

Третьякова Лия Викторовна

Исследование механизмов дистантного повреждения гиппокампа в результате
фокального повреждения мозга: кортикостероидная система и нейровоспаление

1.5.5 – физиология человека и животных

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН

Научный руководитель:

Большаков Алексей Петрович, к.ф-м.н., заведующий лабораторией Молекулярной нейробиологии ИВНД и НФ РАН

Научный консультант:

Гуляева Наталия Валерьевна, д.б.н., проф., заведующая лабораторией Функциональной биохимии нервной системы ИВНД и НФ РАН

Официальные оппоненты:

Зубарева Ольга Евгеньевна, к.б.н., доцент, в.н.с. лаборатории Молекулярных механизмов нейронных взаимодействий ИЭФБ РАН

Стволинский Сергей Лейбович, д.б.н., в.н.с. лаборатории Экспериментальной и трансляционной нейробиологии Института мозга Научного центра неврологии

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Казанский (Приволжский) федеральный университет"

Защита диссертации состоится 21 декабря 2022 года в 14.00 на заседании Диссертационного совета 24.1.046.01 при Институте Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН по адресу: 117485, Москва, ул. Бутлерова 5А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН», а также на сайте ИВНД: <https://ihna.ru>

Автореферат разослан « » _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

д.б.н. Иерусалимский В.Н. 

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

Накопленные к настоящему моменту данные клинических исследований говорят о том, что повреждение головного мозга при инсульте или черепно-мозговой травме (ЧМТ) приводит не только к гибели пораженных частей мозга, развитию воспаления в очаге повреждения, и нарушению функций, связанных с отмирающей тканью мозга, но и к отсроченным последствиям. В отсроченном периоде (>1 мес) после ЧМТ или инсульта, независимо от степени тяжести, у большинства пациентов развивается коморбидные когнитивные и эмоциональные расстройства, вплоть до деменции и депрессии [Gulyaeva, 2019b]. Существует предположение, что данные нарушения ассоциированы с дисфункцией гиппокампа, несмотря на то, что поражение носит очаговый характер, не затрагивает непосредственно гиппокамп и, как правило, оказывает выраженное влияние только в коре головного мозга [Eapen, Cifu, 2019; Oberholzer, Müri, 2019]. Более глубокие структуры, включая гиппокамп, в момент травмы не повреждаются напрямую, и их отсроченное повреждение является дистантным относительно первичной области повреждения. Дистантное повреждение, индуцированное ЧМТ, может включать не только ипсилатеральный, но и контралатеральный гиппокамп (ИГ и КГ, соответственно) [Gulyaeva, 2019a; Gulyaeva, 2019b]. Механизм дистантного повреждения остается невыясненным, однако, поскольку ЧМТ является мощным стрессом и приводит к выбросу в кровь глюкокортикоидов (ГК), а гиппокамп является структурой высокочувствительной к этим гормонам, было выдвинуто предположение, что ГК могут быть одним из факторов развития дистантного повреждения [Gulyaeva, 2019b]. Важно отметить, что в гиппокампе выделяют две основные части – дорсальную и вентральную (септальную и темпоральную), которые вовлечены в реализацию специфичных функций мозга [Fanselow, Dong, 2010; Gulyaeva, 2019a]. Дорсальный гиппокамп (ДГ) в основном связывают с памятью и навигацией, в то время как вентральный гиппокамп (ВГ) вовлечен в обработку информации, связанной с эмоциями. Поэтому развитие различных когнитивных и эмоциональных расстройств после ЧМТ может быть потенциально ассоциировано с различными изменениями, происходящими в этих частях гиппокампа после ЧМТ, однако, гетерогенность ответа вдоль дорсовентральной оси гиппокампа остается до сих пор не исследованной.

Механическое повреждение ткани мозга во время ЧМТ приводит к гибели клеток и высвобождению из них молекул, которые активируют и поддерживают нейровоспалительные каскады [Gaetz, 2004; Schmidt и др., 2005]. Данные события сопровождаются изменениями в количестве и форме клеток микроглии, активацией синтеза провоспалительных цитокинов (IL-

1 β , IL-6, TNF α) и других паракринных факторов, связанных с воспалением (хемокинов, простагландинов, активных форм азота и кислорода), а также нарушением целостности гемато-энцефалического барьера (ГЭБ) и выходом в ткань мозга иммунных клеток из периферического кровообращения. Есть предположение, что именно вышедший из-под контроля нейровоспалительный процесс может лежать в основе посттравматических когнитивных и эмоциональных расстройств, причем продолжительное повышение уровня ГК после ЧМТ может быть одним из ключевых факторов, способствующих потере контроля над нейровоспалением [Gulyaeva, 2019b].

ЧМТ запускает не только множество процессов в поврежденных тканях, но и системный ответ, включающий в себя активацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (ГГНО) и, как следствие, повышение уровня кортикостерона в крови. В этих условиях анализ роли, которую играют ГК и их рецепторы (глюкокортикоидные и минералокортикоидные) в модуляции нейровоспалительного ответа, чрезвычайно сложен вследствие наличия очень большого числа одновременно протекающих разнообразных (в т.ч. ГК-зависимых) процессов как в мозге, так и на системном уровне. Для исследования непосредственной роли, которую могут играть глюкокортикоидные и минералокортикоидные рецепторы (ГР и МР, соответственно) при нейровоспалении, можно использовать альтернативный подход – непосредственное введение агонистов и антагонистов ГР и МР в гиппокамп в условиях нейровоспаления.

Данная работа имеет два основных направления. Первое направление - исследование временной динамики структурных изменений и течения нейровоспалительного и стрессового ответов в ранний период после ЧМТ в гиппокампе в зависимости от близости к месту травмы (ипсилатеральное или контралатеральное полушарие) и расположения вдоль септотемпоральной оси (ДГ или ВГ). Второе направление – оценка роли ГР и МР в течение острого локального нейровоспалительного ответа в гиппокампе, индуцированного введением бактериального липополисахарида (ЛПС), на основе изменений уровней экспрессии генов, ассоциированных с нейровоспалением, и статуса микроглии после внутригиппокампальных инъекций агониста ГР (дексаметазона), антагониста ГР (мифепристона) и антагониста МР (спиронолактона).

Цель исследования:

1. Изучение роли нейровоспаления и системы глюкокортикоидной сигнализации в развитии дистантного повреждения гиппокампа, вызванного ЧМТ кортикальной локализации;

2. Изучение вклада кортикостероидных рецепторов (ГР и МР) в течение локального нейровоспалительного ответа, вызванного введением ЛПС в ДГ.

Задачи исследования:

1. Оценить гибель нейронов и развитие микроглиоза после ЧМТ в ИГ и КГ;
2. Оценить нейровоспалительный ответ после ЧМТ путём измерения концентрации цитокинов и экспрессии соответствующих им генов в ИГ и КГ;
3. Оценить стрессовый ответ после ЧМТ путём измерения концентрации кортикостерона в крови и гиппокампе, а также уровни экспрессии генов соответствующих рецепторов в гиппокампе;
4. Оценить изменения экспрессии генов, ассоциированных с нейровоспалением, после активации ГР дексаметазоном (Декс) в условиях острого нейровоспаления;
5. Оценить изменения экспрессии генов, ассоциированных с нейровоспалением, после ингибирования ГР и МР мифепристоном (Миф) и спиронолактоном (Спир), соответственно, в условиях острого нейровоспаления;
6. Оценить изменения клеток микроглии после введения модуляторов активности ГР и МР в гиппокамп в условиях острого нейровоспаления.

Научная новизна .Впервые на модели латерального гидродинамического удара (ЛГДУ) была изучена динамика гибели нейронов и развития микроглиоза в гиппокампе после ЧМТ в зависимости от близости к месту травмы (ипсилатеральное или контралатеральное полушарие) и расположения вдоль септотемпоральной оси (ДГ и ВГ) и было показано, что (1) гибель нейронов предшествует микроглиозу, причем гибель наблюдается только в ДГ, а микроглиоз охватывает весь гиппокамп; (2) оба процесса постепенно распространяются в КГ.

Впервые на модели ЛГДУ была изучена временная динамика экспрессии генов основных провоспалительных цитокинов и концентраций соответствующих им белков в гиппокампе после ЧМТ в зависимости от близости к месту травмы (ипсилатеральное или контралатеральное полушарие) и расположения вдоль септотемпоральной оси (ДГ и ВГ) и было обнаружено, что (1) активная фаза нейровоспалительного процесса охватывает период не менее 7 суток после травмы, и (2) она распространяется на ДГ и ВГ в ипсилатеральном полушарии (ИДГ, ИВГ) и только ДГ в контралатеральном полушарии (КДГ).

Впервые на модели ЛГДУ была изучена временная динамика изменений концентрации кортикостерона после ЧМТ на системном (в крови) и локальном (в гиппокампе) уровнях и было показано, что они совпадают.

Впервые изучен вклад ГР и МР в регуляцию локального нейровоспаления, индуцированного введением ЛПС в гиппокамп, и показано, что модуляция активности обоих типов рецепторов слабо влияет на компоненту нейровоспаления, связанную с экспрессией цитокинов, но способствует более длительному поддержанию микроглии в активированном состоянии.

Теоретическая и практическая значимость. Теоретическая значимость данной работы заключается в расширении современных представлений о процессах, протекающих в различных частях гиппокампа при ЧМТ, а также влиянии локального применения ГК на нейровоспаление в гиппокампе. Была изучена временная динамика дистантной гибели нейронов и сопровождающего ее микроглиоза в ИГ и КГ, концентраций основных провоспалительных цитокинов и кортикостерона, экспрессии мРНК генов, ассоциированных с нейровоспалением реакцией на стресс. Эти данные могут быть использованы при разработке методик профилактики и лечения расстройств когнитивного и эмоционального спектров, в патогенезе которых присутствуют нейровоспаление, микроглиоз и гибель нейронов в гиппокампе.

Положения, выносимые на защиту:

1. Фокальная черепно-мозговая травма в области неокортекса вызывает стрессорный ответ, приводя к повышению уровня кортикостерона в крови, накоплению кортикостерона и нейровоспалению в ипсилатеральном и контралатеральном гиппокампе.
2. Фокальная черепно-мозговая травма в области неокортекса вызывает отсроченную гибель нейронов в ипсилатеральном и контралатеральном дорсальном гиппокампе и последующее развитие микроглиоза, который охватывает также вентральную часть обоих гиппокампов.
3. При нейровоспалении, индуцированном введенным в дорсальный гиппокамп бактериальным липополисахаридом, эндогенные глюкокортикоиды и минералокортикоиды не оказывают значимого влияния на цитокиновый ответ, однако, активация глюкокортикоидных рецепторов агонистом дексаметазоном частично подавляет этот ответ, сохраняя преобладание активированных форм микроглии.

Степень достоверности и апробация результатов. Материалы диссертации были представлены на: International Summer School on Stress (25-28.06.2019), XXIII Школе-Конференции Молодых Учёных по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии (30-31.10.2019), XXIV Школе-Конференции Молодых Учёных по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии (29-30.10.20), XXVIII Международной конференции студентов, аспирантов, молодых учёных «Ломоносов» (12-23.04.2021), 1st ESN Virtual Conference «Future perspectives for European neurochemistry – a young scientists conference» (25-26.05.2021), 2021 FENS Regional Meeting (25-27.08.2021), XXV Школе-Конференции Молодых Учёных по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии (27-28.10.2021).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 3 печатных работы в рецензируемых журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации, и международных журналах, индексируемых в базе Web of Science/Scopus.

Личный вклад автора. Автор участвовал в разработке дизайна и протоколов исследования. Автор принимал участие в проведении поведенческого тестирования, подготовке биологического материала, анализе экспрессии мРНК, микроскопии, морфологического анализа, обработки и статистического анализа полученных данных. Самостоятельно проведены экспериментальные процедуры внутригиппокампальных инъекций и иммуногистохимического окрашивания.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 114 страницах машинописного текста, содержит 1 таблицу и иллюстрирована 49 рисунками. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение результатов исследования, заключение и выводы, список сокращений, список литературы. Библиографический указатель содержит 6 отечественных и 189 зарубежных источников литературы.

2. МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ И МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

В рамках выполнения диссертационной работы изучали нейровоспаление на разных моделях повреждения гиппокампа. Для этого были выполнены три независимых эксперимента. В Эксперименте 1 изучали временную динамику дистантного повреждения гиппокампа на модели ЧМТ кортикальной локализации. В Экспериментах 2 и 3 изучали вклад

кортикостероидных рецепторов (ГР и МР) на модели локального нейровоспалительного ответа, вызванного введением ЛПС в ДГ. В Эксперименте 2 вводили Декс для активации ГР. В Эксперименте 3 вводили Миф и Спир для ингибирования ГР и МР, соответственно. Схемы экспериментов представлены на рисунках 1 и 2.

Животные

В Эксперименте 1 участвовали 146 взрослых (6 месяцев) самцов крыс линии Wistar весом 327-455 г (медиана 380 г), полученных из питомника «Столбовая» (Московская область). Животных содержали группами, по 4-5 особей в каждой клетке, со свободным доступом к еде и воде. В Экспериментах 2 и 3 участвовали 40 и 49 самцов крыс линии Wistar (300-400 г), соответственно, полученных из питомника «Столбовая» (Московская область). Животных содержали в индивидуальных клетках со свободным доступом к еде и воде.

Экспериментальные процедуры

Эксперимент 1, моделирование ЧМТ. ЧМТ наносили при помощи ЛГДУ. Трепанацию черепа проводили в правой теменной кости (апертура 3мм, AP=3мм, L=3мм), куда затем наносили гидродинамический удар (3.03 ± 0.03 атм), используя специальную установку (Модель FP302, США). Животные были разделены на 3 группы: ЧМТ; ложно-оперированные (ЛО) животные; интактный контроль. Для получения образцов тканей мозга животных декапитировали на 1-е, 3-и, 7-е и 14-е сутки после ЧМТ. Морфологический анализ проводили при помощи окрашивания по Ниссля и иммуногистохимического окрашивания на маркер микроглии Iba1. Биохимический и молекулярно-генетический анализы проводили при помощи ИФА и количественной ПЦР.

Эксперимент 2 и 3, моделирование локального нейровоспаления в гиппокампе. Для модуляции функционирования ГР и МР использовали Декс (0.05 г/л; D1756, Sigma, USA), Спир (5.4 г/л; S3378, Sigma, USA) и Миф (4.5 г/л; M8046, Sigma, USA). Бактериальный ЛПС *E. Coli* (0.2 г/л; серотип O26:B6, Sigma-Aldrich, USA) вводили в ДГ для индукции локального острого нейровоспаления. Для всех экспериментальных веществ в качестве растворителя был выбран фосфатно-солевой буфер (ФСБ). Морфологический анализ проводили при помощи иммуногистохимического окрашивания на маркер микроглии Iba1, а молекулярно-генетический - при помощи количественной ПЦР.

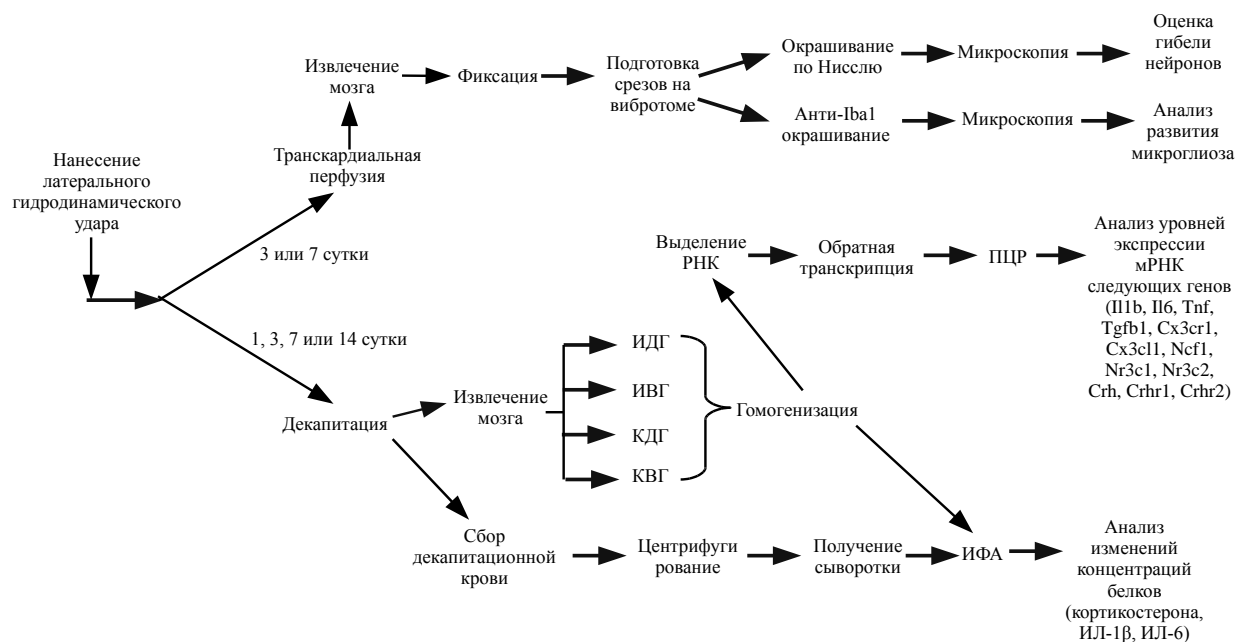


Рисунок 1. Дизайн Эксперимента 1.

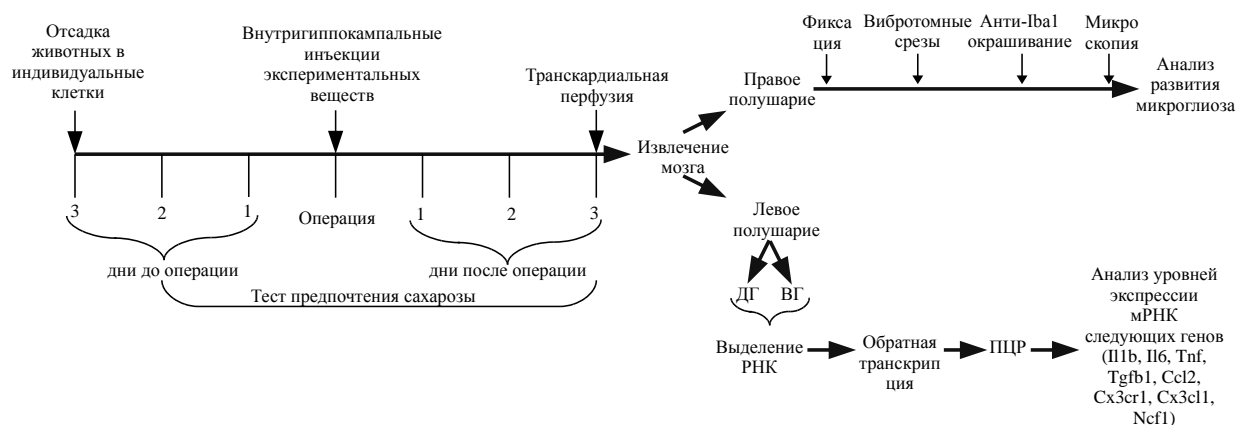


Рисунок 2. Дизайн Экспериментов 2 и 3.

В Эксперименте 2 изучали эффекты Декс, агониста ГР, на развитие острого нейровоспаления в гиппокампальной ткани. Животные были разделены на 5 групп: Интактная группа, контрольная группа ФСБ, группа ЛПС, группа Декс, группа ЛПС + Декс.

В Эксперименте 3 исследовали эффекты ингибиторов ГР и МР (Миф и Спир, соответственно) на развитие острого нейровоспаления в гиппокампальной ткани. Животные были разделены на 7 групп: Интактная группа, контрольная группа ФСБ, группа ЛПС, группа Миф, группа ЛПС + Миф, группа Спир, группа ЛПС + Спир.

Таким образом, Декс, Миф и Спир вводили в гиппокамп как самих по себе (нормальные условия), так и в комбинации с ЛПС (условия нейровоспаления). Для каждого вводимого в гиппокамп вещества общий объем составил 1 мкл.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперимент 1 – временная динамика последствий фокального повреждения мозга

Изменения морфологии, а именно плотности нейронов и развитие микроглиоза, оценивали в трёх областях ДГ и ВГ обоих полушарий - СА1, СА3 и зубчатая извилина (ЗИ) – на 3-и и 7-е сутки после ЧМТ. После ЧМТ количество нейронов в ЗИ ИГ снижалось уже на 3-и сутки. К 7-м суткам после ЧМТ данный процесс распространялся на ЗИ КГ (Рисунок 3, 4). Изменений количества нейронов в областях СА1 и СА3 после нанесения удара не было обнаружено (Рисунок 3).

Количество клеток микроглии не изменялось к 3-м суткам после ЧМТ, но уже значительно увеличивалось к 7-м суткам после ЧМТ в ДГ и ВГ обоих полушарий (Рисунок 5, 6). Таким образом, при использовании ЛГДУ модели ЧМТ мы показали, что повреждение коры приводит к постепенному нарастанию структурных изменений в гиппокампе, как в ипсилатеральном, так и контралатеральном по отношению к месту кортикального удара, а пролиферация микроглии следует за инициирующей потерей нейронов.

Состояние микроглии дополнительно оценивали путем измерения экспрессии генов фракталкина *Cx3cl1* и микроглиальных маркеров *Cx3cr1* и *Ncf1*. Уровень экспрессии гена *Cx3cl1* снижался только в ИДГ на 1-е сутки после ЧМТ по сравнению с ЛО животными.

Динамика изменений экспрессий генов *Cx3cr1* и *Ncf1* была схожа в ИГ – длительное повышение уровня их экспрессии со снижением до уровня ЛО животных к 14-му дню после ЧМТ (Рисунок 7). В КГ эффекты по данным генам были менее выражены – уровень экспрессии *Cx3cr1* был повышен в 1-е сутки после ЧМТ (Рисунок 7), а *Ncf1* – только на 7-е. Таким образом, полученные данные по уровню экспрессии генов микроглиальных маркеров подтверждают данные морфологии, показывая, что микроглия находится в активированном состоянии длительное время после ЧМТ.

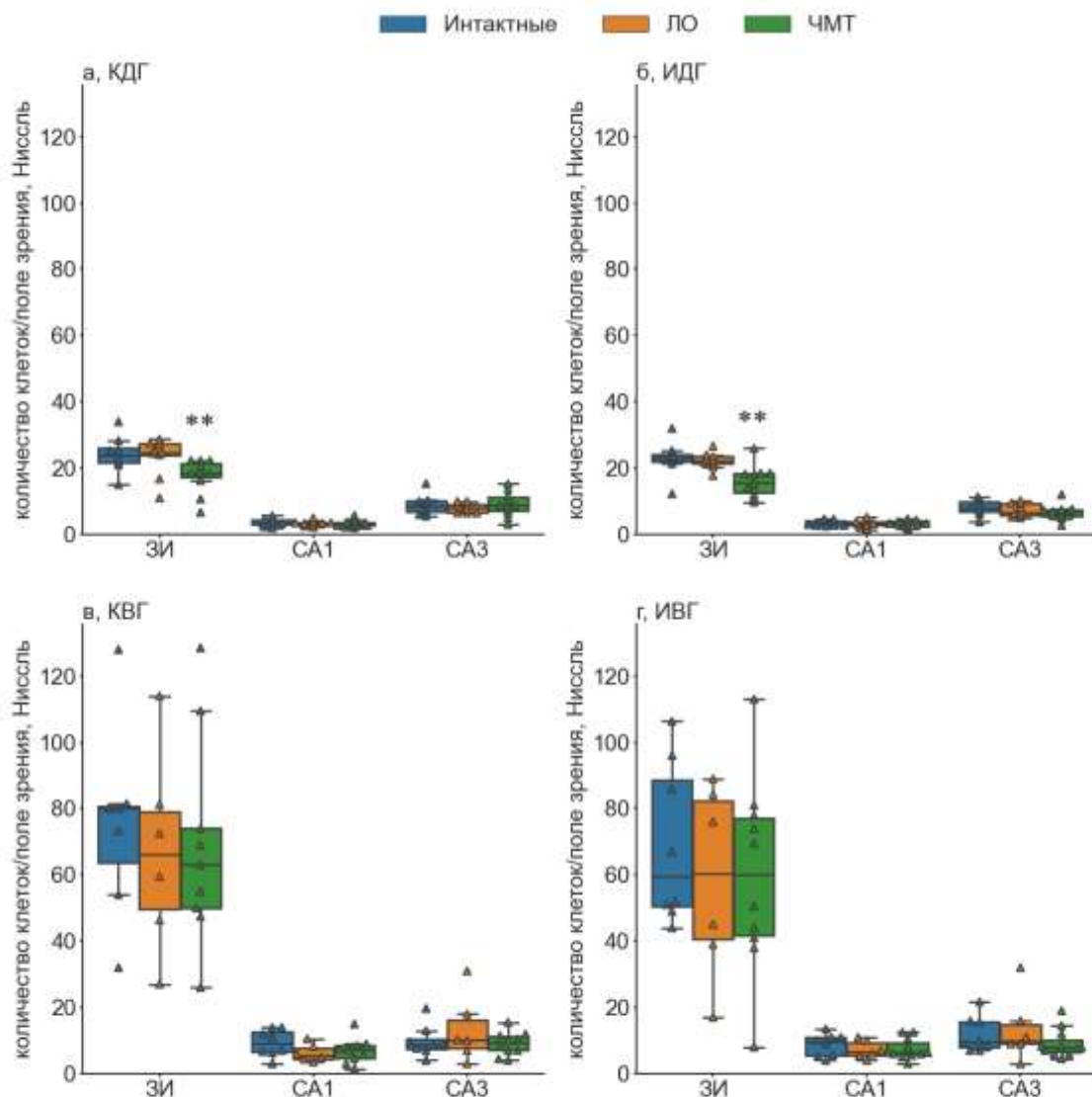


Рисунок 3. Окрасивание нейронов по Нисслю в разных отделах гиппокампа на 7-е сутки после ЧМТ. а, КДГ – контралатеральный дорсальный гиппокамп; б, ИДГ – ипсилатеральный дорсальный гиппокамп; в, КВГ – контралатеральный вентральный гиппокамп; г, ИВГ – ипсилатеральный вентральный гиппокамп. Области гиппокампа - ЗИ (зубчатая извилина), CA1, CA3. * и **, тенденция ($0.0125 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.0125$) различия ЧМТ vs ЛО, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения.

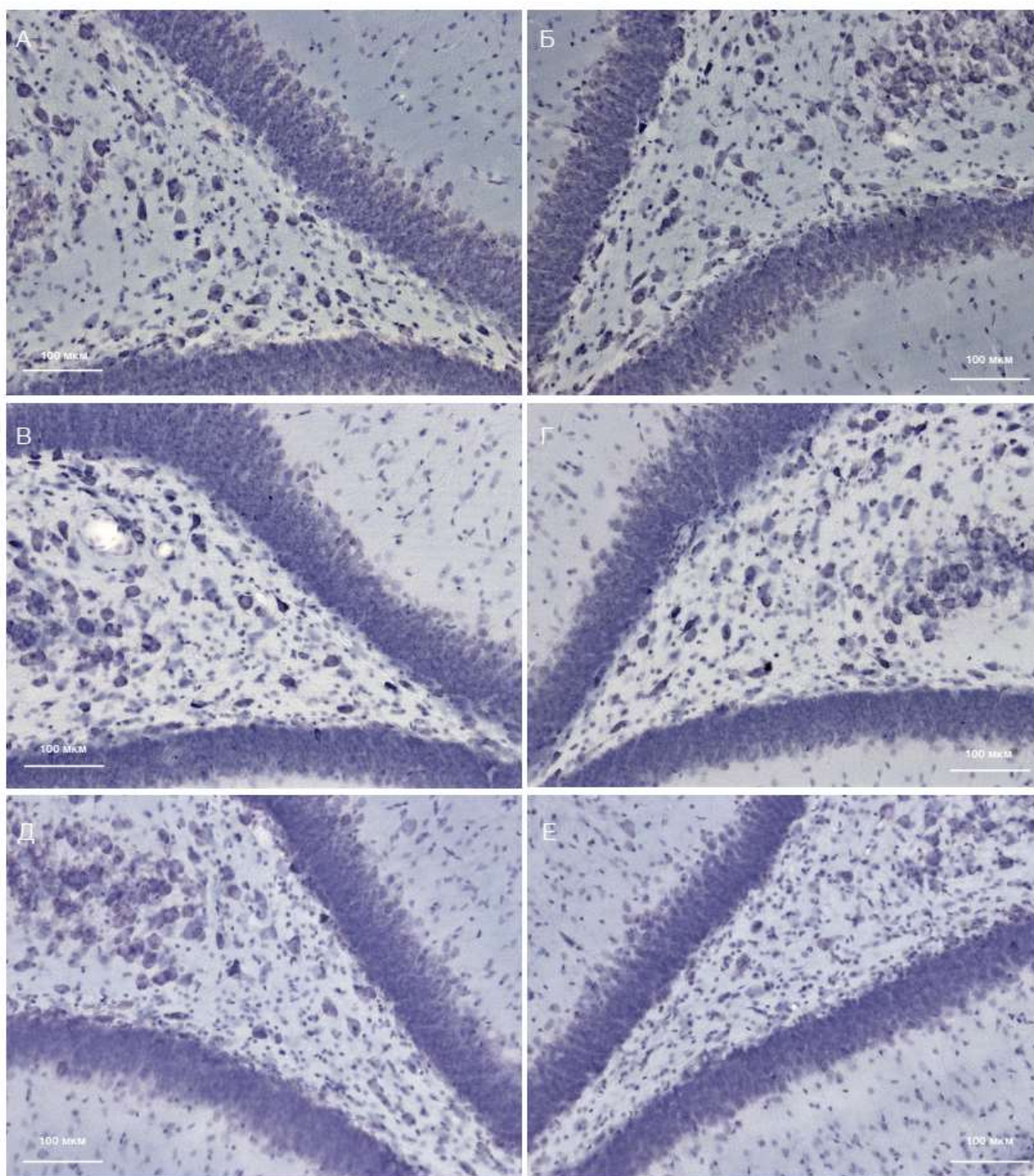


Рисунок 4. Гибель нейронов в гиппокампальной ЗИ, репрезентативные микрофотографии. А, Б—контрольное животное; В, Г— ЛО крыса на 7-есутки после краниотомии; Д, Е – гибель нейронов на 7-е сутки после ЧМТ. Микрофотографии ипсилатерального гиппокампа представлены с левой стороны (А, В, Д). Окрашиванию по Нисслю.

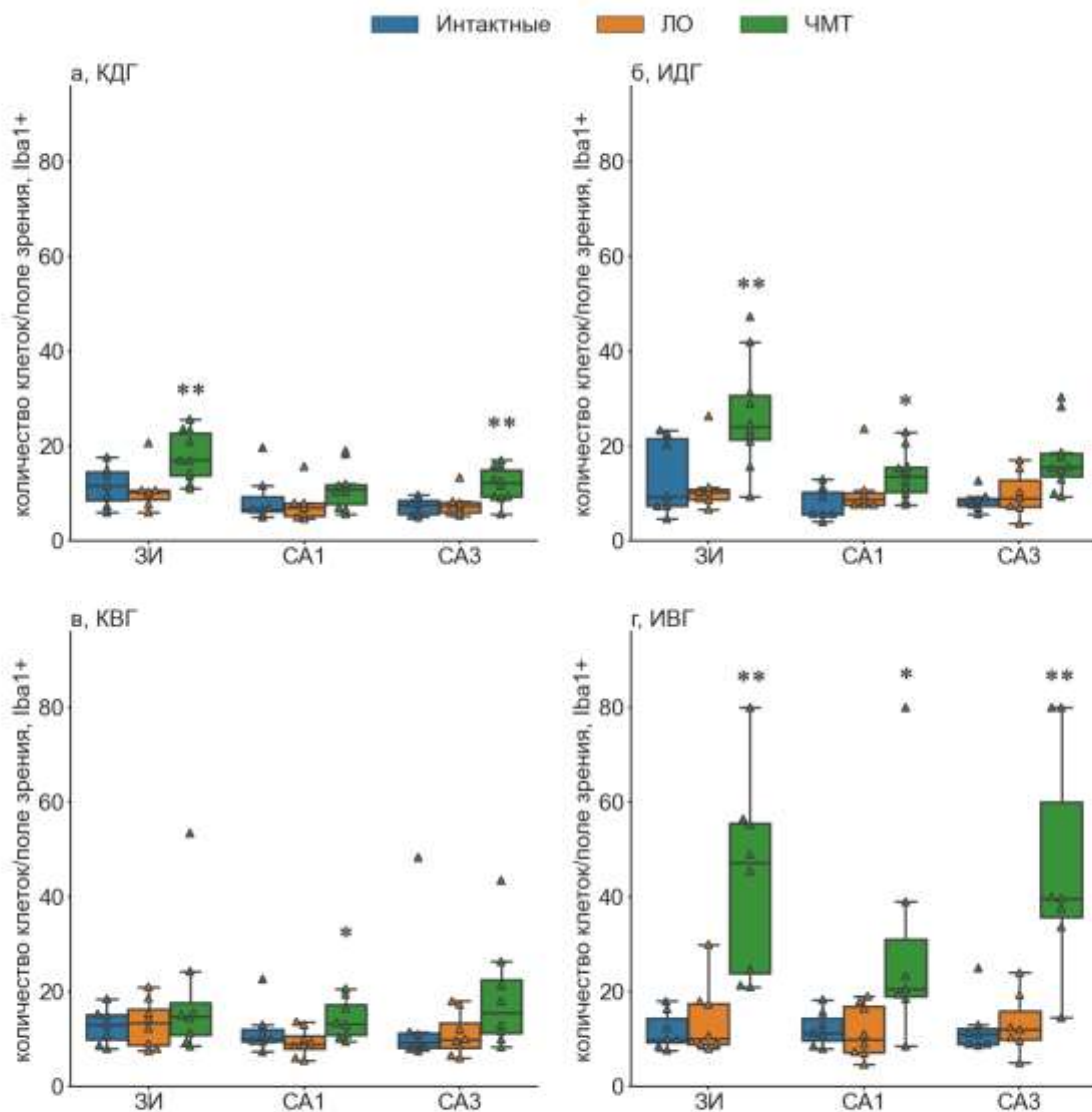


Рисунок 5. Иммуногистохимическое окрашивание на маркер микроглиальных клеток Iba1 в разных отделах гиппокампа на 7-е сутки после ЧМТ. а, КДГ – контралатеральный дорсальный гиппокамп; б, ИДГ – ипсилатеральный дорсальный гиппокамп; в, КВГ – контралатеральный вентральный гиппокамп; г, ИВГ – ипсилатеральный вентральный гиппокамп. Области гиппокампа - ЗИ (зубчатая извилина), CA1, CA3. * и **, тенденция ($0.0125 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.0125$) различия ЧМТ vs ЛО, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения.

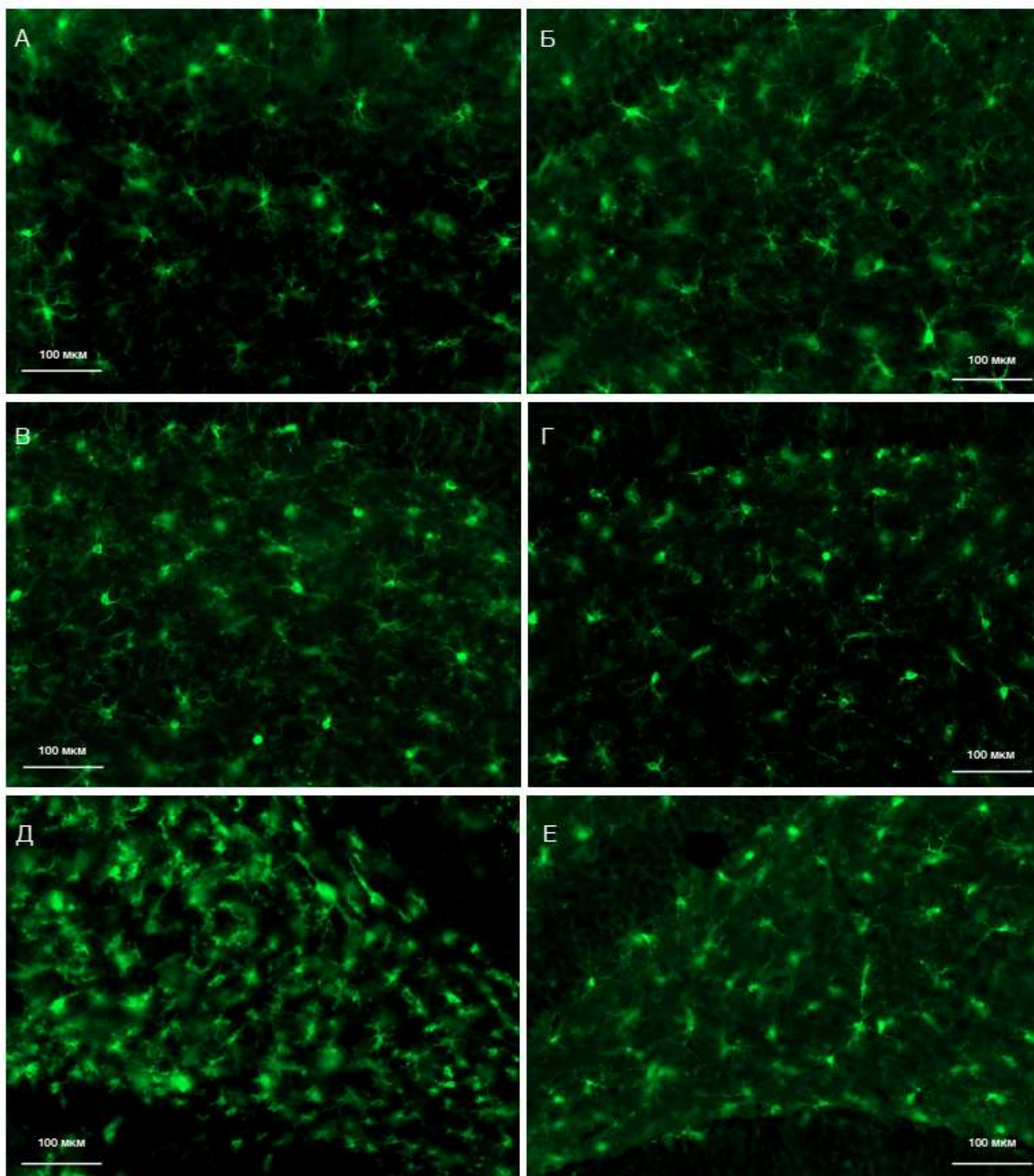


Рисунок 6. Активация микроглии в ЗИ, репрезентативные микрофотографии. А, Б – контрольное животное; В, Г – ЛО крыса на 7-е сутки после краниотомии; Д, Е – микроглиальная активация на 7-е сутки после ЧМТ. Микрофотографии ипсилатерального гиппокампа представлены с левой стороны (А, В, Д). Anti-Iba-1 окрашивание.

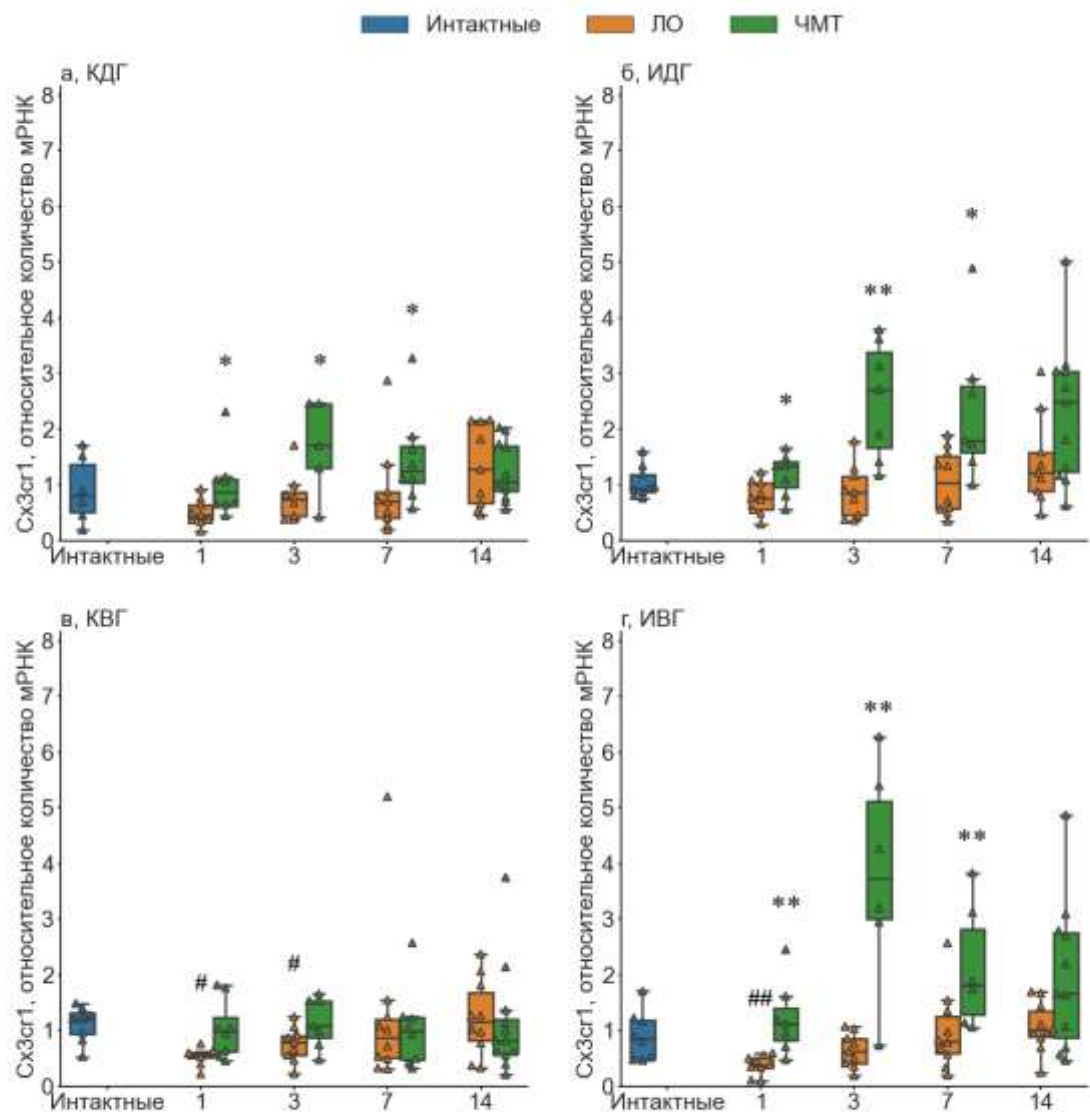


Рисунок 7. Временная динамика экспрессии мРНК *Sx3cr1* в различных отделах гиппокампа после ЧМТ (1-е, 3-и, 7-е и 14-е сутки). а, КДГ – контралатеральный дорсальный гиппокамп; б, ИДГ – ипсилатеральный дорсальный гиппокамп; в, КВГ – контралатеральный вентральный гиппокамп; г, ИВГ – ипсилатеральный вентральный гиппокамп. * и **, тенденция ($0.0125 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.0125$) различия ЧМТ vs ЛО, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения. # и ##, тенденция ($0.00625 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.00625$) различия ЛО vs Интактные, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения.

Кортикостерон является хорошо известным маркером стрессового ответа, в связи с чем его уровень измеряли во всех областях гиппокампа и в крови. Временные динамики изменений концентрации кортикостерона совпадали в исследуемых областях гиппокампа и в крови – рост концентрации на 3-и сутки после ЧМТ и возвращение к уровню ЛО животных к 7-му дню (Рисунок 8).

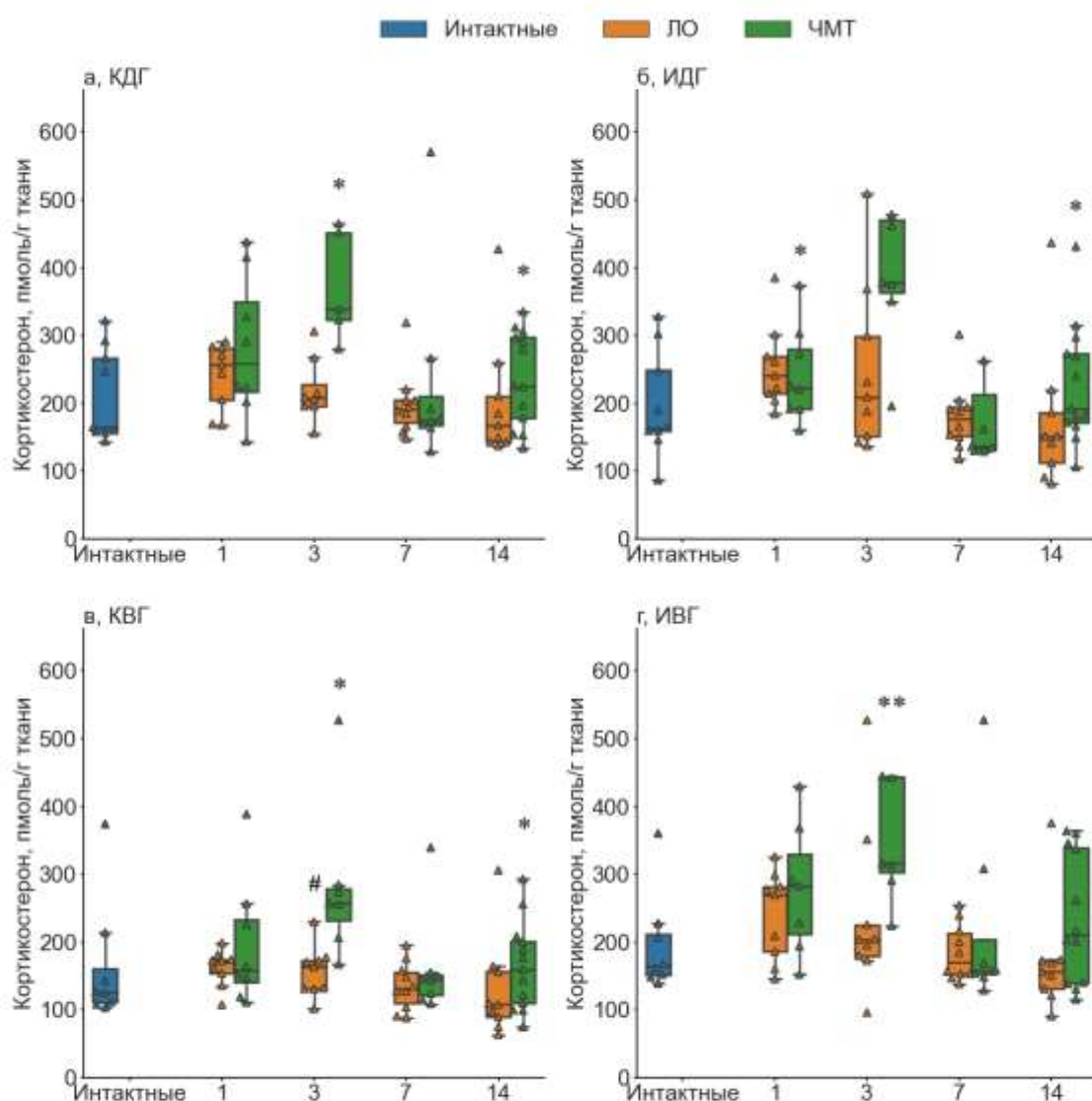


Рисунок 8. Изменения концентрации кортикостерона в различных отделах гиппокампа после ЧМТ (1-е, 3-и, 7-е и 14-е сутки). а, КДГ – контралатеральный дорсальный гиппокамп; б, ИДГ – ипсилатеральный дорсальный гиппокамп; в, КВГ – контралатеральный вентральный гиппокамп; г, ИВГ – ипсилатеральный вентральный гиппокамп. * и**, тенденция ($0.0125 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.0125$) различия ЧМТ vs

ЛО, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения.

Такой ответ кортикостерона может быть одним из факторов, усиливающих нейровоспаление на более поздних этапах после ЧМТ и индуцирующих отсроченную активацию микроглии в областях гиппокампа.

Травма мозга приводит к активации нейровоспалительных каскадов в гиппокампе и высвобождению провоспалительных цитокинов. Здесь мы подтвердили исследования других групп, а также расширили предыдущие данные, показав, что временная динамика цитокинового ответа различается не только в ИГ и КГ, но также зависит от септотемпорального градиента, отличаясь в ДГ и ВГ. ЧМТ привела к значительному усилению экспрессии генов *Il1b*, *Il6* и *Tnf* как в ИДГ и ИВГ, так и в КДГ, по сравнению с ЛО животными, с пиком ответа на 1-е сутки (Рисунок 9).

Более того, уровни экспрессии генов *Il1b* и *Tnf* в ипсилатеральном полушарии снижались до уровня ЛО только к 14-м суткам. Временная динамика изменений экспрессии гена *Il6* отличалась: снижение уровня *Il6* на 3-и сутки во всех частях гиппокампа и его повторное увеличение на 7-е сутки только в ИДГ (Рисунок 10).

Также были измерены концентрации белков IL-1 β и IL-6 во всех отделах гиппокампа. Концентрация белка IL-1 β значительно возрастала на 1-е сутки после травмы только в ИДГ и ИВГ (Рисунок 11), а уровень белка IL-6 в гиппокампе и концентрации IL-1 β , IL-6 и TNF α в сыворотке крови после ЧМТ оставались неизменными.

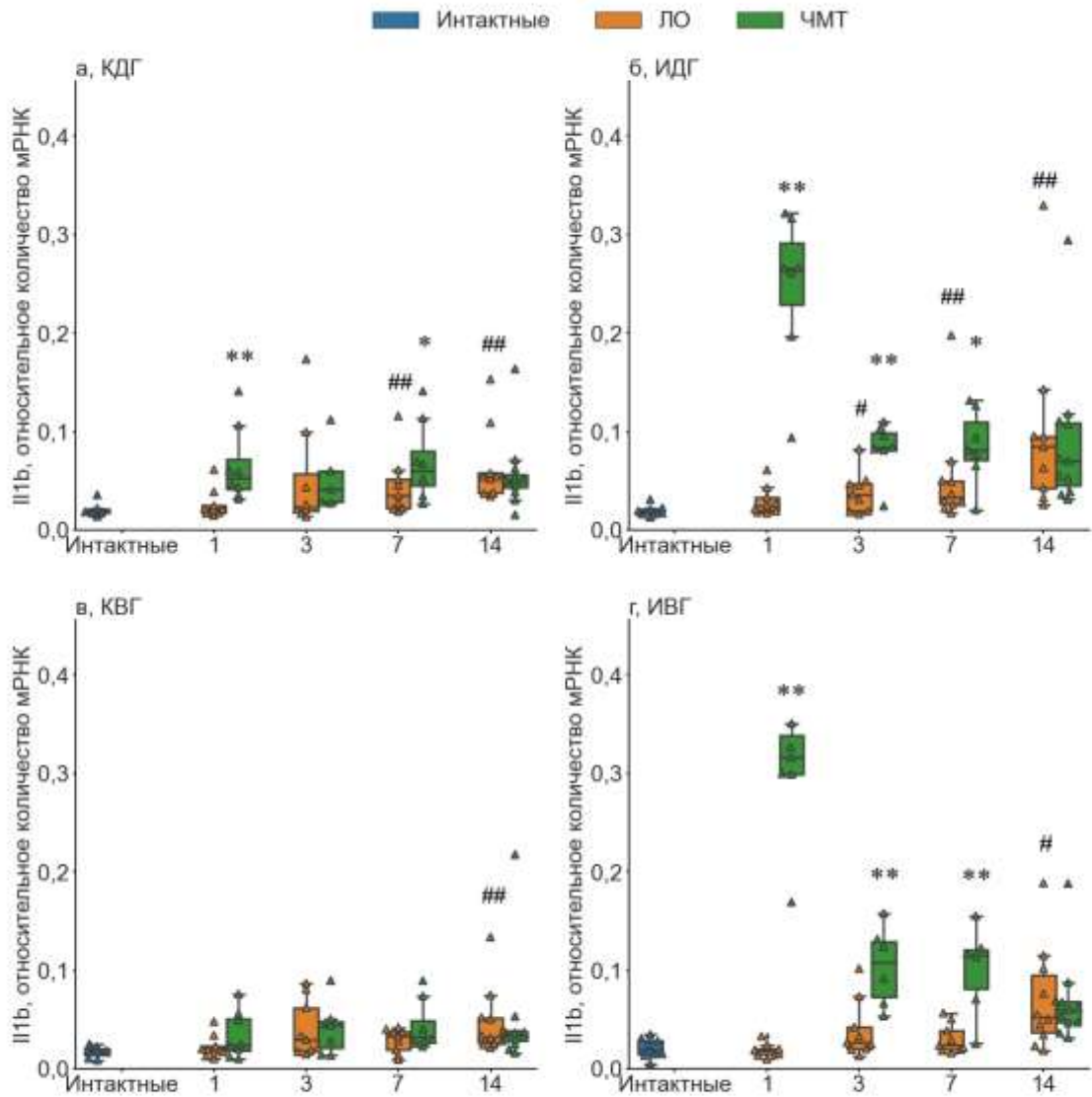


Рисунок 9. Временная динамика экспрессии мРНК *Il1b* в различных отделах гиппокампа после ЧМТ (1-е, 3-и, 7-е и 14-е сутки). а, КДГ – контралатеральный дорсальный гиппокамп; б, ИДГ – ипсилатеральный дорсальный гиппокамп; в, КВГ – контралатеральный вентральный гиппокамп; г, ИВГ – ипсилатеральный вентральный гиппокамп. * и **, тенденция ($0.0125 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.0125$) различия ЧМТ vs ЛО, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения. # и ##, тенденция ($0.00625 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.00625$) различия ЛО vs Интактные, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения.

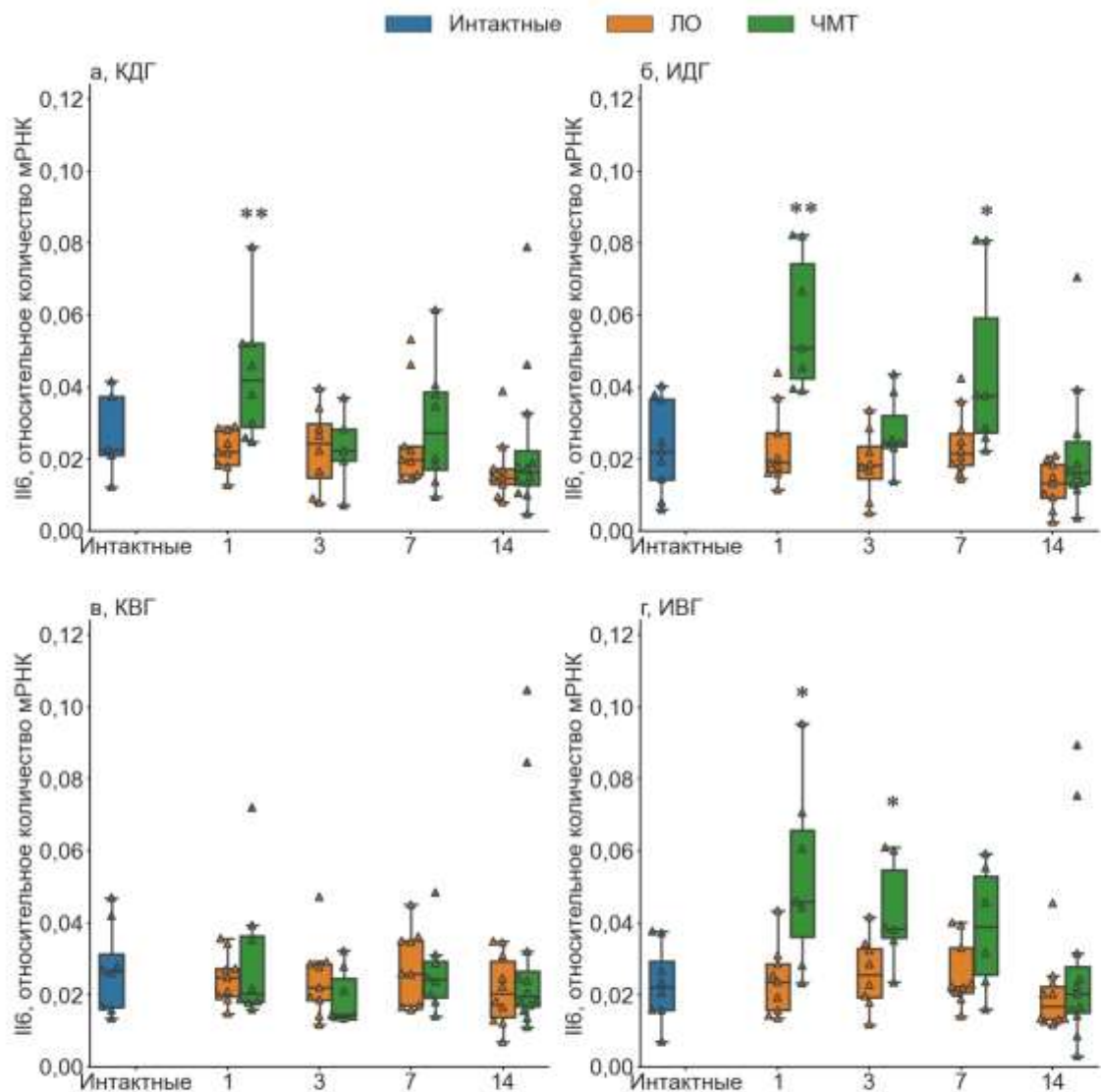


Рисунок 10. Временная динамика экспрессии мРНК *I6* в различных отделах гиппокампа после ЧМТ (1-е, 3-и, 7-е и 14-е сутки). а, КДГ – контралатеральный дорсальный гиппокамп; б, ИДГ – ипсилатеральный дорсальный гиппокамп; в, КВГ – контралатеральный вентральный гиппокамп; г, ИВГ – ипсилатеральный вентральный гиппокамп. * и **, тенденция ($0.0125 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.0125$) различия ЧМТ vs ЛО, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения.

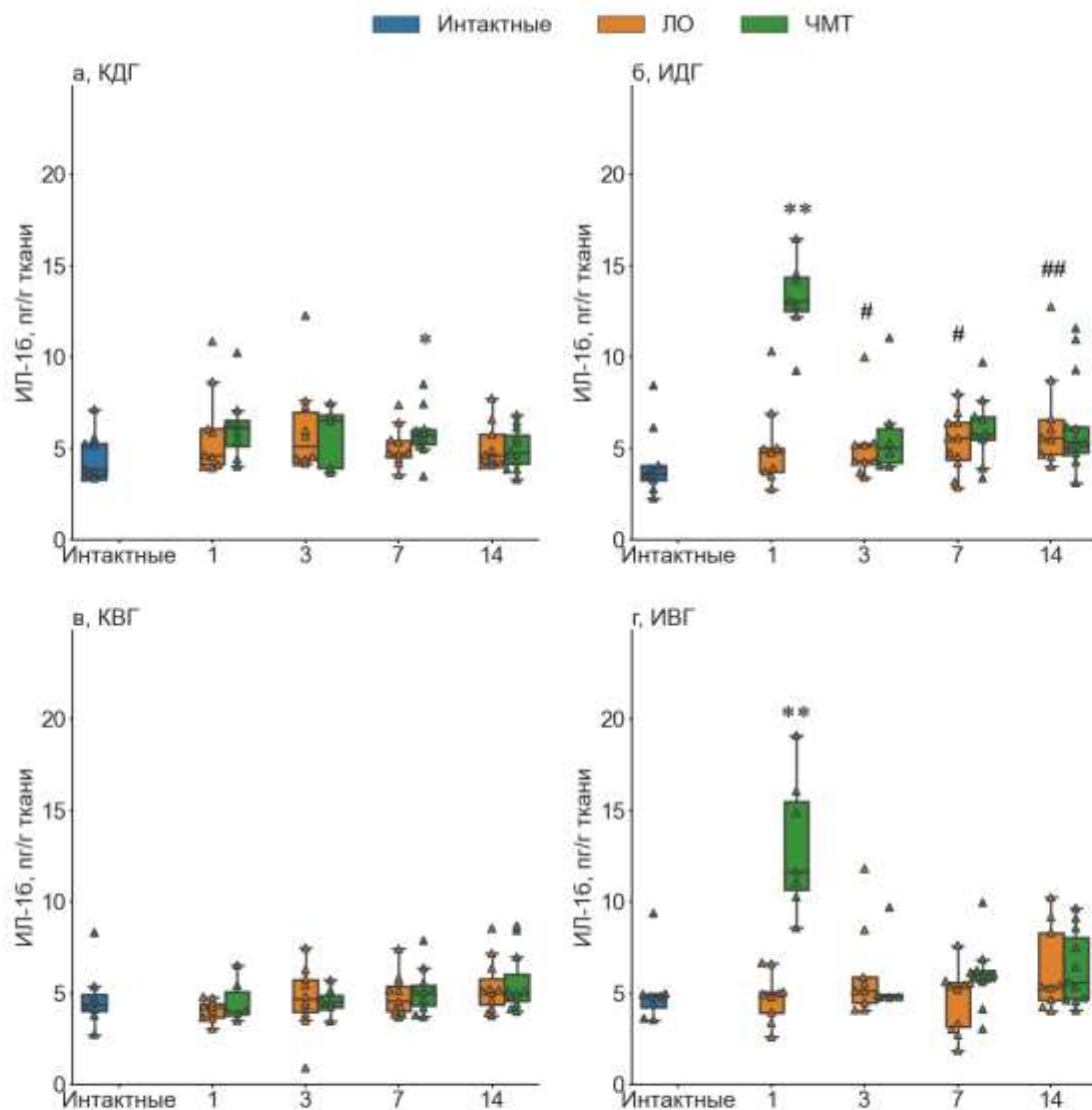


Рисунок 11. Изменения концентрации IL-1β в различных отделах гиппокампа после ЧМТ (1-е, 3-е, 7-е и 14-е сутки). а, КДГ – контралатеральный дорсальный гиппокамп; б, ИДГ – ипсилатеральный дорсальный гиппокамп; в, КВГ – контралатеральный вентральный гиппокамп; г, ИВГ – ипсилатеральный вентральный гиппокамп. * и **, тенденция ($0.0125 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.0125$) различия ЧМТ vs ЛО, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения. # и ##, тенденция ($0.00625 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.00625$) различия ЛО vs Интактные, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения.

Эксперимент 2 – влияние активации ГР на ЛПС-индуцированное нейровоспаление

В Эксперименте 2 мы оценивали прямое влияние агониста ГР Декс на гиппокампальную ткань по изменениям (1) уровней экспрессии генов, связанных с нейровоспалением (*Il1b*, *Tnf*, *Il6*, *Tgfb1*, *Ccl2*, *Cx3cl1*, *Cx3cr1*, *Ncf1*), и (2) морфологии микроглии в нормальных условиях и в условиях острого локального нейровоспаления, индуцированного введением ЛПС. Мы использовали метод внутригиппокампального введения, чтобы избежать системного влияния экспериментальных веществ. Внутригиппокампальная инъекция ФСБ оказала очень слабый локальный воспалительный эффект, который исчезал к 3-м суткам. Инъекция ЛПС запускала нейровоспалительный ответ в ДГ, который заключался в (1) достоверном увеличении уровней экспрессии *Il1b*, *Il6*, *Tnf*, *Tgfb1*, *Ccl2* (Рисунок 12) и *Ncf1*, а также (2) снижении количества клеток отростчатой микроглии и увеличении количества клеток различных активированных подтипов (амебоидного, гипертрофированного, палочковидного, симпластов). В ВГ были обнаружены преимущественно микроглиальные клетки с отростчатой морфологией после инъекции ЛПС. Суммируя эти данные, можно утверждать, что модель ЛПС-индуцированного нейровоспаления подходит в качестве модели локального нейровоспаления в ДГ.

Самостоятельное введение Декс оказало очень слабый провоспалительный эффект - были детектированы только тенденции к увеличению уровней экспрессии *Il1b*, *Il6* и *Ccl2* в ДГ (Рисунок 12), а также достоверное увеличение уровня экспрессии *Tnf* в ВГ. Однако Декс при совместном введении с ЛПС ослаблял усиление экспрессии некоторых цитокинов, индуцированное ЛПС. Достоверное снижение уровней экспрессии *Il6*, *Ccl2*, а также тенденцию к снижению экспрессии *Cx3cl1* наблюдали в ДГ после совместного введения Декс и ЛПС при сравнении с группой ЛПС (Рисунок 12). Активация ГР также оказала слабый провоспалительный эффект и на состояние микроглии в ДГ, но не в ВГ, где микроглия сохранила отростчатый фенотип, характеризующий состояние покоя. Введение Декс не предотвращало изменений морфологии микроглии, возникающих в результате ЛПС-индуцированного нейровоспаления в ДГ. В ВГ фенотип микроглиальных клеток соответствовал состоянию покоя.

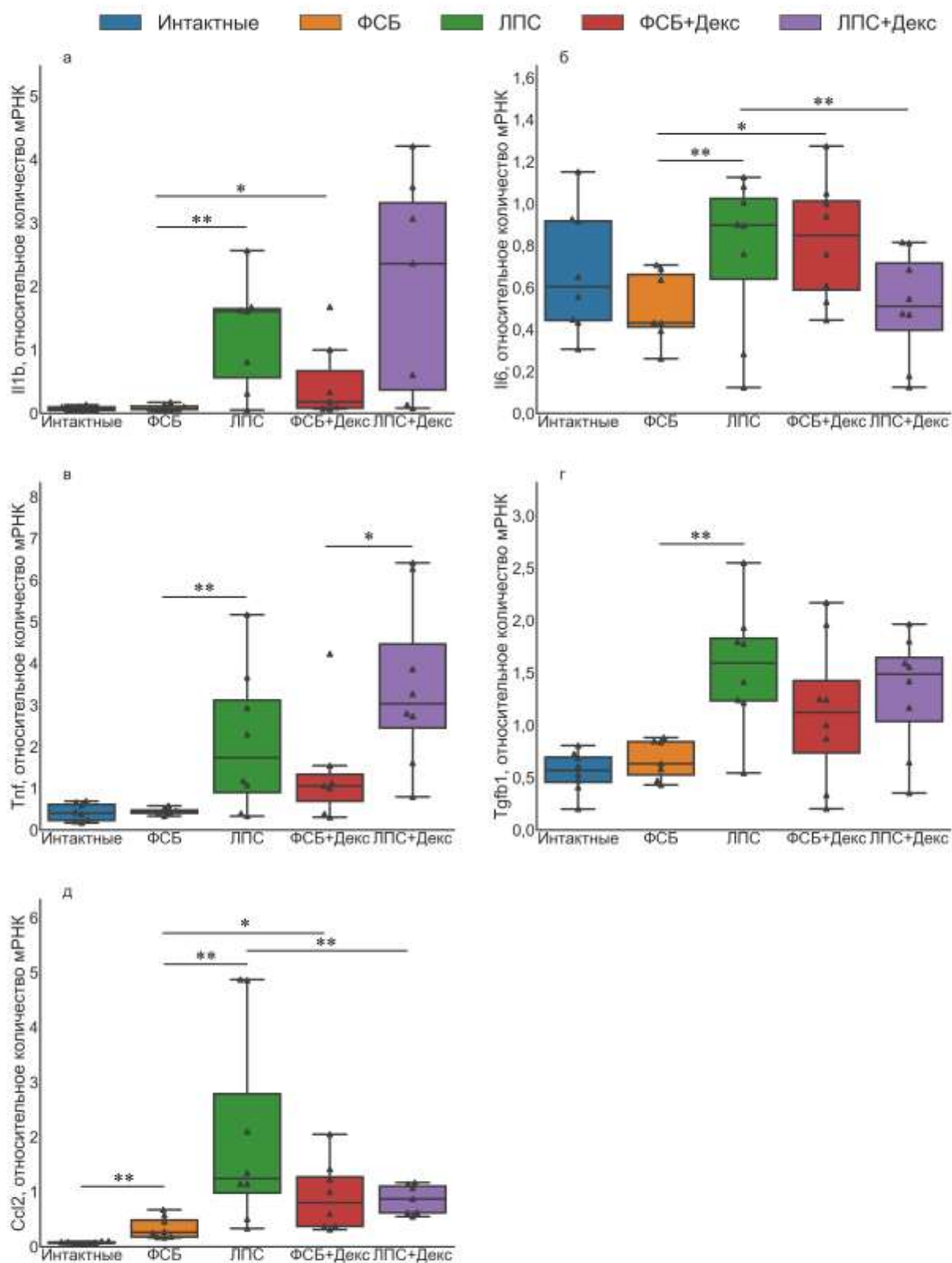


Рисунок 12. Экспрессия мРНК генов, ассоциированных с нейровоспалением, *Il1b* (а), *Il6* (б), *Tnf* (в), *Tgfb1* (г), и *Ccl2* (д) в ДГ после внутригиппокампальной инъекции ФСБ, ЛПС, Декс, ЛПС + Декс. n=8. * и **, тенденция ($0.01 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.01$) различия, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения.

Эксперимент 3 – влияние ингибирования ГР и МР на ЛПС-индуцированное нейровоспаление

В Эксперименте 3 мы оценивали прямое влияние антагониста ГР Миф и антагониста МР Спир на гиппокампальную ткань по изменениям (1) уровней экспрессии генов, связанных с нейровоспалением (*Il1b*, *Tnf*, *Il6*, *Tgfb1*, *Ccl2*, *Cx3cl1*, *Cx3cr1*, *Ncf1*), и (2) морфологии микроглии. Анализ эффектов инъекций ФСБ и ЛПС показал, что их влияние на экспрессию генов, ассоциированных с нейровоспалением, и морфологию микроглии были аналогичными предшествующему эксперименту. Введение ФСБ индуцировало значительное усиление уровней экспрессии *Tgfb1* в ДГ и ВГ и *Ccl2* в ДГ по сравнению с интактной группой (Рисунок 13). Как и в Эксперименте 2, инъекция ЛПС привела к значительному усилению уровней экспрессии *Il1b*, *Il6*, *Tnf*, *Tgfb1*, *Ccl2* (Рисунок 13), а также *Ncf1* по сравнению с группой животных, инъецированных ФСБ.

Самостоятельные инъекции ингибитора ГР Миф и ингибитора МР Спир снижали только экспрессию генов *Il1b* и *Tgfb1* в ДГ (Рисунок 13) на уровне тенденции и не оказывали влияния на относительную представленность других исследуемых генов как в ДГ, так и в ВГ. В условиях воспаления ингибирование ГР и МР имело очень слабый эффект. Мы обнаружили только тенденцию к снижению уровня экспрессии *Il6* в ДГ и ВГ после совместной инъекции Миф и ЛПС (Рисунок 13), а также *Ccl2* в ВГ после совместной инъекции Спир и ЛПС. Аналогично уровням экспрессии генов, Миф и Спир не приводили к изменению фенотипа клеток микроглии по сравнению с группой ФСБ. Ингибирование как ГР, так и МР во время действия ЛПС не влияло на морфологию микроглии, оставляя клетки в активированном состоянии.

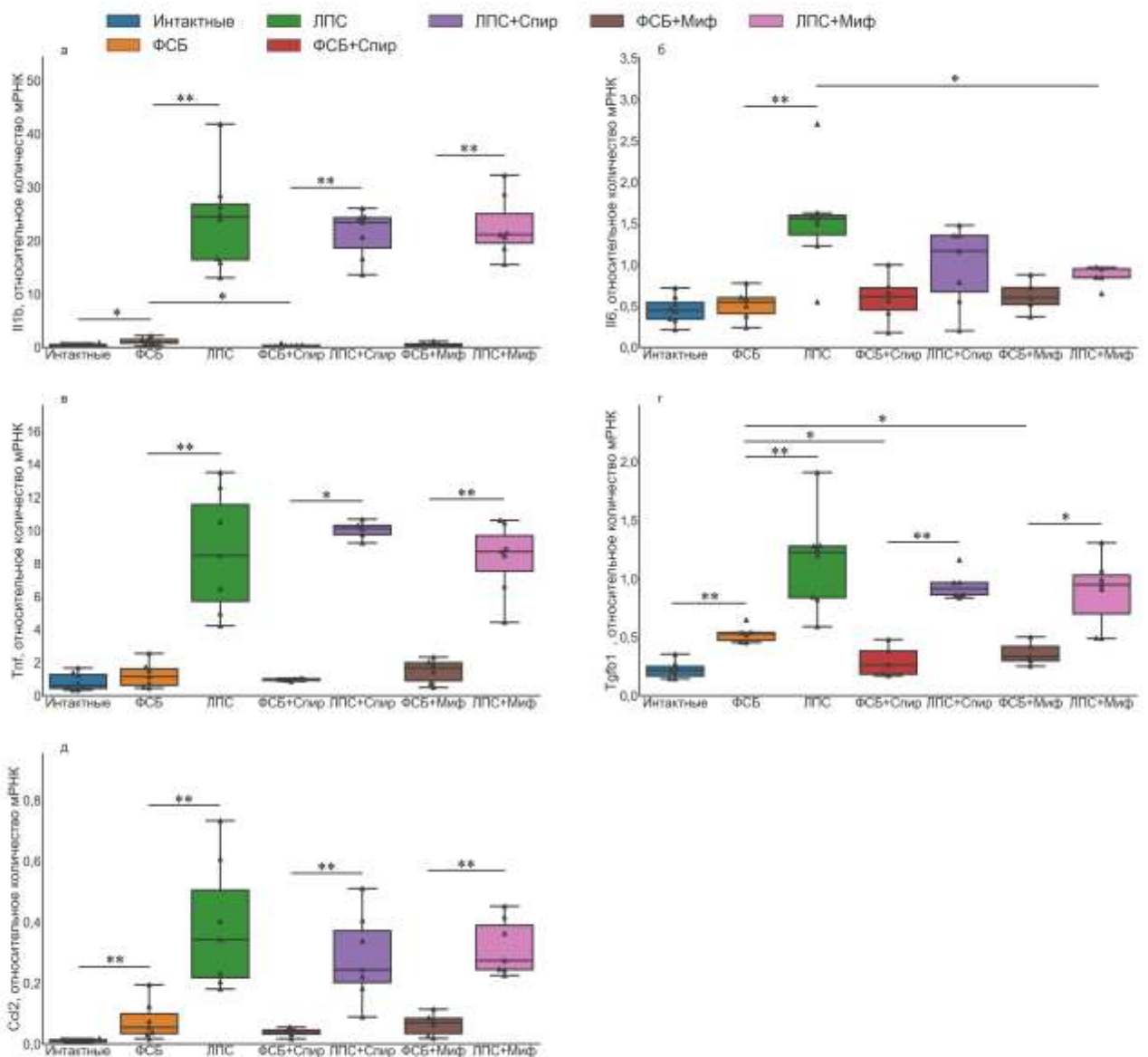


Рисунок 13. Экспрессия мРНКгенов, ассоциированных с нейровоспалением, *Il1b* (а), *Il6* (б), *Tnf* (в), *Tgfb1* (г), и *Ccl2* (д) в ДГ после внутригиппокампальной инъекции ФСБ, ЛПС, Спир, ЛПС + Спир, Миф, ЛПС + Миф. Группы Интактные и ЛПС, n=8; группы ФСБ, Спир + ЛПС и Миф + ЛПС, n=7; группы Спир и Миф, n=6. * и **, тенденция ($0.00625 \leq p < 0.05$) и достоверные ($p < 0.00625$) различия, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами показано, что ЧМТ, несмотря на локальный характер повреждения ткани мозга, приводит к отсроченной гибели нейронов в ЗИ ДГ. Это наблюдение является существенным

шагом к пониманию механизмов развития когнитивных расстройств, а возможно, и посттравматической эпилепсии. Хотя в данной работе мы не исследовали тип нейронов, которые дегенерируют в ЗИ после ЧМТ, практически все они играют важную роль в регуляции передачи информации из неокортекса в гиппокамп и контроле осцилляторной активности сетей гиппокампа. Можно предположить, что гибель этих нейронов является одним из важных событий, лежащих в основе нарушений когнитивных функций в отсроченном периоде после ЧМТ. Согласно нашим данным, другим важным патогенетическим звеном является развитие и распространение нейровоспаления вдоль дорсовентральной оси гиппокампа. По нашему предположению, ведущую роль в развитии этого нейровоспаления могло играть повышение уровня кортикостерона после стресса, индуцированного ЧМТ. Однако наши данные говорят о том, что острая реакция нейровоспаления в гиппокампе, как при ЧМТ, так и после ЛПС, не сопровождается подъемом кортикостерона и ингибирование ГР и МР не оказывает значимого влияния на течение нейровоспаления. Возможно, что подъем кортикостерона, который мы обнаружили на 3-ий день после ЧМТ в крови и всех отделах гиппокампа, выполняет роль фактора, поддерживающего нейровоспаление в гиппокампе и способствующего его распространению вдоль дорсовентральной оси гиппокампа, а также в контралатеральный гиппокамп. Однако прояснение роли этого фактора и других деталей патогенеза ЧМТ выходит за рамки нашей работы и требует дальнейших исследований.

5. ВЫВОДЫ

1. На 3-и сутки после черепно-мозговой травмы начинается гибель нейронов в дорсальном ипсилатеральном гиппокампе и распространяется в дорсальный контралатеральный гиппокамп к 7-м суткам. При этом микроглиоз возникает на всей протяженности дорсовентральной оси гиппокампа после гибели нейронов.
2. Уровни экспрессии генов основных провоспалительных цитокинов (*Il1b*, *Il6* и *Tnf*) возрастают в ипсилатеральном дорсальном, ипсилатеральном вентральном и контралатеральном дорсальном гиппокампах вплоть до 7-х суток после ЧМТ.
3. Воспалительный ответ после черепно-мозговой травмы не является генерализованным – в крови изменений концентраций основных провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF α не обнаруживается.
4. Стрессовый ответ после черепно-мозговой травмы сопровождается подъемом концентрации кортикостерона как локально (в гиппокампе), так и системно (в крови), на 3-и сутки после черепно-мозговой травмы. Значимых изменений уровней экспрессии

генов, ассоциированных с системой реакции на стресс (*Crh*, *Crhr1*, *Crhr2*, *Nr3c1*, *Nr3c2*), не было выявлено.

5. В условиях острого локального нейровоспаления дексаметазон вызывает достоверное снижение уровней экспрессии *Ib6*, *Ccl2*, а также тенденцию к снижению экспрессии *Cx3cl1*, что в данной ситуации характеризует его как противовоспалительный агент.
6. В условиях острого локального нейровоспаления, вызванного липополисахаридом, блокада глюкокортикоидного или минералокортикоидного рецепторов не оказывает значимого влияния на экспрессию основных провоспалительных цитокинов.
7. Введение модуляторов активности глюкокортикоидного и минералокортикоидного рецепторов (дексаметазона, мифепристона, спиронолактона) во время действия липополисахарида не влияет на морфологию микроглии в дорсальном гиппокампе, оставляя клетки в активированном состоянии. В вентральном гиппокампе фенотип микроглиальных клеток соответствует состоянию покоя.

Список публикаций по теме диссертации

1. Bolshakov A.P., Tret'yakova L.V., Kvichansky A.A., Gulyaeva N.V. Glucocorticoids: Dr. Jekyll and Mr. Hyde of Hippocampal Neuroinflammation // *Biochemistry (Moscow)*. - 2021. - V. 86.-№2.-P. 156-167.
2. Tret'yakova L.V., Kvichansky A.A., Bolshakov A.P., Gulyaeva N.V. Dexamethasone Modulates Lipopolysaccharide-Induced Expression of Proinflammatory Cytokines in Rat Hippocampus // *Neurochem. J.* - 2021. - T. 15. - № 3.-С. 302-307.
3. Komoltsev I.G., Tret'yakova L.V., Frankevich S.O., Shirobokova N.I., Volkova A.A., Butuzov A.V., Novikova M.R., Kvichansky A.A., Moiseeva Y.V., Onufriev M.V., Bolshakov A.P., Gulyaeva N.V. Neuroinflammatory Cytokine Response, Neuronal Death, and Microglial Proliferation in the Hippocampus of Rats during the Early Period after Lateral Fluid Percussion-Induced Traumatic Injury of the Neocortex // *Molecular Neurobiology*. - 2022. - V. 59. - P. 1151–1167.

Список тезисов для выступления на конференциях по теме диссертации

1. **Tret'yakova L.V., Volobueva M.N., Komoltsev I.G., Kvichansky A.A., Bolshakov A.P., Gulyaeva N.V.** Analysis of expression of proinflammatory cytokines in regions of rat hippocampus in

- early period after traumatic brain injury // International Summer School on Stress. – 2019. – P. 71.
2. **Третьякова Л.В., Квичанский А.А., Комольцев И.Г.** Анализ экспрессии провоспалительных цитокинов в гиппокампе крысы в раннем периоде после черепно-мозговой травмы // XXIII научная школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии. - 2019. - с. 37-38.
 3. **Третьякова Л.В., Квичанский А.А.** Анализ экспрессии мРНК генов, ассоциированных с нейровоспалением, при локальном введении дексаметазона в гиппокамп крысы // XXIV научная школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии. - 2020. - с. 111-114.
 4. **Третьякова Л.В.** Влияние интрагиппокампального введения бактериального липополисахарида и дексаметазона на процессы нейровоспаления // XXVIII Международной конференции студентов, аспирантов, молодых учёных «Ломоносов». – 2021.
 5. **Tret'yakova L.V., Kvichansky A.A.** The effect of inhibition of gluco- and mineralocorticoid receptors during lipopolysaccharide-induced neuroinflammation // 1st ESN Virtual Conference «Future perspectives for European neurochemistry – a young scientists conference». – 2021. – P. 60.
 6. **Tret'yakova L.V., Kvichansky A.A.** The effect of modulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors during lipopolysaccharide-induced neuroinflammation // FENS Regional Meeting. – 2021.
 7. **Третьякова Л.В., Квичанский А.А., Большаков А.П., Гуляева Н.В.** Экспрессия мРНК генов, ассоциированных с нейровоспалением, при введении в гиппокамп ингибиторов кортикостероидных рецепторов // XXV научная школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии. – 2021. - с. 301-303.