

DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-162-2-102-106

УДК 612.661+611.018.81+579.61+611.018.73+611.345

Структурно-функциональная характеристика нервной, эндокринной систем и состава микрофлоры ободочной кишки у крыс вистар в периоды новорожденности и препубертата*

Тихонов Е. А., Золотова Н. А., Хочанский Д. Н., Макарова О. В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт морфологии человека», 117418, г. Москва, Россия

Structural and functional characteristic of the nervous and endocrine systems and the microbiota composition in the colon of the newborn and prepubescent wistar rats*

E. A. Tikhonov, N. A. Zolotova, D. N. Khochansky, O. V. Makarova

Research Institute of Human Morphology, 117418, Moscow, Russia

Для цитирования: Тихонов Е. А., Золотова Н. А., Хочанский Д. Н., Макарова О. В. Структурно-функциональная характеристика нервной, эндокринной систем и состава микрофлоры ободочной кишки у крыс вистар в периоды новорожденности и препубертата. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2019;162(2): 102–106. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-162-2-102-106

For citation: Tikhonov E. A., Zolotova N. A., Khochansky D. N., Makarova O. V. Structural and functional characteristic of the nervous and endocrine systems and the microbiota composition in the colon of the newborn and prepubescent wistar rats. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2019;162(2): 102–106. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-162-2-102-106

✉ Corresponding author:

Тихонов Евгений Александрович
Evgeny A. Tikhonov
genebio@mail.ru

Тихонов Евгений Александрович, лаборатория иммуноморфологии воспаления, младший научный сотрудник;
ORCID:0000-0001-6652-848X

Золотова Наталья Александровна, лаборатория иммуноморфологии воспаления, и.о. научного сотрудника, к.б.н.;
ORCID: 0000-0002-0119-9889

Хочанский Дмитрий Николаевич, лаборатория иммуноморфологии воспаления, и.о. научного сотрудника, к.б.н.;
ORCID:0000-0002-7153-6828

Макарова Ольга Васильевна, заведующая лабораторией иммуноморфологии воспаления, д.м.н., профессор
Evgeny A. Tikhonov, Laboratory of Inflammation Immunomorphology, Researcher; ORCID: 0000-0001-6652-848X
Natalya A. Zolotova, Laboratory of Inflammation Immunomorphology, Researcher, PhD; ORCID: 0000-0002-0119-9889
Dmitry N. Khochansky, Laboratory of Inflammation Immunomorphology, Researcher, MD PhD; ORCID: 0000-0002-7153-6828
Olga V. Makarova, head of the Laboratory of Inflammation Immunomorphology, MD, PhD, Professor

Резюме

Цель исследования. Охарактеризовать структурно-функциональные особенности нервной, эндокринной системы толстой кишки и состава заселяющей ее микрофлоры у новорожденных и препубертатных крыс Вистар.

Материалы и методы: исследование выполнено на 12 новорожденных и 13 препубертатных самцах крыс Вистар. С помощью иммуногистохимических методов были изучены структура межмышечного нервного сплетения и выявлены эндокринные клетки в ободочной кишке. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии оценивали концентрацию серотонина в стенке ободочной кишки и плазме периферической крови. Определяли соотношение основных таксонов бактерий просветной микрофлоры методом ПЦР в реальном времени.

Результаты. Показано, что в период новорожденности межмышечное нервное сплетение окончательно не сформировано, глиальных клеток в ганглиях мало. Относительное число энтероэндокринных клеток и содержание серотонина в стенке кишки и крови в этот возрастной период минимальное. Состав просветной микрофлоры у новорожденных крыс характеризуется преобладанием таксонов *Firmicutes*, *Enterobacteria*. По сравнению с новорожденными у препубертатных крыс межмышечное нервное сплетение сформировано: нервная сеть крупноячеистая, число глиальных клеток в ганглиях увеличивается в 3–4 раза. Число энтероэндокринных клеток увеличивается в 2,5 раза, содержание серотонина в стенке ободочной кишки и периферической крови повышаются почти в 80 и 6000 раз соответственно. В составе просветной микрофлоры преобладают таксоны *Firmicutes*, снижается количество *Bifidobacteria*, *Enterobacteria*.

Заключение. Таким образом, в постнатальном развитии толстой кишки от периода новорожденности к препубертатному возрасту происходят увеличение числа глиальных клеток в ганглиях межмышечного нервного сплетения,

*

* Illustration to the article are on the colored inset of the Journal.

разрежение энтеральной нервной сети, увеличение числа серотонин-продуцирующих энтероэндокринных клеток, повышение продукции серотонина и изменения состава микрофлоры, связанные с переходом с молочного вскармливания на твердый корм.

Ключевые слова: ободочная кишка, крысы, новорожденные, препубертатные, энтеральная нервная система, энтероэндокринные клетки, серотонин, микрофлора

Summary

The aim was to characterize the structural and functional features of the nervous and endocrine systems and the microbiota composition of the colon in newborns and prepubescent Wistar rats.

Materials and methods: The study was performed on 12 newborns and 13 prepubescent male Wistar rats. We used immunohistochemical methods to investigate the structure of the intermuscular nerve plexus and to detect endocrine cells in the colon. The concentration of serotonin in the colon wall and peripheral blood plasma was evaluated with high-performance liquid chromatography. The ratio of the main taxa of bacteria of the luminal microbiota was determined by real-time PCR.

Results: We identified that in the neonatal period the intermuscular nerve plexus was not completely formed, there were few glial cells in the ganglia. The relative number of enteroendocrine cells and the serotonin content in the intestinal wall and in blood at this age period was minimal. The composition of the luminal microbiota in newborn rats was characterized by the predominance of taxons *Firmicutes*, *Enterobacteria*. In comparison with the newborns the intermuscular nerve plexus in the prepubescent rats was mature: the neural network formed large mesh, while the number of glial cells in the ganglia increased 3–4 times. The number of enteroendocrine cells increased 2.5 times, the content of serotonin in the colon wall and peripheral blood increased almost 80 and 6000 times, respectively. *Firmicutes* predominated in the luminal microflora, the number of *Bifidobacteria*, *Enterobacteria* decreased.

Keywords: colon, rat, newborn, prepubescent, enteric nervous system, enteroendocrine cells, serotonin, microflora

Введение

Постнатальное развитие желудочно-кишечного тракта и одного из его отделов – ободочной кишки – характеризуется структурными изменениями всех оболочек – слизистой, подслизистой, мышечной, а так же иммунной и энтеральной нервной систем.

Энтеральная нервная система представлена двумя сплетениями: межмышечным и подслизистым [1]. Оба сплетения состоят из ганглиев и нервных отростков. Ганглии представлены телами нейронов и глиальными клетками. Глия сопровождает отростки нейронов в нервных трактах. Энтероэндокринные клетки составляют около 1% эпителиальных клеток ободочной кишки, из них около 70% – энтерохромоаффинные (ЕС) клетки [2]. ЕС-клетки секретируют серотонин – основной нейромедиатор в центральной нервной системе. В пищеварительной системе он стимулирует перистальтику, ускоряет транзит содержимого кишечника, снижает абсорбцию воды. [2,3]. Из кишечника серотонин попадает в кровь, где способствует агрегации тромбоцитов, активирует иммунный ответ, и стимулирует дифференцировку остеобластов в остециты [4–7]. В толстой кишке у половозрелых крыс обитают представители 5 основных таксонов бактерий: *Bacteroides*, *Firmicutes*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus*

и *Enterobacteriaceae*. *Clostridia*, входящие в таксон *Firmicutes*, способны продуцировать серотонин [8].

Показана связь ряда заболеваний человека, таких как язвенный колит, болезнь Крона, аутизм, депрессия, сахарный диабет со структурно-функциональными нарушениями толстой кишки и изменением состава колонизирующей ее микрофлоры [4, 6]. Указанные заболевания развиваются в разные возрастные периоды – от новорожденности до старости, а для их коррекции широко используются препараты микробного происхождения – пробиотики, пребиотики и другие. Однако литературные сведения о возрастных изменениях толстой кишки и колонизирующей ее микрофлоры у человека и разных видов лабораторных животных фрагментарны и не систематизированы [9–11]. Показано, что моторная, секреторная и абсорбционная функции толстой кишки у новорожденных крыс еще не сформированы и устанавливаются к препубертатному возрасту [6].

В связи с изложенным, цель настоящей работы – охарактеризовать структурно-функциональные особенности нервной, эндокринной системы толстой кишки и состава заселяющей ее микрофлоры у новорожденных и препубертатных крыс Вистар.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 25 самцах крыс Вистар (питомник «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России): 12 новорожденных (2–4 сут) и 13

препубертатных (25–30 сут). Животных содержали в клетках при естественном освещении, температуре +20–22 °С., со свободным доступом

к воде и пище. При работе с экспериментальными животными руководствовались приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977. На проведение эксперимента получено разрешение биоэтической комиссии ФГБНУ «НИИ морфологии человека». Крыс выводили из эксперимента передозировкой диэтилового эфира.

Энтероэндокринные клетки выявляли с помощью антител к хромогранину А (Rabbit polyclonal anti-Chromogranin A antibody, ab15160, Abcam, Великобритания), в разведении 1:400. В качестве вторых антител использовали коммерческий раствор синтетического полимера, связанного с пероксидазой хрена – Simple Stain Mouse МАХРО (R) (N-Histofine Universal Immuno-peroxidase polymer for mouse tissue Anti-Rabbit Redy-to-use, Nichirei Bioscience Inc., Япония). В качестве системы визуализации антител применяли набор N-Histofine DAB-2V (Nichirei Bioscience Inc., Япония). Оценивали число энтероэндокринных клеток, выявляемых при реакции с антителами к хромогранину А, на стандартной единице площади эпителия (1 мм²).

Концентрацию серотонина определяли в гомогенате толстой кишки [12] и плазме периферической крови [13] методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе Agilent 1260 Infinity Nanoflow LC (Agilent, США).

Имунофлуоресцентное исследование межмышечного нервного сплетения проводили на гистологических срезах и тотальных препаратах мышечной оболочки ободочной кишки. С целью маркирования межмышечного нервного сплетения применяли антитела к βIII-тубулину (ab18207, Abcam, США). На гистологических срезах мышечной оболочки ободочной кишки определяли клеточный состав ганглиев. С целью выявления тел нейронов и глиальных клеток применяли, соответственно, антитела к HuC/D (ab184267, Abcam, США) и S100b (ab868,

Abcam, США). В качестве флуоресцентной метки для HuC/D служил стрептавидин, конъюгированный с AlexaFluor 555 (ThermoFisher, S21381, США) в разведении 1:100; для βIII-тубулина и S100b применяли Alexa-Fluor 488 goat-anti-rabbit (Life technologies, США) в разведении 1:100. Для выявления возрастных изменений межмышечного нервного сплетения на тотальных препаратах, окрашенных антителами к βIII-тубулину, оценивали среднюю площадь межганглионарных пространств (мкм²) и толщину соединяющих ганглии нервных трактов (мкм). Для компьютерной обработки полученных изображений использовали программу ImageJ (Fiji, free software). Проводили подсчет числа нейронов и глиальных клеток в ганглиях на гистологических срезах мышечной оболочки ободочной кишки, окрашенных, соответственно, антителами к HuC/D и S100b.

Методом ПЦР в реальном времени проводили оценку уровня экспрессии мРНК основных таксонов: *Bacteroides*, *Firmicutes*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus*, *Enterobacteriaceae* в кале (просветная микрофлора) у новорожденных и препубертатных крыс. Использовали праймеры и программу амплификации, предложенные С. Nasuti et al. (2016) [14]. Считывание показателей флуоресценции и их интерпретацию в виде значений пороговых циклов (Cp) осуществляли автоматически в соответствии с алгоритмом разработчика (амплификатор DT-Prime, НПФ ДНК-Технология, Россия). Выбирали референсный таксон (*Firmicutes*), относительно которого оценивали долю (%) основных таксонов в каждом образце.

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе STATISTICA 8.0 (StatSoft, Inc., США). Выборки описывали через медиану и межквартильные размахи, для сравнения групп использовали непараметрический критерий Манна-Уитни.

Результаты

Возрастные изменения межмышечного нервного сплетения

Гистоархитектонику межмышечного нервного сплетения изучали на тотальных препаратах, маркированных антителами к βIII-тубулину. В период новорожденности сеть мелкочейстая, ганглии не сформированы, соединяющие их нервные тракты тонкие (рис. 1А). К препубертатному возрастному периоду нервная сеть крупночейстая, ганглии четко очерчены, нервные тракты толстые (рис. 1Б). При количественной оценке структуры нервной сети площадь пространств между ганглиями и толщина нервных трактов увеличивались к препубертатному возрастному периоду в 18 и 1,8 раза, соответственно (табл. 1).

Для выявления клеточного состава ганглиев на гистологических срезах мы использовали маркер нейронов – HuC/D и глиальных клеток – S100b. В период новорожденности ганглии межмышечного нервного сплетения были представлены нейронами и единичными глиальными клетками (рис. 1В). По сравнению с новорожденными у препубертатных крыс количество нейронов в ганглиях не

изменялось, а глиальных клеток увеличивалось (рис. 1Г).

Возрастные изменения популяции энтероэндокринных клеток и содержания серотонина в толстой кишке и периферической крови

Энтероэндокринные клетки выявляли на гистологических срезах с помощью антител к хромогранину А (рис. 2). По данным количественной оценки относительное число энтероэндокринных клеток у новорожденных крыс было минимальным и увеличивалось в 2,5 раза к препубертатному возрастному периоду. Концентрация серотонина в гомогенате ободочной кишки и плазме периферической крови увеличивалась к препубертатному периоду почти в 80 и 6000 раз, соответственно (Табл. 1).

Соотношение основных таксонов просветной микрофлоры у новорожденных и препубертатных крыс Вистар

Методом количественной ПЦР в реальном времени в составе просветной микрофлоры были оценены 5 основных таксонов, в соответствии с классификацией, предложенной С. Nasuti et al.

Параметры	Возрастные группы		Статистическая значимость различий
	Новорожденные	Препубертатные	
	1981 (1167; 2336)	36216 (29505; 41183)	p=0,03
	8,73 (8,26; 11, 35)	15,57 (14,68; 18,90)	p=0,031
1	87,3 (65,4; 157,9)	220,8 (178,8; 253,5)	p=0,0003
	1,9×10 ⁻⁴ (1,7×10 ⁻⁴ ; 2,1×10 ⁻⁴)	0,015 (0,011; 0,030)	p=0,005
	3,7×10 ⁻⁴ (2,3×10 ⁻⁴ ; 6,1×10 ⁻⁴)	2,3 (1,6; 2,8)	p=0,004
	Me (0,25; 0,75). U-		p<0,05

1.

(2016) [14]. В период новорожденности у крыс преобладают таксоны *Firmicutes* и *Enterobacteriaceae*, обнаруживаются *Bifidobacteria*. К препубертатному

периоду снижается содержание *Enterobacteriaceae*, возрастает доля *Bacteroides* и практически исчезают *Bifidobacteria*. (рис. 3).

Обсуждение

По литературным данным ганглии межмышечного нервного сплетения формируют цепь, состоящую из нейронов и глиальных клеток [10, 15], однако клеточный состав ганглиев межмышечного нервного сплетения, численность и толщина внутримышечных нервных отростков у новорожденных и препубертатных крыс не исследованы. Нами показано, что у новорожденных крыс нервная сеть мелкаячестая, нервные тракты относительно тонкие, ганглии небольшие, состоят из 5–6 нейронов и 1–2 глиальных клеток. У препубертатных крыс в ганглиях число нейронов не изменяется, а число глиальных клеток увеличивается в 3–4 раза по сравнению с новорожденными. К препубертатному возрастному периоду нервная сеть становилась разреженной – увеличивалась площадь межганглионарных пространств и толщина межганглионарных нервных трактов. Данные литературы о возрастных изменениях структуры нервной сети и клеточного состава ганглиев фрагментарны и получены на разных видах животных [9, 10, 11, 14, 15]. Увеличение размеров ячеек сети, очевидно, связано увеличением размеров ободочной кишки в целом. Повышение числа глиальных клеток в энтеральных ганглиях, вероятно, обусловлено их пролиферацией и дифференцировкой.

Сведения о численности энтероэндокринных клеток и содержании серотонина в стенке кишки и периферической крови у новорожденных и препубертатных крыс в литературе отсутствуют. Нами показано, что у новорожденных животных число энтероэндокринных клеток и содержание серотонина в гомогенате ободочной кишки и плазме периферической крови низкое. К препубертатному возрастному периоду относительное число энтероэндокринных клеток увеличивается в 2,5 раза. Наряду с этим, концентрация серотонина в гомогенате ободочной кишки и плазме периферической крови возрастают примерно в 80 и 6000 раз соответственно. В литературе представлены данные анализа этих показателей только у половозрелых животных [12].

Литературные данные об основных таксонах просветной микрофлоры у новорожденных крыс отсутствуют, у препубертатных крыс показано, что микрофлора представлена 5 основными таксонами: *Firmicutes*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Bifidobacteria*, *Enterobacteriaceae* [14], но их соотношение в этот период не изучено. По нашим данным, у новорожденных крыс преобладают представители таксонов *Firmicutes* и *Enterobacteriaceae*, обнаруживаются *Bifidobacteria*. В период новорожденности крысы находятся на молочном вскармливании, что обуславливает высокое содержание *Enterobacteriaceae* и наличие *Bifidobacteria*. У препубертатных крыс в составе просветной микрофлоры преобладают представители таксона *Firmicutes*, а количество *Bifidobacteria*, *Enterobacteriaceae* минимальное. В этот период в рационе животных преобладает твердый корм, поэтому увеличивается доля *Bacteroides*, способствующих усвоению клетчатки [14].

Следует отметить, что микрофлора определяет морфофункциональное состояние иммунной системы, ассоциированной со слизистой оболочкой ободочной кишки, участвует в регуляции моторики, секреции и всасывания, а также продукции биологически активных веществ – нейромедиаторов, витаминов, короткоцепочечных жирных кислот [4]. В связи с этим, продуцируемый *Firmicutes* серотонин может влиять на моторику, секрецию, абсорбцию воды в ободочной кишке у крыс в период новорожденности. Показано, что «бактериальный» серотонин у половозрелых мышей составляет около 64% общего серотонина в гомогенате толстой кишки и 49% в плазме крови [16]. По данным других авторов у гнотобиотических мышей содержание серотонина в толстой кишке не превышает 15% от нормы [17]. Серотонин способен синтезировать *Clostridium* – представители таксона *Firmicutes* [8]. По нашим данным, доля серотонин-продуцирующего таксона *Firmicutes* в составе просветной микрофлоры у новорожденных и препубертатных крыс не различается. По данным литературы, общее

количество бактерий в толстой кишке существенно увеличивается к препубертатному возрастному периоду [16]. Эти данные косвенно указывают на

то, что продукция «бактериального» серотонина к препубертатному возрастному периоду увеличивается.

Заключение

Таким образом, в постнатальном развитии толстой кишки от периода новорожденности к препубертатному возрасту происходят увеличение числа глиальных клеток в ганглиях межмышечного нервного сплетения, разрежение энтеральной

нервной сети, увеличение числа серотонин-продуцирующих энтероэндокринных клеток, повышение продукции серотонина и изменения состава микрофлоры, связанные с переходом с молочного вскармливания на твердый корм.

Литература | References

1. Furness J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012; 9(5): 286–94. doi: 10.1038/nrgastro.2012.32.
2. Gunawardene A. R., Corfe B. M., Staton C. A. Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract. *Int. J. Exp. Pathol*. 2011; 92(4): 219–31. doi: 10.1111/j.1365-2613.2011.00767.x.
3. Chen M., Gao L., Chen P., Feng D., Jiang Y., Chang Y., Jin J., Chu F. F., Gao Q. Serotonin-exacerbated DSS-induced colitis is associated with increase in MMP-3 and MMP-9 expression in the mouse colon. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:5359768. doi: 10.1155/2016/5359768.
4. Nicholson J. K., Holmes E., Kinross J., Burcelin R., Gibson G., Jia W., Pettersson S. Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions. *Science*. 2012; 336(6086): 1262–7. doi: 10.1126/science.1223813.
5. Pistollato F., Sumalla Cano S., Elio I., Masias Vergara M., Giampieri F., Battino M. Role of gut microbiota and nutrients in amyloid formation and pathogenesis of Alzheimer disease. *Nutr Rev*. 2016; 74(10): 624–34. doi: 10.1093/nutrit/nuw023.
6. Gabbani T., Marsico M., Marocchi M., Biagini M. R. Isolated hypoganglionosis in young man with autism. *Dig. Liver Dis*. 2017; 49(1): 104. doi: 10.1016/j.dld.2016.10.002.
7. Mercado C. P., Quintero M. V., Li Y., Singh P., Byrd A. K., Talabnin K., Ishihara M., Azadi P., Rusch N. J., Kuberan B., Maroteaux L., Kilic F. A. serotonin-induced N-glycan switch regulates platelet aggregation. *Sci Rep*. 2013; 3:2795. doi: 10.1038/srep02795.
8. Amireault P., Sibon D., Côté F. Life without peripheral serotonin: insights from tryptophan hydroxylase 1 knockout mice reveal the existence of paracrine/autocrine serotonergic networks. *ACS Chem. Neurosci*. 2013; 4(1): 64–71. doi: 10.1021/cn300154j.
9. Castrogiovanni P., Musumeci G., Trovato FM, Avola R, Magro G, Imbesi R. Effects of high-tryptophan diet on pre- and postnatal development in rats: A morphological study. *Eur. J. Nutr*. 2014; 53(1): 297–308. doi: 10.1007/s00394-013-0528-4.
10. Cossais F., Durand T., Chevalier J., Boudaud M., Kermarrec L., Aubert P., Neveu I., Naveilhan P., Neunlist M. Postnatal development of the myenteric glial network and its modulation by butyrate. *Am. J. Physiol. – Gastrointest. Liver Physiol*. 2016; 310(11): G941–51. doi: 10.1152/ajpgi.00232.2015.
11. Peck C. J., Samsuria S. D., Harrington A. M., King S. K., Hutson J. M., Southwell B. R. Fall in density, but not number of myenteric neurons and circular muscle nerve fibres in guinea-pig colon with ageing. *Neurogastroenterol Motil*. 2009; 21(10): 1075–e90. doi: 10.1111/j.1365-2982.2009.01349.x.
12. Oshima S., Fujimura M., Fukimiya M. Changes in number of serotonin-containing cells and serotonin levels in the intestinal mucosa of rats with colitis induced by dextran sodium sulfate. *Histochem Cell Biol*. 1999; 112(4): 257–63.
13. Chen J. J., Li Z., Pan H. Maintenance of serotonin in the intestinal mucosa and ganglia of mice that lack the high-affinity serotonin transporter: Abnormal intestinal motility and the expression of cation transporters. *J. Neurosci*. 2001; 21(16): 6348–61.
14. Nasuti C., Coman M. M., Olek R. A., Fiorini D., Verdenelli M. C., Cecchini C., Silvi S., Fedeli D., Gabbianelli R. Changes on fecal microbiota in rats exposed to permethrin during postnatal development. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2016; 23(11): 10930–7. doi: 10.1007/s11356-016-6297-x.
15. de Vries P., Soret R., Suply E., Heloury Y., Neunlist M. Postnatal development of myenteric neurochemical phenotype and impact on neuromuscular transmission in the rat colon. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2010; 299(2): G539–47. doi: 10.1152/ajpgi.00092.2010.
16. Yano J. M., Yu K., Donaldson G. P., Shastri G. G., Ann P., Ma L., Nagler C. R., Ismagilov R. F., Mazmanian S. K., Hsiao E. Y. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell*. 2015 Apr 9;161(2):264–76. doi: 10.1016/j.cell.2015.02.047.
17. Savelieva K. V., Zhao S., Pogorelov V. M., Rajan I., Yang Q., Cullinan E., Lanthorn T. H. Genetic disruption of both tryptophan hydroxylase genes dramatically reduces serotonin and affects behavior in models sensitive to antidepressants. *PLoS One*. 2008; 3(10): e3301. doi: 10.1371/journal.pone.0003301.