

Полный текст статьи

<Логотип: «Кросс марк»>

## Изменение микробиоты, индуцированное антибиотиками, приводит к нарушению в системе эндоканнабиноидов кишечника, реорганизации нейронов и глии в гиппокампе и развитию депрессии у мышей

F. Guida<sup>a,h,\*</sup>, F. Turco<sup>b</sup>, M. Iannotta<sup>a</sup>, D. De Gregorio<sup>a</sup>, I. Palumbo<sup>b</sup>, G. Sarnelli<sup>b</sup>, A. Furiano<sup>a</sup>, F. Napolitano<sup>c,d</sup>, S. Boccella<sup>a</sup>, L. Luongo<sup>a,h</sup>, M. Mazzitelli<sup>a</sup>, A. Usiello<sup>c,e</sup>, F. De Filippis<sup>f,i</sup>, F.A. Iannotti<sup>g,h</sup>, F. Piscitelli<sup>g,h</sup>, D. Ercolini<sup>f,i</sup>, V. de Novellis<sup>a,h</sup>, V. Di Marzo<sup>g,h,\*</sup>, R. Cuomo<sup>b,i</sup>, S. Maione<sup>a,h,\*</sup>

<sup>a</sup>Кафедра экспериментальной медицины, отделение фармакологии Л. Донателли, Университет Кампании имени Луиджи Ванвителли, Неаполь, Италия

<sup>b</sup>Кафедра клинической медицины и хирургии, Неаполитанский университет имени Фридриха II, Неаполь, Италия

<sup>c</sup>«Институт передовых биотехнологий **Сеиндже**», Неаполь, Италия

<sup>d</sup>Кафедра молекулярной медицины и медицинской биотехнологии, Неаполитанский университет имени Фридриха II, Неаполь, Италия

<sup>e</sup>Кафедра экологических, биологических и фармацевтических наук и технологий, Университет Кампании имени Луиджи Ванвителли, Казерта, Италия

<sup>f</sup>Кафедра сельскохозяйственных наук, отделение микробиологии, Неаполитанский университет имени Фридриха II, Портичи, Италия

<sup>g</sup>Институт молекулярной биохимии, Национальный совет по исследованиям, Поццуоли, Италия

<sup>h</sup>Группа по исследованиям эндоканнабиноидов, Италия

<sup>i</sup>Целевая группа по исследованиям микробиома, Неаполитанский университет имени Фридриха II, Италия

### ИНФОРМАЦИЯ О СТАТЬЕ

### АННОТАЦИЯ

#### История статьи

Получена 22 июня 2017 года

Получена в рецензированной форме 4 сентября 2017 года

Принята к публикации 4 сентября

Ось микробиота-кишечник-головной мозг (MGBA) является каналом двунаправленной связи между хроническим воспалением кишечника и психическими заболеваниями. Данное взаимовлияние осуществляется по нескольким путям, которые активно обсуждаются в литературе. Мы

\* Адреса авторов, которым следует направлять корреспонденцию: Кафедра экспериментальной медицины, отделение фармакологии Л. Донателли, Второй университет Неаполя, 80138, Неаполь, Италия (F. Guida and S. Maione). Институт молекулярной биохимии, Национальный совет по исследованиям, Поццуоли, Италия (V. Di Marzo).

Адреса электронной почты: [franc.guida@gmail.com](mailto:franc.guida@gmail.com) (F. Guida), [vdimarzo@icb.cnr.it](mailto:vdimarzo@icb.cnr.it) (V. Di Marzo), [sabatino.maione@unina2.it](mailto:sabatino.maione@unina2.it) (S. Maione).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2017.09.001>

0889-1591/© «Эльзевир Инк.» 2017 год. Все права защищены.

2017 года  
Опубликована в Интернете 7  
сентября 2017 года

*Ключевые слова:*  
микробиом  
депрессия  
социальное поведение  
гиппокамп  
эндоканнабиноидом

исследовали поведенческие, биохимические и электрофизиологические изменения, а также состав микробиоты кишечника, с помощью модели экспериментального дисбиоза, вызванного антибиотиками. Также оценивалось воспаление тонкого кишечника. Мыши подвергались воздействию смеси противомикробных препаратов в течение 2-х недель. После этого в течение до 7 дней через желудочный зонд им вводился пробиотик *Lactobacillus casei* DG (LCDG) или носитель.

Нарушение состава микробиоты приводило к развитию общего воспаления и изменению количества некоторых эндоканнабиноидов в стенке кишечника. Наблюдались поведенческие изменения, в том числе увеличение периода неподвижности в опыте с подвешиванием за хвост и ухудшение социальной опознающей памяти, что сопровождалось нарушением сигнализации BDNF/TrkB, фосфорилирования TRPV1 и электрической активности нейронов в гиппокампе. Кроме того, обнаружены морфологические перестройки глиальных клеток в областях головного мозга, контролирующего эмоциональное поведение. Последующее введение пробиотика по сравнению с носителем способствовало устранению большинства воспалительных изменений в кишечнике, а также нарушений поведения, биохимических процессов и функции головного мозга. Интересно отметить, что колонизация *Lachnospiraceae* значимо коррелировала с поведенческими изменениями, которые наблюдались у мышей с дисбиозом. Полученные нами данные объясняют некоторые из биомолекулярных и мозговых функциональных изменений, приводящих к развитию эмоциональных расстройств, связанных с изменением состава микробиоты кишечника.

© «Эльзевир Инк.» 2017 год. Все права защищены.

## 1. Введение

Микробиота кишечника значимо влияет на двунаправленные взаимодействия между центральной и кишечной нервной системой (ЦНС и ENS, соответственно). В связи с этим, МГВА участвует в патофизиологических процессах развития психических нарушений, связанных с хроническим воспалением кишечника (Collins and Bercik, 2009; Grenham et al., 2011). Таким образом, помимо обеспечения функций желудочно-кишечного тракта микробиота и ее метаболиты участвуют в модуляции функций головного мозга, таких как эмоциональное поведение (Foster and McVey Neufeld, 2013), реакция на стресс (Bravo et al., 2012), боль (Bercik et al., 2012) и потребление пищи (Alcock et al., 2014). На основании этого можно предположить, что изменения «нормальной» микробиоты, называемые дисбактериозом, могут приводить к развитию функциональных и поведенческих нарушений у животных и человека (Bercik et al., 2011; Fond et al., 2015).

Лекарственные препараты, способствующие восстановлению кишечной микрофлоры, предложены в качестве новой стратегии лечения психических заболеваний, связанных с инфекцией или воспалением, помимо их первоначального применения в качестве метода терапии воспалительных заболеваний кишечника. Пробиотики, то есть селекционированные комменсальные бактерии, входящие в состав пищевых продуктов, или в форме препаратов также обладают другими полезными свойствами, кроме основного питания (Dai et al., 2013). Например, доклинические исследования показали, что пробиотики могут уменьшать стресс и симптомы стрессовых расстройств, таких как депрессия или тревога (Bercik et al., 2010; Slyepchenko et al., 2014). Кроме того, описаны положительные эффекты различных пробиотиков у госпитализированных пациентов с психическими заболеваниями и у здоровых добровольцев (Messaoudi et al., 2011 a, b).

Интересно отметить, что недавняя характеристика микробиома человека позволила по новому обосновать изучение потенциальных эпигенетических механизмов развития нейроонтогенетических нарушений, связанных с патологией желудочно-кишечного тракта, включая расстройства аутистического спектра (ASD) или синдрома дефицита

внимания и гиперактивности (ADHD) (Fond et al., 2015). В предыдущих исследованиях детей выявлена связь между изменениями микробиоты кишечника и риском развития нейropsychиатрических заболеваний во взрослом возрасте, что указывает на возможность успешности ранней интервенции с помощью пробиотиков (Frye et al., 2015; Partty et al., 2015; Petra et al., 2015). Выяснение молекулярных механизмов взаимодействия кишечной микробиоты с головным мозгом должно привести к усовершенствованию стратегий лечения нейropsychиатрических заболеваний, особенно связанных с воспалением кишечника. Тем не менее, клеточные, нейрофизиологические и биохимические процессы, путем воздействия на которые возможно достигнуть лучших результатов лечения, до сих пор недостаточно исследованы.

Показано, что система эндоканнабиноидов участвует в различных патофизиологических процессах как на периферии, так и в ЦНС, что приводит к развитию плейотропного эффекта (Rossi et al., 2014; Cristino et al., 2016; Henry et al., 2017; Mela et al., 2016; Russo et al., 2017). В частности, предполагается, что дисрегуляция эндоканнабиноидного тонуса и связанное с этим влияние на нейрогенез гиппокампа являются этиологическими факторами депрессии (Boorman et al., 2016). Кроме того, обнаружено, что вещества, повышающие экспрессию эндоканнабиноидов, способствуют уменьшению признаков воспалительного заболевания кишечника (IBD) и висцеральной болевой чувствительности у грызунов (D'Argenio et al., 2006; Bashashati et al., 2017). Интересно отметить, что роль эндоканнабиноидов и биохимически связанных с ними биологически активных производных длинноцепочечных жирных кислот, таких как *N*-ацилэтаноламины и *N*-ацилсеротонины, и их мишеней (в общем называемых эндоканнабиноидом) (Piscitelli et al., 2011; Witkamp, 2016) в развитии воспалительных заболеваний и нарушений поведения, связанных с изменением состава микробиоты, никогда не исследовалась, несмотря на то, что в экспериментальных моделях полученные убедительные данные о том, что указанные медиаторы участвуют в патогенезе дисбактериоза при ожирении (Cani et al., 2016), развитии признаков депрессии (Navarria et al., 2014; Rubino et al., 2015) и воспалительных заболеваний кишечника (Borrelli and Izzo, 2009; Capasso et al., 2014).

В настоящем исследовании мы использовали модель дисбактериоза, полученную путем введения молодым здоровым мышам смеси антимикробных препаратов широкого спектра действия (ампициллина, стрептомицина и клиндамицина (ASC)) (Lamouse-Smith et al., 2011) с целью нарушения баланса кишечной микрофлоры. Помимо этого, для оценки влияния изменений микробиоты как на кишечник, так и головной мозг, в качестве фармакологического инструмента использовался пробиотик *Lactobacillus casei* DG (LCDG), признанный мощным модулятором воспалительного/иммунного ответа кишечника (D'Inca et al., 2011; Compare et al., 2017). Было проведено большое количество поведенческих, биохимических и электрофизиологических опытов на мышах *in vivo* и *ex vivo* для оценки того, что приводит ли такое нарушение состава микробиоты к воспалению кишечника, развитию симптомов депрессии, изменению социального поведения, когнитивному дефициту, изменению в импульсации нейронов и активации микроглии и глии или изменению экспрессии некоторых центральных и периферических медиаторов эндоканнабиноидов. Наши результаты позволяют предположить, что лечение пробиотиком может привести к уменьшению эмоциональных расстройств, связанных с нарушениями состава микробиоты, в результате воздействия на несколько клеточных и биохимических механизмов как в центральной нервной системе, так и в периферических тканях.

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Животные и применение фармакологических агентов

Самцы мышей породы C57/bl6 (в возрасте 6 недель), полученные из компании «», содержались в контролируемых условиях освещения и окружающей среды в течение 1 недели до начала экспериментов. Процедуры исследования были утверждены комитетом по этике использования лабораторных животных Университета Кампании в Неаполе. Уход за животными соответствовал требованиям руководства Международной ассоциации по изучению боли (IASP) и Европейского сообщества (Е.С. L358/1 18/12/86) по использованию и защите лабораторных животных. Были приняты все возможные меры для минимизации страдания и уменьшения количества использованных животных.

Ампициллин, стрептомицин и клиндамицин (ASC) смешивались в стерильной питьевой воде (1 мг/мл в течение 2-х недель), как описано ранее (Lamouse-Smith et al., 2011). Раствор антибиотиков в воде для питья давался в течение 14 дней без ограничений. Мыши из контрольной группы в течение 14 дней получали питьевую воду без антибиотиков. После этого мышам из групп контроля и дисбактериоза (Dysb) через желудочных зонд вводился пробиотик (*Lactobacillus casei* DG,  $10^9$  клеток в 100 мкл изотонического раствора натрия хлорида) или изотонический раствор без пробиотика в течение до 7 дней. В течение периода исследования вода менялась каждые 3 дня.

Мышам из дополнительной группы в течение 7 дней изотонический раствор натрия хлорида или ASC вводились интраперитонеально (всасываемая квота суточных доз, введенных внутрь).

### 2.2. Измерение поведенческих реакций

Поведенческие реакции (N = 10-12) измерялись в день 14 и 21 после начала введения антибиотиков (день 0). В конце каждого набора экспериментов мышей умерщвляли для проведения дальнейших оценок. Время измерения поведенческих реакций было запланировано таким образом, чтобы избежать переноса эффектов предыдущего опыта.

#### 2.2.1. Поведение, подобное депрессии

Тест подвешивания за хвост (TST). Мышей по отдельности подвешивали за хвост к горизонтальной перекладине (на высоте 50 см от пола) с помощью липкой ленты, прикрепленной на расстоянии примерно 2-х см от кончика хвоста. Продолжительность неподвижности в секундах измерялась в течение последних 4-х минут 6-минутного теста с помощью регистратора времени. Время неподвижности определялось как отсутствие поведения, ориентированного на высвобождение. Мыши считались неподвижными, если животные висели пассивно и отсутствовали любые движения тела.

Тест принудительного плавания (FST). Мыши помещались в цилиндр (30 см x 45 см), заполненный водой, нагретой до температуры 27°C, на 6 минут. Продолжительность неподвижности в секундах измерялась в течение последних 4-х минут 6-минутного теста. Период неподвижности определялся как время плавания в воде без усилий и движениями, необходимыми только для того, чтобы голова находилась над водой. Немедленно после извлечения из воды мыши помещались под тепловую лампу для высыхания.

#### 2.2.2. Координация движений

Возможное нарушение координации движений оценивалось методом тестирования на ротароде («Ugo Basile»). Измерялось время удержания равновесия мышами до падения с вращающейся оси на пластину, в результате которого активировался магнит, позволяющий регистрировать время нахождения на оси. После адаптации в течение 30 с скорость вращения постепенно увеличивалась с 5 до 40 об/мин в течение до 5 мин.

Измерения проводилось 2 раза в течение одного дня с интервалом 1 час. Время удерживания мыши на оси обозначалось как латентный период (с).

### 2.2.3. Измерение мышечной силы

Подвешивание к проволоке. Металлическая проволока прикреплялась к верхнему краю прозрачной прямоугольной пластмассовой коробки без верха. Проволока туго натягивалась на кромке контейнера для предотвращения вибрации, которая могла повлиять на поведение мыши. Мыши помещались на металлическую проволоку, после чего регистрировалось время до падения. Описанный опыт повторялся пять раз с интервалом в 5 мин между попытками. Время измерялось в течение до 60 секунд. Определялось время до падения с проволоки в секундах.

### 2.2.4. Опознающая память

Распознавание нового объекта. У мышей из групп контроля и дисбактериоза оценивалась способность к распознаванию нового объекта. Процедура оценки состояла из периода привыкания, теста на ознакомление с объектами и теста на распознавание нового объекта. В течение периода привыкания мышам предоставлялась возможность в течение 1 часа свободно исследовать аппарат, представляющий собой прямоугольную открытую коробку (ширина 40 см x длина 30 см x высота 30 см) из серого поливинилхлорида (ПВХ), освещенную тусклым светом. В течение теста на ознакомление каждой мыши предлагалось исследовать в течение 5 мин два идентичных объекта, расположенных в левом и правом углу коробки. В это время камера регистрировала продолжительность исследования каждого объекта. Через 2 часа после теста на ознакомление с объектами один из них заменялся на отличающийся новый объект, после чего в течение 5 минут проводился тест на распознавание нового объекта. Продолжительность исследования объекта определялась как время, в течение которого нос мыши был направлен к объекту на расстоянии до 1 см от него. Экспериментатор, не имеющий информации о лечении, определял индекс распознавания (R.I.) в процентах от продолжительности исследования мышью нового объекта (продолжительность исследования мышью нового объекта + продолжительность исследования мышью знакомого объекта).

### 2.2.5. Рабочая память

Y-образный лабиринт. Аппарат состоял из трех закрытых черных рукавов 30 x 5 x 15 см (длина x ширина x высота), сходящихся в центре в форме черного равностороннего треугольника (5x5x5 см). В начале каждого опыта мышь помещалась в центральную платформу, после чего в течение 5 минут подсчитывалось количество спонтанных чередований (определяемых как количество входов 3 раза подряд в каждый из трех рукавов без повторных входов). Процент чередования вычислялся как отношение количества чередований/(общее количество входов в рукава - 2). Процент чередования вычислялся как параметр поведения, связанного с рабочей памятью.

### 2.2.6. Ноцицептивная боль

Тест горячей пластинки. Мыши помещались на горячую пластину («Ugo Basile», Варесе, Италия), нагретую до температуры  $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , после чего измерялось время нахождения животного на горячей пластине до начала лизания задних лап или прыжков как индекс задержки реакции. Для минимизации повреждения тканей мыши подвергались воздействию тепла не более 30 с.

### 2.2.7. Коммуникабельность

Трехкамерный тест на коммуникабельность. Мыши помещались в трехкамерную коробку из плексигласа, изготовленную по индивидуальному заказу, следующим образом: дверные проемы в двух разделительных стенах были снабжены задвижками для контроля

доступа к примыкающим камерам. Тест состоял из трех последовательных этапов: 5 мин (привыкание), 10 мин (сеанс I) и 10 мин (сеанс II). В течение первых 5 мин мышам предоставлялась возможность свободно исследовать все три камеры аппарата, и определялось предпочтение какой-либо из них. После этого мышь осторожно перемещалась в центральную камеру и удерживалась там короткое время путем закрытия проходов в обе боковой камеры. Во время следующего 10-минутного сеанса I в одну из боковых камер вверх дном помещался сделанный по заказу стакан с прутьями вместо стенок из нержавеющей стали. Первая подселенная мышь (незнакомец 1), ранее обжившаяся в аппарате, помещалась в идентичный перевернутый стакан, расположенный в другой камере. Во время второго сеанса тестируемая мышь встречалась с первой подселенной мышью и второй подселенной мышью (незнакомец 2), помещенной под другой перевернутый стакан (сеанс II). Регистрировались время, проведенное в каждой камере, количество переходов между камерами и продолжительность социального взаимодействия. Предпочтение в общении определялось как время, проведенное в боковой камере с знакомцем 1, по сравнению с временем, проведенным в камере с пустым перевернутым стаканом или временем, проведенным в боковой камере с знакомцем 2, по сравнению с временем, проведенным с знакомцем 1. Для социального взаимодействия использовались самцы мышей породы C57/bl6 (в возрасте 6 недель), которые не использовались в других экспериментах.

### 2.3. Анализ методом вестерн-блоттинга тканей головного мозга

Каждое животное обезглавливалось после анестезии, а затем, немедленно после умерщвления извлекался головной мозг и замораживался в жидком азоте для последующего разделения (N = 8-9). Затем отделялись исследуемые области головного мозга (кора и гиппокамп) и дважды промывались в холодном натрий-фосфатном буфере (PBS) (без Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>, pH 7,4) и гомогенизировались, как описано ранее (20). Затем лизаты центрифугировались в течение 15 мин со скоростью 13000 × g при 4°C, и полученные супернатанты переносились в прозрачные пробирки для измерения концентрации белка с помощью теста DC Protein Assay («Bio-Rad», Сеграте, провинция Милан, Италия). После этого образцы (80 мкг общего белка) кипятились в течение 5 мин в загрузочном буфере Laemmli SDS, после этого подвергались электрофорезу в 8-10% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, а затем переносились на поливинилиденфторидную (PVDF) мембрану. Фильтры инкубировались в течение ночи при 4°C со следующими антителами: (a) поликлональные антитела к TRPV1 (№ в каталоге: ACC-030, разведение 1:200, «Alomone labs», Израиль); (b) поликлональные фосфоспецифические антитела к TRPV1 (№ в каталоге: PAB8499; разведение 1:500; «Abnova Taipei City», Тайвань); (c) мышинные антитела к CB1 (№ в каталоге: Y080037, разведение 1:500, «Applied Biological Materials Inc.», КАНАДА); d) мышинные антитела к BDNF (N-20): sc-546, разведение 1:500, «Santa Cruz Biotechnology», штат Калифорния, США); e) поликлональные антитела к TrkB (794): sc-121:1000, «Santa Cruz Biotechnology», Даллас, штат Техас). Для проверки одинаковой загрузки белка использовались моноклональные антитела к тубулину, клон B-5-1-2 (разведение 1:5000, «Sigma-Aldrich»), или GAPDH (1:5000, «Santa Cruz Biotechnology», Даллас, штат Техас). Реактивные полосы обнаруживались методом хемилюминесценции (ECL или ECL-plus, «Perkin-Elmer»). Изображения анализировались с помощью станции Chemi-Doc с программным обеспечением Quantity-one («Bio-Rad», Сеграте, провинция Милан, Италия) (Putra et al., 2012).

## 2.4. Анализ микробиоты

### 2.4.1. Выделение ДНК и секвенирование 16S

Образцы фекалий (N = 6-8) полностью гомогенизировались в буфере STE (100 mM NaCl, 10 mM Трис-Cl, pH 8,0, 1 mM ЭДТА, pH 8,0) и центрифугировались (1000 об/мин × 1 мин) для отделения осадка. Супернатант снова центрифугировался (12000 × g, 2 мин), после чего осадок использовался для экстракции ДНК с помощью набора для выделения ДНК PowerFecal («Mo Bio Laboratories, Inc.», Карлсбад, штат Калифорния). Регион V3-V4 гена 16S рНК амплифицировался с использованием праймеров SD-Bact-0341 5'-CCTACGGGGGGGGGGCGC и SD-Bact-0785R5'-GAC TACHVGGGTATCTAATCC (26) и следующих условий полимеразной цепной реакции (ПЦР): первоначальная денатурация при 95°C в течение 3-х мин, затем 25 циклов при 95°C в течение 30 с, при 55°C в течение 30 с, при 72°C в течение 30 с и конечное дополнение при 12°C в течение 5 мин. Оба праймера включали последовательности адаптеров со свисающими концами для совместимости с индексами и адаптерами секвенирования Illumina. Смесь для ПЦР (конечный объем 50 мкл) состояла из 50 нг матричной ДНК, конечного количества 0,2 мкМ каждого праймера и 0,5 mM каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 10 мкл реакционного буфера 5X Q5 и реагента High-GC Enhancer, а также 1 Ед полимеразы ДНК High Fidelity DNA Polymerase. Продукты ПЦР очищались с помощью магнитных частиц Agencourt AMPure XP и количественно анализировались с помощью считывающего устройства Plate Reader AF2200. Мультиплексирование, объединение и секвенирование ампликонов проводилось в соответствии с протоколом подготовки библиотеки метагеномного секвенирования 16S Illumina на платформе MiSeq и с использованием набора реагентов MiSeq v3, что приводило к считыванию 2 × 300 bp спаренных концов.

Информацию о последовательностях генов 16S рНК из настоящего исследования можно получить в Архиве считывания последовательностей (SRA) Национального центра биотехнологической информации (США) по номеру доступа SRP098544.

## 2.5. Оценка медиаторов воспаления кишечника

### 2.5.1. Получение образцов

Мыши из каждой группы (N = 6-8) умерщвлялись методом вывиха шейного позвонка. Образцы двенадцатиперстной кишки (с расстояния 8 см от привратника), тощей кишки (с расстояния 18 см от привратника), подвздошной кишки (с расстояния 30 см от привратника) и толстой кишки (дистальнее слепой кишки) промывались натрий-фосфатным буфером (PBS) для удаления содержимого кишечника. Образец длиной 0,5-1 см каждого отдела кишечника разрезался и немедленно помещался в хранилище, где он хранился при температуре -80°C для последующего анализа методом вестерн-блоттинга и ПЦР в реальном времени.

### 2.5.2. Выделение белка и анализ методом вестерн-блоттинга

Для проведения анализа методом вестерн-блоттинга ткани гомогенизировались гипотоническим буфером для лизиса ледяной температуры. Концентрация белка определялась с помощью набора для измерения концентрации белка («Bio-Rad Laboratories», Геркулес, штат Калифорния). Для вестерн-блоттинга эквивалентное количество каждого образца денатурировали, разделяли на полиакриламидном геле с додецилсульфата натрия и переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Amersham», Милан, Италия). Мембраны блокировались в течение 2-х ч при комнатной температуре в 10% молочном буфере и инкубировались в течение ночи при 4°C с кроличьими антителами к IL-1β (разбавление 1:500 об./об., «Abeam», Кембридж, штат Массачусетс), кроличьими антителами к TNFα (1:500, «Abeam»), кроличьими антителами к GFAP

(1:1000, «Abeam»), кроличьими антителами к S100B (1:1000, «Novus Biologicals Europe», Кембридж, Великобритания) или кроличьими антителами к iNOS (1:1000, «Santa Cruz Biotechnology», Санта-Круз, штат Калифорния), используя кроличьи антитела к  $\alpha$ -актину (1:1000, «Abeam») в качестве белка домашнего хозяйства. После этого мембраны инкубировали в течение 2-х ч при комнатной температуре с вторичным антителом кролика, конъюгированным с пероксидазой хрена («Abeam»). Вестерн-блоты анализировались методом сканирующей денситометрии (визуализирующего денситометра GS-700 «Bio-Rad») с получением результатов в единицах оптической плотности [произвольные единицы (a.u.; мм<sup>2</sup>)].

### 2.5.3. Выделение РНК, обратная транскрипция и количественная ПЦР в реальном времени

После гомогенизации из тканей кишечника извлекалась РНК с помощью реактива Trizol («Invitrogen SRL», Сан-Джулиано-Меланезе, Италия) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрация и качество РНК определялись с помощью спектрофотометра Nanodrop («Celbio», Милан, Италия) (отношение A260/A280 составляло  $1,97 \pm 0,06$ , а отношение A260/A230 всегда являлось большим 2,0). Экстрагированная РНК обрабатывалась реагентами из набора DNA-free Kit («Ambion», Остин, штат Техас) в соответствии с инструкцией производителя. Синтез кДНК из РНК, расщепленной ДНКазой, проводился с использованием набора High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit («Applied Biosystems»). Количественная ПЦР в реальном времени проводилась с помощью системы StepOne («Thermo Fisher Scientific», Уолтем, штат Массачусетс) и набора TaqMan Gene Expression Mastermix («Thermo Fisher Scientific»). Олигонуклеотиды генов коннексина-43 (Cx-43), Zonula occludens-1 (ZO-1) и GAPDH были синтезированы компанией «Thermo Fisher Scientific». Экспрессия гена домашнего хозяйства GAPDH являлась примерно одинаковой при различных методах анализа. После каждой реакции использовалась кривая плавления для подтверждения специфичности продуктов ПЦР. Количественный анализ экспрессии мРНК в стимулированных клетках по сравнению с нестимулированными клетками проводился методом  $\Delta\Delta CT$  (Turco et al., 2014) с использованием GAPDH в качестве гена домашнего хозяйства. Каждый эксперимент проводился три раза.

### 2.6. Получение образцов сыворотки крови и проведение иммуноферментного анализа (ИФА)

Кровь у мышей из различных групп (N = 6-8) получалась методом кровопускания. Сыворотка получалась методом центрифугирования со скоростью  $3000 \times g$  в течение 10 мин и хранилась при температуре  $-20^\circ C$  для последующего анализа. Для определения концентрации IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  («Biovendor R&D», Брно, Чешская Республика) проводился ИФА сыворотки крови мышей в соответствии с протоколом производителя. Абсорбция измерялась с помощью микропланшетного фотометра. Концентрация IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  определялась по методу стандартных кривых.

### 2.7. Электрофизиология

#### 2.7.1. Подготовка к записи электрофизиологических сигналов *in vivo*

Мышей анестезировали хлоралгидратом (400 мг/кг, внутривенно) и помещали в стереотаксический аппарат («David Kopf Instruments», Тахунга, штат Калифорния, США). В черепе просверливалось отверстие. Температура тела у животных измерялась ректальным термометром («Yellow Springs Instrument Co.», Йеллоу Спрингс, штат Огайо, США) и поддерживалась на уровне  $35-36,5^\circ C$  с помощью инфракрасной тепловой лампы («Philips», Infrared Heat). Для поддержания полной анестезии во время экспериментов

периодически вводились дополнительные дозы хлоралгидрата (100 мг/кг внутривенно). Анестезия определялась как отсутствие ноцицептивной рефлекторной реакции на щипание хвоста или лапы и мигательной реакции в ответ на давление. Внеклеточная регистрация импульсов отдельных нейронов выполнялась с помощью электрода из вольфрамовой нити со стеклянной изоляцией (импеданс 3-5 МОм) («FHC Frederick Haer & Co», штат Мэн) для оценки электрической активности в предлимбической области (PL) медиальной префронтальной коры (mPFC). Для регистрации электрической активности в области CA3 дорсального гиппокампа использовались одноствольные стеклянные микропипетки, вытянутые из капиллярного стекла Stoelting, толщиной 2 мм (Вуд Дейл, штат Иллинойс), пуллером микропипеток PE-21 Narashige (Токио, Япония), с предварительно вставленными стекловолоконными нитями для заполнения капилляра 2% красителем Pontamine Sky Blue в 2 М NaCl. Концы микропипеток, предназначенных для регистрации сигналов гиппокампа, отламывались для уменьшения диаметра до 1-3 мкм, чтобы импеданс электродов составлял от 2-х до 6 Мом. Во всех экспериментах записанные сигналы усиливались и отображались на цифровом запоминающем осциллографе, для обеспечения того, чтобы исследуемая единица четко различалась на протяжении всего эксперимента. Сигналы собирались системой CED 1401 («Cambridge Electronic Design Ltd.», Великобритания) и анализировались с помощью программного обеспечения Spike2 (CED, версия 4) для построения гистограмм перистимул-времени (PSTH) в Интернете, а также хранения и анализа цифровых данных об активности отдельных нейронов в автономном режиме. Частота импульсации измерялась как среднее количество пиков/с. Сигналы каждого нейрона регистрировались в течение не менее 5 мин для оценки фоновой частоты импульсов и у каждого животного получались показатели не менее 6 нейронов (N = 6-8). Проводились мониторинг и непрерывная регистрация конфигурации, формы и высоты потенциалов действия. В конце электрофизиологических экспериментов животные подвергались эвтаназии, после чего извлекался головной мозг и хранился в параформальдегиде. Изготавливались корональные срезы головного мозга (20 мкм), проходящие через области измерения сигналов для определения места введения электродов и степени повреждения тканей электродами путем исследования под световым микроскопом.

### 2.7.2. Внеклеточная регистрация электрической активности в области CA3 дорсального гиппокампа

Одноствольные стеклянные микропипетки вводились в область CA3 дорсального гиппокампа (AP: от 2,5 до 2,7 мм от брегмы, L: 2-3 мм от средней линии и V: 2,5-3 мм ниже твердой мозговой оболочки) (Рисунок 4А). Активность пирамидальной нейронов CA3 определялась по частоте импульсов (8-15 Гц) (Bambico et al., 2012), величине амплитуды (0,5-1,2 мВ) и продолжительности (0,8-1,2 мс), а также по наличию единичных потенциалов действия между комплексами разрядов (Kandel and Spencer, 1961). Всплески активности нейронов также оценивались в автономном режиме, используя сценарий, разработанный для программы Spike 2 («Cambridge Electronic Design», Кембридж, Великобритания). С помощью указанных анализов вычислялись два параметра: количество зарегистрированных всплесков и среднее отношение количества пиков во время всплеска к общей сумме зарегистрированных пиков (%) за период 200 мс. Параметры, использованные для анализа всплесков, основаны на ранее описанных критериях (Omura et al., 2015): всплеск определялся как пакет, состоящий из не менее чем трех пиков, с началом, определяемым по максимальному начальному интервалу между пиками (ISI) 6 мс в пределах фоновой импульсации высокой частоты. Наибольшим допустимым ISI внутри всплеска считался интервал 20 мс.

### 2.7.3. Внеклеточная регистрация сигналов медиальной префронтальной коры (mPFC)

Имплантация электродов для внеклеточной регистрации потенциалов действия пирамидальных нейронов mPFC после электрической стимуляции базолатеральной области миндалевидного тела (BLA) выполнялась так, как описано ранее (Floresco and Tse, 2007). Стимуляция BLA (100-200 импульсов) приводит к изменению сигналов 2-х различных типов: подавлению или усилению активности отдельных популяций нейронов mPFC (Ishikawa and Nakamura, 2003). В нашем исследовании мы оценивали только ингибирующие нейроны, называемые «BLA-mPFC(-)», так как они составляют наибольшую популяцию, обнаруженную в mPFC (Gabbott et al., 2006) (Рисунок 4К и L). Стимуляция BLA осуществлялась в соответствии с предложенным протоколом (Floresco and Tse, 2007). Кроме того, для оценки эффективности синаптической передачи измерялись как амплитуда потенциалов действия во внеклеточной среде (EAP), характеризующая синаптический ток, так и наклон EAP, характеризующий скорость активации синаптических рецепторов. Наклон в милливольт/миллисекунды (мВ/мс) вычислялся в пределах от 20% до 80% максимальной амплитуды EAP и нормализовался до среднего наклона в течение 15 минут исходного интервала. Амплитуда в милливольт (мВ) вычислялась путем измерения расстояния между двумя горизонтальными курсорами, расположенными на нулевой линии и на вершине отрицательного пика волны.

### 2.8. Иммуногистохимический анализ

В условиях анестезии пентобарбиталом (50 мг/кг внутривенно) животным (N = 5-6) транкардиально вводился физиологический раствор, а затем 4% параформальдегид в 0,1 М фосфатном буфере. После этого извлекался головной мозг и фиксировался в течение 3 ч в фиксаторе для перфузии, затем для защиты клеток в течение 72 ч выдерживался в 30% растворе сахарозы в 0,1 М фосфатном буфере и замораживался в препарате оптимальной температуры для приготовления срезов. Поперечные срезы (20 мкм) изготавливались с помощью криостата и помещались замороженными на теплые предметные стекла. Предметные стекла инкубировались в течение ночи с растворами первичных антител к маркеру клеток микроглии Iba-1 (кроличьи антитела к ионизированному кальций-связывающему адаптеру-1, 1: 1000, «Wako Chemicals», Германия) или к маркеру астроцитов GFAP (кроличьи поликлональные антитела к глиальному фибриллярному белку, 1:1000, «Dako Cytomation», Дания). Возможная неспецифическая маркировка вторичных антител мышей выявлялась только с помощью вторичных антител. После инкубации срезы промывались и инкубировались в течение 2-х ч с раствором вторичных антител (ослиные анти-кроличьи антитела Alexa Fluor™ 488, 1:1000, «Molecular Probes», США). Предметные стекла промывались, покрывались заливочной средой Vectashield («Vector Laboratories», США) и визуализировались с помощью флуоресцентного микроскопа Leica.

#### 2.8.1. Количественный анализ изображений

Количество окрашенных клеток подсчитывалось в пределах клетки размером  $2 \times 104$  мкм<sup>2</sup>, которая помещалась в медиальную области коры, гиппокампа (CA1), таламуса и паравентрикулярного ядра гипоталамуса (PVN). У каждого животного исследовались восемь срезов. Для предотвращения подсчета избыточного количества клеток учитывались только клетки, окрашенные контрастным красителем DAPI. Клетки, меченые Iba-1 и GFAP, идентифицировались как неактивные (с небольшими телами и длинными разветвленными отростками) или активированные (гипертрофированные с втянутыми отростками, длина которых меньше диаметра тела) (Hains and Waxman, 2006).

### 2.9. Измерение концентрации N-ацилсеротонина, N-ацилэтаноламина и

## эндоканнабиноидов

### 2.9.1. Извлечение липидов

Образы тощей, подвздошной и двенадцатиперстной кишки (80-100 мг) гомогенизировались пестиком с раствором 2:1:1 холероформа/метанола/TRIS-HCl (50 мМ, рН 7,4), содержащим дейтерированные стандарты (5 пмоль d8-AEA, 50 пмоль d5-2AG, d4-PEA, d2-OEA и 500 пмоль d8-AA-5-HT), а затем обрабатывались ультразвуком (N = 4-6). Гомогенаты экстрагировались хлороформом, после чего собиралась органическая фаза и высушивалась струей азота. Экстракты восстанавливались в 100 мкл метанола LCMS («Sigma») для анализа методом ЖХ-МС и ЖХ-МС/МС.

### 2.9.2. Анализ методом ЖХ-МС и ЖХ-МС/МС

Концентрация эндоканнабиноидов и *N*-ацилэтанололаминов определялась методом жидкостной хроматографии с изотопным разбавлением - масс-спектрометрии при атмосферном давлении с химической ионизацией, как описано в публикации (Bartelt et al., 2011). Концентрация *N*-ацилсеротонина в тканях измерялась методом ЖХ-МС-МС с помощью жидкостного хроматографа LC20AB, объединенного с гибридным детектором IT-TOF («Shimadzu Corporation», Киото, Япония) и оснащенного интерфейсом ESI. Измерялась концентрация в тканях *N*-ацилсеротонинов, в том числе *N*-арахидоноил серотонина (AA-5-HT) и *N*-олеоил серотонина (OA-5-HT), с использованием d8AA-5-HT. Мы получили полноразмерные спектры MSn выбранных ионов-предшественников методом мониторинга множественных реакций (MRM), извлекли хроматограммы с высокими показателями разрешения [M+Na]<sup>+</sup> и использовали указанные хроматограммы для калибровки и количественной оценки. Анализ методом ЖХ проводился в изократическом режиме с использованием колонки Kinetex C18 и метанола/воды/уксусной кислоты в качестве подвижной фазы со скоростью потока 0,15 мл/мин. В колонку ЖХ-МС/МС загружалось пять мкл каждого экстракта. Количественный анализ проводился путем разведения изотопов с использованием значений m/z 485,2971 и 493,2805, соответствующих молекулярному иону [M + Na]<sup>+</sup> дейтерированного и недейтерированного AA-5-HT, соответственно, или значения m/z 463,2873, соответствующего молекулярному иону [M+ Na]<sup>+</sup> недейтерированного OA-5-HT. Для MRM был выбран наиболее доминирующий ион, полученный в результате реакции (показатель m/z 185, соответствующий потере серотонина, [M+Na]<sup>+</sup>).

## 3. Статистический анализ

Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка (S.E.M.). Показатели поведенческих реакций оценивались методом одностороннего анализа дисперсии (ANOVA), а затем с помощью критерия множественных сравнений Ньюмана-Кейлса. Для внутригруппового анализа использовался непарный *T*-критерий и критерий Манна-Уитни (N = 10-12). Электрофизиологические данные анализировали с использованием однонаправленного ANOVA, а затем апостериорного сравнения Холма-Сайдака или *t*-критерия (N = 6-8). Результаты иммуногистохимического анализа оценивались методом одностороннего ANOVA, а затем с помощью апостериорного критерия Тьюки (n = 5-6). Биомолекулярные данные выражались как среднее значение ± стандартное отклонение (SD) и оценивались по методу одностороннего ANOVA, а затем с помощью апостериорных критериев Фишера или Бонферрони (n = 7-9).

### 3.1. Статистический и биоинформационный анализ данных о микробиоте

Демультиплексированные прямые и обратные последовательности объединялись по методу FLASH (Magoc и Salzberg, 2011). Проводилась выбраковка объединенных последовательностей (показатель Phred <20), а короткие последовательности (<250 bp)

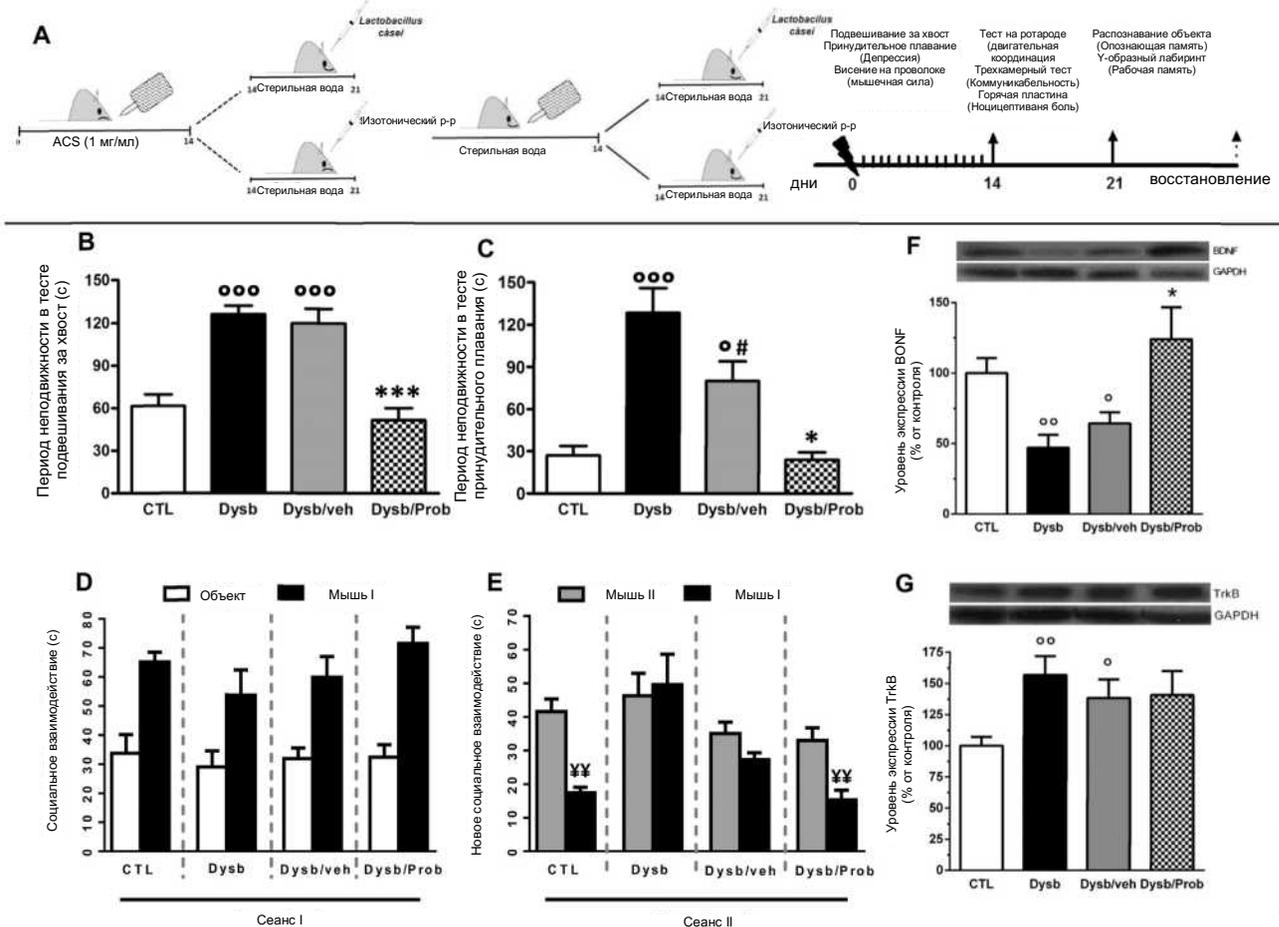
отбирались с помощью программы Prinseq (Schmieder and Edwards, 2011). Затем последовательности высокого качества импортировались в конвейер QIIME (Caporaso et al., 2010). Операционные таксономические единицы (OTU) отбирались методом *de novo* и методом *uclust*, а таксономическое распределение осуществлялось с помощью классификатора RDP и базы данных Greengenes (McDonald et al., 2012) в соответствии с ранее описанным конвейером (De Filippis et al., 2014). Для предотвращения систематической ошибки по причине различной глубины секвенирования, таблицы OTU были разрежены до наименьшего количества последовательностей в образце. Статистический анализ и построение графиков проводились в среде R (<https://www.r-project.org>). Анализ альфа-разнообразия в разреженных таблицах OTU проводился с помощью QIIME. Для определения значимых различий в параметрах альфа-разнообразия или количества отдельных таксонов использовались критерий Крускала-Уоллиса и критерий Вилкоксона для парных сравнений. Пермутационный многомерный анализ вариации (непараметрический MANOVA), основанный на метриках расстояний Жаккарда и Брея-Кертиса, проводился с использованием 999 перестановок для выявления значимых различий в общем составе бактериальных сообществ между группами с использованием функции *adonis* в пакете *vegan*. При необходимости выполнялась коррекция *p*-значений для множественных сравнений. Тепловые графики, составные столбиковые диаграммы и ящичковые диаграммы строились в среде R с помощью пакетов *made4*, *ggplot2* и *ggpubr* (Рисунок 3).

## 4. Результаты

### 4.1. Влияние пробиотика на поведение, подобное депрессии, причиной которого является нарушение состава микробиоты, индуцированное антибиотиками

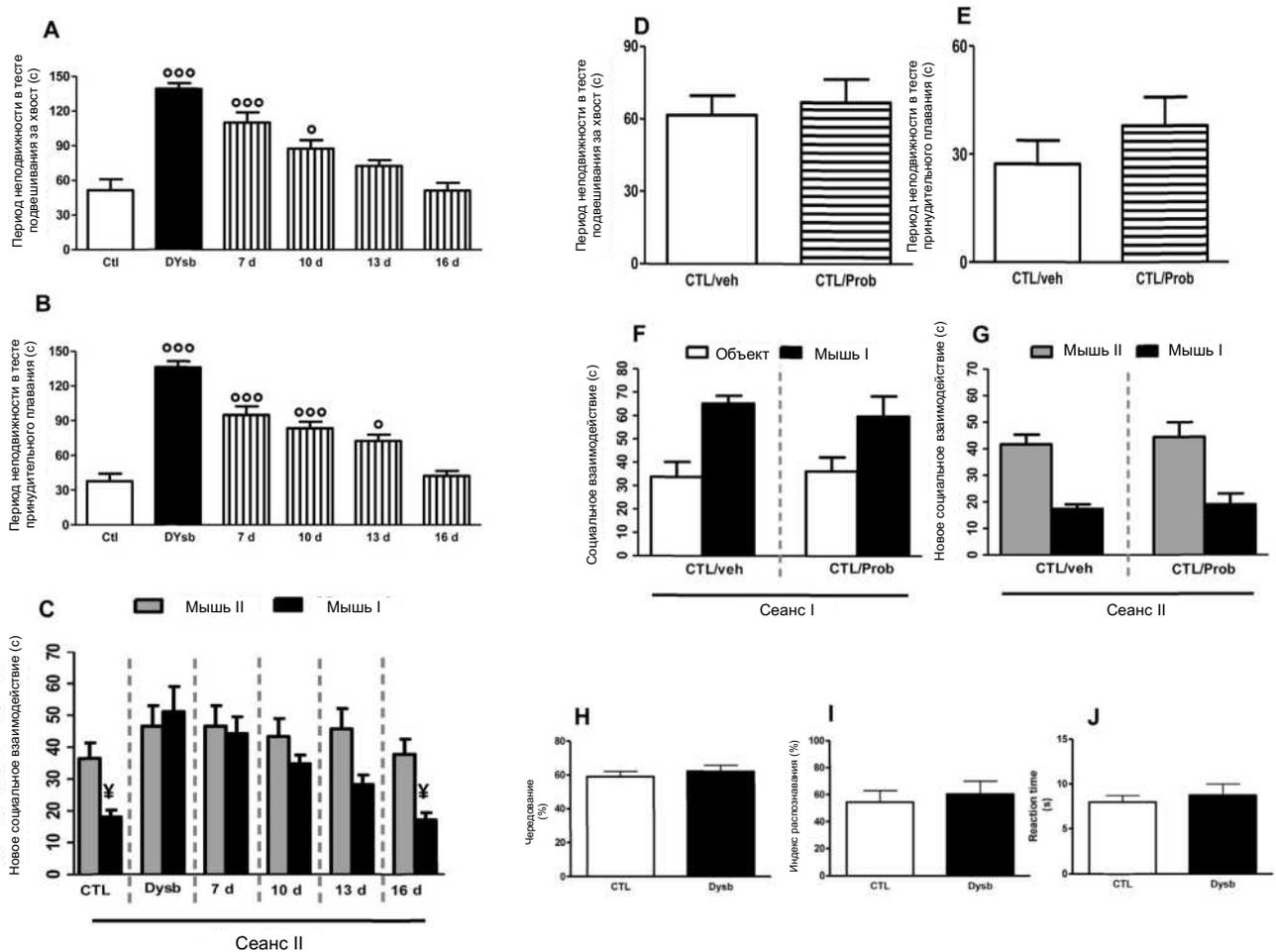
Для оценки возможности нарушения поведения у мышей в результате изменения состава кишечной флоры мы измерили несколько поведенческих реакций. Мы проводили тестирование в дни 14 и 21, а затем до восстановления. Упрощенная схема лечения контрольных мышей и мышей Dysb показана на Рисунке 1А. У мышей из группы дисбактериоза (Dysb) время неподвижности ( $126,2 \pm 6$  с) являлось большим, чем у контрольных мышей ( $61,5 \pm 8,9$  с,  $p < 0,001$ ,  $F(3, 29) = 26,515$ ), что указывает на отсутствие поведения, ориентированного на освобождение (Рисунок 1В). Аналогично, период неподвижности у мышей Dysb ( $128,4 \pm 7,5$  с) являлся большим, чем у контрольных мышей ( $27,2 \pm 6,5$  с,  $p < 0,001$ ,  $F(3, 28) = 17,398$ ) (Рисунок 1С), в опыте принудительного плавания. Многократное введение пробиотика привело к значимому уменьшению периода неподвижности у мышей Dysb в опыте подвешивания за хвост ( $46,5 \pm 7,3$  с) по сравнению с таковым у мышей, которым вводился носитель ( $119,7 \pm 10,3$  с,  $p < 0,001$ ,  $F(3, 29) = 26,515$ ) (Рисунок 1В). У мышей Dysb, которым вводился пробиотик, также являлось меньшим время неподвижности ( $24,0 \pm 5,22$  с), чем у соответствующих контрольных мышей ( $80 \pm 13,9$  с,  $p < 0,001$ ,  $F(3, 28) = 17,398$ ), в опыте принудительного плавания. В последнем опыте у мышей из группы Dysb, которым вводился носитель, наблюдалась небольшая тенденция к восстановлению по сравнению с показателями у мышей Dysb (Рисунок 1В). Тем не менее, указанное различие не являлось статистически значимым.

Результаты теста подвешивания к проволоке и теста на ротороде, показали, что мышечная сила и двигательная функция не ухудшились в результате изменения состава микробиоты (данные не показаны).



BDNF = нейротрофический фактор мозга  
 CTL = контроль  
 Dysb = дисбактериоз  
 Dysb/veh = дисбактериоз/носитель  
 Dysb/prob = дисбактериоз/пробиотик

**Рисунок 1.** Лечение пробиотиком приводит к уменьшению нарушений поведения, связанных с дисбиозом, который индуцирован антибиотиками. Влияние многократного введения носителя или пробиотика на поведенческие реакции у нормальных мышей (CTL) и у мышей с дисбактериозом (Dysb). «А» (левая панель): показана схема достижения дисбактериоза у мышей. Мышам C57BL/6 (в возрасте 6 недель) вводились ампициллин, стрептомицин и клиндамицин (ASC) вместе с питьевой водой или давалась только стерильная вода (0-14 дней). После этого через желудочный зонд мышам вводился пробиотик или физиологический раствор (14-21 день). «А» (правая панель): показан график измерения поведенческих реакций. Дисбактериоз индуцировался в день 0. Поведенческие тесты проводились в дни 14 и 21, а затем до восстановления. На рисунках «В» и «С» показана длительность неподвижности в секундах в опытах подвешивания за хвост и принудительного плавания, соответственно. На рисунках «D» и «E» показана продолжительность исследования объекта или мыши I в секундах (сеанс I, D) и продолжительность изучения знакомой мыши (мышь I) или незнакомой мыши (мышь II, сеанс II, E) в трехкамерном тесте на коммуникабельность. Указаны средние значения ± S.E.M. 10-12 животных в группе. ° = значимые различия по сравнению с Ctl, # = по сравнению с Dysb и \* = по сравнению с Dysb/veh. Односторонний ANOVA, а затем тест множественных сравнений Ньюмана-Кейлса. На рисунке «E» символ ¥ обозначает значимые различия по сравнению с CTL или Dys/Prob в присутствии мыши 1. Для внутригруппового анализа использовался непарный T-критерий и критерий Манна-Уитни. Уровнем значимости считается P < 0,05. Двойной символ обозначает P < 0,01, а тройной символ обозначает P < 0,001. Концентрация белков в гиппокампе мышей CTL или Dysb, которым вводился носитель или пробиотик, измеренная методом вестерн-блоттинга. На рисунках «F» и «G» показана экспрессия белков BDNF и TrkB, нормализованная по GAPDH. Указаны средние значения ± S.E.M. 8-9 животных в группе. Символы ° и \* обозначают значимые различия по сравнению с CTL и Dysb/veh, соответственно. Уровнем статистической значимости считалось значение P < 0,05. Односторонний ANOVA, апостериорные сравнения Фишера. Двойной символ обозначает P < 0,01.



CTL = контроль  
 D = день  
 Dysb = дисбактериоз  
 Dysb/veh = дисбактериоз/носитель  
 Dysb/prob = дисбактериоз/пробиотик

**Рисунок 2.** Влияние многократного введения антибиотиков или пробиотика на поведенческие реакции. На рисунках «А» и «В» показано время неподвижности в секундах в опытах подвешивания за хвост и принудительного плавания, соответственно, у мышей в периоды введения антибиотиков и последующего вымывания. Указаны средние значения  $\pm$  S.E.M. 10-12 животных в группе. Символ <sup>o</sup> обозначает значимое различие по сравнению с Ctl. Односторонний ANOVA, а затем тест множественных сравнений Ньюмана-Кейлса. На рисунке «С» показана продолжительность исследования знакомой мыши (мышь I) или незнакомой мыши (мышь II, сеанс II) в трехкамерном тесте на коммуникабельность в периоды введения антибиотиков и последующего вымывания. Указаны средние значения  $\pm$  S.E.M. 10-12 животных в группе. Символ <sup>¥</sup> обозначает значимые различия по сравнению с CTL или Dys/Prob в присутствии мыши I. Для внутригруппового анализа использовался непарный T-критерий и критерий Манна-Уитни. На рисунках «D» и «E» показана длительность неподвижности в секундах в опытах подвешивания за хвост и принудительного плавания, соответственно. На рисунках «F» и «G» показана продолжительность исследования объекта или мыши I (сеанс I) и продолжительность изучения знакомой мыши (мышь I) или незнакомой мыши (мышь II, сеанс II) в трехкамерном тесте на коммуникабельность. На рисунке «H» показаны значения индекса распознавания в %, полученные в опыте распознавания объекта. На рисунке «I» показаны показатели чередования в %, полученные в опыте Y-образного лабиринта. На рисунке «J» показано время до отдергивания лап, измеренное в опыте горячей пластины. Указаны средние значения  $\pm$  S.E.M. 10-12 животных в группе.

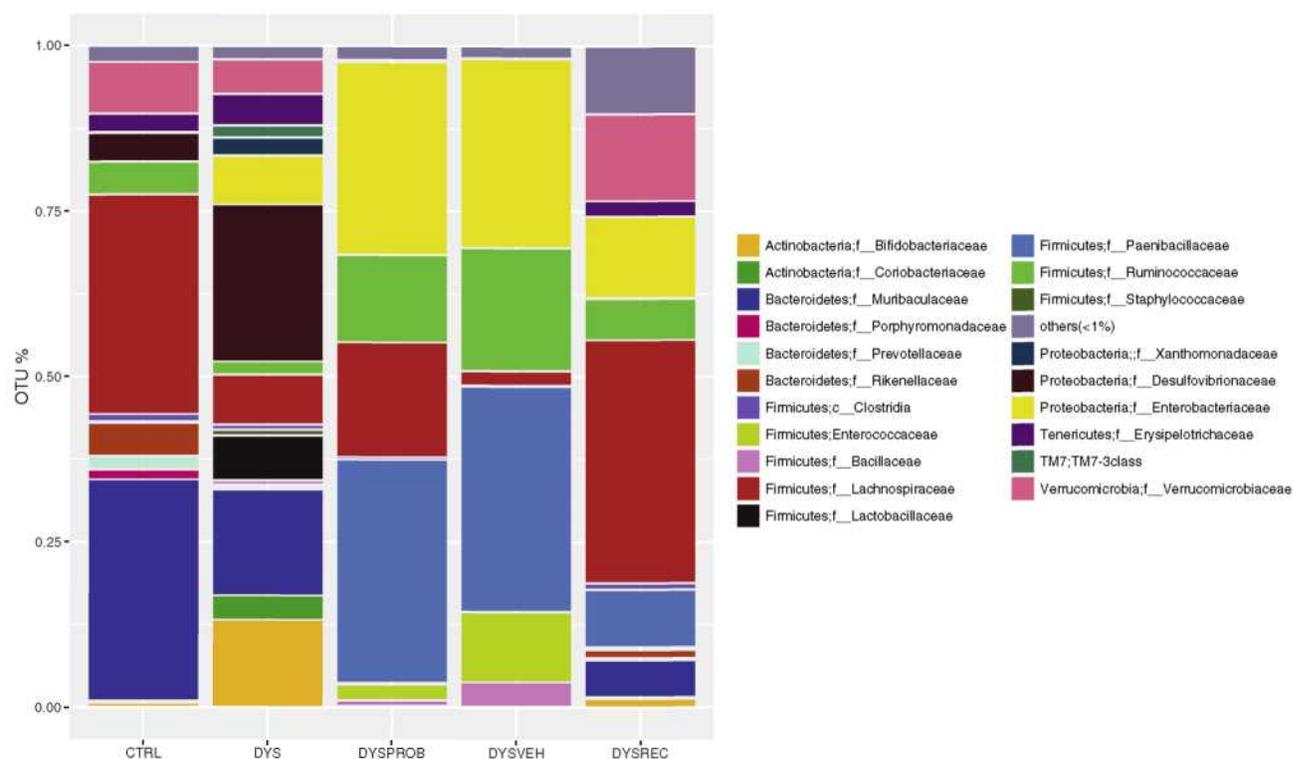
Лечение пробиотиком как таковое не приводило к каким-либо изменениям (Рисунок 2C и D). У мышей Dysb, полностью не получавших лечения, наблюдалось физиологическое восстановление нормального поведения примерно через 2 недели после отмены антибиотиков (Рисунок 2A и B).

Чтобы исключить возможность системного воздействия антибиотиков, вводимых с питьевой водой, мы провели эксперименты, в которых группе мышей смесь антибиотиков

вводилась внутривбрюшинно. Доза подбиралась на основании квоты всасываемости суточных доз, введенных внутрь, в течение 7 дней. В этой группе мышей не наблюдались различия в поведенческих реакциях по сравнению с контролем (CTL =  $60 \pm 4,1$  по сравнению с Dys =  $65 \pm 3,8$  в опыте подвешивания за хвост и CTL =  $36 \pm 5,1$  по сравнению с Dys =  $32,5 \pm 4,2$  в опыте принудительного плавания).

#### 4.2. Влияние пробиотика на изменение социального поведения, вызванное нарушением состава микробиоты, индуцированным антибиотиками

Затем мы исследовали социальное поведение и предпочтение социальной новизны с помощью трехкамерного теста на коммуникабельность. Различия во времени, проведенного в каждой камере, или в количестве переходов между камерами у мышей Dysb по сравнению с контролем не зарегистрированы (не показано). Обе группы мышей проявляли общительность и проводили больше времени, взаимодействуя с другой мышью, чем с объектом, в течение периода регистрации (сеанс I, Рисунок 1D). Тем не менее, у мышей Dysb наблюдалось изменение в предпочтении социальной новизны по сравнению с контрольными мышами. Мыши Dysb не проявляли предпочтения между камерой с незнакомой мышью (мышь 2) ( $46,27 \pm 6,7$  с) и камерой со знакомой мышью (мышь 1) ( $49,6 \pm 9$  с), тогда как контрольные мыши проводили больше времени с мышью 2 ( $41,6 \pm 3,6$  с), чем с мышью 1 ( $17,4 \pm 1,6$  с) (сеанс II, Рисунок 1E). Лечение пробиотиком мышей Dysb привело к увеличению времени, проведенного в камере с мышью 2 ( $33 \pm 3,7$  с), которое явилось значимо большим по сравнению с временем, проведенным в камере с мышью 1 ( $15,3 \pm 0,9$  с)  $p < 0,001$ ), в течение второго сеанса трехкамерного теста на коммуникабельность (Рисунок 1E). У мышей Dysb, которым вводился носитель, не обнаружено различие во времени, проведенного в двух камерах (соответственно,  $35 \pm 3,4$  по сравнению с  $27,2 \pm 2$  с) (Рисунок 1E). Лечение пробиотиком как таковое не приводило к каким-либо изменениям (Рисунок 2F-G). У животных Dysb, которые восстанавливались без лечения, наблюдалось физиологическое восстановление нормального поведения примерно через 2 недели после прекращения лечения антибиотиками (Рисунок 2C). В группе мышей, которым антибиотики вводились внутривбрюшинно, не наблюдались различия в поведенческих реакциях по сравнению с контролем (CTL =  $42 \pm 4,1$  и  $22,3 \pm 3,7$  по сравнению с Dys =  $38 \pm 5,3$  и  $18,5 \pm 4,8$ ).



CTRL = контроль  
 DYS = дисбактериоз  
 DYSPROB = дисбактериоз/пробиотик  
 DYSREC = дисбактериоз/восстановление

**Рисунок 3.** Составная столбиковая диаграмма, на которой показан состав микробиоты на уровне семейств.

#### 4.3. Влияние изменения состава микробиоты, индуцированного антибиотиками, на когнитивное и ноцицептивное поведение

Нарушение состава микробиоты кишечника не влияло на когнитивные показатели в тесте распознавания объектов, так как у мышей *Dysb* индекс распознавания ( $60,4 \pm 9,5\%$ ) не отличался от такового у контрольных мышей ( $54,3 \pm 8,5\%$ ) (Рисунок 2H). Кроме того, у мышей *Dysb* процент чередования рукавов ( $62,2 \pm 3,7\%$ ) не отличался по сравнению с контролем ( $59,0 \pm 3,0\%$ ) в тесте Y-образного лабиринта (Рисунок 2I). Кроме того, порог переносимости тепла в опыт с горячей пластинкой у мышей *Dysb* ( $8,7 \pm 1,2$  с) не отличался по сравнению с контролем ( $7,9 \pm 0,7$  с) (Рисунок 2J).

#### 4.4. Лечение пробиотиком нормализует нарушение экспрессии BDNF в гиппокампе, развившееся по причине изменения состава микробиоты, индуцированного антибиотиками

Чтобы исследовать возможные изменения в регуляции нейротрофического фактора мозга (BDNF), мы измеряли экспрессию BDNF и его мишени, тропомиозинового тирозинкиназного рецептора В (TrkB), в гиппокампе у мышей *Dysb* и контрольных мышей, которым вводился или не вводился пробиотик. Наши данные показали значимое уменьшение экспрессии BDNF у мышей *Dysb*, связанное с увеличением экспрессии TrkB. Лечение пробиотиком приводило к увеличению экспрессии белка BDNF, но не влияло на экспрессию TrkB, по сравнению с мышами *Dysb*, которым вводился носитель (Рисунок IF и G).

#### 4.5. Лечение антибиотиками индуцирует изменения в составе микробиоты кишечника

Как и ожидалось, лечение антибиотиками в целом приводило к глубокому изменению состава микробиоты кишечника (по результатам MANOVA,  $p < 0,05$ ) и мышей Dysb, который явно отличался от такового во всех других группах (Suppl. Fig. S1). Более того, у мышей Dysb разнообразие бактерий являлось меньшим, чем у контрольных мышей ( $p < 0,05$ , Suppl. Fig. S2). Лечение пробиотиком не приводило к восстановлению микробного разнообразия, но через 15 дней после отмены антибиотиков зарегистрировано увеличение параметров альфа-разнообразия ( $p < 0,05$ , Suppl. Fig. S2).

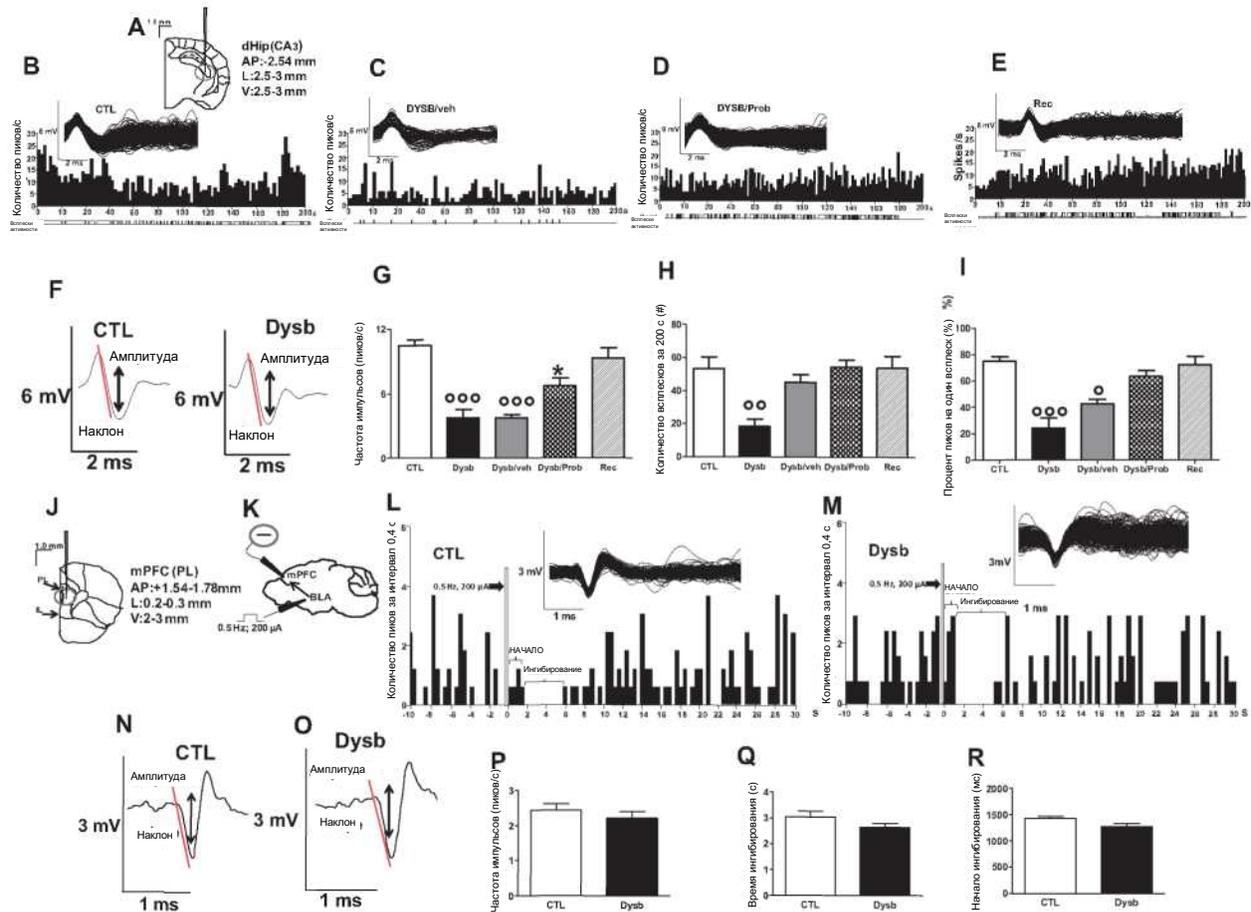
Противомикробные препараты индуцировали увеличение количества *Proteobacteria* и *Actinobacteria* и уменьшение количества *Bacteroidetes* и *Firmicutes* ( $p < 0,05$ , Suppl. Fig. S3). В частности, у мышей Dysb, уменьшилось количество *Lachnospiraceae*, *Muribaculaceae* и *Ruminococcaceae*, но увеличилось количество *Desulfovibrionaceae* и *Enterobacteriaceae* increased ( $p < 0,05$ , Рисунок 2). Анализ на уровне родов показал значимое уменьшение у мышей Dysb количества бактерий, расщепляющих пищевые волокна, относящихся к семействам *Lachnospiraceae* (*Roseburia*, *Lachnospira*, *Lachnobacterium*, *Lachnoclostridium*, *Dorea*, *Acetatifactor*) и *Ruminococcaceae* (*Oscillospira*, *Eubacterium*) (данные не показаны,  $p < 0,05$ ). У мышей, которые лечились пробиотиком, являлось большим количество *Lachnospiraceae*, но меньшим количество *Enterococcaceae* и *Bacillaceae*, чем у мышей, которые лечились плацебо ( $p < 0,05$ , Рисунок 3). Количество бактерий *Lachnospiraceae* достигло уровня, сравнимого с таковым в группе восстановленного контроля (Rec) ( $p > 0,05$ , Рисунок 3), но при этом нормальная микрофлора восстановилась не полностью: количество *Proteobacteria* и *Bacteroidetes* все еще являлось большим и меньшим, чем в группе контроля, соответственно ( $p < 0,05$ ). Интересно то, что избыток *Lachnospiraceae* отрицательно коррелировал с продолжительностью периода неподвижности ( $p < 0,05$ ).

#### 4.6. Влияние пробиотика на воспаление кишечника, развившегося по причине нарушения состава микробиоты, индуцированное антибиотиками

Для оценки возможности того, что изменения состава микробиоты индуцируют нарушение иммунного гомеостаза в кишечнике у мышей, мы измеряли местную экспрессию различных провоспалительных медиаторов в разных сегментах кишечника: в двенадцатиперстной кишке, тощей кишке, подвздошной кишке и толстой кишке. Мы также оценивали влияние пробиотика на экспрессию медиатора воспаления.

Экспрессия IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  и iNOS в двенадцатиперстной кишке у мышей из группы Dysb, являлась значимо большей, чем у мышей из контрольной группы ( $p < 0,05$ ). Лечение пробиотиком привело к значимому уменьшению экспрессии IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  и iNOS ( $p < 0,05$ ) (Suppl. Fig. S4 A-C).

Экспрессия TNF $\alpha$  и iNOS в тощей кишке у мышей из группы Dysb являлась значимо большей, чем у мышей из контрольной группы ( $p < 0,05$ ). Экспрессия IL-1 $\beta$  также увеличилась, но статистически незначимо (Suppl. Fig. S4).



CTL = контроль  
 Dysb = дисбактериоз  
 Dysb/veh = дисбактериоз/носитель  
 Dysb/prob = дисбактериоз/пробиотик  
 Hz = Гц  
 Rec = восстановление  
 mm = мм  
 ms = мс  
 mV = мВ  
 $\mu$ A = мкА

**Рисунок 4.** Влияние лечения пробиотиком и дисбактериоза, индуцированного антибиотиками, на электрофизиологическую активность нейронов гиппокампа и коры головного мозга. На рисунке «А» схематически показаны места регистрации сигналов в области CA3, обозначенные серым кружком. Показатели в мм обозначают стереотаксические координаты. На рисунках «В», «С», «D» и «Е» отображены типичные показания измерителя частоты импульсов, выбросы волны и всплески активности пирамидальных нейронов CA3 в группах CTL, Dysb/veh, Dysb/Prob и Rec, соответственно. На рисунке «F» показаны типичные средние формы сигналов у мышей из групп CTL и Dysb. На рисунках «G», «H» и «I» показаны средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего значения спонтанной активности в единицах количества пиков/с, количества всплесков и процента пиков во время всплесков. Горизонтальный столбик = 2 мс; вертикальный столбик = 6 мВ. На рисунке «J» схематически показаны места регистрации сигналов mPFC, которые обозначены серым кружком. На рисунке «K» схематически показана электрическая стимуляция BLA (0,5 Гц, 200 мкА с интервалом 5 с), которая вызывает ответы нейронов mPFC. На рисунках «L» и «M» отображены типичные показатели регистратора частоты импульсов и выбросы активности нейронов BLA-mPFC (-) у мышей из групп CTL и Dysb, соответственно. На рисунках «P», «Q» и «R» показаны средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего значения спонтанной активности в единицах количества пиков/с, продолжительности ингибирования и начала ингибирования в различных группах мышей. На рисунках «N» и «O» показаны типичные средние формы сигналов у мышей из групп CTL и Dysb. Символ ° обозначает статистически значимое различие по сравнению с группой CTL. Символ \* обозначает статистически значимое различие по сравнению с группой Dysb/veh. Односторонний ANOVA, апостериорный критерий Холма-Сайдака или *t*-тест. Статистическая значимость определяется как  $P < 0,05$ . Двойной символ обозначает  $P < 0,01$ , а тройной символ обозначает  $P < 0,001$  ( $N = 6-8$  в группе).

Лечение пробиотиком являлось эффективным только в отношении уменьшения усиленной экспрессии iNOS ( $p < 0,05$ ).

Экспрессия IL-1 $\beta$  в подвздошной кишке статистически значимо не изменилась у

мышей Dysb, которым вводился или не вводился носитель или пробиотик (Suppl. Fig. S4). Экспрессия TNF $\alpha$  и iNOS являлась значимо большей у мышей Dysb, чем у мышей из контрольной группы ( $p < 0,05$ ). Так же, как и в двенадцатиперстной кишке, лечение пробиотиком привело к уменьшению экспрессии TNF $\alpha$  и iNOS ( $p < 0,05$ ) (Suppl. Fig. S4A-C).

В толстой кишке только экспрессия TNF $\alpha$  являлась значимо большей у мышей Dysb, чем у мышей из контрольной группы ( $p < 0,05$ ). Лечение пробиотиком привело к значимому уменьшению усиленной экспрессии TNF $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) (Suppl. Fig. S4).

Мы также оценили возможную корреляцию изменения состава микробиоты с активацией глиальных клеток кишечника (EGC), так как эти клетки непосредственно участвуют в патогенезе хронического воспаления слизистой оболочки кишечника. Как показано на рисунке Suppl. Fig. S5D, экспрессия GFAP значимо увеличилась в тощей кишке и подвздошной кишке у мышей из группы Dysb ( $p < 0,05$ ), но лечение пробиотиком не оказало влияния на данный эффект. У мышей Dysb также значимо увеличилась экспрессия белка глиальных клеток кишечника S100B ( $p < 0,05$ ) в подвздошной кишке и толстой кишке (Suppl. Fig. S4E). Лечение пробиотиком эффективно уменьшало экспрессию S100B только в подвздошной кишке ( $p < 0,05$ ) (Suppl. Fig. S4E).

#### 4.7. Влияние изменения состава микробиоты, индуцированного антибиотиками, на межклеточные/внутриклеточные связи в кишечнике и циркулирующие цитокины

Для оценки потенциального влияния изменений состава микробиоты и/или лечения пробиотиком на межклеточные (плотные) и внутриклеточные (GAP) связи в кишечнике у мышей мы измеряли экспрессию мРНК зонулина (ZO-1) и коннексина-43 (Cx-43). Во всех анализированных сегментах кишечника экспрессия ZO-1 статистически значимо не изменялась в результате лечения антибиотиками или пробиотиком (Suppl. Fig. S4G). Экспрессия Cx-43 также не нарушалась у мышей с дисбактериозом. Тем не менее, у мышей из группы Dysb лечение пробиотиком привело к увеличению экспрессии мРНК Cx-43 в подвздошной кишке и в толстой кишке ( $p < 0,05$ ) (Suppl. Fig. S4H). Кроме того, мы также измеряли концентрацию IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  в сыворотке крови, чтобы оценить системное влияние изменений состава микробиоты на воспалительные медиаторы для выяснения потенциальных механизмов коммуникации между кишечником и головным мозгом. Ни лечение антибиотиками, ни пробиотиком, значимо не влияли на концентрацию циркулирующих цитокинов по сравнению с таковым у контрольных мышей (данные не показаны).

#### 4.8. Влияние лечения пробиотиком на изменение активности пирамидальных нейронов гиппокампа в области СА3, вызванное нарушением состава микробиоты, индуцированным антибиотиками

Мы проводили внеклеточную регистрацию *in vivo* для мониторинга возможных изменений активности пирамидальных нейронов дорзального гиппокампа (в области СА3) у мышей, лечившихся антибиотиками и пробиотиком. У контрольных животных наблюдалась спонтанная фоновая активность с частотой импульсации  $10,47 \pm 0,51$  пиков/с (Рисунок 4В и G). Анализ всплесков импульсации у контрольных мышей показал, что количество всплесков за период 200 мс, и процент пиков во время всплесков, составляли соответственно  $53,30 \pm 7,13$  и  $75,13 \pm 3,04\%$  (Рисунок 4Н и I). Примечательно, что изменение состава микробиоты вызывало резкое уменьшение частоты импульсов ( $3,77 \pm 0,77$  пиков/с,  $p < 0,001$ ,  $F(3, 16) = 12,04$ ), а также значимое уменьшение количества всплесков и процента пиков во время всплесков ( $18,54 \pm 4,17$ ,  $p < 0,01$ ,  $F(3, 16) = 8,37$  и  $24,09 \pm 7,40\%$ ,  $p < 0,001$ ,  $F(3, 16) = 14,55$  соответственно) (Рисунок 4G-I). Введение носителя не влияло на фоновую частоту импульсации ( $3,76 \pm 0,42$  пиков/с), процент пиков

во время всплесков ( $42,48 \pm 7,82\%$ ) и количество всплесков за период 200 мс ( $40,45 \pm 13,29$ ) (Рисунок 4G- I), несмотря на тенденцию к восстановлению количества всплесков за период 200 мс. Примечательно, что лечение пробиотиком значимо увеличивало спонтанную фоновую активность ( $6,69 \pm 13,29$  пиков/с,  $p < 0,05$ ,  $F(3,16) = 12,04$ ) (Рисунок 4D и G), а также полностью нормализовало количество всплесков и процент пиков во время всплесков ( $54,48 \pm 4,15$  и  $63,12 \pm 4,47\%$  соответственно) по сравнению с данными показателями у мышей Dysb. Тем не менее, отсутствовали статистически значимые различия по сравнению с группой носителя (Рисунок 4G и H). Примечательно, что снижение частоты импульсов у животных Dysb нормализовалось до уровня контроля к концу периода восстановления (Рисунок 4E и G). Нарушение состава микробиоты не приводило к значимому изменению амплитуды или наклона импульсов пирамидальных нейронов гиппокампа, как показано на Рисунке 4E.

#### 4.9. Влияние индуцированного антибиотиками нарушения состава микробиоты на активность нейронов BLA-mPFC(-)

Так как функциональная реорганизация коры лобной доли сильно коррелировала с когнитивными нарушениями при нескольких неврологических заболеваниях (Guida et al., 2015), мы оценивали возможные изменения активности медиальных префронтальных нейронов коры головного мозга (mPFC) после стимуляции базалатеральной области миндалевидного тела (BLA) у контрольных мышей спонтанная частота импульсации нейронов BLA→PLC(-) составляла  $2,43 \pm 0,17$  пиков/с (Рисунок 4K и P). Длительность и начало индуцированного BLA ингибирования у контрольных мышей составляли  $3,04 \pm 0,21$  с и  $1427 \pm 38,10$  мс, соответственно (Рисунок 4Q и R). У мышей Dysb не выявлены значимые изменения фоновой активности (Рисунок 4M и P), а также продолжительности и начала ингибирования ( $2,21 \pm 0,17$  пиков/с,  $2,64 \pm 0,15$  с и  $1273 \pm 58,86$  мс, соответственно) (Рисунок 4Q и R). Кроме того, мы не обнаружили значимое различие в показателях амплитуды EAP или наклона EAP у мышей Dysb по сравнению с мышами из группы контроля (Рисунок 4N и O). Учитывая описанные результаты, мы не проводили регистрацию активности mPFC у контрольных мышей и мышей Dysb, которые лечились пробиотиком.

#### 4.10. Влияние пробиотика на активацию микроглии и астроцитов, вызванную нарушением состава микробиоты, индуцированным антибиотиками

Проводились иммуногистохимические анализы для определения активации нейронов после нарушения состава микробиоты. Во всех группах лечения не обнаружены различия в общем количестве клеток. Тем не менее, согласно ранее описанным критериям (Hains and Waxman, 2006), морфологический анализ положительных клеток Iba-1 показал, что лечение антибиотиками в течение 2-х недель привело к увеличению числа активированных клеток микроглии в сегменте гиппокампа CA1 у мышей Dysb по сравнению с данными показателями в контрольной группе (Рисунок 5A). Кроме того, увеличилось количество гипертрофированных астроцитов, маркированных GFAP (Рисунок 5B). Лечение пробиотиком привело к значимому уменьшению морфологических изменений, вызванных дисбиозом, как микроглии, так и астроцитов, по сравнению с изменениями у животных, которым вводился носитель (Рисунок 5A и B). Вымывание (Res) также приводило к нормализации числа активированных клеток микроглии (Рисунок 5A и C) и астроцитов (Рисунок 5B и D). У мышей Dysb по сравнению с контролем наблюдалось небольшое увеличение числа активированных клеток микроглии или гипертрофированных астроцитов в медиальной префронтальной коре (Рисунок 5E-F), в таламусе и в PVN. Тем не менее, описанные эффекты также уменьшались у животных, которым вводился носитель (Supp. Fig. S5).

#### 4.11. Влияние нарушения состава микробиоты, индуцированного антибиотиками, на концентрацию в ткани кишечника *N*-ацилсеротонина, *N*-ацилэтаноламина и ЕС

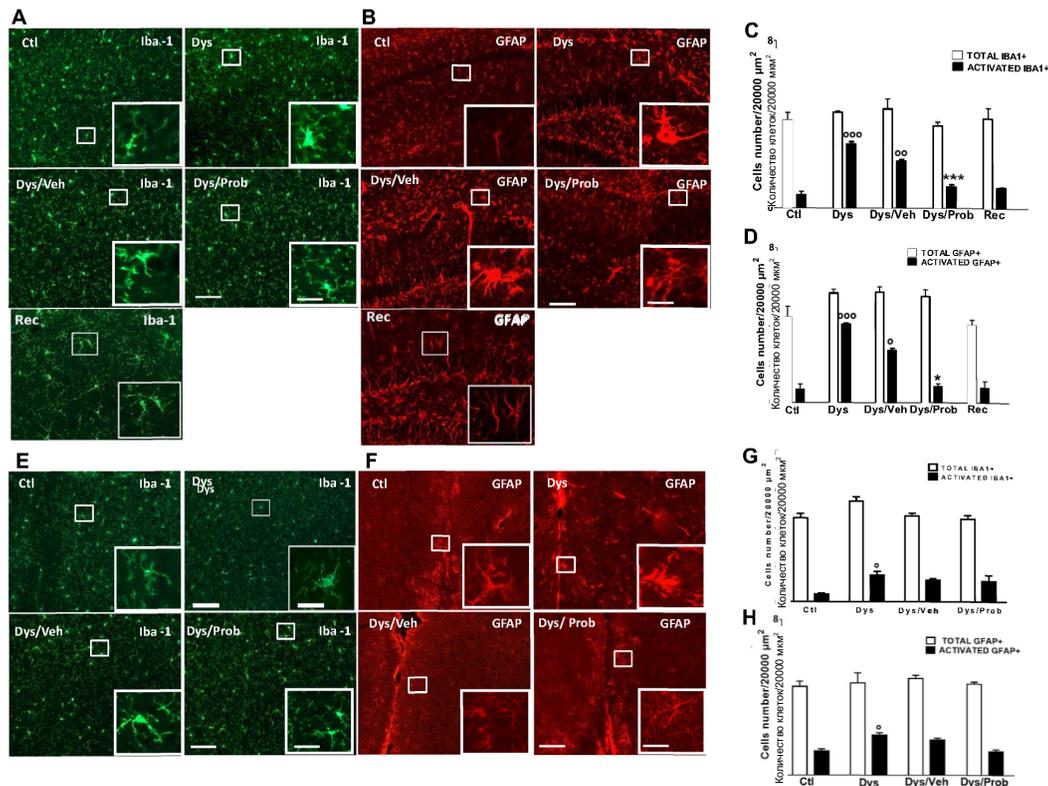
В связи с убедительными данными о нарушении серотонинергической сигнализации при дисбактериозе кишечника и его потенциальной роли в патогенезе депрессии и воспалительных заболеваний кишечника (O'Mahony et al., 2015), предшествующего обнаружения *N*-ацилсеротонинов в кишечнике грызунов (Verhoeckx et al., 2011) и ранее описанной роли *N*-арахидоноилсеротонина (АА-5-НТ) и молекулярных мишеней, которые он ингибирует, то есть гидролазы амидов жирных кислот (ФААН) и транзитного рецепторного потенциала ванилида типа 1 (TRPV1), в экспериментальных моделях тревоги и депрессии [(Kirkedal et al., 2016; Navarria et al., 2014) и ссылки в данном публикациях], мы измерили концентрации этих новых членов эндоканнабиноидома, а также эндоканнабиноидов АЕА и 2-АГ и двух основных *N*-ацилэтаноламинов, у которых установлены различные роли в патогенезе дисбактериоза, депрессии и/или воспаления кишечника (Borrelli and Izzo, 2009; Cani et al., 2016; Capasso et al., 2014, Rubino et al., 2015).

На [Рисунке 5](#) показана концентрация АА-5-НТ и *N*-олеоилэлеротонина (ОА-5-НТ) в ткани тощей, подвздошной и двенадцатиперстной кишки у мышей. В настоящем исследовании мы впервые сообщаем, что концентрация указанных двух липидов в ткани тощей кишки значимо уменьшается ( $P < 0,05$  и  $P < 0,01$ , [Рисунок 6А](#)) у мышей с дисбактериозом и увеличивается после лечения пробиотиком ( $P < 0,05$  и  $P < 0,01$ ). В подвздошной кишке и двенадцатиперстной кишке у мышей с дисбактериозом значимо уменьшалась только концентрация ОА-5-НТ ( $P < 0,05$ ), но также наблюдалась тенденция к уменьшению концентрации АА-5-НТ и ее увеличению после лечения пробиотиком ([Рисунок 6В](#) и [С](#)).

Кроме того, указана концентрация эндоканнабиноидов и *N*-ацилэтаноламина ([Рисунок 6D](#)). У мышей с дисбактериозом концентрация эндоканнабиноида АЕА значимо увеличилась в тощей кишке после лечения пробиотиком ( $P < 0,05$ ) и уменьшилась в двенадцатиперстной кишке ( $P < 0,05$ ). После лечения пробиотиком в двенадцатиперстной кишке уменьшилась концентрация олеоилэтаноламида (ОАЭ) ( $P < 0,05$ ). Концентрация пальмитоилэтаноламида (РЕА) и другого эндоканнабиноида, 2- АГ, значимо не изменилась.

#### 4.12. Лечение пробиотиком нормализует нарушение фосфорилирования TRPV1 в гиппокампе, развившееся по причине изменения состава микробиоты, индуцированного антибиотиками

Мы измеряли концентрацию двух основных прямых или косвенных молекулярных мишеней эндоканнабиноидов в головном мозге, то есть каннабиноидного рецептора CB1, который прямо активируется эндоканнабиноидами АЕА и 2-АГ и косвенно (посредством ингибирования фермента, расщепляющего АЕА, ФААН) *N*-ацилсеротонинами, некоторыми *N*-ацилэтаноламинами и каналом TRPV1, который прямо активируется эндоканнабиноидами и некоторыми *N*-ацилэтаноламинами и ингибируется некоторыми *N*-ацилсеротонинами. Мы обнаружили, что дисбактериоз и последующее лечение пробиотиком не приводят к изменению концентрации белка CB1 и TRPV1 ([Рисунок 6Е](#) и [F](#)).



CTL = контроль  
 Dysb = дисбактериоз  
 Dysb/veh = дисбактериоз/носитель  
 Dysb/prob = дисбактериоз/пробиотик  
 TOTAL = общее количество клеток  
 ACTIVATED = количество активированных клеток

**Рисунок 5.** Пробиотик уменьшает активацию микроглии и астроцитов, вызванную нарушением состава микробиоты, индуцированным антибиотиками. Иммунореактивность Iba-1 и GFAP обнаружена в гиппокампе (A-D) или коре (E-H) у нормальных мышей (CTL) и мышей с дисбактериозом (Dysb), которым вводился носитель или пробиотик, а также у мышей восстановления. На диаграмме показано общее количество клеток и количество активированных клеток. Указаны средние значения ± S.E.M. 5-6 животных в группе. Символ ° обозначает статистически значимое различие по сравнению с группой CTL. Символ \* обозначает статистически значимое различие по сравнению с группой Dysb/veh. Статистическая значимость определяется как P < 0,05. Двойной символ обозначает P < 0,01, а тройной символ обозначает P < 0,001. ANOVA, апостериорный критерий Тьюки. Масштабные полоски на панорамном и вставленном изображении обозначают 100 и 25 мкм, соответственно.

Тем не менее, дисбиоз сопровождался усилением фосфорилирования (и, следовательно, сенсibilизацией) TRPV1 в гиппокампе, и этот эффект уменьшался пробиотиком (Рисунок 6E и F).

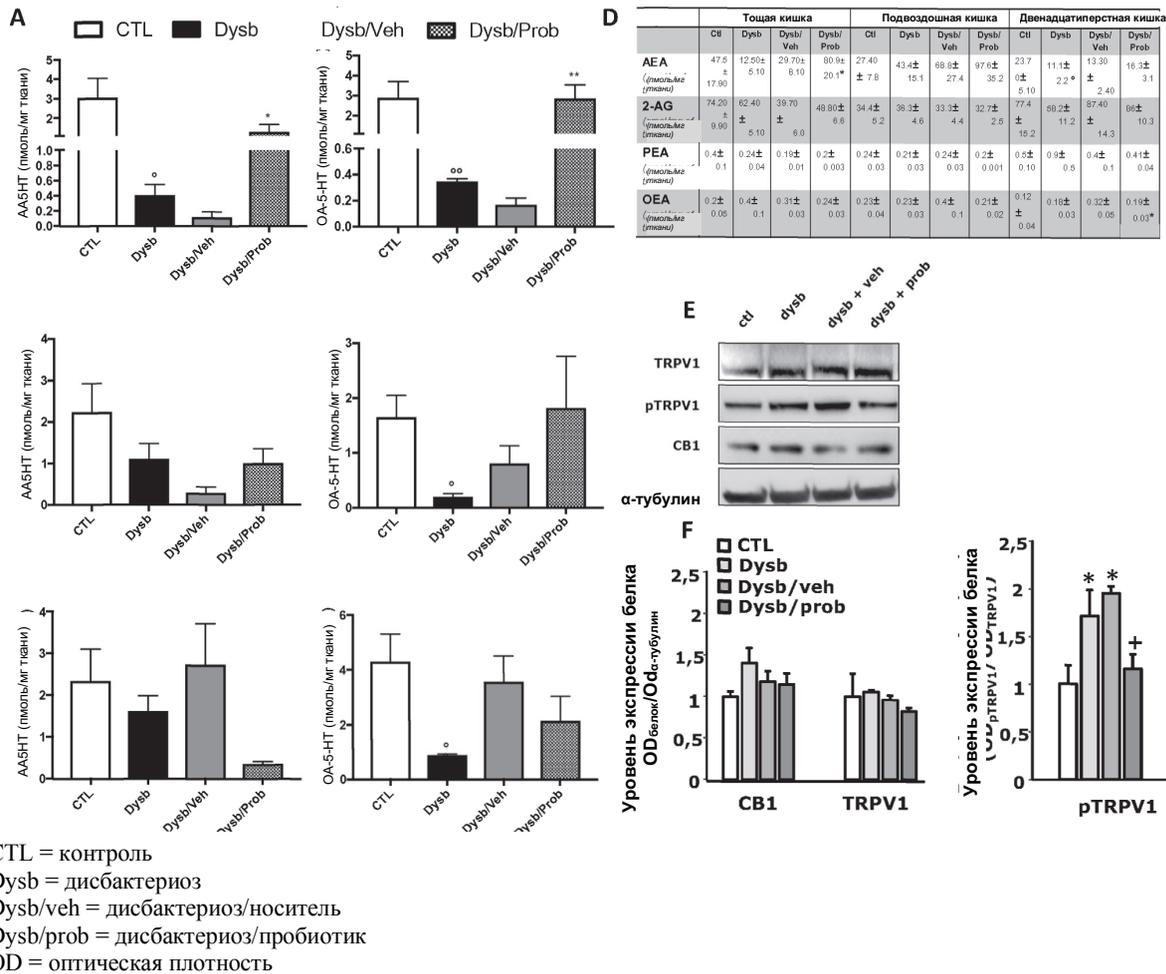
## 5. Обсуждение

Характеристика оси микробиота-кишечник-головной мозг имеет решающее значение для понимания и лечения воспалительных заболеваний кишечника, а также связанных с ними психических нарушений. На сегодняшний день информация о механизмах реципрокного взаимодействия кишечника и головного мозга, а также потенциальном использовании пробиотиков для лечения некоторых нейропсихиатрических заболеваний, по-прежнему остается противоречивой. Настоящее исследование показывает, что индуцированное антибиотиками нарушение состава микробиота приводит к развитию поведения, подобного депрессии, и нарушению социальной активности, связанными с биохимическими и функциональными изменениями в гиппокампе. Примечательно, что многократное введение пробиотика LCDG может способствовать уменьшению воспаления

кишечника, а также нормализации поведенческих реакций и связанные с ними биохимических и функциональных изменений.

Длительное использование противомикробных препаратов приводит к нарушению состава кишечных бактерий. Схема лечения и фармакокинетические свойства лекарственных препаратов могут влиять на бактериальную организацию и, в свою очередь, (положительно или отрицательно) на поведение (Bercik et al., 2011; Johnston et al., 2014). В настоящем исследовании мы использовали смесь антибиотиков широкого спектра действия (Lamouse-Smith et al., 2011) для общего изменения состава микрофлоры и выявления возможных биомолекулярных механизмов модификации поведения. Мы обнаружили, что лечение антибиотиками вызывает депрессивное поведение, проявляющееся как более продолжительная неподвижность в опытах по оценке поведения, подобного депрессии, и ухудшение социальной опознающей памяти, похожие на недостаток мотивации и депрессию, часто наблюдаемые у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника. Благоприятное влияние пробиотиков на поведение и функцию головного мозга приобретает все большее признание в области лечения воспалительных заболеваний (D'Mello et al., 2015). В нашем исследовании по сравнению с животными, которым вводился носитель в течение того же периода времени, многократное введение пробиотика приводило к значимому уменьшению признаков поведения, подобного депрессии, и снижения социальной активности.

Лечение противомикробными препаратами в течение 2-х недель приводило к развитию выраженного дисбактериоза с уменьшением бактериального разнообразия и увеличением количества *Proteobacteria* и *Actinobacteria*, что ранее связывалось с развитием депрессивных нарушений (Jiang et al., 2015). По литературным данным, проникновение провоспалительных медиаторов, включая липополисахарид (ЛПС) грамотрицательных энтеробактерий в системный кровоток (явление, известное как «повышенная кишечная проницаемость»), может являться одним из патофизиологических механизмов депрессии (Berk et al., 2013; Foster and McVey Neufeld, 2013; Maes et al., 2008). Интересно, что частичное восстановление состава микробиоты кишечника наблюдалось уже через 1 неделю после отмены антибиотиков.



**Рисунок 6.** Концентрация AA-5-HT и OA-5-HT в ткани тощей кишки (A), подвздошной кишки (B) и двенадцатиперстной кишки (C) после изменения антибиотиками состава микробиоты. Указаны средние значения ± SEM N = 4-6 мышей. Символы \* P < 0,05, \*\* P < 0,01; ° P < 0,05, °° P < 0,01 обозначают статистически значимые различия между группой Ctl и группой Dysb, а также между группой Dysb/Veh и группой Dysb/Prob, соответственно, в показателях концентрации эндоканнабиноидов и N-ацилэтанолamina в периферических тканях (D) по результатам t-теста Стьюдента. Указаны средние значения ± SEM отдельных измерений у N = 9-11 мышей. Символы \* P < 0,05 и ° P < 0,05 обозначают статистически значимые различия между группой Ctl и группой Dysb, а также между группой Dysb/Veh и группой Dysb/Prob, соответственно, по результатам t-теста Стьюдента. Оценка экспрессии белков CB1 и TRPV1 и/или фосфорилирования в гиппокампе у мышей с дисбактериозом. (E) Типичная хроматограмма, отображающая уровни экспрессии белков CB1 и TRPV1 и изменение их фосфорилирования на конце S800, полученная методом вестерн-блоттинга ткани гиппокампа, у мышей из групп CTL, Dysb, Dysb/veh и Dysb/prob. (F слева) Столбиковая диаграмма, на которой показана концентрация белков CB1 и TRPV1, нормализованная по концентрации α-тубулина. (F справа) Концентрация фосфорилированного TRPV1 (pTRPV1), нормализованная по общей концентрации TRPV1. Звездочка обозначает значение p < 0,05 по сравнению с CTL. Крест (+) обозначает p < 0,05 по сравнению с другими экспериментальными группами. Указаны средние значения ± SD не менее чем трех независимых измерений.

Более поразительно то, что лечение пробиотиком привело к большему увеличению количества *Lachnospiraceae* по сравнению с введением носителя, до уровня, сопоставимого с показателем у мышей из группы контроля в конце периода восстановления. Описанные результаты подтверждают предыдущие данные об уменьшении количества *Lachnospiraceae* у пациентов с большим депрессивным расстройством. Этот факт является интригующим, так как несколько родов из этого семейства расщепляют пищевые волокна и продуцируют короткоцепочечные жирные кислоты (SCFA). Кроме противовоспалительного эффекта, SCFA упрочняют кишечный барьер, регулируя сборку плотных соединений. В связи с этим, недостаток SCFA может являться фактором патогенеза повышенной кишечной проницаемости. Таким образом,

несмотря на то, что в настоящем исследовании не измерялось содержание специфических SCFA, возможна положительная корреляция между количеством *Lachnospiraceae* и антидепрессантным эффектом пробиотиков. Интересно отметить, что в настоящем исследовании нормальный поведенческий фенотип восстанавливался у мышей *Dysb*, не получавших лечения, примерно через 2 недели после отмены антибиотиков. Это позволяет предположить, что антидепрессантный эффект пробиотиков (с точки зрения поведенческих и функциональных/биохимических изменений), может частично усиливаться за счет спонтанного восстановления микробиоты. Таким образом, длительное лечение пробиотиком оказывает благотворное влияние как на центральные/поведенческие функции, так и на кишечник, возможно, ускоряя физиологическое восстановление, которое мы наблюдали в некоторых конечных точках измерения после отмены антибиотиков.

Изменение состава микробиоты также сопровождалось усилением воспалительных процессов в тонком кишечнике. В частности, увеличение экспрессии IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  связывалось с энтеральным реактивным глиозом, о чем свидетельствует увеличение экспрессии GFAP. В последние годы энтеральные глиальные клетки (EGC), которые традиционно считались только выполняющими поддерживающую функцию, начинают признаваться местными регуляторами в ЖКТ воспаления кишечника, являясь связующим звеном между нейронами и не-нейронными клетками (Ochoa-Cortes et al., 2016). В частности, мы ранее продемонстрировали, что EGC и белки S100B непосредственно участвуют в патогенезе воспалительных заболеваний кишечника, регулируя экспрессию белка i-NOS и последующее высвобождение NO (Cirillo et al., 2011). В настоящем исследовании, так же, как GFAP и S100B, экспрессия белка i-NOS являлась значимо большей у мышей с дисбактериозом, чем у контрольных мышей. Пробиотик значимо уменьшал воспаление кишечника. А именно, повышенная концентрация цитокинов у мышей *Dysb*, а также чрезмерная экспрессия i-NOS и S100, полностью нормализовались у мышей, которые лечились пробиотиком. Вместе с тем, концентрация белка GFAP не изменялась, что свидетельствует о сохранении активации EGC во время лечения пробиотиком. Описанные данные подтверждают противовоспалительное действие LCDG (Novotny Nunez et al., 2015) и указывают на возможность сдвига функционального фенотипа GFAP-положительных клеток кишечника в сторону защитного фенотипа. Путем тщательного анализа поверхностных антигенов можно идентифицировать вероятные изменения профиля EGC, вызванные антимикробными препаратами и пробиотиками.

Интересно то, что в предыдущем исследовании дисбиоз, вызванный антибиотиком, не был связан с воспалением кишечника или изменениями специфических кишечных нейротрансмиттеров (Bercik et al., 2011). Кроме того, у тех же животных наблюдался другой поведенческий фенотип - более исследовательский и с меньшей выраженностью страха. Кроме того, в отличие от наблюдений нашей модели, краткосрочное воздействие антибиотиков специфически коррелировало с ухудшением когнитивных характеристик (Frohlich et al., 2016). Подобные расхождения могут являться следствием различных условий эксперимента, включая породу мышей, а также схема лечения противомикробными препаратами или их химические свойства. Несомненно, что указанные факторы могут по-разному влиять на состав микробиоты и, следовательно, на иммунный ответ кишечника, который, в свою очередь, может по-разному влиять на поведение. Повышенная кишечная проницаемость может привести к развитию системного воспаления в результате проникновения бактерий через эпителиальный барьер, и является хорошо известным маркером здоровья кишечника. Наши данные свидетельствуют о том, что дисбактериоз не влияет на кишечный барьер. Фактически, у животных с дисбактериозом наблюдалась тенденция к увеличению экспрессии мРНК ZO-1, но статистический анализ показал отсутствие значимых различий. Кроме того, у

животных с дисбактериозом не обнаружены изменения концентрации циркулирующих провоспалительных цитокинов по сравнению с контролем. Эти данные согласуются с результатами предыдущего исследования, в котором показано, что состав бактерий и, следовательно, кишечная проницаемость зависят от спектра действия антибиотиков, поэтому разные классы антимикробных препаратов могут оказывать различное влияние на целостность кишечника (Tulstrup et al., 2015). Тем не менее, мы не можем исключить, что в нашей модели, несмотря на кажущуюся целостность кишечного барьера, другие биомолекулы могут попадать в системный кровоток и/или другие высвобождаются в меньших количествах (например, *N*-ацилсеротонины, см. ниже), что является одним из факторов патофизиологии депрессии (Frohlich et al., 2016).

Интригующим является то, что мы обнаружили значимое увеличение экспрессии мРНК *Cx-43* в подвздошной кишке и толстой кишке в ответ на лечение пробиотиком. В качестве компонента щелевых соединений *Cx-43* участвует в образовании связей между клетками кишечника, и его экспрессия на поверхности EGC уменьшается при воспалении (Ochoa-Cortes et al., 2016). Недавно было высказано предположение о том, что потеря *Cx-43* клетками EGC может приводить к увеличению проницаемости кишечной сосудистой сети, обеспечивая соединение по оси кишечник-головной мозг и способствуя развитию воспаления головного мозга у пациентов с аутизмом (Gupta et al., 2014). Интересно, что лечение пробиотиком приводило к значимому увеличению экспрессии *Cx-43* у мышей, которым вводились антибиотики. Это может указывать на возможность того, что продукция данного белка является восстановительной реакцией, опосредованной пробиотиками, в ответ на некоторые типы дисбактериоза. Тем не менее, возможную роль *Cx-43* в патогенезе психических заболеваний, связанных с дисбактериозом, еще предстоит установить.

BDNF является ключевым регулятором синаптической пластичности и нейрогенеза. Было показано, что уменьшение концентрации BDNF в гиппокампе и BDNF-зависимые изменения синаптической пластичности являются мощными факторами развития депрессии (Waterhouse and Xu, 2009). В настоящем исследовании у мышей *Dysb*, кроме поведения, подобного депрессии, обнаружено уменьшение концентрации BDNF в гиппокампе, связанное с увеличением экспрессии рецептора TrkB. Описанные результаты, согласующиеся с публикациями, в которых подчеркивается роль BDNF в изменении поведения у стерильных мышей (Bercik et al., 2011; Sudo et al., 2004), указывают на то, что изменение сигнализации BDNF/TrkB может играть определенную роль в развитии симптомов депрессии, вызванных дисбактериозом. Тем не менее, нельзя исключать участие других различных факторов депрессии, связанных с воспалением, включая серотонинергическую и дофаминергическую нейротрансмиссию, а также глюкокортикоиды (Udina et al., 2016).

Сообщается, что функциональные изменения в синапсах областей гиппокампа CA1-CA3 и морфологические модификации пирамидальных нейронов в области CA3 связаны с развитием депрессии (Qiao et al., 2014). Таким образом, уменьшение концентрации BDNF может способствовать изменению активности нейронов гиппокампа, уменьшению синаптогенеза и увеличению чувствительности нейронов к другим факторам, таким как влияние глюкокортикоидов надпочечников, которые вырабатываются в ответ на стресс (Angelucci et al., 2005). Мы обнаружили глубокое подавление активности пирамидальных нейронов CA3 у мышей с *Dysb*. В частности, являлись значимо сниженными фоновая спонтанная активность, количество всплесков и процент пиков во время всплесков. Так же, как и наблюдавшиеся нарушения поведения, в настоящем исследовании концентрация BDNF и электрофизиологическая активность гиппокампа нормализовались в результате лечения пробиотиком. В то же время нарушение состава микробиоты не приводило к электрофизиологическим изменениям в

кортикальных цепях (BLA-mPFC), которые являются ключевыми субстратами когнитивной функции. Кроме того, описанные данные согласуются с отсутствием грубого когнитивного дефицита у животных в настоящем исследовании.

Недавние данные свидетельствуют о вовлечении не-нейронных клеток в регуляцию синаптической пластичности в кортикальных цепях, участвующих в осуществлении эмоциональной функции. В частности, было показано, что увеличение концентрации провоспалительных цитокинов в крови и сопутствующая активация микроглии головного мозга, играют определенную роль в патогенезе депрессии (Rial et al., 2015). В настоящем исследовании нарушение состава микробиоты приводило к значимой активации астроцитов и микроглии на уровне гиппокампа. Описанные изменения считаются прогностическими признаками ослабления головного мозга, которое, в свою очередь, может указывать на ухудшение функции нейронов. Тем не менее, может потребоваться дальнейшее исследование поверхностных антигенов для идентификации функционального фенотипа, индуцированного дисбактериозом. Тем не менее, так же, как поведение и функция, активация микроглии/астроцитов нормализовалась в результате лечения пробиотиком. Кроме гиппокампа, роль активации микроглии/астроцитов у мышей с *Dysb* оценивалась в других областях головного мозга, таких как mPFC, PVN и таламус, в связи с установленным воздействием микробиоты на центры интеграции эмоциональных стимулов, чувствительности и обмена веществ (Sen et al., 2017). Фактически, наблюдалось лишь небольшое увеличение количества активированных клеток микроглии и/или астроцитов. Кроме того, через 7 дней после отмены антибиотиков (у животных, которым вводился носитель) зарегистрировано физиологическое восстановление исходного количества активированных клеток микроглии и/или астроцитов. Последние данные вызывают интерес в связи с ролью PVN в путях нейронной интеграции, регулирующих функции кишечника. Несмотря на все еще недостаточное понимание основных механизмов, наши данные подкрепляют утверждение о том, что микробиота кишечника влияет на области головного мозга, контролируемые эмоциональное поведение, воздействуя, по меньшей мере, на начальной стадии на структуры, обеспечивающие взаимодействие между ЦНС и периферией.

Мы также обнаружили, что дисбактериоз сопровождался в гиппокампе усилением фосфорилирования и, следовательно, сенсibilизации TRPV1, при этом экспрессия каннабиноидного рецептора CB1 не изменилась. Рецепторы TRPV1 и CB1 играют противоположные роли (усиление и подавление, соответственно) в экспериментальных моделях депрессии (Huang et al., 2016; Kirkedal et al., 2016; Navarria et al., 2014; Wang et al., 2017) и являются мишенями как для эндоканнабиноидов, так и, в частности для TRPV1, некоторых других представителей эндоканнабиноидома, таких как *N*-ацилэтанолламины, *N*-ацилдопамины и *N*-ацилсеротонины (Di Marzo and Wang, 2014). Увеличение экспрессии/активности TRPV1 в гиппокампе была связана с усилением реакции на стресс, поведением, подобным депрессии, и уменьшением экспрессии BDNF (Navarria et al., 2014; Wang et al., 2017). Таким образом, увеличение фосфорилирования/сенсibilизации TRPV1 у мышей с *Dysb* может являться одним из факторов развития эффектов, подобных депрессии, и уменьшения экспрессии BDNF, индуцированных антибиотикотерапией. Тем не менее, в гиппокампе активность TRPV1 связывается с долгосрочным подавлением (LTD) интернейронов гиппокампа и (возможно, как следствие) уменьшением долгосрочного потенцирования (LTP) пирамидальных нейронов в области CA1 (Bennion et al., 2011; Brown et al., 2013; Gibson et al., 2008). Два данных эффекта должны приводить к увеличению импульсации пирамидальных нейронов, в то время как фактически дисбактериоз приводил к уменьшению активности пирамидальных нейронов в области CA1. Таким образом, возможно, что наблюдавшееся увеличение активации TRPV1 в гиппокампе происходит в других клетках [функциональные каналы TRPV1 также

обнаружены в зубчатой извилине (Chavez et al., 2010)] или что оно также представляет собой механизм адаптивной отрицательной обратной связи, направленной на противодействие индуцированному дисбиозом ингибированию активности пирамидальных клеток. В любом случае, тот факт, что лечение пробиотиком приводило к устранению гиперфосфорилирования TRPV1, указывает на участие данного канала в реакции мозга на дисбактериоз.

В завершение, мы также наблюдали, что дисбактериоз сопровождался значимым уменьшением экспрессии в ткани кишечника липидных медиаторов нового типа, мононенасыщенных и полиненасыщенных *N*-ацилсеротонинов, которые, как известно, ингибируют инактивацию эндоканнабиноидов FAAH и в то же время ингибируют канал TRPV1 (Chavez et al., 2010; Maione et al., 2007; Ortar et al., 2007), а также ранее обнаружены в тонком кишечнике у свиней и мышей (Verhoeckx et al., 2011). Не менее чем в двух из трех анализированных тканей кишечника экспрессия указанных медиаторов усиливалась у животных, которые лечились пробиотиком, если до начала лечения наблюдалось уменьшение экспрессии. Ожидается, что в экспериментальных моделях активизация FAAH и TRPV1, в том числе по причине уменьшения экспрессии *N*-ацилсеротонина, приведет как к усилению воспаления кишечника (Izzo et al., 2001; McVey and Vigna, 2005), так и симптомов, подобных депрессии (Kirkedal et al., 2016; Navarria et al., 2014). В связи с этим, а также с тем, что циркулирующие длинноцепочечные *N*-ацилсеротонины могут проникать через гемато-энцефалический барьер и устойчивы к гидролизу до серотонина (de Lago et al., 2005), возможно, что впервые обнаруженное в настоящем исследовании уменьшение экспрессии данных медиаторов, индуцированное антибиотиками, является одним из факторов патогенеза как воспаления кишечника, так и симптомов, подобных депрессии. Интересно то, что только в ткани тощей кишки и двенадцатиперстной кишки дисбиоз и последующее лечение пробиотиком сопровождалось уменьшением и увеличением, соответственно, концентрации АЕА (единственного эндоканнабиноида, который специфически инактивировался FAAH), но не эндоканнабиноида 2-AG (который также может инактивироваться другими ферментами). Это указывает на следующее: 1) несомненно, что индуцированная дисбиозом понижающая регуляция *N*-ацилсеротонинов приводит к увеличению активности FAAH; 2) данный эффект менее выражен в подвздошной кишке. Интересно отметить, что кроме АЕА, количество других *N*-ацилэтаноламиновых субстратов FAAH, таких как РЕА и ОЕА, не уменьшалось вследствие нарушения состава микробиоты, что подтверждает мнение о том, что количество этих двух веществ и АЕА может также контролироваться другими факторами, такими как активность избытка биосинтетических ферментов или наличие пищевых предшественников, а также что эти липидные медиаторы играют разные роли в зависимости от причины дисбактериоза и типа цепи жирных кислот (Geurts et al., 2015). Так как тонкий кишечник и микробиота могут являться источником или способствовать биосинтезу серотонина, который является наиболее вероятным предшественником биосинтеза *N*-ацилсеротонинов (Dempsey et al., 2014), необходимы дальнейшие исследования, чтобы связать наблюдавшееся уменьшение концентрации указанных медиаторов со специфическими изменениями колонизации одним или несколькими видами микроорганизмов, индуцированными нашей антибиотикотерапией и противонаправленным лечением LCDG.

## 6. Выводы

Таким образом, наши результаты показывают, что изменение состава микрофлоры кишечника может приводить к изменению эмоционального поведения за счет одновременного приведения в действие нескольких клеточных и молекулярных механизмов. Насколько нам известно, это первое исследование, в котором показана

реорганизация гиппокампа, которая может являться причиной депрессивного поведения, индуцированного нарушением состава микробиоты. Кроме того, наше исследование демонстрирует взаимосвязь между относительным количеством некоторых микроорганизмов и специфическим поведением, а также в нем представлены беспрецедентные примеры биомолекул (с уделением особого внимания эндоканнабиноидам), изменение количества или активности которых, индуцированное дисбиозом, может объяснить данное поведение. В заключение, мы показали, что длительное лечение LCDG может благоприятно действовать на развившийся дисбактериоз, возможно, за счет ускорения физиологического восстановления. Наши результаты являются первым шагом к новому пониманию неясной роли микробиоты в функционировании ЦНС. Установление соответствующих механизмов может привести к разработке новых подходов к лечению психических заболеваний, патогенетически связанных с патологией желудочно-кишечного тракта.

### Авторский вклад

Разработка экспериментов: FG, FT, SM, RC, VD.

Проведение экспериментов: FT, MI, DDG, IP, FD, FN, SB, FAI, FP.

Анализ данных. Поставка материалов/инструментов анализа: FG, GS, LL, AU, EP, VdN, DE, VD.

Написание статьи: FG, SM, VD.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Приложение А. Вспомогательные данные

Дополнительные материалы по статье можно найти в онлайн-версии по адресу <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2017.09.001>.

### Ссылки на литературу

- Alcock, J., Maley, C.C., Aktipis, C.A., 2014. Is eating behavior manipulated by the gastrointestinal microbiota? Evolutionary pressures and potential mechanisms. *Bioessays* 36, 940-949.
- Angelucci, F., Brene, S., Mathe, A., 2005. BDNF in Schizophrenia, Depression and Corresponding Animal Models. Nature Publishing Group.
- Bambico, F.R., Hattan, P.R., Garant, J.P., Gobbi, G., 2012. Effect of delta-9- tetrahydrocannabinol on behavioral despair and on pre- and postsynaptic serotonergic transmission. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 38, 88-96.
- Bartelt, A., Orlando, P., Mele, C., Ligresti, A., Toedter, K., Scheja, L., Heeren, J., Di Marzo, V., 2011. Altered endocannabinoid signalling after a high-fat diet in Apoe(-/-) mice: relevance to adipose tissue inflammation, hepatic steatosis and insulin resistance. *Diabetologia* 54, 2900-2910.
- Bashashati, M., Moossavi, S., Cremon, C., Barbara, M.R., Moraveji, S., Talmon, G., Rezaei, N., Hughes, P.A., Bian, Z.X., Choi, C.H., Lee, O.Y., Coeffier, M., Chang, L., Ohman, L., Schmulson, M.J., McCallum, R.W., Simren, M., Sharkey, K.A., Barbara, G., 2017. Colonic immune cells in irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Neurogastroenterol. Motil.* <http://dx.doi.org/10.1111/nmo.13192>.
- Bennion, D., Jensen, T., Walther, C., Hamblin, J., Wallmann, A., Couch, J., Blickenstaff, J., Castle, M., Dean, L., Beckstead, S., et al., 2011. Transient receptor potential vanilloid 1 agonists modulate hippocampal CA1 LTP via the GABAergic system. *Neuropharmacology* 61, 730-738.
- Bercik, P., Collins, S.M., Verdu, E.F., 2012. Microbes and the gut-brain axis. *Neurogastroenterol. Motil.* 24,405-413.
- Bercik, P., Denou, E., Collins, J., Jackson, W., Lu, J.,Jury,J., Deng, Y., Blennerhassett, P., Maori, J., McCoy, K.D., et al., 2011. The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotropic factor and behavior in mice. *Gastroenterology* 141, 599-609. [609 e591-593](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.05.033).
- Bercik, P., Verdu, E.F., Foster, J.A., Maori, J., Potter, M., Huang, X., Malinowski, P., Jackson, W., Blennerhassett, P., Neufeld, K.A., et al., 2010. Chronic gastrointestinal inflammation induces anxiety-like behavior and alters central nervous system biochemistry in mice. *Gastroenterology* 139 (2102-2112), e2101.
- Berk, M., Williams, L.J., Jacka, F.N., O'Neil, A., Pasco, J.A., Moylan, S., Allen, N.B., Stuart, A.L., Hayley, A.C., Byrne, M.L., Maes, M., 2013. So depression is an inflammatory disease, but where does the inflammation come from? *BMC Med.* 11, 200.
- Boorman, E., Zajkowska, Z., Ahmed, R., Pariante, C.M., Zunszain, P.A., 2016. Crosstalk between endocannabinoid and immune systems: a potential dysregulation in depression? *Psychopharmacology (Berl)* 233,1591-1604.
- Borrelli, F., Izzo, A.A., 2009. Role of acylethanolamides in the gastrointestinal tract with special reference to food intake and energy balance. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 23, 33-49.

- Bravo, J.A., Julio-Pieper, M., Forsythe, P., Kunze, W., Dinan, T.G., Bienenstock, J., Cryan, J.F., 2012. Communication between gastrointestinal bacteria and the nervous system. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12, 667-672.
- Brown, T.E., Chirila, A.M., Schrank, B.R., Kauer, J.A., 2013. Loss of interneuron LTD and attenuated pyramidal cell LTP in Trpv1 and Trpv3 KO mice. *Hippocampus* 23, 662-671.
- Cani, P.D., Plovier, H., Van Hul, M., Geurts, L., Delzenne, N.M., Druart, C., Everard, A., 2016. Endocannabinoids-at the crossroads between the gut microbiota and host metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* 12,133-143.
- Capasso, R., Orlando, P., Pagano, E., Aveta, T., Buono, L., Borrelli, F., Di Marzo, V., Izzo, A. A., 2014. Palmitoylethanolamide normalizes intestinal motility in a model of post-inflammatory accelerated transit: involvement of CB(1) receptors and TRPV1 channels. *Br. J. Pharmacol.* 171, 4026-4037.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Pena, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., et al., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7,335-336.
- Chavez, A.E., Chiu, C.Q., Castillo, P.E., 2010. TRPV1 activation by endogenous anandamide triggers postsynaptic long-term depression in dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* 13,1511-1518.
- Cirillo, C., Sarnelli, G., Turco, F., Mango, A., Grosso, M., Aprea, G., Masone, S., Cuomo, R., 2011. Proinflammatory stimuli activates human-derived enteroglial cells and induces autocrine nitric oxide production. *Neurogastroenterol. Motil.* 23, e372- 382.
- Collins, S.M., Bercik, P., 2009. The relationship between intestinal microbiota and the central nervous system in normal gastrointestinal function and disease. *Gastroenterology* 136, 2003-2014.
- Compare, D., Rocco, A., Coccoli, P., Angrisani, D., Sgamato, C., Iovine, B., Salvatore, U., Nardone, G., 2017. Lactobacillus casei DG and its postbiotic reduce the inflammatory mucosal response: an ex-vivo organ culture model of post- infectious irritable bowel syndrome. *BMC Gastroenterol.* 17, 53.
- Cristino, L., Luongo, L., Imperatore, R., Boccella, S., Becker, T., Morello, G., Piscitelli, F., Busetto, G., Maione, S., Di Marzo, V., 2016. Orexin-A and endocannabinoid activation of the descending antinociceptive pathway underlies altered pain perception in leptin signaling deficiency. *Neuropsychopharmacology* 41, 508- 520.
- D'Argenio, G., Valenti, M., Scaglione, G., Cosenza, V., Sorrentini, I., Di Marzo, V., 2006. Up-regulation of anandamide levels as an endogenous mechanism and a pharmacological strategy to limit colon inflammation. *FASEB J.* 20, 568-570.
- D'Inca, R., Barollo, M., Scarpa, M., Grillo, A.R., Brun, P., Vettorato, M.G., Castagliuolo, I., Sturniolo, G.C., 2011. Rectal administration of Lactobacillus casei DG modifies flora composition and Toll-like receptor expression in colonic mucosa of patients with mild ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.* 56,1178-1187.
- D'Mello, C., Ronaghan, N., Zaheer, R., Dickey, M., Le, T., MacNaughton, W.K., Surette, M.G., Swain, M.G., 2015. Probiotics improve inflammation-associated sickness behavior by altering communication between the peripheral immune system and the brain. *J. Neurosci.* 35,10821-10830.
- Dai, C., Zheng, C.Q., Jiang, M., Ma, X.Y., Jiang, L.J., 2013. Probiotics and irritable bowel syndrome. *World J. Gastroenterol.* 19, 5973-5980.
- De Filippis, F., Vannini, L., La Stora, A., Laghi, L., Piombino, P., Stellato, G., Serrazanetti, D.I., Gozzi, G., Turrone, S., Ferrocino, I., et al., 2014. The same microbiota and a potentially discriminant metabolome in the saliva of omnivore, ovo-lacto-vegetarian and Vegan individuals. *PLoS One* 9, e12373.
- de Lago, E., Petrosino, S., Valenti, M., Morera, E., Ortega-Gutierrez, S., Fernandez- Ruiz, J., Di Marzo, V., 2005. Effect of repeated systemic administration of selective inhibitors of endocannabinoid inactivation on rat brain endocannabinoid levels. *Biochem. Pharmacol.* 70, 446-452.
- Dempsey, D.R., Jeffries, K.A., Anderson, R.L., Carpenter, A.M., Rodriguez Opsina, S., Merlender, D.J., 2014. Identification of an arylalkylamine N-acyltransferase from *Drosophila melanogaster* that catalyzes the formation of long-chain N- acylserotonins. *FEBS Lett.* 588, 594-599.
- Di Marzo, V., Wang, J., 2014. The Endocannabinoidome: The World of Endocannabinoids and Related Mediators. Academic Press.
- Floresco, S.B., Tse, M.T., 2007. Dopaminergic regulation of inhibitory and excitatory transmission in the basolateral amygdala-prefrontal cortical pathway. *J. Neurosci.* 27, 2045-2057.
- Fond, G., Boukouaci, W., Chevalier, G., Regnault, A., Eberl, G., Hamdani, N., Dickerson, F., Macgregor, A., Boyer, L., Dargel, A., et al., 2015. The "psychomicrobiotic": Targeting microbiota in major psychiatric disorders: a systematic review. *Pathol. Biol. (Paris)* 63, 35-42.
- Foster, J.A., McVey Neufeld, K.A., 2013. Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci.* 36, 305-312.
- Frohlich, E.E., Farzi, A., Mayerhofer, R., Reichmann, F., Jacan, A., Wagner, B., Zinser, E., Bordag, N., Magnes, C., Frohlich, E., Kashofer, K., Gorkiewicz, G., Holzer, P., 2016. Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: Analysis of gut microbiota-brain communication. *Brain Behav. Immun.* 56,140-155.
- Frye, R.E., Slaterry, J., MacFabe, D.F., Allen-Vercoe, E., Parker, W., Rodakis, J., Adams, J.B., Krajmalnik-Brown, R., Bolte, E., Kahler, S., et al., 2015. Approaches to studying and manipulating the enteric microbiome to improve autism symptoms. *Microb. Ecol. Health Dis.* 26, 26878.
- Gabbott, P.L., Warner, T.A., Busby, S.J., 2006. Amygdala input monosynaptically innervates parvalbumin immunoreactive local circuit neurons in rat medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 139,1039-1048.
- Geurts, L., Everard, A., Van Hul, M., Essaghir, A., Duparc, T., Matamoros, S., Plovier, H., Castel, J., Denis, R.G., Bergiers, M., et al., 2015. Adipose tissue NAPE-PLD controls fat mass development by altering the browning process and gut microbiota. *Nat. Commun.* 6, 6495.
- Gibson, H.E., Edwards, J.G., Page, R.S., Van Hook, M.J., Kauer, J.A., 2008. TRPV1 channels mediate long-term depression at synapses on hippocampal interneurons. *Neuron* 57, 746-759.
- Grenham, S., Clarke, G., Cryan, J.F., Dinan, T.G., 2011. Brain-gut-microbe communication in health and disease. *Front. Physiol.* 2, 94.
- Guida, F., Luongo, L., Marmo, F., Romano, R., Iannotta, M., Napolitano, F., Belardo, C., Marabese, L., D'Aniello, A., De Gregorio, D., et al., 2015. Palmitoylethanolamide reduces pain-related behaviors and restores glutamatergic synapses homeostasis in the medial

- prefrontal cortex of neuropathic mice. *Mol. Brain* 8,47.
- Gupta, S., Ellis, S.E., Ashar, F.N., Moes, A., Bader, J.S., Zhan, J., West, A.B., Arking, D.E., 2014. Transcriptome analysis reveals dysregulation of innate immune response genes and neuronal activity-dependent genes in autism. *Nat. Commun.* 5,5748.
- Hains, B.C., Waxman, S.G., 2006. Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 26,4308-4317.
- Henry, R.J., Kerr, D.M., Flannery, L.E., Killilea, M., Hughes, E.M., Corcoran, L., Finn, D. P., Roche, M., 2017. Pharmacological inhibition of FAAH modulates TLR-induced neuroinflammation, but not sickness behaviour: an effect partially mediated by central TRPV1. *Brain Behav. Immun.* 62, 318-331.
- Huang, W.J., Chen, W.W., Zhang, X., 2016. Endocannabinoid system: Role in depression, reward and pain control (Review). *Mol. Med. Rep.* 14, 2899-2903.
- Ishikawa, A., Nakamura, S., 2003. Convergence and interaction of hippocampal and amygdalar projections within the prefrontal cortex in the rat. *J. Neurosci.* 23, 9987-9995.
- Izzo, A.A., Capasso, R., Pinto, L., Di Carlo, G., Mascolo, N., Capasso, F., 2001. Effect of vanilloid drugs on gastrointestinal transit in mice. *Br. J. Pharmacol.* 132,1411— 1416.
- Jiang, H., Ling, Z., Zhang, Y., Mao, H., Ma, Z., Yin, Y., Wang, W., Tang, W., Tan, Z., Shi, J., et al., 2015. Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. *Brain Behav. Immun.* 48,186-164.
- Johnston, C.D., Bannantine, J.P., Govender, R., Endersen, L., Pletzer, D., Weingart, H., Coffey, A., O'Mahony, J., Sleator, R.D., 2014. Enhanced expression of codon optimized *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antigens in *Lactobacillus salivarius*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4,120.
- Kandel, E.R., Spencer, W.A., 1961. Electrophysiology of hippocampal neurons. II. After-potentials and repetitive firing. *J. Neurophysiol.* 24, 243-259.
- Kirkedal, C, Wegener, G., Moreira, F., Joca, S.R., Liebenberg, N., 2016. A dual inhibitor of FAAH and TRPV1 channels shows dose-dependent effect on depression-like behaviour in rats. *Acta Neuropsychiatr.*, 1-6
- Lamouse-Smith, E.S., Tzeng, A., Starnbach, M.N., 2011. The intestinal flora is required to support antibody responses to systemic immunization in infant and germ free mice. *PLoS One* 6, e27662.
- Maes, M., Kubera, M., Leunis, J.C., 2008. The gut-brain barrier in major depression: intestinal mucosal dysfunction with an increased translocation of LPS from gram negative enterobacteria (leaky gut) plays a role in the inflammatory pathophysiology of depression. *Neuro Endocrinol. Lett.* 29,117-124.
- Magoc, T., Salzberg, S.L., 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27, 2957-2963.
- Maione, S., De Petrocellis, L, de Novellis, V., Moriello, A.S., Petrosino, S., Palazzo, E., Rossi, F.S., Woodward, D.F., Di Marzo, V., 2007. Analgesic actions of N- arachidonoyl-serotonin, a fatty acid amide hydrolase inhibitor with antagonistic activity at vanilloid TRPV1 receptors. *Br. J. Pharmacol.* 150, 766- 781.
- McDonald, D., Price, M.N., Goodrich, J., Nawrocki, E.P., DeSantis, T.Z., Probst, A., Andersen, G.L., Knight, R., Hugenholtz, P., 2012. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J.* 6, 610-618.
- McVey, D.C., Vigna, S.R., 2005. The role of leukotriene B4 in *Clostridium difficile* toxin A-induced ileitis in rats. *Gastroenterology* 128,1306-1316.
- Mela, V., Piscitelli, F., Berzal, A.L., Chowen, J., Silvestri, C, Viveros, M.P., Di Marzo, V., 2016. Sex-dependent effects of neonatal maternal deprivation on endocannabinoid levels in the adipose tissue: influence of diet. *J. Physiol. Biochem.* 73, 349-357.
- Messaoudi, M., Lalonde, R., Violle, N., Javelot, H., Desor, D., Nejd, A, Bisson, J.F., Rougeot, C., Pichelin, M., Cazaubiel, M., Cazaubiel, J.M., 2011a. Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *Br. J. Nutr.* 105, 755-764.
- Messaoudi, M., Violle, N., Bisson, J.F., Desor, D., Javelot, H., Rougeot, C., 2011b. Beneficial psychological effects of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in healthy human volunteers. *Gut Microbes* 2, 256-261.
- Navarria, A, Tamburella, A, Iannotti, F.A., Micale, V., Camillieri, G., Gozzo, L., Verde, R., Imperatore, R., Leggio, G.M., Drago, F., Di Marzo, V., 2014. The dual blocker of FAAH/TRPV1 N-arachidonoylserotonin reverses the behavioral despair induced by stress in rats and modulates the HPA-axis. *Pharmacol. Res.* 87,151-159.
- Novotny Nunez, I., Maldonado Galdeano, C., de Moreno de LeBlanc, A, Perdigon, G., 2015. *Lactobacillus casei* CRL 431 administration decreases inflammatory cytokines in a diet-induced obese mouse model. *Nutrition* 31,1000-1007.
- Ochoa-Cortes, F., Turco, F., Linan-Rico, A, Soghomonyan, S., Whitaker, E., Wehner, S., Cuomo, R., Christofi, F.L., 2016. Enteric glial cells: a new frontier in neurogastroenterology and clinical target for inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* 22, 433-449.
- Omura, Y., Carvalho, M.M., Inokuchi, K., Fukai, T., 2015. A lognormal recurrent network model for burst generation during hippocampal sharp waves. *J. Neurosci.* 35, 14585-14601.
- Ortar, G., Cascio, M.G., De Petrocellis, L, Morera, E., Rossi, F., Schiano-Moriello, A, Nalli, M., de Novellis, V., Woodward, D.F., Maione, S., Di Marzo, V., 2007. New N- arachidonoylserotonin analogues with potential “dual” mechanism of action against pain. *J. Med. Chem.* 50, 6554-6569.
- O'Mahony, S.M., Clarke, G., Borre, Y.E., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2015. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behav. Brain Res.* 277, 32-48.
- Partty, A., Lehtonen, L, Kalliomaki, M., Salminen, S., Isolauri, E., 2015. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG therapy and microbiological programming in infantile colic: a randomized, controlled trial. *Pediatr. Res.* 78, 470-475.
- Petra, A.I., Panagiotidou, S., Hatziagelaki, E., Stewart, J.M., Conti, P., Theoharides, T.C., 2015. Gut-microbiota-brain axis and its effect on neuropsychiatric disorders with suspected immune dysregulation. *Clin. Ther.* 37, 984-995.
- Piscitelli, F., Carta, G., Bisogno, T., Murru, E., Cordeddu, L., Berge, K., Tandy, S., Cohn, J. S., Grinari, M., Banni, S., Di Marzo, V.,

2011. Effect of dietary krill oil supplementation on the endocannabinoidome of metabolically relevant tissues from high-fat-fed mice. *Nutr. Metab. (Lond.)* 8, 51.
- Putra, M.Y., Ianaro, A., Panza, E., Bavestrello, G., Cerrano, C., Fattorusso, E., Tagliatela-Scafati, O., 2012. Sinularioside, a triacetylated glycolipid from the Indonesian soft coral *Sinularia* sp., is an inhibitor of NO release. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 2723-2725.
- Qiao, H., An, S.C., Ren, W., Ma, X.M., 2014. Progressive alterations of hippocampal CA3-CA1 synapses in an animal model of depression. *Behav. Brain Res.* 275, 191-200.
- Rial, D., Lemos, C., Pinheiro, H., Duarte, J.M., Goncalves, F.Q., Real, J.I., Prediger, R.D., Goncalves, N., Gomes, C.A., Canas, P.M., et al., 2015. Depression as a glial-based synaptic dysfunction. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 521.
- Rossi, F., Bellini, G., Torella, M., Tortora, C., Manzo, I., Giordano, C., Guida, F., Luongo, L., Papale, F., Rosso, F., et al., 2014. The genetic ablation or pharmacological inhibition of TRPV1 signalling is beneficial for the restoration of quiescent osteoclast activity in ovariectomized mice. *Br. J. Pharmacol.* 171, 2621-2630.
- Rubino, T., Zamberletti, E., Parolaro, D., 2015. Endocannabinoids and mental disorders. *Handb. Exp. Pharmacol.* 231, 261-283.
- Russo, R., Cristiano, C., Avagliano, C., De Caro, C., La Rana, G., Raso, G.M., Canani, R.B., Meli, R., Calignano, A., 2017. Gut-brain axis: Role of lipids in the regulation of inflammation, pain and CNS diseases. *Curr. Med. Chem.*
- Schmieder, R., Edwards, R., 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27, 863-864.
- Sen, T., Cawthon, C.R., Ihde, B.T., Hajnal, A., DiLorenzo, P.M., de La Serre, C.B., Czaja, K., 2017. Diet-driven microbiota dysbiosis is associated with vagal remodeling and obesity. *Physiol. Behav.* 173, 305-317.
- Slyepchenko, A., Carvalho, A.F., Cha, D.S., Kasper, S., McIntyre, R.S., 2014. Gut emotions - mechanisms of action of probiotics as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 13, 1770-1786.
- Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X.N., Kubo, C., Koga, Y., 2004. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J. Physiol.* 558, 263-275.
- Tulstrup, M.V., Christensen, E.G., Carvalho, V., Linninge, C., Ahrne, S., Hojberg, O., Licht, T.R., Bahl, M.I., 2015. Antibiotic treatment affects intestinal permeability and gut microbial composition in wistar rats dependent on antibiotic class. *PLoS One* 10, e0144854.
- Turco, F., Sarnelli, G., Cirillo, C., Palumbo, I., De Giorgi, F., D'Alessandro, A., Cammarota, M., Giuliano, M., Cuomo, R., 2014. Enteroglial-derived S100B protein integrates bacteria-induced Toll-like receptor signalling in human enteric glial cells. *Gut* 63, 105-115.
- Udina, M., Navines, R., Egmond, E., Oriolo, G., Langohr, K., Gimenez, D., Valdes, M., Gomez-Gil, E., Grande, I., Gratacos, M., et al., 2016. Glucocorticoid receptors, brain-derived neurotrophic factor serotonin and dopamine neurotransmission are associated with interferon-induced depression. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 19.
- Verhoeckx, K.C., Voortman, T., Balvers, M.G., Hendriks, H.F., Wortelboer, H.M., Witkamp, R.F., 2011. Presence, formation and putative biological activities of N-acyl serotonins, a novel class of fatty-acid derived mediators, in the intestinal tract. *Biochim. Biophys. Acta* 1811, 578-586.
- Wang, S.E., Ko, S.Y., Jo, S., Choi, M., Lee, S.H., Jo, H.R., Seo, J.Y., Lee, S.H., Kim, Y.S., Jung, S.J., Son, H., 2017. TRPV1 Regulates Stress Responses through HDAC2. *Cell. Rep.* 19, 401-412.
- Waterhouse, E.G., Xu, B., 2009. New insights into the role of brain-derived neurotrophic factor in synaptic plasticity. *Mol. Cell. Neurosci.* 42, 81-89.
- Witkamp, R., 2016. Fatty acids, endocannabinoids and inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* 785, 96-107.