
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ПОВЕДЕНЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ И СОСТАВ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ
У КРЫС С РАЗЛИЧНОЙ ВОЗБУДИМОСТЬЮ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ**

© 2025 г. И. Г. Шалагинова^{1,2,*}, Д. С. Кацеров¹, К. О. Энш¹, Е. А. Буденкова¹,

А. К. Прибышина², Н. А. Дюжикова²

¹Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта, Калининград, Россия

²Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: shalaginova_i@mail.ru

Поступила в редакцию 28.03.2025 г.

После доработки 29.04.2025 г.

Принята к публикации 04.05.2025 г.

Предыдущие исследования показали, что две линии крыс, селектированные по порогу возбудимости нервной системы в ответ на длительное эмоционально-болевое стрессирование, проявляют различия как на поведенческом, так и на нейробиологическом и молекулярно-генетическом уровнях, а также специфические изменения выявляются и в составе кишечного микробиома. Это указывает на потенциальную связь между генетическими факторами, микробиотой и нарушениями поведения. Целью данного исследования являлся анализ кишечной микробиоты и поведенческих профилей интактных крыс линий с высоким (ВП) и низким (НП) порогами возбудимости нервной системы для выявления ключевых различий, обусловленных их генетическими особенностями.

Поведение интактных крыс двух линий было проанализировано в тестах “Открытое поле” и “Приподнятый крестообразный лабиринт”, анализ микробиоты в образцах стула проведен с использованием ампликонного секвенирования гена 16S рРНК. Поведенческий анализ показал, что высоковозбудимые крысы (линия НП) демонстрировали более высокую активность и менее выраженное замирание в приподнятом крестообразном лабиринте по сравнению с низковозбудимыми крысами (линия ВП). Показатели альфа-разнообразия микробиоты кишечника не различались между линиями, но анализ бета-разнообразия показал значимые различия в микробных профилях между линиями ВП и НП. Крысы линии НП имеют значимо более высокую по сравнению с линией ВП представленность родов *Lactobacillus* и *Faecalibacterium*, в то время как у крыс линии ВП выше относительная представленность родов *Romboutsia*, *Eubacterium* и *Turicibacter*. Интеграция данных о поведении и микробиоте выявляет потенциальную взаимосвязь между генетическими факторами, профилями кишечного микробиома и уникальными физиологическими и поведенческими характеристиками линий крыс, селектированных по порогу возбудимости нервной системы.

Ключевые слова: микробиота кишечника, микробиом, ось “микробиота – кишечник – мозг”, возбудимость нервной системы, крысы, стресс

DOI: 10.7868/S2658655X25070037, **EDN:** MVMWNE

ВВЕДЕНИЕ

Изучение фундаментальных механизмов индивидуальной устойчивости/уязвимости к стрессорным воздействиям, лежащих в основе формирования постстрессорных психонейропатологий, является актуальной задачей современной нейробиологии и имеет важное клиническое значение. Моделями на животных для такого рода исследований являются линии крыс, селектированные по порогу возбудимости нервной системы, демонстрирующие значимые различия в поведенческих, биохимических, физиологических и микробиологических параметрах в ответ на стресс [1–4].

Высоковозбудимые (низкий порог, линия НП) крысы проявляют более выраженную и сложную динамику поведенческих реакций в ответ на хронический стресс по сравнению с низковозбудимыми (высокий порог, линия ВП) [1, 3]. Показано, что хронический стресс у крыс линий ВП и НП вызывает различную динамику изменений плотности нейронов в области СА3 гиппокампа – ключевой зоне, ответственной за процессы обучения и памяти [2]. Мы также продемонстрировали, что крысы с контрастной возбудимостью имеют различия в степени выраженности и динамике постстрессорного воспаления как в крови, так и в мозге [3, 5]. Оценка геномной нестабильности методом кометного фореза выявила межлинейные различия в реакциях на стресс в различных областях мозга [6]. Предварительные исследования микробиома показали, что постстрессорная динамика состава кишечной микробиоты также имеет линейную специфику: после длительного эмоционально-болевого стрессирования у крыс линии ВП наблюдалось увеличение относительной представленности бактерий родов *Faecalibacterium* и *Prevotella*, в то время как у крыс линии НП таких изменений не отмечалось [4]. Эти наблюдения свидетельствуют о том, что генетические особенности линий с контрастной возбудимостью могут влиять не только на нейрональные и поведенческие реакции, но и на формирование микробной композиции в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), что открывает новые перспективы для исследования оси “микробиота – кишечник – мозг”. Различия в регуляции экспрессии генов, связанных с иммунной функцией, способны опосредованно воздействовать на состав микробиоты [7]. Генетический фон может определять особенности моторики кишечника, секреции слизи и других физиологических параметров, создавая специфические ниши для определенных микробов [8]. Генетические различия могут влиять на метаболизм хозяина, что изменяет доступность субстратов для микробов и соответственно их состав. Есть данные, что генетические особенности хозяина могут объяснять до 10% вариативности бета-разнообразия микробиоты у здоровых людей [9].

Использование данных линий в качестве модельных объектов позволяет глубже понять механизмы взаимодействия генетических факторов, микробиоты, нейровоспаления и поведенческих нарушений в ответ на стресс.

Исследования на стерильных (germ-free, GF) мышах показали, что отсутствие микробной колонизации приводит к изменению нейрохимического профиля и поведения [10], а использование пробиотиков обладает потенциалом для модификации поведения и улучшения состояния при нейропсихических расстройствах [11], а также для коррекции поведенческих нарушений в моделях на животных [12].

Хотя в современных исследованиях оси “микробиота – кишечник – мозг” большое внимание уделяется анализу изменений микробиоты после экспериментальных воздействий, базовые характеристики микробиоты у контрольных или интактных животных зачастую остаются недостаточно детализированными [13]. Это усложняет интерпретацию данных при исследовании эффекта экспериментальных воздействий на микробную композицию, поскольку сравнение с “контролем” чаще всего основано на общих оценках, а не детализированных профилях. Без четко охарактеризованного “базового” состояния микробиоты и диапазона ее изменения критически важные

факторы, влияющие на экспериментальные результаты, такие как исходные различия между группами, могут быть упущены.

Целью настоящего исследования являлся анализ поведенческого профиля и состава кишечной микробиоты у интактных крыс двух линий, селектированных по порогу возбудимости нервной системы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

В исследовании использовались 5-месячные самцы крыс двух линий, различающихся по уровню возбудимости периферической и центральной нервной системы [1]. Средняя масса тела животных в группах находилась в диапазоне 370–400 г и не различалась между линиями. В течение 80 поколений крыс селектировали по высокому (линия ВП) или низкому (линия НП) порогу возбудимости большеберцового нерва (*n. tibialis*) в ответ на электрическую стимуляцию. Для определения порога возбудимости большеберцового нерва у животных оценивали моторный ответ задней конечности, вводя активный электрод в икроножную мышцу и подавая одиночные прямоугольные импульсы длительностью 2 мс. Линии входят в состав биокolleкции Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (№ GZ 0134-2018-0003) и защищены патентами на селекционные достижения № 10769 и № 10768, выданными Государственной комиссией Российской Федерации, регистрация в Государственном реестре охраняемых селекционных достижений от 15 января 2020 г.

Все животные содержались в одном виварии в стандартных условиях и получали гранулированный корм промышленного производства, удовлетворяющий их пищевые потребности. Корм содержал 18–24% белков, 40–70% углеводов и 4–9% жиров, а также необходимые витамины и минералы. Водопроводная отфильтрованная вода предоставлялась без ограничений. Животные содержались при стандартном световом режиме (12 : 12, свет : темнота) с началом светового периода в 8:00.

Поскольку тесты “Открытое поле” (ОП), “Приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ), а также манипуляции при сборе фекалий могут вызывать стрессовую реакцию, для исключения перекрестного влияния между поведенческими тестами и анализом микробиоты были сформированы две независимые группы животных: одна – для поведенческого анализа ($n = 22$), другая – для исследования состава кишечной микробиоты ($n = 40$). Все процедуры проводились в рамках одного периода времени при идентичных условиях содержания, что обеспечивает сопоставимость групп по экспериментальным параметрам при сохранении независимости исследуемых показателей от проводимых процедур.

Поведенческие тесты

Все поведенческие тесты проводились в период с 12:00 до 16:00. В качестве дезинфицирующего средства в поведенческих установках использовали 70%-ный этанол. В тесте ПКЛ оценивали следующие параметры: время, проведенное в открытых и закрытых рукавах лабиринта, количество заходов в центр, время, проведенное в центре, и время замирания.

Локомоторная активность измерялась в тесте ОП (диаметр 1.5 м, высота 40 см). Анализировали следующие параметры: длительность неподвижности, время, проведенное в центре и на периферии, а также общее время двигательной активности.

В обоих тестах животных помещали в установки и позволяли свободно передвигаться в течение 5 мин, осуществляли видеорегистрацию поведения. Общее количество животных, использованных в поведенческих тестах, составило $n = 22$ (по 11 крыс каждой линии). Анализ поведенческих данных проводил один и тот же оператор

с помощью подсчета поведенческих параметров по предварительно зашифрованным видеозаписям, исключавшим определение принадлежности животных к экспериментальным группам (линиям).

Выделение ДНК из образцов и секвенирование ампликонов 16S рРНК

В каждую группу для исследования микробиоты входило по 20 интактных крыс линий ВП и НП (всего $n = 40$). Для исследования изменений в составе кишечной микробиоты образцы фекалий собирали в стерильные пробирки и хранили при -80°C без консервантов.

Тотальную экстракцию ДНК проводили в соответствии с протоколом “QINRA” Международного консорциума по стандартизации микробиома человека с незначительными изменениями. После медленного размораживания при температуре 4°C от 150 до 200 мг фекалий из каждого образца распределяли по пробиркам объемом 2 мл, предварительно заполненным 300 мг стеклянных шариков диаметром 0.1 мм (#G8772) (Merck KGaA, Германия), которые затем подвергали измельчению в гомогенизаторе Minilys personal (#P000673-MLYS0-A.0, Bertin technologies, Франция) в течение 180 с при 3000 об/мин после добавления буфера для лизиса ASL (#19082, QIAGEN, Хильден, Германия). Такие этапы протокола, как частичное удаление непереваренных белков с помощью раствора ацетата аммония, осаждение нуклеиновых кислот изопропанолом, обработка РНКазой и очистка ДНК-экстракта на кварцевой колонке с помощью мини-набора QIAamp DNA Stool (№ 51504, QIAGEN Hilden, Германия), были выполнены без каких-либо изменений. Целостность ДНК оценивали методом электрофореза экстракта в 1%-ном агарозном геле. Все измерения концентрации нуклеиновых кислот проводились с использованием флуорометра Qubit 2.0 (#Q32866, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) с фирменным набором для анализа HS-днк Qubit (#Q32851, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США).

Библиотека ампликонов была подготовлена с использованием двухэтапного протокола, где первую ПЦР проводили с праймерами вырожденной гипервариабельной области гена 16S рРНК V4 F515 (5'-GTGBCAGCMGCCGCGGTAA-3') и 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'), модифицированными для включения “гетерогенного спейсера” длиной 0–5 п. н. с последовательностью линкера штрих-кода, и где вторая ПЦР включала последовательности штрих-кода и адаптера, совместимые с Illumina [14]. Амплификацию проводили с использованием реакционной смеси qPCRMix-HS SYBR (Evrogen, Россия) на системе ПЦР в реальном времени CFX96 (BioRad, Калифорния, США) в соответствии с протоколом [15].

Качество и размер продуктов ПЦР оценивали методом электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле. Ампликоны очищали с помощью набора для экстракции QIAquick (№ 28704, QIAGEN, Хильден, Германия) и измеряли их концентрацию перед объединением в пул с эквимоллярной концентрацией. Окончательный набор образцов был очищен и концентрирован с помощью магнитных шариков AMPureXP (#A63881, Beckman Coulter, Бреа, Калифорния, США). Секвенирование проводили на платформе Illumina Miseq, с использованием набора реагентов MiSeq PE kit V2 на 500 циклов с Nano flow cell (Illumina Inc., Сан-Диего, Калифорния, США), в соответствии с инструкциями производителя.

Анализ поведенческих данных

Для оценки влияния фактора “линия” (ВП и НП) на поведенческие параметры был проведен многомерный дисперсионный анализ (MANOVA). Нормальность распределения данных для каждой переменной проверялась с помощью теста Шапиро – Уилка. Для переменных, существенно отклоняющихся от нормальности, применяли логарифмическое преобразование или извлечение квадратного корня.

Парные корреляции между всеми переменными рассчитывали с использованием коэффициента корреляции Пирсона. Высококоррелированные переменные ($|r| > 0.8$) исключались для уменьшения избыточности данных и устранения мультиколлинеарности. После этого шага набор данных был сокращен до шести поведенческих параметров для MANOVA: время, проведенное в центральной части ПКЛ (*EPM_center_time*), время, проведенное в закрытом рукаве ПКЛ (*EPM_closed_time*), время замирания в ПКЛ (*EPM_freezing*), время, проведенное на периферии ОП (*OF_periphery_time*), время замирания в ОП (*OF_freezing*) и активность в ОП (*OF_activity_time*).

Многомерный дисперсионный анализ (MANOVA) проводили с использованием теста Pillai's Trace. Принадлежность к линии рассматривалась как независимая переменная, а шесть отобранных поведенческих параметров – как зависимые переменные.

Все статистические анализы выполнялись в среде программирования *R* (версия 4.4.1, 2024-06-14) с использованием программы RStudio (2024.04.2 Build 764). Для MANOVA использовался программный пакет *car* (*companion of applied regression*) [16], а для проверки нормальности и преобразования данных – пакет *stats*.

Для изучения поведенческих профилей двух линий был проведен анализ главных координат (Principal Coordinates Analysis (PCoA)). Для расчета матрицы расстояний между особями применялась метрика Манхэттена, основанная на шести поведенческих переменных. PCoA выполнялся с использованием пакета *vegan* в среде *R* [17]. Для визуализации использовались первые две главные координаты (PCo1 и PCo2), так как они объясняли основную часть дисперсии в данных.

Индивидуальные данные отображались на графике вдоль первых двух осей (PCo1 и PCo2), где каждая точка представляла отдельную крысу. Для каждой группы были добавлены эллипсы, отражающие 95%-ные доверительные интервалы, с использованием функции *stat_ellipse* из пакета *ggplot2* [18].

Для выявления переменных, вносящих наибольший вклад в разделение по оси PCo1, были рассчитаны коэффициенты корреляции между значениями каждой переменной и координатами животных по оси PCo1. Эти значения были использованы в качестве индикаторов вклада переменных и визуализированы на графике (Importance in PCo1). Вклад отдельных переменных в PCo1 был представлен в виде столбчатой диаграммы, где положительные значения указывают на связь с линией ВП, а отрицательные – с линией НП.

Анализ данных секвенирования 16S рРНК

Качество ридов проверялось с использованием FastQC, после чего данные демультиплексировались с помощью *deML* [19]. Анализ демультиплексированных ридов проводился с использованием программного конвейера *Qiime2-2020.14* [20].

Анализ выполняли в среде программирования *R* (версия 4.4.1, 2024-06-14) с использованием программы RStudio (2024.04.2 Build 764). Различия в микробных сообществах между группами ВП и НП оценивали с помощью пермутационного многомерного дисперсионного анализа – Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA), реализованного в функции *adonis2* из пакета *vegan*.

Были использованы две метрики расстояния: *Bray-Curtis* и *LEfSe* (Linear Discriminant Analysis Effect Size). Частота встречаемости таксонов (prevalence) рассчитывалась как отношение числа образцов, содержащих данный таксон, к общему числу образцов в группе. Таксоны основного микробиома (core microbiome) определялись на основании порога по показателю prevalence > 50% и минимального уровня относительной представленности 1%. Определение таксонов, значимо различающихся между группами ВП и НП, проводили с использованием пакета *Deseq2* в среде MicrobiomeAnalyst 2.0, перед анализом была проведена фильтрация таксонов с низкой частотой встречаемости [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты поведенческих тестов

MANOVA выявил значимый эффект фактора “линия” (ВП vs НП) на поведенческие параметры (Pillai’s Trace = 0.671, $F(5,17) = 6.92$, $p = 0.001$), что свидетельствует о выраженных различиях в поведенческих профилях между линиями (рис. 1a). Анализ по отдельным параметрам с помощью t -теста показал значимые различия только по двум показателям: времени двигательной активности в ПКЛ (EPM_activity_time, $p < 0.01$) и времени замирания (EPM_freeseing, $p < 0.01$), что отражено на рис. 1с.

Рис. 1a показывает, что крысы линий ВП и НП формируют отдельные кластеры вдоль оси PCo1, это подчеркивает различие в их поведенческих профилях. Первые две оси PCo объясняют значительную часть дисперсии данных: PCo1 – 47.26%, а PCo2 – 34.62%. Вместе они объясняют 81.88% дисперсии, что указывает на надежность визуализации различий между группами на графике PCoA. Крысы линии ВП образуют кластер, смещенный вправо по оси PCo1, при этом переменные, такие как замирание, локомоторная активность и время, проведенное в закрытых и открытых рукавах ПКЛ, вносят наибольший вклад в PCo1 (рис. 1b).

Анализ микробиоты

Рис. 2a показывает доминирование типов *Firmicutes* и *Bacteroidota* в обеих линиях крыс с некоторыми вариациями.

У крыс линии НП наблюдается более высокая относительная представленность *Proteobacteria* по сравнению с крысами линии ВП, в то время как у крыс линии ВП более распространены *Actinobacteriota*. На уровне семейства *Lactobacillaceae* и *Bifidobacteriaceae* более представлены у крыс линии НП (рис. 2b) по сравнению с линией ВП.

На уровне рода у крыс линии ВП наблюдается более высокая относительная представленность *Ligilactobacillus*, *Bifidobacterium* и *Allobaculum*, в то время как у крыс линии НП отмечается повышенная относительная представленность *Lactobacillus*, включая как идентифицированные на уровне рода, так и смешанную группу неклассифицированных представителей *Lactobacillaceae* (рис. 2с).

На рис. 3a–b показаны индексы альфа-разнообразия кишечной микробиоты у крыс линий ВП и НП. Статистически значимых различий индексов Chao1 (богатство таксонов) и Симпсона (однородность сообщества) выявлено не было.

На рис. 3с показаны различия в составе кишечной микробиоты между линиями крыс ВП и НП, визуализированные с помощью анализа главных координат (PCoA) на основе индекса несходства Брея – Кёртиса. Анализ PERMANOVA выявил значимые различия между группами ($F = 3.8575$, $p = 0.001$, $R^2 = 0.090$), это указывает на то, что примерно 9% вариативности встречающихся таксонов объясняется принадлежностью к линии.

В то время как обе группы имеют схожие доминирующие классы (рис. 4a), такие как *Bacilli*, *Clostridia* и *Coriobacteriia*, очевидны различия в менее распространенных классах. Крысы линии ВП демонстрируют более высокую представленность *Actinobacteria*, но не имеют *Negativicutes* в основном микробиоме.

У высоковозбудимых крыс линии НП представленность *Eubacterium* в основном микробиоме ниже, а несколько родов, присутствующих у низковозбудимых крыс ВП, отсутствуют (*Streptococcus*, некультивируемые *Erysipelotrichaceae*, *Romboutsia*, *Intestinimonas* и *Ruminococcus*) (рис. 4b). Несколько родов, входящих в основной микробиом крыс НП, полностью отсутствуют в основном микробиоме крыс ВП: *Blautia*, *Catenibacterium*, *Dubosiella*, *Faecalibacterium*, *Lachnospiraceae_NK4A136_group*, *Lachnospiraceae_UCG_010*, *Prevotellaceae_NK3B31_group*, *Quinella*, *unclassified_Eggerthellaceae*.

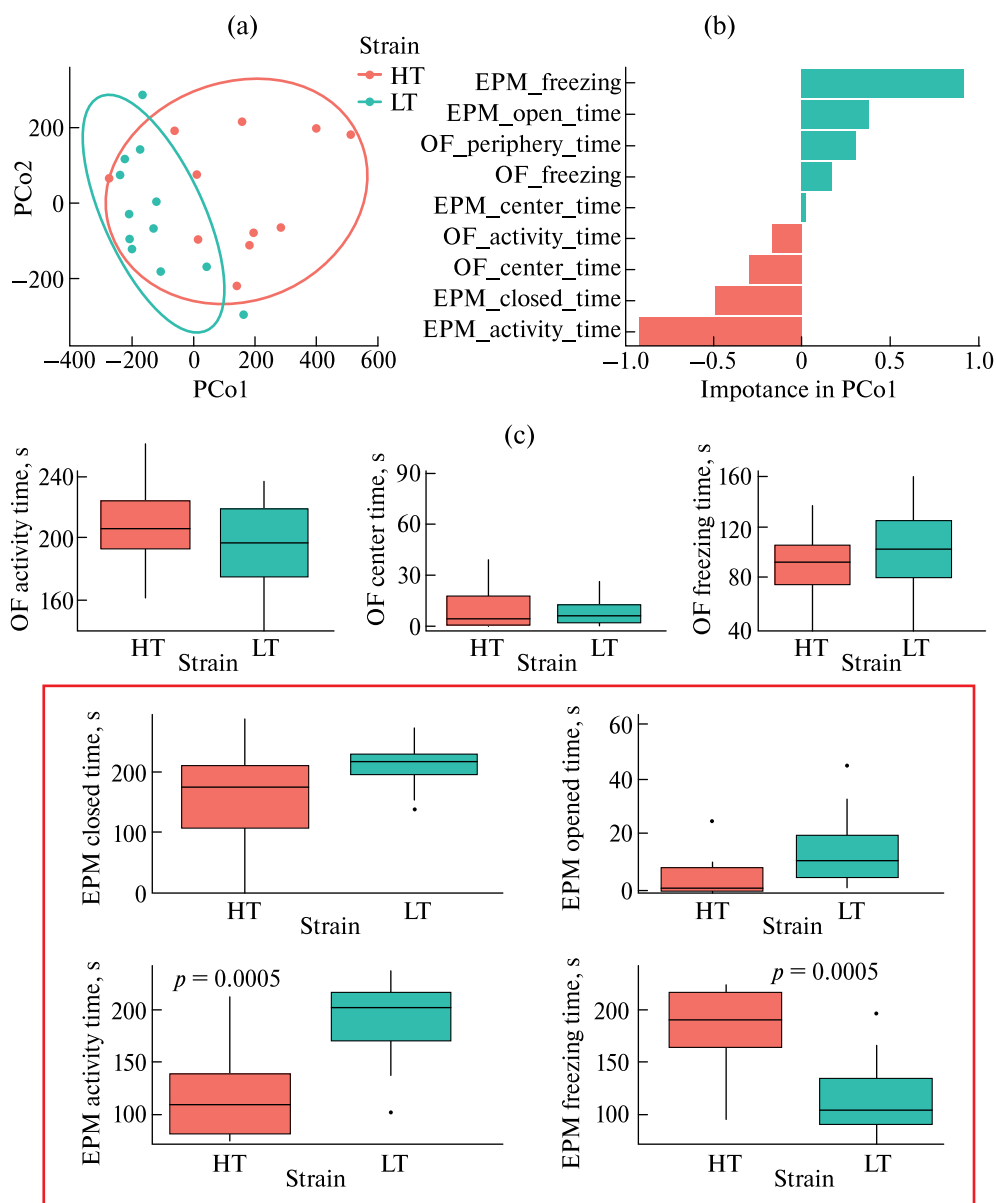


Рис. 1. Поведенческие профили линий крыс ВП и НП. (a) – Распределение линий ВП (НТ) и НП (ЛТ) в пространстве РСОА. Каждая точка представляет отдельное животное, овалы обозначают 95%-ные доверительные интервалы для каждой группы. (b) – Относительный вклад поведенческих переменных в первую главную ось координат (РСО1). Положительные значения (красные столбики) указывают на переменные, которые более тесно связаны с линией ВП, отрицательные значения (синие столбики) более тесно связаны с линией НП. (c) – Диаграммы размаха представляют распределение ключевых поведенческих переменных для линий с НП и ВП. Центральная линия – медиана, края прямоугольника представляют межквартильный размах. В красной рамке указаны параметры с наибольшим относительным вкладом в РСО1; p – уровень значимости различий (t -test).

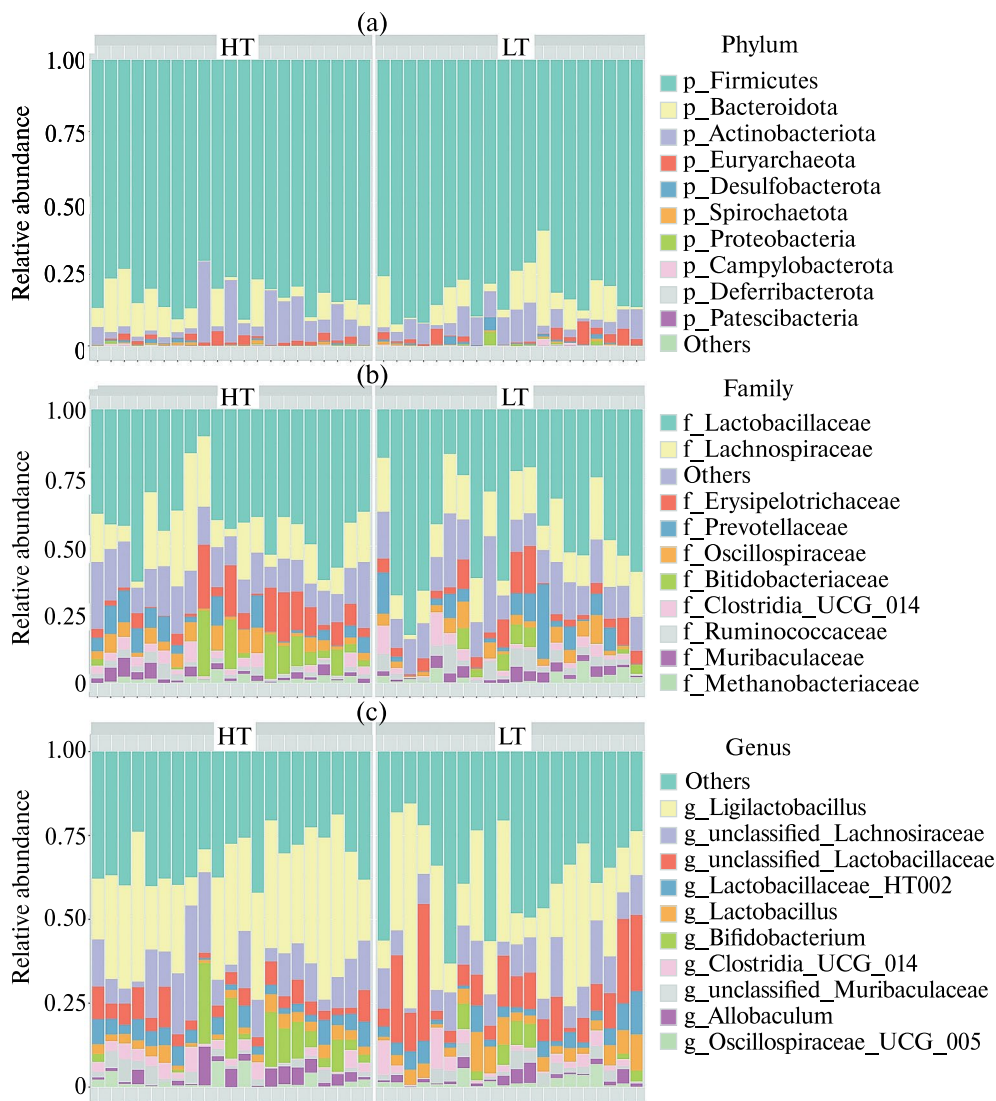


Рис. 2. Относительная представленность кишечного микробиома у крыс линий ВП и НП на различных таксономических уровнях. (а) – Уровень типа. (б) – Уровень семейства. (с) – Уровень рода.

Рис. 5 представляет результаты дискриминантного анализа (LDA), выявляющие различия в микробных таксонах между линиями ВП и НП. Для группы ВП наиболее характерна высокая представленность таких таксонов, как *Eubacterium coprostanoligenes_group*, *Streptococcus* и *Romboutsia*. Микробиом группы НП обогащен таксонами *unclassified_Lactobacillaceae*, *Collinsella* и *Faecalibacterium*.

Помимо выполнения LDA-анализа, мы применили *DESeq2* для получения более надежных данных, способствующих пониманию микробных различий между линиями. В то время как *LDA* выделяет таксоны с дискриминативной способностью и визуализирует специфические паттерны, *DESeq2* представляет данные о статистической значимости различающихся по представленности таксонов со строгим контролем

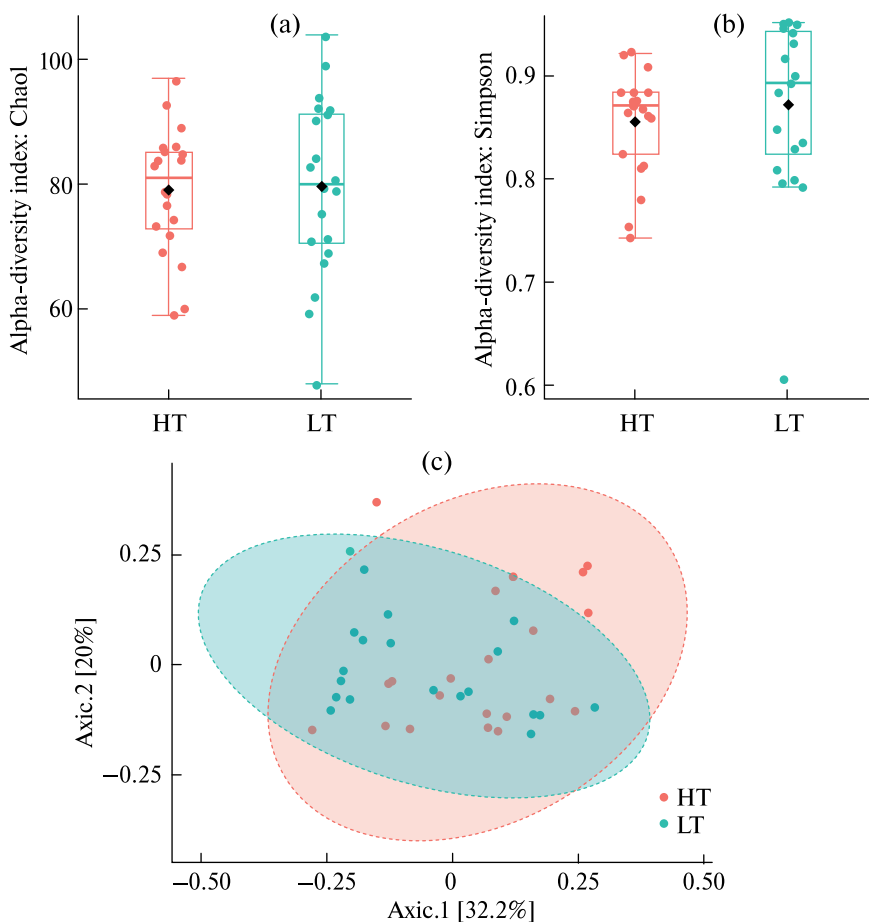


Рис. 3. Показатели разнообразия микробиоты в группах крыс линий ВП и НП. (а–б) – Альфа-разнообразие ($p > 0.05$, критерий Манна – Уитни). (с) – Бета-разнообразие (РСоА состава кишечной микробиоты на основе индекса Брея – Кёртиса).

множественности сравнений (FDR). Такое сочетание методов обеспечивает как биологическую (LDA), так и статистическую значимость ($DESeq2$), создавая целостное представление о различиях в микробном сообществе.

На рис. 6 показано, что, согласно результатам анализа дифференциальной представленности с использованием пакета *DESeq2*, 9 родов были значимо более представлены (*upregulated*) в стуле линии ВП, а 11 родов – у линии НП. На рис. 7 показаны только те роды, различия в представленности которых были выявлены обоими методами – LDA и $DESeq2$.

Как показано на рис. 7, пять таксонов значимо менее представлены у линии НП по сравнению с ВП: *Turicibacter*, *Family_XIII_AD3011_group*, *Adlercreutzia*, *Streptococcus*, *Eubacterium_coprostanoligenes_group*. Семь таксонов более представлены у высоко-возбудимых крыс линии НП по сравнению с низково-возбудимыми ВП: *Oribacterium*, *Lachnospiraceae_UCG_010*, *Dorea*, *Faecalibacterium*, *Catenisphaera*, *unclassified_Lactobacillaceae*, *Monoglobus*.

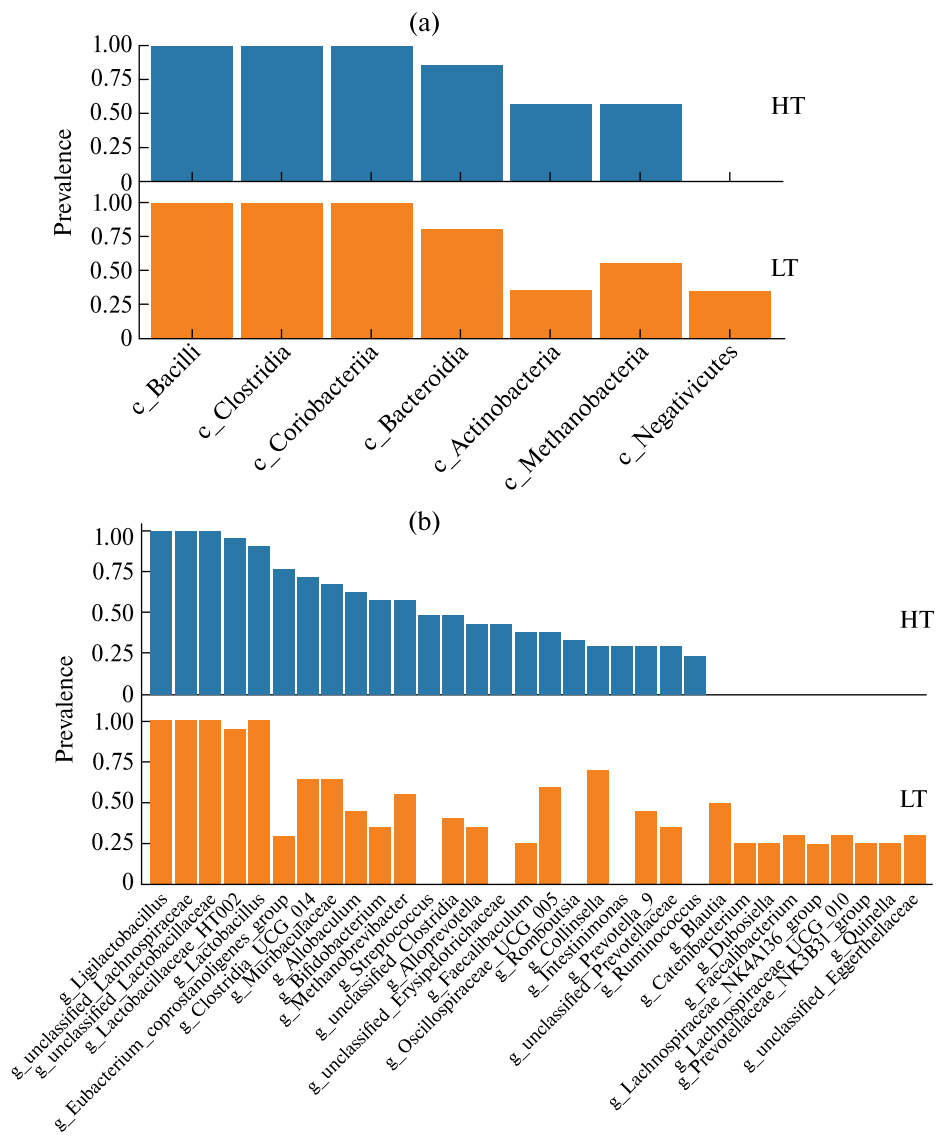


Рис. 4. Состав основного микробиома кишечника на уровне класса (а) и рода (б) у крыс линий ВП (НТ) и НП (LT). По вертикали – частота встречаемости таксонов (prevalence), по горизонтали – таксоны основного микробиома.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Поведенческий профиль линий НП и ВП

Как показал анализ, линии крыс с контрастной возбудимостью нервной системы различаются по поведению в тесте ПКЛ в большей степени, чем по поведенческим паттернам в ОП. Анализ отдельных переменных показывает, что интактные высоко-возбудимые крысы линии НП проявляют повышенную активность в ПКЛ, что выражается в увеличенном времени, проведенном как в открытых, так и в закрытых рукавах

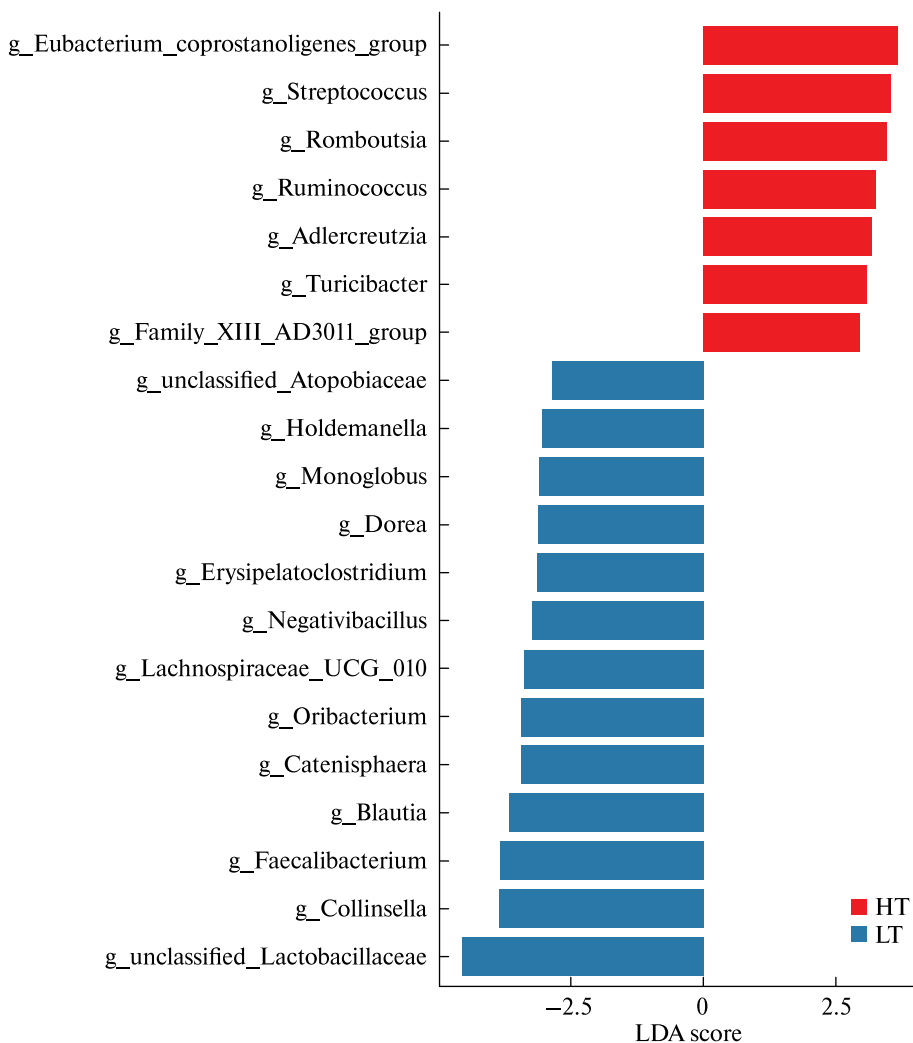


Рис. 5. Результаты дискриминантного анализа (LEfSe/LDA) микробных таксонов у крыс линий ВП и НП. LDA-score количественно определяет вклад каждого таксона в разделение двух групп. Положительные значения указывают на обогащение в группе ВП, а отрицательные – в группе НП. Чем больше абсолютное значение, тем выше дискриминативная значимость таксона.

лабиринта по сравнению с крысами линии ВП. При этом выраженность замирания в тесте ПКЛ ниже, чем у низковозбудимой линии ВП. Ранее было показано, что у крыс линии НП наблюдается повышенная активность гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы (ГГАС), что сопровождается повышенным базальным уровнем кортикостерона [1]. Известно, что активация ГГАС может оказывать значительное влияние на поведение, особенно в контексте стресс-ассоциированных реакций. Высокий уровень кортикостерона может способствовать увеличению моторной подвижности и снижению выраженности реакций избегания в поведенческих тестах, что может объяснять наблюдаемую у интактных крыс линии НП повышенную активность в ПКЛ и сниженное замирание.

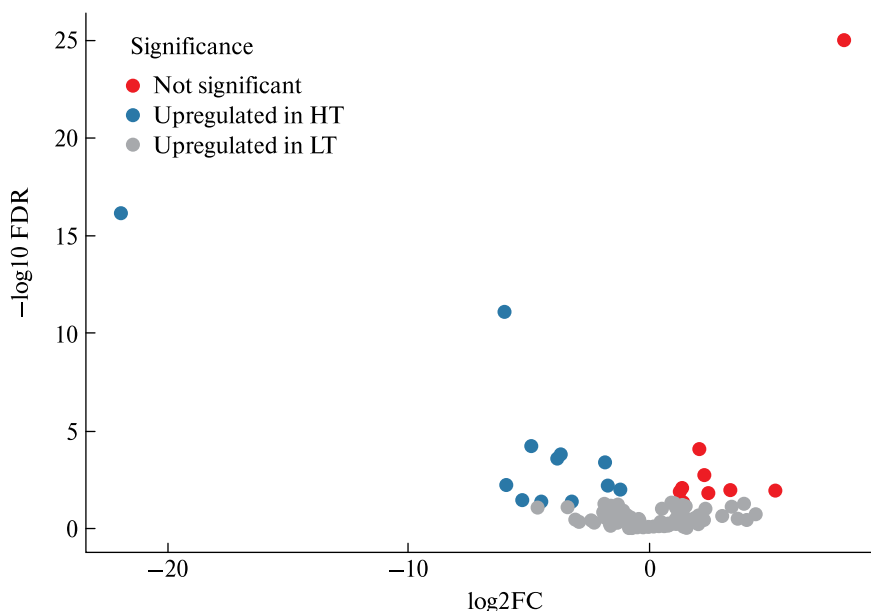


Рис. 6. Дифференциально представленные микробные таксоны на уровне рода между линиями крыс ВП и НП. Ось X ($\log_2FC$): показывает логарифм от изменения относительной представленности микробных таксонов между группами ВП и НП. Положительные (красные) значения указывают на таксоны, более представленные (*upregulated*) в группе ВП (НТ), отрицательные (синие) – на таксоны, более представленные в группе НП (ЛТ). Ось Y ($-\log_{10}FDR$) отражает статистическую значимость различий (скорректированное p -значение).

Однако, как показало наше предыдущее исследование [3], линия НП демонстрирует более выраженные поведенческие изменения в обоих тестах (ПКЛ, ОП) на ранних сроках после стрессового воздействия. Возможно, повышенная активность и сниженное избегание в физиологических условиях не являются маркером устойчивости, а, напротив, могут отражать сниженную способность к адаптации, обусловленную особенностями регуляции ГАС. С другой стороны, низкая активность и избегающее поведение интактных крыс линии ВП отражают их чрезмерную осторожность и избегание новизны. Эти крысы демонстрируют минимальные изменения в поведении при воздействии стресса в срок до 1 месяца [3], что можно интерпретировать как отсутствие эффекта. С другой стороны, важно учитывать, что постстрессорные паттерны поведения могли быть недостаточно полно охарактеризованы с помощью тестов ПКЛ и ОП либо проявляться в более поздние сроки.

Микробная композиция кишечника

Анализ состава и структуры кишечного микробиома у линий крыс с контрастной возбудимостью нервной системы показал, что в стуле обеих линий преобладают типы *Firmicutes* и *Bacteroidota*, что соответствует типичному составу кишечного микробиома грызунов [22].

Хотя анализ состава микробиоты на уровне типов является традиционным этапом в исследованиях оси “микробиота – кишечник – мозг”, он остается довольно обобщенным методом, не дающим полной картины и не позволяющим делать однозначные выводы. Каждый тип объединяет огромное разнообразие бактериальных видов и родов,

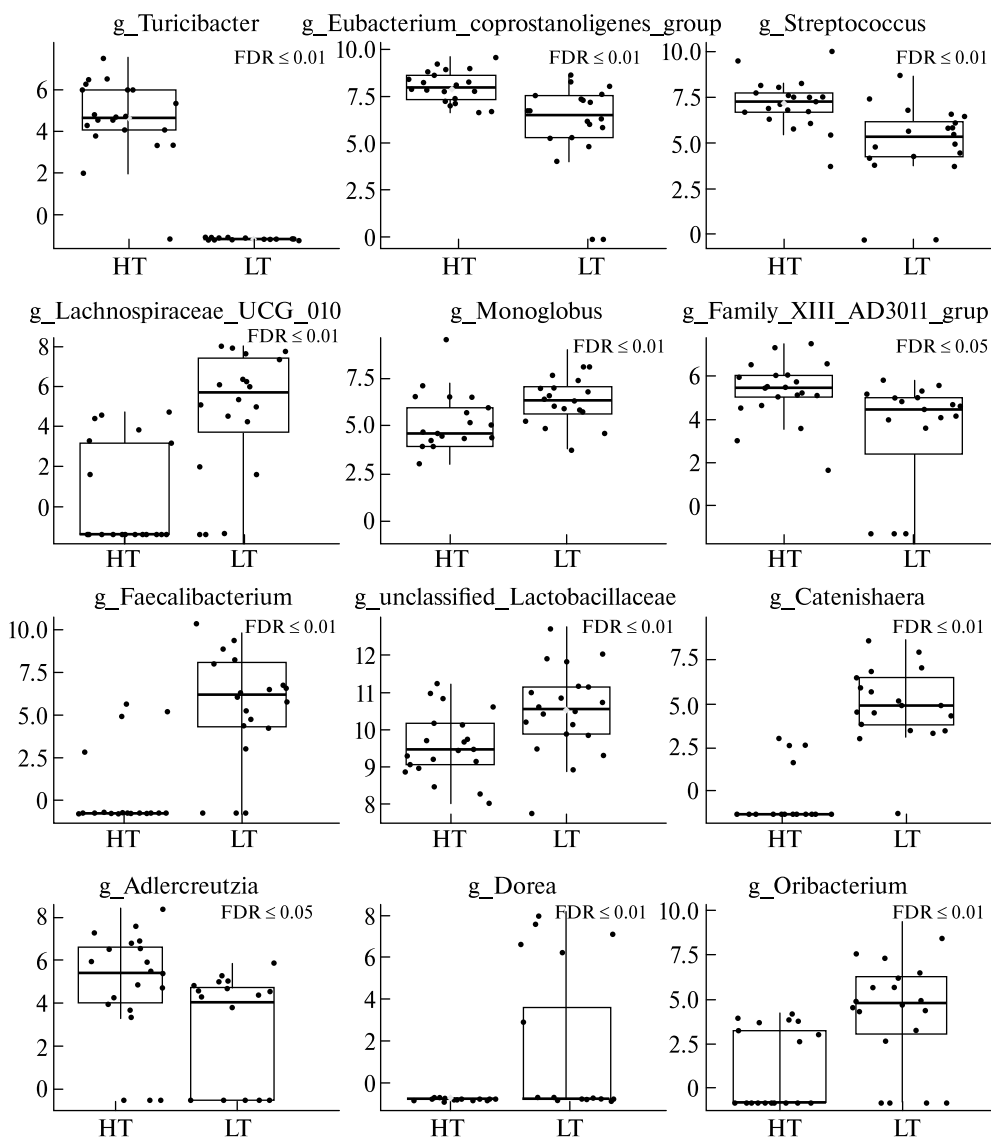


Рис. 7. Дифференциально представленные таксоны на уровне рода в стуле крыс линий ВП и НП. Обозначения: ВП (HT) и НП (LT) – экспериментальные группы; Log-transformed Counts – логарифмически преобразованные нормализованные количества представителей микробных родов; статистическая значимость различий оценивалась методом *DESeq2* с контролем FDR.

которые могут значительно различаться по своим функциональным свойствам и влиянию на организм хозяина.

Так, например, *Firmicutes* – доминирующий тип у грызунов – включает как виды, ассоциированные с положительным влиянием на здоровье (например, некоторые представители *Lactobacillus*), так и виды, связанные с развитием патологий (например, *Clostridium difficile*). Соотношение *Firmicutes/Bacteroidetes* используется для оценки состава кишечного микробиома и выявления потенциальных изменений, связанных с различными заболеваниями, включая ожирение [23], воспалительные заболевания

кишечника [24], метаболический синдром [25] и постстрессорные расстройства [26]. Многие исследования сосредоточены на изучении того, какие сдвиги в этом соотношении характерны для определенных патологий и воздействий, предполагая, что его изменение может служить биомаркером нарушений. Однако такой подход оказался малоэффективным, так как соотношение *Firmicutes/Bacteroidetes* варьирует даже среди здоровых индивидов в пределах одной популяции [27]. На состав микробиоты у человека и модельных животных существенно влияют многочисленные факторы, включая диету, уровень физической активности, потребление антибиотиков, а также различные аспекты образа жизни и окружающей среды.

Предлагается вместо поиска универсальных таксономических сдвигов в качестве маркеров заболеваний направить исследования на идентификацию маркеров для стратификации пациентов на подгруппы с целью персонализации терапевтических вмешательств [27].

На уровне семейств *Lactobacillaceae* и *Bifidobacteriaceae* были более распространены у крыс НП, также для них характерна повышенная относительная представленность *Lactobacillus* по сравнению с ВП.

В фекалиях низковоzbудимой линии ВП доминируют роды *Ligilactobacillus*, *Bifidobacterium* и *Allobaculum*. Эти роды могут способствовать поддержанию гомеостаза за счет их способности продуцировать короткоцепочечные жирные кислоты (SCFAs) [28, 29] и модулировать иммунные процессы.

У линии НП выявлена повышенная относительная представленность рода *Lactobacillus* и неклассифицированных таксонов семейства *Lactobacillaceae*. Согласно данным [30], увеличение доли *Lactobacillus* в микробиоте прямо коррелирует с выраженностью дезадаптивных ответов в экспериментальных моделях выученной беспомощности (*inescapable shock*). У крыс с дефицитом избегающего поведения в ответ на повторяющийся неизбежаемый футшок рост численности *Lactobacillus* сопровождался повышением уровня молочной кислоты, что указывает на связь метаболической активности данного рода с индивидуальными особенностями адаптации. Эти наблюдения подчеркивают амбивалентную роль *Lactobacillus* в модуляции оси “микробиота – кишечник – мозг”: несмотря на общепризнанные пробиотические свойства [31], их избыточная представленность может ассоциироваться с изменением регуляторных механизмов, опосредующих взаимодействие микрофлоры и организма.

Интересно также, что в исследовании [30] было показано снижение уровней уксусной и пропионовой кислот у стресс-чувствительных крыс, что может указывать на нарушение баланса короткоцепочечных жирных кислот (SCFAs), играющих ключевую роль в поддержании кишечного баланса и иммунной регуляции. Таким образом, сдвиг микробного профиля в сторону *Lactobacillus* может привести к дисбалансу метаболитов.

Значимых различий между линиями по индексам альфа-разнообразия выявлено не было. Это указывает на схожее богатство (*Chao1*) и равномерность распределения таксонов (*Simpson*) в микробиоте кишечника обеих групп. Примечательно, что линия НП демонстрирует большую вариабельность значений индексов по сравнению с ВП, это может свидетельствовать о более высоком уровне индивидуальных различий в составе микробиоты у высоковоzbудимых крыс.

В наших предыдущих экспериментах [4], направленных на изучение изменений микробиоты после стрессового воздействия у крыс данных линий, было показано, что в физиологических условиях крысы линии НП имели значимо более низкие индексы *Chao1* и *Shannon* по сравнению с ВП. Однако в настоящем исследовании, проведенном в том же виварии и при идентичных диетических и средовых условиях, такие различия не были обнаружены.

Литературные данные подтверждают спонтанную динамику альфа-разнообразия. Например, в исследовании [32] были продемонстрированы значительные изменения

во времени состава микробиоты у здоровых взрослых людей, несмотря на стабильные условия окружающей среды. Аналогично было показано, что сезонные изменения и небольшие вариации в диете могут существенно влиять на разнообразие микробиоты [33]. Также имеются данные об изменениях индексов альфа-разнообразия у интактных взрослых грызунов, содержащихся в стандартных условиях, если биоматериал отбирался еженедельно [34]. Это подчеркивает динамическую природу микробиоты, которая может изменяться под влиянием различных факторов, не все из которых можно контролировать даже в рамках стандартизированных протоколов.

Анализ *PERMANOVA* и расстояние *Bray – Curtis* указывают на значимые различия в микробном составе между линиями ВП и НП, которые могут быть обусловлены генетическим фоном, поскольку это интактные животные двух линий, селективированных по порогу возбудимости нервной системы и содержащихся в одинаковых условиях. Анализ *PERMANOVA* подтвердил статистическую значимость различий, при этом примерно 9% вариабельности объясняется принадлежностью к линии, что указывает на ее влияние, хотя и в ограниченной степени.

Далее мы исследовали, какие конкретные таксоны составляют основной микробиом двух линий крыс. Термин “основной микробиом” (*core microbiome*) означает набор микробных таксонов, который характерен и стабильно присутствует у определенного типа хозяина или в определенной среде, независимо от индивидуальных вариаций [35]. В основном микробиоме высоковозбудимых крыс (НП) были выявлены следующие отличия от линии ВП: снижение численности рода *Eubacterium* и отсутствие родов, присутствующих в “core microbiome” низковолюбимых крыс (ВП), включая *Streptococcus*, *Romboutsia*, *Intestinimonas* и *Ruminococcus*.

Род *Eubacterium*, который также является частью основного микробиома кишечника человека, производит бутират – ключевую молекулу, важную для поддержания энергетического баланса, моторики кишечника, иммуномодуляции и подавления воспаления в кишечнике. Кроме того, бутират участвует в трансформации желчных кислот и холестерина, способствуя их гомеостазу [36]. Дисбиоз и изменение представленности *Eubacterium* в кишечнике связывают с различными заболеваниями человека, такими как диабет 2-го типа и ожирение [37].

Некоторые виды *Streptococcus* участвуют в ферментации углеводов, производя молочную кислоту [38], что помогает поддерживать баланс pH и подавлять рост патогенных микроорганизмов. Однако роль этих бактерий в кишечнике сложна, так как некоторые виды могут быть патогенными, что затрудняет оценку функциональных последствий их полного отсутствия в основном микробиоме НП и присутствия у ВП.

Род *Romboutsia*, который также отсутствует в основном микробиоме НП, но присутствует у ВП, включает грамположительные анаэробные бактерии, обитающие в кишечнике человека и животных. Эти бактерии известны своими положительными эффектами на физиологию хозяина. Например, *Romboutsia ilealis* может ферментировать различные углеводы, производя короткоцепочечные жирные кислоты (SCFAs), которые поддерживают целостность кишечного барьера. Некоторые виды *Romboutsia* регулируют иммунные реакции, способствуя иммунному гомеостазу и предотвращая воспаление кишечника [39].

Род *Intestinimonas* состоит из анаэробных бактерий, которые играют роль в метаболизме аминокислот – в превращении лизина в бутират, поддерживающий энергетический баланс в кишечнике [40]. Особенно интересен *Intestinimonas butyriciproducens*, который может превращать компоненты пищи, такие как фруктозиллин, в SCFAs, включая бутират и ацетат. Бутират служит основным источником энергии для колоноцитов, поддерживает целостность кишечного барьера и обладает противовоспалительными свойствами. Исследования показали, что *I. butyriciproducens* улучшает метаболическое здоровье хозяина, снижая массу тела, гипергликемию и воспаление в жировой ткани у мышей с ожирением, индуцированным диетой [41].

Род *Ruminococcus* также отсутствует в основном микробиоме НП, в то время как известно, что его представители являются ключевыми видами для разрушения крахмала в кишечнике. Однако некоторые штаммы связаны с воспалительными заболеваниями кишечника, такими как болезнь Крона [42].

Таким образом, в основном микробиоме высоковозбудимых крыс НП отсутствуют несколько таксонов, производящих метаболиты, потенциально важные для физиологии хозяина.

Следующая цель работы заключалась в определении таксонов, которые различаются между двумя линиями крыс, с применением комбинации подходов, минимизирующих ложноположительные результаты и обеспечивающих как статистическую, так и биологическую значимость. Анализ LEfSe хорошо подходит для определения таксонов, которые различаются между двумя группами, при этом эти различия могут быть биологически значимыми. В то же время *DESeq2* обеспечивает более строгую статистическую проверку, контролируя ложные открытия (FDR), что делает его особенно надежным для количественного анализа дифференциальной представленности большого числа таксонов [43].

По результатам обоих анализов следующие таксоны являются наиболее надежными для характеристики различий в микробиоме кишечника крыс с различной возбудимостью нервной системы: *Eubacterium coprostanoligenes_group*, *Streptococcus*, *Turicibacter*, *Family XIII AD3011_group* и *Adlercreutzia*. Эти таксоны менее представлены в стуле крыс линии НП по сравнению с ВП. Некоторые из этих таксонов частично совпадают с данными об основном микробиоме (*Eubacterium*, *Streptococcus*).

Turicibacter – род грамположительных бактерий, принадлежащих к типу *Firmicutes*. Они встречаются в кишечнике различных млекопитающих, включая человека. Исследования показывают, что *Turicibacter* может играть определенную роль в регуляции иммунной системы и метаболизме хозяина. Кроме того, штаммы *Turicibacter* могут модифицировать желчные кислоты, влияя на метаболизм липидов и энергетический баланс [44]. У мышей отсутствие *Turicibacter sanguinis* повышает восприимчивость к тяжелым кишечным инфекциям, тогда как его присутствие снижает риск таких заболеваний [45]. Таким образом, *Turicibacter* играет важную роль в поддержании здоровья кишечника и общего метаболического баланса у различных видов, включая крыс и человека. Его значимо более низкая относительная представленность в фекалиях линии НП по сравнению с линией ВП может иметь биологическое значение.

Что касается группы *Family XIII AD3011*, то исследования на животных моделях показали, что увеличение их численности связано с нарушениями гемопоэза и повышением уровня IL-5 в модели токсичности бензола, а также с экспрессией ACOD1, маркера воспаления, в моделях колита [46]. Клинические исследования у человека связывают высокую численность этой группы с хроническим воспалением и шизофренией [47].

Adlercreutzia – род грамположительных, облигатно анаэробных бактерий из семейства *Eggerthellaceae*. Они известны своей способностью метаболизировать изофлавоны, такие как даидзеин, превращая их в эквол – соединение с эстрогенной активностью. Снижение численности *Adlercreutzia* наблюдается у мышей, получающих высококалорийную диету, что может свидетельствовать о потенциальной связи с метаболическими расстройствами. Кроме того, было отмечено снижение численности *Adlercreutzia equolifaciens* у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени (NAFLD), при этом ее уровень снижается по мере прогрессирования заболевания. Это предполагает, что *Adlercreutzia* может обладать противовоспалительными свойствами [48].

Более представлены в стуле линии НП крыс по сравнению с линией ВП были таксоны: *Oribacterium*, *Lachnospiraceae_UCG_010*, *Dorea*, *Faecalibacterium*, *Catenisphaera*, *unclassified_Lactobacillaceae* и *Monoglobus*.

Oribacterium – род грамположительных, облигатно анаэробных бактерий, обычно встречающийся в ротовой и кишечной микробиоте млекопитающих. Он связан

с ферментацией углеводов и производством SCFAs. Однако чрезмерное количество *Oribacterium* обнаружено у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких [49]. *Lachnospiraceae* *UCG_010* является частью основного микробиома кишечника человека, при этом его видовое разнообразие и относительная представленность увеличиваются с возрастом хозяина. Различные таксоны *Lachnospiraceae*, помимо производства SCFAs, также связаны с различными воспалительными заболеваниями как в кишечнике, так и вне его [50, 51].

Dorea – еще один род из семейства *Lachnospiraceae*, также связанный с производством бутирата. Хотя эти бактерии обычно являются полезными, их избыток может быть ассоциирован с воспалительными заболеваниями, такими как синдром раздраженного кишечника и метаболические расстройства. Кроме того, показано, что высокая представленность *Dorea* положительно коррелирует с депрессивным поведением [52].

Faecalibacterium считается ключевым индикатором здоровья кишечника благодаря своим выраженным противовоспалительным эффектам через производство бутирата и модуляцию иммунного ответа. Было показано, что увеличение его представленности повышает уровни SCFAs и IL-10, при этом снижая уровни кортикостерона и IL-6 [53]. Кроме того, *F. prausnitzii* может улучшать кишечный барьер, регулируя белки плотных контактов, тем самым снижая проницаемость и воспаление [54].

Интересно, что текущее наблюдение, согласно которому относительная представленность *Faecalibacterium* в стуле крыс линии НП выше, чем у линии ВП, контрастирует с нашими предыдущими данными, согласно которым увеличение представленности *Faecalibacterium* было отмечено, напротив, у линии ВП, однако только после стресса и временно (присутствует через 7 дней, но отсутствует через 24 дня после стресса по сравнению с контролем той же линии) [4]. Возможно, у линии ВП это временное увеличение может быть функциональным, способствуя их адаптации. Линия НП демонстрирует более высокую представленность этих бактерий даже в физиологических условиях, что может свидетельствовать о предрасположенности к воспалению даже в отсутствие внешних стрессоров.

Обнаруженные различия в микробиоте между линиями крыс позволяют предположить, что генетические факторы, определяющие уровень возбудимости нервной системы, могут также участвовать в формировании микробного сообщества кишечника, вероятно, через опосредованные механизмы, такие как нейровоспаление, уровень кортикостероидов или влияние на моторику и секрецию в ЖКТ.

Возможные механизмы связи между поведенческими особенностями и микробиотой у крыс с контрастной возбудимостью нервной системы

Полученные данные показывают, что линии крыс с контрастной возбудимостью нервной системы отличаются как по поведению, так и по структуре кишечной микробиоты. Хотя прямая взаимосвязь между этими признаками в данной работе не устанавливалась, полученные результаты согласуются с концепцией влияния генетических факторов на формирование оси “кишечник – мозг”. Линия НП, характеризующаяся повышенной локомоторной активностью и более выраженным исследовательским поведением, имеет увеличенную по сравнению с линией ВП относительную представленность бактерий родов *Lactobacillus* и *Faecalibacterium*. Эти таксоны широко известны как потенциальные “психобиотики”, положительно влияющие на стрессоустойчивость и эмоциональное состояние животных [53, 55].

В противоположность этому, у крыс линии ВП – более пассивных и склонных к тревожному поведению – отмечена более высокая доля родов *Romboutsia*, *Eubacterium* и *Turicibacter*. Хотя эти микробы менее изучены в контексте поведения, известно, что представители *Turicibacter* взаимодействуют с серотониновой системой хозяина: они способны стимулировать выработку серотонина в кишечнике, предположительно

через продукцию короткоцепочечных жирных кислот (Short chain fatty acid, SCFAs), и одновременно сами реагируют на повышение уровня кишечного серотонина [56].

Таким образом, наблюдаемые различия в микробиоте между линиями могут потенциально объяснять расхождения в поведенческих реакциях, особенно связанных со стресс-реактивностью.

Кишечная микробиота может модулировать работу мозга и поведение хозяина через ряд взаимодополняющих механизмов. Один из ключевых путей – метаболиты микробного происхождения, прежде всего SCFAs, такие как ацетат, пропионат и бутират. Продуцируемые анаэробными бактериями (*Faecalibacterium*, *Eubacterium* и др.), они служат важными сигнальными молекулами: усиливают барьерную функцию кишечника, регулируют системное воспаление и способны влиять на нейрональную активность. Показано, что введение *F. prausnitzii* повышает уровень SCFA в кишечнике и концентрацию противовоспалительного цитокина IL-10 в крови, сопутствуя снижению уровней кортикостерона и провоспалительных цитокинов (например, IL-6) при стрессовом воздействии. Эти изменения ассоциируются с ослаблением тревожно-депрессивного поведения [53]. Короткоцепочечные жирные кислоты могут напрямую действовать на центральную нервную систему, проникая через гематоэнцефалический барьер [57] или активируя афферентные волокна блуждающего нерва [58]. Кроме того, SCFAs способны модулировать активность микроглии и астроцитов в головном мозге, тем самым влияя на нейровоспаление и нейропластичность [59].

Другой важный механизм – воздействие микробиоты на нейромедиаторные системы. Около 90% серотонина синтезируется в желудочно-кишечном тракте, и состав микробиоты во многом определяет этот процесс [60]. Так, лактобациллы стимулируют экспрессию ферментов синтеза серотонина (триптофан-гидроксилазы) в энтерохромаффинных клетках кишечника и могут тем самым повышать пул периферического 5-НТ, оральное введение некоторых штаммов *Lactobacillus* снижает уровень кортикостерона и выраженность тревожноподобных симптомов у мышей, подвергнутых социальному стрессу [55]. Микробиота также влияет на метаболизм триптофана по кинурениновому пути, что может менять соотношение нейроактивных метаболитов, связанных с депрессивным поведением [61].

Помимо серотонина, бактерии кишечника производят и другие нейроактивные вещества – γ -аминомасляную кислоту, дофамин, норадреналин – или индуцируют их синтез косвенно [62, 63].

Предполагают, что иммунный путь взаимодействия “кишечник – мозг” заключается в том, что микробиота модулирует созревание и развитие иммунной системы хозяина, способна вызывать иммунные ответы: так, липополисахарид грамотрицательных бактерий может активировать врожденный иммунитет, вызывая секрецию цитокинов, которые воздействуют на мозг и изменяют поведение. Баланс про- и противовоспалительных сигналов, формируемый под влиянием микрофлоры, существенно сказывается на реакции организма на стресс [64]. В совокупности короткоцепочечные жирные кислоты, нейромедиаторные молекулы и иммунные посредники составляют сложную сеть механизмов, посредством которых особенности кишечного микробиоценоза способны усиливать или ослаблять поведенческие реакции на стрессовые нагрузки.

Важно подчеркнуть, что обнаруженные различия в микробиоте между линиями ВП и НП проявляются несмотря на идентичные условия содержания животных. Это свидетельствует о возможной роли генетических особенностей хозяина в формировании состава кишечной экосистемы. Генетический профиль организма может напрямую влиять на микробиом, определяя характер иммунных и метаболических взаимодействий с симбиотическими микробами [65].

Показано, что разные линии мышей сохраняют различия в составе микробиоты даже при совместном содержании: в одном из исследований две инбредные мыши двух линий, содержащиеся в одной клетке в условиях однородной микробной контаминации,

демонстрировали устойчивое расхождение профилей микробиоты в пользу наследуемых (генотип-зависимых) таксонов [66]. Эти данные указывают, что генотип хозяина способен создавать специфические ниши для микробиоты – через различия в секреции слизистых субстратов, иммуноглобулинов, моторику кишечника, уровень гормонов стресса и другие наследуемые физиологические параметры. Продолжительная (более 80 поколений) селекция линий ВП и НП по возбудимости нервной системы могла сопровождаться сопряженным отбором аллелей, влияющих на кишечную среду обитания микроорганизмов. Помимо генетической предрасположенности, нельзя исключить и влияние вертикальной передачи микробиоты: у каждой линии сложился свой материнский микробиом, передаваемый потомству при рождении и выкармливании, что закрепило различия на уровне сообщества. Таким образом, генетическая дивергенция линий ВП и НП может иметь своим следствием дивергенцию и их кишечных микробиомов даже при устранении внешних различий среды обитания.

Изучение линий крыс с контрастной возбудимостью нервной системы позволяет глубже понять механизмы функционирования оси “микробиота – кишечник – мозг”, роль генетических факторов в ее функционировании, а также закладывает основу для дальнейших исследований причинно-следственных связей между микробным составом и постстрессорными нарушениями поведения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ поведения показал, что у высоковозбудимых крыс линии НП более выражена локомоторная активность и менее выражено замирание в тесте ПКЛ по сравнению с низковозбудимыми крысами линии ВП. Эти различия отражают поведенческие профили, связанные с их генетически детерминированным контрастным уровнем возбудимости.

Не было обнаружено значимых различий в индексах альфа-разнообразия между линиями ВП и НП, что указывает на схожее общее разнообразие и равномерность распределения таксонов в микробиоте стула обеих линий крыс, несмотря на их генетические различия и контрастирующие уровни возбудимости нервной системы.

Анализ бета-разнообразия подчеркивает наличие микробиомных профилей, специфичных для каждой линии, что поддерживается дополнительными статистическими методами.

Различия в поведенческих и микробиомных профилях предполагает возможную связь между генетическими факторами, композицией микробиоты кишечника и различными физиологическими характеристиками у крыс с контрастной возбудимостью нервной системы. Для более глубокого понимания этой связи необходимо исследовать функциональное значение этих различий. Для этого необходим метагеномный подход (shotgun-секвенирование), поскольку важны не только различия в таксономическом составе, но и различия в функциональных возможностях микробиоты.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы (И. Г. Ш., Н. А. Д.), сбор данных (К. О. Э., Д. С. К., Е. А. Б., А. К. П.), обработка данных (И. Г. Ш., Д. С. К.), написание и редактирование манускрипта (И. Г. Ш., Н. А. Д.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование было поддержано Федеральной программой академического лидерства “Приоритет-2030” в Балтийском федеральном университете им. И. Канта и средствами федерального бюджета в рамках государственного задания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (№ 1021062411629-7-3.1.4).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова, протокол № 09/16 от 16.09.2021 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vaido AI, Shiryayeva NV, Pavlova MB, Levina AS, Khlebaeva DA, Lyubashina OA, Dyuzhikova NA* (2018) Selected rat strains Ht, Lt as a model for the study of dysadaptation states dependent on the level of excitability of the nervous system. *Lab Animals for Sci* 3. <https://doi.org/10.29296/2618723X-2018-03-02>
2. *Shiryayeva NV, Vshivtseva VV, Mal'tsev NA, Sukhorukov VN, Vaido AI* (2008) Neuron density in the hippocampus in rat strains with contrasting nervous system excitability after prolonged emotional-pain stress. *Neurosci Behav Physiol* 38: 355–357. <https://doi.org/10.1007/S11055-008-0049-4>
3. *Shalaginova IG, Tuchina OP, Sidorova MV, Levina AS, Khlebaeva DA, Vaido AI, Dyuzhikova NA* (2021) Effects of psychogenic stress on some peripheral and central inflammatory markers in rats with the different level of excitability of the nervous system. *PLoS One* 16: e0255380. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255380>
4. *Shevchenko A, Shalaginova I, Katserov D, Matskova L, Shiryayeva N, Dyuzhikova N* (2023) Post-stress changes in the gut microbiome composition in rats with different levels of nervous system excitability. *PLoS One* 18: e0295709. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0295709>
5. *Shalaginova IG, Tuchina OP, Turkin AV, Vylegzhanina AE, Nagumanova AN, Zachevilo TG, Dyuzhikova NA* (2023) The effect of long-term emotional and painful stress on the expression of proinflammatory cytokine genes in rats with high and low excitability of the nervous system. *Russ J Physiol* 109(4): 545–558 (In Russ). <https://doi.org/10.31857/S0869813923040088>
6. *Shcherbinina V, Pavlova M, Daev E, Dyuzhikova N* (2024) Rats selected for different nervous excitability: long-term emotional-painful stress affects the dynamics of DNA damage in cells of several brain areas. *Int J Mol Sci* 25: 994. <https://doi.org/10.3390/ijms25020994>
7. *Van averbeke V, Berkell M, Mysara M, Rodriguez-Ruiz JP, Xavier BB, De Winter FHR, Jongers B, Jairam RK, Hotterbeekx A, Goossens H, Cohen ES, Malhotra-Kumar S and Kumar-Singh S* (2022) Host Immunity Influences the Composition of Murine Gut Microbiota. *Front Immunol* 13: 828016. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.828016>
8. *Paone P, Cani PD* (2020) Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners? *Gut* 69: 2232–2243. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322260>
9. *Dzierzynski L, Queen J, Sears CL* (2023) Subtle, persistent shaping of the gut microbiome by host genes: A critical determinant of host biology. *Cell Host Microb* 31(10): 1569–1573. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.09.007>
10. *Clarke G, Grenham S, Scully P, Fitzgerald P, Moloney RD, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF* (2013) The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol Psychiatry* 18: 666–673. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.77>

11. *Sorboni SG, Moghaddam HS, Jafarzadeh-Esfehani R, Soleimanpour S* (2022) A comprehensive review on the role of the gut microbiome in human neurological disorders. *Clin Microbiol Rev* 35: e00338-20.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00338-20>
12. *Lof J, Smits K, Melotte V, Kuil LE* (2022) The health effect of probiotics on high-fat diet-induced cognitive impairment, depression and anxiety: a cross-species systematic review. *Neurosci Biobehav Rev* 136: 104634.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104634>
13. *Laukens D, Brinkman BM, Raes J, De Vos M, Vandenabeele P* (2016) Heterogeneity of the gut microbiome in mice: guidelines for optimizing experimental design. *FEMS Microbiol Rev* 40: 117–132.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuv036>
14. *Toshchakov SV, Izotova AO, Vinogradova EN, Kachmazov GS, Tuaeva AY, Abaev VT* (2021) Culture-independent survey of thermophilic microbial communities of the North Caucasus. *Biology* 10: 1352.
<https://doi.org/10.3390/biology10121352>
15. *Gohl DM, Vangay P, Garbe J, MacLean A, Hauge A, Becker A* (2016) Systematic improvement of amplicon marker gene methods for increased accuracy in microbiome studies. *Nat Biotechnol* 34: 942–949.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3656>
16. *Fox J, Weisberg S, Adler D, Bates D, Baud-Bovy G, Ellison S, Heiberger R* (2012) Package ‘car’. Vienna: R Found Stat Comput 16: 332–333.
17. *Oksanen J, Kindt R, Legendre P, O’Hara B, Stevens MHH, Oksanen MJ, Suggests MASS* (2007) The vegan package. *Commun ecol package* 10: 631–637.
18. *Wickham H* (2016) Programming with ggplot2. *Ggplot2: elegant graphics for data analysis* 241–253.
19. *Renaud G, Stenzel U, Maricic T, Wiebe V, Kelso J* (2015) deML: robust demultiplexing of Illumina sequences using a likelihood-based approach. *Bioinformatics* 31: 770–772.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu719>
20. *Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR* (2019) Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol* 37: 852–857.
<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
21. *Lu Y, Zhou G, Ewald J, Pang Z, Shiri T, Xia J* (2023) MicrobiomeAnalyst 2.0: comprehensive statistical, functional and integrative analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Res* 51.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkad407>
22. *De Marco P, Henriques AC, Azevedo R, Sá SI, Cardoso A, Fonseca B, Barbosa J, Leal S* (2021) Gut microbiome composition and metabolic status are differently affected by early exposure to unhealthy diets in a rat model. *Nutrients* 13: 3236.
<https://doi.org/10.3390/nu13093236>
23. *Grigor’eva IN* (2020) Gallstone disease, obesity and the firmicutes/bacteroidetes ratio as a possible biomarker of gut dysbiosis. *J Pers Med* 11: 13.
<https://doi.org/10.3390/jpm11010013>
24. *Stojanov S, Berlec A, Štrukelj B* (2020) The influence of probiotics on the firmicutes/bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease. *Microorganisms* 8: 1715.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8111715>
25. *Xu Z* (2022) Gut microbiota in patients with obesity and metabolic disorders – A systematic review. *Genes Nutr* 17: 2.
<https://doi.org/10.1007/s12263-021-00693-y>
26. *Hantsoo L, Zemel BS* (2021) Stress gets into the belly: early life stress and the gut microbiome. *Behav Brain Res* 414: 113474.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113474>
27. *Magne F, Gotteland M, Gauthier L, Zazueta A, Pessoa S, Navarrete P, Balamurugan R* (2020) The firmicutes/bacteroidetes ratio: a relevant marker of gut dysbiosis in obese patients? *Nutrients* 12: 1474.
<https://doi.org/10.3390/nu12051474>
28. *Dong Y, Han M, Fei T* (2024) Utilization of diverse oligosaccharides for growth by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* species and their in vitro co-cultivation characteristics. *Int Microbiol* 27: 941–952.
<https://doi.org/10.1007/s10123-023-00446-x>

29. Fusco W, Lorenzo MB, Cintoni M (2023) Short-chain fatty-acid-producing bacteria: key components of the human gut microbiota. *Nutrients* 15: 2211.
<https://doi.org/10.3390/nu1509221>
30. Zhang K (2019) Abnormal composition of gut microbiota is associated with resilience versus susceptibility to inescapable electric stress. *Transl Psychiatry* 9: 231.
<https://doi.org/10.1038/s41398-019-0571-x>
31. Mindus C (2021) Lactobacillus-based probiotics reduce the adverse effects of stress in rodents: a meta-analysis. *Front Behav Neurosci* 15: 642757.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.642757>
32. Caporaso JG, Lauber CL, Costello EK (2011) Moving pictures of the human microbiome. *Genome Biol* 12: R50.
<https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-5-r50>
33. Claesson M, Jeffery I, Conde S (2012) Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 488: 178–184.
<https://doi.org/10.1038/nature11319>
34. Meng C, Feng S, Hao Z, Dong C, Liu H (2020) Changes in gut microbiota composition with age and correlations with gut inflammation in rats. *PLoS One* 17: e0265430.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265430>
35. Neu AT, Allen EE, Roy K (2021) Defining and quantifying the core microbiome: challenges and prospects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118: e2104429118.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2104429118>
36. Mukherjee A, Lordan C, Ross RP, Cotter PD (2020) Gut microbes from the phylogenetically diverse genus *Eubacterium* and their various contributions to gut health. *Gut Microbes* 12: 1802866.
<https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1802866>
37. Yassour M, Lim MY, Yun HS (2016) Sub-clinical detection of gut microbial biomarkers of obesity and type 2 diabetes. *Genome Med* 8: 17.
<https://doi.org/10.1186/s13073-016-0271-6>
38. Liu G, Qiao Y, Zhang Y, Leng C, Chen H, Sun J, Fan X, Li A, Feng Z (2020) Metabolic profiles of carbohydrates in *Streptococcus thermophilus* during pH-controlled batch fermentation. *Front Microbiol* 11: 1131.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01131>
39. Gerritsen J, Hornung B, Renckens B, van Hijum SAFT, Martins dos Santos V, Rijkers GT, Schaap PJ, de Vos WM, Smidt H (2017) Genomic and functional analysis of *Romboutsia ilealis* CRIBT reveals adaptation to the small intestine. *Peer J* 5: e3698.
<https://doi.org/10.7717/peerj.3698>
40. Rampanelli E, Romp N, Troise AD, Ananthasabesan J, Wu H, Gül IS, Bui TPN (2025) Gut bacterium *Intestinimonas butyriciproducens* improves host metabolic health: Evidence from cohort and animal intervention studies. *Microbiome* 13: 15.
41. Seegers J, Bui T, de Vos WM (2021) Remarkable metabolic versatility of the commensal bacteria *Eubacterium hallii* and *Intestinimonas butyriciproducens*: potential next-generation therapeutic microbes. In: Mojgani N, Dadar M (eds) *Probiotic bacteria and postbiotic metabolites: role in animal and human health*. *Microorganisms for Sustainability*. Springer, Singapore.
https://doi.org/10.1007/978-981-16-0223-8_5
42. La Reau AJ, Suen G (2018) The Ruminococci: key symbionts of the gut ecosystem. *J Microbiol* 56: 199–208.
<https://doi.org/10.1007/s12275-018-8024-4>
43. Cao Q, Sun X, Rajesh K, Chalasani N, Gelow K, Katz B, Shah VH, Sanyal AJ, Smirnova E (2021) Effects of rare microbiome taxa filtering on statistical analysis. *Front Microbiol* 11: 607325.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.607325>
44. Lynch JB, Gonzalez EL, Choy K (2023) Gut microbiota *Turicibacter* strains differentially modify bile acids and host lipids. *Nat Commun* 14: 3669.
<https://doi.org/10.1038/s41467-023-39403-7>
45. Hoek KL, McClanahan KG, Latour YL, Shealy N, Piazuolo MB, Vallance BA, Byndloss MX, Wilson KT, Olivares-Villagómez D (2023) *Turicibacterales* protect mice from severe *Citrobacter rodentium* infection. *Infect Immun* 91: e00322-23.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00322-23>

46. Zhang L, Jing J, Han L, Wang J, Zhang W, Liu Z (2021) Characterization of gut microbiota, metabolism and cytokines in benzene-induced hematopoietic damage. *Ecotoxicol Environ Saf* 228: 112956. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112956>
47. Misiak B, Pawlak E, Rembacz K, Kotas M, Żebrowska-Różańska P, Kujawa D (2024) Associations of gut microbiota alterations with clinical, metabolic, and immune-inflammatory characteristics of chronic schizophrenia. *J Psychiatr Res* 171: 152–160. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2024.01.036>
48. Oñate FP, Chamignon C, Burz SD (2023) *Adlercreutzia equolifaciens* is an anti-inflammatory commensal bacterium with decreased abundance in gut microbiota of patients with metabolic liver disease. *Int J Mol Sci* 24: 12232. <https://doi.org/10.3390/ijms241512232>
49. Wu X, Chen J, Xu M, Zhu D, Wang X, Chen Y, Yu L (2017) 16S rDNA analysis of periodontal plaque in chronic obstructive pulmonary disease and periodontitis patients. *J Oral Microbiol* 9: 1324725. <https://doi.org/10.1080/20002297.2017.1324725>
50. Vacca M, Celano G, Calabrese FM (2020) The controversial role of human gut Lachnospiraceae. *Microorganisms* 8: 573. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040573>
51. Hexun Z, Miyake T, Maekawa T (2023) High abundance of Lachnospiraceae in the human gut microbiome is related to high immunoscores in advanced colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother* 72: 315–326. <https://doi.org/10.1007/s00262-022-03256-8>
52. McGaughey KD (2019) Relative abundance of *Akkermansia* spp. and other bacterial phylotypes correlates with anxiety- and depressive-like behavior following social defeat in mice. *Sci Rep* 9: 3281. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40140-5>
53. Hao Z (2019) *Faecalibacterium prausnitzii* (ATCC 27766) has preventive and therapeutic effects on chronic unpredictable mild stress-induced depression-like and anxiety-like behavior in rats. *Psychoneuroendocrinology* 104: 132–142. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.02.025>
54. Martin R, Miquel S, Chain F (2015) *Faecalibacterium prausnitzii* prevents physiological damages in a chronic low-grade inflammation murine model. *BMC Microbiol* 15: 67. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0400-1>
55. Li LF, Zou HW, Song BL, Wang Y, Jiang Y, Li ZL, Niu QH, Liu YJ (2023) Increased *Lactobacillus* Abundance Contributes to Stress Resilience in Mice Exposed to Chronic Social Defeat Stress. *Neuroendocrinology* 113(5): 563–576. <https://doi.org/10.1159/000528876>
56. Yano JM, Yu K, Donaldson GP, Shastri GG, Ann P, Ma L, Nagler CR, Ismagilov RF, Mazmanian SK, Hsiao EY (2015) Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell* 161: 264–276. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.047>
57. Mansuy-Aubert V, Ravussin Y (2023) Short chain fatty acids: the messengers from down below. *Front Neurosci* 17: 1197759. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1197759>
58. Bonaz B, Bazin T and Pellissier S (2018) The Vagus Nerve at the Interface of the Microbiota-Gut-Brain Axis. *Front Neurosci* 12: 49. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00049>
59. Colombo AV, Sadler RK, Llovera G, Singh V, Roth S, Heindl S, Sebastian Monasor L, Verhoeven A, Peters F, Parhizkar S, Kamp F, Gomez de Agüero M, MacPherson AJ, Winkler E, Herms J, Benakis C, Dichgans M, Steiner H, Giera M, Haass C, Tahirovic S, Liesz A (2021) Microbiota-derived short chain fatty acids modulate microglia and promote A β plaque deposition. *Elife* 10: e59826. <https://doi.org/10.7554/eLife.59826>
60. Terry N, Margolis KG (2017) Serotonergic Mechanisms Regulating the GI Tract: Experimental Evidence and Therapeutic Relevance. *Handb Exp Pharmacol* 239: 319–342. https://doi.org/10.1007/164_2016_103
61. Clarke G, Grenham S, Scully P, Fitzgerald P, Moloney RD, Shanahan F, Dinan TG, Cryan J (2013) The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol Psychiatry* 18: 666–673. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.77>

62. Strandwitz P, Kim KH, Terekhova D, Liu JK, Sharma A, Levering J, McDonald D, Dietrich D, Ramadhar T, Lekbua A, Mroue N, Liston C, Stewart EG, Dubin MJ, Zengler K, Knight R, Gilbert JA, Clardy J, Lewis K (2019) GABA-modulating bacteria of the human gut microbiota. *Nature Microbiol* 4(3): 396–403.
<https://doi.org/10.1038/s41564-018-0307-3>
63. Wang Y, Tong Q, Ma SR, Zhao ZX, Pan LB, Cong L, Han P, Peng R, Yu H, Lin Y, Gao T, Shou Y, Li X, Zhang X, Zhang Z, Fu J, Wen B, Yu J, Cao X, Jiang JD (2021) Oral berberine improves brain dopa/dopamine levels to ameliorate Parkinson's disease by regulating gut microbiota. *Signal Transduct Targ Therapy* 6(1): 77.
64. Zheng D, Liwinski T, Elinav E (2020) Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Res* 30: 492–506.
<https://doi.org/10.1038/s41422-020-0332-7>
65. Dąbrowska K, Witkiewicz W (2016) Correlations of Host Genetics and Gut Microbiome Composition. *Front Microbiol* 7: 1357.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01357>
66. Korach-Rechtman H, Freilich S, Gerassy-Vainberg S, Buhnik-Rosenblau K, Danin-Poleg Y, Bar H, Kashi Y (2019) Murine Genetic Background Has a Stronger Impact on the Composition of the Gut Microbiota than Maternal Inoculation or Exposure to Unlike Exogenous Microbiota. *Appl Environ Microbiol* 85(18): e00826-19.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00826-19>

Behavioral Profile and Gut Microbiota Composition in Rats with Different Nervous System Excitability

I. G. Shalaginova^{a, b, *}, D. S. Katserov^a, K. O. Ensh^a, E. A. Budenkova^a,
A. K. Pribyshina^b, and N. A. Dyuzhikova^b

^aEducational and Scientific Cluster “Institute of Medicine and Life Sciences (MEDBIO)”,
Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

^bPavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

*e-mail: shalaginova_i@mail.ru

Previous studies have shown that two rat strains selected by the excitability threshold of the nervous system exhibit differences in response to prolonged emotional-pain stress at behavioral, neurobiological, and molecular-genetic levels, as well as specific changes in gut microbiota composition. This suggests a potential link between genetic factors, microbiota, and behavioral disturbances. The aim of this study is to analyze the gut microbiota and behavioral profiles of intact rats with high (HT) and low (LT) excitability thresholds to identify key differences driven by their genetic characteristics.

The behavior of intact rats from two strains was analyzed in the Open Field and Elevated Plus Maze, and microbiota analysis in stool samples was conducted using 16S rRNA gene amplicon sequencing. Behavioral analysis revealed that high-excitability (LT) rats exhibited higher activity and less freezing in the Elevated Plus Maze compared to low-excitability (HT) rats. Alpha-diversity indices showed no significant differences between the strains, but beta-diversity analysis revealed significant differences in microbial profiles between HT and LT rats. LT rats had significantly higher abundances of *Lactobacillus* and *Faecalibacterium* genera, whereas HT rats showed a higher relative abundance of *Romboutsia*, *Eubacterium*, and *Turicibacter* genera. The integration of behavioral and microbiota data highlights a potential relationship between genetic factors, gut microbiota profiles, and the unique physiological and behavioral traits of rat strains selected based on the excitability threshold of the nervous system.

Keywords: gut microbiota, core microbiome, gut-brain axis, nervous system excitability, rats, stress