

© Коллектив авторов, 2024

УДК 57.024

Мавренкова П.В.¹, Хлебникова Н.Н.¹, Алчинова И.Б.¹, Шойбонов Б.Б.², Порошина А.С.³, Деморжи М.С.¹, Карганов М.Ю.¹**Стресс разлуки с матерью в раннем возрасте влияет на нейроиммуноэндокринные характеристики крыс зависимым от пола и возраста образом**¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,

125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8;

²ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»,

125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8;

³ООО «Экзакт Лабс», 117246, Москва, Россия,

Научный проезд, д. 20, с. 2

Введение. Стресс в раннем возрасте (СРВ), часто сопровождающийся стойкими нейроиммуноэндокринными нарушениями, в дальнейшей жизни существенно повышает риск развития нервно-психических патологий, в основе которых лежит эмоциональная дисрегуляция. Расстройства, связанные с СРВ, встречаются с разной частотой у мужчин и женщин, могут проявляться специфическими для пола симптомами и иметь различные физиологические маркёры. Для моделирования симптомов стресс-индуцированных заболеваний у грызунов используют парадигму разлучения детенышей с матерью в неонатальном периоде. **Цель работы** – оценить влияние повторяющейся длительной сепарации от матери с одновременной изоляцией от сиблингов (МСИ) на состояние периферической иммунной системы и функционирование системы стресс-реакции у самцов и самок крыс подросткового (1 мес) и взрослого (2 мес и 11 мес) возраста с нарушениями поведения.

Методика. Нарушения поведения животных тестировали с помощью общепринятых методик («открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт», тест социального взаимодействия и др.). Уровень 27 цитокинов/хемокинов в сыворотке крови определяли методом мультиплексного анализа. Функциональную активность классического пути системы комплемента определяли в гемолитическом тесте с использованием эритроцитов человека. Уровень кортикостерона в сыворотке крови оценивали методом иммуноферментного анализа.

Результаты. Развитие гиперактивного фенотипа у взрослых крыс-МСИ обоего пола сопровождалось снижением уровня лептина и массы тимуса в подростковом возрасте. Выявлена зависимая от пола динамика изменения уровней фракталкина и VEGF: содержание хемокинов было снижено у самцов в подростковом, а у самок – в молодом взрослом возрасте; только у самок старшего возраста отмечено повышение уровня хемокинов. У самок-МСИ в возрасте 2 мес формировался провоспалительный цитокиновый профиль, который сохранялся в возрасте 11 мес. Функциональная активность системы комплемента в возрасте 2 мес была снижена у самцов-МСИ и повышена у самок. Только у самцов-МСИ выявили снижение базального уровня кортикостерона в подростковом возрасте и увеличение массы надпочечников в молодом взрослом возрасте.

Заключение. Можно предположить, что в реализацию эффектов МСИ у самцов и самок крыс вовлечены различные патофизиологические механизмы.

Ключевые слова: сепарация от матери; крысы подросткового и взрослого возраста; половые различия; цитокиновый профиль; органы-маркеры стресса

Для цитирования: Мавренкова П.В., Хлебникова Н.Н., Алчинова И.Б., Шойбонов Б.Б., Порошина А.С., Деморжи М.С., Карганов М.Ю. Стресс разлуки с матерью в раннем возрасте влияет на нейроиммуноэндокринные характеристики крыс зависимым от пола и возраста образом. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2024; 68(3): 37-53.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.03.37-53

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Мавренкова П.В., Хлебникова Н.Н., Карганов М.Ю.; сбор материала – Мавренкова П.В., Хлебникова Н.Н., Алчинова И.Б., Деморжи М.С.; техническая подготовка материала – Шойбонов Б.Б., Порошина А.С.; подготовка иллюстративного материала к публикации, написание текста – Мавренкова П.В.; редактирование – Хлебникова Н.Н., Карганов М.Ю. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Карганов Михаил Юрьевич, e-mail: mkarganov@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания № FGFU-2022-0010 «Оценка адаптивных реакций организма на действие физико-химических и экологических факторов среды» ФГБНУ НИИОПП.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.07.2024

Принята к печати 29.08.2024

Опубликована 27.09.2024

Mavrenkova P.V.¹, Khlebnikova N.N.¹, Alchinova I.B.¹, Shoibonov B.B.²,
Poroshina A.S.³, Demorzhi M.S.¹, Karganov M.Yu.¹

Stress of early maternal separation affects the neuroimmunoendocrine characteristics of rats in a sex- and age-dependent manner

¹Institute of General Pathology and Pathophysiology,

8 Baltiyskaya St., Moscow, 125315, Russian Federation;

²Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies,

8 Baltiyskaya St., Moscow, 125315, Russian Federation;

³Exacte Labs,

20 Nauchnyy Proezd, Bldg. 2, Moscow, 117246, Russian Federation

Background. Early-life stress (ELS) often accompanied by persistent neuro-immune-endocrine dysfunctions in later life significantly increases the risk of developing neuropsychiatric diseases with underlying emotional dysregulation. ELS-related disorders occur at different frequency in males and females, may manifest sex-specific symptoms, and have different physiological markers. The paradigm of neonatal maternal separation is used to model the symptoms of stress-induced diseases in rats. **The aim** of the study was to assess the effect of repeated, prolonged maternal separation with simultaneous isolation from siblings (MSI) on the state of the peripheral immune system and the functioning of the stress-responsive system in adolescent (1 month) and adult (2 months and 11 months) male and female rats with behavioral disorders.

Methods. Behavioral disorders were tested using standard methods (open field, elevated plus maze, social interaction test, etc.). Concentrations of 27 cytokines/chemokines were measured by a multiplex assay. The functional activity of the classical complement pathway was measured by a hemolytic test on human erythrocytes. Blood serum corticosterone was measured by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results. The development of the hyperactive phenotype in adult MSI rats of either sex was associated with decreases in the leptin concentration and thymus mass in adolescence. Concentrations of fractalkine and VEGF showed sex-dependent changes: the chemokines were reduced in males during adolescence whereas in females, in young adulthood; only older females showed increases in chemokine concentrations. MSI females at the age of 2 months had a pro-inflammatory cytokine profile that persisted through the age of 11 months. The functional activity of the complement system was decreased in two-month-old MSI males and increased in females. Only MSI males showed a decrease in basal corticosterone in adolescence and an increase in the adrenal mass in young adulthood.

Conclusion. It was assumed that different pathophysiological mechanisms are involved in the implementation of the MSI effects in male and female rats.

Keywords: maternal separation; adolescent and adult rats; sex differences; cytokine profile; stress marker organs

For citation: Mavrenkova P.V., Khlebnikova N.N., Alchinova I.B., Shoibonov B.B., Poroshina A.S., Demorzhi M.S., Karganov M.Yu. Stress of early maternal separation affects the neuroimmunoendocrine characteristics of rats in a sex- and age-dependent manner. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological physiology and experimental therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(3): 37-53. (In Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.03.37-53

Author's contribution: concept and design of the study – Mavrenkova P.V., Khlebnikova N.N., Karganov M.Yu.; collection of material – Mavrenkova P.V., Khlebnikova N.N., Alchinova I.B.; Demorzhi M.S., technical preparation of the material – Poroshina A.S., Shoibonov B.B., preparation of illustrative material for publication, writing the text – Mavrenkova P.V.; editing the text – Khlebnikova N.N., Karganov M.Yu. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: *Mikhail Yu. Karganov*, e-mail: mkarganov@mail.ru

Information about the authors:

Mavrenkova P.V., <https://orcid.org/0000-0001-6987-0096>

Khlebnikova N.N., <https://orcid.org/0000-0002-0245-305X>

Alchinova I.B., <https://orcid.org/0000-0001-5294-7317>

Shoibonov B.B., <https://orcid.org/0000-0001-7061-6706>

Poroshina A.S., <https://orcid.org/0000-0002-0400-2201>

Demorzhi M.S., <https://orcid.org/0000-0001-7190-4304>

Karganov M.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-5862-8090>

Funding. The study was carried out as part of a state assignment on the topic: «Assessment of the body's adaptive reactions to the action of physicochemical and environmental factors» (No. FGFU-2022-0010).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 11.07.2024

Accepted 29.08.2024

Published 27.09.2024

Введение

Переживание неблагоприятных событий в детстве, часто называемое стрессом раннего возраста (СРВ), является существенным фактором риска развития нервно-психических и соматических нарушений в дальнейшей жизни [1]. Патофизиологические механизмы расстройств, связанных с СРВ, изучены далеко не полностью. Наличие в анамнезе СРВ/детской травмы связывают с периферической иммунной дисрегуляцией и формированием провоспалительного фенотипа во взрослом возрасте, причем специфические профили воспаления зависят от конкретного типа травматического события [2]. Было высказано предположение, что провоспалительные цитокины, высвобождающиеся под влиянием СРВ, вызывают системные эффекты, выходящие далеко за пределы канонического иммунного ответа, вмешиваясь, в частности, в развитие и созревание мозга [3], а также стимулируют секрецию глюкокортикоидов, оказывающих плейотропное действие на организм, в том числе, модулирующих функционирование гипоталамо-гипофизарно-адреналовой оси (ГГА).

Моделирование на грызунах симптомов расстройств, вызванных СРВ, позволяет изучать их патогенез в контролируемых условиях и генетически однородных популяциях. Для млекопитающих стресс сепарации от матери (МС) в неонатальный период развития детенышей является существенным средовым фактором риска, способным вызвать или демаскировать психопатологический фенотип у взрослых животных [4]. Модификации МС могут приводить к специфическим нарушениям поведения крыс в подростковом и взрослом возрасте, устойчивым сдвигам в функционировании ГГА и нарушению механизмов адаптации к стрессу. Ранее мы показали, что СРВ, вызванный многократным 6-часовым отделением детенышей от матери и сиблингов в условиях комнатной температуры, приводил к формированию гиперактивного фенотипа у молодых взрослых крыс [5]. Иммунная система играет, по-видимому, существенную роль в процессах формирования поведенческих нарушений, а также стрессоустойчивости/стрессоуязвимости взрослых особей, модулируя нейроэндокринные взаимодействия, развитие и функционирование центральной нервной системы (ЦНС) [6]. В настоящее время получены доказательства взаимовлияния ЦНС и периферической иммунной системы [3]. Статус периферической иммунной системы влияет на функции нейронов головного мозга, что может приводить к изменению поведения: снижению/повышению двигательной

активности, нарушению социального взаимодействия, изменению болевой чувствительности, эмоциональной дисрегуляции [6].

Взаимовлияние иммунной системы и ГГА модулирует регуляцию стресс-ответа. Глюкокортикоиды связываются с рецепторами иммунных клеток на периферии и в головном мозге, вызывая либо про-, либо противовоспалительный эффект, в зависимости от уровня гормонов, продолжительности их действия и анализируемой структуры/органа [7]. Провоспалительные цитокины, в свою очередь, активируют ГГА, увеличивая высвобождение адренокортикотропного гормона и кортикостерона [6]. Изменение профиля циркулирующих цитокинов, индуцированное СРВ, может быть одним из патофизиологических механизмов развития стойких дисфункций ГГА и предрасположенности к нервно-психическим нарушениям.

Расстройства, связанные с нарушением регуляции гормонов стресса, встречаются с разной частотой у мужчин и женщин, могут проявляться специфическими для пола симптомами в ответ на одинаковое аверсивное воздействие и иметь различные физиологические маркеры [8]. В связи с этим включение пола в качестве биологической переменной в доклинические исследования является важным аспектом современного подхода к изучению взаимосвязи между воздействием стресса и нейроиммуноэндокринным ответом. Данные литературы о половой и возрастной специфике в активности ГГА, нейровоспалительных реакциях и сывороточном цитокиновом профиле у грызунов, подвергнутых хроническому стрессу, в том числе стрессу МС, достаточно противоречивы [9].

Целью данного исследования было изучение влияния хронического стресса сепарации от матери и однопометников в неонатальном периоде на цитокиновый профиль и функциональную активность классического пути системы комплемента, а также на массу органов-маркеров стресса и уровень кортикостерона у молодых взрослых животных обоего пола, а также у крыс подросткового и старшего возраста.

Методика

Исследование выполнено на крысах Вистар, выращенных в виварии ФБГНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», регистрация в системе «Меркурий» – RU 1487336. Беременных и кормящих самок, а в дальнейшем животных опытных и контрольных групп содержали в стандартных условиях вивария с естественной сменой освещённости и свободным доступом к воде (водопроводная вода) и пище (сбалансированный грану-

лированный корм для грызунов ООО «Лаборатор-корм», Россия, Москва). Все манипуляции с животными были одобрены Этическим комитетом НИИ общей патологии и патофизиологии (протокол № 2-22 от 12 мая 2022 г.) в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016, ГОСТ 33215-2014, 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными».

Дизайн исследования. После спаривания беременных самок содержали в индивидуальных пластиковых клетках (36×20×14 см) до момента родов (0-й постнатальный день, ПНД-0). На следующий день (ПНД-1) потомство перераспределяли по кормящим самкам таким образом, что каждая самка выкармливала 6-8 детенышей (равное количество самок и самцов) из разных пометов, рожденных в один и тот же день. Эти смешанные пометы были случайным образом разделены на две группы. Одну группу составили детеныши, которые подвергались процедуре ежедневной сепарации от матери и изоляции от однопометников (МСИ). В контрольную группу (КОН) вошли крысята, которые оставались с кормящей самкой. В ПНД-24 животных одного пола, вскормленных одной самкой, отсаживали от самок в новые клетки (57×37×19 см).

Часть случайно выбранных самцов (КОН, $n=11$; МСИ, $n=10$) и самок (КОН, $n=9$; МСИ, $n=10$) декапитировали в ПНД-28 (возраст 1 мес) для получения образцов тканей и биологических жидкостей. Остальных животных не беспокоили (за исключением еженедельной чистки клеток) вплоть до тестирования поведения в ПНД-56-60 (2 мес), после чего еще часть животных была декапитирована (самцы: КОН, $n=12$; МСИ, $n=16$; самки: КОН, $n=13$; МСИ, $n=13$). У оставшихся крыс поведение оценивали повторно в ПНД-308-311 (11 мес); на данном сроке наблюдения тестирование проводили в сокращенном объеме. После завершения измерений животных также декапитировали (самцы: КОН, $n=17$; МСИ, $n=8$; самки: КОН, $n=15$; МСИ, $n=6$). Оценивали массу стресс-органов, функциональную активность классического пути системы комплемента крови и измеряли содержание цитокинов/хемокинов и кортикостерона (КОРТ) в образцах сыворотки крови.

Сепарация от матери и изоляция от однопометников. Процедуру МСИ проводили, как описано ранее [9]. Вкратце, в ПНД-2-18 крысят МСИ групп подвергали ежедневной изоляции в период 10-18 ч. Каждого детеныша помещали в пластиковый контейнер (6×6×5 см), со свежей подстилкой и переносили в соседнее по-

мещение с температурой 21-23°C. Через 6-8 часов крысят возвращали в домашние клетки. Детенышей контрольной группы ежедневно брали в руки и немедленно возвращали самке.

Оценка поведения. В возрасте 1 мес поведение животных не оценивали. В возрасте 2 мес оценку локомоторного и исследовательского поведения проводили по показателям горизонтальной и вертикальной активности в тестах «автоматизированное открытое поле» (аОП) и классическое «ОП с визуальным наблюдением» (кОП). Эти тесты различаются степенью аверсивности для крыс, в частности, размером и формой открытого пространства и интенсивностью освещения. Условия кОП являются более стрессорирующими для грызунов. Тревожноподобное поведение тестировали в приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ). Для оценки социального поведения крыс использовали тест социального взаимодействия (ТСВ) и трехкамерный социальный тест (ТСТ). Испытания проводили в дневное время с 9.00 до 17.00; клетки с контрольными и опытными животными чередовали (КОН-МСИ-КОН-МСИ и т.д.) для снижения влияния фактора суточной активности. Каждую крысу тестировали только один раз в сутки, интервал между тестами составлял не менее 24 часов. Подробное описание тестов приведено в статье [5]. В возрасте 11 мес тесты кОП и ТСТ не проводили.

Оценка состояния иммунной и стресс-реактивной систем

Получение биологических образцов. Сбор образцов сыворотки крови проводили в интервале 10.00-15.00 ч, чередуя крыс МСИ и КОН. Сразу после декапитации смешанную венозную и артериальную кровь собирали в пробирки VacPlus («Санамедикал», Россия) с активатором свертывания (SiO_2) и разделительным гелем и центрифугировали 15 мин при 2000 g. Образцы сыворотки крови хранили при температуре -80°C до проведения биохимических исследований. Определяли массу органов-маркеров стресса – селезенки, надпочечников и тимуса. Надпочечники помещали в формальдегид для дальнейшего гистологического исследования.

Мультиплексный анализ цитокинов. Эта часть исследований выполнена на базе ФГБУ «ГНЦ-Институт иммунологии» ФМБА России. Для количественной оценки содержания цитокинов/хемокинов/факторов роста в сыворотке крови крыс использовали набор MILLIPLEX map Kit («Millipore-Merck», Дармштадт, Германия), предназначенный для одновременного определения 27 анализатов: интерлейкинов ИЛ-1 α , ИЛ-1 β ,

ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12(p70), ИЛ-13, ИЛ-17A, ИЛ-18; ИФН γ ; ФНО α ; гранулоцитарных колониестимулирующих факторов (granulocyte colony-stimulating factor) G-CSF, GM-CSF; эпидермального фактора роста (epidermal growth factor) EGF; эотаксина, фракталкина, лептина, моноцитарного хемотаксического белка (monocyte chemoattractant protein) MCP-1; индуцируемого ИФН- γ белка IP-10; липополисахарид-индуцируемого хемокина (lipopolysaccharide-induced chemokine) LIX; воспалительных белков макрофагов (macrophage inflammatory proteins) MIP-1 α , MIP-2; васкулярного эндотелиального фактора роста (vascular endothelial growth factor) VEGF; RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted); GRO/KC/CINC-1. Определение проводили по протоколу производителя. Образцы сыворотки крови разводили средой в два раза, чтобы максимизировать чувствительность к исходным уровням цитокинов. Тестируемый образец объемом 25 мкл инкубировали с магнитными сферами, покрытыми антителами, в течение 30 мин. После захвата аналита сферой добавляли детектирующее антитело с биотином. Затем реакционную смесь инкубировали с конъюгатом стрептавидин-фикоэритрин в течение 10 мин для завершения реакции на поверхности каждой микросферы. В наборе используются 2 флуорохрома, что позволяет получать разные спектральные характеристики для идентификации и количественного определения аналита. Интенсивность флуоресценции детектирующих антител и стрептавидин-ПЭ оценивали с помощью анализатора MAGPIX (Luminex Corporation, Остин, Техас, США) и его программного обеспечения.

Большая часть образцов цитокинов была измерена, за исключением нескольких аналитов, для которых значительное (60% и более) число проб показало результаты ниже чувствительности метода: GM-CSF на всех сроках тестирования, ИЛ-13 в возрасте 1 мес, ИЛ-4 в возрасте 1 и 2 мес, ИЛ-1 α в возрасте 1 и 11 мес, ИЛ-6 и MIP-2 в возрасте 11 мес. Эти цитокины были исключены из дальнейшего анализа.

Оценка функциональной активности системы комплемента. Определение функциональной активности классического пути системы комплемента крысы проводили с использованием реакции лизиса эритроцитов человека группы А системы АВ0. Реакцию комплемент-зависимого лизиса оценивали турбидиметрически по снижению оптической плотности суспензии эритроцитов при длине волны 620 нм [10]. Степень лизиса эритроцитов в экспериментальных образцах определяли по калибровочному графику, где контроль представлял собой 0% лизиса, а полный лизис – 100%.

Определение уровня кортикостерона в сыворотке крови. Содержание КОРТ в образцах сыворотки крови определяли методом ИФА с использованием набора EIA-14F1 (IDS, Великобритания) в соответствии с рекомендациями производителя. Абсорбцию измеряли на микропланшетном фотометре Immunochem-2100 (High Technology, Inc., США) при 450 нм (длина волны сравнения 650 нм). Для экстраполяции данных была построена 4-параметровая логическая кривая с использованием ресурса Myassays.com. Реальную концентрацию КОРТ рассчитывали с учетом коэффициента разведения.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения Statistica 8 (TIBCO Software Inc., США). Первоначально данные проверяли на нормальность распределения и однородность дисперсий. Если гипотезу о нормальности распределения данных принимали, то для сравнения средних значений нескольких независимых выборок применяли двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с учетом факторов «пол» (самки/самцы) и «группа» (МСИ/КОН). Данные анализировали отдельно для каждого изучаемого параметра. Апостериорное сравнение средних значений дисперсионного комплекса проводили по критерию Ньюмана–Кеулса (Newman-Keuls test). Данные представлены как $M \pm s.e.m.$ Значение $p < 0.05$ считалось статистически значимым. При отвержении гипотезы о нормальном распределении данных использовали непараметрический двусторонний U-критерий Манна–Уитни для независимых переменных. Для поправки на множественность сравнений рассчитывали критическое значение p ($p_{кр}$) для каждого сравнения по методу FDR-контроля. В этом случае данные представлены как $Me [Q1, Q3]$.

Результаты

Поведение животных

Результаты анализа паттернов поведения двухмесячных крыс-МСИ и крыс, выращенных с матерью, подробно описаны ранее [5] и в данной работе приведены в обобщенной форме (табл. 1). В возрасте 2 мес крысы-МСИ обоего пола демонстрировали повышенную локомоторную и исследовательскую активность, сниженную тревожность и повышенную агрессивность по сравнению с КОН. В ТСТ у самцов-МСИ наблюдали сниженное по сравнению с КОН предпочтение конспецифика несоциальному объекту (социальное предпочтение) и повышенное предпочтение незнакомого крысы (социальная новизна); самки-МСИ

не отличались от КОН по социальному предпочтению, и в меньшей степени, чем КОН, интересовались новым социальным объектом.

В возрасте 11 мес в тесте аОП выявлено влияние фактора «пол» на суммарную локомоторную активность [F(1, 42)=15.72, p=0.0003], влияние фактора «группа» не достигало уровня статистической значимости [F(1, 42)=3.20, p=0.08]. В динамике наблюдения горизонтальная двигательная активность в группе МСИ превышала таковую у контрольных животных только в отдельных точках (рис. 1, А, Б). В обеих группах локомоторная активность у самок была выше, чем у самцов той же группы. Исследовательская активность у крыс-МСИ и КОН статистически значимо не различалась [F(1, 42)=0.24, p=0.62]. В группе КОН число стоек у самок было больше, чем у самцов [F(1, 42)=6.39, p=0.01] (рис. 1, В).

В тесте ПКЛ выявлено влияние только фактора «пол» на исследовательскую активность: число [F(1, 42) = 7.79, p=0.007] и продолжительность [F(1, 42) = 6.62, p=0.013] стоек у самок были больше, чем у самцов (соответственно 10.2 ± 1.0 vs 6.6 ± 0.7; 27.1 ± 3.2 с vs 17.0 ± 2.5 с). На величину общего пробега влиял фактор «пол» [F(1, 42)= 10.08, p=0.003], выявлено взаимодействие факторов «пол×группа» [F(1, 42)= 8.22, p=0.006], однако при апостериорном сравнении (Newman-Keuls test) статистически значимые различия между группами не были обнаружены (рис. 2, А). На предпочтение ОР влиял как фактор «пол» [F(1, 42)= 14.56, p=0.0004], так и фактор «группа» [F(1, 42)= 4.12, p=0.048]. Самки-МСИ чаще заходили в открытые рукава (ОР) (данные не приведены) и больше времени проводили в ОР по сравнению с самками-КОН и с самцами-МСИ (рис. 2, Б). Самки-МСИ

демонстрировали большее число и продолжительность свешиваний в ОР по сравнению с другими группами (рис. 2, В, Г), тогда как у самцов-МСИ наблюдали больше реакций груминга, превышающих по продолжительности величину этого показателя у самцов-КОН и самок-МСИ (рис. 2, Д, Е).

В ТСВ у самцов-МСИ наблюдали большее число (6.0 [2.0;13.0]) и продолжительность (30.5 [15.5; 45.0] с) агрессивных контактов по сравнению с самцами-КОН (0.0 [0.0; 3.5] и 0.0 [0.0; 4.0] соответственно), однако различия не достигали уровня статистической значимости и сохранялись только в тенденции (p=0.07 и p=0.05 для числа и продолжительности агрессивных контактов соответственно, Mann-Whitney U Test). Самки-МСИ не отличались от КОН, а самки в целом не отличались от самцов соответствующих групп по показателям ТСВ.

Оценка состояния иммунной и стресс-реактивной систем

Содержание цитокинов/хемокинов в сыворотке крови крыс. В возрасте 1 мес уровень лептина был снижен у крыс-МСИ обоего пола по сравнению с соответствующим КОН, а уровни VEGF и фракталкина – только у самцов-МСИ; у самцов-МСИ отмечен повышенный по сравнению с КОН уровень ИЛ-5 (табл. 2). Анализ профиля цитокинов показал, что содержание ряда цитокинов у самок было выше, чем у самцов: ИЛ-2, ИФН-γ, ИЛ-18, IP-10, эотаксин, ИЛ-5, MIP-1alfa, MCP-1 в группе КОН (рис. 3, А, Б); MIP1-alfa, ИЛ-18, VEGF, фракталкин – в группе МСИ (рис. 3, В, Г).

В возрасте 2 мес при межгрупповом сравнении выявлено, что у самок-МСИ было увеличено содержа-

Таблица 1/Table 1

Направленность изменений паттернов поведения у крыс, выращенных в условиях сепарации от матери, по сравнению с крысами, выращенными с матерью, в возрасте 2 месяцев

The direction of changes in behavior patterns in rats raised in conditions of maternal separation, compared with rats raised with the mother, at the age of 2 months

Тесты	аОП		ПКЛ	ТСВ		ТСТ	
	Локомоторная активность	Исследовательская активность	Уровень тревожности	Социальность	Агрессивность	Социальное предпочтение	Социальная новизна
Самцы	↑↑	↑	↓	=	↑↑	↓	↑
Самки	↑↑	↑	↓	=	↑	=	↓

Примечание. ↑ увеличение эффекта; ↓ уменьшение эффекта; = не отличается от контрольных значений; аОП – автоматизированное открытое поле, ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт; ТСВ – тест социального взаимодействия; ТСТ – трехкамерный социальный тест.
Note. ↑ increase in effect; ↓ decrease in effect; = does not differ from the control values; аОП – an automated open field, ЕСМ – an elevated cruciform maze; TSI – a test of social interaction; TST – a three-chamber social test.

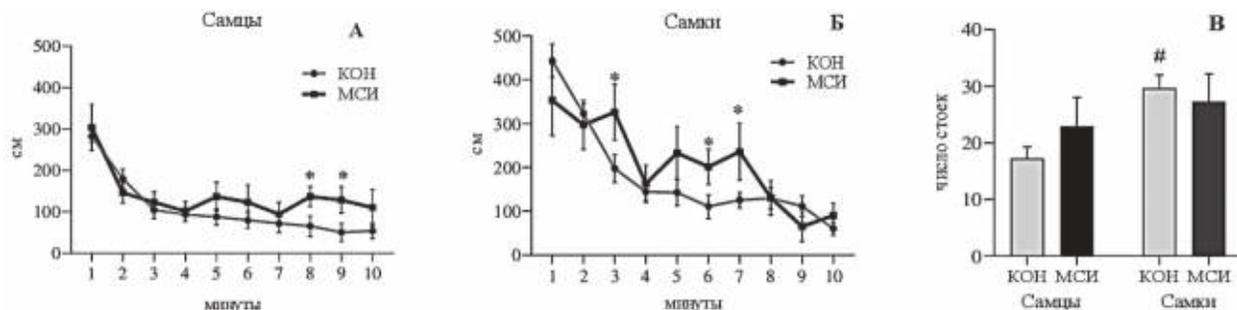


Рис. 1. Локомоторная активность самцов (А) и самок (Б) крыс, подвергнутых неонатальной сепарации от матери (МСИ, квадратики), и крыс, выращенных с матерью (КОН, кружки), и суммарная (за 10 мин) исследовательская активность крыс (В) в возрасте 11 мес. * $p < 0.05$ по сравнению с КОН, # $p < 0.05$ по сравнению с самцами соответствующей группы (Newman-Keuls test).

Fig. 1. Locomotor activity of male (A) and female (B) rats exposed to the neonatal maternal separation (MSI, squares) and rats raised with their mother (CON, circles), and the total (in 10 min) exploratory activity of rats (C) at the age of 11 months. * $p < 0.05$ compared to CON, # $p < 0.05$ compared to males of the corresponding group (Newman-Keuls test).

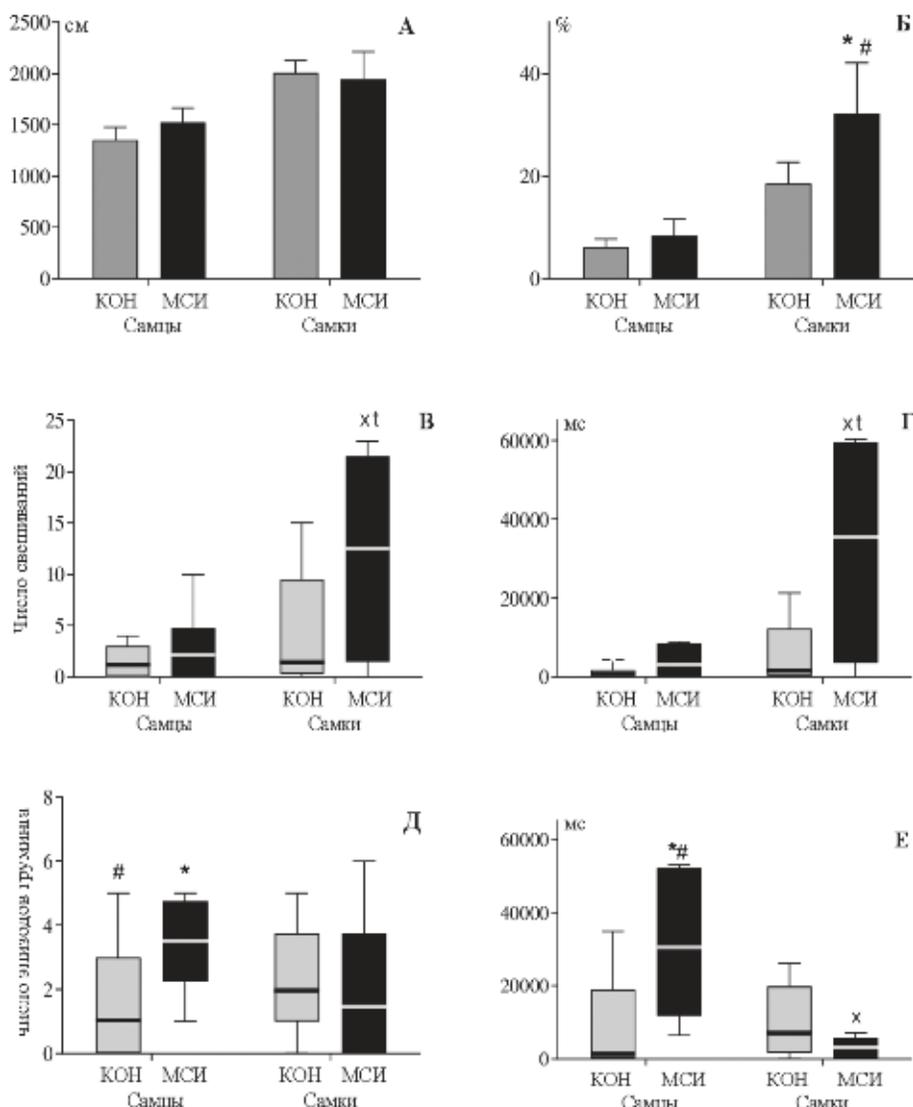


Рис. 2. Показатели поведения в приподнятом крестообразном лабиринте самцов и самок крыс в возрасте 11 мес, подвергнутых в неонатальный период сепарации от матери (МСИ), по сравнению с контрольными крысами (КОН), выращенными с матерью. А) общий пробег; Б) предпочтение открытых рукавов (по длительности пребывания в отсеке); В) и Г) число и длительность свешивания из открытых рукавов; Д) и Е) число и длительность груминга. Для А и Б результаты представлены в виде $M \pm s.e.m.$, Newman-Keuls test; для В – Е – Медиана [Q1; Q3]; Mann-Whitney U Test, * $p < p_{кр}$; $p_{кр} < p < 0.05$ по сравнению с КОН, # $p < p_{кр}$; $p_{кр} < p < 0.05$ по сравнению с животными другого пола.

Fig. 2. Characteristics of behavior in the elevated plus maze of male and female rats at the age of 11 months, exposed to the neonatal maternal separation (MSI), compared with the control rats (CON) raised with their mother. А) total distance; Б) preference of open arms (for the duration of stay in the compartment); С) and Д) the number and duration of hanging from the open arms; Е) and F) the number and duration of grooming. For А and B, the results are presented as $M \pm s.e.m.$, Newman-Keuls test; for С – Е – Median [Q1; Q3]; Mann-Whitney U Test, * $p < p_{cr}$; $p_{cr} < p < 0.05$ compared to CON, # $p < p_{cr}$; $p_{cr} < p < 0.05$ compared to animals of the other sex.

ние ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-12-Р70 и LIX, а содержание IP-10, ИЛ-10 и фракталкина было снижено по сравнению с самками-КОН (табл. 2). У самцов-МСИ были повышены уровни IP-10 и LIX. У самок по сравнению с самцами в группе КОН содержание ИЛ-5 было снижено, а содержание IP-10 повышено; в группе МСИ были снижены уровни ИЛ-1β, ИЛ-10, фракталкина и IP-10.

В возрасте 11 мес у самок-МСИ по сравнению с КОН уровень IP-10 был повышен, а уровни MIP1-alfa, ИЛ1-beta, ИЛ-2, ИЛ-10, ИЛ-18, VEGF и фракталкина были снижены (табл. 2). У самцов различия в уровнях цитокинов не были выявлены. Отличия в содержании цитокинов у самок и самцов в группе КОН отмечены только на уровне тенденции (рис. 3, И, К),

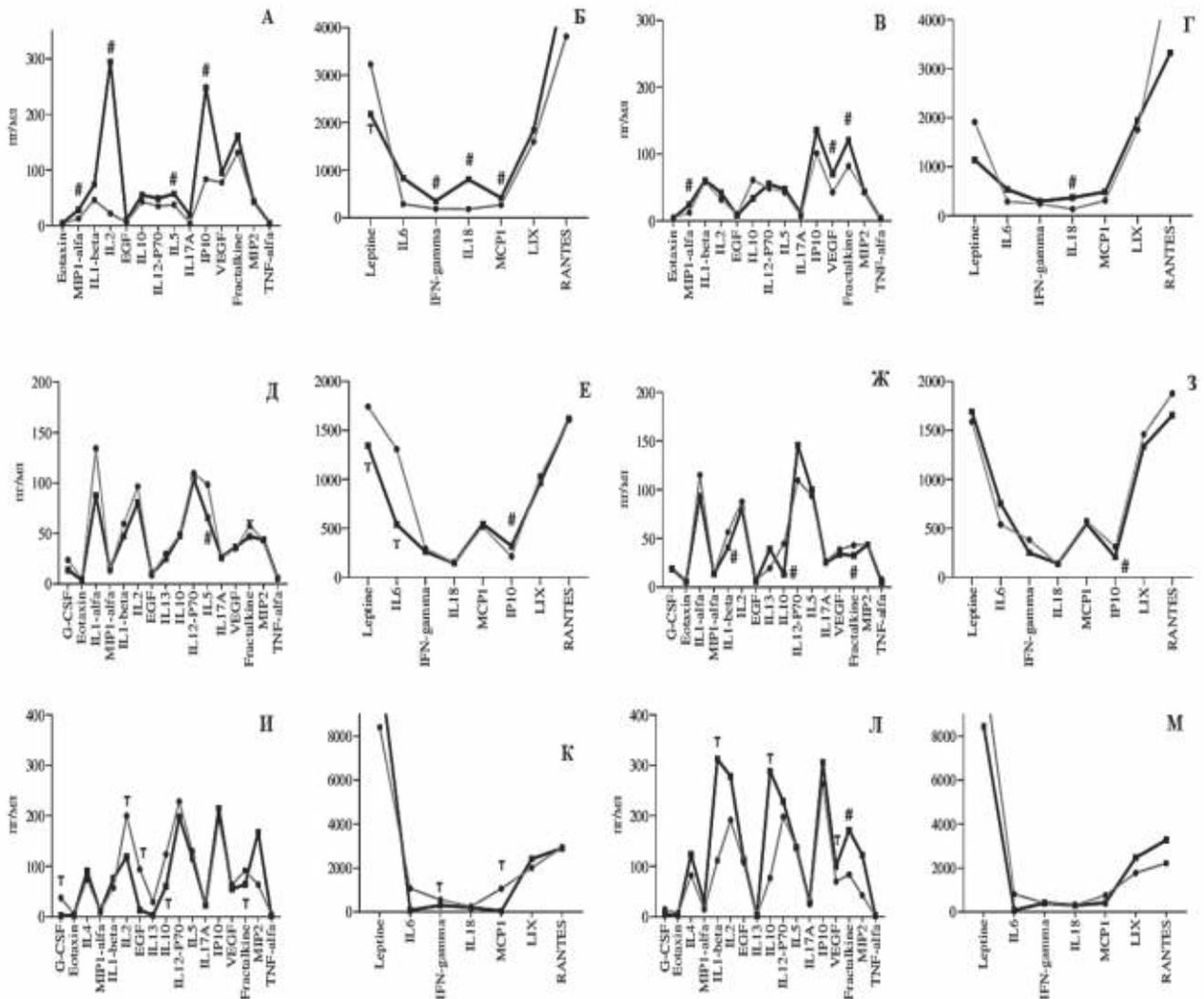


Рис. 3. Цитокиновый профиль самцов (серая линия, кружки) и самок (черная линия, квадратики) крыс, выращенных с матерью (КОН, А, Б, Д, Е, И, К), и крыс, подвергнутых стрессу сепарации от матери (МСИ, В, Г, Ж, З, Л, М). А-Г – в возрасте 1 мес, Д-З – в возрасте 2 мес, И-М – в возрасте 11 мес # $p < p_{кр}$; $p_{кр} < \#p < 0.05$; $T < 0.1$ по сравнению с самцами соответствующей группы (Mann–Whitney U Test). Межквартильные разбросы не приведены для облегчения восприятия рисунков.

Fig. 3. Cytokine profiles of males (gray line, circles) and females (black line, squares) of rats raised with their mother (CON, A, B, D, E, I, K), and rats exposed to the neonatal maternal separation (MSI, C, D, W, Z, L, M). A-G – at the age of 1 month, D-Z – at the age of 2 months, I-M – at the age of 11 months. # $p < p_{cr}$; $p_{cr} < \#p < 0.05$; $T < 0.1$ compared to males of the corresponding group (Mann–Whitney U Test). The interquartile ranges are not given to facilitate the perception of the figures.

Таблица 2/Table 2

Содержание некоторых цитокинов/хемокинов в сыворотке крови самцов и самок крыс подросткового и взрослого возраста, подвергнутых в неонатальном периоде сепарации от матери (МСИ) или выращенных с матерью (КОН)

The content of certain cytokines/chemokines in the blood serum of male and female adolescent and adult rats subjected to neonatal maternal separation (MSI) or raised with their mother (CON)

	Самцы		Самки	
	КОН	МСИ	КОН	МСИ
1 месяц				
VEGF	80.3 [46.3; 129.6]	42.8* [31.7; 82.1]	95.0 [49.1; 1073.5]	70.2 # [33.6; 1514.9]
Фракталкин	134.2 [74.2; 287.9]	82.1* [49.5; 202.3]	161.3 [67.8; 2630.6]	121.1 # [59.6; 2834.6]
Лептин	3491.9 [1875.1; 6664.1]	1916.4* [297.8; 3727.3]	2178.3(#) [1786.9; 4341.6]	1141.8* [206.4; 3159.1]
ИЛ-5	37.6 [24.9; 48.1]	47.8^x [24.9; 69.3]	57.2 [3.2; 17.4]	47.4 [14.0; 73.2;]
2 месяца				
IP-10	213.1 [112.8; 350.7]	311.6* [177.1; 596.7]	291.2 # [181.0; 562.1]	207.1*# [164.7; 321.4]
ИЛ-6	1307.6 [293.0; 5822.9]	539.6 [293.0; 1475.4]	539.6 [140.6; 1132.8]	753.3^x [293.0; 1307.6]
ИЛ-10	49.2 [13.3; 151.8]	44.7 [22.2; 124.6]	74.0 [13.3; 488.8]	13.3*# [8.8; 55.2]
ИЛ-12-P70	109.7 [74.3; 283.7]	109.6 [61.9; 195.3]	101.1 [41.9; 153.6]	145.6^x [74.3; 174.7]
ИЛ-5	98.4 [73.2; 184.0]	93.7 [557.2; 1148.2]	65.5 [24.9; 106.0]	100.0^x [73.2; 117.4]
VEGF	35.2 [26.7; 60.0]	38.7 [29.6; 43.5]	38.0 [29.6; 47.7]	31.7 ^T [26.7; 36.4]
Фракталкин	57.5 [29.3; 128.9]	43.1 [23.6; 1595.3]	49.5 [26.4; 89.1]	32.6^x [17.7; 48.7]
LIX	1029.0 [612.8; 1512.9]	1459.7 ^x [723.5; 2233.4]	963.1 [509.7; 2107.7]	1406.4^x [976.5; 1705.8]
Лептин	1842.0 [898.9; 3923.7]	1587.1 [1116.9; 2967.1]	1343.1 (#) [594.9; 2531.1]	1689.1 [1257.6; 2221.0]
11 месяцев				
IP 10	215.1 [40.5; 308.3]	190.5 [131.8; 365.4]	305.9 # [277.3; 592.9]	263.1* # [64.5; 582.3]
MIP-1α	12.2 [4.5; 21.4]	14.7 [8.3; 45.7]	10.5 [5.5; 19.9]	27.4*^T [10.1; 96.7]
ИЛ-1β	57.3 [19.7; 199.7]	111.5 [17.8; 240.3]	75.9 [34.6; 178.5]	312.1*^T [74.2; 647.3]
ИЛ-2	199.7 [33.3; 306.0]	191.5 [4.8; 319.4]	119.0 [3.4; 241.9]	278.3^x [99.4; 1740.4]
ИЛ-10	123.4 [34.0; 202.2]	76.9 [34.0; 835.2]	60.4 [14.3; 152.8]	288.2*# [123.4; 699.4]
VEGF	63.4 [23.4; 108.9]	69.7 [35.7; 145.9]	54.7 [23.4; 93.4]	99.9* [66.2; 378.9]
Фракталкин	91.7 [24.7; 152.0]	83.3 [55.9; 205.0]	64.2 [10.7; 107.9]	171.4* [116.5; 726.7]
ИЛ-18	247.0 [56.2; 411.3]	294.9 [127.1; 664.9]	189.2 [110.5; 354.2]	294.8 ^x [204.1; 2041.1]

Примечание. * $p < p_{гр.}, p_{гр} < x p < 0.05$ и $T p = 0.1$ по сравнению с КОН, # $p < p_{гр.}$; (#) $p < 0.08$ по сравнению с самцами той же группы.

Note. * $p < p_{gr.}, p_{gr} < x p < 0.05$ and $T p = 0.1$ compared to CON, # $p < p_{gr.}$; (#) $p < 0.08$ compared to males of the same group.

в группе МСИ у самок статистически значимо был повышен уровень фракталкина (рис. 3, К, М).

Функциональная активность классического пути системы комплемента в сыворотке крови крыс. В возрасте 1 мес все животные показали низкую функциональную активность системы комплемента в отношении эритроцитов человека (рис. 4, А). Внутригрупповых и межгрупповых различий не обнаружено.

В возрасте 2 мес выявлено взаимодействие факторов «пол × группа» [$F(1, 51)=9.68, p=0.003$]: у самцов-МСИ лизис эритроцитов был ниже, а у самок выше, чем у соответствующих контрольных животных (рис. 4, Б).

В возрасте 11 мес животные обоего пола демонстрировали высокую функциональную активность системы комплемента, однако статистически значимых отличий между группами по этому показателю не обнаружено (рис. 4, В).

Уровень кортикостерона в сыворотке крови крыс. В возрасте 1 мес выявлено влияние фактора «пол» [$F(1, 35)=5.08, p=0.03$] и взаимодействие факторов «пол × группа» [$F(1, 35)=4.95, p=0.03$] на базовый уровень КОРТ в сыворотке крови. У самок-КОН уровень КОРТ был выше, чем у самцов, в группе МСИ половых различий в содержании КОРТ не выявлено (рис. 5, А). При межгруппо-

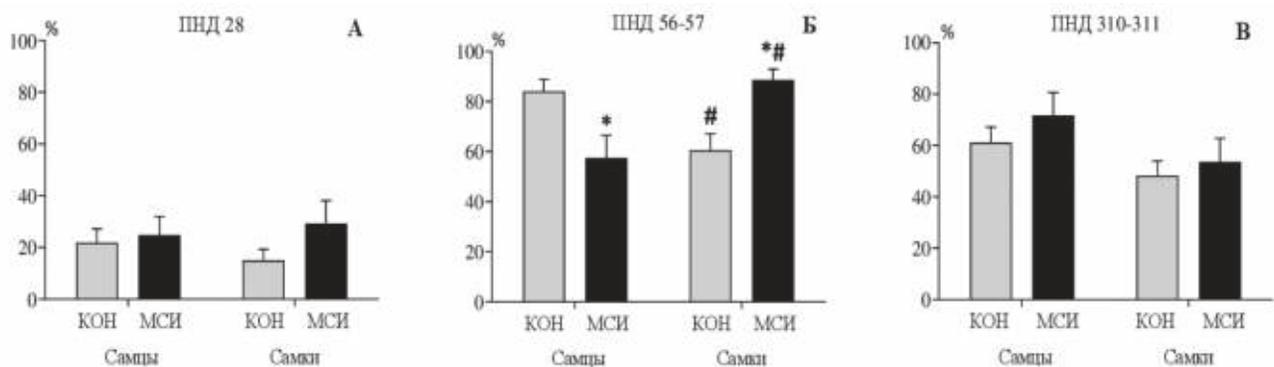


Рис. 4. Функциональная активность системы комплемента самцов и самок крыс, подвергнутых в неонатальном периоде сепарации от матери (МСИ) или выращенных с матерью (КОН), в возрасте 1 мес (А), 2 мес (Б) и 11 мес (В). * $p<0.05$ по сравнению с КОН. # $p<0.05$ по сравнению с самцами той же группы (Newman-Keuls test)

Fig. 4. Functional activity of the classical pathway of the complement system of male and female rats exposed to the neonatal maternal separation (MSI) or raised with their mother (CON), at the age of 1 month (A), 2 months (B) and 11 months (C). * $p<0.05$ compared to CON. # $p<0.05$ compared to males of the same group (Newman-Keuls test).

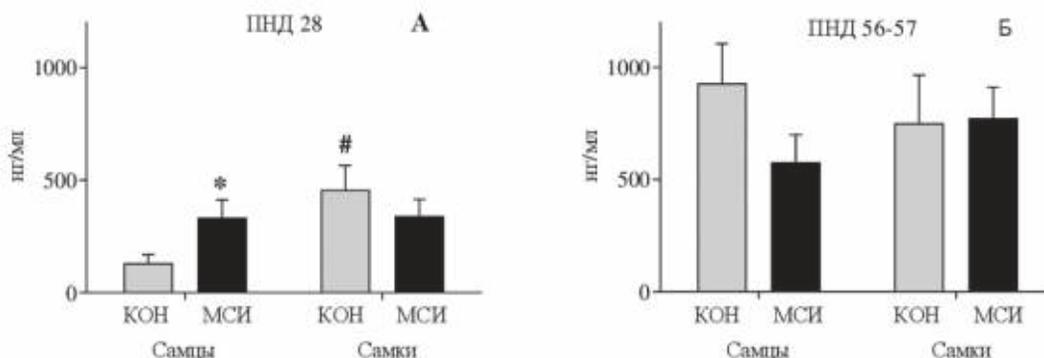


Рис. 5. Содержание кортикостерона в сыворотке крови самцов и самок крыс в возрасте 1 мес (А) и 2 мес (Б). МСИ – крысы, подвергнутые неонатальной сепарации от матери и однопометников, КОН – крысы, выращенные с матерью. * $p=0.047$ по сравнению с КОН. # $p=0.016$ по сравнению с самцами соответствующей группы (Newman-Keuls test).

Fig. 5. The corticosterone content in the blood serum of male and female rats aged 1 month (A) and 2 months (B). MSI – the rats exposed to the neonatal maternal separation (MSI), CON – rats raised with their mother. * $p=0.047$ compared to CON. # $p=0.016$ compared to males of the corresponding group (Newman-Keuls test).

вом сравнении у самцов-МСИ обнаружен повышенный уровень КОРТ по сравнению с самцами-КОН.

В возрасте 2 мес не выявлено статистически значимых различий в содержании КОРТ при межгрупповом и внутригрупповом сравнении (рис. 5, Б). В возрасте 11 мес уровень КОРТ не оценивали.

Вес органов-маркеров стресса. В возрасте 1 мес выявлено влияние фактора «пол» на абсолютный $[F(1, 35)=5.05, p=0.03]$ и относительный $[F(1, 35)=5.53, p=0.02]$ вес селезенки и фактора «группа» – на абсолютный $[F(1, 35)=14.73, p=0.0005]$ и относительный $[F(1, 35)=19.7, p<0.0003]$ вес тимуса. В группе МСИ вес тимуса был меньше, чем в группе КОН: у самцов – статистически значимо, у самок $p=0.08$ (рис. 6). Относительный вес селезенки у самок-КОН был самым большим и превышал значение показателя у самцов-КОН и самок-МСИ (рис. 6). На остальные показатели оцениваемые факторы не влияли. Взаимодействия факторов также не обнаружено.

В возрасте 2 мес выявлено влияние фактора «пол» на абсолютный $[F(1, 51)=37.99, p<0.0001]$ и относительный $[F(1, 51)=77.65, p<0.0001]$ вес надпочечников и относительный вес тимуса $[F(1, 51)=4.68, p=0.03]$. Фактор «группа» влиял на относительный вес тимуса $[F(1, 51)=6.97, p=0.01]$ и селезенки $[F(1, 51)=5.09, p=0.03]$. Взаимодействие факторов «пол × группа» обнаружено для относительного веса надпочечников $[F(1, 51)=4.66, p=0.03]$, абсолютного $[F(1, 51)=5.18, p=0.03]$ и относительного $[F(1, 51)=6.19, p=0.02]$ веса селезенки. В группе МСИ по сравнению с КОН у самцов был больше относительный вес надпочечников и селезенки, у самок – относительный вес тимуса (рис. 6).

В возрасте 11 мес фактор «пол» влиял на вес тела животных и абсолютный и относительный вес всех стресс-органов [во всех случаях $F(1, 42) \geq 11.41, p \leq 0.002$], а фактор «группа» – на абсолютный $[F(1, 42)=12.13, p=0.001]$ и относительный $[F(1, 42)=7.39, p=0.009]$ вес тимуса.

Обсуждение

Поведение животных. В нашем исследовании многократное отлучение новорожденных крысят от матери в критический период развития мозга и созревания ГГА приводило к формированию у молодых взрослых животных гиперактивного фенотипа, характеризующегося высокой локомоторной и исследовательской активностью и сниженным уровнем тревожности. Эти признаки сохранялись в возрасте 11 мес (хотя были менее выражены) и проявлялись преимущественно у самок. Самцы-МСИ демонстрировали признаки эмоционального напряжения в тесте ПКЛ. Возможные

биохимические механизмы этих нарушений подробно обсуждались ранее [5].

Клинические наблюдения и экспериментальные исследования показывают, что эффекты СРВ зависят от возраста тестируемых субъектов, однако данные, включая результаты мета-анализов, противоречивы [11]. Отметим, что изучение отдаленных последствий МС у животных чаще всего ограничиваются подростковым и молодым взрослым возрастом. В данной работе мы не оценивали влияние МСИ на поведение крыс в возрасте 1 мес, что накладывает определенные ограничения на интерпретацию полученных данных о связи возрастной динамики содержания цитокинов с психо-эмоциональным состоянием животных. Работ по оценке эффектов МС у крыс среднего и старшего возраста очень мало [12]. В целом, наши данные о меньшей выраженности гиперактивного фенотипа у крыс старшей возрастной группы согласуются с результатами других авторов, хотя нам не удалось найти работы, выполненные в парадигме МС на пожилых самках.

Фактор пола оказывает существенное влияние на эффекты МС, однако результаты отличаются в разных исследованиях, а механизмы, лежащие в основе влияния пола на отдаленные последствия МС, не выяснены до конца [13]. Более того, даже при наличии сходных поведенческих проявлений у взрослых животных, подвергнутых МС, механизмы, ответственные за эти паттерны, могут быть разными у самцов и самок [14].

Физиологические маркеры стресса. В нашей работе МСИ приводила к зависимым от пола и возраста изменениям маркеров стресса (уровня КОРТ и веса надпочечников, тимуса и селезенки) у крыс. Только у самцов-МСИ и только в подростковом возрасте был повышен базальный уровень КОРТ в сыворотке крови. Как у самцов, так и у самок-МСИ подросткового возраста был снижен вес тимуса; у самок, кроме того, был снижен вес селезенки. У молодых взрослых самцов-МСИ отмечена гипертрофия надпочечников и селезенки, у самок-МСИ был увеличен вес тимуса. В зрелом возрасте у самцов-МСИ был снижен вес тимуса, а у самок – вес надпочечников.

Зависимые от пола различия в содержании КОРТ в крови у крыс-подростков наблюдали после длительной (6 ч, ПНД 1-21) МС: базальные уровни гормона были повышены у самцов, но не у самок [15]. С учетом того факта, что ГГА у крыс-подростков развита не полностью [16], высказана гипотеза об активации ГГА тестостероном у самцов в подростковый период. У взрослых животных в подавляющем большинстве исследований не обнаружено влияния МС на исход-

ный уровень КОРТ, но существенно меняется реактивность ГГА [17].

Классическими (по Г. Селье) признаками хронического стресса у крыс считают гипертрофию надпочечников и тимолимфатическую атрофию (уменьшение веса тимуса, лимфатических узлов и селезенки), причем увеличение веса надпочечников и снижение веса тимуса, по-видимому, отражают тяжесть любого стресса, а изменение веса селезенки зависит от типа стресс-воздействия [18]. В доступной литературе нам не удалось найти работы по влиянию МС на вес органов-маркеров стресса, поэтому мы не можем напрямую сопоставить полученные результаты с данными других авторов. Однако снижение веса тимуса у крыс-МСИ

обою пола в подростковом возрасте свидетельствует о вовлеченности иммунной системы в формирование уязвимости/устойчивости к СРВ.

Уровни периферических цитокинов. В настоящем исследовании установлено, что МСИ вызывает у крыс зависящие от пола и возраста изменения периферических уровней ряда про- и противовоспалительных цитокинов/хемокинов (табл. 3).

Мы показали, что у крыс-МСИ обою пола в возрасте 1 мес наряду с уменьшением веса тимуса был снижен уровень адипокина лептина. Известно, что лептин выступает не только в качестве адипостатического гормона, но и в качестве цитокина – модулятора активности иммунной системы; нарушение его функ-

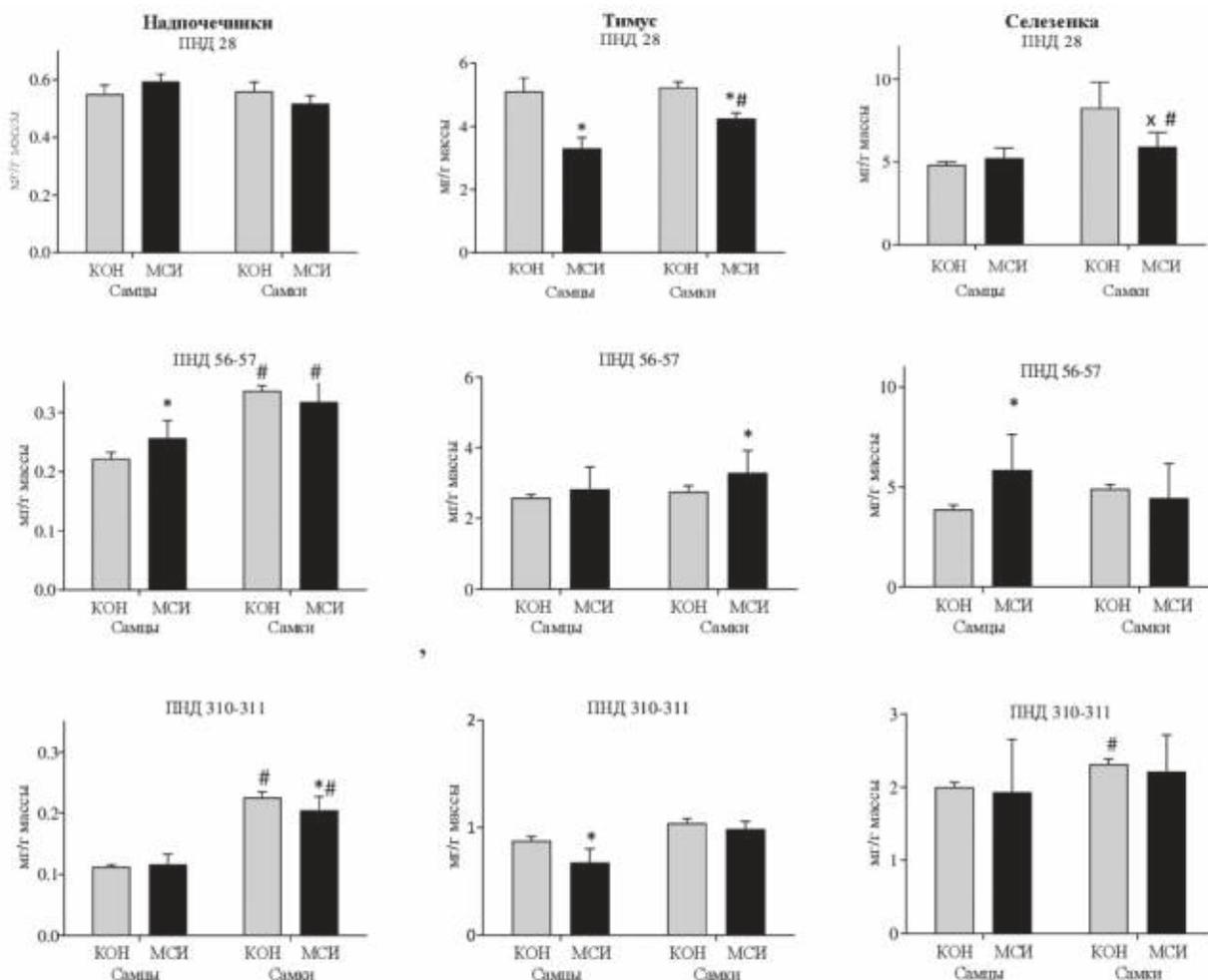


Рис. 6. Относительный вес органов-маркеров стресса. МСИ – крысы, подвергнутые неонатальной сепарации от матери и однопометников, КОН – крысы, выращенные с матерью. $p < 0.05$ по сравнению: * с соответствующим контролем, # с самцами той же группы (Newman-Keuls test).

Fig. 6. Relative weight of organs - the markers of stress. MSI – the rats exposed to the neonatal maternal separation; CON – the animals raised with their mother. $p < 0.05$ compared to: * the appropriate control, # males of the same group (Newman-Keuls test).

ции приводит к иммунодефициту, включающему аномальную активность и атрофию тимуса [19]. У крысят в период новорожденности лептин уменьшает секрецию глюкокортикоидов надпочечниками, гипореактивность ГГА обуславливает притупленную реакцию на стресс в ПНД-2-14 [20]. МС сопровождается быстрым снижением содержания лептина в плазме, что может быть одним из механизмов модуляции формирования ГГА и развития уязвимости к стрессу в более позднем возрасте.

В нашем исследовании уровни лептина были снижены у крыс обоего пола в подростковом возрасте, но не у взрослых животных. В работах других авторов показано, что после суточной материнской депривации в ПНД-9 у самцов крыс сниженный уровень лептина сохранялся в пубертатном периоде, но не у взрослых животных. У взрослых крыс уровень лептина обычно выше у самцов по сравнению с самками [21]. В нашей работе такое соотношение наблюдали у крыс-КОН в возрасте 2 мес. У крыс-МСИ половых разли-

чий в уровне лептина не было, что, возможно, связано с пониженной температурой изоляции крысят [22].

Вызванный МСИ дефицит лептина в раннем онтогенезе может оказывать существенное влияние на регуляцию иммунного ответа организма и на программирование развивающегося мозга. Показано, что лептин играет нейропротекторную роль, в частности, защищает нейроны от эксайтотоксических и оксидативных повреждений и участвует в развитии нейронов [23]. На основании приведенных фактов можно предположить, что снижение уровня лептина, обнаруженное у крыс-МСИ подросткового возраста, вовлечено в изменения развития ЦНС и наблюдаемые во взрослом возрасте нарушения поведения

Интересными представляются полученные нами данные изменения уровней хемокинов VEGF и фракталкина, а также уровня цитокина ИЛ-5 в сыворотке крыс-МСИ по сравнению с КОН. Уровни хемокинов снижались как у самцов, так и у самок-МСИ, однако динамика процесса зависела от пола животных. У сам-

Таблица 3/Table 3

Изменение некоторых цитокинов/хемокинов в зависимости от пола и возраста крыс, подвергнутых сепарации от матери и изоляции от однопометников в неонатальном периоде по сравнению с контрольной группой животных, выращенных с матерью
Changes in some cytokines/chemokines depending on the sex and age of rats subjected to maternal separation and isolation from littermates in the neonatal period compared with the control group of animals raised with their mother

	1 месяц		2 месяца		11 месяцев	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Провоспалительные						
ИЛ1-beta	=	=	=	=	=	↑↑
ИЛ6	=	=	=	↑↑	=	=
ИЛ12-P70	=	=	=	↑↑	=	=
ИЛ-18						↑
ИЛ2	=	=	=	=	=	↑
ИЛ5	↑	=	=	↑	=	=
Противовоспалительные						
ИЛ10	=	=	=	↓↓	=	↑↑
Хемокины						
VEGF	↓↓	=	=	↓	=	↑↑
Фракталкин	↓↓	=	=	↓↓	=	↑↑
IP10	=	=	↓↓	↑↑	=	↑↑
MIP1-alfa	=	=	=	=	=	↑↑
LIX	=	=	=	↑	=	=
Leptine	↓↓	↓↓	=	=	=	=

Примечание. ↑ увеличение содержания; ↓ уменьшение содержания; = не отличается от контрольных значений.

Note. ↑ increase in content; ↓ decrease in content; = does not differ from the control values.

цов снижение анализов наблюдали в возрасте 1 мес, у самок их содержание снижалось в более поздние сроки – в возрасте 2 мес. В зрелом возрасте (11 мес) только самки-МСИ демонстрировали повышенный по сравнению с КОН уровень VEGF и фракталкина. Уровень ИЛ-5 повышался в группе МСИ у самцов-подростков и у молодых взрослых самок.

Хемокины из семейства VEGF относятся к многофункциональным трофическим факторам, которые модулируют работу ЦНС, усиливая ангиогенез, повышая проницаемость сосудов, устраняя дефекты их формирования [24]. VEGF участвует в развитии нейронов, в процессах синаптогенеза и синаптической пластичности, оказывает прямой нейротрофический и нейропротекторный эффект. Считается, что VEGF связан с нарушением эмоциональной регуляции, вовлечен в когнитивную деятельность и социальное поведение. Он играет важную роль в реакциях на стресс, а развитие стресс-индуцированных психопатологий связывают с дефицитом VEGF. Периферический VEGF называют в числе потенциальных биомаркеров аффективных расстройств. Повышенные уровни хемокина были обнаружены в плазме крови у лиц с депрессией по сравнению со здоровым контролем [25], что рассматривают как возможный компенсаторный механизм, способствующий нейропротекции. Считают, что VEGF оказывает защитное действие на DA-ергические и серотонинергические нейроны, нарушения которых могут привести к гиперактивности и импульсивному агрессивному поведению животных [26]. Также хемокины семейства VEGF вовлечены в реализацию стресс-реакции, по-видимому, посредством модуляции активности норадренергической системы [27]. Хронический социальный стресс повышал экспрессию мРНК VEGF в мозге, но снижал концентрацию VEGF в сыворотке у самок крыс. Можно предположить, что снижение уровня сывороточного VEGF у молодых крыс-МСИ ассоциировано с наблюдаемыми в нашей работе нарушениями двигательного, исследовательского и социального поведения животных. Снижение уровня VEGF в крови у самцов в более раннем по сравнению с самками периоде онтогенеза может отражать большую уязвимость самцов к повторяющемуся МСИ. Кроме того, несинхронное снижение уровня VEGF у самцов и самок может быть обусловлено разными механизмами, вовлеченными в регуляцию активности VEGF [27].

Наряду с VEGF, нейротрофические и нейропротекторные функции в ЦНС опосредует фракталкин [28], который экспрессируется преимущественно в нейронах и регулирует активность микроглии, обе-

спечивая адгезию клеток в мембраносвязанной форме и действуя как аттрактант для воспалительных клеток (как местных, так и периферических) в растворимой форме. В развивающемся мозге фракталкин участвует в процессах синаптогенеза, синаптической пластичности и ремоделирования нейронных сетей путем синаптической обрезки (прунинга). Экспериментальные исследования по изучению роли фракталкина в эффектах СРВ немногочисленны. У крыс, подвергшихся пренатальному стрессу, нарушения поведения во взрослом возрасте сопровождалось снижением экспрессии мРНК фракталкина и концентрации белка в гиппокампе и фронтальной коре, с одновременным повышением уровня провоспалительных факторов в этих структурах; внутрижелудочковое введение фракталкина приводило к нормализации поведения и снижению нейровоспаления [29]. В литературе мы не нашли данных об уровне периферического фракталкина, полученных на трансляционных моделях психических расстройств.

Помимо уже упомянутых VEGF, фракталкина и ИЛ-5, уровень которых изменялся у самок-МСИ позже, чем у самцов, в возрасте 2 мес только у самок-МСИ наблюдали повышенные уровни провоспалительных цитокинов ИЛ-6, ИЛ-12, LIX и сниженный уровень противовоспалительного цитокина ИЛ-10.

Интерлейкины являются важными модуляторами развития ЦНС и ее дальнейшего функционирования. Провоспалительные цитокины ингибируют пролиферацию нейронов и контролируют синаптогенез, влияют на уровень нейротрансмиттеров в мозге [30]. Отметим, что ИЛ-6 может оказывать также противовоспалительное действие, и способствует выживанию катехоламинергических нейронов в мозге. В свою очередь, экспрессию провоспалительных цитокинов могут регулировать противовоспалительные цитокины, в том числе, ИЛ-10 [30]. ИЛ-10 участвует в процессах синаптогенеза в ЦНС, экспрессия его рецептора была обнаружена в нейронах гиппокампа на ранней стадии развития ЦНС.

Как уже упоминалось, периферический иммунный статус не всегда совпадает с уровнями цитокинов в ЦНС, особенно с учетом цитокиновой специфики разных отделов мозга. Тем не менее, провоспалительный профиль плазменных цитокинов рассматривают как возможный прогностический маркер уязвимости организма к стрессу и высокого риска развития нервно-психических нарушений [31]. Имеются данные о том, что периферические воспалительные факторы ИЛ-1 и ИЛ-6 связаны со стресс-индуцированными нарушениями социального поведения [7]. Пониженное содержание в крови ИЛ-10 также может при-

водить к дисрегуляции провоспалительных цитокинов, и повышенному риску развития соматических и нервно-психических патологий, в том числе постстрессовых эмоционально-мотивационных нарушений [28].

Показано, что СРВ изменяет экспрессию цитокинов на периферии и в мозге во время развития и во взрослом возрасте. Точный профиль изменений зависит от многих факторов и, по-видимому, является весьма варибельным, однако общее направление изменений — сдвиг баланса в сторону преобладания провоспалительных цитокинов, которые могут нарушать ГЭБ и активировать центральные иммунные реакции [32]. Провоспалительный профиль цитокинов, выявленный в наших экспериментах у молодых взрослых самок-МСИ может свидетельствовать о стойких изменениях иммунной модуляции, вызванных СРВ.

Заслуживают внимания полученные нами данные о разнонаправленных сдвигах хемокина IP-10 у молодых взрослых крыс-МСИ: уровень белка был снижен у самцов-МСИ и повышен у самок. В мозге этот хемокин секретируется нейронами, глией и стромальными клетками в ответ на IFN- γ и действует как хемоаттрактант Т-клеток и естественных клеток-киллеров в ЦНС. В экспериментах по изучению влияния транскраниальной лазерной стимуляции на поведение и когнитивную деятельность крыс улучшение обучения и память у старых животных сопровождалось снижением IP-10 в гиппокампе [33]. Мета-анализ клинических данных о периферических уровнях цитокинов/хемокинов у пациентов с различными психиатрическими диагнозами выявил повышенный уровень IP-10 у лиц с биполярным расстройством, но только в состоянии эутимии [34]. В связи с ограниченным объемом сведений о связи IP-10 с психическими заболеваниями и стресс-индуцированными нарушениями, преждевременно делать заключения о физиологическом значении зависимых от пола изменений уровня IP-10 у крыс-МСИ.

Самки-МСИ старшего возраста (11 мес) демонстрировали повышенные по сравнению с контрольными значениями уровни ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-10, ИЛ-18, IP-10, MIP-1 α , VEGF и фракталкина. Можно предположить, что увеличение содержания периферических маркеров воспаления связано со старением животных. Особенностью стареющих тканей является бессимптомное хроническое воспаление низкой степени тяжести («стерильное» воспаление), отражающее накопление поврежденных макромолекул, вредных продуктов микробного происхождения и т.д. На самцах линии Fisher показано, что с возрастом у них увеличивалось содержание ряда провоспалительных плазменных ци-

токинов/хемокинов [3]. Возможно, у самок-МСИ этот процесс начинается раньше, чем у самцов. С другой стороны, нельзя исключить, что эти сдвиги в содержании сывороточных цитокинов являются отсроченными эффектами МСИ.

Функциональная активность системы комплемента. Результаты наших экспериментов свидетельствуют о том, что у молодых взрослых крыс-КОН функциональная активность классического пути системы комплемента была выше у самцов, чем у самок. У крыс-МСИ наблюдали обратное соотношение за счет снижения скорости лизиса эритроцитов комплементом у самцов и повышения — у самок. Интересно, что в подростковом возрасте функциональная активность классического пути системы комплемента была одинаково низкой у крыс обоего пола.

Система комплемента является ключевой частью врожденного иммунитета. Однако ее созревание продолжается вплоть до подросткового возраста [35], а в дальнейшем врожденный иммунный ответ может меняться на протяжении всей жизни, по-разному влияя на мозг и поведение. Незрелость системы комплемента при рождении и в детстве делает ее уязвимой для стресса, который может навсегда изменить ход развития нейроиммунного взаимодействия.

Белки каскада комплемента секретируются гепатоцитами печени и почти всеми типами клеток ЦНС [6]. Расщепление этих белков приводит к образованию фрагментов, которые функционируют как сигнальные молекулы. Фрагменты (C3a, C5a), действуя на иммунные клетки, индуцируют высвобождение провоспалительных цитокинов и накопление макрофагов, а их взаимодействие с тканеспецифическими клетками (например, с нейронами) регулирует пролиферацию клеток-мишеней. В здоровом развивающемся мозге активация комплемента приводит к образованию компонента C3b, который опсонизирует синапсы для элиминации макрофагами и, наряду с молекулами фракталкина, участвует в прунинге и ремоделировании нейронных сетей. В зрелом мозге этот процесс существенно подавлен [36]. Стресс активирует секрецию провоспалительных цитокинов, которые помогают организовать дальнейший иммунный ответ, в т.ч. активацию белков системы комплемента [37]. Показано, что у крыс хронический психологический стресс индуцирует ремоделирование нейронных сетей в мозге (в частности, в центральном ядре миндалины) и способствует развитию тревожно-подобного поведения [38].

В свете сказанного, интерпретация наших данных о зависимом от пола изменении активности си-

стемы комплемента у молодых взрослых крыс может быть неоднозначной. С одной стороны, повышенная активность системы комплемента может свидетельствовать об общей провоспалительной направленности иммунного ответа у самок-МСИ, тогда как у самцов в этом возрасте нормализация цитокинового профиля сопровождалась снижением активности системы комплемента. С другой стороны, реакция системы комплемента может быть компенсаторной, направленной на ремоделирование нейронных связей, нарушенных МСИ. В таком случае самцы оказываются более уязвимыми к СРВ. Можно также предположить, что в основе наблюдаемых различий в иммунных реакциях лежит разная скорость созревания нейронных и иммунных связей у самцов и самок крыс, и отставленные эффекты МСИ будут проявляться неодинаково в разном возрасте.

Заключение

По совокупности данных можно заключить, что МСИ может влиять на поведенческие, эндокринные и иммунные характеристики самцов и самок крыс по-разному: самцы демонстрируют нарушения в более раннем (подростковом) возрасте. У самок дисфункции начинают развиваться позже, но сохраняются, по крайней мере, до среднего взрослого возраста. Одним из возможных механизмов таких отличий могут быть разные пути реализации нейроиммунных реакций, индуцированных ранними авersive событиями.

Литература

(пп. 1–9; 11–38 см. References)

10. Карганов М.Ю., Шойбонов Б.Б., Алчинова И.Б., Мавренкова П.В., Деморжи М.С., Терешкина Н.В. др. *Скрининг-тест для определения функциональной активности системы комплемента крысы – патент на изобретение № 2786208 от 19.12.2022.*

References

1. Shin S.H., Kim Y.K. Early life stress, neuroinflammation, and psychiatric illness of adulthood. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2023; 1411: 105-34. https://doi.org/10.1007/978-981-19-7376-5_6
2. Quagliato L.A., Coelho D.A., de Matos U.M.A., Nardi A.E. Physical abuse during childhood predicts IL-2R levels in adult panic disorder patients. *J. Affect. Disord.* 2021; 295: 1440-4. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2021.09.022>
3. Budamagunta V., Kumar A., Rani A., Bean L., Manohar-Sindhu S., Yang Y., et al. Effect of peripheral cellular senescence on brain aging and cognitive decline. *Aging Cell.* 2023; 22(5): e13817. <https://doi.org/10.1111/acer.13817>
4. Cattane N., Vernon A.C., Borsini A., Scassellati C., Endres D., Capuron L., et al. Preclinical animal models of mental illnesses to translate findings from the bench to the bedside: Molecular brain mechanisms and peripheral biomarkers associated to early life stress

- or immune challenges. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2022; 58: 55-79. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2022.02.002>
5. Mavrenkova P.V., Khlebnikova N.N., Alchinova I.B., Demorzhi M.S., Shoibonov B.B., Karganov M.Y. Effects of maternal separation and subsequent stress on behaviors and brain monoamines in rats. *Brain Sci.* 2023; 13(6): 956. <https://doi.org/10.3390/brainsci13060956>
6. Reddaway J., Brydges N.M. Enduring neuroimmunological consequences of developmental experiences: From vulnerability to resilience. *Mol. Cell. Neurosci.* 2020; 109: 103567. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2020.103567>
7. Duque E.D., Munhoz C.D. The pro-inflammatory effects of glucocorticoids in the brain. *Front. Endocrinol.* 2016; 28(7): 78. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00078>
8. Hodes G.E., Bangasser D., Sotiropoulos I., Kokras N., Dalla C. Sex differences in stress response: classical mechanisms and beyond. *Curr. Neuropharmacol.* 2024; 22(3): 475-94. <https://doi.org/10.2174/1570159X22666231005090134>
9. Solarz A., Majcher-Maślanka I., Kryst J., Chocyk A. Early-life stress affects peripheral, blood-brain barrier, and brain responses to immune challenge in juvenile and adult rats. *Brain Behav, Immun.* 2023; 108: 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2022.11.005>
10. Karganov M.Yu., Shoybonov B.B., Alchinova I.B., Mavrenkova P.V., Demorzhi M.S., Tereshkina N.V., et al. *Screening test for determining the functional activity of the rat complement system – patent for invention No.2786208 dated 12/19/2022. [Skрининг-тест дlya opredeleniya funktsionalnoy aktivnosti sistemy komplementa krysy – patent na izobreteniye № 2786208 ot 19.12.2022].* (In Russian)
11. White J.D., Kaffman A. The moderating effects of sex on consequences of childhood maltreatment: from clinical studies to animal models. *Front. Neurosci.* 2019; 13: 1082. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01082>
12. Mishra P.K., Kutty B.M., Laxmi T.R. The impact of maternal separation and isolation stress during stress hyporesponsive period on fear retention and extinction recall memory from 5-week-to 1-year-old rats. *Exp. Brain Res.* 2019; 237(1): 181-90. <https://doi.org/10.1007/s00221-018-5411-3>
13. Rincón-Cortés M. Sex differences in addiction-relevant behavioral outcomes in rodents following early life stress. *Addict. Neurosci.* 2023; 6: 100067. <https://doi.org/10.1016/j.addicn.2023.100067>
14. Zanta N.C., Assad N., Suchecki D. Neurobiological mechanisms involved in maternal deprivation-induced behaviours relevant to psychiatric disorders. *Front. Mol. Neurosci.* 2023; 16: 1099284. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1099284>
15. Lundberg S., Martinsson M., Nylander I., Roman E. Altered corticosterone levels and social play behavior after prolonged maternal separation in adolescent male but not female Wistar rats. *Horm. Behav.* 2017; 87: 137-44. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.11.016>
16. Burke A.R., Miczek K.A. Stress in adolescence and drugs of abuse in rodent models: role of dopamine, CRF, and HPA axis. *Psychopharmacology (Berl)*. 2014; 231(8): 1557-80. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3369-1>
17. Biggio F., Pisu M.G., Garau A., Boero G., Locci V., Mostallino M.C., et al. Maternal separation attenuates the effect of adolescent social isolation on HPA axis responsiveness in adult rats. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2014; 24(7): 1152-61. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2014.03.009>
18. Langgartner D., Fuchsl A.M., Kaiser L.M., Meier T., Foertsch S., Busch C., et al. Biomarkers for classification and class prediction of stress in a

- murine model of chronic subordination stress. *PLoS One*. 2018; 13(9): e0202471. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202471>
19. Velloso L.A., Savino W., Mansour E. Leptin action in the thymus. *Ann. N.-Y. Acad. Sci.* 2009; 1153: 29-34. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2008.03973.x>
 20. Pralong F.P., Roduit R., Waeber G., Castillo E., Mosimann F., Thorens B., et al. Leptin inhibits directly glucocorticoid secretion by normal human and rat adrenal gland. *Endocrinology*. 1998; 139(10): 4264-8. <https://doi.org/10.1210/endo.139.10.6254>
 21. Mela V., Diaz F., Vazquez M.J., Argente J., Tena-Sempere M., Viveros M.P., et al. Interaction between neonatal maternal deprivation and serum leptin levels on metabolism, pubertal development, and sexual behavior in male and female rats. *Biol. Sex. Differ.* 2016; 7: 2. <https://doi.org/10.1186/s13293-015-0054-6>
 22. Raff H., Hoeynck B., Jablonski M., Leonovicz C., Phillips J.M., Gehrand A.L. Insulin sensitivity, leptin, adiponectin, resistin, and testosterone in adult male and female rats after maternal-neonatal separation and environmental stress. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2018; 314(1): 12-21. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00271.2017>
 23. Viveros M.P., Llorente R., López-Gallardo M., Suarez J., Bermúdez-Silva F., De la Fuente M., et al. Sex-dependent alterations in response to maternal deprivation in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2009; 34(1): 217-26. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.05.015>
 24. Newton S.S., Fournier N.M., Duman R.S. Vascular growth factors in neuropsychiatry. *Cell. Mol. Life Sci.* 2013; 70(10): 1739-52. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1281-9>
 25. Kahl K.G., Bens S., Ziegler K., Rudolf S., Kordon A., Dibbelt L., Schweiger U. Angiogenic factors in patients with current major depressive disorder comorbid with borderline personality disorder. *Psychoneuroendocrinology*. 2009; 34(3): 353-7. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.09.016>
 26. Sun P., Wei S., Wei X., Wang J., Zhang Y., Qiao M., et al. Emotional stress influences VEGF/VEGFR2 and its induced PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Neural. Plast.* 2016; 2016: 4129015. <https://doi.org/10.1155/2016/4129015>
 27. Nowacka-Chmielewska M.M., Paul-Samojedny M., Bielecka-Wajdman A.M., Barski J.J., Obuchowicz E. Alterations in VEGF expression induced by antidepressant drugs in female rats under chronic social stress. *Exp. Ther. Med.* 2017; 13(2): 723-30. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4022>
 28. Modzelewski S., Oracz A., Hendo K., Sokół A., Waszkiewicz N. Biomarkers of postpartum depression: a narrative review. *J. Clin. Med.* 2023; 14; 12(20): 6519. <https://doi.org/10.3390/jcm12206519>
 29. Ślusarczyk J., Trojan E., Wydra K., Głombik K., Chamera K., Kucharczyk M., et al. Beneficial impact of intracerebroventricular fractalkine administration on behavioral and biochemical changes induced by prenatal stress in adult rats: possible role of NLRP3 inflammasome pathway. *Biochem. Pharmacol.* 2016; 113: 45-56. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.05.008>
 30. Brydges N.M., Reddaway J. Neuroimmunological effects of early life experiences. *Brain Neurosci. Adv.* 2020; 4: 2398212820953706. <https://doi.org/10.1177/2398212820953706>
 31. Baumeister D., Akhtar R., Ciufolini S., Pariante C.M., Mondelli V. Childhood trauma and adulthood inflammation: a meta-analysis of peripheral C-reactive protein, interleukin-6 and tumour necrosis factor- α . *Mol. Psychiatry*. 2016; 21(5): 642-9. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.67>
 32. Peng Z., Peng S., Lin K., Zhao B., Wei L., Tuo Q., et al. Chronic stress-induced depression requires the recruitment of peripheral Th17 cells into the brain. *J. Neuroinflammation*. 2022; 19(1): 186. <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02543-6>
 33. Cardoso F.D.S., de Souza Oliveira Tavares C., Araujo B.H.S., Mansur F., Lopes-Martins R.Á.B., Gomes da Silva S. Improved spatial memory and neuroinflammatory. Profile changes in aged rats submitted to photobiomodulation therapy. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2022; 42(6): 1875-86. <https://doi.org/10.1007/s10571-021-01069-4>
 34. Misiak B., Bartoli F., Carrà G., Matecka M., Samochowiec J., Jaroš K., et al. Chemokine alterations in bipolar disorder: A systematic review and meta-analysis. *Brain Behav. Immun.* 2020; 88: 870-7. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.04.013>
 35. Dowling D.J., Levy O. Ontogeny of early life immunity. *Trends. Immunol.* 2014; 35(7): 299-310. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.04.007>
 36. Schafer D.P., Lehrman E.K., Kautzman A.G., Koyama R., Mardinly A.R., Yamasaki R., et al. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron*. 2012; 74(4): 691-705. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.026>
 37. Agorastos A., Pervanidou P., Chrousos G.P., Baker D.G. Developmental trajectories of early life stress and trauma: a narrative review on neurobiological aspects beyond stress system dysregulation. *Front Psychiatry*. 2019; 10: 118. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00118>
 38. Yuan T., Orock A., Greenwood-Van Meerveld B. Amygdala microglia modify neuronal plasticity via complement C1q/C3-CR3 signaling and contribute to visceral pain in a rat model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2021; 320(6): 1081-92. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00123.2021>

Сведения об авторах:

Мавренкова Полина Вячеславовна, аспирант, лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП;

Хлебникова Надежда Николаевна, доктор биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. общей патологии нервной системы ФГБНУ НИИОПП;

Алчинова Ирина Борисовна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП;

Шойбонов Батожаб Батожаргалович, канд. хим. наук, ст. науч. сотр., лаб. фармакологии кровообращения ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»;

Порошина Алина Сергеевна, ст. исследователь группы клеточных методов, ООО «Экзактэ Лабс»;

Деморжи Марина Сергеевна, науч. сотр., лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП;

Карганов Михаил Юрьевич, доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр., лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП, mkarganov@mail.ru