 10. Article No. 378.
  68. Ji J., Xue T.-F., Guo X.-D., Yang J., Guo R.-B., Wang J., Huang J.-Y., Zhao X.-J., Sun X.-

- L. Antagonizing peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  facilitates M1-to-M2 shift of microglia by enhancing autophagy via the LKB1-AMPK signaling pathway. *Aging Cell*. 2018. V. 17. Article No. e12774.
69. Ries M., Sastre M. Mechanisms of A $\beta$  clearance and degradation by glial cells. *Front. Aging Neurosci.* 2016. V. 8. Article No. 160.
70. Braun N., Sévigny J., Robson S.C., Enjyoji K., Guckelberger O., Hammer K., Di Virgilio F., Zimmermann H. Assignment of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1/cd39 expression to microglia and vasculature of the brain. *Eur. J. Neurosci.* 2000. V. 12. P. 4357–4366.
71. Кравченко П.Н., Олейник Е.К. Система регуляторных Т-клеток и аутоиммунные процессы. *Труды Карельского научного центра Российской академии наук*. 2013. P. 18–30.
72. Таширева Л.А., Перельмутер В.М., Манских В.Н., Денисов Е.В., Савельева О.Е., Кайгородова Е.В., Завьялова М.В. Типы иммунновоспалительных реакций как алгоритмы взаимодействия клеток в условиях репаративной регенерации и опухолевого роста. *Биохимия*. 2017. V. 82. P. 732–748.
73. Wang L.-M., Zhang Y., Li X., Zhang M.-L., Zhu L., Zhang G.-X., Xu Y.-M. Nr4a1 plays a crucial modulatory role in Th1/Th17 cell responses and CNS autoimmunity. *Brain. Behav. Immun.* 2018. V. 68. P. 44–55.
74. Araujo D.J., Toriumi K., Escamilla C.O., Kulkarni A., Anderson A.G., Harper M., Usui N., Ellegood J., Lerch J.P., Birnbaum S.G. et al. Foxp1 in forebrain pyramidal neurons controls gene expression required for spatial learning and synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 2017. V. 37. P. 10917–10931.
75. Shen L., Nam H.S., Song P., Moore H., Anderson S.A. FoxG1 haploinsufficiency results in impaired neurogenesis in the postnatal hippocampus and contextual memory deficits. *Hippocampus*. 2006. V. 16. P. 875–890.
76. Hawk J.D., Abel T. The role of NR4A transcription factors in memory formation. *Brain Res. Bull.* 2011. V. 85. P. 21–29.
77. Beck B., Pourié G. Ghrelin, neuropeptide Y, and other feeding-regulatory peptides active in the Hippocampus: Role in learning and memory. *Nutr. Rev.* 2013. V. 71. P. 541–561.
78. Deakin I.H., Godlewska B.R., Walker M.A., Huang G.J., Schwab M.H., Nave K.A., Law A.J., Harrison P.J. Altered hippocampal gene expression and structure in transgenic mice overexpressing neuregulin 1 (*Nrg1*) type I. *Transl. Psychiatry*. 2018. V. 8. Article No. 229.
79. Chen P.B., Kawaguchi R., Blum C., Achiro J.M., Coppola G., O'Dell T.J., Martin K.C. Mapping gene expression in excitatory neurons during hippocampal late-phase long-term potentiation. *Front. Mol. Neurosci.* 2017. V. 10. Article No. 39
80. Cembrowski M.S., Wang L., Sugino K., Shields B.C., Spruston N. Hipposeq: A comprehensive RNA-seq database of gene expression in hippocampal principal neurons. *eLife*. 2016. V. 5. Article No. e14997.
81. Умрюхин А.Е. Нейромедиаторные гиппокампальные механизмы стрессорного поведения и реакций избегания. *Вестник новых медицинских технологий*. 2013. № 1.
82. Guo L., Niu M., Yang J., Li L., Liu S., Sun Y., Zhou Z., Zhou Y. GHS-R1a Deficiency Alleviates Depression-Related Behaviors After Chronic Social Defeat Stress. *Front. Neurosci.* 2019. V. 13.
83. Инюшкина Е.М. Лептин – анорексигенный регуляторный полипептид с респираторной активностью. *Вестник Самарского государственного университета. Естественная серия*. 2006. V. 2. P. 168–177.
84. Мазо Г.Э., Рукавишников Г.В., Кибитов А.О., Кельин Л.Л., Бобровский А.В. Нарушения пищевого поведения у пациентов с депрессивным расстройством:

- патофизиологические механизмы коморбидности. *Успехи физиологических наук*. 2019. V. 50. P. 31–41.
85. Morozov Y.M., Koch M., Rakic P., Horvath T.L. Cannabinoid type 1 receptor-containing axons innervate NPY/AgRP neurons in the mouse arcuate nucleus. *Mol. Metab.* 2017. V. 6. P. 374–381.
  86. Costa R.A., Ferreira I.R., Cintra H.A., Gomes L.H.F., Guida L. da C. Genotype-Phenotype Relationships and Endocrine Findings in Prader-Willi Syndrome. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2019. V. 10.
  87. Shen Y., Tian M., Zheng Y., Gong F., Fu A.K.Y., Ip N.Y. Stimulation of the Hippocampal POMC/MC4R Circuit Alleviates Synaptic Plasticity Impairment in an Alzheimer's Disease Model. *Cell Rep.* 2016. V. 17. P. 1819–1831.
  88. Гмошинский И.В., Апрятин С.А., Шипелин В.А., Никитюк Д.Б. Нейромедиаторы и нейропептиды – биомаркеры метаболических нарушений при ожирении. *Проблемы эндокринологии*. 2018. V. 64. P. 258–269.
  89. Mavani G.P., DeVita M. V., Michelis M.F. A review of the nonpressor and nonantidiuretic actions of the hormone vasopressin. *Front. Med.* 2015. V. 2. Article No. 19.
  90. Bordt E.A., Smith C.J., Demarest T.G., Bilbo S.D., Kingsbury M.A. Mitochondria, Oxytocin, and Vasopressin: Unfolding the Inflammatory Protein Response. *Neurotox. Res.* 2019. V. 36. P. 239–256.

Рукопись поступила в редакцию 29.09.2020, переработанный вариант поступил 24.11.2020.  
Дата опубликования 08.12.2020.



## Changes in the Hippocampal Genes Transcriptome in Depression Model Mice upon Intranasal Exposure to M2 Macrophage Secretome Factors

Shevela E.Y.<sup>1</sup>, Markova E.V.<sup>1,2</sup>, Knyazheva M.A.<sup>1</sup>, Proskurina A.S.<sup>3</sup>,  
Efremov Y.R.<sup>2,3</sup>, Molodtsov V.V.<sup>2,4</sup>, Seledtsov I.A.<sup>4</sup>, Ostanin A.A.<sup>1</sup>,  
Bogachev S.S.<sup>3</sup>, Kolchanov N.A.<sup>3</sup>, Chernykh E.R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia*

<sup>2</sup>*Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia*

<sup>3</sup>*Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

<sup>4</sup>*Softberry Inc., New-York, USA*

**Abstract.** In the current report, the effect of bioactive compounds of the M2 macrophage secretome on transcription of hippocampal genes in mice with a depression-like condition caused by social stress has been investigated. Surgically resected hippocampus was used for mRNA isolation with following RNA sequencing procedures. Comparative analysis of transcriptomes from the control depressive mice treated with physiological saline solution and mice after intranasal administration of M2 macrophages-conditioned medium revealed that remission of the depressive-like state is associated with a significant up- and downregulation of a number of genes, which were found to participate in restoration/regulation of ATP/Adenosine balance. Among the events associated with positive changes in behavioral pattern of depressive mice, the switch of microglial environment from a pro-inflammatory phenotype to an anti-inflammatory one, and subsequent restoration of compromised cannabinoid and glutamatergic transmitter pathways has been predicted.

**Key words:** *ATP, cannabinoid system, glutamate, microglia, neurons, RNAseq.*