

ТРЕТЬЯКОВА ЛИЯ ВИКТОРОВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ДИСТАНТНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ
ГИППОКАМПА В РЕЗУЛЬТАТЕ ФОКАЛЬНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ
МОЗГА: КОРТИКОСТЕРОИДНАЯ СИСТЕМА И НЕЙРОВОСПАЛЕНИЕ**

1.5.5 – физиология человека и животных

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к.ф.-м.н. Большаков Алексей Петрович

Научный консультант:

д.б.н. проф. Гуляева Наталия Валерьевна

Оглавление

1.	Введение	4
1.1.	Актуальность проблемы	4
1.2.	Цели и задачи	5
1.3.	Научная новизна	6
1.4.	Теоретическая и практическая значимость	7
1.5.	Положения, выносимые на защиту	7
1.6.	Степень достоверности и апробация результатов	8
1.7.	Публикации	8
1.8.	Личный вклад автора	8
1.9.	Структура и объем диссертации	9
2.	Обзор литературы	10
2.1.	Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система (ось)	10
2.1.1.	Структура гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, основные эффекторные молекулы	10
2.1.2.	Мишени глюкокортикоидов – глюкокортикоидный и минералокортикоидный рецепторы	10
2.2.	Нейровоспаление	13
2.2.1.	Микроглия	13
2.2.2.	Провоспалительные цитокины	15
2.2.2.1.	IL-1 β	16
2.2.2.2.	IL-6	17
2.2.2.3.	TNF α	18
2.2.2.4.	CCL2	19
2.2.3.	Противовоспалительные цитокины	19
2.2.3.1.	TGF β	19
2.3.	Противовоспалительное действие глюкокортикоидов	20
2.4.	Провоспалительное действие глюкокортикоидов	23
2.4.1.	Эффекты глюкокортикоидов при остром нейровоспалении	25
2.4.2.	Эффекты глюкокортикоидов при хроническом нейровоспалении	26
2.5.	Черепно-мозговая травма как модель изучения фокального повреждения мозга	27
2.5.1.	Экспериментальные модели ЧМТ – моделирование фокального и диффузного повреждений	28
2.5.2.	Последствия ЧМТ, дистантное повреждение гиппокампа	32

3. Материалы и методы	36
3.1. Животные	36
3.2. Экспериментальные процедуры	36
3.2.1. Эксперимент 1, моделирование ЧМТ	36
3.2.2. Эксперимент 2 и 3, моделирование локального нейровоспаления в гиппокампе	37
3.3. Биохимический и молекулярно-генетический анализ	40
3.3.1. Подготовка ткани мозга для Эксперимента 1	40
3.3.2. Выделение РНК и обратная транскрипция	40
3.3.3. Количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) «в реальном времени»	40
3.3.4. Иммуноферментный анализ (ИФА)	41
3.4. Морфологический анализ	41
3.5. Исследование поведения	43
3.6. Статистика	44
4. Результаты	45
4.1. Эксперимент 1 - временная динамика последствий фокального повреждения мозга	45
4.1.1. Анализ морфологии гиппокампа после ЧМТ	45
4.1.2. Изменения уровня маркеров, ассоциированных со стресс-реактивностью, после ЧМТ	56
4.1.3. Временная динамика цитокинового ответа после ЧМТ	64
4.2. Эксперимент 2 - влияние активации ГР на ЛПС-индуцированное нейровоспаление	70
4.3. Эксперимент 3 - влияние ингибирования ГР и МР на ЛПС-индуцированное нейровоспаление	79
5. Обсуждение полученных результатов	88
5.1. Последствия фокального повреждения мозга	88
5.2. Влияние модуляции активности ГР и МР на ЛПС-индуцированное нейровоспаление	92
6. Заключение	95
7. Выводы	96
8. Список условных обозначений	97
9. Список использованной литературы	98
10. Список публикаций по теме диссертации	114

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1. Актуальность проблемы

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).

1.2. Цели и задачи

Цели 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.

1.3. 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.

1.4. 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 и 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.

1.5. 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.

1.6. 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).

1.7. 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.

1.8. 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.

1.9. 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. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система (ось)

2.1.1. Структура гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, основные эффекторные молекулы

ГГНО является основной системой стресс-реактивности организма, обеспечивающей эффективную адаптацию к условиям окружающей среды при воздействии физических или психосоциальных стрессогенных факторов. Эффекторными молекулами ГГН системы являются глюкокортикоиды (ГК), гормоны семейства кортикостероидов. Наиболее функционально активным ГК у человека является кортизол, а у грызунов – кортикостерон [Hall, 2016].

ГГНО образует связь между мозгом и эндокринной системой, а именно между гипоталамусом, передней долей гипофиза и надпочечниками. Паравентрикулярное ядро гипоталамуса содержит нейроэндокринные клетки, активируемые при стрессе и ответственные за синтез и высвобождение кортикотропин-рилизинг гормона (КРГ), распознаваемого рецепторами передней долей гипофиза. КРГ стимулирует секрецию адренкортикотропного гормона (АКТГ) из гипофиза в кровь. АКТГ, в свою очередь, транспортируется кровью к надпочечникам, где запускает синтез ГК в коре надпочечников и их выход в кровь. Кортизол (кортикостерон), вырабатываемый корой надпочечников, ингибирует нейроэндокринную активность, как гипоталамуса, так и гипофиза, что снижает синтез КРГ и АКТГ и, в свою очередь, приводит к снижению продукции ГК. Такая система отрицательных обратных связей позволяет подавлять или завершать адаптационный ответ, индуцированный стрессорными факторами [Hall, 2016].

2.1.2. Мишени ГК – ГР и МР

ГК осуществляют свои физиологические функции посредством двух типов рецепторов - ГР и МР. Эти рецепторы принадлежат к подсемейству 3 ядерных рецепторов группы С, NR3C. ГР кодируется геном *Nr3c1*, а МР – геном *Nr3c2*. У ГР существует две изоформы – активная (ГР α) и неактивная (ГР β).

Ответ клеток на ГК зависит от баланса между двумя изоформами и может играть важную роль в формировании клеточного ответа на подъём уровня ГК. Так, связывание кортикостерона с ГР не обязательно приводит к активации ГР, или экспрессия изоформы ГР β может быть повышена в ответ на действие провоспалительных цитокинов и приводить к сниженной чувствительности к ГК, лежащей в основе феномена так называемой глюкокортикоидной резистентности [Silverman, Sternberg, 2012]. Также, шапероны Hsp70 и Hsp90, связанные с ГР, либо инактивируют, либо активируют ГР [Baker и др., 2019; Kirschke и др., 2014].

ГК, помимо связывания с ГР, взаимодействуют с МР с более высокой аффинностью. Изоформы и транскрипционные варианты МР не вполне изучены, однако у человека и крысы было обнаружено 2 сплайс-варианта МР [Bloem, Guo, Pratt, 1995]. Функциональная значимость этих транскриптов МР и их экспрессии в различных частях мозга до сих пор не ясны. МР тоже может связывать кортикостерон, причем аффинность кортикостерона к МР в несколько раз выше, чем к ГР [Young, 2003]. Представленность этих рецепторов в структурах мозга различается. Изначально МР был обнаружен преимущественно в лимбических зонах, в частности в гиппокампе, однако последующие исследования по секвенированию РНК единичных клеток показали, что большинство клеток во всех областях мозга содержат мРНК МР [Saunders и др., 2018; Tasic и др., 2018; Zeisel и др., 2018]. Единственным исключением является микроглия, которая не экспрессирует МР. В отличие от МР, ГР обильно представлен во всём мозге, во всех областях и исследованных типах клеток.

ГР взаимодействуют как с эндогенными ГК (кортикостерон/кортизол), так и с синтетическими аналогами ГК (дексаметазон, преднизолон, и др.). ГР локализован в цитоплазме в виде мономера в комплексе с белками теплового шока. Связывание лиганда с ГР запускает конформационные изменения в рецепторе, приводящие к формированию гомодимерного комплекса и его транслокации из цитоплазмы в ядро. В ядре активированный ГР связывается с элементами ответа на ГК (glucocorticoid response elements, GREs) и негативными GREs, обладающими палиндромной структурой. Субъединицы гомодимерного комплекса обеспечивают высокую степень связывания димера ГР. ГР, связанные с ДНК, запускают сборку транскрипционных регуляторных комплексов, выступающих в роли ко-активаторов или ко-репрессоров транскрипции [Krauss, 2003]. Активация МР стимулирует схожие механизмы: после связывания с агонистом формируются белковые комплексы, которые при попадании в ядро взаимодействуют с элементами ответа на гормоны (hormone response elements, HREs) и регулируют экспрессию генов. Индуцированный стрессом подъём уровня кортикостерона приводил к активации МР и ГР и накоплению этих рецепторов в ядре клеток

мозга стрессированных животных (после 30 минут пребывания на приподнятой платформе) [Caudal, Jay, Bill, 2014]. Важно, что время накопления ГР и МР в ядре после острого стресса было неодинаково в различных областях мозга: быстрое (в течение 10 минут) накопление МР наблюдалось в префронтальной коре, в этот период ГР транслоцировались в ядра клеток дорсального гиппокампа. Отсроченный (через 1 ч) подъём уровня МР наблюдался в ДГ и ВГ, в то время как ГР оставался на высоком уровне в ядрах ДГ и накапливался во фронтальной коре. Важно, что уровень кортикостерона в крови оставался высоким в течение 1 ч [Caudal, Jay, Bill, 2014]. На основе этих данных можно сделать несколько важных выводов. Во-первых, транслокация МР и ГР в ядро не повторяет в точности динамику уровня кортикостерона в крови, а зависит от некоторых дополнительных факторов, таких как локальная концентрация кортикостерона и модификации МР и ГР. Во-вторых, механизмы, регулирующие уровень активации МР и ГР, зависят от структуры мозга [Piskunov и др., 2016], а, следовательно, баланс между про- и противовоспалительной активностью ГК также может варьировать в зависимости от структуры. В-третьих, стресс индуцирует долговременные изменения в активности как МР, так и ГР, и это затрудняет прогнозирование локального паттерна экспрессии генов после стресса.

Обнаружена мембранная форма МР, опосредующая быстрые негеномные эффекты [Karst, Derijk, Kloet, 2007]. Впервые такие рецепторы были найдены в пирамидных нейронах гиппокампа. Позже было показано, что кратковременная активация МР альдостероном усиливает долговременную потенциацию в ВГ, но не в ДГ [Maggio, Segal, 2012]. До сих пор не ясно, присутствуют ли мембранные МР в других типах клеток, кроме нейронов, и могут ли они участвовать в регуляции нейровоспаления.

Физиологически важно, что ГК секретируются неравномерно, формируя ультрадианный ритм. У крыс наблюдается приблизительно часовой цикл выброса кортикостерона, регулируемый активацией или ингибированием ГГН оси. Сигнальная трансдукция в ответ на пики выброса кортикостерона зависит от динамического взаимодействия с ГР и МР [Lightman и др., 2008]. Считается, что эффекты низких базальных концентраций эндогенных ГК опосредованы МР, обладающих более высокой аффинностью. Низкоаффинные ГР играют ключевую роль при высоких концентрациях эндогенных ГК (при стрессе или дневных пиках выброса) [Pariante, Lightman, 2008]. По-видимому, оптимальная функция ГК реализуется при их средних концентрациях, в то время как гипер- и гипосекреция приводит к негативным последствиям [Kloet De и др., 1998].

Типичным клиническим примером гиперсекреции ГК, приводящим к различным патологическим проявлениям, является синдром Кушинга [Sharma, Nieman, 2011]. Синдром Кушинга часто ассоциирован с психопатологией, причем спектр наблюдаемых у пациентов расстройств поведения охватывает патологии от тяжелой депрессии до мании [Pereira, Tiemensma, Romijn, 2010]. Важно, что длительный подъем уровня ГК может вызывать сниженную чувствительность или резистентность рецепторов к ГК [Rodriguez и др., 2016]. В общем и целом, глюкокортикоидная резистентность может быть вызвана изменениями на различных уровнях сигнального каскада ГК: нарушенная экспрессия ГР, нарушенное связывание ГК с их рецептором, нарушенная транслокация в ядро, нарушенная активность кофакторов [Vandewalle и др., 2018]. Поскольку доказанным эффектом ГК является подавление воспаления, развитие глюкокортикоидной резистентности может приводить к усилению провоспалительного ответа.

Прежде чем переходить к подробному рассмотрению про- и противовоспалительных эффектов ГК, рассмотрим основных участников нейровоспаления.

2.2. Нейровоспаление

Нейровоспаление – это комплексный ответ нервной системы на повреждение или чужеродные агенты, который включает в себя следующие клеточные и молекулярные элементы: (а) изменения формы и паттернов экспрессии генов микроглии и астроцитов; (б) активацию синтеза цитокинов (IL-1 β , IL-6, CCL2, TNF α) и продукции других паракринных воспалительных медиаторов (простагландинов, активных форм азота и кислорода); (в) привлечение клеток иммунной системы из периферического кровообращения в результате измененного функционирования ГЭБ. Нейровоспалительная реакция может запускаться различными внутренними и внешними патологическими стимулами, такими как травмы, инфекции, токсические вещества и т.д., хотя ограниченное и контролируемое локальное нейровоспаление важно для оптимальной нейропластичности, включая нормальное протекание нейрогенеза и функционирование синапсов [Estes, McAllister, 2014].

2.2.1. Микроглия

Микроглиальные клетки являются резидентными макрофагами ЦНС, принадлежат к глиальной системе и широко распределены по головному и спинному мозгу. Адекватное

функционирование клеток микроглии является одним из ключевых факторов для гомеостаза ЦНС как в норме, так и при патологии [Ginhoux и др., 2013]. В качестве клеток иммунной системы мозга микроглия быстро распознает признаки патогенной инвазии или разрушения ткани, активируя секрецию специфических белков (цитокинов, хемокинов, простагландинов, активных форм кислорода), которые запускают воспалительную реакцию. Микроглиальные клетки выполняют функции тканевых макрофагов - очищают ЦНС от разрушенных и ненужных нейронов и синапсов, инфекционных агентов, бляшек амилоида и пр. [Gehrmann, Matsumoto, Kreutzberg, 1995]. Микроглия также смягчает степень повреждения ЦНС и участвует в процессах восстановления ткани мозга. В то же время, нарушение регуляции активации микроглии и воспаление, индуцированное микроглией, наблюдается практически при всех патологиях мозга [Helmut и др., 2011; Kingwell, 2012; Perry, Nicoll, Holmes, 2010]).

На основе гистологических данных выделяют несколько основных морфологических типов микроглии [Savage, Garaschuk, Verkhratsky, 2019]. Отростчатый фенотип характерен для микроглиальных клеток в состоянии покоя, отличается наличием длинных тонких отростков и маленькой округлой сомы, а также отсутствием фагоцитоза. Амебоидный фенотип микроглии морфологически и функционально очень схож с макрофагами (характерны отсутствие отростков и способность к амебоидным движениям и фагоцитозу). Известно, что амебоидная микроглия экспрессирует в большей степени гены, ассоциированные с ходом клеточного цикла, миграцией и фагоцитозом; отростчатая микроглия в большей степени экспрессирует гены, ассоциированные с созреванием нейронов, синаптической трансмиссией и презентацией антигенов [Parakalan и др., 2012]. Гипертрофированный фенотип представляет собой активированные клетки микроглии, с увеличенной сомой, короткими и толстыми отростками и со способностью к фагоцитозу. Поэтому данный фенотип всегда встречается в областях мозга, в которых имеются патологические процессы. Ещё выделяют палочковидный фенотип микроглии, который отличается удлинённой сомой и маленьким количеством радиальных отростков. Палочковидные клетки обычно располагаются рядом с нейрональными элементами, часто обнаруживаются в местах патологий, но их функция до конца не ясна.

Микроглия имеет ряд отличительных характеристик – она экспрессирует специфические транскрипционные факторы, а также использует сигнальную систему, опосредованную фракталкином, для коммуникации с нейронами. Среди характерных транскрипционных факторов можно выделить *Ncf1* и *Sall1*. Также типичным маркером микроглиальных клеток является Ca-связывающий белок *Iba1* – он свободно распределен по цитоплазме микроглиальных клеток, что делает иммуногистохимическую окраску на этот белок очень удобным инструментом для исследования морфологии микроглии. Что касается

фракталкиновой системы, то микроглия – это единственные клетки в ЦНС, которые экспрессируют рецептор (Cx3cr1) к сигнальному белку фракталкину (Cx3cl1), который экспрессируется только нейронами. Существуют некоторые данные, которые говорят о том, что фракталкин может выступать в качестве противовоспалительного агента, однако, его участие в процессах нейровоспаления при различных патологиях ЦНС очень мало исследовано.

Микроглиальные клетки являются одним из основных источников различных молекул, выделяющихся при воспалительной реакции. Было показано, что микроглия является источником цитокинов и реактивных форм кислорода, включая TNF α , CCL2, IL-1 β , и др. [Hanisch, 2002]. Необходимо отметить, что источниками цитокинов также являются астроциты, клетки олигодендроцитарного ряда и клетки сосудов, однако, исследовать вклад каждой из этих клеточных субпопуляций в развитие нейровоспалительного ответа при различных патологиях является сложной и дорогостоящей задачей. Поэтому для описания течения нейровоспалительного ответа часто используют набор из нескольких упомянутых цитокинов.

2.2.2. Провоспалительные цитокины

Важными участниками нейровоспалительного ответа являются цитокины, белковые молекулы, продуцируемые в основном иммунными клетками (моноцитами, макрофагами и лимфоцитами), а также микроглией, нейронами и астроцитами. Цитокины принимают участие в различных процессах: воспалении, инфекции, восстановлении поврежденных тканей и гомеостаза [Nathan, 2002], а также в нормальном развитии когнитивных функций, в частности памяти, у лабораторных животных [Goshen и др., 2007].

На основании их тканевых эффектов выделяют про- и противовоспалительные цитокины, которые запускают и ингибируют воспалительные ответы, соответственно. Наиболее исследованными провоспалительными цитокинами являются интерлейкин-1 β (IL-1 β), интерлейкин-6 (IL-6), моноцитарный хемоаттрактантный белок (MCP-1, CCL2) и фактор некроза опухоли α (TNF α), наиболее известными противовоспалительными цитокинами – IL-4, IL-10, IL-1RA и трансформирующий ростовой фактор (TGF β 1).

При нормальных условиях концентрации цитокинов в ЦНС поддерживаются на низких уровнях. При патологических условиях, сопровождающихся изменениями микроокружения в ЦНС, вызванных травмой, инфекцией или ишемизацией, синтез цитокинов глиальными клетками многократно усиливается [Sheng и др., 2011; Páv и др., 2008].

2.2.2.1. IL-1 β

IL-1 β – провоспалительный цитокин, относящийся к семейству цитокинов IL-1. Данный белок участвует в регуляции воспалительных (инфекционных и асептических) и клеточных процессов (пролиферация, дифференцировка и апоптоз). IL-1 β продуцируется тканевыми макрофагами, моноцитами, дендритными клетками, а также В-лимфоцитами, НК-клетками и эпителиальными клетками, а в мозге - микроглией. Данный цитокин усиливает экспрессию молекул адгезии на эндотелиальных клетках, что обеспечивает миграцию (диапедез) иммунокомпетентных клеток из кровеносного русла к месту инфекции. Соответственно, при патологиях ЦНС IL-1 β активно вовлечен в процессы развития воспаления, а также восстановления ткани после поражения [Hewett и др., 2012]. Например, было показано, что у пациентов на 7-е сутки после ЧМТ уровень IL-1 β в крови повышен [Sun и др., 2019].

IL-1 β синтезируется в форме белка - предшественника про-IL-1 β в результате стимуляции клеток врожденного иммунитета от Toll-подобных рецепторов (TLRs) или RIG-подобных рецепторов (RLRs), например, связывание ЛПС с TLR4 на макрофагах и дендритных клетках приводит к запуску внутриклеточного сигнального каскада, который заканчивается активацией транскрипционного фактора NF- κ B [Matzinger, 2012]. Для осуществления своих функций про-IL-1 β должен быть переведен в свою активную форму, что осуществляет фермент каспаза-1 (интерлейкин-1-конвертирующий фермент). Таким образом, для секреции активированного IL-1 β необходимы эти два шага. В особых случаях, например, при сильном нейтрофильном воспалении, IL-1 β может быть процессирован другими протеазами [Contassot, Beer, French, 2012; Sahoo и др., 2011].

Banks и соавт. прямо показали возможность транспорта IL-1 β из крови в мозг через ГЭБ [Banks и др., 1991]. Транспорт IL-1 β через ГЭБ осложнен его гидрофильностью и достаточно высокой молекулярной массой и его механизмы остаются неизученными [Banks, 2015; Bluthe, 2005].

IL-1 β осуществляет свои функции посредством связывания с IL рецептором типа 1 (IL-1RI). С помощью гибридизации *in situ* было обнаружено, что IL-1RI экспрессируется преимущественно в структурах, связанных с ГЭБ, а именно в менингеальных оболочках, сосудистом сплетении и эндотелии сосудов [Ericsson и др., 1995]. Также было показано, что рецепторы к семейству IL-1 высоко сконцентрированы в гранулярных клетках ЗИ [Van и др., 1991; Farrar и др., 1987], что может быть важным фактором участия нейровоспаления в развитии дистантного повреждения гиппокампа.

Помимо IL-1 β с рецептором IL-1RI взаимодействуют другие представители семейства IL-1 – IL-1 α и IL-1 рецепторный антагонист (IL-1RA). IL-1RA является ингибитором для IL-1 α и IL-1 β , конкурируя с ними за места связывания с рецептором [Dinarello, 2011]. IL-1 β сначала связывается с первой внеклеточной цепью IL-1RI, что привлекает вспомогательный белок IL-1RAcP (IL-1 receptor accessory protein), работающий как корецептор и необходимый для передачи сигнала [Weber, Wasiliew, Kracht, 2010]. Таким образом, формируется гетеродимерный рецепторный комплекс (IL-1 β , IL-1RI и IL-1RAcP). В результате последовательного фосфорилирования и убиквитинилирования молекул, данные сигнальные пути приводят к активации таких транскрипционных факторов как NF- κ B, AP-1, c-JunN-terminal kinase (JNK) и p38 MAPK [Simi и др., 2007; Weber, Wasiliew, Kracht, 2010].

2.2.2.2. IL-6

IL-6 – провоспалительный цитокин, синтезируемый микроглией, активированными макрофагами и Т-клетками. Его действие опосредовано рецепторным комплексом, состоящим из трансмембранного гликопротеина IL-6R (CD126 или gp80), связывающего IL-6, и трансмембранного гликопротеина gp130 (CD130), трансдуцирующего сигнал. На клетках-мишенях IL-6 сначала связывается с мембранно-связанным IL-6R (mbIL-6R). Далее комплекс IL-6 и IL-6R взаимодействует с двумя молекулами gp130, что приводит к запуску внутриклеточных сигнальных каскадов JAK/STAT, ERK и PI3K [Bluthe, 2005]. Данный механизм передачи сигнала IL-6 называют классическим.

Интересно, что на своей клеточной поверхности IL-6R экспрессируют только некоторые клетки, а именно макрофаги, нейтрофилы и несколько типов Т-лимфоцитов, а в ЦНС – астроциты, микроглия и нейроны [Maes и др., 2014]. В противоположность этому, gp130 экспрессирован повсеместно [Bluthe, 2005]. Клетки, на которых экспрессирован только gp130 без IL-6R не восприимчивы к IL-6 [Dinarello, 2011].

Известно, что под действием протеолиза может образовываться растворимая форма IL-6R (sIL-6R), способная связывать IL-6. Образующийся при этом комплекс взаимодействует с димером gp130 на клетках, не экспрессирующих IL-6R, запуская внутриклеточный сигнальный каскад [Scheller, Rose-John, 2006]. Данный механизм называют трансигнальным. Благодаря трансигналингу, IL-6 способен взаимодействовать с большинством клеток [Maes и др., 2014]. Однако существует растворимая форма gp130 – sgp130, которая способна связывать ИЛ-6 только в комплексе IL-6–sIL-6R. Тем самым, sgp130 ингибирует ответ, опосредованный sIL-6R

транссигнальным каскадом [Jostock и др., 2001]. Считают, что классический сигнальный каскад IL-6 оказывает противовоспалительные эффекты, в то время как транссигнальный каскад – провоспалительные [Maes и др., 2014].

При остром воспалении IL-6 оказывает противовоспалительные эффекты. Они могут быть связаны с повышенной продукцией sIL-1RA и растворимых рецепторов TNF α , которые ингибируют соответственно ИЛ-1 β и TNF α [Scheller и др., 2011]. Во время хронического воспаления IL-6 активирует Т и В лимфоциты и повышает секрецию иммуноглобулинов, что поддерживает данное состояние [Maes и др., 2014]. Также IL-6 индуцирует образование Th-17-лимфоцитов из наивных Т-клеток и ингибирует дифференцировку Т-клеток в сторону Treg [Kimura, Kishimoto, 2010].

2.2.2.3. TNF α

Важным цитокином, принимающим участие в регуляции клеточной пролиферации, индукции апоптоза и запуске острофазного ответа является TNF α . Он продуцируется активированными макрофагами, CD4⁺ лимфоцитами, NK-клетками и нейтрофилами. В мозге основными источниками TNF α являются нейроны, астроциты и микроглия [Duseja и др., 2015]. Астроциты и клетки микроглии секретируют TNF α в ответ на воспаление и инфекционные стимулы. TNF α может запускать апоптоз нейронов, активируя транскрипционный фактор NF- κ B, который индуцирует экспрессию Mn-SOD (марганец-зависимая супероксиддисмутаза или СОД2) и Bcl-2.

TNF α преимущественно синтезируется как трансмембранный белок, собирающийся в стабильные гомотримеры [Kriegler и др., 1988]. Помимо мембранно-ассоциированной формы существует растворимая гомотримерная форма данного цитокина (sTNF). Она образуется путём протеолитического расщепления металлопротеазой [Black и др., 1997].

TNF α может связываться с двумя типами рецепторов – TNFR1 (CD120a, p55) и TNFR2 (CD120b, p75). Считают, что транспорт TNF α из крови в мозг через ГЭБ осуществляется через данные рецепторы [Pan, Kastin, 2002]. TNFR1 экспрессируется в большинстве тканей и может быть активирован обеими формами TNF α [Chen, Goeddel, 2002]. TNFR2 характерен для клеток иммунной системы и отвечает на мембрано-связанную форму гомотримера TNF α [Figiel, 2008]. В мозге TNFR1 экспрессируется постоянно, в то время как для экспрессии TNFR2 в основном нужна стимуляция [Chen, Goeddel, 2002]. Максимальное количество рецепторов к TNF α найдено в гипоталамусе, гиппокампе, амигдале и префронтальной коре [Khairnova и др., 2009].

2.2.2.4. CCL2

CCL2 - цитокин, относящийся к семейству хемокинов и так же известный как MCP1 (моноцитарный хемоаттрактантный белок). CCL2 привлекает моноциты, Т клетки памяти и дендритные клетки к местам воспаления, вызванного либо повреждением ткани, либо инфекцией [Carr и др., 1994; Xu и др., 1996]. В ЦНС CCL2 экспрессируется нейронами, астроцитами и микроглией. Экспрессия CCL2 нейронами обнаруживается во многих отделах, в т.ч. в коре и гиппокампе [Banisadr и др., 2005]. CCL2 выполняет свои функции посредством двух типов рецепторов – Ccr2 и Ccr4 [Craig, Loberg, 2006]. Существует предположение, что CCL2 является одним из ключевых цитокинов, вовлеченных не только в реализацию воспаления, но и его разрешение за счет индукции факторов, приводящих к деградации мРНК IL1 и IL6 [Xu и др., 2012].

Данный хемокин участвует в процессе нейровоспаления, который наблюдается при различных заболеваниях ЦНС [Gerard, Rollins, 2001]. Так, в глиальных клетках усиливается экспрессия CCL2 при ЧМТ [Semple и др., 2010], эпилепсии [Fabene, Bramanti, Constantin, 2010; Foresti и др., 2009], ишемии мозга [Kim и др., 1995], а также болезни Альцгеймера [Hickman, Khoury, 2010] и экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите (ЭАЭ) [Ransohoff и др., 1993]. При стимулировании культуры микроглиальных клеток ЛПС также было обнаружено увеличение CCL2 на уровнях экспрессии и концентрации белка, а при стимулировании культуры микроглиальных клеток CCL2 – увеличение уровней экспрессии *Iba1*, *Il1b*, но не *Il6* [Poriolek-Barczyk и др., 2020]. Все вышеприведенные результаты указывают на то, что CCL2 играет важную роль в нейровоспалительном ответе.

2.2.3. Противовоспалительные цитокины

Нами было указано выше, что основными противовоспалительными цитокинами являются IL-4, IL-10, IL-1RA и TGF- β 1. Однако, согласно данным анализа транскриптомов единичных клеток неокортекса и гиппокампа [Saunders и др., 2018; Tasic и др., 2018], из всех этих цитокинов в мозге экспрессируется только TGF- β 1, поэтому далее рассмотрим чуть подробнее этот цитокин.

2.2.3.1. TGF- β 1

Трансформирующий ростовой фактор β 1 (TGF- β 1) - цитокин, принимающий участие в контроле многих клеточных функций – рост, пролиферация, дифференцировка, апоптоз. TGF- β 1 играет важную роль в контроле иммунной системы и показывает различную активность на разных типах клеток или клетках на разных стадиях развития. Большинство иммунных клеток секретируют TGF- β 1 [Letterio, Roberts, 1998].

На макрофаги и моноциты TGF- β 1 оказывает преимущественно подавляющее действие, он может ингибировать их пролиферацию и предотвращать продуцирование ими активных форм кислорода и азота. Макрофаги и моноциты реагируют на низкие уровни TGF- β 1 как на хемоаттрактант. Более того, под действием TGF- β 1 усиливаются экспрессия IL-1 β и TNF α моноцитами [Wahl, Wen, Moutsopoulos, 2006] и фагоцитоз макрофагами [Letterio, Roberts, 1998]. Было показано, что TGF- β 1 является важным фактором, поддерживающим микроглию в мозге в состоянии покоя [Zöller и др., 2018]. В условиях воспаления, индуцированного ЛПС в макрофагах TGF- β 1 может индуцировать повышение уровня TNF α [Chen и др., 2008b]; а в перicyтах мозга TGF- β 1 ослабляет экспрессию CCL2 и CX3CL1, индуцированную Plb [Rustenhoven и др., 2016]. Таким образом, эффекты TGF- β 1 сильно зависят от молекулярного контекста и типа клеток, на которые цитокин оказывает действие.

2.3. Противовоспалительное действие ГК

Считают, что, помимо участия в развитии стрессорного ответа, ГК являются модуляторами воспаления. Воспаление – типичный ответ ткани на повреждение или инфекцию, целью которого является устранение провоспалительных факторов и/или репарация поражённой ткани. Влияние ГК на регуляцию воспалительного ответа неоднозначно, что подробно будет рассмотрено далее.

На системном уровне ГК известны как противовоспалительные агенты, чем обусловлено активное применение их синтетических аналогов в клинике в качестве иммуносупрессивных препаратов. ГК могут ингибировать воспаление несколькими способами:

- (1) ГК подавляют экспрессию фосфолипазы A2 [Dolan-O'keefe, Nick, 1999];
- (2) ГК ингибируют синтез простагландинов на уровне циклооксигеназы/простагландин-Е изомеразы (ЦОГ-1 и ЦОГ-2) [Goppelt-Struebe, Wolter, Resch, 1989];
- (3) ГК ингибируют экспрессию молекул адгезии [Cronstein и др., 1992];

- (4) ГК ингибируют экспрессию генов цитокинов [Gocjon и др., 1997];
- (5) ГК индуцируют экспрессию ангиотензин-превращающего фермента и эндотелина, сенсибилизируют эпителиальные клетки к вазоконстрикторам и ингибируют продукцию вазодилататоров, что приводит к снижению притока крови к области воспаления [Perretti, 2000];
- (6) ГК ингибируют различные функции лейкоцитов, связанные с воспалением (эпителиальная адгезия, миграция, хемотаксис, фагоцитоз, респираторный взрыв и др.) [Flower, Rothwell, 1994];
- (7) ГК ингибируют инфильтрацию иммунных клеток из крови в ткани за счёт супрессии их хемотаксиса [Spencer, 2011];
- (8) ГК индуцируют апоптоз в лимфоцитах.

В большинстве случаев активация ГР и МР приводит к ингибированию активности иммунных клеток и индукции апоптоза в лимфоцитах [Cain, Cidlowski, 2017]. Однако среди иммунных клеток субпопуляция Th17 лимфоцитов демонстрирует значительно большую резистентность к индуцированному ГК апоптозу [Banuelos и др., 2016]. Известно, что эта субпопуляция лимфоцитов ответственна за хронические воспалительные заболевания дыхательных путей [McKinley и др., 2008]. Субпопуляция Т-супрессоров может быть значительно более чувствительной к подавляющему эффекту низких концентраций ГК, чем субпопуляция Т-хелперов (включая Th17) и Т-киллеров, а также В-клеток. Таким образом, при относительно низких концентрациях ГК обладают скорее иммуностимулирующим (провоспалительным) эффектом, сдвигая соотношение Т-хелпер / Т-супрессор в сторону преимущественно Т-хелперной активности. При более высоких концентрациях ГК могут иметь иммуносупрессивный эффект, причем выраженность иммуносупрессии прямо пропорциональна концентрации ГК в крови и почти линейно растёт до достижения уровней, в 100 раз превышающих физиологический [Banuelos, Lu, 2016].

Большинство долговременных противовоспалительных эффектов ГК может быть результатом негативного регуляторного механизма, называемого трансрепрессией. ГР, связанный с лигандом, встраивается в хроматин за счёт белок-белковых взаимодействий с ДНК-связанными транскрипционными факторами, особенно с ядерным фактором NF-κB и активирующим белком-1 (AP1), который является комплексом белков c-Fos и c-Jun. ГР напрямую связывает Jun субъединицу AP1 и p65 субъединицу NF-κB, препятствуя транскрипционной активации этих двух белков [Nissen, Yamamoto, 2000]. В конечном счёте, это приводит к супрессии синтеза провоспалительных цитокинов. Помимо вышеперечисленных механизмов, существуют и другие пути косвенного воздействия ГК на воспаление. Подъём ГК

повышает уровень эндоканнабиноидов [Hillard, 2018], которые, как известно, оказывают сложное влияние на воспаление. Во-первых, повышение уровня эндоканнабиноидов приводит к подавлению активации ГНО и выброса ГК. Во-вторых, эндоканнабиноиды индуцируют прямые противовоспалительные эффекты, как зависимые так и независимые от активации их рецепторов; однако эндоканнабиноиды, подавляя высвобождение некоторых провоспалительных цитокинов ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$), могут одновременно активировать высвобождение других про- (IL-6) и противовоспалительных (IL-10) цитокинов [Klein, 2005]. Следовательно, подъём уровня ГК не только запускает прямое противовоспалительное действие, но также активирует систему эндоканнабиноидов, которая также помогает контролировать воспалительный ответ и подавлять острое воспаление. В ряде исследований было подтверждено противовоспалительное действие ГК. В большинстве этих исследований системный воспалительный ответ был индуцирован инъекцией бактериального ЛПС. Индуцированная ЛПС продукция простагландинов в зубчатой извилине у крыс подавляется кортикостероном, высвобождающимся в ответ на введение ЛПС [Ma и др., 2017]. Этот результат подтверждает предшествующие исследования относительно противовоспалительной роли ГК после инъекции ЛПС. Острый иммобилизационный стресс сразу после системного введения ЛПС приводил к подавлению индуцированного ЛПС воспалительного ответа через 1-2 ч как на периферии, так и в мозге [Goujon, 1995]. У адреналэктомированных мышей увеличение экспрессии генов и концентрации провоспалительных цитокинов, индуцированное ЛПС, через 2-4 ч было сильнее как в периферических тканях, так и в мозге по сравнению с ложноперирированными мышами [Goujon и др., 1996]. Эти результаты говорят о том, что эндогенные ГК регулируют механизмы ответа организма на воспаление посредством ингибирования экспрессии цитокинов в периферических органах и в мозге при остром и кратковременном воздействии. ГК также подавляют провоспалительный ответ на ЛПС как в периферических макрофагах, так и в микроглии при их введении после системного действия ЛПС [Frank и др., 2010]. Противовоспалительный ответ наблюдался и после длительного (36 ч) воздействия на крыс чрезвычайно высокой дозы кортикостерона (гранула 100 мг, подкожно). В этом исследовании кортикостерон подавлял экспрессию мРНК *Il1b* и *Il1a* в гипоталамусе и гиппокампе, однако, экспрессия $\text{TNF}\alpha$ в этих структурах оставалась неизменной. Эти противовоспалительные изменения парадоксальным образом сопровождался подъёмом мРНК *Il6* и в гипоталамусе и в гиппокампе [Chai и др., 1996]. Причины несоответствия между влиянием кортикостерона на цитокины на уровне мРНК и белка до сих пор остаются неясными.

2.4. Провоспалительное действие ГК

Провоспалительные эффекты ГК были описаны в экспериментальных парадигмах острым и хроническим применением ГК перед воздействием, запускающим воспаление.

Как острый, так и хронический тяжёлый стресс приводили к накоплению кортикостерона в гиппокампе крыс, которое сопровождалось повышением экспрессии мРНК *I1b* [Piskunov и др., 2016]. Более мягкий хронический непредсказуемый стресс также вызывал повышение экспрессии мРНК *I1b* в гиппокампе крыс [Stepanichev и др., 2018]. Эти исследования, хотя и подтверждают участие ГК в развитии стрессорного ответа при данных условиях.

Попытка раскрыть взаимосвязь между системой ГК и нейровоспалением была совершена исследовательской группой, возглавляемой Р.Сапольским [Munhoz и др., 2006; Munhoz и др., 2010]. Авторы использовали системное введение ЛПС после хронического стресса, чтобы оценить роль ГК в регуляции экспрессии провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF α . Как ожидалось, у крыс, не подвергнутых стрессорному воздействию, ЛПС вызывал увеличение уровня этих цитокинов в гиппокампе, а блокирование ГР мифепристонотенцировало это повышение. Однако мифепристон оказывал противоположный эффект у крыс, подвергнутых стрессу, ослабляя индуцированный ЛПС подъём уровня цитокинов. Последний вывод явно говорит о том, что у хронически стрессированных животных активность системы ГК является провоспалительной [Munhoz и др., 2006]. Позже авторы расширили свои выводы и подвергли дальнейшему анализу взаимосвязь между хроническим подъёмом уровня кортикостерона и ответом на ЛПС [Munhoz и др., 2010]. В этом исследовании уровень кортикостерона в крови адrenaлэктомированных животных постоянно поддерживался на трёх разных уровнях: базальном, умеренно повышенном и высоком, благодаря имплантации гранул, высвобождающих кортикостерон. Ожидалось, что во время эксперимента с ЛПС поддержание низкого базального уровня кортикостерона должно быть ассоциировано с усиленным нейровоспалением из-за отсутствия опосредованного кортикостероном подавления воспаления. Однако экспрессия провоспалительных цитокинов (IL-1 β и TNF α) была аналогична таковой, наблюдаемой у интактных животных, подвергнутых действию ЛПС. Парадоксально то, что хронически умеренный подъём кортикостерона усиливал воспалительный ответ, индуцированный ЛПС, в гиппокампе по сравнению с интактными животными, а хронически высокий уровень кортикостерона не оказывал эффекта на воспалительный ответ, индуцированный ЛПС. Сдвиг в сторону провоспалительного действия ГК был также описан в работе М.Г. Франка и соавт. [Frank и др., 2014]. Чтобы точно контролировать уровень

кортикостерона, крысам была проведена адреналэктомия, после чего в питьевую воду добавляли кортикостерон в различных концентрациях. Обращает на себя внимание то, что «высокая» концентрация кортикостерона в данном исследовании соответствовала «умеренной» концентрации в исследовании [Munhoz и др., 2010]. Добавление высоких доз кортикостерона усиливало экспрессию генов, ассоциированных с воспалением (Iba1, МНСII, NLRP3) в гиппокампе. Более того, в микроглии, выделенной из гиппокампа крыс, подвергнутых воздействию высоких доз кортикостерона, была показана повышенная экспрессия провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, TNF α) и компонента инфламмосомы (NLRP3) в ответ на действие высокой дозы ЛПС [Frank и др., 2014]. Анализ эффектов ГК на животных моделях патологий, не ассоциированных с непосредственным повреждением мозга, наводит на мысль о том, что высокие уровни кортикостерона, наблюдаемые после либо стресса, либо введения ЛПС, могут приводить к трансформации действия ГК в сторону провоспалительного. Это говорит о том, что провоспалительный ответ может иметь другие механизмы регуляции, помимо действия ГК и что длительное умеренное повышение кортикостерона может усилить воспалительный ответ. Примечательно, что длительное воздействие высоких доз кортикостерона не оказал провоспалительного эффекта, указывая на возможное существование «провоспалительного» диапазона концентрация кортикостерона.

Провоспалительное действие ГК также было обнаружено на моделях патологий мозга, ассоциированных с прямыми повреждениями нервной ткани животных. Эндогенные ГК усиливают разрушение гиппокампа и запускают развитие нейровоспаления после инъекции каината. К. Динкель и соавт. обнаружили, что инъекция каината крысам с хронически повышенным уровнем кортикостерона запускала накопление клеток, способствующих развитию воспаления (гранулоцитов, моноцитов/макрофагов, микроглии) в гиппокампе [Dinkel, Macpherson, Sapolsky, 2003]. Воспалительный ответ в гиппокампе, который оценивали по уровню цитокинов IL-1 β и TNF α , также был усилен у крыс с хронически высоким профилем ГК. Дальнейший анализ эффектов ГК на индуцированный каинатом воспалительный ответ показал, что хронически высокий уровень кортикостерона увеличивал экспрессию IL-1 β [Sorrells и др., 2013] и ускорял накопление провоспалительного цитокина CCL2 в гиппокампе [Sorrells и др., 2014]. В модели эпилепсии, индуцированной литием/пилокарпином, две инъекции Декс через 24 и 36 ч после эпилептического статуса подавляли нейровоспалительный ответ в гиппокампе [Vizuetе и др., 2018]. Вероятно, чрезвычайно высокая доза Декс, использованная в данном исследовании, смогла преодолеть ожидаемый провоспалительный эффект, аналогичный эффекту, показанному для кортикостерона в работе [Munhoz и др., 2010]. Индуцированный стрессом рост концентрации кортикостерона зависит от

типа повреждения мозга. Так, окклюзия средней мозговой артерии (МСаО) может индуцировать более высокий уровень кортикостерона по сравнению с повреждением, вызванным каинатом [Smith-Swintosky и др., 1996]. Фокальное ишемическое повреждение неокортекса в модели МСаО запускало накопление кортикостерона и IL-1 β в гиппокампе, с большей выраженностью эффекта в ВГ [Onufriev и др., 2017b]. Неонатальный провоспалительный стресс (введение ЛПС крысам) приводил к накоплению кортикостерона и IL-6 в гиппокампе половозрелых животных, в то время как IL-1 β оставался в нормальном диапазоне [Onufriev и др., 2017a]. Однако до сих пор механизм(ы) ГК-зависимого накопления цитокинов в гиппокампе в вышеупомянутых моделях остается неясным. Основываясь на экспериментальных данных опровоспалительном эффекте ГК при некоторых условиях, была выдвинута гипотеза о том, что дистантное повреждение гиппокампа после МСаО может происходить в результате провоспалительного действия ГК, связывающихся со своими рецепторами в этой структуре [Gulyaeva, 2019a; Gulyaeva, 2019b].

По длительности течения выделяют острое и хроническое нейровоспаление.

2.4.1. Эффекты ГК при остром нейровоспалении

Острое системное введение экзогенного кортикостерона усиливало провоспалительный ответ после введения ЛПС как в периферических макрофагах (в печени), так и в клетках микроглии гиппокампа, если инъекция кортикостерона предшествовала (2 или 24 ч) введению ЛПС [Frank и др., 2010]. Клетки гиппокампа были праймированы кортикостероном, поскольку индуцированное ЛПС увеличение экспрессии мРНК и белка TNF α , IL-1 β и IL-6 было значительно выше после предварительного воздействия кортикостерона [Frank и др., 2010]. Прайминг микроглии гиппокампа может быть индуцирован острым стрессом [Frank и др., 2012]. Микроглия, изолированная из мозга крыс через 24 ч после начала воздействия острого неизбежного стресса, показала более сильный провоспалительный цитокиновый ответ (например, экспрессию IL-1 β) на ЛПС, а предварительная обработка антагонистом ГР мифепристоном или адrenaлэктомиа устраняли сенсibilизацию микроглии. Таким образом, провоспалительный ответ (IL-1 β , IL-6, NF κ B α) микроглии на иммунологические изменения, аналогично с периферическими макрофагами, может быть сенсibilизирован ГК, индуцированными стрессом. Прайминг нейровоспалительного ответа также наблюдался в экспериментах с локальным введением ЛПС после стресса. Внутригиппокампальная инъекция ЛПС стрессированным животным увеличивала число реактивных клеток микроглии, а также экспрессию мРНК *Iib* и *Tnf* [Espinosa-Oliva и др., 2009]. Данные результаты говорят о том, что

предварительный подъём ГК изменяет воспалительную систему, действуя в качестве эндогенного сигнала опасности и подготавливая организм к дальнейшим иммунологическим угрозам.

В большинстве работ часто анализируют только уровни некоторых провоспалительных цитокинов в гиппокампе, несмотря на то, что индуцированное ГК увеличение уровня этих цитокинов могло быть связано со снижением экспрессии рецепторов данных цитокинов. Было показано, что подъём концентрации ГК в сыворотке крови, происходящий после иммобилизационного стресса или лечения Декс (кратко- или длительного), не меняет плотность рецепторов IL-1 в гиппокампе мышцы в покое или после периферической инъекции ЛПС [Betancur, 1994]. Важно, что IL-1 и IL-6 также не влияли на экспрессию ГР и МР. Экспрессия ГР в гиппокампе была существенно снижена после инъекции TNF α [Betancur, 1995]. Вместе взятые, эти результаты говорят о том, что уровни рецептора IL-1 в гиппокампе относительно резистентны к модулированию различными уровнями циркулирующих ГК, а TNF α может модулировать активность ГГНО во время иммунных/воспалительных процессов.

2.4.2. Эффекты ГК при хроническом нейровоспалении

Признаки нейровоспаления часто наблюдаются в двух качественно разных ситуациях длительных или хронических патологических состояний. Первая включает состояния, не связанные с повреждением мозга, например, депрессивно-подобные расстройства или инфекцию, моделированную введением ЛПС. Вторая ситуация ассоциирована с повреждением мозга и последующей нейродегенерацией (инсульт, ЧМТ, судороги). Важное различие этих двух ситуаций заключается в том, что гибель клеток, индуцированная повреждением мозга, вызывает высвобождение молекул, связанных с повреждением, которые могут активировать и поддерживать воспалительные каскады.

О нейровоспалении как следствии хронического стресса сообщалось несколькими группами; однако механизм участия в нем ГК до сих пор не известен. Хорошо известна позитивная корреляция между развитием нейровоспаления при депрессивных состояниях и увеличением концентрации ГК в крови пациентов с депрессивными расстройствами, а также в мозге животных при моделировании депрессии [Frank, Watkins, Maier, 2015]. Системное введение Декс в течение 21-го дня индуцировало депрессивно-подобное поведение у мышей и глюкокортикоидную резистентность. Пониженные уровни кортикостерона сопровождалась сниженной экспрессией мРНК ГР в гиппокампе, стриатуме и префронтальной коре, а также

повышенной экспрессией FKBP51, подавляющей функциональную активность ГР [Skurjo и др., 2015]. Стоит отметить, что Декс имеет более высокую аффинность к ГР по сравнению с кортикостероном, однако, в большинстве исследований он используется в аналогичном диапазоне концентраций, как и кортикостерон (1-10 мг/кг) [Al-Shorbagy, SayehEl, Abdallah, 2012; Sigwalt и др., 2011]. Поэтому очень ожидаемо, что хроническое лечение такими концентрациями Декс может вызвать чрезмерную активацию сигналинга, опосредованного ГР, и индуцировать глюкокортикоидную резистентность. Глюкокортикоидная резистентность может послужить пусковым фактором, усиливающим воспалительный ответ из-за затухания иммуносупрессивных каскадов, связанных с ГР. К сожалению, дозозависимые эффекты Декс на нейровоспаление систематически не исследуются.

2.5. ЧМТ как модель изучения фокального повреждения мозга

ЧМТ – это повреждение головного мозга в результате воздействия на него внешней механической силы различного происхождения (удар, снаряд, взрывная волна) [Capizzi, Woo, Verduzco-Gutierrez, 2020; Coronado и др., 2011; Grafman, Salazar, 2015]. ЧМТ может приводить к временным или постоянным нарушениям когнитивных и двигательных функций, а также к развитию других неврологических осложнений [Capizzi, Woo, Verduzco-Gutierrez, 2020; Maas, Stocchetti, Bullock, 2008; Oberholzer, Müri, 2019]. Прогноз заболевания зависит от характера, локализации и тяжести травмы [Eapen, Cifu, 2019; Oberholzer, Müri, 2019].

Патогенез ЧМТ сложный и многофакторный. В данном комплексе патофизиологических процессов обычно выделяют первичное и вторичное повреждения. Первичное повреждение при ЧМТ является непосредственным результатом механического разрушения мозговой ткани, и поэтому, традиционно считалось, что ЧМТ – это острое повреждение. В зависимости от характера разрушения оно может быть фокальным, диффузным или сочетанным (комбинация диффузного и фокального повреждений), что, в свою очередь обеспечивает высокую гетерогенность случаев травмы [Kabadi, Faden, 2014]. ЧМТ может манифестировать многими симптомами нейродегенеративных заболеваний, например, болезнью Паркинсона [Acosta и др., 2015; Su и др., 2011] или Альцгеймера [Malkesman и др., 2013; Tajiri и др., 2013], что позволило определить её как хроническое заболевание. По мере накопления клинических и лабораторных данных было установлено, что после первичного воздействия запускается вторичный каскад молекулярных и биохимических изменений, которые приводят к эксайтотоксичности, ишемии, апоптозу, некрозу и нейровоспалению. В данной работе основное обсуждение отведено временной динамике течения нейровоспалительного процесса после эпизода травмы.

2.5.1. Экспериментальные модели ЧМТ – моделирование фокального и диффузного повреждений

В связи с высокой гетерогенностью клинических случаев травмы и невозможностью исследования многих аспектов повреждения непосредственно на людях, были разработаны различные экспериментальные модели для изучения последствий ЧМТ на животных. Несмотря на то, что более крупные животные ближе по размеру и физиологии к людям, грызуны являются наиболее используемыми в исследовании ЧМТ из-за их умеренной стоимости, маленького размера и стандартизированных результатов измерений. Ранее, модели ЧМТ рассматривали биомеханические аспекты повреждения мозга [Dixon, Lighthall, Anderson, 1988; McIntosh и др., 1987; Prins и др., 1996], однако, постепенно фокус внимания сместился на изучение сложных молекулярных каскадов, инициируемых травмой головы.

По типу оказываемого воздействия можно выделить следующие модели:

1. Модель гидродинамического удара
2. Модель контролируемого удара коры
3. Модель падения груза
4. Модель ударного ускорения
5. Проникающие баллистические модели повреждения мозга
6. Модель взрывной травмы

Наиболее часто в экспериментах на животных используют первые 4 варианта моделей. Поэтому далее более подробно остановимся именно на них.

(1) Модель гидродинамического удара

В модели гидродинамического удара повреждение наносит маятник, который ударяет поршень резервуара с жидкостью. Это позволяет сгенерировать импульс давления жидкости, приложенный к неповрежденной твердой мозговой оболочке через трепанационное отверстие. Гидродинамический удар вызывает кратковременное смещение и деформацию мозговой ткани. Тяжесть клинических проявлений зависит от силы импульса давления [McIntosh и др., 1989], параметра, который контролируется высотой подъема маятника.

В зависимости от места расположения трепанационного отверстия относительно саггитального шва модель гидродинамического удара может быть разделена на следующие виды:

1. срединную (в центре саггитального шва);
2. парасаггитальную (<3.5 мм латерально от срединной линии);
3. латеральную (>3.5 мм латерально от срединной линии).

Модель гидродинамического удара воспроизводит клиническую ситуацию ЧМТ без перелома костей черепа [Thompson и др., 2005]. С ее использованием можно воспроизвести внутричерепное кровоизлияние, отёк мозга и прогрессирующее разрушение серого вещества, т.е. патофизиологические отличительные черты ЧМТ человека [Graham, 2000]. Однако у людей ЧМТ умеренной и тяжёлой степени часто ассоциированы с повреждением костей черепа и ушибами на нескольких извилинах. Данные особенности не могут быть воспроизведены в данной модели [Hardman, Manoukian, 2002].

Изначально, срединный вариант модели гидродинамического удара был разработан для использования на кошках и кроликах. Далее он был адаптирован под крыс [McIntosh и др., 2016]. Затем данный вариант был модифицирован в латеральный для работы с грызунами [McIntosh и др., 1989]. В настоящее время именно латеральный вариант модели гидродинамического удара является наиболее широко используемым для изучения ЧМТ на животных [Thompson и др., 2005].

ЛГДУ вызывает фокальный ушиб непосредственно коры и, возможно, диффузное повреждение субкортикальных структур (гиппокампа и таламуса). Данные процессы происходят сразу после удара и могут приводить к гибели нейронов спустя 12 часов после ЧМТ. Также они могут незаметно распространяться на другие структуры мозга к 7-му дню после ЧМТ [Nicks и др., 1996]. Из-за продолжающейся гибели клеток область травмированной коры продолжает расширяться и становится полостью, окруженной глией. В особенно чувствительных областях мозга (ИГ, таламусе, медиальном септуме, стриатуме, амигдале) можно наблюдать сигнальные каскады вторичного повреждения от нескольких дней до нескольких месяцев [Nicks и др., 1996]. Как и у пациентов с ЧМТ, у животных в модели латерального гидродинамического удара наблюдаются поведенческий и когнитивный дефициты. Когнитивные и неврологические нарушения могут сохраняться более года после тяжелого удара. Для модели гидродинамического удара по сравнению с другими моделями характерна высокая смертность, вероятно, из-за длительного апноэ.

Ключевым моментом в определении локализации повреждения ткани является место трепанационного отверстия. При его латеральном расположении преимущественно поражается ипсилатеральная кора. Контралатеральная кора и ствол мозга вовлекаются редко [Vink и др.,

2001]. В то же время, срединный и парасаггитальный варианты расположения трепанационного отверстия часто приводят к билатеральным изменениям коры, связанными с прямым осевым движением нижней части ствола мозга. Степень повреждения коры зависит как от локализации трепанационного отверстия, так и от силы наносимого удара [Lyeth и др., 2002].

(2) Модель контролируемого кортикального повреждения

В модели контролируемого кортикального повреждения для нанесения удара на открытую, неповрежденную твердую мозговую оболочку применяется пневматическое или электромагнитное ударное устройство. Такой метод позволяет воссоздать в эксперименте разрушение ткани коры, острую субдуральную гематому, аксональное повреждение, сотрясение и дисфункцию ГЭБ. Данная модель применяется на многих животных, а именно на крысах, мышах, хорьках, поросятах и обезьянах [Edward Dixon и др., 1991]. Контролируемое повреждение подается на неповрежденную твердую мозговую оболочку через одностороннее трепанационное отверстие, вызывая деформацию нижележащей коры. Трепанационное отверстие часто локализовано между брегмой и лямбдой. Основным преимуществом данной модели является простота, с которой можно контролировать такие механические факторы, как время, скорость и глубина удара, а также отсутствие риска отраженного повреждения.

Тяжесть контролируемого кортикального повреждения растет с увеличением степени деформации коры и скорости воздействия, что позволяет корректировать тяжести травмы в соответствии с конкретными экспериментальными требованиями [Saatman и др., 2006]. Когнитивный дефицит сохраняется до года после контролируемого кортикального повреждения и может быть связан с атрофией мозга и прогрессирующим снижением мозгового кровотока [Burns и др., 2012]. Контролируемый кортикальный удар также вызывает дефицит в эмоциональном поведении в тестах вынужденного плавания и подвешенного крестообразного лабиринта у мышей. Когнитивный дефицит увеличивается по отношению к тяжести удара [Burns и др., 2012], а эмоциональный дефицит нет, предполагая, что пороговое значение для эмоциональных изменений после экспериментальной ЧМТ является низким.

Несмотря на свою стоимость и сложность, данная модель предоставляет возможность следить за физиологическими данными после травмы в окружающей среде, сходной с отделением интенсивной терапии. В свою очередь, это может облегчить трансляцию данных по животным в клиническую практику.

(3) Модели ЧМТ в результате падения груза

В модели ЧМТ в результате падения груза череп подвергается воздействию свободно падающего груза. Изменяя массу груза и высоту, с которой он падает, можно регулировать степень тяжести повреждения. В зависимости от того проводят краниотомию или нет, падение груза осуществляется через трепанационное отверстие непосредственно на твердую мозговую оболочку или на обнаженный от скальпа череп, соответственно.

В варианте данной модели по Фини груз через трепанационное отверстие падает на твердую мозговую оболочку [Feeneу и др., 1981]. Это вызывает ушиб коры и кровоизлияние в области удара, которое в течение 24-х часов после ЧМТ может прогрессировать в некротическую полость. Также возможно расширение данной полости в течение последующих двух недель [Dail и др., 1981]. В данной модели у крыс тяжелые ушибы могут вызывать функциональный дефицит, сохраняющийся более 90 дней.

Существует еще один вариант модели ЧМТ падения груза, разработанный группой Шохами, который представляет собой модель закрытой травмы головы. Падение груза осуществляется ипсилатерально на обнаженный от скальпа череп крысы или мыши [Otto и др., 2003]. При этом голова животного закреплена на твердой поверхности. Наносимый грузом удар становится причиной неврологических нарушений и пробоя ГЭБ. При этом неврологические нарушения коррелируют с тяжестью травмы. С помощью МРТ на модели закрытой травмы головы были продемонстрированы неврологический и поведенческий дефициты, активация микроглии и астроцитов и нейродегенеративные процессы, что схоже с клиникой закрытой травмы головы у человека [Albert-Weißенberger и др., 2012].

(4) Модель ударного ускорения

Для пациентов с ЧМТ в результате дорожно-транспортных происшествий характерно диффузное повреждение мозга. В эксперименте повреждение такого рода воспроизводят в модели ударного ускорения по Мармароу. В данной модели устройство для нанесения травмы состоит из набора грузов из латуни, которые свободно падают с указанной высоты по трубе из плексигласа. Крысам под общей анестезией обнажают поверхность черепа путем разреза скальпа. Далее по срединной линии между брегмой и лямбдой крепится диск из нержавеющей стали с помощью зубного цемента, который образует так называемый «шлем», чтобы предотвратить перелом черепа. Затем крыс подвергают удару путем сбрасывания груза на «шлем». Смерть наступает, в первую очередь, в результате респираторной депрессии. При этом механическая вентиляция легких после тяжелого удара значительно снижает уровень смертности животных [Marmarou и др., 1994].

Модель ударного ускорения по Мармароу вызывает двустороннее повреждение нейронов и микроциркуляторного русла, а также обширное диффузное аксональное повреждение в мозолистом теле, внутренней капсуле, зрительных трактах, ножках мозга, ножках мозжечка и трактах ствола мозга. Это приводит к развитию двигательного и когнитивного дефицитов, сходных с теми, которые наблюдаются в моделях гидродинамического удара и контролируемого повреждения коры. Также, вызванные дефициты коррелируют со степенью тяжести повреждения [Marmarou, Roland Reynolds, 1994].

Основным недостатком модели ударного ускорения является относительно высокая вариабельность в степени тяжести наносимого повреждения. Однако, эта модель недорогая, легкая в исполнении, и она позволяет воспроизвести в эксперименте диффузное аксональное повреждение, которое наблюдается в клинике.

Так как в реальной жизни при автомобильных авариях и спортивных травмах обычно встречается фронтальное повреждение мозга, модель ударного ускорения была модифицирована. В новой модели по Марилэнд удар приходится на переднюю часть черепа и производит ЧМТ, характеризующуюся передне-задним ротационным ускорением мозга внутри неповрежденного черепа. У экспериментальных животных при этом отсутствуют ушиб коры, перелом черепа и длительное апноэ, но имеются петехиальные кровоизлияния и диффузное аксональное повреждение. Более чем на одну неделю сохраняются неврологический и поведенческий дефициты [Kuehn и др., 2009].

2.5.2. Последствия ЧМТ, дистантное повреждение гиппокампа

В отсроченном периоде после ЧМТ, не зависимо от степени тяжести, у большинства пациентов развивается коморбидные когнитивные и эмоциональные расстройства, вплоть до деменции и депрессии [Gulyaeva, 2019b]. Считают, что данные нарушения ассоциированы с дисфункцией гиппокампа. Случайное вовлечение гиппокампа в посттравматическую патологию головного мозга достаточно неожиданно при ЧМТ легкой степени, поскольку 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 ипсилатеральное, но и контралатеральное полушарие гиппокампа [Gulyaeva, 2019a; Gulyaeva, 2019b].

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 ГЭБ и выходом иммунных клеток из периферического кровообращения. В связи с вышесказанным можно предположить, что вышедший из-под контроля нейровоспалительный процесс может лежать в основе посттравматических когнитивных и эмоциональных расстройств.

Важным компонентом реакции на стресс, индуцированный ЧМТ, может включать изменения не только в экспрессии цитокинов и уровне ГК, но и изменения в уровне КРГ (Crh). Хорошо известно, что гиппокамп является одной из ключевых структур мозга, вовлеченных в реакцию на стресс, и локальное изменение концентрации КРГ при воздействии стресса происходит также в нем. Однако источником КРГ являются не гипоталамические проекции, а интернейроны гиппокампа [Maras, Varam, 2012]. Было показано, что КРГ, выделяющийся при стрессе в гиппокампе, взаимодействует со своими рецепторами Crhr1 и Crhr2 и выполняет важную роль в формировании памяти и регуляции синаптической пластичности, в то время как длительное повышение при хроническом стрессе может быть одним из факторов, способствующих нарушению памяти [Chen и др., 2012]. Однако при патологиях роль КРГ в гиппокампе остается неисследованной, в частности, при ЧМТ, являющейся острым стрессовым воздействием, участие Crh и его рецепторов в изменении функции гиппокампа остается абсолютно неизвестным.

В предшествующих исследованиях с экспериментальными моделями ЧМТ сообщалось об изменениях концентрации белков провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF α , так же как и уровней экспрессии этих же цитокинов в неокортексе и гиппокампе. Данные исследования были сфокусированы на изменениях, происходящих в области повреждения коры [Chen и др., 2008a; Dalgard и др., 2012; Hiskens и др., 2021; Kinoshita и др., 2002; Kuwar и др., 2019; Lagraoui и др., 2012; Mukherjee и др., 2011; Vitarbo и др., 2004; Zhao и др., 2014]. Используя различные модели травмы, разными группами было показано, что уровни белков IL-1 β , IL-6 и TNF α повышаются быстро после травмы и остаются повышенными в ипсилатеральной части неокортекса вплоть до 5-7-х суток после ЧМТ. Напротив, изменения, происходящие в гиппокампальной ткани, намного меньше исследованы и, в связи с этим, менее понятны.

На модели контролируемого повреждения коры было показано, что локальная кортикальная травма приводит к изменениям экспрессии цитокинов в ИГ. Также сообщалось о повышении уровней белков IL-1 β на 21-е сутки [Zhang и др., 2015], IL-6 на 3-и и 21-е сутки [Gatson и др., 2013; Zhang и др., 2015], а также TNF α на 2-е и 21-е сутки после ЧМТ [Kuwar и др., 2019; Zhang и др., 2015]. Схожим образом, было зафиксировано увеличение как концентрации белка IL-1 β , так и относительной представленности соответствующего гена в целом гиппокампе через 3, 8, 12 и 48 часов после диффузной ЧМТ на модели падения груза по Мармароу [Chao и др., 2012; Lu и др., 2005]. Похожие изменения были обнаружены в исследованиях ЧМТ на модели ЛГДУ [Kinoshita и др., 2002; Vitarbo и др., 2004]. В этих экспериментах был обнаружен резкий рост уровней мРНК *Tnf* и *Il1b* и соответствующих им белков как в ипсилатеральной, так и контралатеральной областях коры и гиппокампа через 1, 3, 24 и 72 часа после ЧМТ. Было показано, что в ипсилатеральном полушарии резкое повышение уровней экспрессии мРНК цитокинов и соответствующих им белков появилось в очень ранний период после травмы (1 и 3 часа), а через 24 часа уровни этих цитокинов возвращался к таковому у ЛО животных. В контралатеральном полушарии также присутствовали такие изменения, но были менее выраженными: незначительное обратимое увеличение концентрации TNF α (в неокортексе и гиппокампе) и IL-1 β (только в гиппокампе). В разных моделях ЧМТ эти изменения в концентрациях цитокинов были ассоциированы с изменениями в состоянии микроглии в различные временные точки не только в неокортексе [Gatson и др., 2013; Mei и др., 2017; Witcher и др., 2020; Zhao и др., 2014], но также и в гиппокампе [Aungst и др., 2014; Gatson и др., 2013; Zhao и др., 2014]. Таким образом, согласно существующим представлениям, повреждение ткани неокортекса при ЧМТ приводит к мощному нейровоспалению в очаге повреждения, включающему в себя как цитокиновый ответ, так и изменения в состоянии микроглии. Кроме того, нейровоспалительный ответ наблюдается также в гиппокампе, несмотря на то, что эта структура мозга не повреждается при ЧМТ.

Известно, что гиппокамп неоднороден вдоль септотемпоральной оси, и обычно выделяют две основные его части – ДГ и ВГ [Fanselow, Dong, 2010; Gulyaeva, 2019a]. Традиционно считается, что ДГ вовлечен в анализ пристрастной информации, навигации и формирование памяти, в то время как ВГ участвует в процессах, ассоциированных с обработкой эмоционально окрашенной информации. Поскольку при ЧМТ наблюдаются когнитивные и эмоциональные нарушения, можно ожидать, что изменения в функционировании происходят в обеих частях гиппокампа, однако, насколько характер изменений в каждой из частей гиппокампа является универсальным до сих пор неизвестно. Более того, разная вовлеченность ДГ и ВГ в реализацию специфичных функций мозга может

быть потенциально ассоциирована с различными изменениями, происходящими в этих частях гиппокампа после ЧМТ. Однако в предшествующих исследованиях влияние ЧМТ на каждый гиппокамп отдельно (ИДГ, ИВГ, КДГ, КВГ) не рассматривалось. С точки зрения отсроченных когнитивных и эмоциональных нарушений, изучение динамики течения нейровоспалительного и стрессового ответов может быть крайне важным, именно разделяя области гиппокампа не только по близости к наносимой травме (ипсилатерально и контралатерально), но и вдоль септотемпоральной оси на ДГ и ВГ, что и было рассмотрено в нашей работе.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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.

3.1. 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. Светлое время суток было установлено с 8:00 до 20:00.

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. Светлое время суток было установлено с 8:00 до 20:00.

3.2. Экспериментальные процедуры

3.2.1. Эксперимент 1, моделирование ЧМТ

Все хирургические манипуляции проводили под ингаляционным наркозом (2-3% изофлуран). 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). Среднее время восстановления установочного рефлекса после ЛГД удара составляло 116 ± 13 сек, хвостового

ответа - 166 ± 17 сек. 10 крыс были исключены из эксперимента из-за острой смерти, а 3 крысы – по техническим ошибкам. После нанесения ЧМТ крыс возвращали в их домашние клетки.

Животные были разделены на 3 группы в случайном порядке: 69 крыс получили ЛГДУ; 60 крыс - только трепанацию черепа без травмы мозга (группа ложно-оперированных (ЛО) животных); 18 крыс - группа интактного контроля без хирургических манипуляций.

Для получения образцов тканей мозга для дальнейших биохимических и молекулярно-генетических исследований животных декапитировали гильотиной в разные дни после ЧМТ:

- 1). 1-е сутки (ЛО n=9; ЧМТ n=8),
- 2). 3-и сутки (ЛО n=10; ЧМТ n=7),
- 3). 7-е сутки (ЛО n=11; ЧМТ n=7),
- 4). 14-е сутки (ЛО n=10; ЧМТ n=14).

Мозг помещали в ледяной 0.9% раствор NaCl сразу после извлечения. Гиппокамп после извлечения делили на 4 части: ипсилатеральный дорсальный гиппокамп (ИДГ), ипсилатеральный вентральный гиппокамп (ИВГ), контралатеральный дорсальный гиппокамп (КДГ) и контралатеральный вентральный гиппокамп (КВГ). Декапитационную кровь собирали и центрифугировали при 1500 об/мин и 4°C в течение 15 минут для получения сыворотки.

Для гистологического анализа анестезированных крыс подвергали процедуре транскардиальной перфузии 4% раствором формальдегида в 0.1M фосфатном буфере с pH=7.4 на 3-и (ЛО n=11; ЧМТ n=8) и 7-е (ЛО n=9; ЧМТ n=12) сутки после ЧМТ. Животных из контрольной группы умерщвляли в соответствии вышеописанным способом для биохимического и гистологического анализа (9 и 8 крыс, соответственно).

Дизайн Эксперимента 1 представлен на Рисунке 1.

3.2.2. 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). Концентрации модуляторов ГР и МР были выбраны на основе их значений EC_{50} и IC_{50} для ГР и МР [Wilkinson и др., 2008] и соответствовали примерно десятикратным EC_{50} и IC_{50} при расчете на объем ДГ (~50мкл). Дозы вводимых экспериментальных веществ (мкг) были следующими: $m(\text{ЛПС}) = 0.2$, $m(\text{Декс}) = 0.05$, $m(\text{Миф}) = 4.5$, $m(\text{Спир}) = 5.4$.

Эксперимент 2 и Эксперимент 3 были выполнены независимо друг от друга.

В Эксперименте 2 изучали эффекты Декс, агониста ГР, на развитие острого нейровоспаления в гиппокампальной ткани. Животные были разделены на 5 групп ($n=8$): Интактная группа без каких-либо манипуляций, контрольная группа ФСБ, группа ЛПС, группа Декс, группа Декс + ЛПС.

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 ($n=6-8$): Интактная группа без каких-либо манипуляций, контрольная группа ФСБ, группа ЛПС, группа Миф, группа Миф + ЛПС, группа Спир, группа Спир + ЛПС.

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.

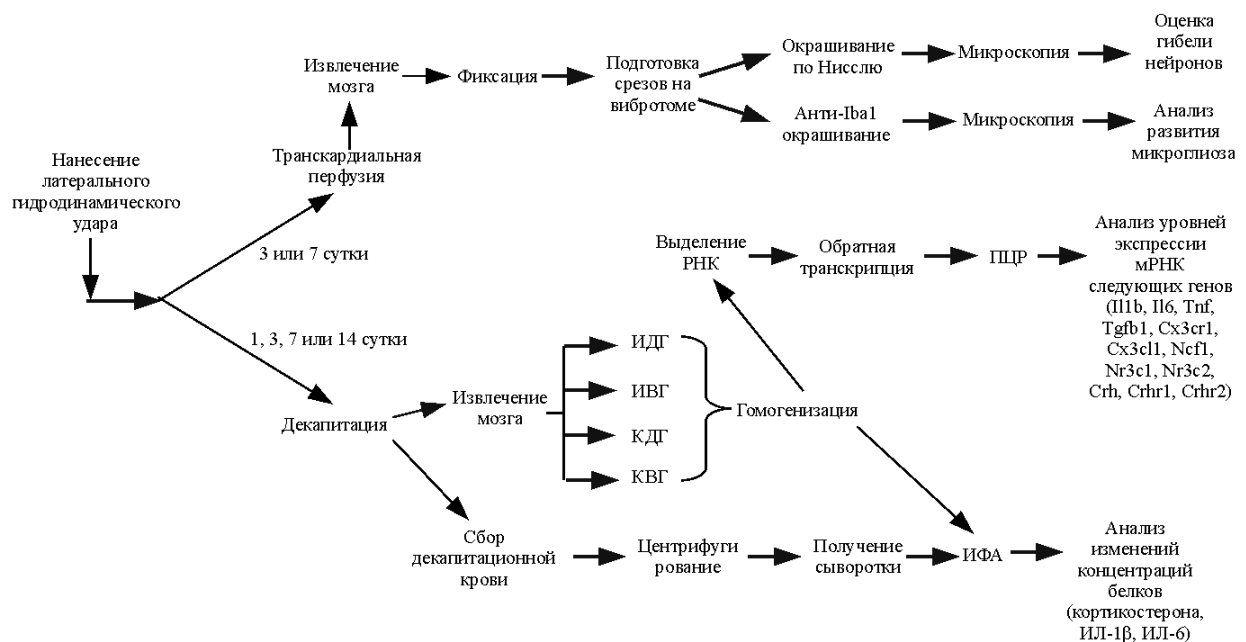


Рисунок 1. Дизайн Эксперимента 1.

Все хирургические манипуляции проводили под ингаляционным наркозом (2-3% изофлуран). Крыс фиксировали в стереотаксисе, затем проводили трепанацию черепа в левой (AP= -3.5 мм, L= +2.00 мм) и правой (AP= -3.5 мм, L= -2.00 мм) теменных костях. Экспериментальные вещества (1 мкл) инъецировали в зубчатые извилины (ЗИ) ДГ (H= -3.5 мм) обоих полушарий при помощи шприца Hamilton со скоростью 0.15 мкл/сек.

После операции животных возвращали в их домашние клетки. Через 3 дня после инъекции крысы были анестезированы 10% хлоралгидратом и подвергнуты транскардиальной перфузии 0.9% раствором NaCl. После чего извлекали мозг и быстро помещали в ледяной раствор NaCl. Далее изолировали гиппокамп, его левую половину делили на ДГ и ВГ для дальнейшего молекулярно-генетического анализа. Правую половину гиппокампа фиксировали в 4% растворе формальдегида для последующего морфологического анализа.

Чтобы оценить степень развития депрессивно-подобного поведения после модуляции ГР и МР при нормальных условиях и после индукции локального нейровоспаления, мы применяли тест предпочтения сахарозы. Сниженное потребление сахарозы (ангедония) в данном тесте считают надежным показателем депрессивно-подобного поведения у крыс [Willner, Muscat, Parr, 1992].

Дизайны Эксперимента 2 и Эксперимента 3 были одинаковыми и представлены на Рисунке 2.

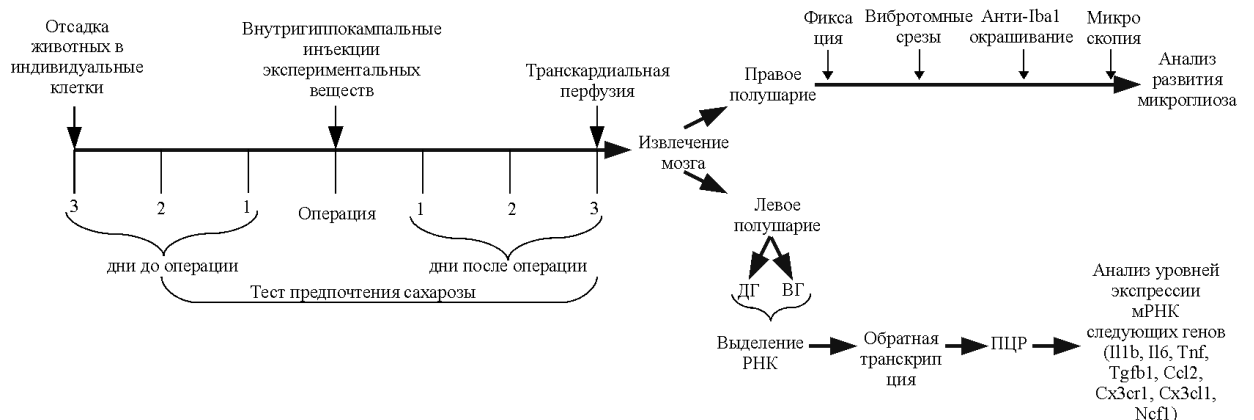


Рисунок 2. Дизайн Экспериментов 2 и 3.

3.3. Биохимический и молекулярно-генетический анализ

3.3.1. Подготовка ткани мозга для Эксперимента 1

Образцы тканей всех частей гиппокампа гомогенизировали при помощи гомогенизатора Поттера в десятикратном избытке холодного буфера для гомогенизации (0.1% NP-40, ингибитор протеаз (Roche), ФСБ) 10-ю ударами пестика при скорости вращения 1000 об/мин. Полученный гомогенат дополнительно размешивали автоматическим дозатором объемом 1 мл, затем 50 мкл отбирали в пробирку типа Eppendorf с 500 мкл реагента для выделения РНК Qiazol (Qiagen). Данную часть гомогената использовали для ПЦР-анализа. Оставшуюся часть гомогената центрифугировали (16900 g, 15 мин, 4⁰C). Далее супернатант использовали для определения концентраций провоспалительных цитокинов и кортикостерона методом ИФА. Аликвоты супернатанта хранили при температуре -80⁰C до момента использования.

3.3.2. Выделение РНК и обратная транскрипция

Выделение РНК производили при помощи реагентов Qiazol (Эксперимент 1) и Extract RNA (Эксперимент 2 и 3) в соответствии с инструкциями производителя. Перед синтезом кДНК, полученную РНК (Эксперимент 1 – 1 мкг, Эксперимент 2 и 3 – 2 мкг) подвергали воздействию фермента ДНКазы I (Thermo Fisher Scientific, USA) согласно инструкциям производителя. 4 мкл смеси после ДНКазной обработки оставляли для дальнейшего использования в качестве отрицательного контроля без обратной транскрипции.

Для синтеза цепи кДНК из оставшихся 7 мкл РНК использовали готовый набор MMLVRTKit (Евроген, SB001, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Продукты, полученные после обратной транскрипции, разводили деионизованной водой в 8 раз.

3.3.3. Количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) «в реальном времени»

Экспрессию целевых генов анализировали, используя готовый набор «qPCRmix-HSSYBR+LowROX» (Евроген, Россия), в соответствии с инструкциями производителя и при помощи прибора для амплификации CFX384 (Bio-Rad). Целевыми генами в Эксперименте 1 были *Cx3cl1*, *Cx3cr1*, *Ncf1*, *Nr3c1*, *Nr3c2*, *Crh*, *Crhr1*, *Crhr2*, *Il1b*, *Tnf*, *Il6*, в Эксперименте 2 и 3 - *Il1b*, *Tnf*, *Il6*, *Tgfb1*, *Ccl2*, *Cx3cl1*, *Cx3cr1*, *Ncf1*. Нуклеотидные последовательности праймеров приведены в Таблице 1. Относительную представленность транскриптов оценивали $2^{-\Delta\Delta Ct}$

методом, учитывая эффективности реакций и нормируя на среднее геометрическое между показателями экспрессии генов *Hprt2* и *Ywhaz*. Гены для нормирования были выбраны на основе анализа транскриптомов гиппокампов крыс, которые показали стабильность экспрессии в условиях нейровоспаления [Dobryakova и др., 2018]. Данные на графиках представлены в виде относительного количества мРНК.

3.3.4. Иммуноферментный анализ (ИФА)

В Эксперименте 1 для определения уровней кортикостерона в сыворотке крови и в гиппокампе использовали готовые наборы для ИФА (EIA4164; DRG) в соответствии с инструкциями производителя. Данные наборы позволяют детектировать как свободный, так и связанный кортикостерон методом конкурентного ИФА.

Уровни провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF α в сыворотке и гиппокампе измеряли, используя готовые наборы R&D Systems Quantikine ELISA согласно инструкциям производителя (SRLB00; SR6000B; RTA00), при помощи считывателя планшетов Hidex Sense (Hidex, Финляндия).

3.4. Морфологический анализ

В Эксперименте 1 фронтальные срезы головного мозга толщиной 50 мкм были подготовлены на вибротоме Leica VT1200S (Leica Biosystems, Germany). Срезы, локализованные в промежутке 600 мкм между координатами 2.1 и 5.8 мм от брегмы, были отобраны для дальнейшего анализа. Для оценки гибели нейронов срезы были окрашены по Нисслю. Соседние с ними срезы были взяты для иммуногистохимического окрашивания на микроглиальный маркер Iba1. Иммуногистохимическое окрашивание проводили согласно стандартному двухдневному протоколу. Мы использовали первичные поликлональные антитела (rabbit anti-Iba1 IgG; Wako, Japan; разведение 1:500) и вторичные антитела (Goat anti-rabbit IgG (H+L) Alexa-488, Invitrogen; разведение 1:500). Микрофотографии срезов, окрашенных по методу Ниссля, делали на микроскопе Keyence BZ-X700 (x20). Микрофотографии иммуногистохимически окрашенных срезов делали на микроскопе AxioImager.Z2 (Carl Zeiss, Германия), используя объектив 40x (NA=0.75) EC Plan-Neofluar, MRm камеру, а также программу Zenblue 2011. Одно изображение собирали с каждой области с 6-ти срезов на каждое животное. На уровне ДГ и ВГ делали по 3 среза; таким образом, для

дальнейшего анализа были использованы три среза на структуру и на животное. Дальнейшие подсчеты микроглиальных клеток производили в программе ImageJ.

В Эксперименте 2 и 3 фронтальные срезы из образцов правых полушарий толщиной 60 мкм были подготовлены на вибротоме Leica VT1200S (Leica Biosystems, Germany). Срезы помещали в раствор криопротектора (фосфатный буфер/этиленгликоль/глицерин, 1:0.75:0.75) и хранили при температуре -20°C . Для иммуногистохимического окрашивания на микроглиальный маркер Iba1 использовали первичные антитела (rabbit anti-Iba1 IgG; Wako, Japan; разведение 1:400) со вторичными антителами (Goat anti-rabbit IgG (H+L) Alexa-488, Invitrogen; разведение 1:500). Для фиксации срезов использовали среду с защитой от выцветания, содержащую DAPI для окрашивания ядер клеток (Invitrogen, USA). Микрофотографии иммуногистохимически окрашенных срезов делали на микроскопе Keyence BZ-9000 (x20). Дальнейшие подсчеты микроглиальных клеток производили в программе ImageJ. Количество микроглиальных клеток считали в каждом срезе в 3-х полях (100x100 мкм) в *stratum radiatum* зоны CA1 и суммировали. Для каждого животного мы изучали 3 среза; срезы включали роstralную часть ДГ (+250-300 мкм от места инъекции), каудальную часть ДГ (-250-300 мкм от места инъекции), а также ВГ с зоной CA1. Результаты роstralной и каудальной частей ДГ усредняли из-за схожей морфологической картины.

Во время подсчета мы выделили 5 подтипов микроглиальных клеток [Savage, Carrier, Tremblay, 2019]:

(1) Отростчатая микроглия, фенотип покоящейся микроглии, который характеризуется маленькой округлой сомой, сильно разветвленными и тонкими отростками, а также округлым ядром, которое занимает почти всё внутреннее пространство сомы;

(2) Амебоидная микроглия, фенотип морфологически сходный с макрофагами, характеризующийся большими круглыми телами клеток без отростков;

(3) Гипертрофированная микроглия, фенотип функционально активированной микроглии, характеризующийся увеличенной сомой с более короткими и толстыми отростками, по сравнению с отростчатой микроглией. Ядра гипертрофированной микроглии не занимают всю внутреннее содержимое сомы;

(4) Палочковидная микроглия, фенотип микроглии, характеризующийся удлиненными клетками с удлиненными ядрами;

(5) Симпласты, клетки морфологически похожие на палочковидную микроглию, но с несколькими ядрами.

Подтипы (2)-(5) связаны с повреждением микроглии. Репрезентативные микрофотографии клеток микроглии различных подтипов представлены на Рисунке 3.

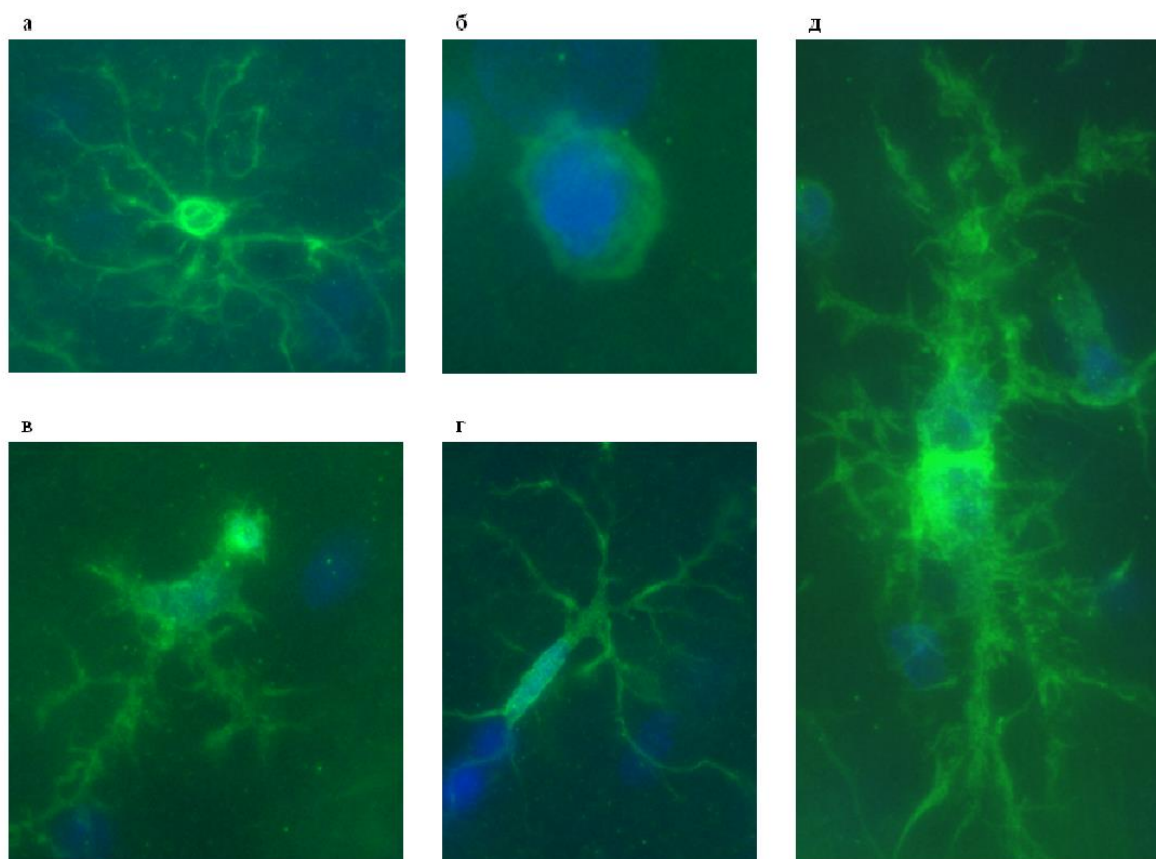


Рисунок 3. Репрезентативные микрофотографии клеток микроглии различных подтипов. а, отростчатая микроглия; б, амёбовидная микроглия; в, гипертрофированная микроглия; г, палочковидная микроглия; д, симпласт. Окрашивание с анти-Iba-1 и DAPI; иммерсионный объектив х60.

3.5. Исследование поведения

Для исследования поведения животных в Экспериментах 2 и 3 использовали тест предпочтения сахарозы.

В течение 1-го дня крыс адаптировали к их индивидуальным клеткам, в которые их поместили для проведения теста предпочтения сахарозы. В течение следующих 5-и дней животным предоставляли выбор между двумя поилками со свежей водой и 1% раствором сахарозы в воде *ad libitum*. Обе поилки взвешивали каждый день в течение всего времени проведения теста предпочтения сахарозы. Количество (г) потребленных воды и раствора

сахарозы фиксировали. Предпочтение сахарозы (%) по сравнению с водой рассчитывали согласно следующей формуле:

$$\text{Условная единица (i)} = \frac{m(\text{сахароза, i})}{m(\text{сахароза, i}) + m(\text{вода, i})} \Bigg/ \text{Ме} \left(\frac{m(\text{сахароза, оптимальные})}{m(\text{сахароза, оптимальные}) + m(\text{вода, оптимальные})} \right)$$

3.6. Статистика

Согласно тестам Шапиро-Уилка и Левена, значения переменных не были нормально распределены и группы имели разные дисперсии. Выбросы исключались из подсчётов автоматически согласно методу 1.5 IQR. В Эксперименте 1 для определения достоверности различий между экспериментальными группами использовали Н-критерий Краскела-Уоллеса с применением *post hoc* теста Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения в программном пакете Python 3.7 SciPy: 4 гипотезы для гистологии, $\alpha=0.0125$; 8 гипотез для ПЦР и ИФА, $\alpha=0.00625$. В Эксперименте 2 и 3 для определения достоверности различий между экспериментальными группами использовали тест Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения в программном пакете Python 3.7 SciPy: (1) Эксперимент 2 - 5 гипотез, $\alpha=0.01$; (2) Эксперимент 3 - 8 гипотез, $\alpha=0.00625$. Для определения достоверности различий экспериментальных эффектов в тесте предпочтения сахарозы использовали тест Фридмана с применением *post hoc* теста Ньюмена. Данные на графиках представлены в виде диаграмм размаха: полосы обозначают медианы, диаграммы обозначают квантили, усы обозначают $Q1-1.5*IQR$ и $Q3+1.5*IQR$.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ

4.1. Эксперимент 1 - временная динамика последствий фокального повреждения мозга

4.1.1. Анализ морфологии гиппокампа после ЧМТ

Изменения морфологии, а именно плотности нейронов и развитие микроглиоза, оценивали в трёх областях ДГ и ВГ обоих полушарий - СА1, СА3 и ЗИ – на 3-и и 7-е сутки после ЧМТ.

После ЧМТ количество нейронов в ЗИ ипсилатерального полушария снижалось уже на 3-и сутки (ИДГ: ЗИ, $N = 13.048$, $p = 0.001$; СА1, $N = 10.165$, $p = 0.006$; ИВГ: ЗИ, $N = 15.333$, $p = 0.0$; СА3, $N = 8.039$, $p = 0.018$; КДГ: ЗИ, $N = 8.557$, $p = 0.014$; КВГ: ЗИ, $N = 11.783$, $p = 0.003$) (Рисунок 4). К 7-м суткам после ЧМТ данный процесс распространялся на ЗИ контралатерального полушария (ИДГ: ЗИ, $N = 11.121$, $p = 0.004$; СА1, $N = 11.196$, $p = 0.004$; ИВГ: ЗИ, $N = 7.592$, $p = 0.022$; СА1, $N = 10.19$, $p = 0.006$; СА3, $N = 6.523$, $p = 0.038$; КДГ: ЗИ, $N = 13.882$, $p = 0.001$; СА1, $N = 15.535$, $p = 0.0$; КВГ: ЗИ, $N = 8.915$, $p = 0.012$; СА1, $N = 8.76$, $p = 0.013$) (Рисунок 5, 6). Изменений количества нейронов в областях СА1 и СА3 после нанесения удара не было обнаружено.

Количество клеток микроглии не изменялось к 3-м суткам после ЧМТ (ИДГ: ЗИ, $N = 6.582$, $p = 0.037$; ИВГ: СА3, $N = 12.347$, $p = 0.002$; КВГ: СА3, $N = 8.268$, $p = 0.016$) (Рисунок 7), но уже значительно увеличивалось к 7-м суткам после ЧМТ в ДГ (ИДГ: ЗИ, $N = 14.683$, $p = 0.001$; СА1, $N = 6.12$, $p = 0.047$; СА3, $N = 6.737$, $p = 0.034$; КДГ: ЗИ, $N = 16.765$, $p = 0.0$; СА3, $N = 7.835$, $p = 0.02$) и ВГ (ИВГ: ЗИ, $N = 17.345$, $p = 0.0$; СА1, $N = 7.728$, $p = 0.021$; СА3, $N = 14.575$, $p = 0.001$; КВГ: СА1, $N = 6.873$, $p = 0.032$) обоих полушарий (Рисунок 8, 9). Таким образом, гибель нейронов, наблюдаемая на 3-и сутки после ЧМТ в ИДГ, не связана с развитием микроглиоза (Рисунок 4, 7).

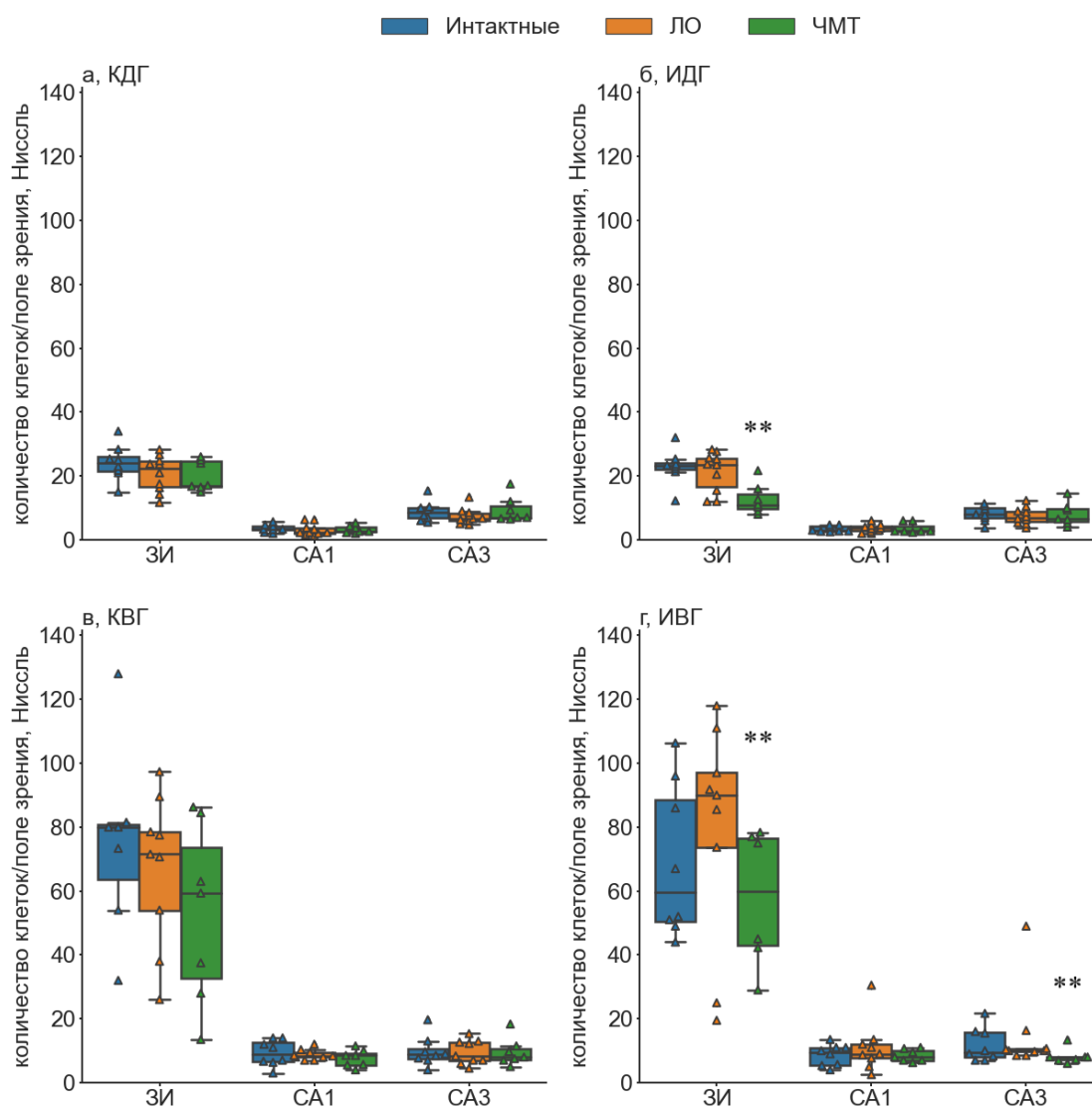


Рисунок 4. Окрашивание нейронов по Нисслю в гиппокампе на 3-и сутки после ЧМТ. а, КДГ – контралатеральный дорсальный гиппокамп; б, ИДГ – ипсилатеральный дорсальный гиппокамп; в, КВГ – контралатеральный вентральный гиппокамп; г, ИВГ – ипсилатеральный вентральный гиппокамп. Области гиппокампа – ЗИ (зубчатая извилина), СА1, СА3. * 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.

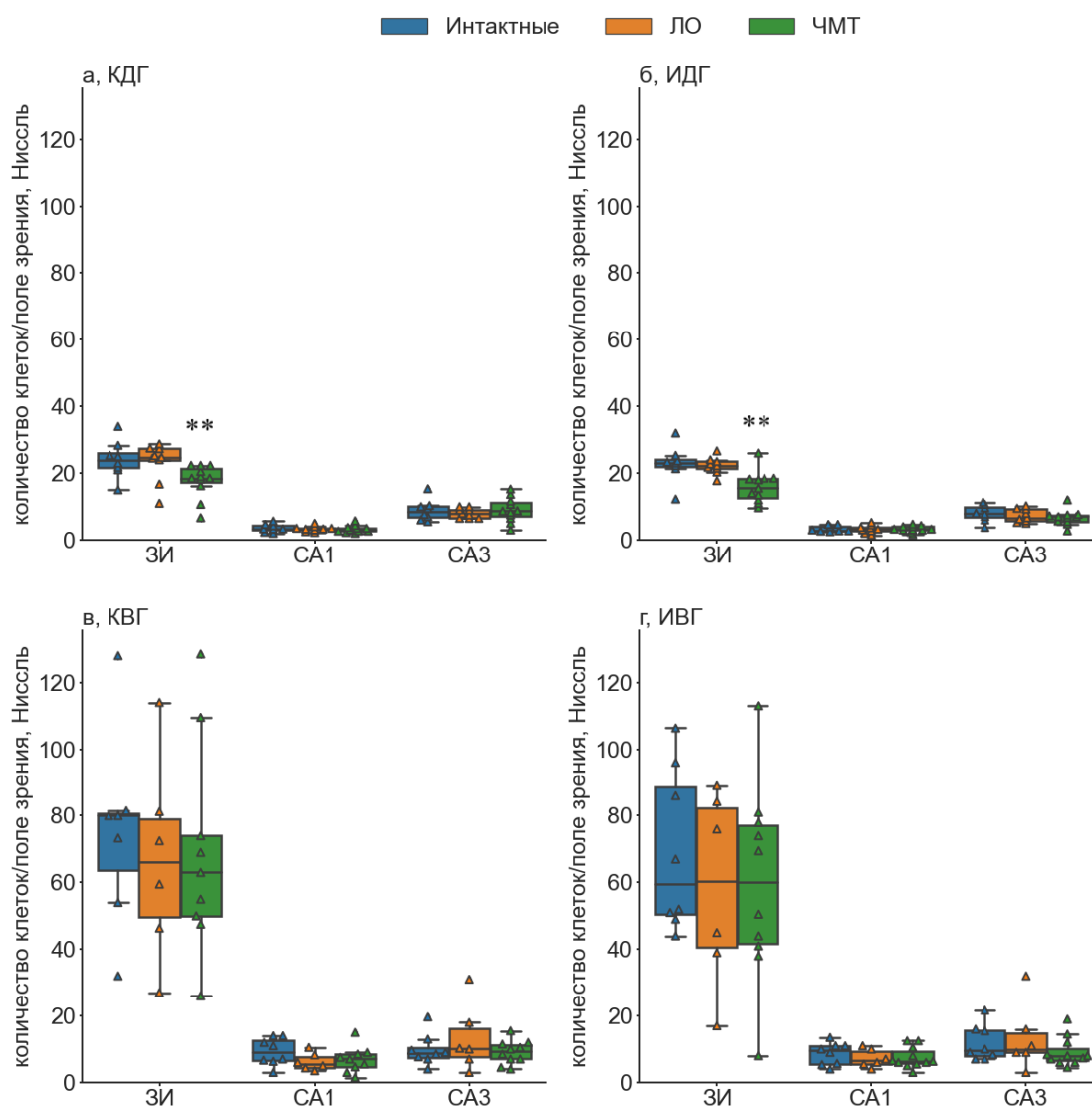


Рисунок 5. Окрашивание нейронов по Нислю в гиппокампе на 7-е сутки после ЧМТ. а, КДГ – контралатеральный дорсальный гиппокамп; б, ИДГ – ипсилатеральный дорсальный гиппокамп; в, КВГ – контралатеральный вентральный гиппокамп; г, ИВГ – ипсилатеральный вентральный гиппокамп. Области гиппокампа – ЗИ (зубчатая извилина), СА1, СА3. * и **, тенденция ($0.0125 \leq p < 0.05$) и достоверные ($p < 0.0125$) различия ЧМТ vs ЛО, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения.

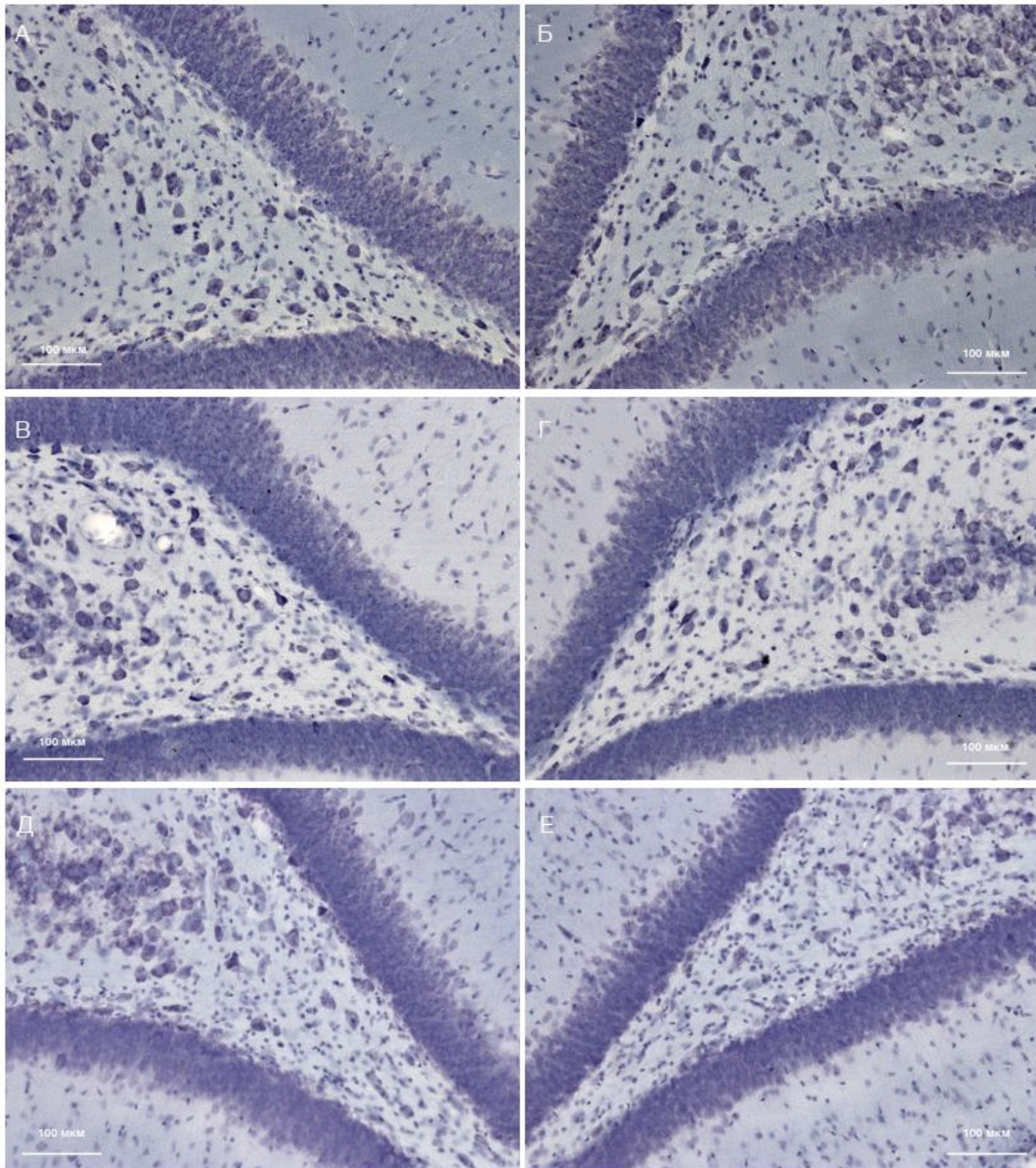


Рисунок 6. Гибель нейронов в гиппокампальной ЗИ, репрезентативные микрофотографии. А, Б – контрольное животное; В, Г – ЛО крыса на 7-е сутки после краниотомии; Д, Е – гибель нейронов на 7-е сутки после ЧМТ. Микрофотографии ипсилатерального гиппокампа представлены с левой стороны (А, В, Д). Окрашиванию по Нисслю.

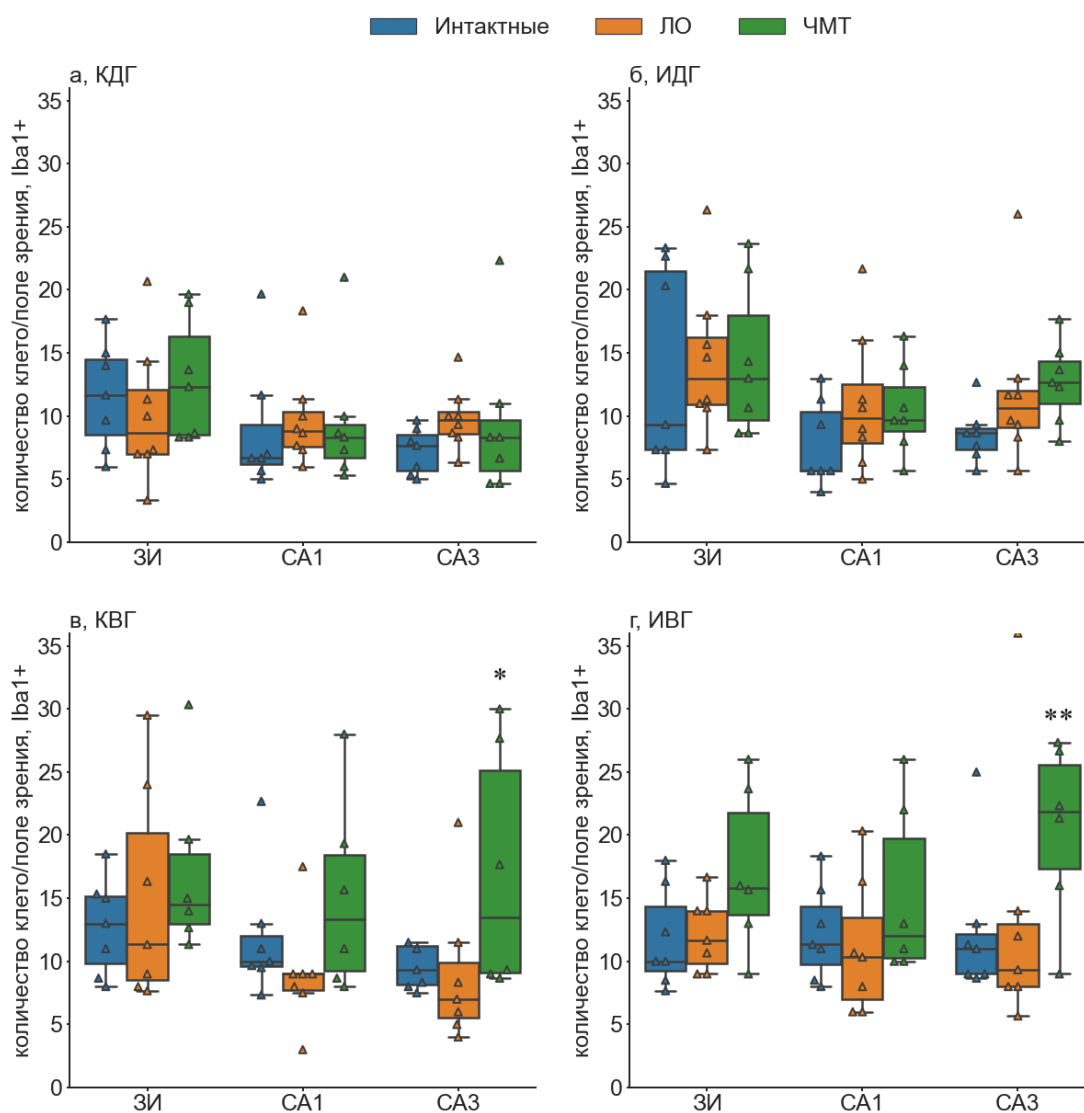


Рисунок 7. Иммуногистохимическое окрашивание на маркер микроглиальных клеток Iba1 в разных отделах гиппокампа на 3-и сутки после ЧМТ. а, КДГ – контралатеральный дорсальный гиппокамп; б, ИДГ – ипсилатеральный дорсальный гиппокамп; в, КВГ – контралатеральный ventральный гиппокамп; г, ИВГ – ипсилатеральный ventральный гиппокамп. Области гиппокампа – ЗИ, СА1, СА3. * 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.

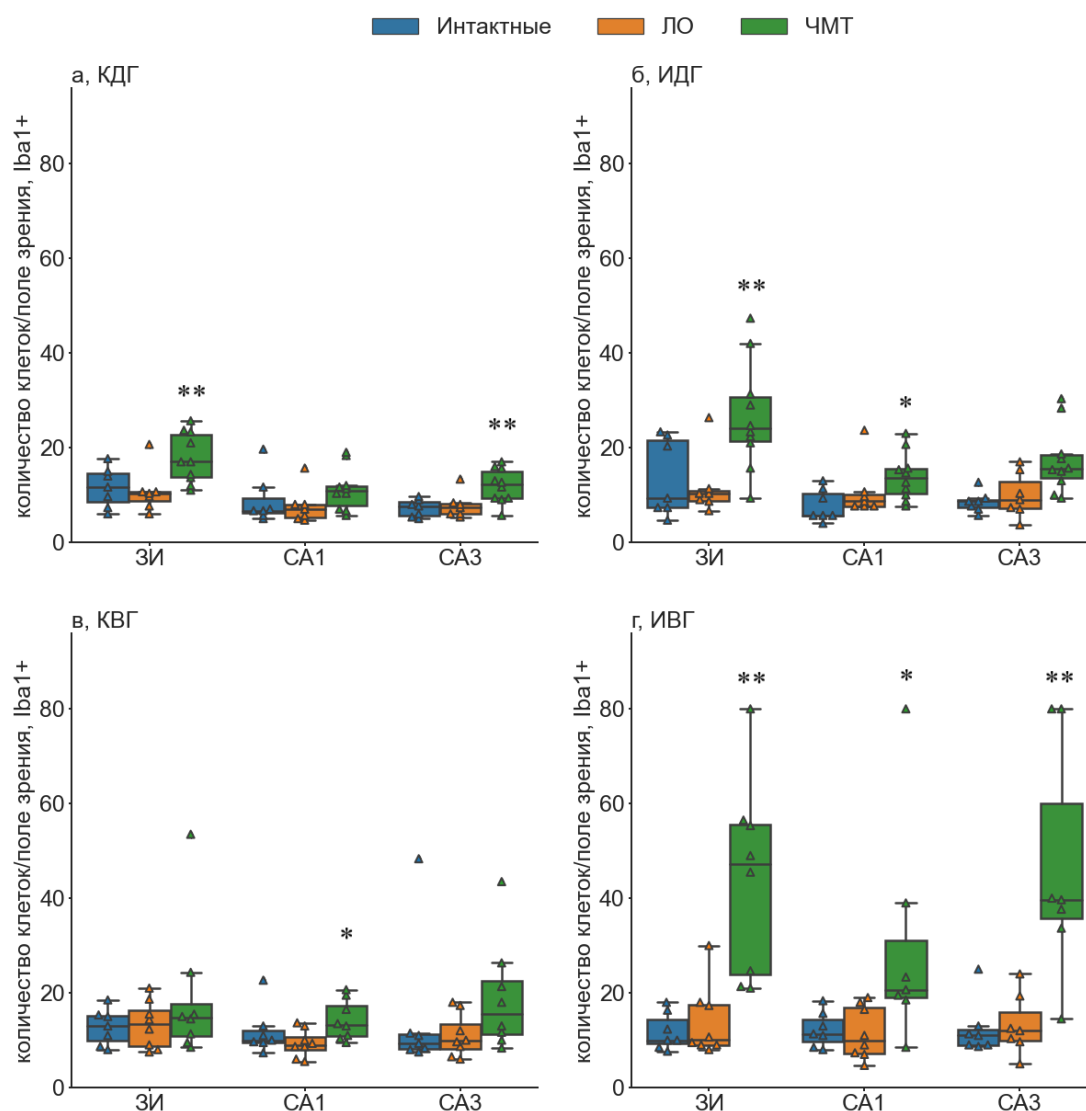


Рисунок 8. Иммуногистохимическое окрашивание на маркер микроглиальных клеток Iba1 в разных отделах гиппокампа на 7-е сутки после ЧМТ. а, КДГ – контралатеральный дорсальный гиппокамп; б, ИДГ – ипсилатеральный дорсальный гиппокамп; в, КВГ – контралатеральный ventральный гиппокамп; г, ИВГ – ипсилатеральный ventральный гиппокамп. Области гиппокампа – ЗИ, СА1, СА3. * 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.

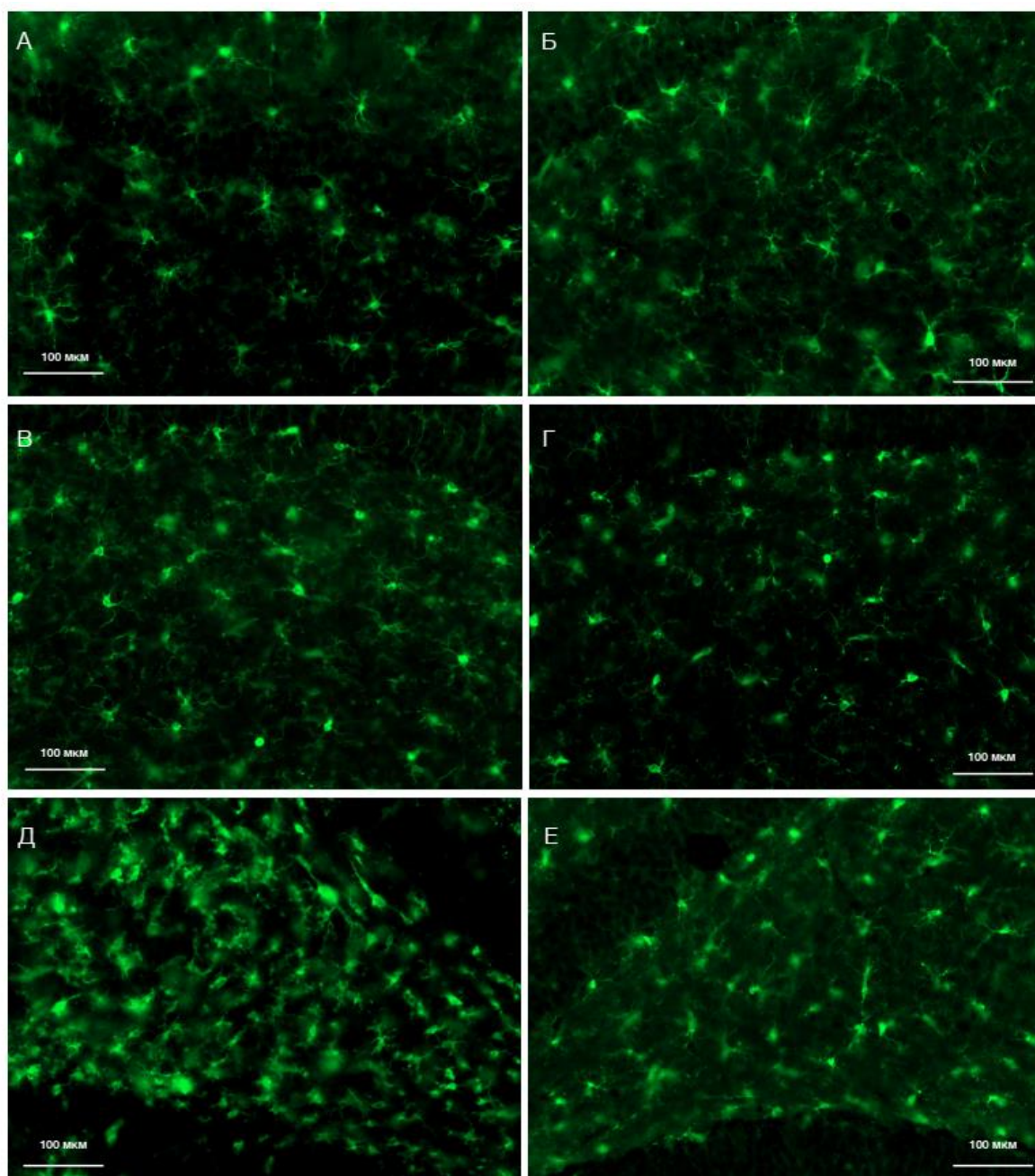


Рисунок 9. Активация микроглии в ЗИ, репрезентативные микрофотографии. А, Б – контрольное животное; В, Г – ЛО крыса на 7-е сутки после краниотомии; Д, Е – микроглиальная активация на 7-е сутки после ЧМТ. Микрофотографии ипсилатерального гиппокампа представлены с левой стороны (А, В, Д). Anti-Iba-1 окрашивание.

Для более полного понимания состояния микроглии после травмы проводили измерения уровней экспрессии генов микроглиальных маркеров - *Cx3cl1*, *Cx3cr1* и *Ncf1*. Уровень экспрессии гена *Cx3cl1* снижался только в ИДГ на 1-е сутки после ЧМТ по сравнению с ЛО

животными (1 день: ИДГ, $N = 14.33$, $p = 0.001$) (Рисунок 10). В КВГ и ИВГ было обнаружено снижение экспрессии гена *Sx3cl1* у ЛО животных по сравнению с интактными в 1-е несколько дней после операции (1 день: ИВГ, $N = 6.138$, $p = 0.046$; КВГ, $N = 10.725$, $p = 0.005$; 3 день: КВГ, $N = 8.017$, $p = 0.018$; 7 день: КВГ, $N = 7.411$, $p = 0.025$) (Рисунок 10).

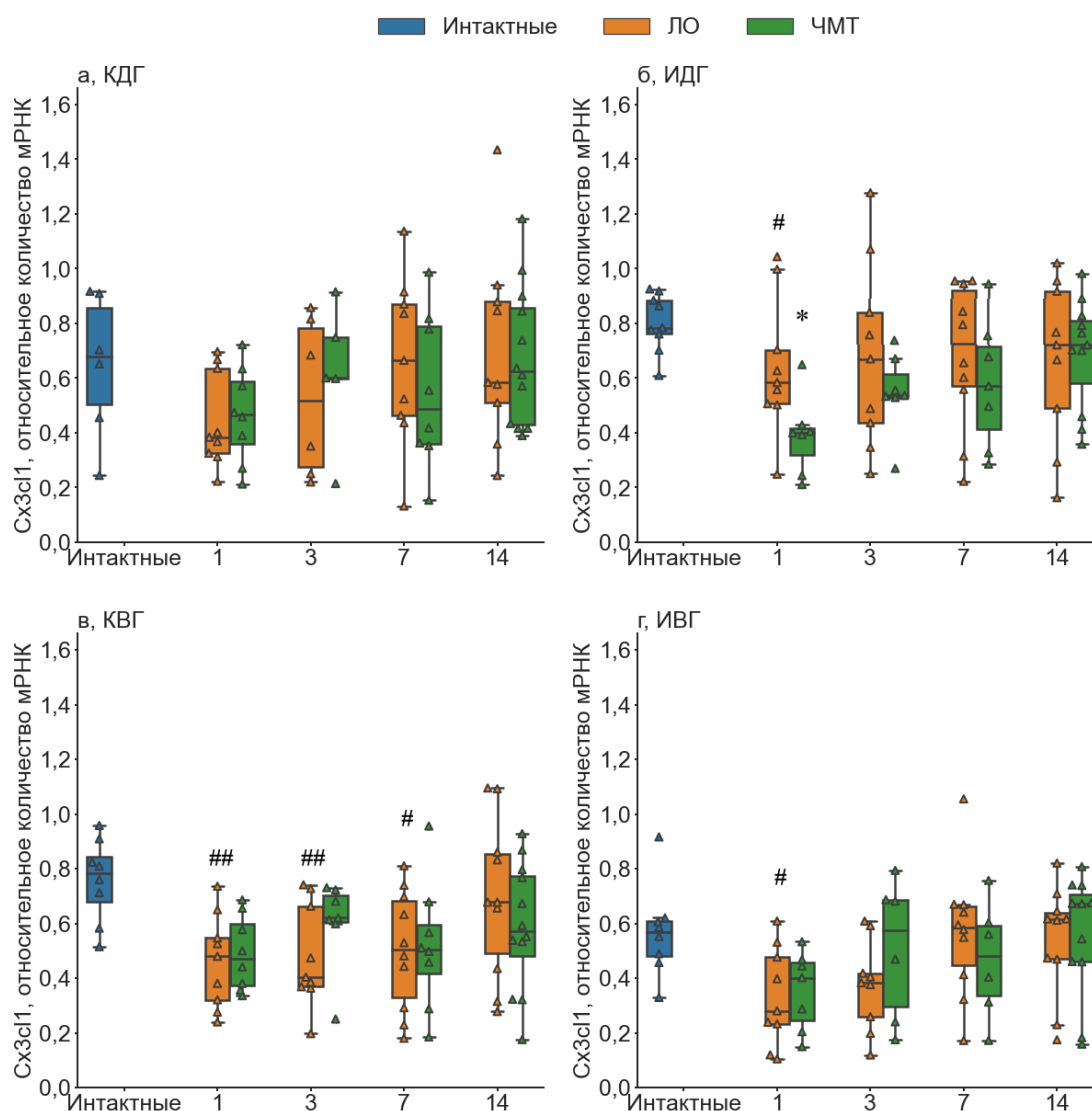


Рисунок 10. Временная динамика экспрессии мРНК *Sx3cl1* в различных отделах гиппокампа после ЧМТ (1-е, 3-и, 7-е и 14-е сутки). а, КДГ – контралатеральный дорсальный гиппокамп; б, ИДГ – ипсилатеральный дорсальный гиппокамп; в, КВГ – контралатеральный вентральный гиппокамп; г, ИВГ – ипсилатеральный вентральный гиппокамп. * и **, тенденция ($0.00625 \leq p < 0.05$) и достоверные ($p < 0.00625$) 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.

Анализируя эффект ЧМТ, мы обнаружили значительное увеличение экспрессии *Cx3cr1* во всех частях гиппокампа на 1-е сутки (КВГ: $H = 6.045$, $p = 0.049$; ИВГ: $H = 10.937$, $p = 0.004$) (Рисунок 11). В контралатеральном полушарии данный подъем заканчивался к 3-у дню (ИДГ: $H = 12.181$, $p = 0.002$; ИВГ: $H = 9.766$, $p = 0.008$) (Рисунок 11), в то время как в ипсилатеральном полушарии уровень экспрессии *Cx3cr1* оставался повышенным вплоть до 7-х суток (ИДГ: $H = 7.486$, $p = 0.024$; ИВГ: $H = 8.384$, $p = 0.015$) и возвращался к уровню ЛО животных к 14-му дню (ИДГ: $H = 7.321$, $p = 0.026$) (Рисунок 11). В ВГ обоих полушарий было обнаружено снижение экспрессии *Cx3cr1* в 1-е сутки после операции у ЛО животных по сравнению с интактными.

Изменения мРНК другого микроглиального маркера *Ncf1* были схожими с таковыми *Cx3cr1*. ЧМТ приводила к увеличению экспрессии *Ncf1*, которое прекращалось к 14-му дню; однако, такой эффект по гену *Ncf1* наблюдали только в ипсилатеральном полушарии (1 день: ИДГ, $H = 10.713$, $p = 0.005$; ИВГ, $H = 13.142$, $p = 0.001$; 3 день: ИДГ, $H = 7.854$, $p = 0.02$; ИВГ, $H = 8.438$, $p = 0.015$; 7 день: ИДГ, $H = 11.372$, $p = 0.003$; ИВГ, $H = 7.607$, $p = 0.022$; КДГ, $H = 10.307$, $p = 0.006$; 14 день: ИДГ, $H = 8.697$, $p = 0.013$) (Рисунок 12). Таким образом, полученные данные по уровню экспрессии генов микроглиальных маркеров подтверждают данные морфологии, показывая, что микроглия находится в активированном состоянии длительное время после ЧМТ.

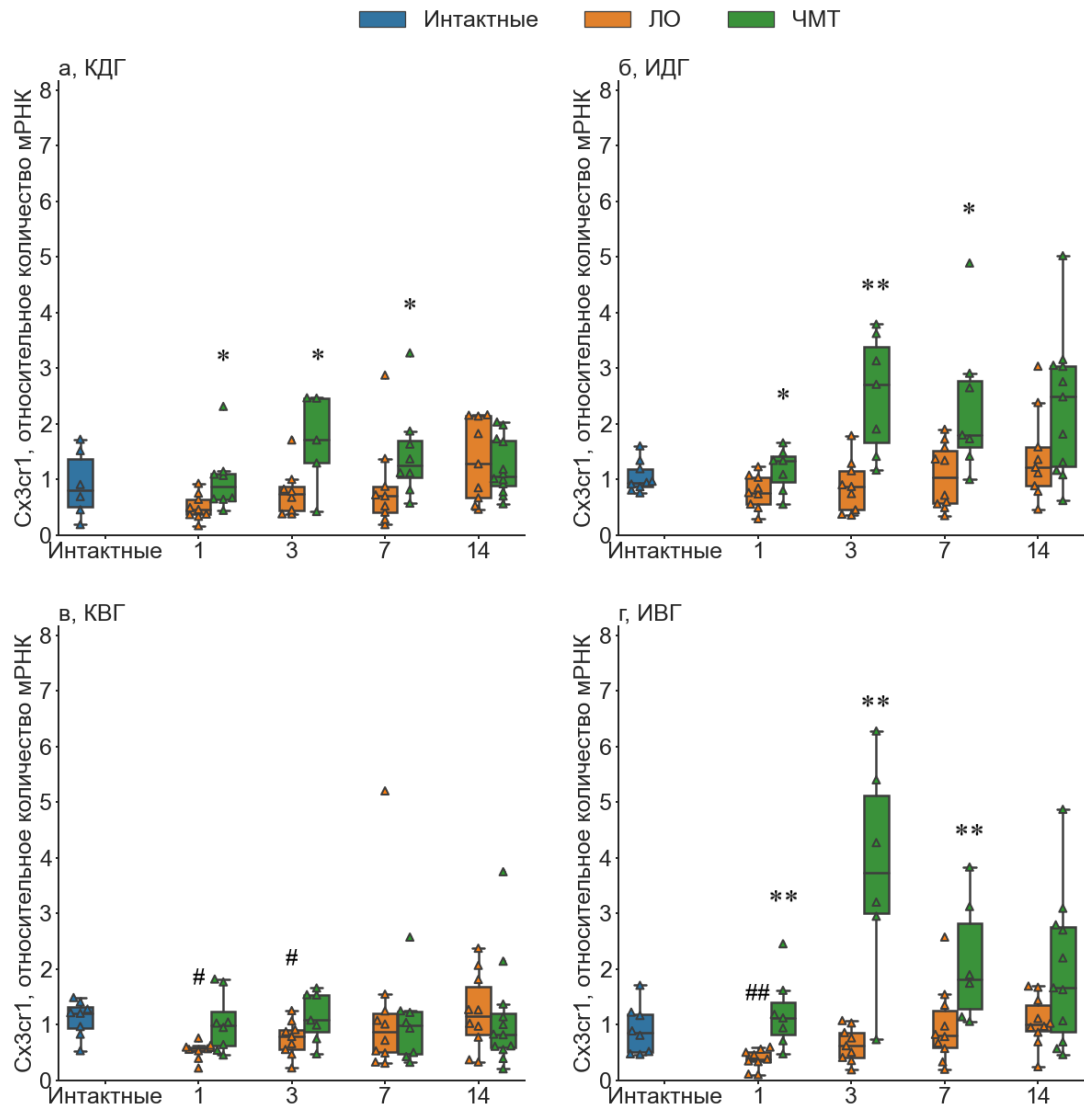


Рисунок 11. Временная динамика экспрессии мРНК *Sx3cr1* в различных отделах гиппокампа после ЧМТ (1-е, 3-и, 7-е и 14-е сутки). а, КДГ – контралатеральный дорсальный гиппокамп; б, ИДГ – ипсилатеральный дорсальный гиппокамп; в, КВГ – контралатеральный вентральный гиппокамп; г, ИВГ – ипсилатеральный вентральный гиппокамп. * и **, тенденция ($0.00625 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.00625$) 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.

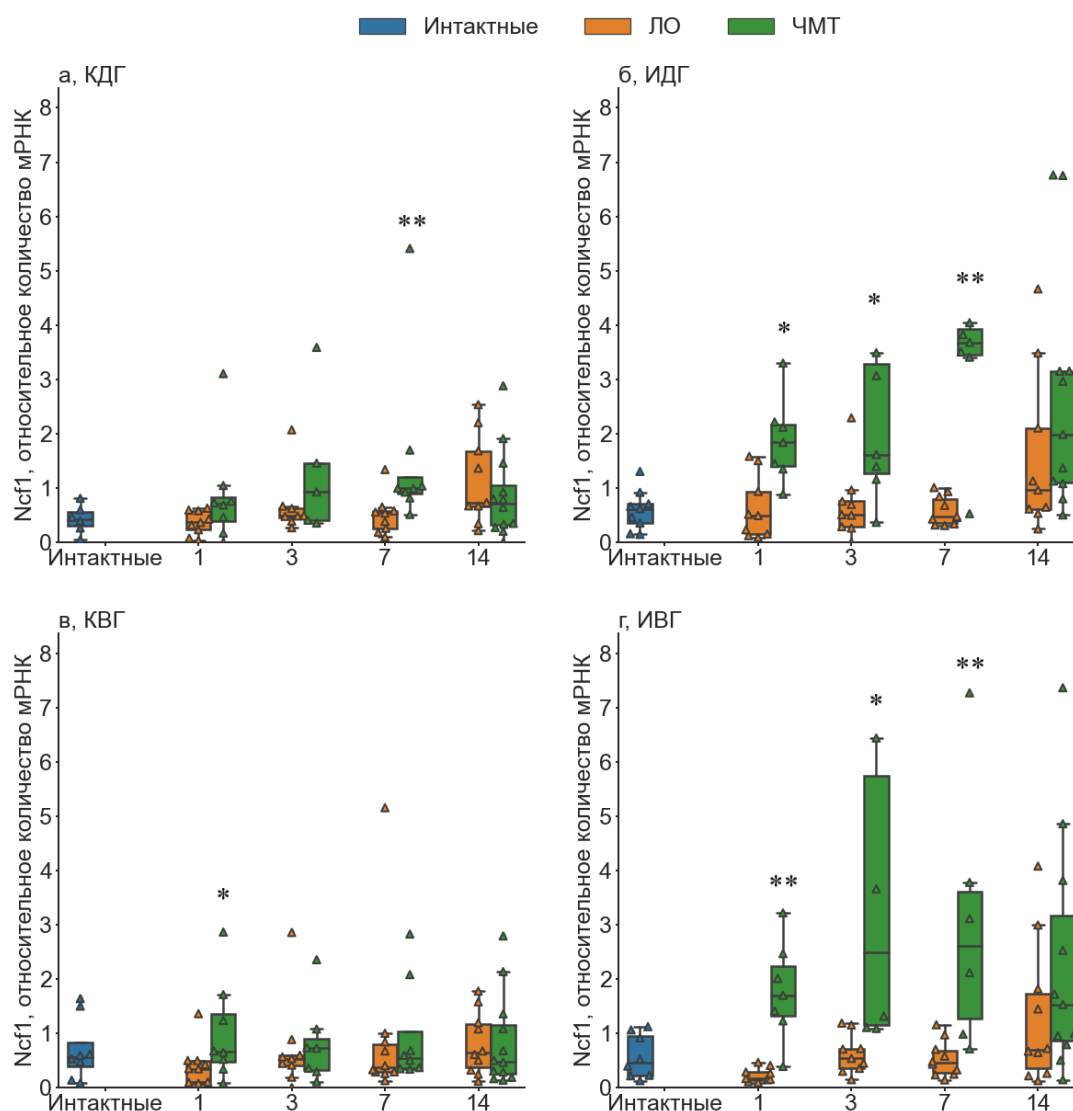


Рисунок 12. Временная динамика экспрессии мРНК *Ncf1* в различных отделах гиппокампа после ЧМТ (1-е, 3-и, 7-е и 14-е сутки). а, КДГ – контралатеральный дорсальный гиппокамп; б, ИДГ – ипсилатеральный дорсальный гиппокамп; в, КВГ – контралатеральный вентральный гиппокамп; г, ИВГ – ипсилатеральный вентральный гиппокамп. * и **, тенденция ($0.00625 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.00625$) 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.

4.1.2. Изменения уровня маркеров, ассоциированных со стресс-реактивностью, после ЧМТ

Кортикостерон является хорошо известным маркером стрессового ответа, в связи с чем его уровень измеряли во всех областях гиппокампа, а также в сыворотке крови. Концентрация кортикостерона возрастала во всех частях на 3-и сутки после ЧМТ (ИДГ:Н = 8.803, $p = 0.012$; ИВГ:Н = 11.523, $p = 0.003$; КДГ:Н = 9.7, $p = 0.008$; КВГ:Н = 10.595, $p = 0.005$), а к 7-му дню она падала до уровня, наблюдаемого у ЛО животных (Рисунок 13).

Временная динамика изменения концентрации кортикостерона в сыворотке крови была такой же, как в гиппокампе – рост концентрации на 3-и сутки после ЧМТ (Н = 11.169, $p = 0.004$) (Рисунок 14).

Так как функции кортикостерона опосредованы ГР и МР, то изменения в уровне экспрессии генов данных рецепторов могут косвенно говорить об изменении ответа гиппокампальных клеток на изменения концентрации кортикостерона. Следовательно, были проанализированы уровни экспрессия генов ГР и МР (*Nr3c1* и *Nr3c2*, соответственно) во всех отделах гиппокампа (*Nr3c1*, 1 день: ИДГ: Н = 6.677, $p = 0.035$; КДГ:Н = 9.157, $p = 0.01$; КВГ: Н = 8.927, $p = 0.012$; 3 день: ИВГ, Н = 6.271, $p = 0.043$; 14 день: КВГ, Н = 7.359, $p = 0.025$) (*Nr3c2*, ИДГ, 1 день: Н = 8.783, $p = 0.012$; КДГ, Н = 6.826, $p = 0.033$; 3 день: КВГ, Н = 6.268, $p = 0.044$; 7 день: Н = 8.244, $p = 0.016$; КВГ, Н = 8.49, $p = 0.014$). Значимых изменений не было выявлено (Рисунок 15, 16).

В стрессовый ответ в гиппокампе может быть вовлечен сигнальный путь КРГ, синтезируемого некоторыми гиппокампальными интернейронами, в связи с чем во всех отделах гиппокампа были проанализированы изменения относительной представленности генов самого КРГ (*Crh*) и его рецепторов (*Crhr1* и *Crhr2*) после ЧМТ. Однако значительного влияния ЧМТ на уровни экспрессии генов *Crh* (1 день: ИВГ, Н = 16.141, $p = 0.0$; КВГ, Н = 6.44, $p = 0.04$; 3 день: ИВГ, Н = 7.15, $p = 0.028$; КДГ, Н = 7.858, $p = 0.02$; КВГ, Н = 10.63, $p = 0.005$) (Рисунок 17), *Crhr1* (1 день: ИДГ, Н = 10.885, $p = 0.004$; ИВГ, Н = 6.838, $p = 0.033$; КВГ, Н = 8.24, $p = 0.016$; 3 день: ИВГ, Н = 8.303, $p = 0.016$) (Рисунок 18) и *Crhr2* (1 день: ИДГ, Н = 6.684, $p = 0.035$; КДГ: Н = 7.146, $p = 0.028$; ИВГ, Н = 6.864, $p = 0.032$; 3 день: КВГ, Н = 7.711, $p = 0.021$; 14 день: КДГ, Н = 7.209, $p = 0.027$) (Рисунок 19) не было выявлено.

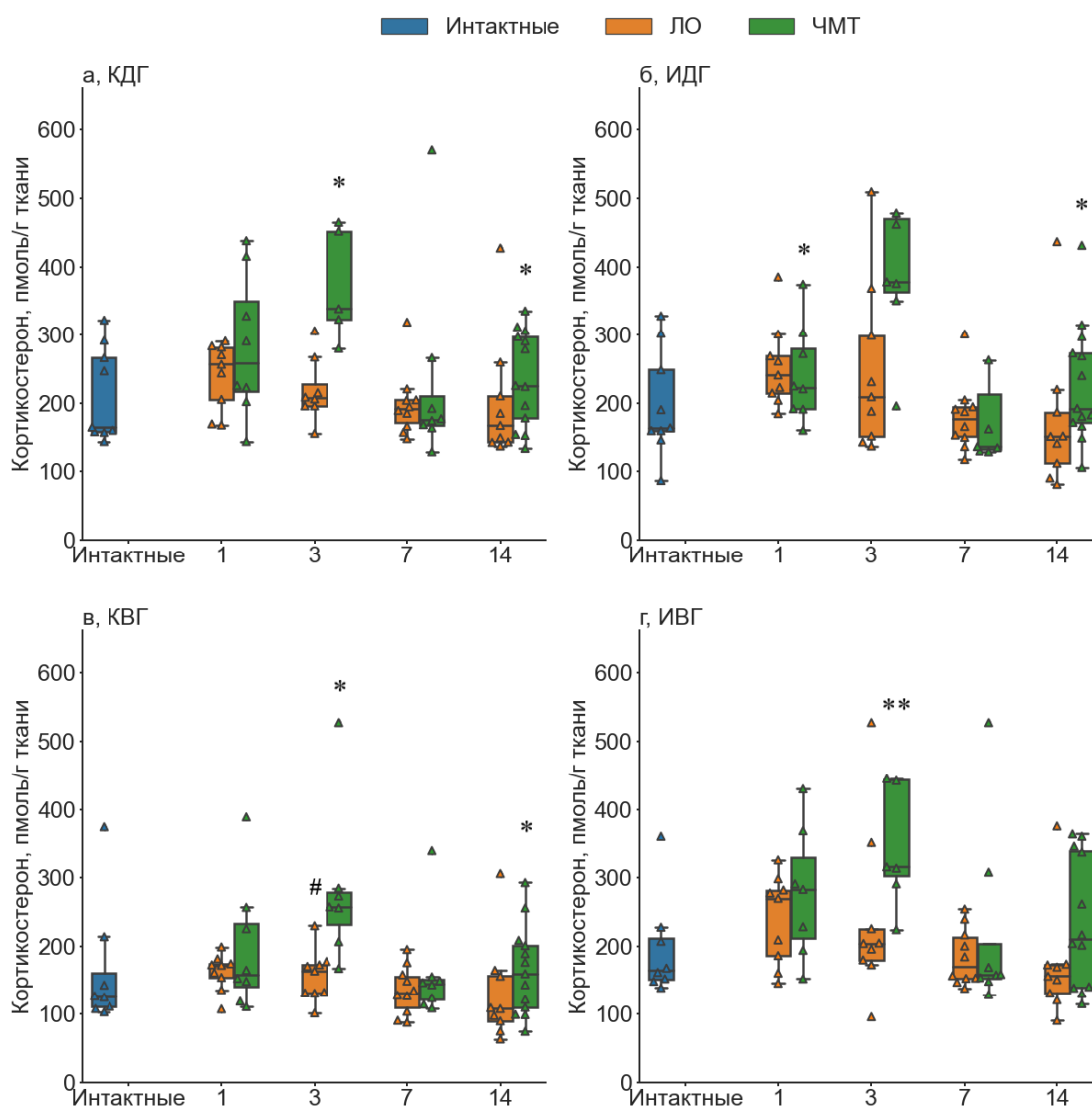


Рисунок 13. Изменения концентрации кортикостерона в различных отделах гиппокампа после ЧМТ (1-е, 3-и, 7-е и 14-е сутки). а, КДГ – контралатеральный дорсальный гиппокамп; б, ИДГ – ипсилатеральный дорсальный гиппокамп; в, КВГ – контралатеральный вентральный гиппокамп; г, ИВГ – ипсилатеральный вентральный гиппокамп. * и **, тенденция ($0.00625 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.00625$) различия ЧМТ vs ЛО, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения.

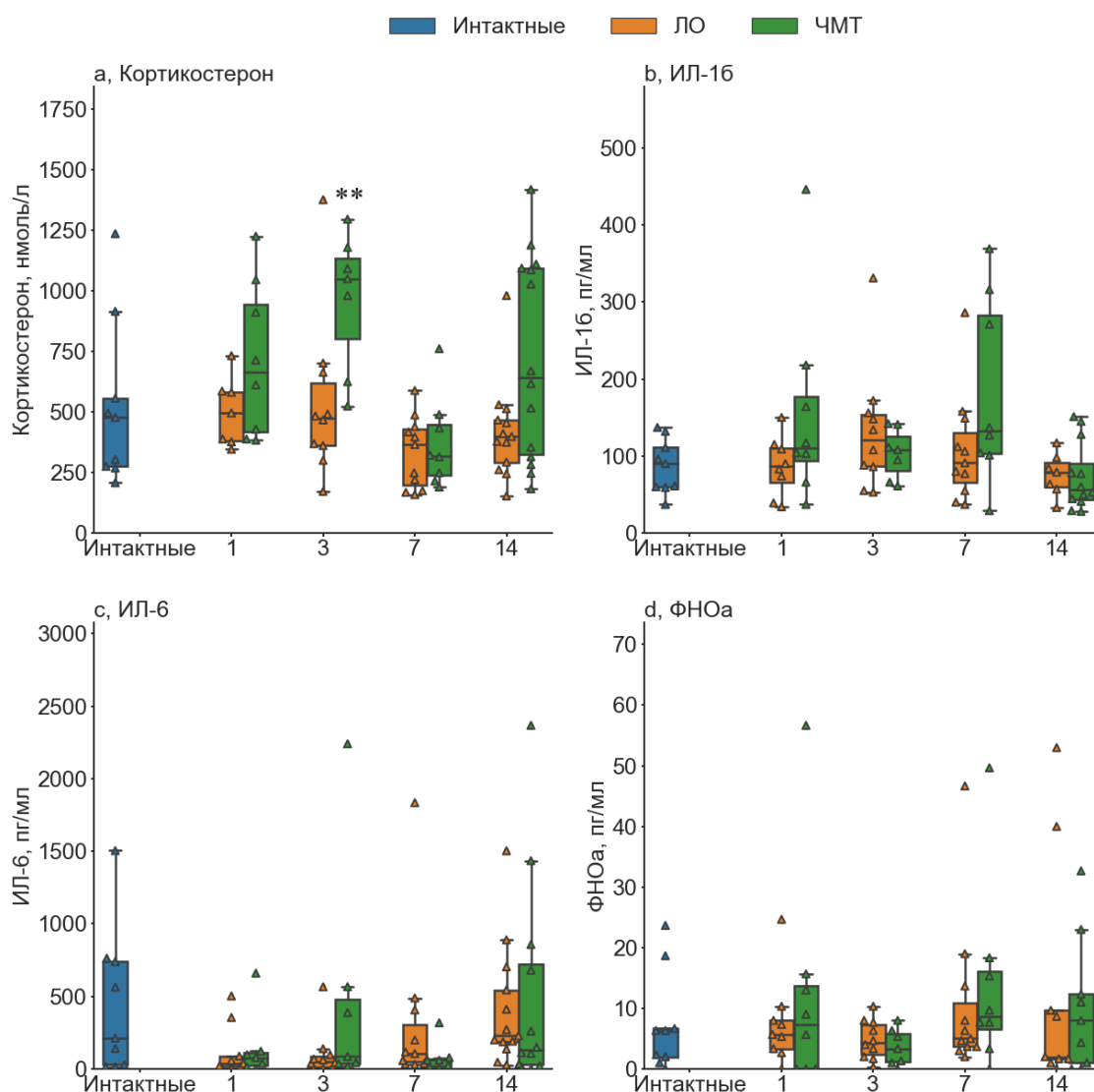


Рисунок 14. Изменения концентрации кортикостерона и провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, TNF α) в сыворотке крови после ЧМТ (1-е, 3-и, 7-е и 14-е сутки). * и **, тенденция ($0.00625 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.00625$) различия ЧМТ vs ЛО, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения.

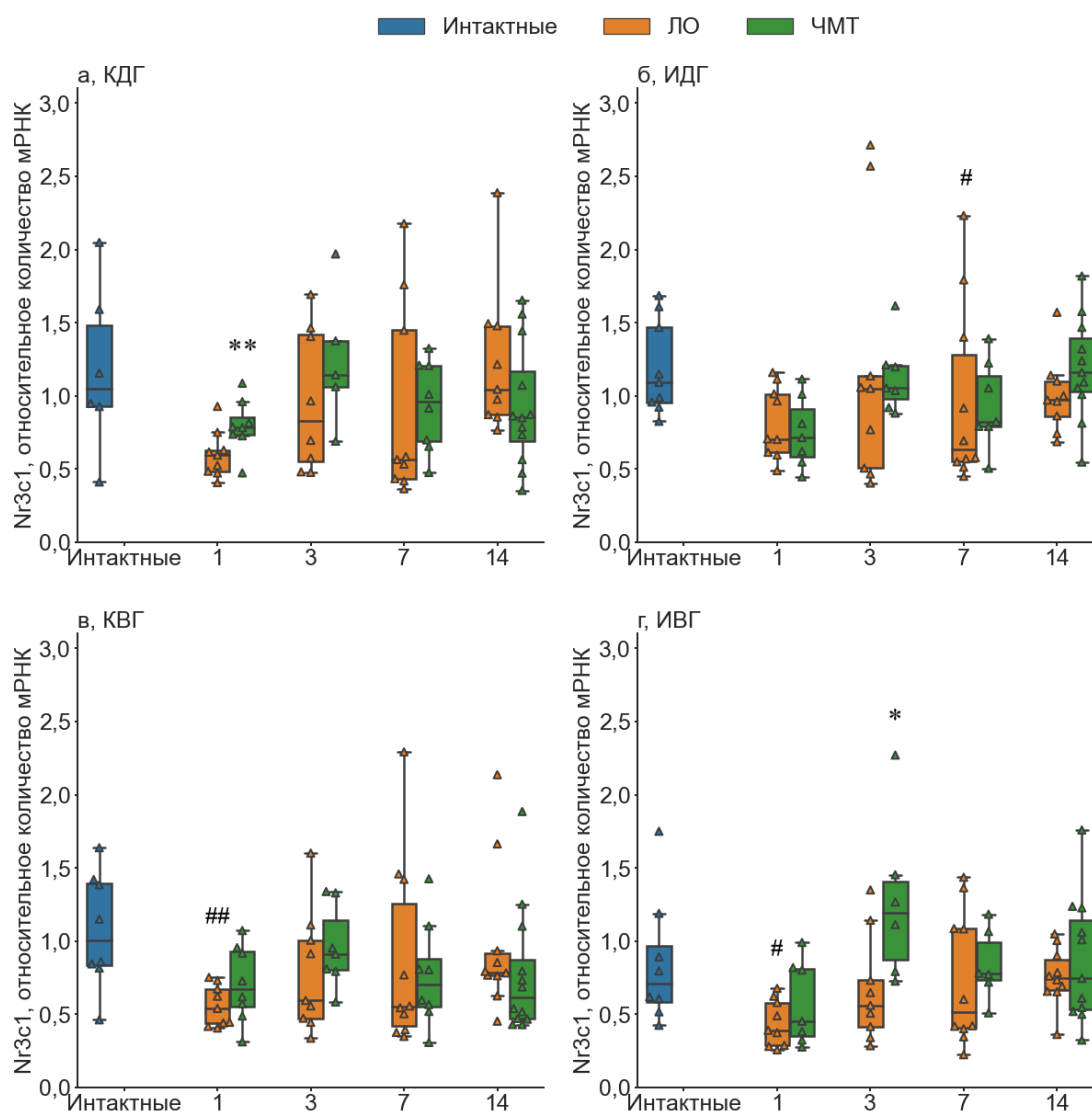


Рисунок 15. Временная динамика экспрессии мРНК *Nr3c1* в различных отделах гиппокампа после ЧМТ (1-е, 3-и, 7-е и 14-е сутки). а, КДГ – контралатеральный дорсальный гиппокамп; б, ИДГ – ипсилатеральный дорсальный гиппокамп; в, КВГ – контралатеральный вентральный гиппокамп; г, ИВГ – ипсилатеральный вентральный гиппокамп. * и **, тенденция ($0.00625 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.00625$) 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.

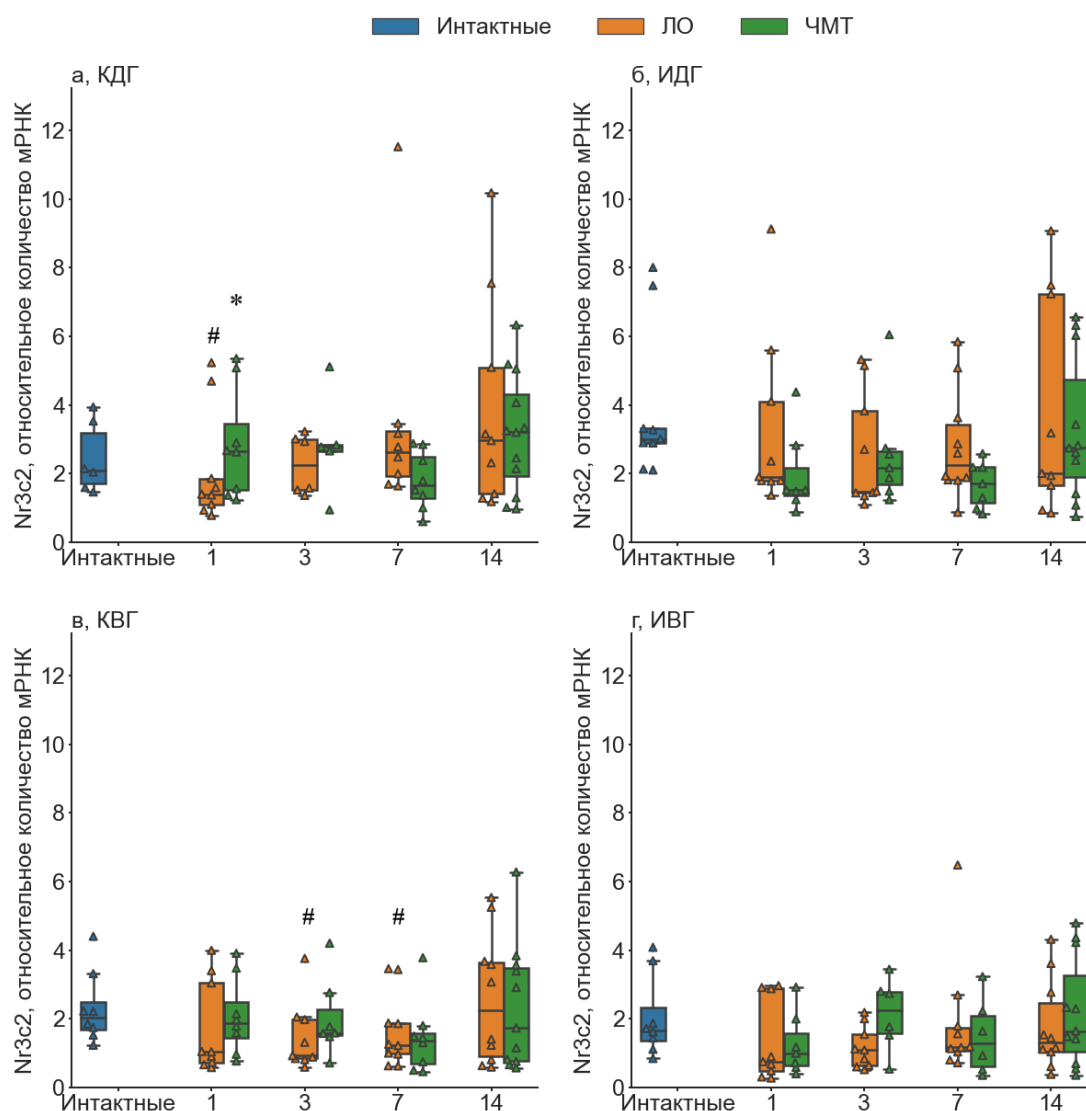


Рисунок 16. Временная динамика экспрессии мРНК *Nr3c2* в различных отделах гиппокампа после ЧМТ (1-е, 3-и, 7-е и 14-е сутки). а, КДГ – контралатеральный дорсальный гиппокамп; б, ИДГ – ипсилатеральный дорсальный гиппокамп; в, КВГ – контралатеральный вентральный гиппокамп; г, ИВГ – ипсилатеральный вентральный гиппокамп. * и **, тенденция ($0.00625 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.00625$) 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.

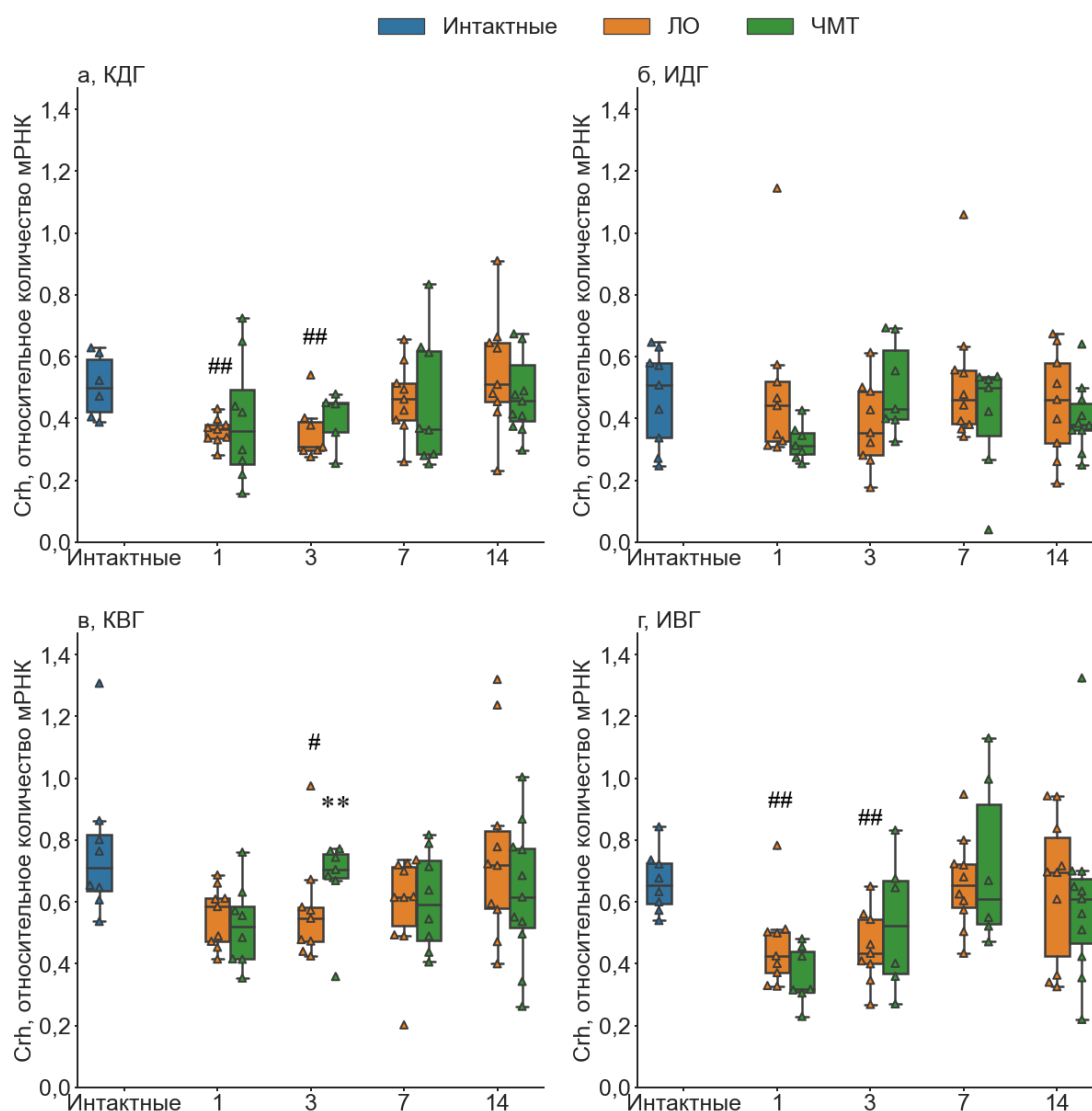


Рисунок 17. Временная динамика экспрессии мРНК *Crh* в различных отделах гиппокампа после ЧМТ (1-е, 3-и, 7-е и 14-е сутки). а, КДГ – контралатеральный дорсальный гиппокамп; б, ИДГ – ипсилатеральный дорсальный гиппокамп; в, КВГ – контралатеральный вентральный гиппокамп; г, ИВГ – ипсилатеральный вентральный гиппокамп. * и **, тенденция ($0.00625 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.00625$) 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.

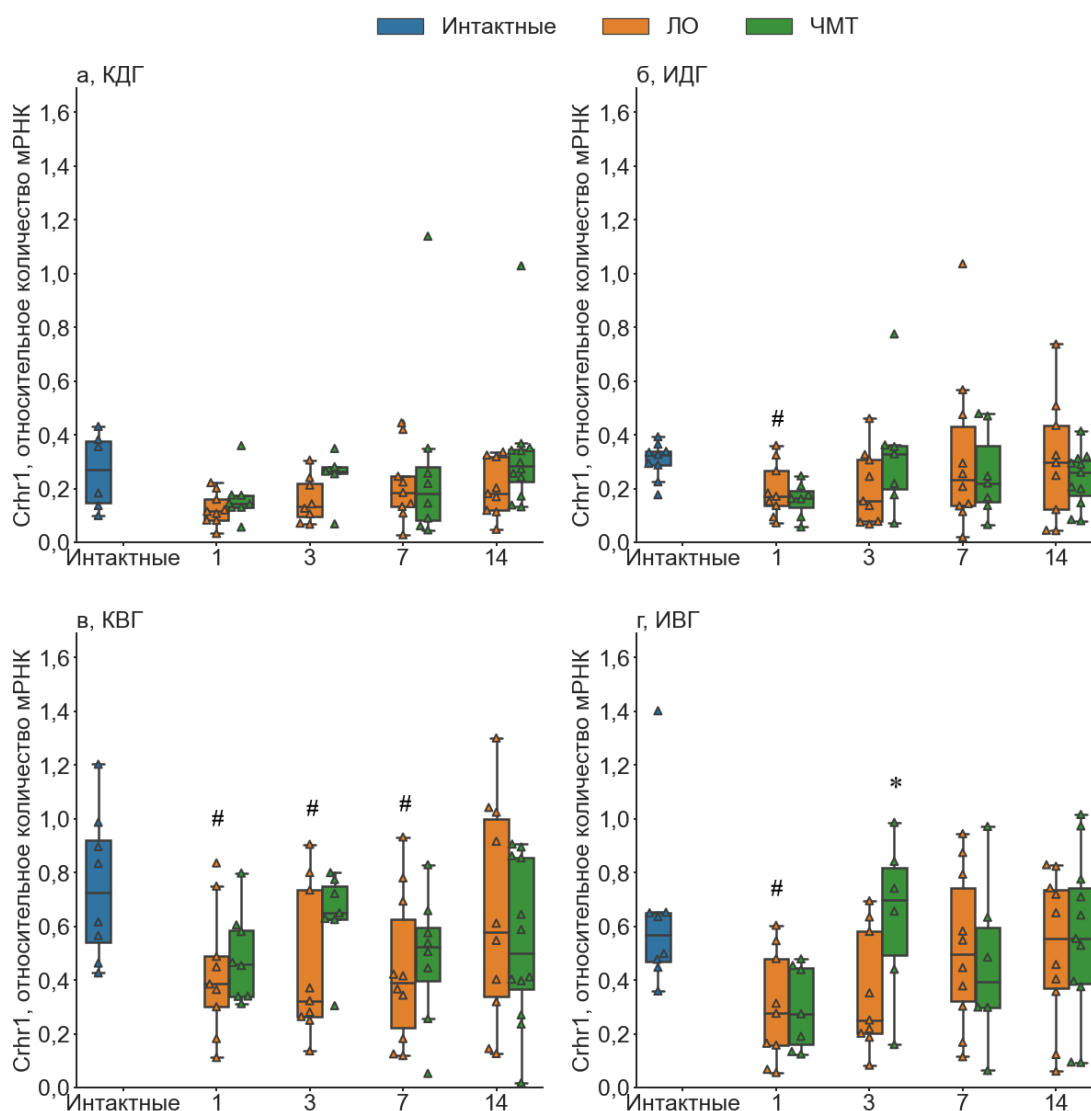


Рисунок 18. Временная динамика экспрессии мРНК *Crhr1* в различных отделах гиппокампа после ЧМТ (1-е, 3-и, 7-е и 14-е сутки). а, КДГ – контралатеральный дорсальный гиппокамп; б, ИДГ – ипсилатеральный дорсальный гиппокамп; в, КВГ – контралатеральный вентральный гиппокамп; г, ИВГ – ипсилатеральный вентральный гиппокамп. * и **, тенденция ($0.00625 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.00625$) 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.

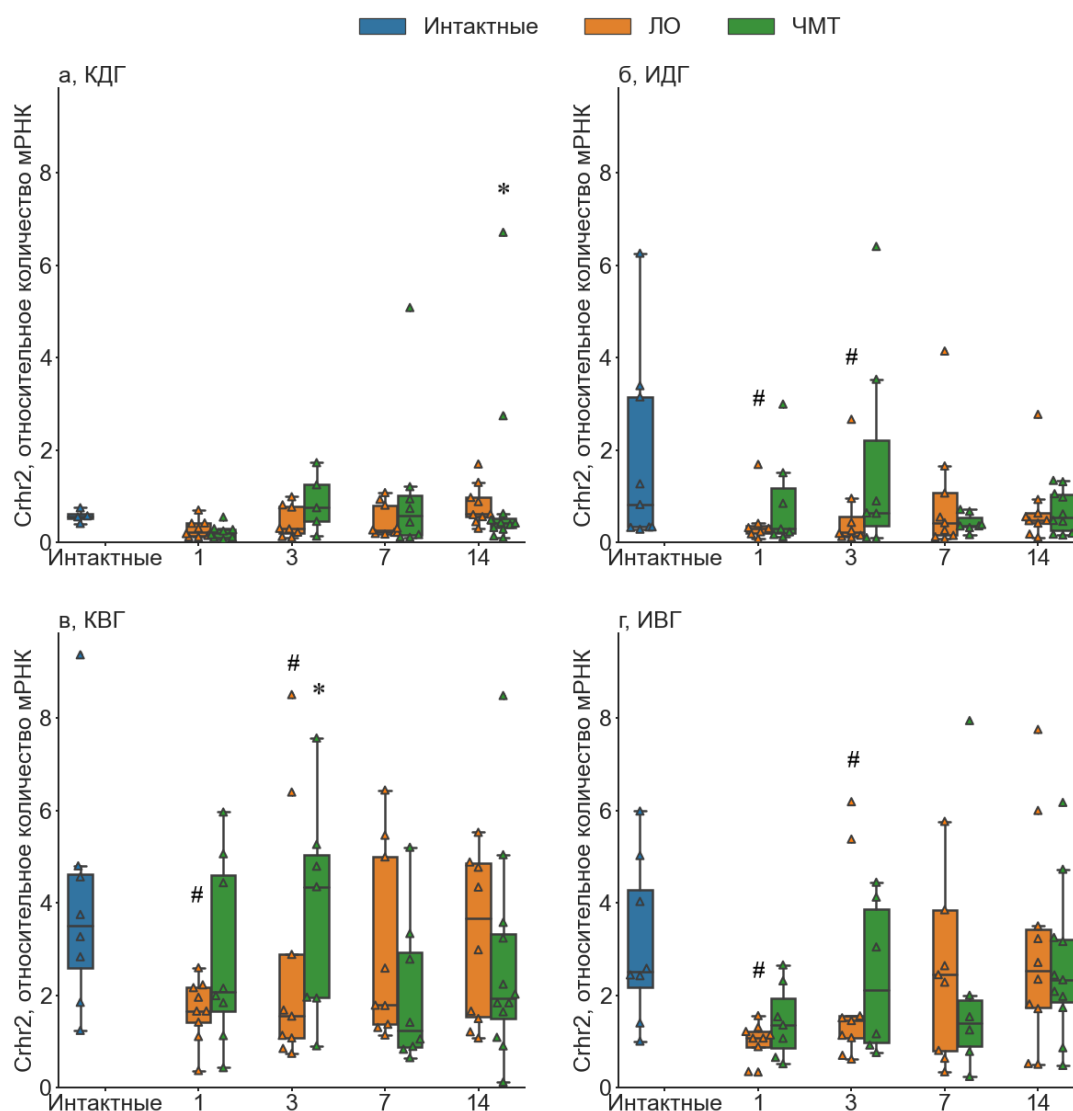


Рисунок 19. Временная динамика экспрессии мРНК *Crhr2* в различных отделах гиппокампа после ЧМТ (1-е, 3-и, 7-е и 14-е сутки). а, КДГ – контралатеральный дорсальный гиппокамп; б, ИДГ – ипсилатеральный дорсальный гиппокамп; в, КВГ – контралатеральный вентральный гиппокамп; г, ИВГ – ипсилатеральный вентральный гиппокамп. * и **, тенденция ($0.00625 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.00625$) 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.

4.1.3. Временная динамика цитокинового ответа после ЧМТ

Сначала были оценены изменения концентраций основных провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF α в сыворотке крови после ЧМТ. Концентрации указанных цитокинов не менялись в сыворотке крови после ЧМТ при сравнении с ЛО животными (Рисунок 14).

Экспрессии генов данных цитокинов в гиппокампе значительно изменились после травматического воздействия. 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 (*Il1b*, 1 день: ИДГ, Н = 14.054, p = 0.001; ИВГ, Н = 11.143, p = 0.004; КДГ, Н = 13.913, p = 0.001; 3 день: ИДГ, Н = 14.0, p = 0.001; ИВГ, Н = 12.217, p = 0.002; 7 день: ИДГ, Н = 13.466, p = 0.001; ИВГ, Н = 12.184, p = 0.002; КДГ, Н = 12.709, p = 0.002; КВГ, Н = 9.222, p = 0.01; 14 день: ИДГ, Н = 14.538, p = 0.001; ИВГ, Н = 12.511, p = 0.002; КДГ, Н = 11.11, p = 0.004; КВГ, Н = 10.72, p = 0.005) (*Il6*, 1 день: ИДГ, Н = 13.503, p = 0.001; ИВГ, Н = 8.352, p = 0.015; КДГ, Н = 8.866, p = 0.012; 3 день: ИВГ, Н = 6.837, p = 0.033) (*Tnf*, 1 день: ИДГ, Н = 13.552, p = 0.001; ИВГ, Н = 13.781, p = 0.001; КДГ, Н = 17.266, p = 0.0; КВГ, Н = 7.158, p = 0.028; 3 день: ИДГ, Н = 6.037, p = 0.049; ИВГ, Н = 8.865, p = 0.012; КДГ, Н = 6.349, p = 0.042; КВГ, Н = 7.524, p = 0.023; 7 день: ИДГ, Н = 11.993, p = 0.002; ИВГ, Н = 11.365, p = 0.003; 14 день: ИВГ, Н = 7.235, p = 0.027) (Рисунок 20 – 22). Более того, уровни экспрессии генов *Il1b* (Рисунок 20) и *Tnf* (Рисунок 22) 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 21).

Следует отметить, что уровни экспрессии *Il1b*, *Il6* и *Tnf* оказались чувствительны не только к наносимой травме, но и к самой трепанации черепа. Относительное количество мРНК *Il1b* возросло у ЛО животных в обоих полушариях гиппокампа по сравнению с интактными животными (Рисунок 20). Более сильный эффект наблюдался в ДГ (Рисунок 20), где трепанация черепа привела к увеличению уровня экспрессии *Il1b* на 3-и сутки и его сохранению на высоком уровне вплоть до 14-го дня. ВГ оказался менее чувствительным к трепанации - подъем мРНК *Il1b* наблюдали только на 14-й день (Рисунок 20). На уровни экспрессии *Il6* и *Tnf* трепанация не оказала влияния, было обнаружено достоверное увеличение экспрессии *Tnf* только в ИВГ на 14-е сутки (Рисунок 22).

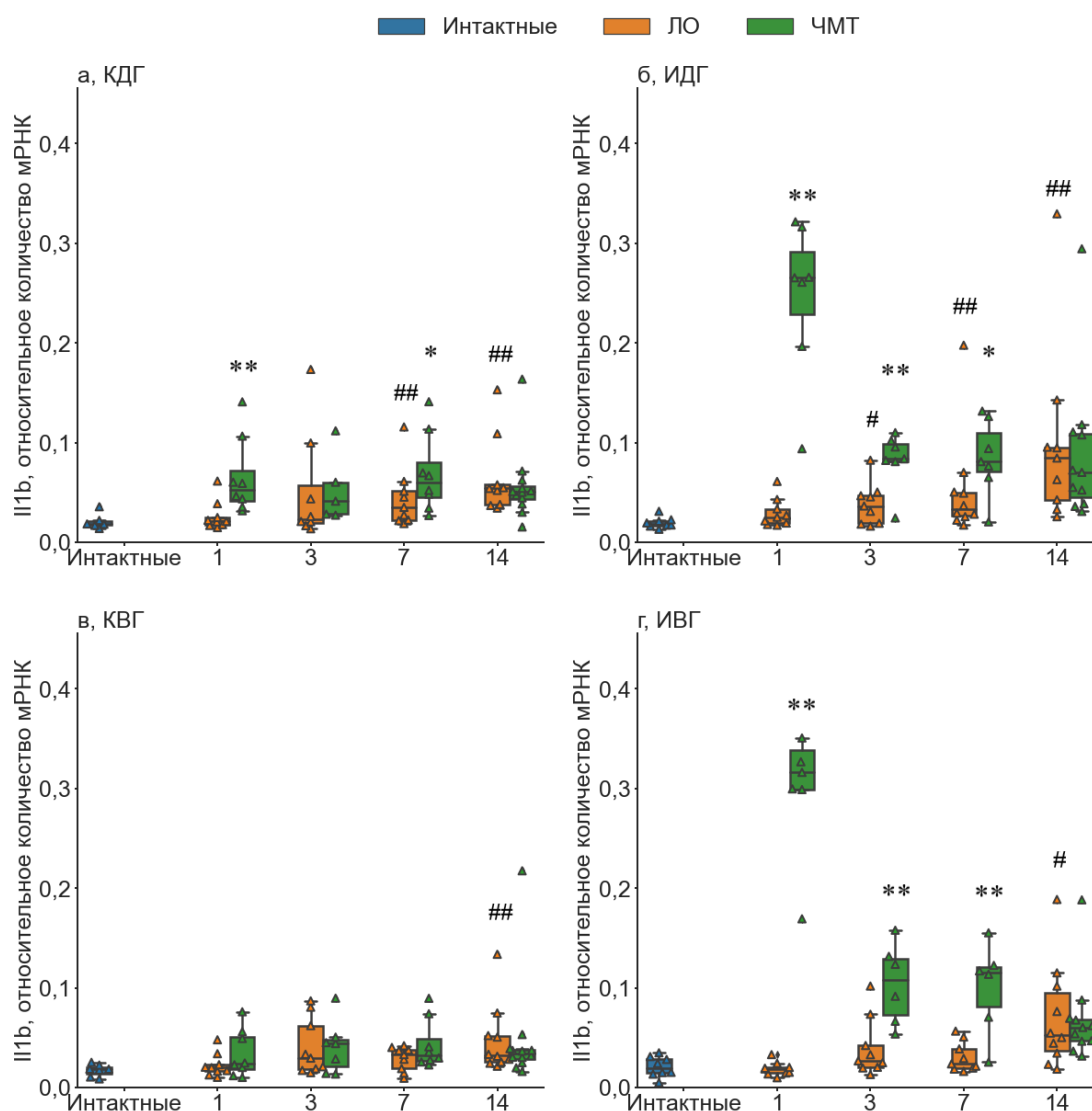


Рисунок 20. Временная динамика экспрессии мРНК *Il1b* в различных отделах гиппокампа после ЧМТ (1-е, 3-и, 7-е и 14-е сутки). а, КДГ – контралатеральный дорсальный гиппокамп; б, ИДГ – ипсилатеральный дорсальный гиппокамп; в, КВГ – контралатеральный вентральный гиппокамп; г, ИВГ – ипсилатеральный вентральный гиппокамп. * и **, тенденция ($0.00625 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.00625$) 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.

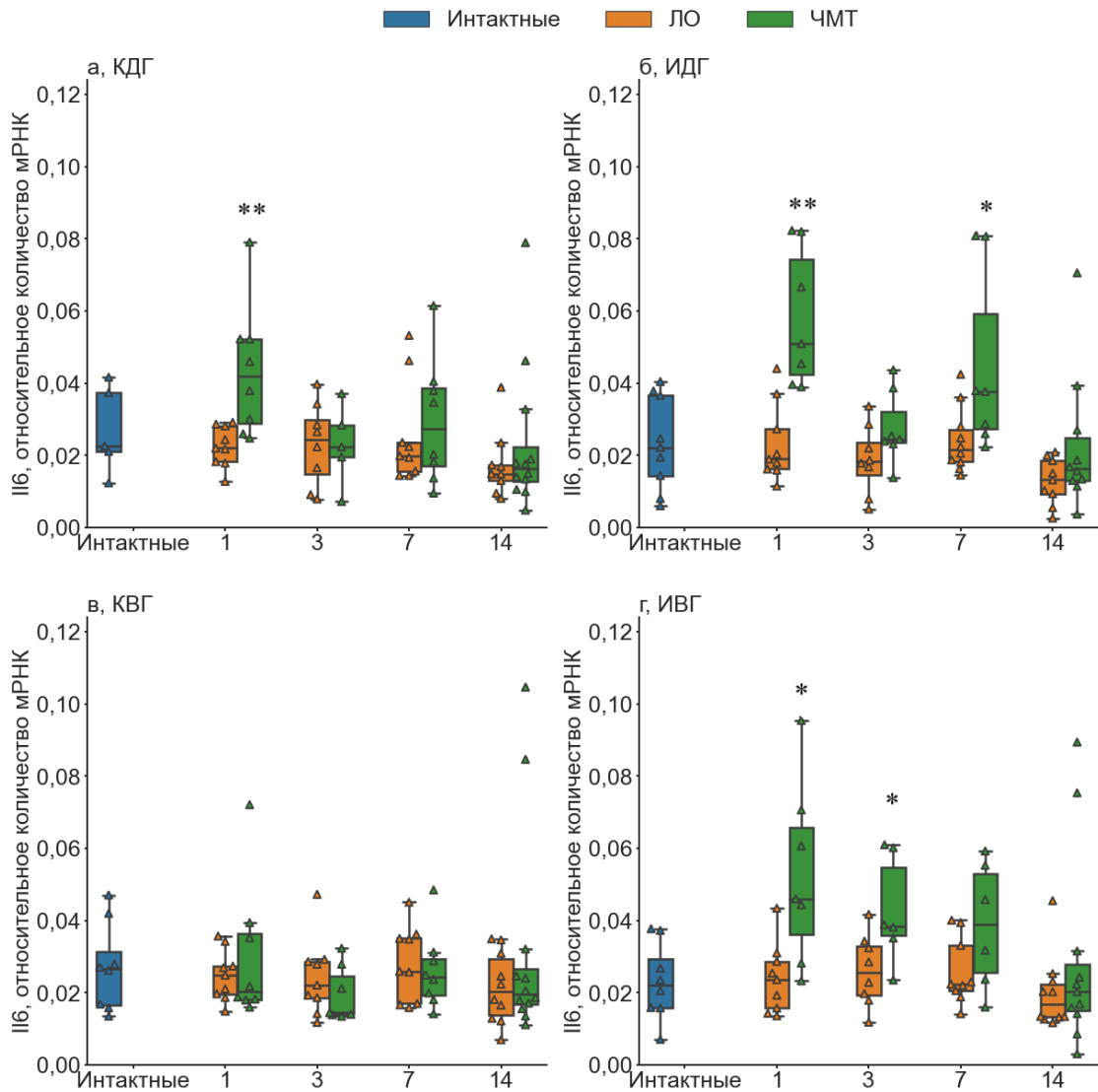


Рисунок 21. Временная динамика экспрессии мРНК *Il6* в различных отделах гиппокампа после ЧМТ (1-е, 3-и, 7-е и 14-е сутки). а, КДГ – контралатеральный дорсальный гиппокамп; б, ИДГ – ипсилатеральный дорсальный гиппокамп; в, КВГ – контралатеральный вентральный гиппокамп; г, ИВГ – ипсилатеральный вентральный гиппокамп. * и **, тенденция ($0.00625 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.00625$) различия ЧМТ vs ЛО, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения.

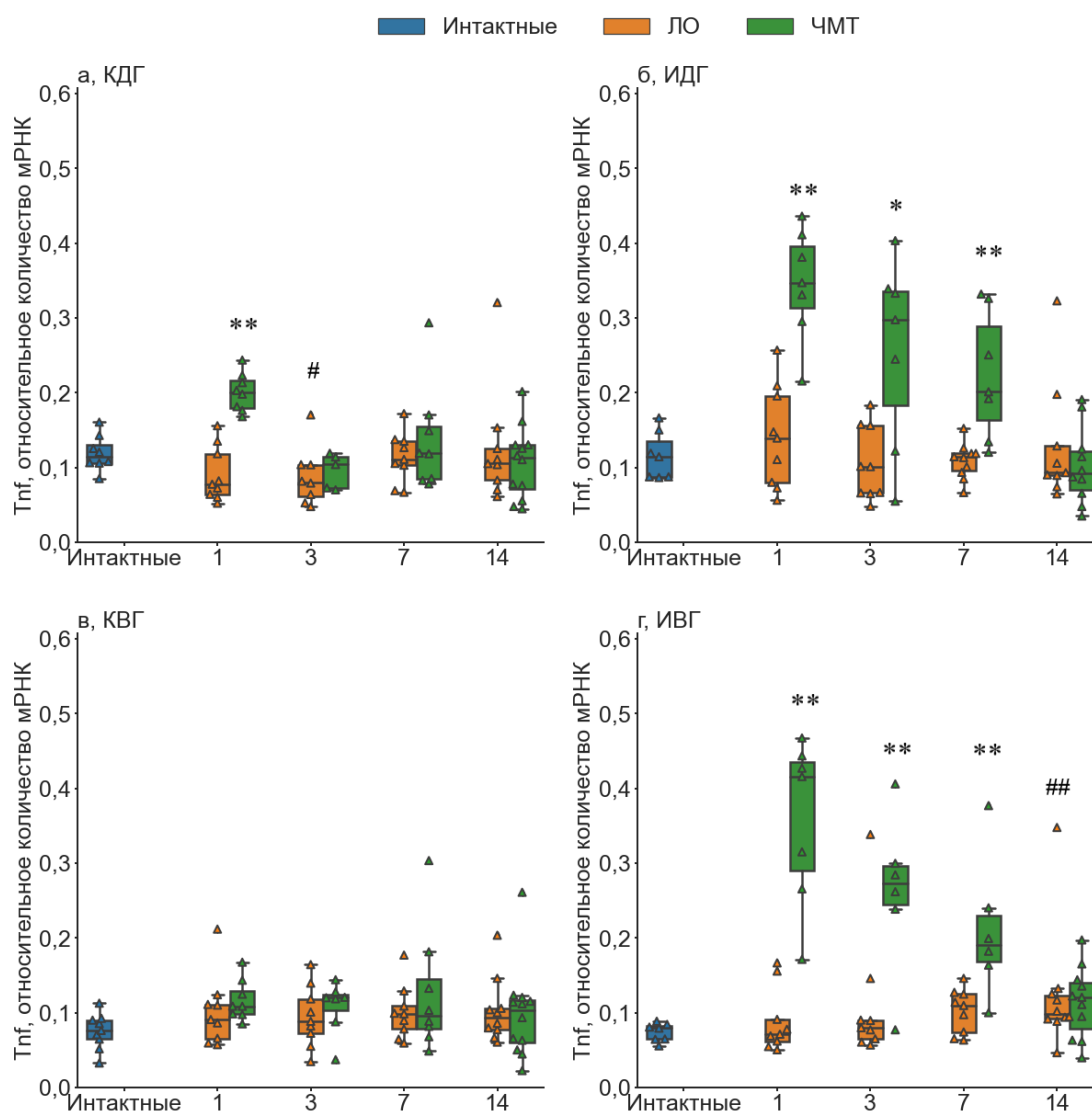


Рисунок 22. Временная динамика экспрессии мРНК *Tnf* в различных отделах гиппокампа после ЧМТ (1-е, 3-и, 7-е и 14-е сутки). а, КДГ – контралатеральный дорсальный гиппокамп; б, ИДГ – ипсилатеральный дорсальный гиппокамп; в, КВГ – контралатеральный вентральный гиппокамп; г, ИВГ – ипсилатеральный вентральный гиппокамп. * и **, тенденция ($0.00625 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.00625$) 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.

Также были измерены концентрации белков IL-1 β и IL-6 во всех отделах гиппокампа. Концентрация IL-1 β значительно возрастала на 1-е сутки после травмы только в ИДГ (1 день: $N = 14.283$, $p = 0.001$; 3 день: $N = 9.133$, $p = 0.01$; 7 день: $N = 10.728$, $p = 0.005$; 14 день: $N = 12.289$, $p = 0.002$) и ИВГ (1 день: $N = 14.278$, $p = 0.001$; 7 день: $N = 11.532$, $p = 0.003$) (Рисунок 23). На уровень белка IL-6 в гиппокампе не повлияла ни трепанация черепа, ни сама травма (Рисунок 24).

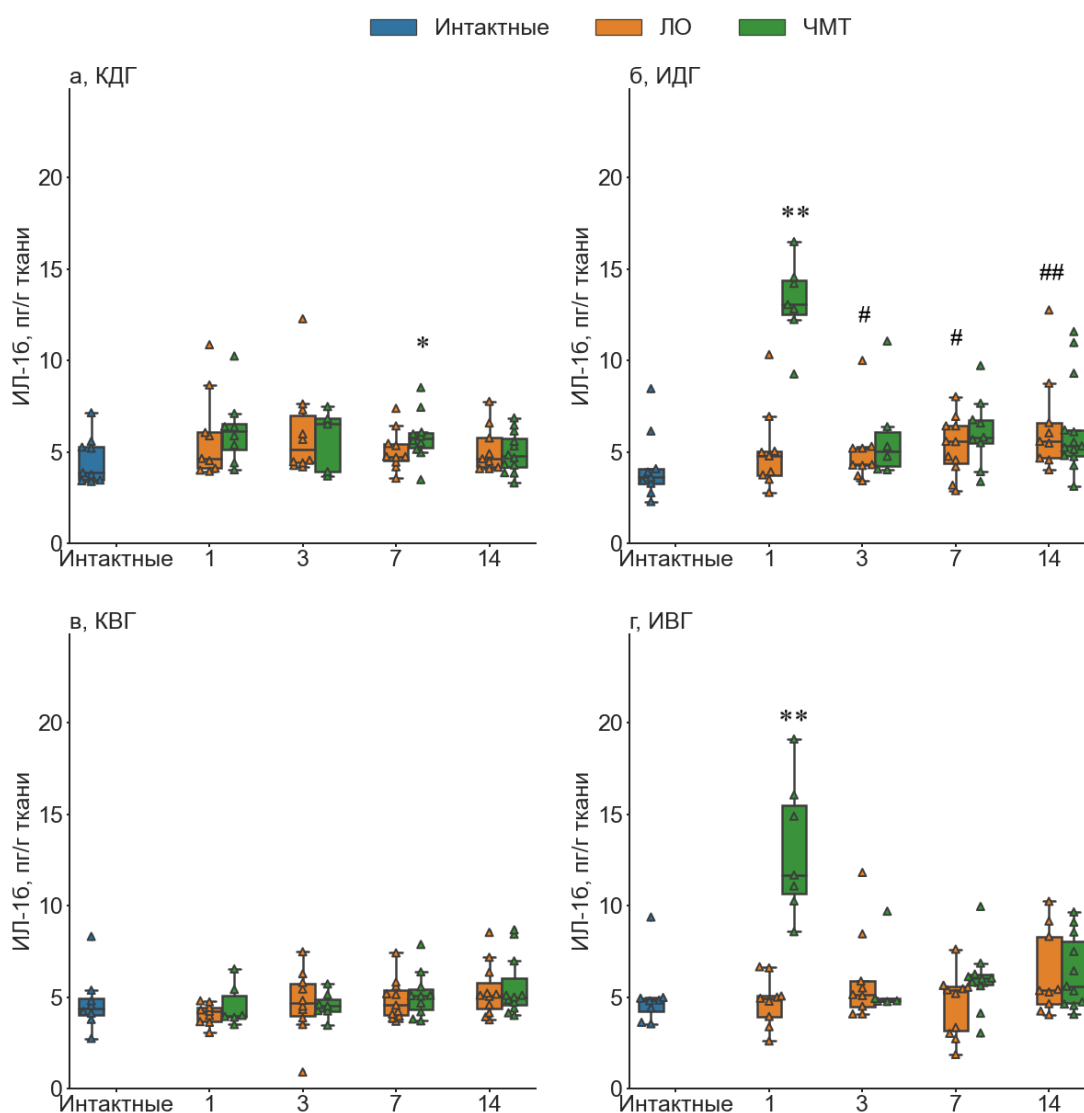


Рисунок 23. Изменения концентрации IL-1 β в различных отделах гиппокампа после ЧМТ (1-е, 3-и, 7-е и 14-е сутки). а, КДГ – контралатеральный дорсальный гиппокамп; б, ИДГ – ипсилатеральный дорсальный гиппокамп; в, КВГ – контралатеральный вентральный гиппокамп; г, ИВГ – ипсилатеральный вентральный гиппокамп. * и **, тенденция

($0.00625 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.00625$) 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.

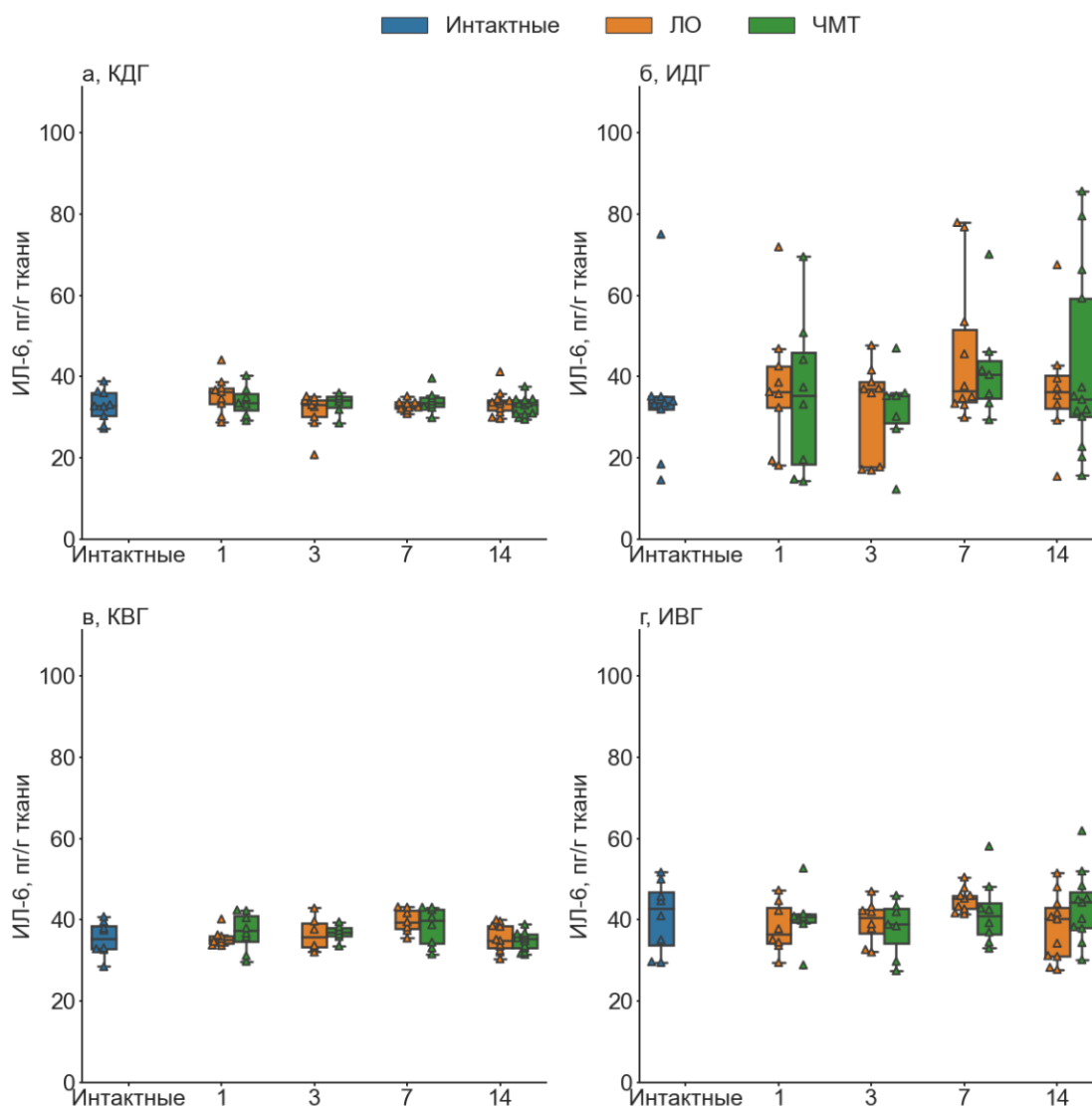


Рисунок 24. Изменения концентрации IL-6 в различных отделах гиппокампа после ЧМТ(1-е, 3-и, 7-е и 14-е сутки). а, КДГ – контралатеральный дорсальный гиппокамп; б, ИДГ – ипсилатеральный дорсальный гиппокамп; в, КВГ – контралатеральный вентральный гиппокамп; г, ИВГ – ипсилатеральный вентральный гиппокамп.

4.2. Эксперимент 2 –эффекты активации ГР на ЛПС-индуцированное нейровоспаление

В Эксперименте 2 оценивали эффект активации ГР на маркеры нейровоспаления и морфологию микроглии при контрольных условиях и после введения ЛПС. Перед проверкой эффектов активации ГР исследовали эффекты, оказываемые внутривентрикулярными инъекциями ФСБ и ЛПС.

Инъекция раствора ФСБ практически не вызывала изменений экспрессии мРНК большинства исследуемых генов (*Il1b*, *Il6*, *Tnf*, *Tgfb1*, *Cx3cl1*, *Cx3cr1*, *Ncf1*) в ДГ и ВГ по сравнению с группой интактного контроля (Рисунок 25 - 32). Отсутствие изменений в данных ключевых цитокинах указывает на отсутствие острого воспаления через 3-е суток после введения ФСБ в гиппокамп. Остаточный воспалительный ответ отражался в достоверном увеличении экспрессии *Ccl2* в ДГ (Рисунок 29а) после инъекции ФСБ по сравнению с интактной группой.

Инъекция ЛПС запускала нейровоспалительный ответ в ДГ, который заключался в достоверном увеличении уровней экспрессии *Il1b* (Рисунок 25), *Il6* (Рисунок 26), *Tnf* (Рисунок 27), *Tgfb1* (Рисунок 28), *Ccl2* (Рисунок 29) и *Ncf1* (Рисунок 32) по сравнению с группой, получивших инъекцию ФСБ. Для системы фракталкина было обнаружено значительное увеличение уровня экспрессии *Cx3cr1* (Рисунок 30) и отсутствие изменений в уровне экспрессии *Cx3cl1* в ДГ (Рисунок 31).

Анализ морфологии микроглии показал, что инъекция ФСБ не вызывала изменений морфологии микроглии в ДГ (Рисунок 33, 34). Инъекция ЛПС приводила к снижению количества клеток отростчатой микроглии и увеличению количества клеток других подтипов - амебоидного, гипертрофированного, палочковидного, симпластов – по сравнению с группой ФСБ в ДГ (Рисунок 33, 34), что говорит об активации микроглии. В ВГ были обнаружены преимущественно микроглиальные клетки с отростчатой морфологией после инъекции ЛПС (Рисунок 33, 35).

Суммируя полученные данные по экспрессии генов и морфологии микроглии, можно утверждать, что модель ЛПС-индуцированного нейровоспаления подходит в качестве модели локального нейровоспаления в ДГ.

Самостоятельное введение Декс оказало очень маленький эффект на уровни экспрессии изучаемых генов. Нами были детектированы только тенденции к увеличению уровней экспрессии *Il1b* (Рисунок 25), *Il6* (Рисунок 26) и *Ccl2* (Рисунок 29) в ДГ, а также достоверное

увеличение уровня экспрессии *Tnf* в ВГ (Рисунок 27). Однако, в противоположность нашим ожиданиям, Декс при совместном введении с ЛПС ослаблял усиление экспрессии некоторых цитокинов, индуцированное ЛПС. Достоверное снижение уровней экспрессии *Il6* (Рисунок 26), *Ccl2* (Рисунок 29), а также тенденция к снижению экспрессии *Cx3cl1* (Рисунок 30) наблюдали в ДГ после совместного введения Декс и ЛПС при сравнении с группой ЛПС.

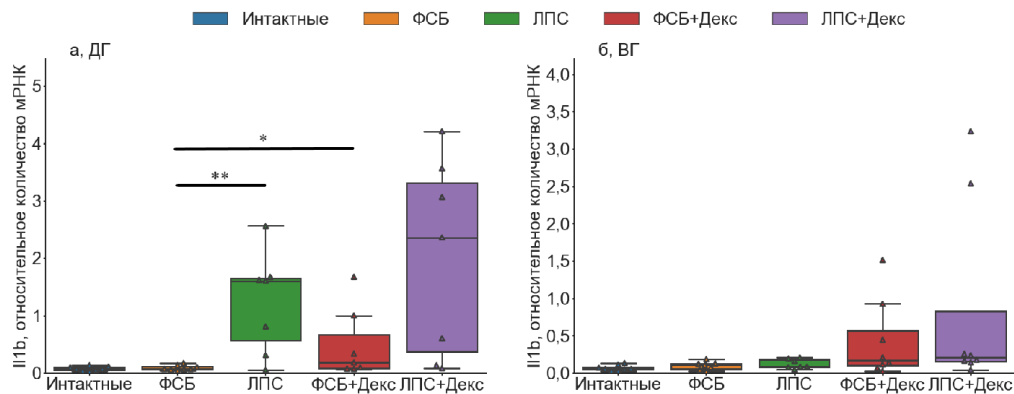


Рисунок 25. Экспрессия мРНК *Il1b* в ДГ и ВГ после внутригиппокампальной инъекции ФСБ, ЛПС, Декс, ЛПС + Декс. n=8. * и **, тенденция ($0.01 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.01$) различия, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения.

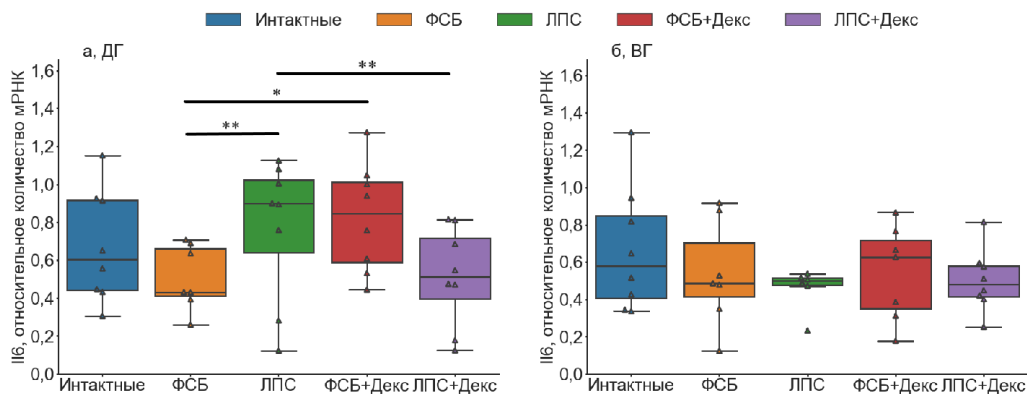


Рисунок 26. Экспрессия мРНК *Il6* в ДГ и ВГ после внутригиппокампальной инъекции ФСБ, ЛПС, Декс, ЛПС + Декс. n=8. * и **, тенденция ($0.01 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.01$) различия, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения.

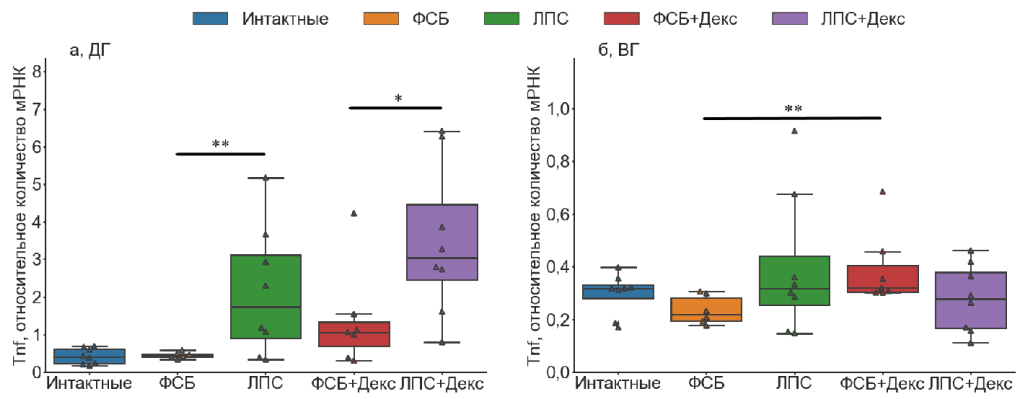


Рисунок 27. Экспрессия мРНК *Tnf* в ДГ и ВГ после внутригиппокампальной инъекции ФСБ, ЛПС, Декс, ЛПС + Декс. $n=8$. * и **, тенденция ($0.01 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.01$) различия, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения.

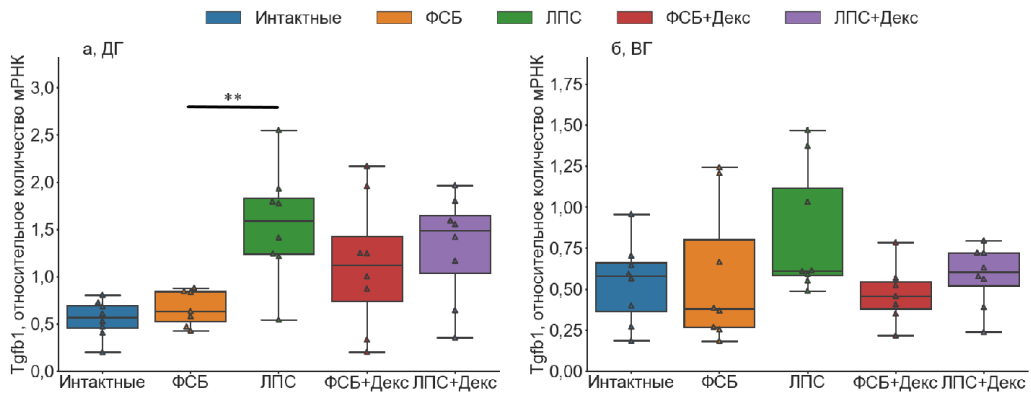


Рисунок 28. Экспрессия мРНК *Tgfb1* в ДГ и ВГ после внутригиппокампальной инъекции ФСБ, ЛПС, Декс, ЛПС + Декс. $n=8$. * и **, тенденция ($0.01 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.01$) различия, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения.

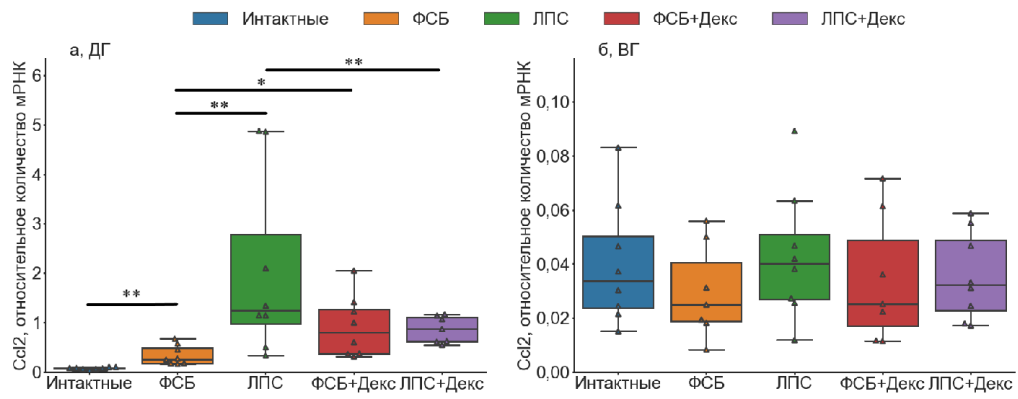


Рисунок 29. Экспрессия мРНК *Ccl2* в ДГ и ВГ после внутригиппокампальной инъекции ФСБ, ЛПС, Декс, ЛПС + Декс. $n=8$. * и **, тенденция ($0.01 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.01$) различия, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения.

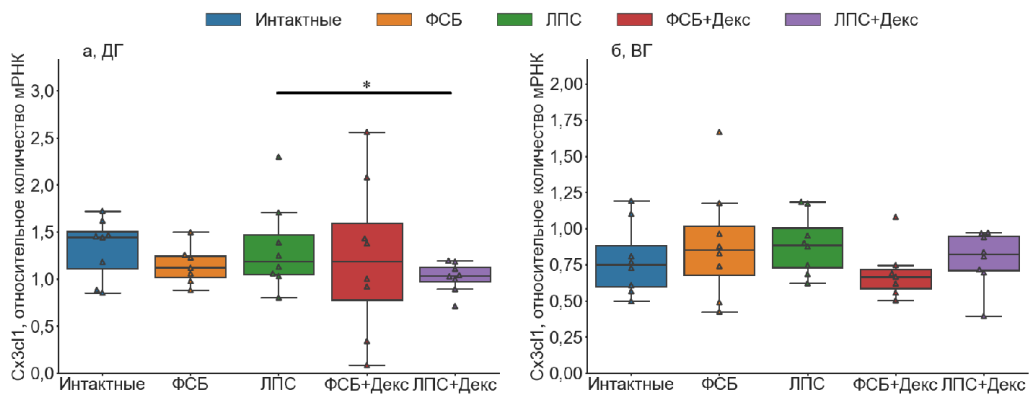


Рисунок 30. Экспрессия мРНК *Cx3cl1* в ДГ и ВГ после внутригиппокампальной инъекции ФСБ, ЛПС, Декс, ЛПС + Декс. $n=8$. * и **, тенденция ($0.01 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.01$) различия, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения.

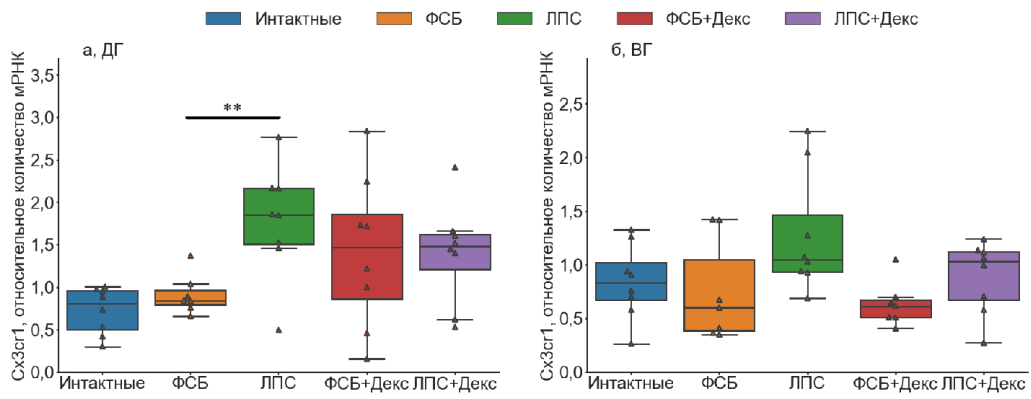


Рисунок 31. Экспрессия мРНК *Cx3cr1* в ДГ и ВГ после внутригиппокампальной инъекции ФСБ, ЛПС, Декс, ЛПС + Декс. $n=8$. * и **, тенденция ($0.01 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.01$) различия, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения.

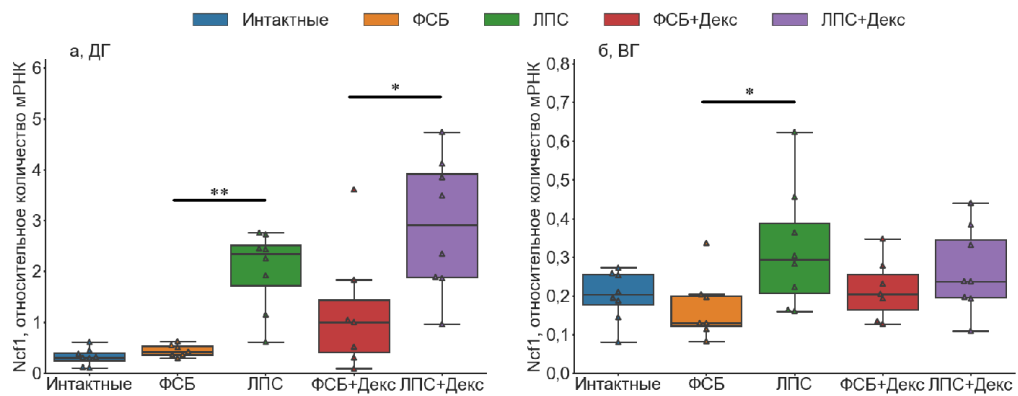
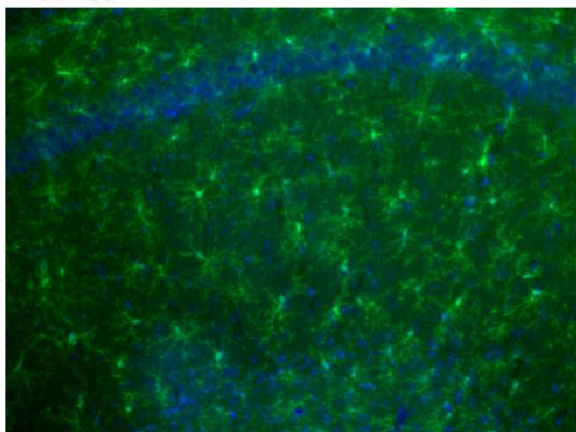
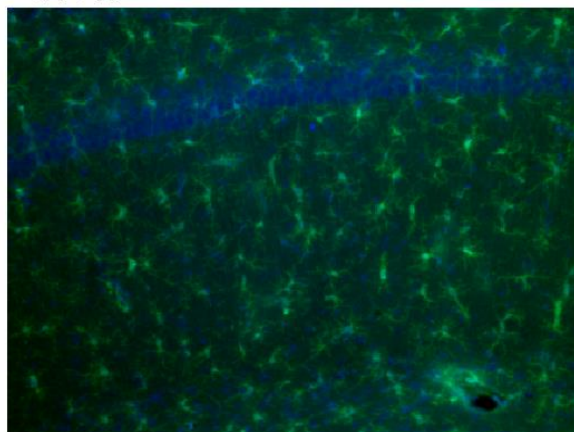


Рисунок 32. Экспрессия мРНК *Ncf1* в ДГ и ВГ после внутригиппокампальной инъекции ФСБ, ЛПС, Декс, ЛПС + Декс. $n=8$. * и **, тенденция ($0.01 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.01$) различия, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения.

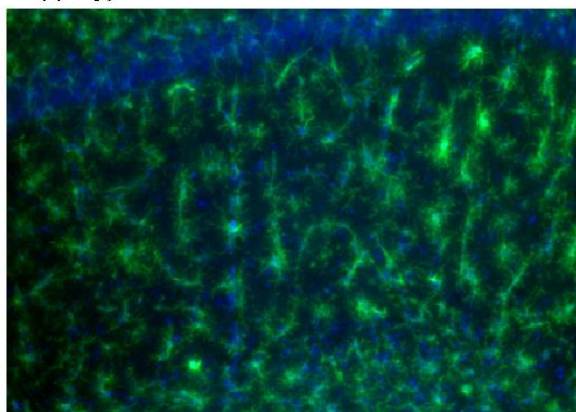
а, ДГ, группа Интактные



б, ДГ, группа ФСБ



в, ДГ, группа ЛПС



г, ВГ, группа Интактные

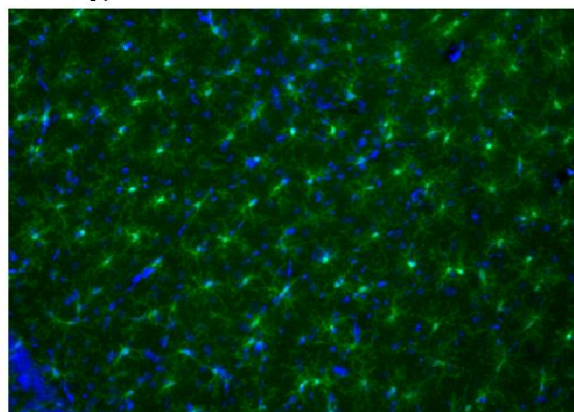


Рисунок 33. Активация микроглии в гиппокампе, репрезентативные микрофотографии. А, ДГ, группа Интактные; б, ДГ, группа ФСБ; в, ДГ, группа ЛПС; г, ВГ, группа Интактные. Репрезентативные микрофотографии ВГ групп ФСБ и ЛПС схожи с таковой у ВГ группы Интактные. Окрашивание анти-Iba1 и DAPI, x20.

Активация ГР также оказала слабый провоспалительный эффект и на состояние микроглии в ДГ (Рисунок 34, 36), но не в ВГ, где микроглия сохранила отростчатый фенотип состояния покоя (Рисунок 35). Введение Декс не предотвращало изменений морфологии микроглии, возникающих в результате ЛПС-индуцированного нейровоспаления в ДГ (Рисунок 34, 36). В ВГ фенотип микроглиальных клеток соответствовал состоянию покоя (Рисунок 35).

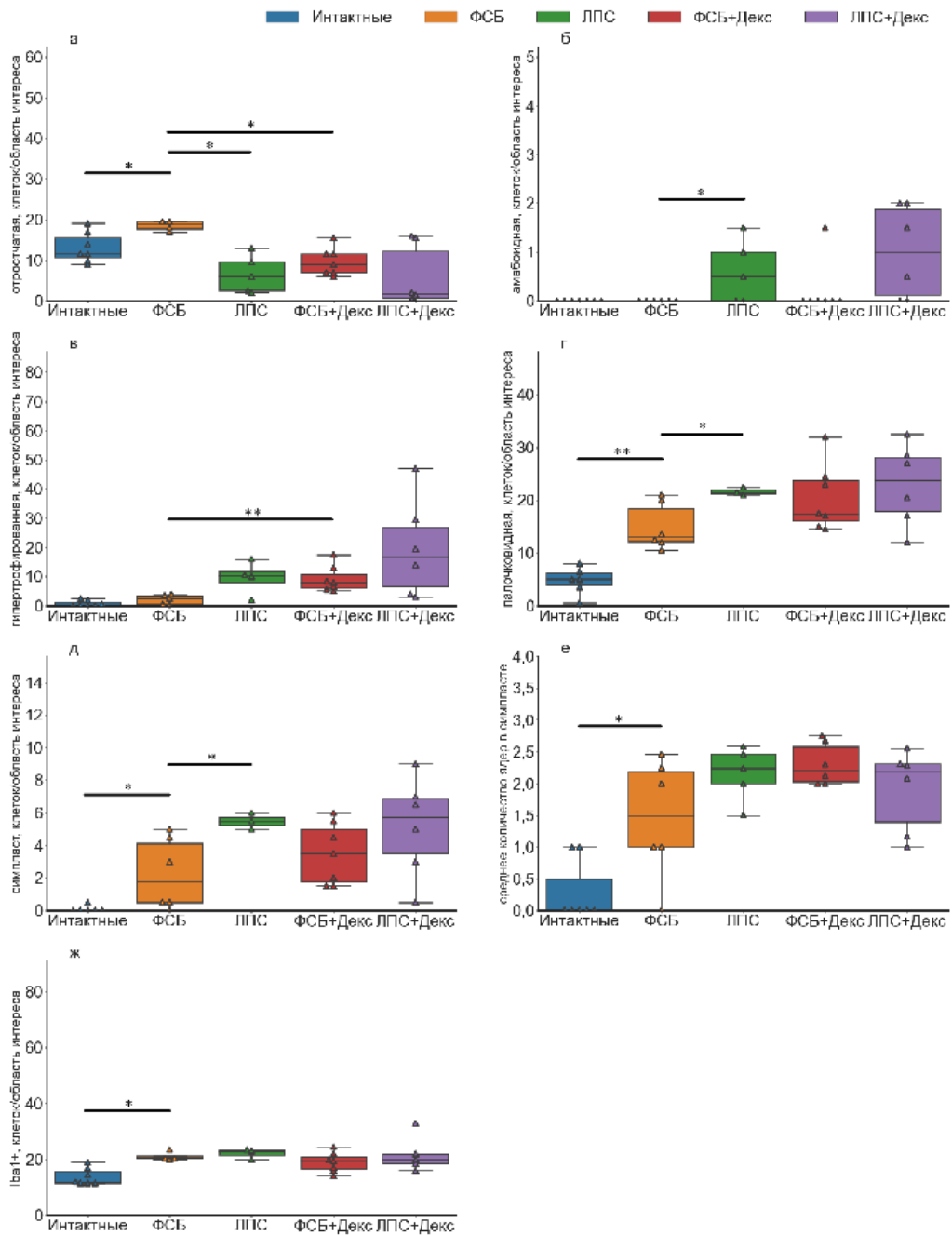


Рисунок 34. Количество Iba1+ клеток различных подтипов в ДГ после внутригиппокампальной инъекции ФСБ, ЛПС, Декс, ЛПС + Декс. а, отростчатая микроглия; б, амебодная микроглия; в, гипертрофированная микроглия; г, палочковидная микроглия; д, симпласты; е, среднее количество ядер в клетке-симпласте;

ж, общее количества Iba1+ клеток в области интереса. $n=7$. * 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.

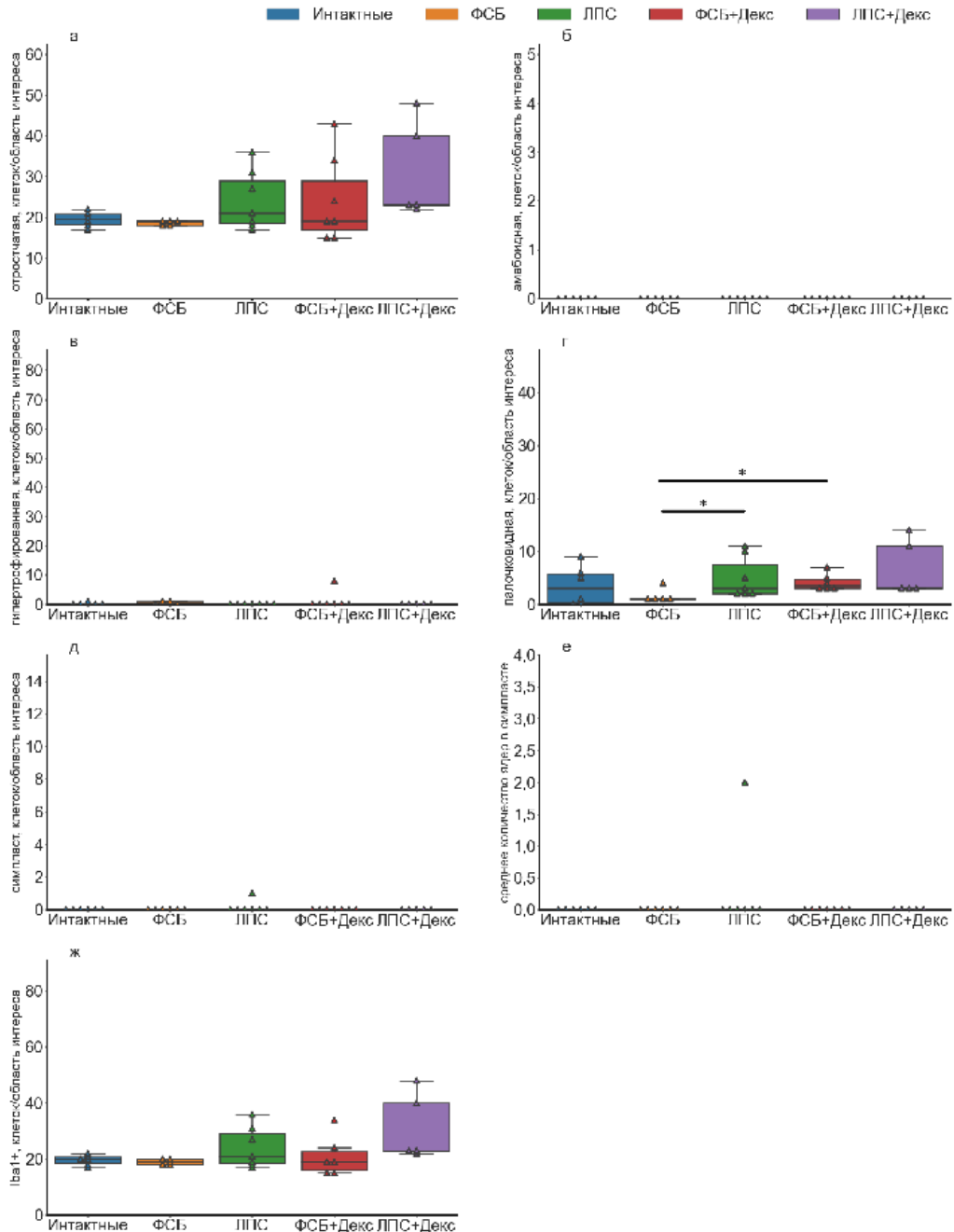


Рисунок 35. Количество Iba1+ клеток различных подтипов в ВГ после

внутригиппокампальной инъекции ФСБ, ЛПС, Декс, ЛПС + Декс. а, отростчатая микроглия; б, амебоидная микроглия; в, гипертрофированная микроглия; г, палочковидная микроглия; д, симпласты; е, среднее количество ядер в клетке-симпласте; ж, общее количества Iba1+ клеток в области интереса. n=7. * 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.

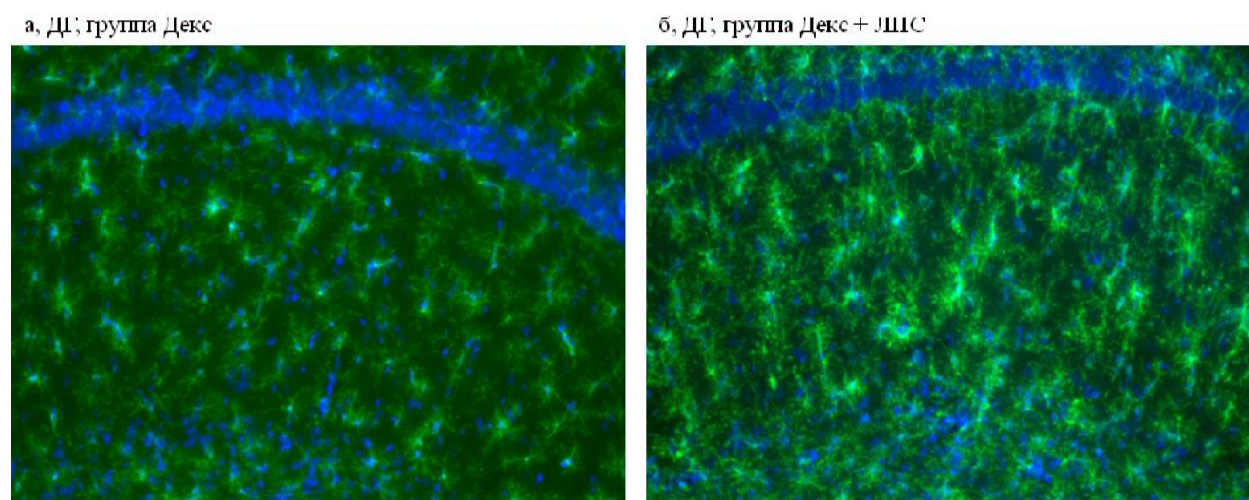


Рисунок 36. Активация микроглии в ДГ, репрезентативные микрофотографии. а, ДГ, группа Декс; б, ДГ, группа Декс + ЛПС. Окрашивание анти-Iba1 и DAPI, x20.

Значительное снижение предпочтения сахарозы было показано для группы животных после комбинированной инъекции Декс и ЛПС на 1-е и 2-е сутки после операции при сравнении с этими же животными до операции (Рисунок 37).

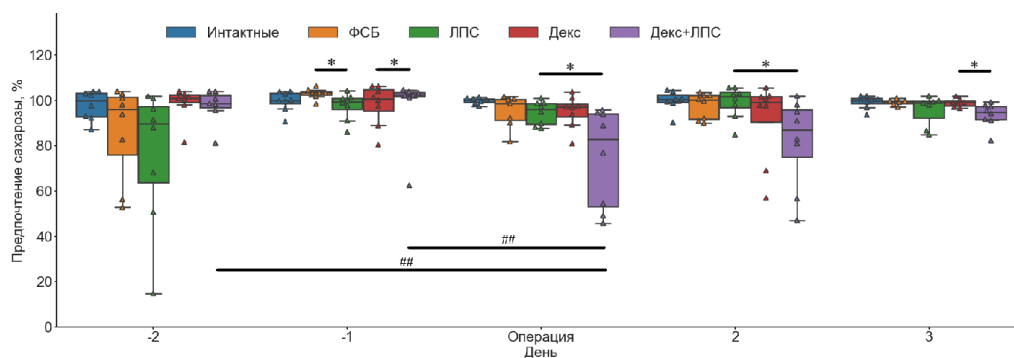


Рисунок 37. Изменения предпочтения сахарозы каждого животного до и после внутригиппокампальной инъекции ФСБ, ЛПС, Декс, ЛПС + Декс. $n=8$. * и **, тенденция ($0.01 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.01$) различия, соответственно, между группами в течение одного дня, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения. # ($0.01 \leq p \leq 0.05$) и ## ($p < 0.01$), тенденции и достоверные различия, соответственно, между животными одной группы в разные дни, согласно тесту Фридмана с применением *post hoc* теста Ньюмена.

4.3. Эксперимент 3 – эффекты ингибирования ГР и МР на ЛПС-индуцированное нейровоспаление.

В Эксперименте 3 мы оценивали эффекты ингибирования ГР и МР на те же самые маркеры, как и в Эксперименте 2, при нормальных и нейровоспалительных условиях. Анализ эффектов инъекций ФСБ и ЛПС показал, что их влияние на экспрессию генов, ассоциированных с нейровоспалением (Рисунок 38 - 45), и морфологию микроглии (Рисунок 46 - 48) были аналогичными предшествующему эксперименту. Введение ФСБ индуцировало значительное усиление уровней экспрессии *Tgfb1* в ДГ и ВГ (Рисунок 41) и *Ccl2* в ДГ (Рисунок 42) по сравнению с интактной группой. Как и в Эксперименте 2, инъекция ЛПС привела к значительному усилению уровней экспрессии *Il1b* (Рисунок 38), *Il6* (Рисунок 39), *Tnf* (Рисунок 40), *Tgfb1* (Рисунок 41), *Ccl2* (Рисунок 42), а также *Ncf1* (Рисунок 45) по сравнению с группой животных, инъецированных ФСБ. Единственным кажущимся различием было разное влияние ЛПС на экспрессию генов системы фракталкина, *Cx3cl1* (Рисунок 43) и *Cx3cr1* (Рисунок 44). Кажущееся отсутствие достоверных изменений в уровне экспрессии *Cx3cr1* по сравнению с Экспериментом 2 связано с высокой дисперсией в группе ФСБ в данном эксперименте. Можно отметить, что в Эксперименте 2 интактные и получившие ФСБ животные не отличались по экспрессии генов системы фракталкина, а их дисперсия была сравнима, в то время как в

Эксперименте 3 дисперсия экспрессии данных генов в группе ФСБ было намного больше, что привело к кажущемуся различию в эффекте ЛПС. Если сравнить группу ЛПС с интактной, то мы можем увидеть, что ЛПС оказал такой же эффект на экспрессию генов системы фракталкина, как и в Эксперименте 2 (Эксперимент 3, Интактные vs ЛПС: *Cx3cr1*, $p=0.00031$; *Cx3cl1*, $p=0.28$).

Анализ морфологии микроглии после инъекции ФСБ не показал каких-либо значимых изменений в ДГ (Рисунок 46) и ВГ (Рисунок 47). Как и в Эксперименте 2, было обнаружено большее количество микроглиальных клеток активированного фенотипа в ДГ (Рисунок 46) и фенотипа состояния покоя в ВГ (Рисунок 47) после инъекции ЛПС.

Самостоятельные инъекции ингибитора ГР Миф и ингибитора МР Спир снижали только экспрессию генов *Il1b* (Рисунок 38) и *Tgfb1* (Рисунок 41) в ДГ 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 39), а также *Ccl2* в ВГ после совместной инъекции Спир и ЛПС (Рисунок 42).

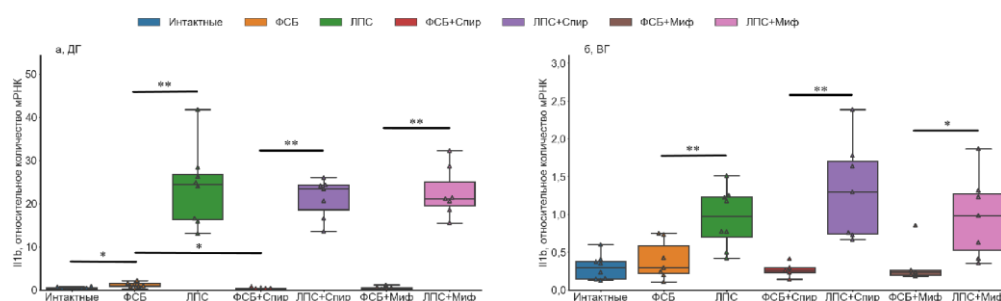


Рисунок 38. Экспрессия мРНК *Il1b* в ДГ и ВГ после внутригиппокампальной инъекции ФСБ, ЛПС, Спир, ЛПС + Спир, Миф, ЛПС + Миф. Группы Интактные и ЛПС, $n=8$; группы ФСБ, ЛПС + Спир и ЛПС + Миф, $n=7$; группы Спир и Миф, $n=6$. * и **, тенденция ($0.00625 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.00625$) различия, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения.

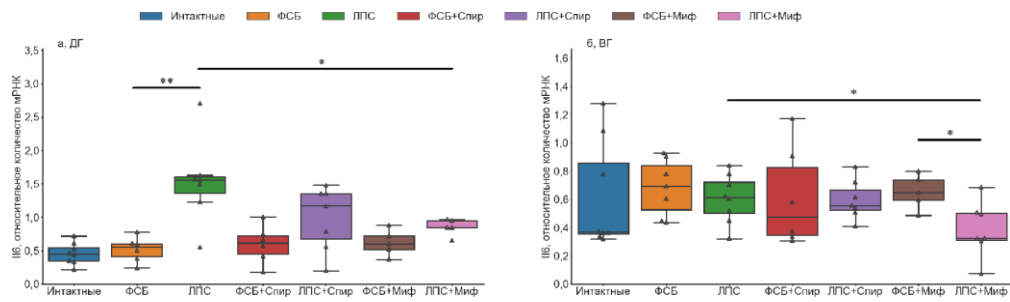


Рисунок 39. Экспрессия мРНК *Il6* в ДГ и ВГ после внутригиппокампальной инъекции ФСБ, ЛПС, Спир, ЛПС + Спир, Миф, ЛПС + Миф. Группы Интактные и ЛПС, $n=8$; группы ФСБ, ЛПС + Спир и ЛПС + Миф, $n=7$; группы Спир и Миф, $n=6$. * и **, тенденция ($0.00625 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.00625$) различия, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения.

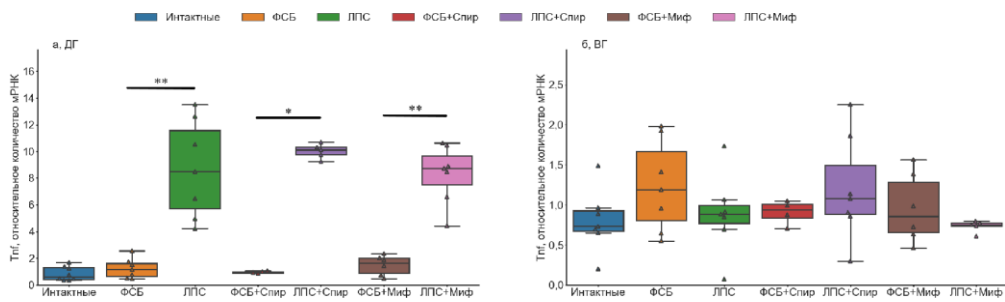


Рисунок 40. Экспрессия мРНК *Tnf* в ДГ и ВГ после внутригиппокампальной инъекции ФСБ, ЛПС, Спир, ЛПС + Спир, Миф, ЛПС + Миф. Группы Интактные и ЛПС, $n=8$; группы ФСБ, ЛПС + Спир и ЛПС + Миф, $n=7$; группы Спир и Миф, $n=6$. * и **, тенденция ($0.00625 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.00625$) различия, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения.

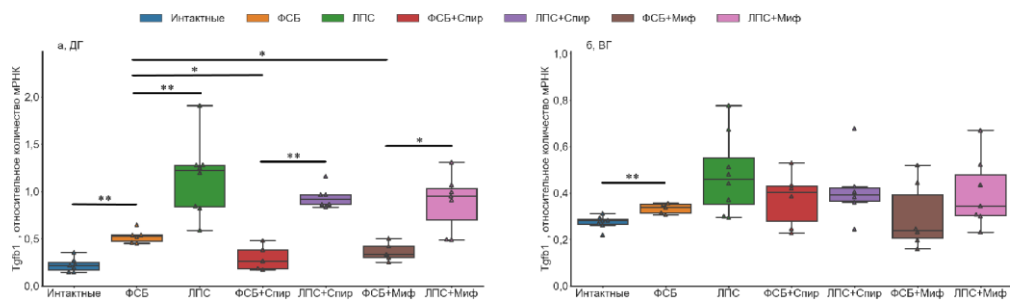


Рисунок 41. Экспрессия мРНК *Tgfb1* в ДГ и ВГ после внутригиппокампальной инъекции ФСБ, ЛПС, Спир, ЛПС + Спир, Миф, ЛПС + Миф. Группы Интактные и ЛПС, n=8; группы ФСБ, ЛПС + Спир и ЛПС + Миф, n=7; группы Спир и Миф, n=6. * и **, тенденция ($0.00625 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.00625$) различия, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения.

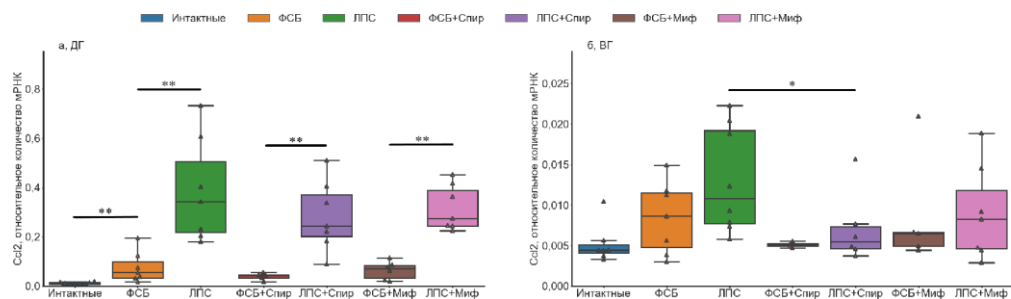


Рисунок 42. Экспрессия мРНК *Ccl2* в ДГ и ВГ после внутригиппокампальной инъекции ФСБ, ЛПС, Спир, ЛПС + Спир, Миф, ЛПС + Миф. Группы Интактные и ЛПС, n=8; группы ФСБ, ЛПС + Спир и ЛПС + Миф, n=7; группы Спир и Миф, n=6. * и **, тенденция ($0.00625 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.00625$) различия, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения.

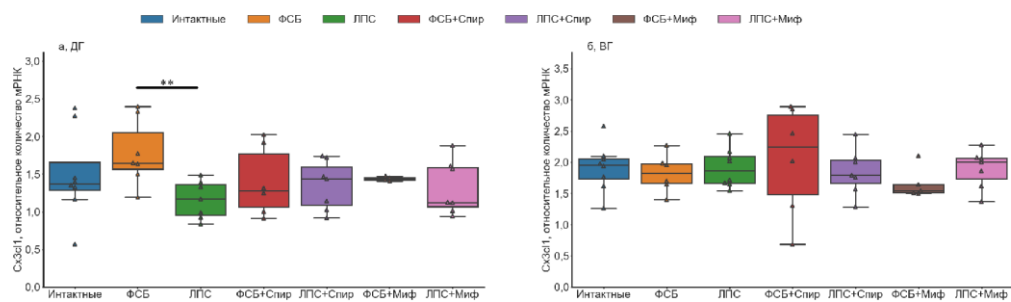


Рисунок 43. Экспрессия мРНК *Cx3cl1* в ДГ и ВГ после внутригиппокампальной инъекции ФСБ, ЛПС, Спир, ЛПС + Спир, Миф, ЛПС + Миф. Группы Интактные и ЛПС, n=8; группы ФСБ, ЛПС + Спир и ЛПС + Миф, n=7; группы Спир и Миф, n=6. * и **, тенденция ($0.00625 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.00625$) различия, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения.

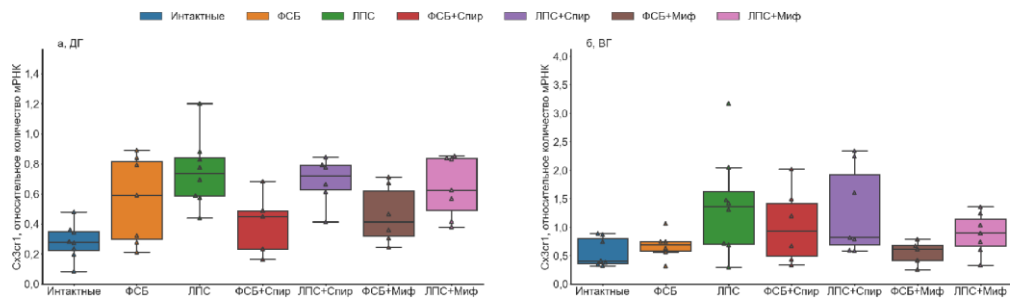


Рисунок 44. Экспрессия мРНК *Cx3cr1* в ДГ и ВГ после внутригиппокампальной инъекции ФСБ, ЛПС, Спир, ЛПС + Спир, Миф, ЛПС + Миф. Группы Интактные и ЛПС, $n=8$; группы ФСБ, ЛПС + Спир и ЛПС + Миф, $n=7$; группы Спир и Миф, $n=6$. * и **, тенденция ($0.00625 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p \leq 0.00625$) различия, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения.

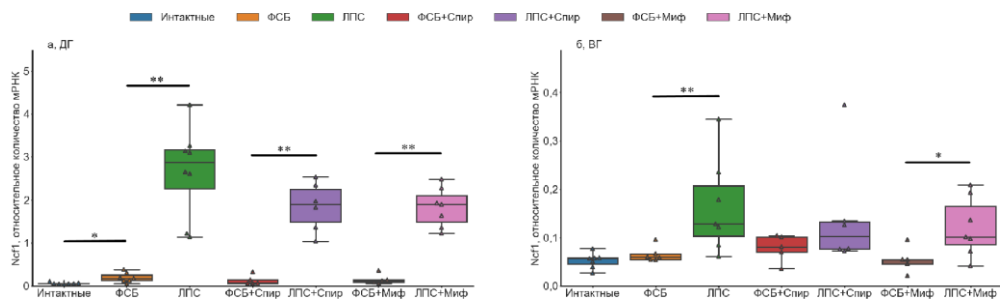


Рисунок 45. Экспрессия мРНК *Nef1* в ДГ и ВГ после внутригиппокампальной инъекции ФСБ, ЛПС, Спир, ЛПС + Спир, Миф, ЛПС + Миф. Группы Интактные и ЛПС, $n=8$; группы ФСБ, ЛПС + Спир и ЛПС + Миф, $n=7$; группы Спир и Миф, $n=6$. * и **, тенденция ($0.00625 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.00625$) различия, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения.

Аналогично уровням экспрессии генов, Миф и Спир не приводили к изменению фенотипа клеток микроглии по сравнению с группой ФСБ (Рисунок 46 - 48). Ингибирование как ГР, так и МР во время действия ЛПС не влияло на морфологию микроглии, оставляя клетки в фенотипах активированного состояния (Рисунок 46 - 48).

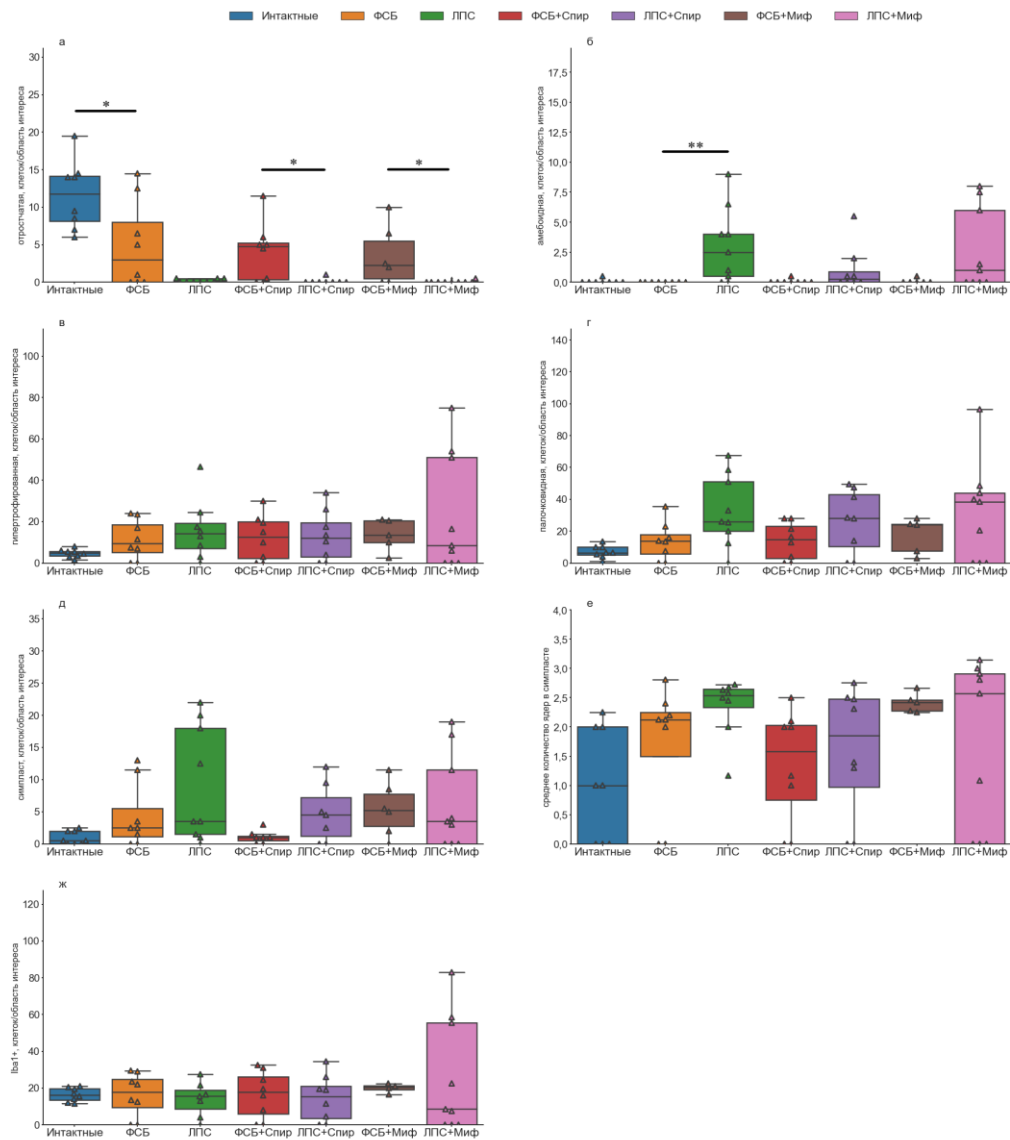


Рисунок 46. Количество Iba1+ клеток различных подтипов в ДГ после внутригиппокампальной инъекции ФСБ, ЛПС, Спир, ЛПС + Спир, Миф, ЛПС + Миф. а, отростчатая микроглия; б, амёбовидная микроглия; в, гипертрофированная микроглия; г, палочковидная микроглия; д, симпласты; е, среднее количество ядер в клетке-симпласте; ж, общее количества Iba1+ клеток в области интереса. Группы Интактные и ЛПС, n=8; группы ФСБ, ЛПС + Спир и ЛПС + Миф, n=7; группы Спир и Миф, n=6. * и **, тенденция ($0.00625 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.00625$) различия, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения.

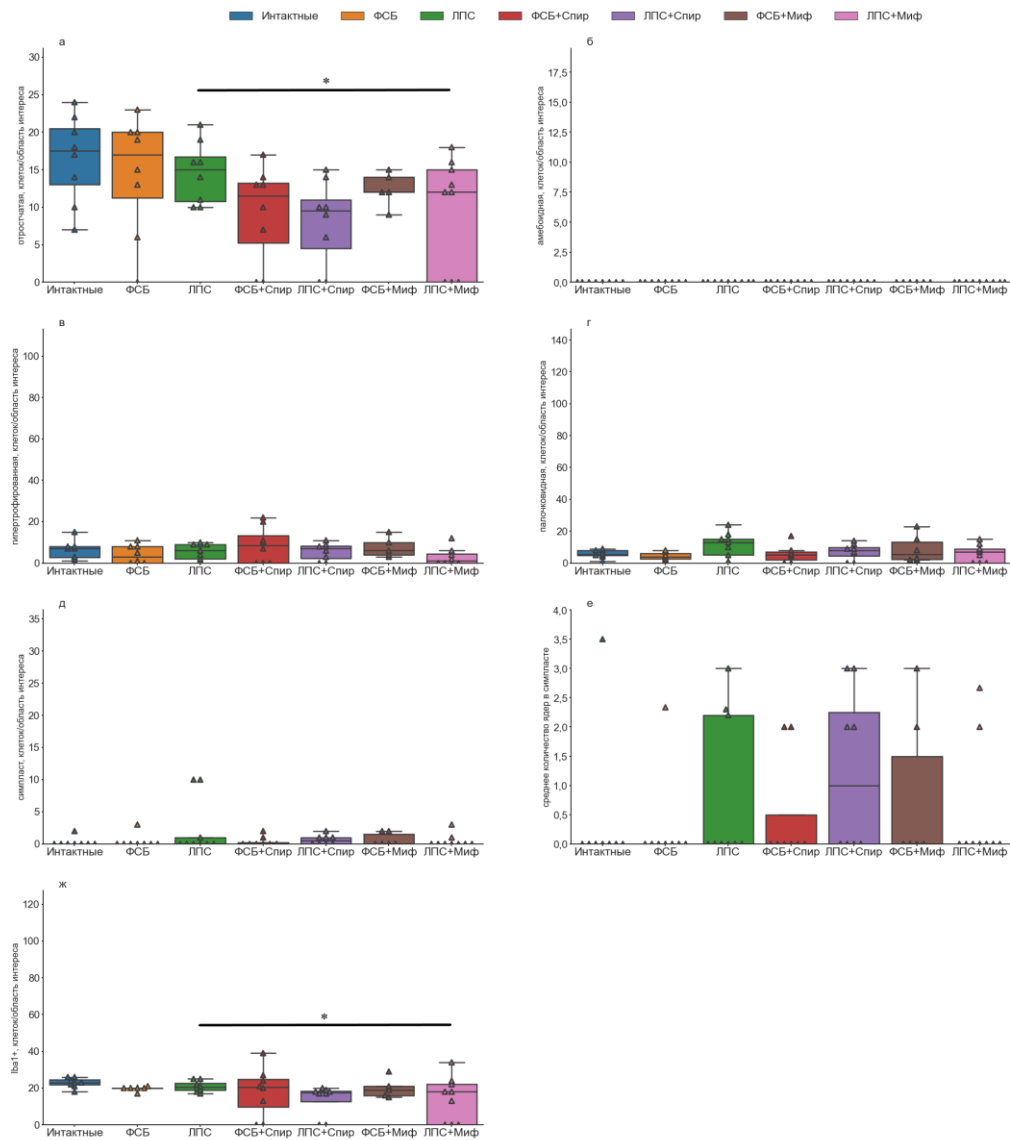
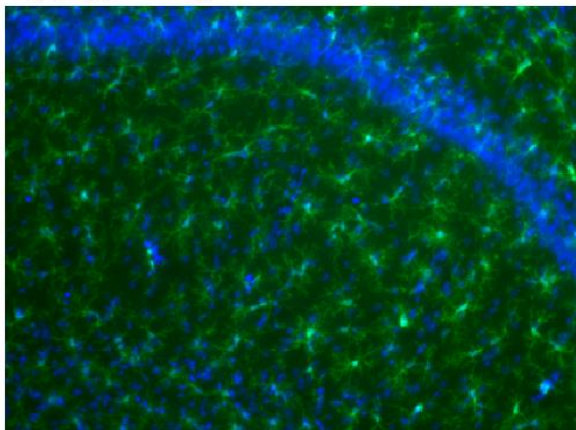
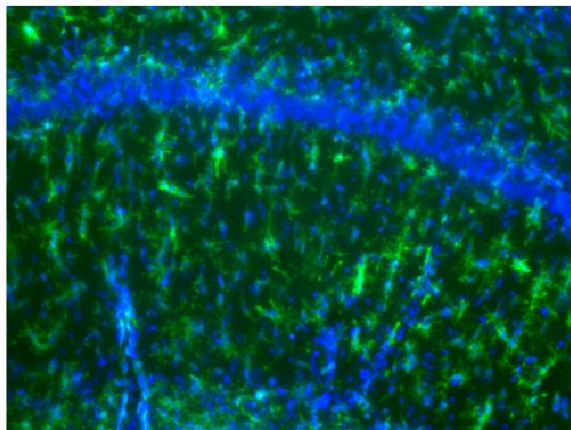


Рисунок 47. Количество Iba1+ клеток различных подтипов в ВГ после внутригиппокампальной инъекции ФСБ, ЛПС, Спир, ЛПС + Спир, Миф, ЛПС + Миф. а, отростчатая микроглия; б, амебоидная микроглия; в, гипертрофированная микроглия; г, палочковидная микроглия; д, симпласты; е, среднее количество ядер в клетке-симпласте; ж, общее количества Iba1+ клеток в области интереса. Группы Интактные и ЛПС, n=8; группы ФСБ, ЛПС + Спир и ЛПС + Миф, n=7; группы Спир и Миф, n=6. * и **, тенденция ($0.00625 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.00625$) различия, соответственно, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения.

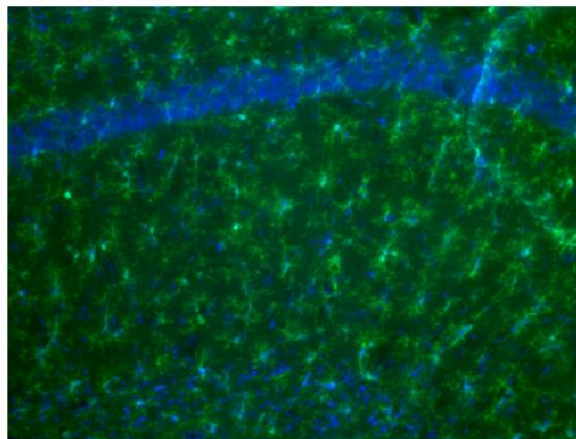
а, ДГ, группа Миф



б, ДГ, группа Миф + ЛПС



в, ДГ, группа Спир



г, ДГ, группа Спир + ЛПС

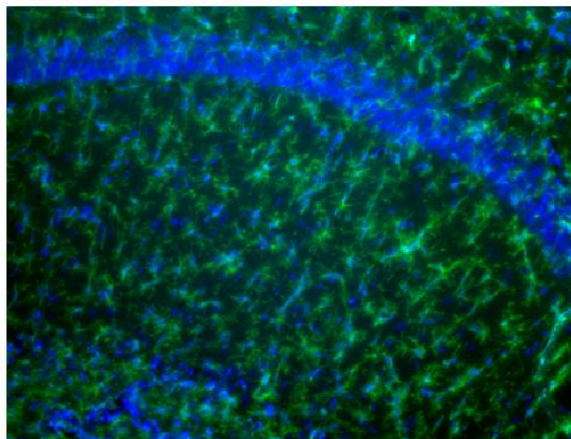


Рисунок 48. Активация микроглии в ДГ, репрезентативные микрофотографии. а, ДГ, группа Миф; б, ДГ, группа Миф + ЛПС; в, ДГ, группа Спир; г, ДГ, группа Спир + ЛПС. Окрашивание анти-Iba1 и DAPI, x20.

Анализ поведенческих эффектов в тесте предпочтения сахарозы не показал значимых эффектов ЛПС, а также ингибиторов ГР и МР самих по себе или в комбинации с ЛПС, на поведение животных (Рисунок 49).

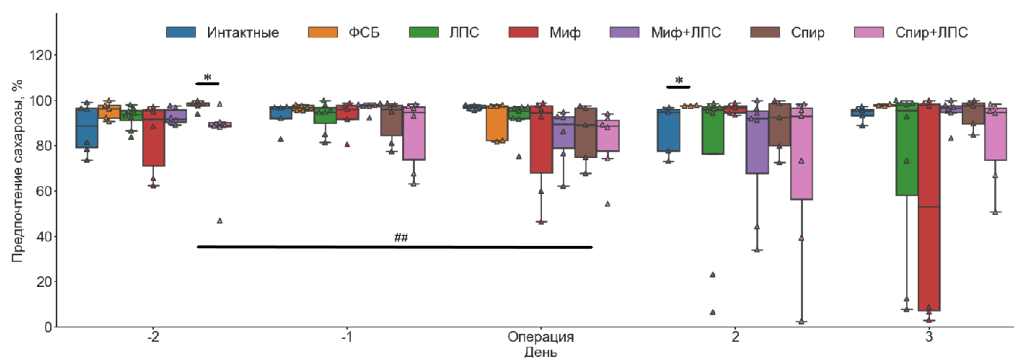


Рисунок 49. Изменения предпочтения сахарозы каждого животного до и после внутригиппокампальной инъекции ФСБ, ЛПС, Спир, ЛПС + Спир, Миф, ЛПС + Миф. Группы Интактные и ЛПС, n=8; группы ФСБ, ЛПС + Спир и ЛПС + Миф, n=7; группы Спир и Миф, n=6. * и **, тенденция ($0.00625 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.00625$) различия, соответственно, между группами в течение одного дня, согласно тесту Манна-Уитни с поправкой на множественные сравнения. # и ##, тенденция ($0.00625 \leq p \leq 0.05$) и достоверные ($p < 0.00625$) различия, соответственно, между животными одной группы в разные дни, согласно тесту Фридмана с применением post hoc теста Ньюмена.

5. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

5.1. Последствия фокального повреждения мозга

Как указывалось выше, долгосрочный период после ЧМТ часто ассоциирован с коморбидными деменцией и депрессией, которые наблюдаются не только у людей, но и животных, и считаются связанными с отсроченным повреждением гиппокампа [Nicks и др., 1993; Shultz и др., 2012]. В данном эксперименте, мы показали, что повреждение коры после ЛГДУ приводит к постепенному нарастанию структурных изменений в гиппокампе, как в ипсилатеральном, так и контралатеральном по отношению к месту кортикального удара. Кортикальное повреждение также индуцирует пролиферацию клеток микроглии, являющуюся признаком нейровоспаления, в гиппокампе. На 3-и сутки после ЧМТ было обнаружено снижение плотности нейронов в ЗИ только в ИГ. К 7-м суткам, потеря нейронов распространилась на гиппокамп контралатерального полушария. В данной временной точке этот процесс сопровождался увеличением количества микроглиальных клеток не только в ЗИ, где нейроны подверглись дегенерации, но также в зонах СА3 и СА1. Нейровоспаление, ассоциированное с активацией микроглии, обычно является обязательным условием нейродегенерации; однако данное предположение не подтвердилось нашими данными. Более того, наоборот, пролиферация микроглии следовала за потерей нейронов. Задержка между гибелью нейронов и микроглиозом в ЗИ и пролиферацией микроглии в зоне СА3 предполагает, что могут быть некоторые независимые факторы, запускающие отсроченную пролиферацию микроглии и гибель нейронов в гиппокампе. Факт того, что нейродегенерация сначала возникает в ипсилатеральной ЗИ, может свидетельствовать о прямом механическом воздействии кортикальной травмы на подкорковые структуры. Однако дальнейшее распространение нейрональной гибели на контралатеральное полушарие может быть признаком последующего переключения механизмов дистантного гиппокампального повреждения.

Безусловно, биомеханика ЛГДУ частично определяет область повреждения [Hua и др., 2015; Vink и др., 2001], но большая часть травмы ограничена ипсилатеральным неокортексом и только слегка захватывает нижележащие области мозга, включая гиппокамп. Таким образом, асимметрию повреждения можно частично объяснить биомеханикой травмы, но некоторые пункты противоречат чистой биомеханической природе ипсилатерального гиппокампального повреждения.

повреждения, а именно: (1) наличие нормальной ткани между первичной неокортикальной и гиппокампальной травами, (2) локализация гиппокампального повреждения главным образом в полиморфном слое ЗИ, а также (3) билатеральное участие одних и тех же гиппокампальных структур.

Известно, что травма мозга приводит к активации нейровоспалительных каскадов в гиппокампе и высвобождению провоспалительных цитокинов [Chao и др., 2012; Gatson и др., 2013; Kinoshita и др., 2002; Kuwar и др., 2019; Lu и др., 2005; Vitarbo и др., 2004; Zhang и др., 2015]. Здесь мы подтвердили предыдущие исследования других групп, что нейровоспаление происходит с различной интенсивностью в различных частях КГ и ИГ [Kinoshita и др., 2002; Vitarbo и др., 2004]. Более того, мы 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. Действительно, наши данные предполагают, что в гиппокампе, вероятно, существует сложный многомерный паттерн экспрессии провоспалительных цитокинов, индуцированный ЧМТ. Этот паттерн может быть определен природой цитокина, конкретной областью гиппокампа, близостью к месту травмы (ипсилатеральное или контралатеральное полушарие), а также локализацией вдоль септотемпорального градиента (ДГ и ВГ).

Интересно, наши измерения IL-1 β и IL-6 в гиппокампе на уровнях белка и мРНК показали различную временную динамику изменений после ЧМТ. У этого может быть несколько причин. Подъем мРНК *Il1b* отражает активацию микроглии и, вероятно, периваскулярных макрофагов, в ответ на изменения в состоянии ткани гиппокампа. Сильное повышение уровня мРНК через день после ЧМТ неизбежно приводит к подъему уровня белка. Однако на более поздних стадиях возможный подъем концентрации белка IL-1 β может быть замаскирован рядом процессов. В частности, может иметь место интенсификация метаболизма IL-1 β , в то время как увеличение IL-1 β компенсируется повышенным потреблением и деградацией белка. Возможно также, что развивающееся нейровоспаление в гиппокампе после ЧМТ может сопровождаться увеличением проницаемости ГЭБ и более активным выходом цитокинов в кровоток. Последнее может говорить о том, что изменения экспрессии мРНК отражают ответ клеток на ЧМТ, в то время как уровень белка является более сложным параметром, на который влияют различные факторы, включая скорости их деградации и вымывания из ткани.

Использование ЛО животных считается универсальным способом, обеспечивающим хороший операционный контроль в моделях заболеваний, включающих хирургические стадии.

Ложная операция предполагает, что эффекты операции, используемой для модели человеческого заболевания (которое фактически не включает в себя хирургическое вмешательство), нельзя просто вычестить из сложных изменений в экспериментальных группах. Физиологические ответы на различные повреждения (например, краниотомия и сама травма при моделировании ЧМТ) подразумевают наличие как общих, так и специфических механизмов на различных уровнях. Таким образом, подход, при котором сравнивают изменения в ЛО группе и экспериментальных группах (что мы обычно делаем, когда используем ЛО животных), является не идеальным, но, к сожалению, единственным доступным. Моделирование ЧМТ с помощью ЛГДУ остается золотым стандартом в данной области, тем не менее, имеет ряд недостатков, усложняющих интерпретацию результатов. Например, было показано, что краниотомия (ложная операция) привела к резкому повышению уровня кортикостерона в крови, в то время как травма мозга сама по себе не оказывала дополнительного влияния на данный параметр в острый период после ЧМТ [Grundy и др., 2001]. Мы расширили эти данные, обнаружив, что трепанация сама по себе может вызывать длительные изменения экспрессии некоторых цитокинов (*Cx3cl1*, *Il1b*, *Tnf*) в гиппокампе без изменений на морфологическом уровне. Изменения, наблюдаемые у ЛО животных, могут повлиять на конечный результат нейровоспаления после ЧМТ. Эта находка может быть очень важной для фармакологических исследований, где некоторые лекарственные средства применяются для модуляции нейровоспаления после ЧМТ.

Наконец, травма мозга сопровождается генерализованным стрессовым ответом организма, опосредованным активацией ГГНО. Этот универсальный ответ на травму, сопровождаемый высвобождением кортикостерона у грызунов (кортизола у людей), может быть тесно связан с провоспалительными событиями, как в мозге, так и во всем организме [Gulyaeva, 2019b]. На модели диффузной ЧМТ, индуцируемой срединным гидродинамическим ударом, было обнаружено, что ЧМТ-индуцируемый подъем уровня кортикостерона в крови длится не менее 1-го дня [Rowe, Ortiz, Thomas, 2020]. Однако, в модели ЛГДУ, подъем уровня кортикостерона в крови обратимый и сравним с повышением, индуцированным трепанацией у ЛО животных [Grundy и др., 2001]. По сравнению с опубликованными данными в исследовании Grundy et al. (2001), мы не обнаружили сильного роста кортикостерона в крови или гиппокампе через сутки после ЧМТ. Вместо этого, концентрация кортикостерона увеличилась только на 3-и сутки после ЧМТ в гиппокампах обоих полушарий и в крови, впоследствии возвращаясь к уровню ЛО животных. Природа роста кортикостерона на 3-и сутки не ясна; однако, этот подъем уровня кортикостерона может быть важен при потере контроля над нейровоспалительными процессами, происходящим после ЧМТ. Давно известно, что ГК способны подавлять

воспалительный ответ, что позволяет их использовать в клинике в качестве противовоспалительных агентов. Однако многие исследования предполагают, что длительный подъем кортикостерона может привести к его переходу из противовоспалительного в провоспалительный, вызывая нейровоспаление в гиппокампе [Bolshakov и др., 2021]. Следовательно, подъем кортикостерона и в крови, и в гиппокампе на 3-и сутки после ЧМТ может быть одним из факторов, усиливающих нейровоспаление на более поздних этапах после ЧМТ и индуцирующих отсроченную активацию микроглии в областях гиппокампа.

Мы предполагали, что ЧМТ может также приводить к изменениям в функции сигнальных систем, сопряженных со стрессом, в гиппокампе. К этим системам относится рецепция глюко- и минералкортикоидов, а также система с участием КРГ и его рецепторов. Однако на уровне экспрессии мРНК генов, кодирующих упомянутые белки, мы не обнаружили изменений ни в одной из областей гиппокампа. Предположительно, это может говорить о том, что в исследуемые периоды времени (1, 3, 7, 14 сутки) транскрипция исследуемых генов практически не менялась, однако, функционирование сигнальных каскадов могло меняться на уровне белков, что может быть предметом дальнейших исследований.

Говоря о дистантном повреждении гиппокампа, в частности, о гибели нейронов в хилусе ЗИ, стоит обратить внимание на то, какие нейроны там присутствуют и могут подвергаться воздействию. В гиппокампе имеются различные тормозные нейроны (соматостатин- (СОМ), парвальбумин- (ПВ), холецистокинин-, кальретинин- (КР), кальбиндин- (КБ) и нейропептид Y- (НПУ) положительные), обеспечивающие как локальное торможение в ЗИ так и торможение вне гиппокампа, а также мшистые клетки, формирующие синаптические связи между ДГ и ВГ. Известно, что в ДГ и ВГ количество интернейронов разных подтипов, а также их чувствительность к различным воздействиям отличается. Так, было показано, что при хроническом стрессе снижается количество СОМ+, ПВ+, КР+, КБ+ и НПУ+ интернейронов, причем в ДГ и ВГ результаты отличаются [Czeh и др., 2015]. После диффузной ЧМТ повреждаются в основном аксоны ПВ+ интернейронов, а повреждение аксонов СОМ+ интернейронов происходит намного реже [Harris и др., 2022]. Прогрессирующая дегенерация ПВ+ интернейронов в ЗИ была также описана на модели контролируемого кортикального удара как в ИГ, так и КГ [Pavlov и др., 2011]. Схожая картина была описана в другой работе, где было показано, что в ипсилатеральном гиппокампе наблюдается снижение числа ПВ+ интернейронов в ЗИ, а также области СА1, но не в префронтальной коре и амигдале [Taylor, Tio, Sutton, 2013]. В то же время, исследования, посвященные изменениям в функционировании мшистых нейронов после ЧМТ, выявили очень слабые изменения [Grovala и др., 2020]. Несмотря на то, что мы не производили специфического анализа клеток, которые дегенерируют после ЧМТ в

нашей модели, однако, на основании существующих данных можно предположить, что основной нейрональной субпопуляцией, которая начинает отмирать после ЧМТ, являются ПВ+ интернейроны, ответственные за торможение в ЗИ. Однако справедливость этого утверждения для всей септотемпоральной оси гиппокампа требует проверки в дальнейших исследованиях.

5.2. Влияние модуляция активности ГР и МР на ЛПС-индуцированное нейровоспаление

Целью Эксперимента 2 было проанализировать влияние активации ГР на нейровоспалительный ответ в гиппокампе. Мы оценивали прямое влияние агониста ГР Декс на гиппокампальную ткань по изменениям (1) уровней экспрессии генов, связанных с нейровоспалением, и (2) морфологии микроглии. 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.

На периферии ГК известны в качестве противовоспалительных агентов, которые реализуют свои функции, связываясь с ГР и МР. При этом в мозге ГК могут быть как противовоспалительными, так и провоспалительными агентами [Bolshakov и др., 2021], потому что их эффекты зависят от некоторых факторов, таких как, например, способ введения [Culig и др., 2017; Meneses и др., 2017] и условия в ткани [Frank и др., 2010]. Известно, что при нормальных условиях ГК присутствуют в мозге и могут связываться с ГР и МР для реализации своих функций. В нашем эксперименте активация ГР Декс привела к слабому провоспалительному сдвигу в экспрессии цитокинов и в ДГ, и в ВГ. Преобладание активированных форм микроглии в ДГ также подтверждают развитие нейровоспаления. Такой эффект высокой концентрации ГК в теле ранее был продемонстрирован в различных исследованиях [Frank и др., 2014; Munhoz и др., 2006; Munhoz и др., 2010]. Мы расширили предыдущие находки, показав, что прямое введение Декс в гиппокампальную ткань имело схожий провоспалительный эффект [Tret'yakova и др., 2021].

Затем мы оценивали влияние активации ГР на ЛПС-индуцированный нейровоспалительный ответ в гиппокампе и для этого совместно вводили Декс и ЛПС. Как известно, ЛПС сам по себе вызывает воспаление [Noh, Jeon, Seo, 2014; Perez-Dominguez и др., 2019; Qin и др., 2007; Ré Da и др., 2020; Tyagi и др., 2008], которое в данном исследовании проявлялось подъемом уровня экспрессии генов, ассоциированных с нейровоспалением (*IIIb*,

Il6, Tnf, Tgfb1, Ccl2 и *Ncf1*), и появлением активированных форм микроглии. Мы ожидали, что активация ГР в условиях индукции нейровоспаления ЛПС в гиппокампе будут более выраженными, по сравнению с нормальными условиями. Однако мы обнаружили, что Декс ослабил экспрессию только *Il6, Ccl2* и фракталкина (*Cx3cl1*), что предполагает наличие некоторых противовоспалительных характеристик у Декс. На клеточном уровне Декс не оказал сильного влияния на количество активированных форм микроглии, появившихся после введения ЛПС, но привел к появлению специфичных морфологических изменений, которые качественно отличались от изолированных инъекций Декс и ЛПС.

Таким образом, локальная активация ГР при введении Декс оказала очень маленький провоспалительный эффект на гиппокампальную ткань. Во время ЛПС-индуцированного нейровоспаления гиперактивация ГР посредством Декс ослабила экспрессию провоспалительных цитокинов, но сохранила активированный статус микроглии. В результате можно предположить, что ГР участвует в регуляции только некоторых веток нейровоспалительного процесса, относящихся к фракталкин- и интерлейкин-6-опосредованному сигналингу.

Целью Эксперимента 3 было проанализировать влияние ингибирования ГР и МР на нейровоспалительный ответ в гиппокампе. Мы оценивали прямое влияние антагониста ГР Миф и антагониста МР Спир на гиппокампальную ткань так же, как и в Эксперименте 2. Контрольные вещества (ФСБ и ЛПС) оказали влияние, аналогичное таковому в предшествующем эксперименте.

Ингибирование ГР и МР Миф и Спир, соответственно, значительно не повлияло на уровень цитокинов и морфологию микроглии. Это означает, что при базальных условиях и условиях слабого воспаления, вызванного микротравмой мозга в месте инъекции, ГК не оказывают долговременного влияния на экспрессию цитокинов и морфологию микроглии. Однако следует отметить, что данный результат не означает, что при базальных условиях ГК не являются критичными регуляторами нейровоспалительного сигналинга, т.к. мы не исследовали острых эффектов ингибиторов ГР и МР, а проанализировали только отсроченные последствия однократной инъекции этих агентов. Возможно, что они оказывали влияние на острую фазу нейровоспаления после возникновения микротравмы, однако, на 3-й день после инъекции этот эффект уже сложно обнаружить. Для прояснения «быстрых» эффектов использованных нами антагонистов требуются дополнительные измерения на более коротких временах после инъекции.

Затем мы оценивали влияние ингибирования ГР и МР на ЛПС-индуцированный нейровоспалительный ответ в гиппокампе и для этого совместно вводили Миф/Спир и ЛПС. Данное воздействие имело очень слабое влияние и на экспрессию цитокинов, и на морфологию микроглии. Здесь необходимо отметить, что хотя мы не проводили измерений уровня ГК в крови и ткани гиппокампа в острый период (первые несколько часов) после инъекции ЛПС, на основании имеющихся литературных данных [Pérez-Nievas и др., 2010] можно сделать вывод о том, что инъекция ЛПС приводила к повышению ГК по крайней мере в крови. Можно было бы ожидать, что снижение активности ГР и МР при индукции нейровоспаления должно было снизить или повысить уровень цитокинов в зависимости от того, какой эффект оказали эндогенные ГК при инъекции ЛПС. Мы же не обнаружили значимых изменений при добавлении ингибиторов, что говорит о том, что развитие цитокинового и морфологического ответов на ЛПС-индуцированное нейровоспаление не модулируется эндогенными ГК, которые могут выделяться после инъекции ЛПС.

Таким образом, при ингибировании ГР и МР посредством внутригиппокампальных инъекций Миф и Спир, соответственно, не было выявлено эффектов, противоположных эффектам активации ГР. Полученные данные Экспериментов 2 и 3 могут служить доказательством того, что нейровоспаление имеет сложную природу, и ГК модулируют различные аспекты нейровоспалительного ответа в гиппокампе на молекулярном и клеточном уровнях.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дистантное повреждение гиппокампа рассматривается в качестве одного из возможных механизмов патогенеза эмоциональных и когнитивных расстройств после ЧМТ. Существует предположение, что дистантное повреждение развивается в результате действия ГК, выброшенных в кровь при развитии стрессового ответа на ЧМТ, на клетки гиппокампа. Продолжительное действие ГК на ткань гиппокампа потенциально может приводить к развитию и усилению нейровоспаления и последующей гибели нейронов гиппокампа. Проведенная нами работа была сфокусирована на анализе динамики гибели нейронов и развития нейровоспаления в различных частях гиппокампа после ЧМТ, индуцированной ЛГДУ.

Нами показано, что ЧМТ, несмотря на локальный характер повреждения ткани мозга в неокортексе, приводит к отсроченной гибели нейронов в ЗИ ДГ. Это наблюдение является существенным шагом к установлению механизмов развития когнитивных расстройств, а возможно, и посттравматической эпилепсии. Нами показано, что страдают клетки в основном ДГ, вовлеченного в функционирование рабочей памяти и навигацию в пространстве. Последнее наводит на мысль, что развитие когнитивных расстройств может быть результатом именно поражения ДГ, в то время как распространение нейровоспаления из ДГ в ВГ, вовлеченный преимущественно в обработку информации, связанной с эмоциями, может быть важным фактором нарушения функционирования ВГ, способствующим развитию эмоциональных расстройств.

Как мы указывали выше, существует предположение, что ведущую роль в развитии нейровоспаления может играть повышение уровня кортикостерона после стресса, индуцированного ЧМТ. Взаимосвязь между сигнальной системой кортикостерона и развитием нейровоспаления мы попытались проанализировать с помощью двух подходов: (1) измерения уровня кортикостерона после ЧМТ и (2) анализ эффектов, возникающих при модуляции активности ГР и МР в условиях острого воспаления, вызванного внутригиппокампаальной инъекцией ЛПС. Результаты наших экспериментов говорят о том, что подъем кортикостерона после травмы либо после инъекции ЛПС не является фактором, который существенным образом влияет на течение нейровоспаления. Однако данный вывод можно распространить только на начальную фазу течения нейровоспаления. Важно отметить, что мы обнаружили подъем кортикостерона на 3-й день после ЧМТ в крови и всех отделах гиппокампа. Механизм этого повышения остается неясным, однако, можно предположить, что он выполняет роль

фактора, поддерживающего нейровоспаление в гиппокампе после ЧМТ и способствующего его распространению вдоль дорсовентральной оси гиппокампа, а также в КГ. Однако прояснение роли этого фактора и других деталей патогенеза ЧМТ выходит за рамки нашей работы и требует дальнейших исследований.

7. 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 $IL-1\beta$, $IL-6$ и $TNF\alpha$ 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 *Il6*, *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.

8. СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВГ – вентральный гиппокамп

ГК – глюкокортикоиды

ГР – глюкокортикоидный рецептор

ГЭБ – гемато-энцефалический барьер

ДГ – дорсальный гиппокамп

Декс - дексаметазон

ИВГ – ипсилатеральный вентральный гиппокамп

ИДГ – ипсилатеральный дорсальный гиппокамп

КВГ – контралатеральный вентральный гиппокамп

КДГ – контралатеральный дорсальный гиппокамп

ЛПС – липополисахарид

Миф - мифепристон

МР – минералокортикоидный рецептор

Спир - спиронолактон

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ЦНС – центральная нервная система

ЧМТ – черепно-мозговая травма

IL-1 β –интерлейкин 1 β

IL-6 – интерлейкин 6

TNF α – фактор некроза опухоли α

TGF β 1 – трансформирующий ростовой фактор β

9. СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Acosta S. A. и др. Alpha-Synuclein as a pathological link between chronic traumatic brain injury and parkinson's disease // *J. Cell. Physiol.* 2015. Т. 230. № 5. С. 1024–1032.
2. Al-Shorbagy M. Y., Sayeh B. M. El, Abdallah D. M. Diverse effects of variant doses of dexamethasone in lithium-pilocarpine induced seizures in rats // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2012. Т. 90. № 1. С. 13–21.
3. Albert-Weißberger C. и др. An experimental protocol for mimicking pathomechanisms of traumatic brain injury in mice // *Exp. Transl. Stroke Med.* 2012. Т. 4. № 1. С. 1–5.
4. Aungst S. L. и др. Repeated mild traumatic brain injury causes chronic neuroinflammation, changes in hippocampal synaptic plasticity, and associated cognitive deficits // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2014. Т. 34. № 7. С. 1223–1232.
5. Baker J. D. и др. Hsp90 heterocomplexes regulate steroid hormone receptors: From stress response to psychiatric disease // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Т. 20. № 1. С. 79.
6. Van E. и др. Receptors for interleukin-1 (α and β) in mouse brain: Mapping and neuronal localization in hippocampus // *Neuroscience.* 1991. Т. 43. № 1. С. 21–30.
7. Banisadr G. и др. Highly regionalized neuronal expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) in rat brain: Evidence for its colocalization with neurotransmitters and neuropeptides // *J. Comp. Neurol.* 2005. Т. 489. № 3. С. 275–292.
8. Banks W. A. и др. Human interleukin (IL) 1 alpha, murine IL-1 alpha and murine IL-1 beta are transported from blood to brain in the mouse by a shared saturable mechanism. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991. Т. 259. № 3. С. 988–96.
9. Banks W. A. The blood-brain barrier in neuroimmunology: Tales of separation and assimilation //

Brain. Behav. Immun. 2015. T. 44. C. 1–8.

10. Banuelos J. и др. BCL-2 protects human and mouse Th17 cells from glucocorticoid-induced apoptosis // *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 2016. T. 71. № 5. C. 640–650.

11. Banuelos J., Lu N. Z. A gradient of glucocorticoid sensitivity among helper T cell cytokines // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016. T. 31. C. 27–35.

12. Betancur C. Corticosteroid Regulation of IL-1 Receptors in the Mouse Hippocampus: Effects of Glucocorticoid Treatment, Stress, and Adrenalectomy // *Neuroendocrinology.* 1994. T. 59. C. 120–128.

13. Betancur C., Borrell J., Guaza C. Cytokine regulation of corticosteroid receptors in the rat hippocampus: Effects of interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor and lipopolysaccharide // *Neuroendocrinology.* 1995. T. 62. № 1. C. 47–54.

14. Black R. A. и др. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells // *Nature.* 1997. T. 385. № 6618. C. 729–733.

15. Bloem L. J., Guo C., Pratt J. H. Identification of a splice variant of the rat and human mineralocorticoid receptor genes // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1995. T. 55. № 2. C. 159–162.

16. Bluthé R. Inactivation of the Cerebral NF- κ B Pathway Inhibits Interleukin-1 β -Induced Sickness Behavior and c-Fos Expression in Various Brain Nuclei // 2005. C. 1492–1499.

17. Bolshakov A. P. и др. Glucocorticoids: Dr. Jekyll and Mr. Hyde of Hippocampal Neuroinflammation // *Biochem.* 2021. T. 86. № 2. C. 156–167.

18. Burns M. P. и др. The Effect of Injury Severity on Behavior: A Phenotypic Study of Cognitive and Emotional Deficits after Mild, Moderate, and Severe Controlled Cortical Impact Injury in Mice // *J. Neurotrauma.* 2012. T. 29. № 13. C. 2283–2296.

19. Cain D. W., Cidlowski J. A. Immune regulation by glucocorticoids // *Nat. Rev. Immunol.* 2017. T. 17. № 4. C. 233–247.

20. Capizzi A., Woo J., Verduzco-Gutierrez M. Traumatic Brain Injury: An Overview of Epidemiology, Pathophysiology, and Medical Management // *Med. Clin. North Am.* 2020. T. 104. № 2. C. 213–238.

21. Carr M. W. и др. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1994. T. 91. № 9. C. 3652–3656.

22. Caudal D., Jay T. M., Godsil B. P. Behavioral stress induces regionally-distinct shifts of brain mineralocorticoid and glucocorticoid receptor levels // *Front. Behav. Neurosci.* 2014. Т. 8. С. 19.
23. Chai Z. и др. Subchronic glucocorticoid pretreatment reversibly attenuates IL-1 β induced fever in rats; IL-6 mRNA is elevated while IL-1 α and IL-1 β mRNAs are suppressed, in the CNS // *Cytokine.* 1996. Т. 8. № 3. С. 227–237.
24. Chao P. K. и др. Indomethacin protects rats from neuronal damage induced by traumatic brain injury and suppresses hippocampal IL-1 β release through the inhibition of Nogo-A expression // *J. Neuroinflammation.* 2012. Т. 9. С. 121.
25. Chen G. и др. Progesterone administration modulates TLRS/NF- κ B signaling pathway in rat brain after cortical contusion // *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2008a. Т. 38. № 1. С. 65–74.
26. Chen G., Goeddel D. V. TNF-R1 signaling: A beautiful pathway // *Science* (80-.). 2002. Т. 296. № 5573. С. 1634–1635.
27. Chen Y. и др. LPS-induced up-regulation of TGF- β receptor 1 is associated with TNF- α expression in human monocyte-derived macrophages // *J. Leukoc. Biol.* 2008b. Т. 83. № 5. С. 1165–1173.
28. Chen Y. и др. Tuning synaptic transmission in the hippocampus by stress: the CRH system // *Front. Cell. Neurosci.* 2012. Т. 6. С. 13.
29. Contassot E., Beer H. D., French L. E. Interleukin-1, inflammasomes, autoinflammation and the skin // *Swiss Med. Wkly.* 2012. Т. 142. С. 1–10.
30. Coronado V. G. и др. Surveillance for traumatic brain injury-related deaths - United States, 1997-2007 // *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2011. Т. 60. № SS-5. С. 1–36.
31. Craig M. J., Loberg R. D. CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1) in cancer bone metastases // *Cancer Metastasis Rev.* 2006. Т. 25. № 4. С. 611–619.
32. Cronstein B. N. и др. A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: The glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992. Т. 89. № 21. С. 9991–9995.
33. Culig L. и др. Increasing adult hippocampal neurogenesis in mice after exposure to unpredictable chronic mild stress may counteract some of the effects of stress // *Neuropharmacology.* 2017. Т. 126. С. 179–189.

34. Czéh B. и др. Chronic stress reduces the number of GABAergic interneurons in the adult rat hippocampus, dorsal-ventral and region-specific differences // *Hippocampus*. 2015. Т. 25. № 3. С. 393–405.
35. Dail W. G. и др. Responses to cortical injury: II. Widespread depression of the activity of an enzyme in cortex remote from a focal injury // *Brain Res*. 1981. Т. 211. № 1. С. 79–89.
36. Dalgard C. L. и др. The cytokine temporal profile in rat cortex after controlled cortical impact // *Front. Mol. Neurosci*. 2012. Т. 5. С. 6.
37. Dantzer R. Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications // *Ann N Y Acad Sci*. 2001. Т. 933. № 33. С. 222–234.
38. Dinarello C. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases // *Blood*. 2011. Т. 117. № 14. С. 3720–3733.
39. Dinkel K., Macpherson A., Sapolsky R. M. Novel glucocorticoid effects on acute inflammation in the CNS // *J. Neurochem*. 2003. Т. 84. С. 705–716.
40. Dixon C. E., Lighthall J. W., Anderson T. E. Physiologic, Histopathologic, and Cineradiographic Characterization of a New Fluid-Percussion Model of Experimental Brain Injury in the Rat. : Mary Ann Liebert, Inc., Publishers, 1988.
41. Dobryakova Y. V. и др. Intracerebroventricular administration of 192IgG-saporin alters expression of microglia-associated genes in the dorsal but not ventral hippocampus // *Front. Mol. Neurosci*. 2018. Т. 10. С. 429.
42. Dolan-O'keefe M., Nick H. S. Inhibition of Cytoplasmic Phospholipase A 2 Expression by Glucocorticoids in Rat Intestinal Epithelial Cells // *Gastroenterology*. 1999. Т. 116. С. 855–864.
43. Duseja R. и др. Astrocytic TNF α regulates the behavioral response to antidepressants // *Brain. Behav. Immun*. 2015. Т. 44. С. 187–194.
44. Eapen B. C., Cifu D. X. Rehabilitation after traumatic brain injury. : Elsevier, 2019.
45. Edward Dixon C. и др. A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat // *J. Neurosci. Methods*. 1991. Т. 39. № 3. С. 253–262.
46. Ericsson A. и др. Type 1 Interleukin-1 Receptor in the Rat Brain : Distribution , Regulation , and Relationship to Sites of IL- & Induced Cellular Activation // *J. Comp. Neurol*. 1995. Т. 361. № 4. С. 681–698.

47. Espinosa-Oliva A. M. и др. Stress is critical for LPS-induced activation of microglia and damage in the rat hippocampus // *Neurobiol. Aging*. 2009. Т. 32. № 1. С. 85–102.
48. Estes M. L., McAllister A. K. Alterations in immune cells and mediators in the brain: It's Not always neuroinflammation! // *Brain Pathol*. 2014. Т. 24. № 6. С. 623–630.
49. Fabene P. F., Bramanti P., Constantin G. The emerging role for chemokines in epilepsy // *J. Neuroimmunol*. 2010. Т. 224. № 1–2. С. 22–27.
50. Fanselow M. S., Dong H. W. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? // *Neuron*. 2010. Т. 65. № 1. С. 7–19.
51. Farrar W. L. и др. Visualization and characterization of interleukin 1 receptors in brain // *J. Immunol*. 1987. Т. 139. № 2. С. 459–463.
52. Feeney D. M. и др. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat // *Brain Res*. 1981. Т. 211. № 1. С. 67–77.
53. Figiel I. Pro-inflammatory cytokine TNF- α as a neuroprotective agent in the brain // *Acta Neurobiol Exp*. 2008. Т. 68. С. 526–534.
54. Flower R. J., Rothwell N. J. Lipocortin-I: cellular mechanisms and clinical relevance // *Trends Pharmacol. Sci*. 1994. Т. 15. № 3. С. 71–76.
55. Foresti M. L. и др. Chemokine CCL2 and its receptor CCR2 are increased in the hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus // *J. Neuroinflammation*. 2009. Т. 6. С. 40.
56. Frank M. G. и др. Prior exposure to glucocorticoids sensitizes the neuroinflammatory and peripheral inflammatory responses to *E. coli* lipopolysaccharide // *Brain. Behav. Immun*. 2010. Т. 24. № 1. С. 19–30.
57. Frank M. G. и др. Glucocorticoids mediate stress-induced priming of microglial pro-inflammatory responses // *Brain. Behav. Immun*. 2012. Т. 26. № 2. С. 337–345.
58. Frank M. G. и др. Chronic exposure to exogenous glucocorticoids primes microglia to pro-inflammatory stimuli and induces NLRP3 mRNA in the hippocampus // *Psychoneuroendocrinology*. 2014. Т. 40. № 1. С. 191–200.
59. Frank M. G., Watkins L. R., Maier S. F. The permissive role of glucocorticoids in neuroinflammatory priming: mechanisms and insights // *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2015. Т. 22. № 4. С. 300–305.

60. Gaetz M. The neurophysiology of brain injury // *Clin. Neurophysiol.* 2004. Т. 115. № 1. С. 4–18.
61. Gatson J. W. и др. Resveratrol decreases inflammation in the brain of mice with mild traumatic brain injury // *J. Trauma Acute Care Surg.* 2013. Т. 74. № 2. С. 470–475.
62. Gehrman J., Matsumoto Y., Kreutzberg G. W. Microglia: Intrinsic immuneffector cell of the brain // *Brain Res. Rev.* 1995. Т. 20. № 3. С. 269–287.
63. Gerard C., Rollins B. J. Chemokines and disease // *Nat. Immunol.* 2001. Т. 2. № 2. С. 108–115.
64. Ginhoux F. и др. Origin and differentiation of microglia // *Front. Cell. Neurosci.* 2013. Т. 7. № 1. С. 45.
65. Goppelt-Struebe M., Wolter D., Resch K. Glucocorticoids inhibit prostaglandin synthesis not only at the level of phospholipase A2 but also at the level of cyclo-oxygenase/PGE isomerase // *Br. J. Pharmacol.* 1989. Т. 98. № 4. С. 1287–1295.
66. Goshen I. и др. A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes // *Psychoneuroendocrinology.* 2007. Т. 32. № 8–10. С. 1106–1115.
67. Goujon E. Stress downregulates lipopolysaccharide-induced expression of proinflammatory cytokines in the spleen, pituitary, and brain of mice // *Brain Behav. Immun.* 1995. Т. 9. С. 292–303.
68. Goujon E. и др. Adrenalectomy enhances pro-inflammatory cytokines gene expression, in the spleen, pituitary and brain of mice in response to lipopolysaccharide // *Mol. Brain Res.* 1996. Т. 36. С. 53–62.
69. Goujon E. и др. REGULATION OF CYTOKINE GENE EXPRESSION IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM BY GLUCOCORTICOIDS: MECHANISMS AND FUNCTIONAL CONSEQUENCES // *Psychoneuroendocrinology.* 1997. Т. 22. С. S75–S80.
70. Grafman J., Salazar A. M. Traumatic Brain injury, part I, *Handbook of Clinical Neurology.* : Elsevier B.V., 2015. Вып. 2nd.
71. Graham D. I. и др. Recent Advances in Neurotrauma // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2000. Т. 59. № 8. С. 641–651.
72. Grovola M. R. и др. Mossy cell hypertrophy and synaptic changes in the hilus following mild diffuse traumatic brain injury in pigs // *J. Neuroinflammation.* 2020. Т. 17. № 1.
73. Grundy P. L. и др. The Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis Response to Experimental Traumatic

Brain Injury. : Mary Ann Liebert, Inc, 2001.

74. Gulyaeva N. V. Functional Neurochemistry of the Ventral and Dorsal Hippocampus: Stress, Depression, Dementia and Remote Hippocampal Damage // *Neurochem. Res.* 2019a. Т. 44. № 6. С. 1306–1322.

75. Gulyaeva N. V. Biochemical Mechanisms and Translational Relevance of Hippocampal Vulnerability to Distant Focal Brain Injury: The Price of Stress Response // *Biochem.* 2019b. Т. 84. № 11. С. 1306–1328.

76. Hall J. E. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. : Elsevier Ltd, 2016. Вып. 13.

77. Hanisch U. K. Microglia as a source and target of cytokines // *Glia.* 2002. Т. 40. № 2. С. 140–155.

78. Hardman J. M., Manoukian A. Pathology of head trauma // *Neuroimaging Clin. N. Am.* 2002. Т. 12. № 2. С. 175–187.

79. Harris A. C. и др. Somatostatin interneurons exhibit enhanced functional output and resilience to axotomy after mild traumatic brain injury // *Neurobiol. Dis.* 2022. Т. 171. С. 105801.

80. Helmut K. и др. Physiology of microglia // *Physiol. Rev.* 2011. Т. 91. № 2. С. 461–553.

81. Hewett S. J. и др. Interleukin-1 β in Central Nervous System Injury and Repair Sandra // *Eur J Neurodegener Dis.* 2012. Т. 1. № 2. С. 195–211.

82. Hickman S. E., Khoury J. El. Mechanisms of Mononuclear Phagocyte Recruitment in Alzheimer's Disease // *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2010. Т. 9. № 2. С. 168–173.

83. Hicks R. и др. Mild Experimental Brain Injury in the Rat Induces Cognitive Deficits Associated with Regional Neuronal Loss in the Hippocampus. : Mary Ann Liebert, Inc., Publishers, 1993.

84. Hicks R. и др. Temporal and spatial characterization of neuronal injury following lateral fluid-percussion brain injury in the rat // *Acta Neuropathol.* 1996. Т. 91. № 3. С. 236–246.

85. Hillard C. J. Circulating Endocannabinoids: From Whence Do They Come and Where are They Going? // *Neuropsychopharmacology.* 2018. Т. 43. № 1. С. 155–172.

86. Hiskens M. и др. Celecoxib in a Preclinical Model of Repetitive Mild Traumatic Brain Injury: Hippocampal Learning Deficits Persist with Inflammatory and Excitotoxic Neuroprotection // *Trauma Care.* 2021. Т. 1. № 1. С. 23–37.

87. Hua Y. и др. Characterization of Closed Head Impact Injury in Rat // *Biomed Res. Int.* 2015. Т.

2015.

88. Jostock T. и др. Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses // *Eur. J. Biochem.* 2001. Т. 268. № 1. С. 160–167.
89. Kabadi S. V., Faden A. I. Neuroprotective strategies for traumatic brain injury: Improving clinical translation // *Int. J. Mol. Sci.* 2014. Т. 15. № 1. С. 1216–1236.
90. Karst H., Derijk R., Kloet E. R. De. The coming out of the brain mineralocorticoid receptor // *Trends Neurosci.* 2008. Т. 31. № 1. С. 1–7.
91. Khairova R. A. и др. A potential role for pro-inflammatory cytokines in regulating synaptic plasticity in major depressive disorder // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2009. Т. 12. № 4. С. 561–578.
92. Kim J. S. и др. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 after focal cerebral ischemia in the rat // *J. Neuroimmunol.* 1995. Т. 56. С. 127–134.
93. Kimura A., Kishimoto T. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance // *Eur. J. Immunol.* 2010. Т. 40. № 7. С. 1830–1835.
94. Kingwell K. Neurodegenerative disease: Microglia in early disease stages // *Nat. Rev. Neurol.* 2012. Т. 8. № 9. С. 475.
95. Kinoshita K. и др. INTERLEUKIN-1 MESSENGER RIBONUCLEIC ACID AND PROTEIN LEVELS AFTER FLUID-PERCUSSION BRAIN INJURY IN RATS: IMPORTANCE OF INJURY SEVERITY AND BRAIN TEMPERATURE // *Neurosurgery.* 2002. Т. 51. С. 195–203.
96. Kirschke E. и др. Glucocorticoid receptor function regulated by coordinated action of the Hsp90 and Hsp70 chaperone cycles // *Cell.* 2014. Т. 157. № 7. С. 1685–1697.
97. Klein T. W. Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics // *Nat. Rev. Immunol.* 2005. Т. 5. № 5. С. 400–411.
98. Kloet E. R. De и др. Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease // *Endocr. Rev.* 1998. Т. 19. № 3. С. 269–301.
99. Krauss P. G. *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation Third , Completely Revised Edition.* , 2003. 442 с.
100. Kriegler M. и др. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: Ramifications for the complex physiology of TNF // *Cell.* 1988. Т. 53. № 1. С. 45–53.

101. Kuehn R. и др. Novel Model of Frontal Impact Closed Head Injury in the Rat // *J. Neurotrauma*. 2009. Т. 26. № 12. С. 2233–2243.
102. Kuwar R. и др. A novel small molecular NLRP3 inflammasome inhibitor alleviates neuroinflammatory response following traumatic brain injury // *J. Neuroinflammation*. 2019. Т. 16. № 1.
103. Lagraoui M. и др. Controlled cortical impact and craniotomy induce strikingly similar profiles of inflammatory gene expression, but with distinct kinetics // *Front. Neurol*. 2012. Т. 3. С. 155.
104. Letterio J. J., Roberts A. B. REGULATION OF IMMUNE RESPONSES BY TGF- β // *Annu. Rev. Immunol*. 1998. Т. 16. С. 137–161.
105. Lightman S. L. и др. The significance of glucocorticoid pulsatility // *Eur. J. Pharmacol*. 2008. Т. 583. № 2–3. С. 255–262.
106. Lu K. T. и др. Effect of interleukin-1 on traumatic brain injury-induced damage to hippocampal neurons // *J. Neurotrauma*. 2005. Т. 22. № 8. С. 885–895.
107. Lyeth B. G. и др. Craniectomy Position Affects Morris Water Maze Performance and Hippocampal Cell Loss after Parasagittal Fluid Percussion // *J. Neurotrauma*. 2002. Т. 19. № 3. С. 303–316.
108. Ma Y. и др. Glucocorticoids Suppress the Protective Effect of Cyclooxygenase-2-Related Signaling on Hippocampal Neurogenesis Under Acute Immune Stress // *Mol. Neurobiol*. 2017. Т. 54. № 3. С. 1953–1966.
109. Maas A. I. R., Stocchetti N., Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults // *Lancet Neurol*. 2008. Т. 7. С. 728–741.
110. Maes M. и др. Targeting classical IL-6 signalling or IL-6 trans -signalling in depression? // *Expert Opin. Ther. Targets*. 2014. Т. 18. № 5. С. 495–512.
111. Maggio N., Segal M. Cellular basis of a rapid effect of mineralocorticosteroid receptors activation on LTP in ventral hippocampal slices // *Hippocampus*. 2012. Т. 22. № 2. С. 267–275.
112. Malkesman O. и др. Traumatic brain injury - modeling neuropsychiatric symptoms in rodents // *Front. Neurol*. 2013. Т. 4. С. 157.
113. Maras P. M., Baram T. Z. Sculpting the hippocampus from within: Stress, spines, and CRH // *Trends Neurosci*. 2012. Т. 35. № 5. С. 315–324.

114. Marmarou A. и др. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. // *J. Neurosurg.* 1994. Т. 80. № 2. С. 291–300.
115. Marmarou A., Roland Reynolds R. A new model of diffuse brain injury in rats Part II: Morphological characterization // *J Neurosurg.* 1994. Т. 80. С. 301–313.
116. Matzinger P. The evolution of the danger theory // *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2012. Т. 8. № 4. С. 311–317.
117. McIntosh T. K. и др. Traumatic Brain Injury in the Rat: Characterization of a Midline Fluid-Percussion Model // *Cent. Nerv. Syst. Trauma.* 1987. Т. 4. № 2. С. 119–134.
118. McIntosh T. K. и др. Traumatic Brain Injury in the Rat: Characterization of a Midline Fluid-Percussion Model // *Cent. Nerv. Syst. Trauma.* 1987. Т. 4. № 2. С. 119–134.
119. McIntosh T. K. и др. TRAUMATIC BRAIN INJURY IN THE RAT: CHARACTERIZATION OF A LATERAL FLUID-PERCUSSION MODEL // *Neuroscience.* 1989. Т. 28. № I. С. 233–244.
120. McKinley L. и др. T H 17 Cells Mediate Steroid-Resistant Airway Inflammation and Airway Hyperresponsiveness in Mice // *J. Immunol.* 2008. Т. 181. № 6. С. 4089–4097.
121. Mei Z. и др. Huperzine A alleviates neuroinflammation, oxidative stress and improves cognitive function after repetitive traumatic brain injury // *Metab. Brain Dis.* 2017. Т. 32. № 6. С. 1861–1869.
122. Meneses G. и др. Intranasal delivery of dexamethasone efficiently controls LPS-induced murine neuroinflammation // *Clin. Exp. Immunol.* 2017. Т. 190. № 3. С. 304–314.
123. Mukherjee S. и др. Early TBI-Induced Cytokine Alterations are Similarly Detected by Two Distinct Methods of Multiplex Assay // *Front. Mol. Neurosci.* 2011. Т. 4. С. 21.
124. Munhoz C. D. и др. Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor- κ B in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion // *J. Neurosci.* 2006. Т. 26. № 14. С. 3813–3820.
125. Munhoz C. D. и др. Glucocorticoids exacerbate lipopolysaccharide-induced signaling in the frontal cortex and hippocampus in a dose-dependent manner // *J. Neurosci.* 2010. Т. 30. № 41. С. 13690–13698.
126. Nathan C. Points of control in inflammation // *Nature.* 2002. Т. 420. № 6917. С. 846–852.
127. Nissen R. M., Yamamoto K. R. The glucocorticoid receptor inhibits NF κ B by interfering with

- serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain // *Genes Dev.* 2000. T. 14. № 18. С. 2314–2329.
128. Noh H., Jeon J., Seo H. Systemic injection of LPS induces region-specific neuroinflammation and mitochondrial dysfunction in normal mouse brain // *Neurochem. Int.* 2014. T. 69. № 1. С. 35–40.
129. Oberholzer M., Müri R. M. Neurorehabilitation of Traumatic Brain Injury (TBI): A Clinical Review // *Med. Sci.* 2019. T. 7. № 3. С. 47.
130. Onufriev M. V. и др. Neonatal proinflammatory stress induces accumulation of corticosterone and interleukin-6 in the hippocampus of juvenile rats: Potential mechanism of synaptic plasticity impairments // *Biochem.* 2017a. T. 82. № 3. С. 275–281.
131. Onufriev M. V. и др. Accumulation of corticosterone and interleukin-1 β in the hippocampus after focal ischemic damage of the neocortex: Selective vulnerability of the ventral hippocampus // *Neurochem. J.* 2017b. T. 11. № 3. С. 236–241.
132. Otto V. I. и др. Experimental Closed Head Injury: Analysis of Neurological Outcome, Blood–Brain Barrier Dysfunction, Intracranial Neutrophil Infiltration, and Neuronal Cell Death in Mice Deficient in Genes for Pro-Inflammatory Cytokines // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2003. T. 20. № 2. С. 369–380.
133. Pan W., Kastin A. J. TNF α transport across the blood-brain barrier is abolished in receptor knockout mice // *Exp. Neurol.* 2002. T. 174. № 2. С. 193–200.
134. Parakalan R. и др. Transcriptome analysis of amoeboid and ramified microglia isolated from the corpus callosum of rat brain // *BMC Neurosci.* 2012. T. 13. № 1.
135. Pariante C. M., Lightman S. L. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments // *Trends Neurosci.* 2008. T. 31. № 9. С. 464–468.
136. Páv M. и др. Neurobiological Aspects of Depressive Disorder and Antidepressant Treatment: Role of Glia // *Physiol. Res.* 2008. T. 57. С. 151–164.
137. Pavlov I. и др. Progressive loss of phasic, but not tonic, GABA A receptor-mediated inhibition in dentate granule cells in a model of post-traumatic epilepsy in rats // *Neuroscience.* 2011. T. 194. С. 208–219.
138. Pereira A. M., Tiemensma J., Romijn J. A. Neuropsychiatric disorders in Cushing's syndrome // *Neuroendocrinology.* 2010. T. 92. С. 65–70.

139. Perez-Dominguez M. и др. The detrimental effects of lipopolysaccharide-induced neuroinflammation on adult hippocampal neurogenesis depend on the duration of the pro-inflammatory response // *Neural Regen. Res.* 2019. Т. 14. № 5. С. 817–825.
140. Pérez-Nievas B. G. и др. Corticosterone basal levels and vulnerability to LPS-induced neuroinflammation in the rat brain // *Brain Res.* 2010. Т. 1315. С. 159–168.
141. Perretti M. The Microcirculation and Inflammation: Site of Action for Glucocorticoids // *Microcirculation.* 2000. Т. 7. № 3. С. 147–161.
142. Perry V. H., Nicoll J. A. R., Holmes C. Microglia in neurodegenerative disease // *Nat. Rev. Neurol.* 2010. Т. 6. № 4. С. 193–201.
143. Piskunov A. и др. Chronic combined stress induces selective and long-lasting inflammatory response evoked by changes in corticosterone accumulation and signaling in rat hippocampus // *Metab. Brain Dis.* 2016. Т. 31. № 2. С. 445–454.
144. Popiolek-Barczyk K. и др. The CCL2/CCL7/CCL12/CCR2 pathway is substantially and persistently upregulated in mice after traumatic brain injury, and CCL2 modulates the complement system in microglia // *Mol. Cell. Probes.* 2020. Т. 54. С. 101671.
145. Prins M. L. и др. Fluid percussion brain injury in the developing and adult rat: a comparative study of mortality, morphology, intracranial pressure and mean arterial blood pressure // *Dev. Brain Res.* 1996. Т. 95. С. 272–282.
146. Qin L. и др. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration // *Glia.* 2007. Т. 55. № 5. С. 453–462.
147. Ransohoff R. M. и др. Astrocyte expression of mRNA encoding cytokines IP-10 and JE/MCP-1 in experimental autoimmune encephalomyelitis // *FASEB J.* 1993. Т. 7. № 6. С. 592–600.
148. Ré C. Da и др. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide leads to memory impairment and alterations in hippocampal leptin signaling // *Behav. Brain Res.* 2019. Т. 379. С. 112360.
149. Rodriguez J. M. и др. Glucocorticoid resistance in chronic diseases // *Steroids.* 2016. Т. 115. С. 182–192.
150. Rowe R. K., Ortiz J. B., Thomas T. C. Mild and Moderate Traumatic Brain Injury and Repeated Stress Affect Corticosterone in the Rat // *Neurotrauma Reports.* 2020. Т. 1. № 1. С. 113–124.
151. Rustenhoven J. и др. TGF-beta1 regulates human brain pericyte inflammatory processes involved

- in neurovasculature function // *J. Neuroinflammation*. 2016. Т. 13. С. 37.
152. Saatman K. E. и др. Differential Behavioral and Histopathological Responses to Graded Cortical Impact Injury in Mice // *J. Neurotrauma*. 2006. Т. 23. № 8. С. 1241–1253.
153. Sahoo M. и др. Role of the Inflammasome, IL-1 β , and IL-18 in Bacterial Infections // *Sci. World J.* 2011. Т. 11. С. 2037–2050.
154. Saunders A. и др. Molecular Diversity and Specializations among the Cells of the Adult Mouse Brain // *Cell*. 2018. Т. 174. № 4. С. 1015- 1030.e16.
155. Savage J. C., Carrier M., Tremblay M. E. Morphology of Microglia Across Contexts of Health and Disease / подред. O. Garaschuk, Ver. New York: Humana Press Inc., 2019. 13–26 с.
156. Scheller J. и др. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6 // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2011. Т. 1813. № 5. С. 878–888.
157. Scheller J., Rose-John S. Interleukin-6 and its receptor: From bench to bedside // *Med. Microbiol. Immunol.* 2006. Т. 195. № 4. С. 173–183.
158. Schmidt O. I. и др. Closed head injury—an inflammatory disease? // *Brain Res. Rev.* 2005. Т. 48. № 2. С. 388–399.
159. Semple B. D. и др. Role of CCL2 (MCP-1) in traumatic brain injury (TBI): Evidence from severe TBI patients and CCL2^{-/-} mice // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2010. Т. 30. № 4. С. 769–782.
160. Sharma S. T., Nieman L. K. Cushing’s syndrome: All variants, detection, and treatment // *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2011. Т. 40. № 2. С. 379–391.
161. Sheng W. и др. Pro-inflammatory cytokines and lipopolysaccharide induce changes in cell morphology, and upregulation of ERK1/2, iNOS and sPLA₂-IIA expression in astrocytes and microglia. // *J. Neuroinflammation*. 2011. Т. 8. № 1. С. 121.
162. Shultz S. R. и др. Repeated mild lateral fluid percussion brain injury in the rat causes cumulative long-term behavioral impairments, neuroinflammation, and cortical loss in an animal model of repeated concussion // *J. Neurotrauma*. 2012. Т. 29. № 2. С. 281–294.
163. Sigwalt A. R. и др. Molecular aspects involved in swimming exercise training reducing anhedonia in a rat model of depression // *Neuroscience*. 2011. Т. 192. С. 661–674.
164. Silverman M. N., Sternberg E. M. Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional

correlates : from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction // 2012. Т. 1261. С. 55–63.

165. Simi A. и др. Interleukin-1 and inflammatory neurodegeneration // *Biochem. Soc. Trans.* 2007. Т. 35. № 5. С. 1122–1126.

166. Skupio U. и др. Behavioral and molecular alterations in mice resulting from chronic treatment with dexamethasone: Relevance to depression // *Neuroscience*. 2015. Т. 286. С. 141–150.

167. Smith-Swintosky V. L. и др. Metyrapone, an Inhibitor of Glucocorticoid Production, Reduces Brain Injury Induced by Focal and Global Ischemia and Seizures // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1996. Т. 16. С. 585–598.

168. Sorrells S. F. и др. Glucocorticoid signaling in myeloid cells worsens acute cns injury and inflammation // *J. Neurosci.* 2013. Т. 33. № 18. С. 7877–7889.

169. Sorrells S. F. и др. Glucocorticoids increase excitotoxic injury and inflammation in the hippocampus of adult male rats // *Neuroendocrinology*. 2014. Т. 100. С. 129–140.

170. Spencer R. L., Kalman B. A., Dhabhar F. S. Role of endogenous glucocorticoids in immune system function: regulation and counterregulation / подред. B. S. Mcewen, H. M. Goodman. : Oxford University Press, 2011. 381–423 с.

171. Stepanichev M. Y. и др. Chronic Mild Stress Increases the Expression of Genes Encoding Proinflammatory Cytokines in the Rat Brain // *Biol. Bull.* 2018. Т. 45. № 2. С. 186–191.

172. Su E. и др. α -synuclein levels are elevated in cerebrospinal fluid following traumatic brain injury in infants and children: The effect of therapeutic hypothermia // *Dev. Neurosci.* 2011. Т. 32. № 5–6. С. 385–395.

173. Sun Y. и др. Elevated serum levels of inflammation-related cytokines in mild traumatic brain injury are associated with cognitive performance // *Front. Neurol.* 2019. Т. 10. С. 1120.

174. Tajiri N. и др. Traumatic brain injury precipitates cognitive impairment and extracellular $\text{A}\beta$ aggregation in Alzheimer's disease transgenic mice // *PLoS One*. 2013. Т. 8. № 11. С. e78851.

175. Tasic B. и др. Shared and distinct transcriptomic cell types across neocortical areas // *Nature*. 2018. Т. 563. № 7729. С. 72–78.

176. Taylor A. N., Tio D. L., Sutton R. L. Restoration of neuroendocrine stress response by glucocorticoid receptor or GABA_A receptor antagonists after experimental traumatic brain injury // *J. Neurotrauma*. 2013. Т. 30. № 14. С. 1250–1256.

177. Thompson H. J. и др. Invited Review Lateral Fluid Percussion Brain Injury: A 15-Year Review and Evaluation. , 2005.
178. Tret'yakova L. V. и др. Dexamethasone Modulates Lipopolysaccharide-Induced Expression of Proinflammatory Cytokines in Rat Hippocampus // *Neurochem. J.* 2021. Т. 15. № 3. С. 302–307.
179. Tyagi E. и др. Influence of LPS-induced neuroinflammation on acetylcholinesterase activity in rat brain // *J. Neuroimmunol.* 2008. Т. 205. № 1–2. С. 51–56.
180. Vandewalle J. и др. Therapeutic Mechanisms of Glucocorticoids // *Trends Endocrinol. Metab.* 2018. Т. 29. № 1. С. 42–54.
181. Vink R. и др. Small shifts in craniotomy position in the lateral fluid percussion injury model are associated with differential lesion development // *J. Neurotrauma.* 2001. Т. 18. № 8. С. 839–847.
182. Vitarbo E. A. и др. Tumor necrosis factor α expression and protein levels after fluid percussion injury in rats: The effect of injury severity and brain temperature // *Neurosurgery.* 2004. Т. 55. № 2. С. 416–424.
183. Vizuite A. F. K. и др. Effects of dexamethasone on the Li-pilocarpine model of epilepsy: Protection against hippocampal inflammation and astrogliosis // *J. Neuroinflammation.* 2018. Т. 15. С. 68.
184. Wahl S. M., Wen J., Moutsopoulos N. TGF- β : a mobile purveyor of immune privilege // *Immunol. Rev.* 2006. Т. 213. С. 213–227.
185. Weber A., Wasiliew P., Kracht M. Interleukin-1 (IL-1) pathway // *Sci. Signal.* 2010. Т. 3. № 105. С. cm1.
186. Wilkinson J. M. и др. Compound profiling using a panel of steroid hormone receptor cell-based assays // *J. Biomol. Screen.* 2008. Т. 13. № 8. С. 755–765.
187. Willner P., Muscat R., Papp M. Chronic mild stress-induced anhedonia: A realistic animal model of depression // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1992. Т. 16. № 4. С. 525–534.
188. Witcher K. G. и др. Comparison between midline and lateral fluid percussion injury in mice reveals prolonged but divergent cortical neuroinflammation // *Brain Res.* 2020. Т. 1746. С. 146987.
189. Xu J. и др. MCP-1-induced protein-1, an immune regulator. // *Protein Cell.* 2012. Т. 3. № 12. С. 903–910.

190. Xu L. L. и др. Human recombinant monocyte chemotactic protein and other c-c chemokines bind and induce directional migration of dendritic Cells in vitro // *J. Leukoc. Biol.* 1996. Т. 60. № 3. С. 365–371.
191. Young A. E. Mineralocorticoid Receptor Function in Major Depression // 2003. Т. 60. С. 24–28.
192. Zeisel A. и др. Molecular Architecture of the Mouse Nervous System // *Cell*. 2018. Т. 174. № 4. С. 999- 1014.e22.
193. Zhang W. и др. Rhamnetin attenuates cognitive deficit and inhibits hippocampal inflammatory response and oxidative stress in rats with traumatic brain injury // *Cent. Eur. J. Immunol.* 2015. Т. 40. № 1. С. 35–41.
194. Zhao G. W. и др. The neuroprotective effect of modified «shengyu» decoction is mediated through an anti-inflammatory mechanism in the rat after traumatic brain injury // *J. Ethnopharmacol.* 2014. Т. 151. № 1. С. 694–703.
195. Zöller T. и др. Silencing of TGF β signalling in microglia results in impaired homeostasis // *Nat. Commun.* 2018. Т. 9. С. 4011.

10. 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.