

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Венедиктов Артем Андреевич

**Морфофункциональные особенности нейронов коры головного мозга мышей
в условиях хронического системного воспаления**

1.5.22. Клеточная биология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор,

член-корреспондент РАН

Кузнецов Сергей Львович

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Кора больших полушарий головного мозга у мышей.....	13
1.1.1. Морфофункциональные особенности нейронов в изокортексе.....	14
1.1.2. Морфофункциональные особенности нейроглии в изокортексе.....	18
1.1.3. Целевые области изокортекса для исследования.....	24
1.2. Липополисахарид как фактор повреждения нейронов.....	26
1.2.1. Общая характеристика липополисахарида.....	26
1.2.2. Механизм действия липополисахарида на клетки.....	27
1.2.3. Воздействие липополисахарида на нейроны и глию.....	29
1.2.4. Видовая и типовая принадлежность липополисахарида.....	31
1.2.5. Выбор доз липополисахарида в моделях повреждения нейронов.....	32
1.3. Морфофункциональные маркеры в изокортексе у мышей.....	36
1.3.1. Маркеры нейронов изокортекса.....	38
1.3.2. Маркеры астроцитов изокортекса.....	39
1.3.3. Маркеры клеток микроглии в изокортексе.....	41
1.3.4. Маркеры функциональных изменений в нейронах и глиии.....	42
1.4. Белки теплового шока как модификаторы повреждения нейронов.....	42
1.5. Выводы по обзору литературы.....	44
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	45
2.1. Сведения об использованном липополисахариде.....	45
2.1.1. Манипуляции с рабочим раствором.....	45
2.1.2. Введение раствора липополисахарида.....	46
2.2. Экспериментальные животные.....	46
2.2.1. Видовые и групповые характеристики животных.....	46
2.2.2. Количество животных в исследовании.....	47
2.2.3. Содержание животных.....	48
2.2.4. Распределение по группам и маркировка.....	50

2.2.5. Эвтаназия и забор органов.....	50
2.3. Проведение исследования.....	51
2.3.1. Пилотный эксперимент и расчет количества животных.....	51
2.3.2. План основного исследования.....	52
2.3.3. Стереотаксическое введение липополисахарида.....	54
2.3.4. Проведение физиологических тестов.....	55
2.3.5. Изготовление гистологических срезов.....	55
2.3.6. Окраска классическими гистологическими методами.....	56
2.3.7. Иммуногистохимическое исследование.....	58
2.3.8. Анализ гистологических препаратов.....	60
2.3.9. Статистический анализ.....	63
2.3.10. Выводы по методам исследования.....	64
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.....	65
3.1. Изменения нейронов при внутрибрюшинном введении липополисахарида.....	65
3.2. Активация нейроглии при внутрибрюшинном введении липополисахарида.....	70
3.3. Изменения при повышенной экспрессии белков теплового шока.....	76
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	92
4.1. Сокращение количества нейронов в поясной коре большого мозга.....	92
4.2. Активация нейроглии в поясной коре большого мозга.....	94
4.3. Изменения при повышенной экспрессии белков теплового шока.....	97
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	100
ВЫВОДЫ.....	101
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	102
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	103
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	104
БЛАГОДАРНОСТИ.....	129

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Нейроны в коре больших полушарий головного мозга подвергаются разнообразным морфофункциональным изменениям при проникновении через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) веществ бактериального происхождения [48]. Многие из этих изменений становятся более выраженными постепенно, не проявляясь в качестве заболеваний центральной нервной системы (ЦНС) на протяжении долгого времени. Такое воздействие повреждающих факторов может увеличить риск развития нейродегенеративных заболеваний и ускоренного старения нервной ткани [85].

В последние годы в литературе часто употребляется термин «нейровоспаление» [48, 85], подразумевающий низкоинтенсивную стимуляцию нейроглии различными веществами (в основном бактериальной природы), опосредованно приводящую к повреждению нейронов без воспаления в классическом понимании. Так, при нейровоспалении не наблюдается лейкоцитарной инфильтрации и расширения кровеносных сосудов.

При этом термин «хроническое системное воспаление» сам по себе также не означает воспаления в классическом понимании [48]. Под ним подразумевается низкоинтенсивное (как правило, повторяющееся) неинфекционное повреждение тканей, которое сопровождается активацией каких-либо клеточных или гуморальных иммунных факторов, но не имеет единых молекулярных маркеров, а синдром системной воспалительной реакции или сепсис не развиваются.

Изучение морфофункциональных особенностей нейронов при подобных повторяющихся низкоинтенсивных воздействиях представляется важным для углубления знаний о механизмах нейродегенерации и старения, а в дальнейшем для разработки мер профилактики и лечения нейродегенеративных заболеваний. При этом возможны различные варианты реактивных изменений в нейронах при хроническом системном воспалении.

Многие из них изучены на моделях конкретных заболеваний [147], в том числе в областях головного мозга за пределами коры больших полушарий. Вместе с тем для изучения нейродегенерации и старения нейронов необходимо иметь представление об общих закономерностях морфофункциональных изменений непосредственно в коре больших полушарий головного мозга при повреждающем воздействии за счет бактериальных агентов, которое не успевает привести к манифестации заболеваний.

Таким образом, анализ качественных и количественных морфофункциональных параметров нервных клеток в коре больших полушарий головного мозга при хроническом системном воспалении и развитии признаков нейродегенерации является актуальным для изучения, так как позволит сделать выводы о закономерностях повреждения нейронов, а также определить модели для изучения методов профилактики и лечения нейродегенеративных заболеваний.

Степень разработанности темы исследования

В последние годы отмечается активный рост нейроморфологических, молекулярно-биологических и физиологических исследований нервных клеток и ткани при нейродегенеративных изменениях. Многие из этих работ посвящены воздействию веществ бактериальной природы, повреждающему нейроны в головном мозге [158, 211]. Тем не менее исследователи в основном уделяют внимание либо острому повреждению высокой интенсивности, при котором возникает системная воспалительная реакция с нарушением целостности ГЭБ [145, 197] вплоть до лимфоцитарной и моноцитарной инфильтрации [159], либо, напротив, малоинтенсивным воздействиям с минимальными нейроморфологическими проявлениями [92, 167, 199].

Существуют исследования, в которых морфологические изменения в нейронах вызывали опосредованно по типу нейровоспаления при хроническом системном воспалении. В подобных работах авторы фокусируют свое внимание на узких аспектах, позволяющих считать полученные результаты моделью

конкретных нейродегенеративных заболеваний [28, 62]. Вместе с тем целесообразно изучить явления, развивающиеся на ранних стадиях процесса нейровоспаления в коре больших полушарий головного мозга.

Общепринятым в экспериментальных работах веществом бактериальной природы, способным проникать в нейроглию через эндотелиоциты ГЭБ, является липополисахарид клеточной стенки (ЛПС) [43, 45, 122]. В настоящем исследовании, как и в большинстве ранее выполненных работ, в качестве модельных животных для экспериментов с воздействием ЛПС выбраны мыши.

Таким образом, изменения в нейронах и глии коры больших полушарий головного мозга у мышей при введении ЛПС с развитием нейровоспаления изучены в основном на моделях нейродегенеративных заболеваний. При этом мало исследованы реактивные морфофункциональные особенности нейронов и глии у мышей при нейровоспалении после введения ЛПС без явных признаков развития патологических процессов. Решению этой научной задачи посвящена настоящая диссертационная работа.

Цель и задачи исследования

Цель исследования: изучить закономерности морфофункциональных изменений нейронов и нейроглии в коре больших полушарий головного мозга при хроническом системном воспалении и повреждении нервных клеток.

1. Изучить морфофункциональные изменения, развивающиеся в нейронах и нейроглии коры больших полушарий головного мозга у мышей при внутрибрюшинном введении бактериального липополисахарида как модели хронического системного воспаления методами классической, иммуноферментативной и иммунофлуоресцентной гистологической техники.

2. Определить морфологические особенности нейронов в изокортексе у мышей при внутрижелудочковом и интракортикальном введениях бактериального липополисахарида как моделях прямого повреждения нейронов.

3. Установить характер морфофункциональных изменений в нейронах изокортекса у мышей при одновременном введении бактериального липополисахарида и повышенной экспрессии белка теплового шока HSPA1A семейства HSP70 в качестве модели нейропротекции.

4. Выявить режимы введения липополисахарида, которые можно использовать при изучении морфофункциональных особенностей нервных клеток с развитием реактивных изменений без признаков воспаления в нервной ткани.

Научная новизна

В настоящей работе впервые подробно описаны и проанализированы морфологические изменения в поясной коре больших полушарий головного мозга у мышей возрастом 3 месяца при внутрибрюшинном введении ЛПС в дозах 0,5 мг/кг, 1 мг/кг и 2 мг/кг массы тела животных в сутки в течение 4 дней, а именно пикнотичность нейронов и снижение их количества, а также активация нейроглии и усиление секреции фактора некроза опухоли альфа без явных признаков развития патологических процессов в центральной нервной системе.

Впервые исследован характер изменений в моторной коре больших полушарий головного мозга у мышей при введении ЛПС в дозе 12 мкг/кг массы тела животного в боковые желудочки головного мозга и непосредственно в первичную моторную кору больших полушарий головного мозга, а именно снижение двигательной активности животных, пикнотичность и гиперхромность нейронов с перипеллюлярным отеком, активация нейроглии. При этом впервые верификация места стереотаксического введения ЛПС у мышей выполнена сочетанием лазерной спекл-контрастной визуализации (функционального метода) и окрашиванием части препарата трифенилтетразолия хлоридом (морфологического метода).

Впервые установлено, что у мышей повышенная экспрессия человеческого белка теплового шока HSPA1A семейства HSP70 в клетках и в межклеточном веществе сопровождается умеренно благоприятным эффектом при

интракортикальном введении ЛПС, а именно меньшим снижением двигательной активности животных без изменения количества нервных клеток.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость настоящего исследования заключается в уточнении морфологических закономерностей реактивного повреждения нейронов, не сопровождающемся явными патологическими процессами, после введений бактериального ЛПС, в том числе при нейропротекции за счет избыточной экспрессии молекулярных шаперонов HSP70.

Практическая значимость работы состоит в апробации моделей повреждения нервной ткани, пригодных для дальнейших научных исследований, направленных на поиск методов профилактики и лечения нейродегенеративных заболеваний. Режимы дозирования ЛПС для разных вариантов введения могут быть применены при формировании групп сравнения в доклинических исследованиях лекарственных препаратов. Сведения об использовании трансгенных моделей животных при введении ЛПС могут быть использованы в практике дальнейших исследований задачи изучения нейроморфологических изменений в условиях хронического системного воспаления и нейровоспаления.

В результате проведенного исследования решена актуальная научная задача: изучены закономерности морфофункциональных изменений нейронов и нейроглии в коре больших полушарий головного мозга при хроническом системном воспалении и повреждении нервных клеток.

Полученные в исследовании научные результаты в части морфофункциональных особенностей реактивных изменений в нейронах и нейроглии внедрены в практику преподавания дисциплины «Гистология, эмбриология, цитология» в рамках высшего медицинского образования по специальности 31.05.01 «Лечебное дело», а также в научные семинары для молодых исследователей и аспирантов в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский

государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) и федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования Ярославский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Методология и методы исследования

Методология настоящего исследования строилась на анализе качественных и количественных показателей морфофункциональных изменений в нейронах и микроглии при гистологических исследованиях с привлечением также физиологических тестов. Для этого были выбраны следующие методы.

Качественные изменения в целевых областях коры больших полушарий головного мозга определялись на препаратах после окраски срезов мозга гематоксилином и эозином, а также толуидиновым синим по методу Ниссля. Количественные морфофункциональные изменения оценивались при иммуногистохимическом исследовании по экспрессии маркеров NeuN (нейрональный ядерный белок, свойственный зрелым и сохраняющим жизнеспособность нейронам), GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок, содержание которого увеличивается у большинства активированных сигнальными веществами астроцитов), SOX9 (фактор транскрипции, свойственный астроцитам), Iba1 (1-й белок-адаптер, связывающий ионизированный кальций – маркер, в нервной ткани свойственный исключительно клеткам микроглии и резко возрастающий при их активации), ФНО- α (фактор некроза опухоли альфа, который в коре больших полушарий головного мозга образуется активированными астроцитами и клетками микроглии) и каспазы-3 (ключевой фермент-регулятор апоптоза, содержание которого нарастает при активации соответствующих процессов клеточной гибели). Подсчет количественных характеристик производился на изображениях, полученных в программе Zen 3.10 при помощи камеры Axioscam 305 color на световом и флуоресцентном режимах микроскопа

Axiomager.A1 (Carl Zeiss, Германия). Для оценки воздействия на моторную кору больших полушарий головного мозга выполнялись также физиологические тесты «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт».

Статистическая обработка включала в себя оценку характера распределения, в зависимости от которого проводилось определение средних значений оцениваемых величин и их ошибки, медианы, межквартильного размаха (25 и 75 %) с учетом величины p , расцениваемой как статистически значимая при $p < 0,05$.

Личный вклад автора

Идея и концепция настоящего исследования принадлежат А.А. Венедиктову. Автором спланированы и проведены все эксперименты, включая забор и окраску материала, выполнена статистическая обработка и последующий анализ полученных данных. Диссертантом написаны все опубликованные статьи, тезисы и сообщения на конференциях, рукописи диссертации и автореферата.

Положения, выносимые на защиту

1. Реактивные изменения в нейронах и нейроглии, а именно пикнотичность нейронов, снижение количества NeuN-положительных клеток, увеличение количества GFAP- и Iba1-положительных клеток, а также усиление секреции фактора некроза опухоли альфа, демонстрируемые методами классической, иммуноферментативной и иммунофлуоресцентной гистологической техники, являются характерными закономерностями морфофункциональных изменений в коре больших полушарий головного мозга для хронического системного воспаления с внутрибрюшинным введением липополисахарида.

2. Внутрижелудочковое введение мышам эшерихиозного липополисахарида в дозе 12 мкг/кг массы тела животного приводит к более выраженному снижению количества нейронов, окрашенных по методу Ниссля, чем интракортикальное введение.

3. При стереотаксическом введении мышам эшерихиозного липополисахарида однократно интракорткально в дозе 12 мкг/кг массы тела животного развивается повреждение нейронов моторной коры больших полушарий головного мозга, а именно перичеллюлярный отек, гиперхромные и пикнотические изменения в нейронах, снижение числа нейронов, нарушения моторной активности животных в тестах «приподнятый крестообразный лабиринт и открытое поле», при этом в сочетании с повышенной экспрессией белка HSPA1A семейства HSP70 выраженность этих проявлений уменьшается.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Область исследования относится к следующим пунктам паспорта научной специальности 1.5.22. Клеточная биология: 1 («Изучение строения клеток и тканей и общих закономерностей генеза, ультраструктурной организации и функции клеток эукариот, в том числе в составе тканей и органов»), 5 («Исследование адаптации тканевых элементов к действию различных биологических, физических, химических и других факторов»), 14 («Исследование адаптации клеток и тканей к действию различных факторов внешней среды»).

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов обеспечена стандартизацией условий содержания лабораторных животных, их достаточным количеством, подтвержденным расчетами, и рандомизацией по группам, методикой исследования, адекватной поставленной исследовательской задаче, и корректными методами статистической обработки данных. Апробация полученных в ходе исследования научных результатов была произведена в форме научного доклада на заседании научно-практической конференции кафедры анатомии и гистологии человека ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский

Университет), протокол заседания от 30.04.2025 № 13, а также путем участия в форме докладов и выступлений на 7 научных конференциях, форумах, семинарах.

Публикации по теме диссертации

Материалы диссертации опубликованы в 9 печатных работах, включая 2 научные статьи в журналах, входящих в Перечень ВАК при Минобрнауки России (Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук); 1 научная статья в журнале, индексируемом в международной базе данных Scopus; 3 научных публикации в иных журналах; 3 научных публикации – материалы конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация написана в виде рукописи на 129 страницах, состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы. Работа проиллюстрирована 23 рисунками и 16 таблицами. Библиографический список включает 217 источников, включая 195 источников на иностранных языках.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Кора больших полушарий головного мозга у мышей

У мышей структура нервной ткани в коре больших полушарий головного мозга (у грызунов данная структура носит название «изокортекс») сходна с цито- и миелоархитектоникой человеческой коры. Так, в ней выделяют шесть слоев (пластинок). В изокортексе содержатся тела нейронов и глиальных клеток, отростки клеток (нейропилы) и основной аморфный компонент (так называемые перинейрональные сети). Эти перинейрональные сети преимущественно характерны для сенсорных отделов коры, особенно для IV пластинки (слоя), и окружают в основном тормозные, нешипиковые нейроны [24].

Тем не менее мышинному изокортексу свойственны определенные особенности, касающиеся состава и локализации компонентов межклеточного вещества, а также других морфофункциональных характеристик. Так, разнообразие клеток в коре больших полушарий головного мозга у мышей очень высоко. В изокортексе насчитывается не менее 98 типов клеток по наборам транскрибируемой мРНК, что показано на примере соматосенсорной коры, самой крупной по размеру у грызунов [139]. Наборы транскриптов мРНК в клетках из разных областей изокортекса отличаются незначительно, причем практически все различия обусловлены соотношением между субпопуляциями нейронов, а не субпопуляциями глии [182].

Морфологически разнообразие клеток в изокортексе у мышей менее выражено и представлено всеми клеточными популяциями нервной ткани, кроме эпендимоцитов, а также эндотелиоцитами, гладкими мышечными клетками и перицитами, входящими в состав кровеносных сосудов головного мозга [139]. Представляется важным охарактеризовать основные типы нейронов и клеток нейроглии (астроглии, микроглии и олигодендроглии), их морфофункциональные особенности и ключевые параметры этих клеточных популяций, наиболее подходящие для настоящего исследования.

1.1.1. Морфофункциональные особенности нейронов в изокортексе

По совокупности морфологических, функциональных и эмбриональных характеристик нейроны в изокортексе у мышей можно разделить на две группы. Предшественники клеток 1-й группы на ранних этапах эмбриогенеза мигрируют в формирующуюся кору в дорсальной части конечного мозга [60]. Из них развиваются звездчатые нейроны (являются глутаматергическими) и пирамидные нейроны (самые многочисленные в коре больших полушарий головного мозга; для них нейромедиаторами в синапсах аксонов могут быть аспартат, глутамат, энкефалин и ацетилхолин) [2]. Клетки 2-й группы, нешипиковые нейроны (являются ГАМКергическими), могут развиваться как из ганглионарного бугорка в вентральной части конечного мозга [153], так и из его дорсальной части [99].

От прочих нейронов звездчатые шипиковые и пирамидные клетки значительно отличаются не только микроскопическими характеристиками и нейромедиаторами в синапсах аксонов, но и наличием крупных шипиков, что нашло отражение в названии «шипиковые» [112]. Популяции как звездчатых, так и пирамидных нейронов достаточно однородны по иммуноморфологическим свойствам, поэтому классификации двух этих групп клеток у взрослых животных основаны на физиологических показателях [105, 123].

Пирамидные нейроны

В раннем онтогенезе пирамидные нейроны хорошо различимы по иммуноморфологическим характеристикам. Так, экспрессия многих факторов транскрипции определяема при иммуногистохимическом исследовании и позволяет отличить интракортикальные пирамидные нейроны II-IV пластинок (слоев), аксоны которых могут образовывать комиссуральные и ассоциативные пути, но не покидают коры, и нейроны, образующие проекционные пути [18, 74]. Некоторые из иммуногистохимических маркеров транскрипции и дифференцировки можно при определенных условиях выявить в пирамидных клетках в позднем онтогенезе [114].

Морфометрические различия между пирамидными нейронами определяются на протяжении всего постнатального онтогенеза: во II и VI пластинках (слоях) большинство пирамидных клеток малого размера, в III – среднего, а V пластинка характеризуется крупными и гигантскими пирамидными нейронами (клетками Беца и клетками Мейнерта). Кроме того, общим, но регистрируемым преимущественно *in vivo*, морфологическим свойством всех пирамидных клеток в коре является наличие шипиков на аксонах [131]. Следует отметить, что не все современные источники различают шипики на дендритах и аксонах [78]. Еще одним свойством пирамидных клеток является наличие в области аксонального холмика сегмента с высокой плотностью натриевых и калиевых каналов и без миелиновой оболочки [121].

Применим также функциональный принцип классификации пирамидных нейронов, при котором различия между ними в коре у человека и мыши максимальны из-за вариации когнитивных функций. По этой классификации у человека выделяют семь функциональных слоев пирамидных нейронов, а у грызунов – только три, причем эти слои располагаются последовательно от V и VI пластинок (слоев) ко II пластинке (слою). Тем не менее взаимосвязь этих слоев с морфометрическими характеристиками относительна [124]. Теснее функциональная классификация пирамидных нейронов связана с генетической и молекулярной классификацией, насчитывающей на момент написания настоящей работы 12 типов [79]. В разных областях изокортекса состав глутаматергических рецепторов на морфологически однотипных пирамидных нейронах различен [136].

Звездчатые шипиковые нейроны

Этим клетками свойственна сложная архитектура отростков и шипиков, приобретаемая в ходе жизни [139]. Субпопуляции звездчатых нейронов различают в основном по расположению в разных пластинках изокортекса (таблица 1). Кроме того, плотность звездчатых клеток связана с анатомическим строением коры больших полушарий головного мозга, возрастая в сенсорных отделах (гранулярная кора) и уменьшаясь в моторных (агранулярная кора).

Прочие нейроны

По сравнению со звездчатыми и пирамидными клетками, прочие (тормозные) нейроны более разнообразны по своим морфологическим характеристикам (таблица 1) [2, 8, 41, 52, 53, 60, 66, 111, 116, 123, 156, 180, 202]. Эти различия согласуются с функциональными параметрами клеток и содержанием транскриптов мРНК [177]. Для классификации тормозных нейронов на основе морфологических характеристик и электрофизиологических показателей зачастую используется терминология группы Петилья [161], названной в честь родного города основоположника нейроморфологии С. Рамона-и-Кахаля, и построенный с ее учетом классификатор с машинным обучением Neuroclassifier [148]. Эта терминология встречается и в отечественной литературе [8]. Другая, молекулярная, классификация нейронов по данным секвенирования РНК в отдельных клетках выделяет шестнадцать основных субпопуляций, но морфологически не все они хорошо различимы [42].

Таблица 1 – Морфологические свойства нейронов в изокортексе у мышей

Субпопуляция	Положение перикариона в слоях коры	Морфологические особенности
1. Звездчатые шипиковые нейроны	II, IV	Мультиполярные клетки с полигональным или округлым перикарионом, сильно ветвящимися дендритами и длинным аксоном, не покидающим коры
2. Пирамидные нейроны	II, III, V, VI, единичные в IV	Мультиполярные клетки с треугольным перикарионом, длинными дендритами и длинным аксоном, во многих случаях покидающим кору или свой модуль
3. Прочие нейроны, в том числе:	I-VI	Мультиполярные или биполярные клетки с коротким аксоном
1) клетки-канделябры (также: аксоаксональные, канделябровидные)	II, III, V, VI	Мультиполярные клетки с аксоном, многократно ветвящимся рядом со своим перикарионом («бутоны» или «картриджи») вокруг аксонов пирамидных клеток; PV ⁺
2) трансламинарные нейроны	V, VI	Мелкие и немногочисленные клетки, аксон распространяется радиально до II-VI пластинок; PV ⁺
3) корзинчатые нейроны	II-VI (PV ⁺); II-VI (VIP ⁺ , CCK ⁺); II-VI (5-HT _{3A} ⁺ , CCK ⁺ , VIP ⁻)	Небольшие клетки с короткими дендритами и аксоном, густо ветвящимся вокруг перикариона и дендритов других клеток (звездчатых и пирамидных нейронов)

Продолжение Таблицы 1

4) клетки с двойным букетом дендритов или гроздевидные двухпучковые клетки	II-IV	Вытянутый перикарион, аксон распространяется радиально, образуя синапсы на других тормозных нейронах; 5-HT _{3A} ⁺ , VIP ⁺
5) клетки с аксональной кисточкой или нейроглиоморфные клетки	I; V (дискутируется)	Мелкие клетки, похожие на протоплазматический астроцит, с сильным ветвлением дендритов и аксона; 5-HT _{3A} ⁺ , RELN ⁺ , при медленном проведении сигнала в шипиках также NPY ⁺
6) мультиполярные клетки I пластинки (слоя)	I	Похожи на клетки с аксональной кисточкой, но у отростков меньше ветвлений, хорошо различимых при световой микроскопии; 5-HT _{3A} ⁺ , NPY ⁺
7) клетки с одним букетом дендритов	I	Похожи на клетки с аксональной кисточкой, но аксон спускается в другие пластинки или переходит в другие колонки и модули коры, образуя синапсы на других тормозных нейронах; 5-HT _{3A} ⁺ , RELN ⁺
8) горизонтальные клетки Кахалья-Ретциуса	I	Мелкие перикарионы, тангенциальное распространение и слабое ветвление отростков, существуют только при незавершенном нейрогенезе; RELN ⁺
9) интерстициальные клетки	Субкортикальная зона белого вещества	Немногочисленны, небольшие по размеру; Meis2 ⁺
10) овоидные клетки Мартинолли	II, III, V, VI	Вытянутый овальный перикарион, незначительное ветвление дендритов с синапсами от других тормозных клеток, аксон доходит до I пластинки, образуя синапсы с дендритами пирамидных клеток; не встраиваются в последовательные цепи нейронов, а передают торможение на все соседние пирамидные нейроны; SST ⁺
11) овоидные клетки, отличные от клеток Мартинолли	II, III, IV, V, VI	Перикарион и дендриты аналогичны клеткам Мартинолли, но аксон образует синапсы с дендритами пирамидных клеток, не доходя до I пластинки; SST ⁺
12) веретеновидные клетки	VI	Вытянутый перикарион, незначительное ветвление дендритов, аксон распространяется тангенциально в соседние модули, обособляются раньше всех в онтогенезе, не считая клеток Кахалья-Ретциуса; SST ⁺ , NPY ⁺ , NOS ⁺
Примечание: сокращения иммуногистохимических маркеров, используемые в таблице 1: 5-HT _{3A} – субъединица 3A 5-гидрокситриптамина рецептора к серотонину; СКК – холецистокинин; Meis2 – фактор транскрипции, 2-ой гомолог 1-ого участка миелоидной экотропической вирусной интеграции; NOS – синтаза оксида азота (II); NPY – нейропептид Y; PV – парвальбумин; RELN – рилин; SST – соматостатин; VIP – вазоинтестинальный пептид		

Разнообразие нейронов в изокортексе у мышей очень велико. При этом им всем присущи общие морфологические характеристики, например состояние ядер, хроматофильной субстанции, сохранность аксонов и нейропиля. Эти характеристики доступны оценке как классическими гистологическими методами, хорошо изученными и до сих пор применяющимися в нейроморфологии, так и иммуноморфологическими методами [23, 165, 201].

Таким образом, для изучения изменений, развивающихся в коре больших полушарий головного мозга при повреждающих воздействиях, важным и адекватным способом является определение морфологических и функциональных характеристик нейронов. Помимо изучения морфофункциональных параметров нейронов, важным в оценке состояния нервной системы и, в частности, в коре больших полушарий головного мозга представляется исследование характеристик нейроглии, поскольку эти диффероны нервной ткани взаимозависимы.

1.1.2. Морфофункциональные особенности нейроглии в изокортексе

Принципы взаимодействия нервных и глиальных клеток, а также соотношение их количества слабо подвержены эволюционным изменениям и едины для различных отделов головного мозга у млекопитающих [89]. Тем не менее каждому виду присущи определенные морфофункциональные особенности строения нейроглии, во многом представляющие собой следствие различий между цитоархитектоническими характеристиками нейронов.

Нервные клетки в коре больших полушарий головного мозга в эмбриональном и раннем постнатальном периодах пространственно ориентируются в заданных глией направлениях, что необходимо в том числе для образования полноценно функционирующих синапсов. У мышей при этом процессе астроциты изокортекса приобретают морфологические характеристики зрелых клеток к 21-му дню жизни, поэтому синапсы между кортикальными нейронами начинают полноценно функционировать не ранее этого времени. У взрослых мышей более половины синапсов (как правило, глутаматергических) в

изокортексе остаются в плотном окружении астроцитов, контактирующих с нейронами при помощи белков нейролигинов [70].

Кортикальные астроциты не только поддерживают сами синапсы, но и участвуют в несинаптической передаче сигналов (контакты по типу «Sonic Hedgehog»). Этот процесс регулируется фактором транскрипции Gli1 и особенно выражен для IV-V пластинок (слоев) [181].

Кортикальные астроциты взаимодействуют не только с нейронами. Поскольку астроциты являются компонентом гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) наряду с эндотелием капилляров и их базальной мембраной, при эмбриональной и продолжающейся ранней постнатальной васкуляризации изокортекса количество астроцитов возрастает [137]. При этом у мышей с 9-х суток эмбриогенеза нейробласты, и в последующем в онтогенезе – нейроны секретируют ряд молекулярных факторов, способствующих формированию ГЭБ и поддерживающих его регенерацию при нарушении. Морфологически это проявляется образованием плотных соединений между эндотелиоцитами с белками клаудином и окклюдинам, синтезом специфичных компонентов базальной мембраны в эндотелиоцитах и перицитах, а также прикреплением отростков астроцитов к базальной мембране эндотелия [106].

Астроциты, на которые воздействуют поступившие через ГЭБ или от других клеток нервной ткани молекулярные сигналы о повреждении, переходят в реактивное состояние с изменением своих секреторных фенотипов и функциональных свойств, но практически без изменения морфометрических характеристик. Реактивные астроциты (A1-астроциты) увеличивают объем цитоскелета, слабее связываются с окоლოსинаптическими участками мембран нейронов и секретируют широкий спектр биологически активных веществ, включая провоспалительные цитокины [69]. В изокортексе у мышей получившие сигнал о повреждении A1-астроциты быстро трансформируются в A2-астроциты, секретирующие противовоспалительные цитокины и нейротрофические факторы.

Для иммуногистохимического типирования этих субпопуляций (A1- и A2-астроциты) применимы такие маркеры, как фактор комплемента C3 и белок

S100A10, связывающий кальций [91]. Тем не менее граница между подтипами A1 и A2 относительна, поскольку один и тот же астроцит может при некоторых условиях проявлять признаки обоих подтипов [69]. В связи с этим можно предполагать, что подсчет соотношения между A1- и A2-астроцитами в нейроморфологических исследованиях не следует применять как средство типирования субпопуляций астроглии.

Астроциты изокортекса у мышей протоплазматические, они обладают короткими и широкими отростками. Генетически они не представляют единой популяции. Часть астроцитов развивается из клеток с экспрессией гена *Emx1*, которые также являются предшественниками нейробластов в дорсальной части конечного мозга. Остальные астроциты образуются из клеток с экспрессией гена *Olig2*, свойственной исключительно для нейроглии [51].

Морфометрических различий при обычной световой микроскопии между группами с происхождением из *Emx1*⁺-клеток и *Olig2*⁺-клеток практически нет, но существуют иммуноморфологические. Так, большинство астроцитов, развивающихся из *Emx1*-экспрессирующих предшественников, образуют глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) при активации внутриклеточных сигнальных путей, причем как в астроцитах типа A1, так и в астроцитах типа A2. Кроме того, *Emx1*⁺- и *Olig2*⁺-клетки синтезируют разные наборы мРНК [63].

Морфологические различия между астроцитами связаны не только с их происхождением, но и с локализацией в головном мозге. Так, для всех областей изокортекса специфична экспрессия генов *Chrd11*, *Eps8*, *Hlf* и *Nr1d1* (вне головного мозга они неспецифичны и могут активно экспрессироваться многими дифферонами эпителиальных тканей и тканей внутренней среды организма). При конфокальной микроскопии астроциты с экспрессией этих генов имеют характерную трехмерную структуру: астроцит с отростками занимает большой объем, а сами отростки распространяются в разные стороны равномерно и относительно симметрично [137].

Второй по распространенности популяцией нейроглии в изокортексе у мышей являются клетки микроглии. Эти клетки, незначительно отличающиеся от

макрофагов по своим характеристикам, имеют иное, хотя и гематопозитическое происхождение. Так, их предшественники мигрируют в формирующийся зачаток головного мозга на этапе кроветворения в желточном мешке, и после этого не пополняются за счет популяции моноцитов, поскольку отделены от системного кровотока за счет ГЭБ [71].

Микроглию принято подразделять на амебодную, покоящуюся и реактивную. При этом долгое время в литературе реактивную микроглию, в зависимости от функционального состояния, определяли как провоспалительную (M1) или регенераторную (M2). В настоящее время это противопоставление представляется сомнительным, поскольку одни и те же микроглиоциты на близких временных отрезках проявляют свойства как M1-, так и M2-клеток [132].

В изокортексе у мышей клетки микроглии осуществляют не только фагоцитоз поврежденных структур, но и контактное взаимодействие с нейронами. К таким видам взаимодействий относится множество процессов, самыми распространенными из которых являются следующие [54, 132]:

- 1) глутамат-зависимая активация микроглиоцитов и рост их отростков при контакте с синапсами, что опосредовано белком Iba1;
- 2) реполяризация плазмалеммы нейрона в случае его избыточной электрической активности после удаления клетками микроглии продуктов жизнедеятельности, скопившихся около аксона;
- 3) запуск ремиелинизации при обратимом повреждении аксона в области его начального сегмента и в местах перехватов Ранвье за счет стимуляции перемещения предшественников олигодендроглиоцитов в очаг повреждения.

Некоторые особенности прямого взаимодействия между нервными клетками и клетками микроглии у мышей свойственны исключительно для изокортекса. Так, плазмалемма у пирамидных и звездчатых нейронов контактирует с плазмалеммой микроглиоцитов реже, чем у других типов нейронов, причем обычно это происходит в области синапса, и относительно редко – рядом с шипиками. Тем не менее при изначальном формировании или ремоделировании шипиков, особенно

на дендритах пирамидных нейронов во II и III пластинках (слоях), отростки клеток микроглии тесно подходят к плазмалемме нервных клеток [54].

Существуют экспериментальные данные, позволяющие предположить специфичность взаимодействия отдельных микроглиоцитов с субпопуляциями кортикальных нейронов, что значительно отличается от представления о клетках микроглии как аналогах резидентных макрофагов для ЦНС [163]. Так, по наборам транскриптов мРНК и секреторной активности выделено шесть типов кортикальных микроглиоцитов, контактирующих с нейронами определенных субпопуляций. При этом во II и III пластинках (слоях) изокортекса представлены все эти типы клеток микроглии.

Несмотря на непосредственное взаимодействие с нейронами, клетки микроглии не входят в состав ГЭБ и не участвуют в фильтрации поступающих в кору из кровотока веществ. Для описания взаимодействия их со структурами ГЭБ в последнее время широко используется термин нейрососудистая единица (НСЕ), включающая ГЭБ около конкретного нейрона, нейрон, перициты и микроглиоциты, а иногда и гладкие миоциты в стенках артериол [106]. НСЕ – прикладной термин, применимый в диагностике заболеваний [1], он не очень удачен в нейроморфологических исследованиях.

НСЕ и ГЭБ – структуры, обеспечивающие снабжение нейронов кислородом и питательными веществами. Выведение продуктов жизнедеятельности нейронов и нейроглии осуществляется через периваскулярные пространства между клетками, или лимфатическую систему. В ней ликвор, попадающий из субарахноидального пространства, поступает напрямую к плазмалемме кортикальных нейронов и нейроглии, омывая их и становясь жидким компонентом аморфного вещества, причем продвижение ликвора между нейронами осуществляется за счет пульсации близлежащих артериальных сосудов.

Периваскулярные пространства, заполненные ликвором, деформируются при реакции нейроглии на сигналы о повреждении, поскольку активация микроглиоцитов и астроцитов сопровождается изменением цитоскелета и, следовательно, деформацией клеток [86]. Это может нарушать дренаж ликвора из

межклеточного вещества. Диапазон деформации периваскулярных пространств ограничен тем, что в них располагается небольшое количество клеток, поддерживающих их объем, т. е. выполняющих стромальную функцию. По своим морфологическим и молекулярным свойствам эти клетки аналогичны представителям фибробластно-фиброцитарного дифферона [136].

Однако при фиксации биологического материала и проводке его через спирты восходящей концентрации периваскулярные пространства уменьшаются. Кроме того, при смерти животного перераспределение жидкости в головном мозге обычно происходит чрезвычайно быстро [97, 130]. Следовательно, размер периваскулярных пространств при гистологическом исследовании будет искажен.

Поскольку изокортекс, обладающий высокой электрической активностью, оказывается в постоянной водной среде из-за наличия глимфатической системы, электроизоляция при помощи олигодендроглии необходима для функционирования нейронов. Олигодендроглиоциты в изокортексе у мышей представляют собой самую малочисленную популяцию клеток нервной ткани. В основном они образуют миелиновые оболочки отростков нервных клеток. Несмотря на разнообразие олигодендроглиоцитов в изокортексе у мышей при секвенировании РНК в отдельных клетках, все они развиваются из одних предшественников, а отличия по транскриптам РНК проявляются исключительно под влиянием соседних нейронов [151].

Ввиду высокой плотности нейронов в изокортексе каждый олигодендроглиоцит образует несколько мезаксонов. Поскольку наиболее крупные отростки – это аксоны пирамидных клеток, тела олигодендроглиоцитов в изокортексе у мышей в наибольшей степени представлены в VI пластинке (слое) и в субкортикальном слое непосредственно под ней [163]. Следовательно, изучение морфофункциональных характеристик олигодендроглиоцитов имеет ограниченную информативность в контексте настоящего исследования.

Нейроглия в изокортексе мышей представляет собой морфологически и функционально единый с нейронами комплекс. Как показано выше, активация астроглии и микроглии сопровождает практически любое воздействие на нервные

клетки. Таким образом, для изучения воздействия, оказываемого повреждающими факторами на кору больших полушарий головного мозга, представляется важным и методологически верным оценить количественные морфологические характеристики активации астроцитов и микроглиоцитов.

1.1.3. Целевые области изокортекса для исследования

Кора больших полушарий головного мозга у млекопитающих, включая мышей, неоднородна. Анатомические, гистологические и физиологические различия между областями изокортекса обусловлены необходимостью обрабатывать информацию на разных уровнях, например анализировать воспринимаемые сигналы, координировать двигательные акты и осуществлять нервно-психическую деятельность. Области, отличающиеся анатомически, имеют разные молекулярные идентификаторы. Так, в обзоре Cadwell с коллегами объединены сведения о 48 молекулярных маркерах, специфичных для конкретных областей изокортекса у мышей [59]. Сложность морфологии, физиологии и биохимии коры обуславливает разные подходы к классификации ее областей.

В настоящее время широко применяются три ключевые классификации областей изокортекса у мышей по Paxinos, по Allen и по Swanson, взаимно дополняющие друг друга и изложенные в виде стереотаксических атласов [186, 193, 194, 208]. В дальнейшем по ходу текста используется терминология по классификации Paxinos, при необходимости дополненная терминами по классификации Allen.

Ввиду разнообразия областей в изокортексе следует сфокусировать внимание на его участке, ключевом с точки зрения практической значимости исследования для дальнейшего изучения нейродегенеративных заболеваний и старения головного мозга. Такой участок должен отвечать за выстраивание сложных психических реакций. Одной из наиболее подходящих под этот критерий областей изокортекса является передняя поясная (цингулярная) кора, связанная с выбором приоритетных задач и волевыми решениями [141]. Кроме того, передняя поясная кора отвечает за

управление сложными реакциями на внешние раздражители [129], что важно при развитии нейродегенеративных процессов [57, 170, 207].

Следует подчеркнуть, что хотя у мелких грызунов технически можно различить передние и средние участки поясной коры, морфофункциональные различия между ними отмечаются не по сагиттальной оси, как у человека, а по вертикальной оси, и «передней» при экстраполяции на человека будет более верхняя область поясной коры у мышей – Cg1 по классификации Paxinos [210]. Кроме того, в последнее время высказываются предложения выделить четыре области поясной коры у мышей в силу отдельных физиологических различий между ними, а именно: передние Cg1 и Cg2 и средние Cg1 и Cg2. Тем не менее эти изменения пока не нашли отражения в официальных номенклатурах [75].

Интересно, что прунинг нейронов в поясной коре и формирование зрелой архитектоники нервных клеток у человека продолжается вплоть до окончания пубертатного периода [191]. Соответственно, при моделировании хронического системного воспаления репрезентативно изучение морфологических характеристик в поясной коре у половозрелых животных.

При этом вышеописанные функции передней поясной коры не являются уникальными, поскольку их разделяют и многие подкорковые структуры, например гиппокамп. Кроме того, при хроническом системном воспалении невозможно оценить, в какой степени изменение поведенческих реакций мыши связано с повреждением в конкретной области коры.

Для комплексной оценки изменений в изокортексе у мышей в рамках настоящего исследования целесообразно изучить также функциональные характеристики, в регуляцию которых структуры головного мозга вне изокортекса вовлечены в меньшей степени, чем в случае с передней поясной корой. Такими характеристиками являются моторные акты, координируемые первичной и вторичной моторной корой (M1 и M2 по Paxinos) [193].

Однако искажение моторных тестов возможно при моделировании хронического системного воспаления за счет воздействия на спинной мозг. По этой причине целесообразность проведения таких тестов у животных с моделью

хронического системного воспаления сомнительна. Рационально непосредственно воздействовать на моторную кору, применяя режим введения, аналогичный использованному для моделирования хронического системного воспаления с точки зрения степени воздействия на кортикальные нейроны. Кроме того, необходимо оценить также морфологические изменения, которые произойдут при этом в первичной и вторичной моторной коре.

Таким образом, при моделировании хронического системного воспаления в первую очередь следует оценивать морфофункциональные характеристики нейронов и нейроглии в передней поясной (цингулярной) коре больших полушарий головного мозга, а именно в области Cg1, а при прямом повреждении коры больших полушарий головного мозга – функциональные параметры и морфологические характеристики нейронов в моторной коре больших полушарий головного мозга.

1.2. Липополисахарид как фактор повреждения нейронов

1.2.1. Общая характеристика липополисахарида

Для моделирования как хронического системного воспаления, так и прямого повреждения изокортекса могут быть использованы различные методы. Так, морфофункциональные изменения в нервной ткани могут быть вызваны при помощи бактериальных, химических, механических, физических воздействий. Особенно широкое распространение получили модели субклинических и клинических проявлений конкретных нозологий, сопровождающихся постепенным развитием у лабораторных животных нейродегенеративных процессов [46, 110, 212]. Однако применение перечисленных подходов не позволяет смоделировать нейровоспаление при хроническом системном воспалении, вследствие чего они не могут быть использованы для решения задач, поставленных в настоящей работе.

В живом организме нервная ткань подвержена воздействию химических веществ бактериального происхождения [31, 37]. Ключевым из бактериальных факторов, способных воздействовать на нейроны, является липополисахарид

клеточной стенки грамотрицательных бактерий (ЛПС) [10]. Это обуславливает выбор ЛПС как повреждающего агента, рассматриваемого в текущем разделе.

Для многоклеточных организмов взаимодействие клеток с ЛПС является эволюционно древним процессом, поэтому узнавание ЛПС многими клетками не требует специфического распознавания и иммунного ответа [174]. Такое распознавание активно осуществляется эндотелиоцитами и клетками нейроглии, когда ЛПС проникает через ГЭБ [113, 179]. Для подбора адекватных режимов введения и дозирования ЛПС представляется важным рассмотреть его общее строение, механизмы действия на клетки в целом и в нервной ткани.

1.2.2. Механизм действия липополисахарида на клетки

В клеточной стенке живых бактерий ЛПС фактически представляет собой несколько объединенных в одно вещество компонентов. С точки зрения взаимодействия с клетками млекопитающих наиболее важны два из них: липидный компонент, который распознается неспецифически, и соматический антиген, который необходим для развития иммунного ответа и воспалительной реакции [138]. В рамках настоящего исследования ключевой является функция липидного компонента (липид А), поскольку именно его распознают клетки нейроглии [84].

В естественных условиях ЛПС попадает в системный кровоток или в рыхлую волокнистую соединительную ткань в очаге инфекции двумя путями. В первом случае клеточная стенка бактерии разрушается постепенно или вообще не разрушается, а частично отшнуровывается при делении бактерии. Небольшие фрагменты внешней мембраны, отсоединившись от клетки, приобретают сферическую форму. Эти структуры называются блеббинг-везикулами [155].

Другой вариант связан с быстрой гибелью бактерий. При этом в кровоток попадает много отдельных молекул ЛПС, а липид А образует комплексы с белками, связывающими липополисахарид (ЛСБ) и имеющими печеночное происхождение. ЛСБ обладает сродством к молекулам 14-го кластера дифференцировки (CD14), в большом количестве локализованным на плазмалеммах клеток моноцитарно-

макрофагального звена, а также секретлируемым ими в кровеносном русле. В результате практически сразу после поступления ЛПС в кровоток образуются комплексы из липида А, ЛСБ и белков CD14, не связанных с клетками [173].

Если ЛПС попал в макроорганизм в виде блеббинг-везикул, то его липид А может образовать комплексы с циркулирующими негистоновыми белками высокомолекулярной группы (HMGB1). HMGB1 с липидом А способен к самостоятельной неспецифической адгезии и проникновению в плазмалемму эукариотических клеток [213, 215]. Внутри цитоплазмы липид А, попавший в клетку с HMGB1, активирует такие ферменты, как каспаза-11 и гасдермин D, а также способствует повышению экспрессии пуринового рецептора P2X7. Все три механизма приводят к клеточной гибели путем апоптоза или пироптоза [102].

Если ЛПС соединился с ЛСБ и CD14, то его может распознавать комплекс из двух молекул на поверхности некоторых клеток (применительно к нервной ткани – астроцитов или микроглиоцитов): толл-подобного рецептора 4 (TLR4) и миелоидного фактора дифференцировки 2 (MD2) [126, 166, 178]. Изменяя свою конформацию при соединении с липидом А, комплекс TLR4 и MD2 активирует сразу несколько сигнальных путей посредством цитозольного белка, 88-го фактора первичного ответа миелоидной дифференцировки (MyD88), расположенного в непосредственной близости от плазмалеммы. В результате оказывается воздействие на механизмы регуляции транскрипции, клетка начинает вырабатывать избыточные количества индуцибельной синтазы оксида азота (II), фактора некроза опухолей α (ФНО- α), интерлейкинов (ИЛ-1 и ИЛ-6) и каспазы-3 [200].

При секреции ФНО- α и интерлейкинов может происходить неспецифическое повреждение соседних клеток, а при увеличении количеств каспазы-3 – апоптотические изменения в самой клетке, распознавшей ЛПС. Однако при длительном воздействии ЛПС на комплекс TLR4-MD2 они вместе могут перемещаться вглубь цитоплазмы, запуская дополнительные сигнальные пути. Отсроченными эффектами активации этих дополнительных путей является образование интерферонов α и β , а также рецепторов к ним. Кроме того, оба варианта проникновения липида А из ЛПС в клетку (в виде блеббинг-везикул в

комплексе с HMGB1 или вместе с ЛСБ, CD14, TLR4 и MD2) сопровождаются усилением ферментативной активности многих цитозольных и митохондриальных оксидаз. При длительном воздействии эта активность приводит к перекисному окислению липидов, повреждению генетического материала [119, 198].

В рамках настоящего исследования представляется важным охарактеризовать, какие из вышеописанных механизмов задействованы при влиянии ЛПС на нейроны и глию.

1.2.3. Воздействие липополисахарида на нейроны и глию

Кора больших полушарий головного мозга изолирована от остального организма при помощи ГЭБ. Вследствие этого ЛПС, попав в организм инъекционно или естественным путем, должен для воздействия на кортикальные нейроны преодолеть стенки капилляров ЦНС, которые имеют особую структуру базальных мембран эндотелия и плотных соединений между эндотелиоцитами. В этих условиях основные эффекты ЛПС опосредованы индуцибельной синтазой оксида азота (II) – NOS, активируемой им в эндотелиоцитах при адгезии к их поверхности. NOS инициирует каскад реакций, приводящий к повышению проницаемости эндотелия и его базальной мембраны, после чего ЛПС (как правило, в комплексе с ЛСБ и CD14) достигает астроглии [85, 100]. Часть ЛПС попадает в периваскулярные пространства, что незначительно замедляет его перемещение [160].

В дальнейшем ЛПС взаимодействует с астроцитами, активируя в них MyD88-зависимые сигнальные пути и побуждая переходить в состояние A1-астроцитов. При этом перестраивается цитоскелет и меняется набор белков на поверхности плазмалеммы [87, 135, 185, 216]. При продолжительном или повторяющемся воздействии ЛПС на A1-астроциты в них начинается синтез и секреция ФНО- α и интерлейкинов (например, ИЛ-1 β). Кроме того, астроциты неспособны поглотить весь ЛПС, и часть его взаимодействует с клетками микроглии [77].

Микроглиоциты также переходят в реактивное состояние, меняют набор плазмалеммальных белков и вырабатывают ФНО- α в ответ на каскад ферментативных реакций, инициированных ЛПС [65, 211, 214]. В реактивном состоянии микроглия хуже обеспечивает изоляцию аксонов и синапсов от химических повреждений [76]. ФНО- α и интерлейкины, образованные клетками глии, также повреждают мембраны нейронов напрямую [211].

Отдельная роль во взаимодействии с ЛПС отводится эпендимной глии. Эпендима не входит в состав коры больших полушарий, но также способна распознавать комплексы с ЛПС на своей плазмалемме, и это опосредованно влияет на нейроны и глию в коре. Эпендимоциты, взаимодействующие с ЛПС, снижают скорость фильтрации ликвора, что ухудшает качество лимфатического дренажа и провоцирует накопление в нейропиле потенциально патологических соединений, например, бета-амилоида [29].

При прохождении ЛПС через ГЭБ нейроны достаточно редко сами взаимодействуют с ЛПС, поскольку его практически полностью захватывает глия [35]. Именно поэтому непосредственное повреждение нейронов молекулами ЛПС можно смоделировать, если вводить его в системный кровоток многократно или в высокой дозе. Однако это приведет также к лейкоцитарной миграции, возможному развитию воспаления и появлению многочисленных дополнительных эффектов со стороны других органов и систем. Другой вариант заключается в прямом введении ЛПС в структуры коры больших полушарий головного мозга. При этом нейроны сами воспринимают ЛПС, а повреждающее действие опосредовано каскадами индуцибельной NOS и MyD88 [162].

Вместе с тем под воздействием собственной микробиоты кишечника и постоянной выработке ею ЛПС или при его введении в системный кровоток с моделированием хронического системного воспаления нейроны за счет вышеописанных процессов в нейроглии испытывают следующие воздействия:

- 1) повреждение секретируемыми глией белками;
- 2) отсроченное нарушение синаптической передачи;
- 3) избыточное накопление продуктов обмена в нейронах.

В ряду этих воздействий повреждение нейронов за счет цитокинов является эволюционно наиболее древним [50]. Нервные клетки имеют механизмы адаптации к такому повреждению и способны какое-то время его компенсировать, например за счет белков теплового шока [190]. Однако при длительном воздействии в нейронах постепенно активируются оксидазы в цитозоле и митохондриях, происходит перегрузка системы молекулярных шаперонов. Это увеличивает вероятность гибели клеток, а также значительно ограничивает выполнение ими своих функций, нарушает структуру ядра и хроматофильной субстанции [67].

Длительная секреция цитокинов в глии повреждает не только нейроны, но и эндотелиоциты. Также продолжительная циркуляция ЛПС в системном кровотоке приводит к увеличению темпов его взаимодействия с астроглией. Это особенно выражено при симпатической стимуляции гладких мышечных клеток в стенках крупных сосудов и может сопровождаться массивной лейкоцитарной инфильтрацией в структуры ЦНС [4].

Таким образом, прямое введение такого эндотоксина, как ЛПС, в кору больших полушарий головного мозга приводит к непосредственному повреждению кортикальных нейронов, а введение ЛПС в системный кровоток в зависимости от дозы, экспозиции и конкретного способа введения может либо не нарушать целостность ГЭБ, либо способствовать активации нейроглии и опосредованному повреждению нейронов, равно как и развитию (при определенных условиях) патологических процессов, в том числе – воспалительных [14]. Важны не только доза вводимого эндотоксина, но и его видовая и типовая принадлежность.

1.2.4. Видовая и типовая принадлежность липополисахарида

Существует большое разнообразие вариантов ЛПС, с помощью которых моделируется повреждение нейронов. Поскольку одной из наиболее распространенных бактерий, характерных для микробиоты человека и других млекопитающих, является кишечная палочка (*Escherichia coli*), в экспериментальных исследованиях обосновано применение эшерихиозного ЛПС.

Однако кишечная палочка крайне разнообразна по набору соматических (O), капсульных (K) и жгутиковых (H) антигенов (капсульные и жгутиковые антигены также часто обозначаются вместе как B) [108].

Для исследования морфофункциональных изменений в нейронах и нейроглии предпочтителен серовар *E. coli*, стойкий к внешнему воздействию, что позволит ему не разрушиться при прохождении ГЭБ. Для серовара O111:K58:H2, также известного как O111:B4, характерны большие размеры молекул и высокая степень устойчивости к биологическим и физическим воздействиям [49]. Кроме того, показаны различия в эффектах данного ЛПС по сравнению с другими эшерихиозными сероварами [61]. В естественных условиях вариант кишечной палочки O111:B4 является распространенным инфекционным агентом, попадающим в организм фекально-оральным путем, а соответствующий эшерихиозный ЛПС – его ключевым фактором патогенности [154]. Кроме того, ЛПС серовара O111:B4 активирует микроглиоциты и макрофаги [142]. Следовательно, применение эшерихиозного ЛПС O111:B4 адекватно для повреждения нейронов и нейроглии. При естественном пути поступления ЛПС он не подвергается ферментативной обработке в ЖКТ (поэтому неприемлемы варианты перорального приема), но не минует порталного кровотока (поэтому неприемлемо внутривенное или внутриартериальное введение).

С учетом выбора серовара представляется важным рассмотреть конкретные режимы введения ЛПС с развитием нейровоспаления и выбрать те из них, которые наиболее применимы в рамках исследования.

1.2.5. Выбор доз липополисахарида в моделях повреждения нейронов

Липополисахарид является одним из основных повреждающих факторов, способных приводить к развитию хронического системного воспаления, т. е. низкоинтенсивного, «стерильного» повреждения тканей с участием иммунных клеток и гуморальных факторов, но без развития воспаления в классическом понимании, без сепсиса и без синдрома системной воспалительной реакции [48, 83,

85]. Для воздействия на нейроны в изокортексе и других структурах головного мозга в условиях хронического системного воспаления у грызунов разработано большое количество моделей и режимов введения ЛПС. К сожалению, лишь малая часть этих методик соответствует основной тематике работы, т. е. моделированию нейровоспаления при повторяющихся, низкодозовых введениях ЛПС без воспалительной инфильтрации и иных патологических феноменов в нервной ткани.

Так, однократное введение ЛПС крысам в дозах до 0,5 мг/кг массы тела не приводит к появлению признаков нейровоспаления [104]. У мышей дозы, достаточные для провокации морфологических изменений, обычно гораздо меньше. Однако при внутрибрюшинном режиме дозирования ЛПС в дозе 1 мг/кг массы тела у мышей требуется несколько суток введения, чтобы наблюдать признаки повреждения нервной ткани [64].

В то же время однократная внутрибрюшинная инъекция ЛПС в дозе 5 мг/кг массы тела у мышей приводит к морфологическим изменениям в нервной ткани уже через сутки [150], а спустя несколько месяцев у животных на этом режиме дозирования наблюдаются выраженные нейродегенеративные процессы [186]. Доза ЛПС в 10 мг/кг массы тела оказывается для мышей септической и даже смертельной, приводя не только к опосредованному, метаболическому повреждению нейронов, но и к иммунному ответу с развитием воспаления [58, 95].

Из примеров, приведенных в данном обзоре источников, очевидно, что режимы с однократным введением ЛПС в системный кровоток в любой дозе не подходят для целей настоящего исследования, и следует рассмотреть модели повреждения нейронов при введении ЛПС в течение нескольких дней. Например, при двухдневном режиме введения ЛПС мышам в дозе 0,5 мг/кг массы тела в сутки нейроглия подвергается значительным морфофункциональным изменениям, но нет сведений об изменениях со стороны нейронов [118]. Семь суток введения в дозах 0,5 мг/кг или 0,75 мг/кг массы тела приводят уже к нейродегенеративным изменениям [36]. В то же время, неоднократные введения ЛПС мышам из расчета 2,5 мг/кг массы тела сопровождаются сепсисом с обширной лимфоцитарной инфильтрацией в структурах головного мозга [197].

С учетом вышеописанного, оптимальный режим инъекционного введения ЛПС мышам для цели настоящего исследования предполагает диапазон доз от 0,5 до 2 мг/кг массы тела в сутки на протяжении не менее двух и не более семи дней подряд. Viader с коллегами [22] подробно описали модель хронического системного воспаления с морфофункциональными изменениями со стороны нейроглии без развития воспаления в нервной ткани для режима дозирования ЛПС в дозе 1 мг/кг массы тела мыши в течение четырех суток внутрибрюшинного введения, т. е. для среднего значения дозы внутри выбранного диапазона 0,5-2 мг/кг массы тела. При этом в вышеуказанной публикации коллектива Viader и соавторов сведения о воздействии ЛПС на нейроны изложены чересчур сжато.

С учетом анализа результатов, полученных другими исследователями в работах, рассмотренных в настоящем обзоре, наиболее предпочтительным режимом дозирования ЛПС для моделирования морфофункциональных изменений в нейронах изокортекса при хроническом системном воспалении является введение его внутрибрюшинно из расчета 1 мг/кг массы тела животного в сутки в течение 4 дней. Кроме того, для оценки развития признаков нейровоспаления в выбранном режиме дозирования целесообразно апробировать аналогичные режимы по нижней и верхней границам рассмотренного диапазона, т. е. из расчета 0,5 мг/кг и 2 мг/кг массы тела животного в сутки в течение 4 дней.

Также подлежит решению вопрос о режиме дозирования ЛПС при запланированном введении его непосредственно в структуры ЦНС. Так, при внутрижелудочковом введении мышам сальмонеллезного ЛПС в дозе 1 мкг/кг массы тела изменения морфологии нейронов отмечали в гиппокампе и коре больших полушарий головного мозга спустя 24 часа [162]. В частности, снижалось количество шипиков и дендритов нервных клеток. В другом исследовании спустя неделю после введения мышам ЛПС *E. coli* серовара O111:B4 в желудочки головного мозга в дозе 12 мкг/кг массы тела отмечали множественные морфофункциональные изменения в коре и гиппокампе [32].

В то же время введение мышам в боковые желудочки эшерихиозного ЛПС серовара O55:B5 из расчета 50 нг/кг уже спустя двое суток приводило к

выраженной реакции нейроглии, например к повышенной экспрессии маркеров, свидетельствующих об активации микроглиоцитов [203]. При введении ЛПС того же серовара в дозе 300 нг/кг массы тела аналогичные явления сохранялись вплоть до седьмых суток после применения эндотоксина [204].

При интракортикальном введении и схожих режимах дозирования (100 нг/кг и 200 нг/кг массы тела) ЛПС O55:B5 морфофункциональные признаки активации нейроглии и повреждения нейронов проявляются раньше (через сутки и двое суток соответственно), чем при внутрижелудочковом введении [98, 195]. Через 24 часа активируется микроглия и при интракортикальном режиме дозирования 1 мкг/кг массы тела животных для серовара O26:B6 [196]. Исходя из данных литературы, режимом введения ЛПС в структуры головного мозга, адекватным для выполнения соответствующей задачи настоящего исследования, можно полагать 12 мкг/кг массы тела для серовара O111:B4, так как в исследованиях с применением этого режима продемонстрированы изменения в нейронах без развития воспаления.

Введение ЛПС является адекватной моделью для этого исследования. При этом в наибольшей степени решению задачи моделирования хронического системного воспаления соответствует режим внутрибрюшинного введения ЛПС E. coli серовара O111:B4 в дозе 1 мг/кг массы тела в течение четырех суток (модель хронического системного воспаления с нейровоспалением коллектива Viader и соавторов [22]). Решению задачи моделирования прямого повреждения нейронов представляется адекватным режим с введением ЛПС того же серовара в структуры ЦНС в дозе 12 мкг/кг массы тела и выведением животных из эксперимента через двое суток (модель апробирована коллективом Ahmedy и соавторов только для внутрижелудочкового введения [32]).

Таким образом, на основании обзора литературных источников для пилотного эксперимента выбраны дозы ЛПС: 0,5 мг/кг, 1 мг/кг и 2 мг/кг массы тела для внутрибрюшинного введения в течение 4 суток и 12 мкг/кг массы тела для стереотаксических введений.

Для составления плана исследования следует также изучить, какие маркеры морфологических и функциональных изменений нейронов и нейроглии в изокортексе у мышей наиболее отвечают его цели и задачам.

1.3. Морфофункциональные маркеры в изокортексе у мышей

Для оценки морфофункциональных характеристик нейронов и глии доступны различные качественные и количественные показатели. Описанию подлежат и те, и другие, однако только количественные подлежат статистическому сравнению в экспериментальном исследовании. В изокортексе к ним относятся показатели клеточности, распределения экспрессируемых белков в клетках и межклеточном пространстве. Одной из ключевых сравнительных морфологических характеристик изокортекса является количество жизнеспособных нейронов.

Однако области и поля в коре больших полушарий головного мозга у каждого организма отличаются по плотности распределения нейронов и клеток нейроглии. Эти отличия в плотности распределения в большей степени выражены у приматов и кошек (максимальной – в сенсорных отделах коры), в меньшей – у мышей [144].

Необходимо учитывать, что механическое воздействие на головной мозг, например, при гидроцефалии или травме, может привести к изменению плотности нейронов [72]. Кроме того, сравнение допустимо только между животными одной линии, пола и возраста, так как существуют значительные различия между ними по плотности нейронов [143, 157] и клеток нейроглии [30, 143].

Оценка плотности нейронов предполагает использование стандартизированной методики идентификации этих клеток. Для визуализации и подсчета отдельных нейронов в коре больших полушарий головного мозга в изокортексе у мышей широко используют окрашивание гематоксилином и эозином, по методу Ниссля (толуидиновым синим, крезильным фиолетовым, метиленовым синим и др.), нигрозином, импрегнацию азотнокислым серебром в различных модификациях

(Бильшовского, Бильшовского-Грос-Лаврентьева, Гольджи, Гольджи-Кокса) [96, 103], а также различные комбинации этих методов [23, 81].

Несмотря на относительную простоту проведения, классические гистологические методы окрашивания мало избирательны, реагируют на многие молекулярные процессы с задержкой, следовательно, затрудняют морфологическую визуализацию функциональных изменений, произошедших в нейронах при жизни животного. В связи с этим для наилучшей информативности целесообразно комбинировать классические гистологические и иммуногистохимические методы окрашивания, позволяющие выявить изменения в экспрессии отдельных белков и морфофункциональные, а не только морфологические изменения.

Существуют также другие подходы, применяемые для оценки структуры нейронов и плотности их распределения в ткани, например конфокальная микроскопия и флуоресцентная микроскопия. Так, комбинация различных окрасок с конфокальной микроскопией позволяет визуализировать синапсы и трехмерную структуру нейрона с отростками [176]. Эта и другие техники востребованы для описательных исследований с морфологической характеристикой нейрональной цитоархитектоники, но мало применимы для сравнения групп по плотности распределения клеток при экспериментальном исследовании.

Морфофункциональные изменения в отростках нейронов можно оценить при подсчете соотношения пикселей в поле зрения с помощью методов машинного обучения, в т. ч. после окраски гематоксилином и эозином [20]. Данный метод, тем не менее, не учитывает сложную архитектуру межклеточных взаимодействий в нервной ткани, влияющую на характер реактивных изменений в нейронах.

Существуют методы косвенной оценки морфофункциональных характеристик: физиологические (электрофизиологические и поведенческие тесты), молекулярные (иммуноблоттинг, иммуноферментный анализ и др.) и клеточные (культивация нейронов и иммуноцитохимическое исследование). Из них в дополнение к гистологическому исследованию для оценки

морфофункционального состояния структур нервной системы наиболее подходящими являются моторные тесты.

Для изучения морфофункциональных изменений в нейронах и нейроглии изокортекса у мышей при разных вариантах введения бактериального липополисахарида применимы классические гистологические методы, моторные физиологические тесты и иммуногистохимические техники окрашивания. Иммуногистохимический подход предполагает высокую специфичность, поэтому для его практического использования в настоящем исследовании необходимо определить наиболее подходящие конкретные маркеры с учетом результатов, полученных другими исследователями.

1.3.1. Маркеры нейронов изокортекса

Среди разнообразных белков, входящих в состав кортикальных нейронов, актуально использование для иммуногистохимического исследования антител к ним лишь в том случае, если такие антитела доступны для стандартизованного производства. В настоящем исследовании требуется визуализировать зрелые нейроны в изокортексе у мышей без выделения отдельных субпопуляций, но с оценкой общего числа клеток, т. е. подсчетом перикарионов. Кроме того, это должны быть клетки, сохранившие функциональную активность и жизнеспособность, в противном случае для оценки состояния и их подсчета было бы достаточно микрофотографий препаратов, окрашенных классическими гистологическими методами.

К соответствующим антителам можно отнести иммуноглобулины, специфично связывающиеся со следующими белками:

- 1) нейрональный ядерный маркер (NeuN);
- 2) белки цитоскелета: бета-тубулин III класса; альфа-интернексин; тау-белок; белок 2, ассоциированный с микротрубочками (MAP2); целый ряд белков, образующих нейрофиламенты;
- 3) белки синапсов: синаптофизин; белки постсинаптической плотности;

- 4) нейрон-специфическая енолаза;
- 5) белки аксонального роста и трансформации: белок, связанный с ростом (GAP43); нейропилин-1.

Сведения об экспрессии белков цитоскелета и синапсов, а также аксонального роста и трансформации не позволят достоверно оценить число перикарионов, сохранивших жизнеспособность. Следовательно, для исследования пригодны исключительно NeuN и нейрон-специфическая енолаза. Однако в литературе нет сведений об успешной визуализации изменений в нейронах, связанных с введением ЛПС, по уровням нейрон-специфической енолазы, хотя она может рассматриваться как маркер нейродегенерации [55].

Нейрональный ядерный маркер, таким образом, остается оптимальным вариантом. Кроме того, он изначально описан как общий маркер для кортикальных нейронов [140], что подтверждено и более поздними исследованиями [6]. Следует отметить, что в упомянутой работе В.В. Гусельниковой и Д.Э. Коржевского упоминается также возможность ложноположительной и ложноотрицательной реакции с NeuN; соответствующие особенности, дополняющие стандартную процедуру ИГХ, учтены в методике и дизайне исследования (подробно рассмотренных в главе 2 настоящей работы). Следовательно, изменения количества зрелых и функционирующих нейронов в изокортексе у мышей в настоящей работе рационально оценивать при гистологическом исследовании и определении количества нейронов с положительной реакцией антител к белку NeuN.

1.3.2. Маркеры астроцитов изокортекса

Иммуногистохимические маркеры для выявления астроцитов среди других клеточных популяций в нервной ткани разнообразны. Часть из них присуща всем астроцитам, причем наиболее изученными являются маркеры Aldh1l1 и SOX9 [137]. У мышей для астроцитов, расположенных в изокортексе, характерна экспрессия маркера Chrdl1 [33].

Однако использование общих для астроцитов или кортикальных астроцитов маркеров не отвечает поставленной цели работы. Практическую ценность в настоящем исследовании составляет не точный подсчет общего количества астроцитов в изокортексе, а оценка изменений в их активации в ответ на введение липополисахарида, т. е. увеличение количества A1-астроцитов. Из трех упомянутых астроцитарных маркеров к ним относится только SOX9, но и его уровни относительно слабо реагируют на активацию астроглии [137]. Следовательно, необходимо определить, какой из маркеров наиболее приемлем для активированных астроцитов, на которые подействовал ЛПС.

Маркер GFAP характерен в основном для активированных астроцитов, развивающихся из клеток-предшественников с экспрессией *Emx1* и расположенных в глубоких (V и VI) пластинках коры или непосредственно в субкортикальной зоне [63]. Несмотря на то, что GFAP синтезируется в астроцитах и без активации, его количество напрямую зависит от того, получили ли клетки молекулярный сигнал о повреждении. Динамика экспрессии GFAP близка к таковой для кальций-связывающего белка S100 β , но последний хуже выявляется в астроцитах, хотя в пределах ЦНС специфичен только для них [11].

Экспрессия белков, связанных с метаболизмом глутамата, также способна косвенно отражать уровень активации астроцитов. Тем не менее в обмене глутамата активно участвует и олигодендроциты [11], снижая специфичность таких номинально астроцитарных маркеров, как глутаминсинтетаза и мембранно-ассоциированные белки-транспортеры глутамата. Еще одним белком астроцитов, доступным для иммуногистохимического исследования, является аквапорин-4. Он позволяет регулировать лимфатический дренаж, а его повышенная экспрессия на плазмалемме тоже может свидетельствовать об активации астроцитов [109]. Однако лимфатическая система в меньшей степени вовлечена в нарушения, связанные с повторяющимся введением ЛПС в невысоких дозах. По той же причине не подходит для настоящего исследования коннексин-43, белок щелевидных контактов [217]. Данные межклеточные соединения опосредованно страдают при

ЛПС-индуцированном повреждении, но в литературе нет сведений о репрезентативности их белков при подсчете активированных астроцитов.

Также широко применяется для иммуногистохимического исследования астроцитов такой маркер, как альдолаза – фермент, участвующий в обмене глюкозы. Вместе с тем он мало специфичен для конкретных видов повреждения, поэтому его уровни экспрессии, возможно, модулируются сторонними воздействиями, например приемом пищи в различное время. Кроме того, допустимо использовать антитела к таким белкам астроцитов, как коронин, участвующий в образовании цитоскелета, и широко распространенный в различных клеточных популяциях фермент – дейодиназа второго типа. В литературе мало сведений о применении данных маркеров для оценки повреждения клеточных популяций в изокортексе у мышей в целом и при воздействии ЛПС в частности. Существуют сведения об использовании белков, связывающих инсулиноподобный фактор роста (IGFBP), в качестве маркеров активации астроцитов [206], но сведений об их применении для оценки воздействия ЛПС не обнаружено.

Следовательно, маркер GFAP наиболее применим в настоящем исследовании для оценки количества активированных астроцитов в изокортексе при введении мышам ЛПС, а SOX9 может выступать дополнительным маркером при недостаточной информативности данных об экспрессии GFAP для сравнения популяций астроцитов по уровню активации.

1.3.3. Маркеры клеток микроглии в изокортексе

Несмотря на разнообразие подтипов микроглиоцитов изокортекса при секвенировании РНК в отдельных клетках, им всем свойственна экспрессия Iba1, причем в реактивном состоянии она усиливается [163]. Помимо этого, в реактивной микроглии могут также выявляться практически все белки плазмалеммы, свойственные для моноцитарно-макрофагального дифферона (например, CD11b, CX3CR1, CD45, CD68, F4/80, HLA-DR, C1qA и др.), не обладающие высокой специфичностью к реактивной микроглии [11]. Более того, сочетание GFAP и Iba1

для определения A1-астроцитов и реактивной микроглии прямо рекомендовано в указанной работе Д.Э. Коржевского как оптимальное для оценки нейровоспаления.

Следовательно, маркер Iba1 можно считать наиболее подходящим для изучения изменений в количестве клеток реактивной микроглии.

1.3.4. Маркеры функциональных изменений в нейронах и глии

Помимо специфических маркеров нейронов и нейроглии, следует оценить количественные параметры, свидетельствующие о вовлечении механизмов их ЛПС-индуцированного повреждения. Как следует из вышеизложенного анализа литературных источников, ведущими процессами при таком повреждении являются опосредованные нейроглией секреция цитокинов и активация апоптоза, ключевыми маркерами которых выступают фактор некроза опухоли альфа (ФНО- α) и каспаза-3 соответственно [77, 214]. Следовательно, маркеры ФНО- α и каспаза-3 адекватны для количественной оценки функциональных изменений в нейронах и нейроглии изокортекса при введении мышам ЛПС.

Таким образом, в ходе изучения литературных источников подобраны рациональные режимы моделирования экспериментального воздействия для настоящего исследования и конкретные методы оценки изменений при этом воздействии. Представляется важным рассмотреть не только процесс повреждения нейронов, но и то, как усиление адаптивных способностей нервных клеток может модифицировать их повреждение. Для этого необходимо использовать в качестве дополнительного объекта исследования животных, менее подверженных повреждающему воздействию ЛПС, например, за счет повышенной активности белков теплового шока.

1.4. Белки теплового шока как модификаторы повреждения нейронов

Контактируя в процессе жизни с разнообразными бактериальными факторами, нейроны претерпевают ряд молекулярных и морфологических изменений [31, 37]. Эти изменения в некоторой степени замедлены благодаря

вкладу внутриклеточных компенсаторных механизмов типа молекулярных шаперонов, предотвращающих быструю деграцию нервных клеток [83].

Повреждение нейронов приводит к нарушению как процессов образования новых полипептидных цепей, так и ферментативного исправления ошибок в конформации уже синтезированных белков, и именно на этом уровне обеспечивается гомеостаз за счет белков теплового шока [88]. Среди них для нейронов ключевыми являются белки теплового шока массой 70 кДа, или HSP70 [47]. Семейство белков HSP70 включает более 10 разновидностей. Отдельные белки семейства регулируют апоптоз и митохондриальную функцию [133], но важнейшая задача HSP70 – предотвратить ошибки в посттрансляционных модификациях и не допустить агрегации денатурированных белков [56].

Белок HSPA1A – один из наиболее распространенных HSP70 в нейронах у млекопитающих, находящийся в основном в цитозоле, но при определенных условиях секретируемый клеткой вовне [205]. Он интересен тем, что его экспрессия регулируется, и при стрессе и повреждении производится больше HSPA1A. Существуют сведения о благоприятном воздействии HSP70 на выживаемость поврежденных нейронов и потенциальном фармакологическом применении HSP70 [146]. В связи с этим для комплексной оценки воздействия ЛПС целесообразно рассмотреть, как присутствие человеческого HSP70 в нейронах изокортекса мыши влияет на их морфофункциональные характеристики.

Таким образом, для исследования компенсаторных механизмов, влияющих на изменения в коре больших полушарий головного мозга, в рамках настоящей работы, необходимо оценить качественные и количественные морфофункциональные характеристики нейронов и нейроглии у мышей с повышенной экспрессией белков теплового шока, например, HSP70, при введениях бактериального ЛПС.

1.5. Выводы по обзору литературы

Изучение морфофункциональных особенностей нейронов при воздействии, не приводящем в краткосрочной перспективе к формированию выраженных патологических процессов, является актуальной задачей, стоящей перед современной медицинской наукой, поскольку полученные в таких исследованиях данные необходимы для разработки методов профилактики и лечения нейродегенеративных заболеваний. Несмотря на разнообразие моделей повреждения нейронов при малоинтенсивном повреждении, в литературе описано мало закономерностей воздействия на нейроны изокортекса без развития воспаления; также обычно не рассматривается модификация воздействия ЛПС при его введении в обход ГЭБ и компенсация повреждения нейронов за счет компенсаторной системы белков теплового шока, особенно HSP70.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Сведения об использованном липополисахариде

В настоящем исследовании применялся ЛПС кишечной палочки (*Escherichia coli*) серовара O111:K58:H2, также известного как O111:B4. Для изготовления рабочего раствора использовался ЛПС в виде лиофилизированного порошка (артикул L2630, партия № 091M4031V, Sigma-Aldrich, США).

Растворимость исходной субстанции ЛПС, заявленная изготовителем, составляет в физиологическом растворе 4,9-5,1 мг/мл, при нагревании до 70-80 °С возрастая до 20 мг/мл. Лيوфилизированный порошок хранился в холодильнике при температуре 4-6 °С в комнате с ограниченным доступом персонала.

ЛПС *E. coli* O111:B4 (L2630) очищен от посторонних белковых примесей (свыше 99 %) посредством экстракции фенолом с сохранением до 60 % возможных примесей РНК [209]. Таким образом, исключена потенциальная иммуногенность каких-либо компонентов, кроме ЛПС.

2.1.1. Манипуляции с рабочим раствором

Порошок перед растворением взвешивался на аналитических весах в виде навески на стерильном металлическом шпателе для точного определения доз. Для изготовления рабочего раствора при комнатной температуре готовились равные аликвоты по 1 мл (300 мкг/мл ЛПС в 0,9 % растворе натрия хлорида) в пробирках типа «Эппендорф» с перемешиванием в вихревом смесителе типа «Вортекс» в течение 1 мин. при 2500 об./мин.

Рабочий раствор использовался сразу же после приготовления с набором необходимой дозы в инсулиновые шприцы типа U-100 (1 мл, игла калибра № 30 – 8 мм) из расчета 0,5 мг/кг, 1 мг/кг или 2 мг/кг массы тела животного с последующим разведением 0,9 % раствором натрия хлорида до 0,1 мл (или до 0,2 мл в случае с введением ЛПС из расчета 2 мг/кг массы тела животного). Для стереотаксического введения производилось разведение из расчета 12 мкг/кг массы

тела животного с набором в нанолитровую инъекционную помпу для стереотаксического введения (RWD Life Science, КНР). Неиспользованные остатки рабочего раствора утилизировались немедленно после окончания экспериментов.

2.1.2. Введение раствора липополисахарида

После набора индивидуальных для каждого животного доз рабочего раствора ЛПС из расчета на массу тела или аналогичных по объему доз физиологического раствора (натрия хлорид изотонический 0,9 % раствор для инъекций, B. Braun Medical Inc., США) введение осуществлялось внутривентриально и стереотаксически, внутрижелудочно и интракорткально. Внутривентриальное введение выполнялось 1 раз в сутки в промежутке между 12 и 14 часами на протяжении четырех суток, чередуя стороны тела для введения в смежные дни. Стереотаксические введения проводились в интервале между 16 и 19 часами.

2.2. Экспериментальные животные

2.2.1. Видовые и групповые характеристики животных

Исследование выполнено на трех линиях мышей. Основным объектом изучения были самки мышей (*Mus musculus*) линии C57BL/6J, полученные из сертифицированного питомника Филиала «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». Для рандомизации были отобраны животные возрастом от 87 до 93 дней при массе тела $27 \pm 5,0$ г.

Мыши выбраны для исследования как общепринятый вид лабораторных животных, применяемый для изучения повреждения нейронов. Молекулярные, электрофизиологические, морфометрические и иммуноморфологические свойства нейронов у человека и мыши во многом схожи, что позволяет производить межвидовую экстраполяцию данных [149]. Отличия между видами в основном касаются эмбрионального развития, анатомического соотношения областей мозга

[183], наличия извилин и сложных нейрональных сетей [134]. Тем не менее все области коры у мыши имеют гомологичные области у человека [208].

Линия C57BL/6J выбрана для исследования, поскольку мыши данного типа устойчивы к стрессовому воздействию и хорошо изучены [127], в отличие от аутбредных и домашних мышей [171]. Для нейробиологических экспериментов также часто используют линию Balb/c, однако эти мыши избыточно секретируют цитокины при повреждении, что было бы ограничением для настоящей работы [44].

Самки выбраны для исследования, чтобы избежать половых различий в реактивности на ЛПС. У самцов и самок на фоне введения ЛПС в разной степени изменяется целый ряд показателей, связанных с работой ГЭБ [152]. Кроме этого, микроглиоциты самцов и самок имеют разную восприимчивость к ЛПС из-за большей экспрессии рецепторов к нему (TLR4) на плазмалемме у самок [26].

Для выполнения задачи по изучению воздействия ЛПС у животных с повышенным содержанием в нейронах HSP70 были использованы еще две линии мышей на основе C57BL/6J, полученных из вивария Сеченовского Университета. Одна линия (HSP70 эндо) экспрессирует трансгенный человеческий HSPA1A в цитозоле клеток, другая линия (HSP70 экзо) синтезирует его в клетках и секретирует в межклеточное пространство. Данные трансгенные линии хорошо изучены и апробированы в исследованиях на нашей кафедре и вне нее [189].

2.2.2. Количество животных в исследовании

В исследование было включено 72 мыши линии C57BL/6J и по 8 мышей линий HSP70 (эндо) и HSP70 (экзо), итого 88 животных.

Количество особей, с одной стороны, ограничено этическими требованиями по рациональному использованию лабораторных животных в экспериментальных исследованиях, включая концепцию 3R [68], и, с другой стороны, должно быть достаточным для проведения статистической обработки результатов [73].

Так, согласно концепции 3R, из гуманных соображений необходимо снижать число животных в эксперименте до минимального. Одновременно с этим,

увеличение количества значений данных (а следовательно, и животных) будет способствовать повышению достоверности при сравнении выборок.

Решением вопроса о количестве животных с учетом этих двух аспектов является проведение пилотного эксперимента для расчета минимально допустимого (эффективного) размера выборки, который определяет наименьшее значение для оценки статистической достоверности возможных различий между группами. На основании пилотного эксперимента выполнен расчет минимально допустимого (эффективного) размера выборки по следующей формуле:

$$n = \frac{2\sigma^2 \left(\frac{Z_\alpha + Z_\beta}{2} \right)^2}{\delta^2} [40],$$

где n – размер выборки;

σ – максимальное стандартное отклонение значений переменной для исследуемого показателя;

Z_α – целевой уровень статистической значимости, принятый за 1,96 с учетом значений доверительного интервала 95 % при сравнениях по критерию Стьюдента для максимума степеней свободы;

Z_β – целевая статистическая мощность, принятая за 0,8 (80 %) для исследований на небольших выборках животных [82];

δ – минимальные различия между группами по среднему значению.

Был рассчитан размер реальной статистической мощности и проведена оценка эффективного размера выборки для исключения ошибок первого и второго рода, а также «ошибки наблюдателя».

2.2.3. Содержание животных

Настоящее исследование выполнено в соответствии с Принципами надлежащей лабораторной практики согласно межгосударственному стандарту ГОСТ 33044-2014 [17]. Все манипуляции с животными, условия их содержания и ухода за ними рассмотрены и утверждены на заседании локального этического комитета Сеченовского Университета 20.01.2022, протокол № 01-22.

Принятые в исследовании правила оборудования помещений и лабораторного оснащения, а также организации процедур соответствовали положениям ГОСТ 33215-2014, а содержания животных и ухода за ними – ГОСТ 33216-2014. Ежедневно производилась влажная уборка комнат содержания и прочих помещений вивария. Два раза в неделю или чаще по мере загрязнения выполнялась смена подстилки в клетках, один раз в сутки или чаще по мере необходимости – замена бутылок с водой для поения животных. При смене подстилки оставлялась часть незагрязненной подстилки для сохранения запаховых меток и снижения возможного беспокойства животных.

Мыши были размещены в отдельном помещении вивария без контакта с животными, используемыми в других исследованиях. В данной комнате поддерживалась температура воздуха 20-22 °С при относительной влажности 60-65 % и вентиляцией, обеспечивающей не менее 15 смен воздуха в час и разобщенной с другими помещениями для животных.

Контроль температуры и относительной влажности осуществлялся дважды в сутки при помощи термометра и психрометра. В помещении был обеспечен двенадцатичасовой режим освещения, по возможности – за счет естественного света. Стеллаж для размещения клеток с животными имел выступающую верхнюю планку, обеспечивающую затенение и возможность животного выбрать темный участок клетки для пребывания в период дня с ярким освещением.

Мыши были размещены не более, чем по шесть особей, в клетках из полипропилена высотой 20 см, имеющих верхнюю решетку из нержавеющей стали и углубление для корма с тем расчетом, чтобы на одно животное приходилось не менее 100 см² площади клетки. На решетчатую крышку крепились пластиковые бутылки с водой с наконечниками из нержавеющей стали.

Животные получали сертифицированный сбалансированный гранулированный корм, рекомендованный для лабораторных мышей (ООО «Лабораторкорм», Россия). Доступ к корму осуществлялся *ad libitum* на протяжении всех суток, и по мере уменьшения его количества корм досыпался. Для

поения использовалась водопроводная вода из системы городского водоснабжения г. Москвы, прошедшая фильтрацию и разлитая в чистые пластиковые бутылки.

Животные, поступившие из Филиала «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», проходили двухнедельный карантин. Отбор мышей для эксперимента был проведен с учетом пола, возраста и массы тела из числа полученных виварием мышей. При этом ветеринарный врач осматривал животных и давал оценку состоянию их здоровья. После формирования экспериментальных групп ветеринарный врач проводил повторный осмотр, разрешая передачу в экспериментальное исследование мышей без признаков заболеваний и иных видимых отклонений состояния и поведения.

2.2.4. Распределение по группам и маркировка

При распределении мыши дикого типа были рандомизированы методом случайных чисел на группы (контрольная и введение ЛПС в различных дозах); трансгенных мышей не рандомизировали, поскольку их не делили на группы. Каждому животному присваивался индивидуальный номер, при этом маркировка производилась исключительно при помощи чисел во избежание ассоциаций с экспериментальными группами, а ее расшифровка выполнена только после окончания качественного и количественного анализа результатов.

2.2.5. Эвтаназия и забор органов

По достижении контрольных точек исследования животные были выведены из эксперимента с последующим незамедлительным забором органов (контрольные точки: 4 суток для внутрибрюшинного введения, 2 суток для стереотаксического введения). Для проведения эвтаназии было введено 5 мг/кг ксилазина гидрохлорида (Interchemie, Нидерланды) и 40 мг/кг тилетамина/золазепам (Virbac, Франция), после потери животными сознания выполнена декапитация на гильотине (НПК «Открытая наука», Россия).

После этого кожа мыши в области шеи была рассечена сагиттально, разрез продолжен вплоть до нижней части лобной области. Скальпелем кости черепа были разделены в горизонтальной плоскости снаружи, не повреждая самого головного мозга. После этого при помощи анатомического пинцета извлекался головной мозг и отсекался ножницами спинной мозг; материал помещался в фиксирующую жидкость (10 % нейтральный забуференный формалин).

2.3. Проведение исследования

2.3.1. Пилотный эксперимент и расчет количества животных

Пилотный эксперимент был предназначен для расчета размера выборки и экспериментальной проверки выдвинутой ранее гипотезы о рациональном выборе режимов дозирования ЛПС, вводимого для моделирования нейровоспаления (подраздел 1.2.5 настоящей работы). В первой части пилотного эксперимента было отобрано четыре мыши C57Bl/6J (две группы по два животных). Животным 1-й группы в интервале от 12 до 14 часов на протяжении четырех последовательных дней внутрибрюшинно было введено 0,1 мл 0,9 % натрия хлорида физиологического раствора, а мышам 2-й группы – 0,1 мл ЛПС в дозе 1 мг/кг массы тела животного с разведением 0,9 % натрия хлорида физиологическим раствором. Вторая часть пилотного эксперимента включала шесть мышей C57Bl/6J, рандомизированных на три группы: интактные животные, мыши, получавшие физиологический раствор, и мыши, которым интракортикально введен ЛПС из расчета 12 мкг/кг массы тела.

При подсчете количества нейронов, астроцитов и клеток микроглии по иммуногистохимическим маркерам и статистической обработке значений для количественных показателей установлено, что количество нейронов при выбранных режимах дозирования ЛПС снижается, а численные значения остальных показателей увеличиваются. Эффективный размер выборки составляет 3 животных для определения количества клеток с положительной реакцией антител к маркеру NeuN и 5 животных для нахождения значений прочих показателей.

2.3.2. План основного исследования

На основании проведенного пилотного эксперимента было определено количество животных для последующих экспериментов (таблица 2).

Таблица 2 – Дизайн основных экспериментов

№ п/п	Количество мышей во всех группах	Доза ЛПС из расчета на 1 кг массы тела	Маркеры
1	18	0,5 мг; 1 мг; 2 мг	NeuN
2	10	1 мг	GFAP, Iba1
3	20	0,5 мг; 1 мг; 2 мг	GFAP, Iba1, ФНО- α , каспаза-3
4	30	12 мкг	NeuN, GFAP, Iba1, SOX9

В первом эксперименте согласно таблице 2 (п/п 1) изучены морфофункциональные характеристики нейронов головного мозга при воздействии доз 0,5, 1 и 2 мг/кг массы тела. Мышам внутрибрюшинно по той же методике, что и в пилотном эксперименте, был введен физиологический раствор (C57Bl/6J, контрольная группа; $n = 3$), ЛПС в дозе 0,5 мг/кг массы тела в сутки (C57Bl/6J, $n = 3$), 1 мг/кг массы тела в сутки (C57Bl/6J, $n = 3$; HSP70 (эндо), $n = 3$ и HSP70 (экзо), $n = 3$), или 2 мг/кг массы тела в сутки (C57Bl/6J, $n = 3$) на протяжении четырех последовательных дней.

На срезах головного мозга животных, включенных в эксперимент п/п 1, выполнено гистологическое исследование с окрашиванием гематоксилином и эозином, толуидиновым синим по методу Ниссля с оценкой качественных изменений, иммуногистохимические – ферментативное (ИГХ) и флуоресцентное (ИФ) – исследования с оценкой количественных изменений по экспрессии маркера NeuN. Антитела NeuN известны частотой ложных реакций при ошибках фиксации биоматериала, чаще наблюдающихся при ферментативном исследовании, при этом флуоресцентное исследование для подсчета уровней NeuN менее показательно [6]. Поэтому ИФ окраска к NeuN выполнена исключительно для контрольной группы и групп с введением ЛПС в дозе 1 мг/кг массы тела.

Для оценки структурно-функциональных показателей, характеризующих состояние нейроглии, были проведены эксперименты п/п 2 и 3 согласно таблице 2. На срезах головного мозга животных, включенных в третий эксперимент, проведено гистологическое исследование с окрашиванием гематоксилином и эозином, толуидиновым синим по методу Ниссля, ИГХ окрашивание антителами к маркерам GFAP и Iba1. В эксперименте № п/п 3 при ИФ окрашивании исследованы те же характеристики, а также показатели экспрессии каспазы-3 и фактора некроза опухолей α (ФНО- α). Разделение на эксперименты с одинаковым дизайном групп выполнено для обеспечения достаточного для репрезентативной выборки количества срезов (п. 2.2.2 настоящей работы).

Для исследования прямого воздействия ЛПС на кору больших полушарий головного мозга был выполнен эксперимент п/п 4 (таблица 2). В него было включено шесть групп самок мышей возрастом 3 месяца ($n = 5$ в группе, всего 30 мышей), а именно:

- 1) интактные мыши C57Bl6/J;
- 2) мыши C57Bl6/J, интракортикальное введение физиологического раствора;
- 3) мыши C57Bl6/J, интракортикальное введение ЛПС;
- 4) мыши C57Bl6/J, внутривентрикулярное введение ЛПС;
- 5) мыши HSP70 (эндо), интракортикальное введение ЛПС;
- 6) мыши HSP70 (экзо), интракортикальное введение ЛПС.

Верификация повреждения в экспериментах выполнена на установке для лазерной спекл-контрастной визуализации с оценкой интенсивности кровотока по тепловым картам спустя 30 минут и двое суток после введения. В основе метода лазерной спекл-контрастной визуализации лежит принцип обратного рассеивания света от движущихся эритроцитов. Перед стереотаксическими введениями поверхность черепа была отцентрирована с помощью двусторонней лазерной метки, равноудаленной от проекции верхнего сагиттального синуса на череп животного. Запись осуществлялась в течение 1 минуты с визуальным получением данных динамической картины кровотока в коре больших полушарий головного мозга в виде тепловых карт.

Далее в этом эксперименте выполнены физиологические тесты (через сутки после введений ЛПС). Спустя двое суток после введений ЛПС животные выведены из эксперимента. Дополнительная верификация места повреждения выполнена при помощи обработки тканей головного мозга трифенилтетразолия хлоридом из части забранного материала, не предназначенной для изготовления препаратов. Проводилась оценка объема окрашивания / обесцвечивания головного мозга в ходе реакции сукцинатдегидрогеназы и трифенилтетразолия хлорида.

Препараты головного мозга импрегнированы серебром по методу Бильшовского-Гросс-Лаврентьева, окрашены гематоксилином и эозином, толуидиновым синим по методу Ниссля с оценкой качественных изменений и подсчетом количества нейронов; кроме того, выполнено иммунофлуоресцентное исследование с окрашиванием антителами к маркерам NeuN, GFAP и SOX9.

2.3.3. Стереотаксическое введение липополисахарида

Стереотаксические введения в моторную кору больших полушарий головного мозга и боковые желудочки были осуществлены после наркотизации животных изофлураном (Baxter, США). После наступления глубокой седации и проверки болевых рефлексов животное закреплялось на стереотаксической установке (RWD Life Science, КНР). Осуществлялся доступ к черепу путем надреза кожи.

После этого были определены координаты брегмы (венечного шва) и ламбды (сагиттального шва) по анатомическим ориентирам согласно атласу для мышей [193]. Микродрель стереотаксической установки была позиционирована в проекции требуемого участка изокортекса. В ходе программно-аппаратной операции «Skull window program» (дословно: «программа черепного окна») была истончена теменная кость. Далее микродрель была заменена в держателе на нанолитровую инъекционную помпу со стеклянной капельницей и набранным физиологическим раствором или ЛПС. Нанолитровую инъекционную помпу опускалась с выполнением программно-аппаратной операции «Empty» (дословно: «опустошить») при заданной скорости опорожнения 2 мкл/с. После окончания

введения нанолитровую инъекционная помпа была удалена. Операционный шов был выполнен при помощи материала «Пролен» (Ethicon, США).

2.3.4. Проведение физиологических тестов

На контрольной точке 24 ч после проведения эксперимента со стереотаксическим введением были выполнены моторные физиологические тесты на установках «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт» (НПК «Открытая наука», Россия) для оценки функциональных изменений в моторной коре. За два часа до проведения эксперимента мыши были перенесены в помещение, где производились тесты. Между опытами установки были обработаны при помощи дезинфицирующих средств; далее теплым мыльным раствором и чистой водой удалены остатки средства, чтобы не исказить поведения мышей.

Каждый физиологический тест выполняли в течение 5 минут при освещении 300 люкс. Результаты теста записывались на камеру и анализировались при помощи собственного программного обеспечения, разработанного в среде Python (Python Software Foundation, США) с представлением результатов в виде линий трекинга и тепловых карт с усредненным значением по группе.

2.3.5. Изготовление гистологических срезов

Все манипуляции с химическими реагентами были выполнены в лаборатории с приточно-вытяжной вентиляцией и обеспечением необходимых условий пожарной безопасности, а также правил и рекомендаций ГОСТ Р 52905-2007 и СанПиН 2.1.3678-20. Гистологические препараты были изготовлены согласно стандартным протоколам [5].

Фиксация головного мозга осуществлялась в 10 % нейтральном забуференном формалине (ООО «ЭргоПродакшн», Россия). Спустя 1 час после фиксации органа была выполнена вырезка целевых участков головного мозга с требуемыми зонами изокортекса на матрице мозга мыши из нержавеющей стали (RWD Life Science, КНР) с отметкой ориентировки относительно венечного шва

(брегмы). Путем фронтальной резки были получены кусочки мозга толщиной не более 2 мм, после чего эти кусочки были дофиксированы в 10 % нейтральном забуференном формалине на протяжении суток.

После промывки в воде выполнена стандартная проводка через батарею спиртов возрастающей концентрации, изготовленных из исходного 99,66 % изопропилового спирта (ООО «ЭргоПродакшн», Россия) и дистиллированной воды (получена с использованием бидистиллятора БЭ-4, ООО «Производственная фирма Ливам», Россия). После проводки осуществлялась заливка в парафин.

Для резки применялся ротационный микротом НМ 325 (Thermo Fisher Scientific, США). Изготавливались серийные корональные (фронтальные) срезы головного мозга толщиной 5 мкм с накоплением их на водяной бане с дистиллированной водой при температуре 35 °С. Срезы переносились на предметные стекла размером 26×76×2 мм с полосой для маркировки и без покрытия для классического гистологического окрашивания или с силановым покрытием для последующих ИГХ или ИФ исследований (ООО «Минимед», Россия). Подсушивание стекол с парафиновыми срезами производилось в термостате (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия) при температуре 37 °С в течение 2-25 суток, в зависимости от рекомендаций производителя красителей и антител.

2.3.6. Окраска классическими гистологическими методами

Из классических гистологических методов окрашивания для оценки качественных характеристик тканей головного мозга применялись окрашивание гематоксилином и эозином, толуидиновым синим по методу Ниссля и импрегнация серебром по Бильшовскому-Гросс-Лаврентьеву.

Во всех случаях перед окрашиванием препараты последовательно выдерживались в двух контейнерах с О-ксилолом по 5 минут. Для окрашивания гематоксилином и эозином немедленно после О-ксилола препараты помещались в 100 %, а далее в 50 % изопропиловый спирт (по 5 минут). После промывки проточной водой в течение 2 минут препараты были выдержаны в растворе

гематоксилина (ООО «ЭргоПродакшн», Россия) в течение 5 минут, далее вновь промыты в проточной воде на протяжении 5 минут. После этого препараты последовательно помещались на 5 минут сначала в 50 %, а затем в 100 % изопропиловый спирт. Далее в течение 4 минут срезы были окрашены свежеприготовленным раствором натриевой соли эозина (АО «Ленреактив», Россия). Срезы дважды промывались в емкостях со 100 % изопропиловым спиртом и по 5 минут выдерживались в двух контейнерах с О-ксилолом.

Для окрашивания толуидиновым синим по методу Ниссля срезы последовательно были регидратированы в нисходящих концентрациях изопропилового спирта (96 %, 70 %, 30 %) по 5 минут в каждом и промыты дистиллированной водой в течение 5 минут. На 30 секунд срезы погружались в раствор толуидинового синего (ООО «Биовитрум», Россия) и далее в дифференцировочный раствор (ООО «Диаэм», Россия). Немедленно после окрашивания препараты в течение нескольких секунд промывались в дистиллированной воде и проводились через батарею изопропилового спирта (30 %, 70 %, 96 %) в течение 2 минут на каждую емкость. В завершение срезы выдерживались по 5 минут в двух контейнерах с О-ксилолом.

Для импрегнации азотнокислым серебром по методу Бильшовского-Грос-Лаврентьева срезы последовательно регидратировались в изопропиловом спирте нисходящей концентрации (100 % и 50 %) вплоть до дистиллированной воды по 5 минут. После этого препараты выдерживались в 10 % азотнокислом серебре в течение получаса. Далее срезы трижды промывались в 10 % нейтральном забуференном формалине и 10 минут выдерживались в смешанном растворе 10 % нитрата серебра и аммиака. Вслед за этим производилась инкубация в 1 % растворе аммиака в течение 5 минут с последующей промывкой в дистиллированной воде и 1 % растворе тиосульфата натрия. После в течение 8 минут срезы докрашивались нейтральным красным, промывались в течение 5 минут в дистиллированной воде, 50 % и 100 % изопропиловых спиртах и двух порциях О-ксилола

После окрашивания по каждой из методик срезы были заключены под покровное стекло 24×24 мм при помощи монтирующей среды с ксилолом и пластификатором (ООО «ЭргоПродакшн», Россия) из расчета две капли на срез.

2.3.7. Иммуногистохимическое исследование

Перед проведением исследования подсушенные срезы головного мозга мышей в течение 5 минут прогревались в термостате при температуре 58 °С. Далее подготавливали препараты к обработке антителами путем температурной демаскировки эпитопов. Для этого депарафинизирующий и демаскировочный концентрат буфера (One-step dewaxing/antigen retrieval buffer, pH 9,0, 20×, артикул E-IR-R220A, партия XF05RT4N9592; Elabscience, КНР) был разведен дистиллированной водой в соотношении 1:20. Разведенный раствор наливался в стеклянный контейнер для стекол и на водяной бане для демаскировки нагревался до 98 °С. Силановые стекла со срезами погружались в раствор и выдерживались без дальнейшего повышения температуры в течение 20 минут.

Для удаления остатков демаскировочного раствора стекла со срезами были извлечены из стеклянного контейнера и в горизонтальном положении помещены в емкость, выстланную салфетками для поддержания влажности и заполненную буферным раствором (PBS) с добавлением детергента Твин-20 (ООО «Эко-Сервис», Россия). Промывка в PBS выполнялась в течение 2 минут.

Для препаратов, подлежавших ферментативному окрашиванию, была заблокирована собственная пероксидазная активность тканей. Для этого срезы помещались в 3 % раствор перекиси водорода на 20 минут. Для удаления излишков перекиси водорода повторно проводилась тройная промывка в PBS. В случае с окрашиванием флуорохромами этап, описанный в данном абзаце, пропускался.

В обоих вариантах исследования следующим этапом осуществлялось преинкубирование для предотвращения неспецифического связывания антител и, соответственно, фонового окрашивания. Для этого препараты выдерживались в 1 % растворе бычьего сывороточного альбумина (БСА; Biosera, Франция) в термостате

при температуре 37 °С на протяжении 20 минут. Избыток БСА со среза был удален путем легкого встряхивания стекла без промывки.

Инкубация с первичными антителами (таблица 3) была проведена в термостате при температуре 37 °С на протяжении 2 часов. Антитела использовались предварительно нагретыми до комнатной температуры в следующих рабочих разведениях: к GFAP – 1:500, к SOX9 – 1:100, к Iba1 – 1:200, к NeuN – 1:50 для ИГХ и 1:200 для ИФ, к ФНО- α – 1:300, к каспазе-3 – 1:100. По окончании обработки срезы промывались PBS трехкратно в течение 2 минут.

Далее препараты инкубировались со вторичными антикроличьими антителами при температуре 37 °С в термостате на протяжении 30 минут. Для иммуногистохимического исследования с ферментативным окрашиванием использовали антитела Anti-Rabbit-HRP (антикроличьи с пероксидазой хрена), а для иммунофлуоресцентного исследования (окрашивание флуорохромом) – Anti-Rabbit-TRITC (антикроличьи с тетраметилродамина изотиоцианатом).

Таблица 3 – Антитела, использованные для ИГХ и ИФ исследований

Антиген	Тип, клон	Артикул	Партия	Производитель
NeuN	Моноклональное, SR45-07	ET1602-12	H661803001	Huabio, КНР
GFAP	Моноклональное, SA03-04	ET1601-23	HO0913	Huabio, КНР
SOX9	Моноклональное, R06-7F6	E-AB-81453	KL00H0265902	Elabscience, КНР
Iba1	Поликлональное	ER1802-20	HL0213	Huabio, КНР
Каспаза-3	Поликлональное	E-AB-63602	KL092DJN6391	Elabscience, КНР
ФНО- α	Поликлональное	E-AB-33121	KL076RR09660	Elabscience, КНР
Anti-Rabbit-HRP	Поликлональное	HA1119	M05-22-P2	Huabio, КНР
Anti-Rabbit-TRITC	Поликлональное	E-AB-1053	22038	Elabscience, КНР

При ИГХ окрашивании в качестве хромогена применялся 3,3'-диаминобензидин (ДАБ; Central Drug House, Индия). Препараты промывались дистиллированной водой в течение 3 минут для удаления избытка ДАБ; клетки, не прореагировавшие с антителами, докрасивались гематоксилином Карацци в

течение 5 минут (гематоксилин, алюмокалиевые квасцы и йоднокислый калий; ООО «НПФ «Абрис плюс», Россия).

После этого срезы были дифференцированы в солянокислом спирте (3 минуты) и аммиачной воде (5 минут), далее промыты в изопропиловом спирте (5 минут) и двух сменах О-ксилола (5 минут). При ИФ окрашивании препараты были докрашены 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI; Elabscience, КНР). При обоих способах докрашивания срезы промывались дистиллированной водой, после чего проводились через возрастающие концентрации изопропилового спирта и две смены О-ксилола (по 5 минут в каждом контейнере). Срезы были заключены под покровное стекло в монтирующую среду аналогично описанному выше методу для классического гистологического окрашивания.

Для всех экспериментов и реакций иммуногистохимического окрашивания во избежание ложноположительной оценки было использовано по одному срезу препаратов миокарда и печени в качестве иммуногистохимического контроля. За исключением аутофлуоресценции эритроцитов и эндотелиоцитов, на данных контрольных препаратах не отмечено положительной реакции.

2.3.8. Анализ гистологических препаратов

Для оценки изменений в нейронах препараты головного мозга мышей, окрашенные по классическим гистологическим методикам, были просмотрены на микроскопе Axio Imager.A1 (Carl Zeiss, Германия). Для каждого препарата составлено текстовое описание изменений, включая характеристики перикарионов, ядер нейронов, хроматофильной субстанции, кровеносных сосудов, а также наличия клеточных популяций, нетипичных для изокортекса мышей (например, лимфоцитов), согласно принятым классификациям [7]. Клетки без видимого ядра, у которых срез прошел через перикарион, не оценивались.

Препараты, подвергшиеся ИФ окрашиванию, исследовались оптическими методами немедленно после изготовления, а окрашенные иными способами – в течение 3 суток после изготовления. На протяжении всего исследования препараты

хранились в шкафу без посторонних запахов и без доступа прямых солнечных лучей при стабильной относительной влажности воздуха $60 \pm 5,0$ %.

Препараты для иммуногистохимического исследования были сфотографированы при помощи того же микроскопа и камеры Axioscam 305 color (5 мегапикселей, размер пикселя $3,45 \times 3,45$ мкм) с сохранением микрофотографий в интерфейсе программного обеспечения Zen 3.10 (Carl Zeiss, Германия). Для изготовления репрезентативных снимков при анализе качественных характеристик изготавливались полномасштабные оцифрованные изображения головного мозга на слайд-сканере (Precipoint M8, Германия).

Учитывая выбор целевых областей коры в больших полушариях головного мозга при обзоре литературных источников, на микрофотографиях были изучены участки корональных срезов, относящиеся к поясной (цингулярной) коре I (Cg1) по классификации Paxinos и Franklin или к дорсальной части поясной (цингулярной) коры (ACAd) по классификации Allen согласно соответствующим стереотаксическим атласам [187, 193]. Ведущей в терминологии, принятой в настоящей работе, является классификация по Paxinos и Franklin.

Зоны изокортекса Cg1 / ACAd у мышей соответствуют цитоархитектоническим полям Бродмана 24, 25 и 32 у человека [75]. Для иммуногистохимического исследования маркеров нейроглии также учитывались участки изокортекса, непосредственно примыкающие к Cg1. Конкретнее, при ферментативном окрашивании, помимо поясной (цингулярной) коры больших полушарий головного мозга, была изучена передняя ретроспленальная кора (aRSC), достаточно однородная с Cg1 по составу глиальных популяций [188], а для флуоресцентного исследования с антителами к ФНО- α – примыкающая непосредственно к передней поясной коре в передней части изокортекса прелимбическая кора (PLC). Для стереотаксического исследования изучали участки первичной и вторичной моторной коры (M1 и M2).

Для количественной оценки каждого показателя в экспериментах было учтено 12 срезов на 1 животное. Подсчет клеток производился во всех пластинках (слоях) коры больших полушарий головного мозга. Фотографирование препаратов

головного мозга для подсчета количества клеток с положительной реакцией к маркеру NeuN выполнялось в режиме световой микроскопии для обнаружения элементов, окрашенных ДАБ, или в режиме флуоресцентной микроскопии при длине световой волны в диапазоне 540-620 нм при 10-кратном увеличении объектива. Для ИФ исследования была учтена также аутофлуоресценция отдельных структур с использованием соответствующего фильтра микроскопа.

Подсчет выполнялся при помощи программного обеспечения для машинного обучения (нейросети) с открытым кодом QuPath 0.5.0 (Королевский Университет Белфаста, Северная Ирландия, Соединенное Королевство) [164, 172]. Выявленные участки с интенсивностью окрашивания выше заданного порога были учтены в качестве ядер NeuN⁺ клеток. Проводилась визуальная оценка с определением клеток, обладающих морфологическими характеристиками нейрона изокортекса (форма, ядерно-цитоплазматическое соотношение, наличие и внешний вид отростков) во избежание ложноположительного результата. Итоговый результат трактовался как количество NeuN⁺ нейронов в поле зрения.

Для подсчета GFAP⁺ клеток при ферментативном окрашивании в ИГХ исследовании также использовалось 10-кратное увеличение объектива и автоматизированный метод идентификации структур с последующей ручной перепроверкой морфологии клеток (типичное для протоплазматических астроцитов расположение отростков, цитоархитектоника, близость к кровеносным сосудам), а при ИФ исследовании – 40× с подсчетом вручную. Выявленные значения расценивались как количество GFAP⁺ астроцитов в поле зрения.

Для экспрессии маркера Iba1 при ИГХ исследовании микрофотографии были получены при 40-кратном увеличении объектива и с последующим автоматизированным подсчетом зон цитоплазмы, имеющих достаточную интенсивность окрашивания. Были учтены участки клеток с морфологическими характеристиками микроглиоцитов (частое расположение отростков, локализация в пластинках изокортекса). Результаты подсчета трактовались как количество Iba1⁺ участков цитоплазмы микроглиоцитов.

Данный вариант подсчета для ИГХ исследования был выбран, поскольку Iba1 в пилотном эксперименте неравномерно распределялся по клеткам при ферментативном окрашивании, в отличие от флуоресцентного. Поэтому для ИФ исследования Iba1⁺ клетки микроглии учитывались при подсчете вручную на микрофотографиях, выполненных также при увеличении объектива 40×.

Также для микрофотографий препаратов, окрашенных антителами к ФНО- α или каспазе-3 и сфотографированных при 10-кратном увеличении объектива, была выполнена оценка морфофункциональных характеристик. Для этого площадь препарата подсчитана в соответствии с общепринятой методикой [164]. Микрофотография препарата, окрашенного TRITC, сохранялась в 24-битном режиме цветовой модели RGB (8 бит на каждую из трех цифровых составляющих), после чего конвертировалась в цветовую модель HSB, что позволяло получить значение яркости для каждого пикселя микрофотографии. В качестве порогового значения принималось среднее наиболее крупного участка микрофотографии, определялся процент площади микрофотографии, имеющей показатель яркости выше порогового значения, по отношению к общей площади микрофотографии.

Белок ФНО- α реагирует с антителами к нему в основном после выделения из клеток, поэтому площадь препарата с ФНО- α ⁺ реакцией расценивалась как показатель экспрессии белка ФНО- α в межклеточном веществе. Фермент каспаза-3 преимущественно находится в цитоплазме клеток, в связи с чем площадь срезов, окрашенных антителами к каспазе-3, расценивалась как показатель экспрессии этого белка в клетках. Для микрофотографий препаратов с расчетом площади надпорогового окрашивания не учитывались данные для структур вне коры (например, в мягкой мозговой оболочке, прилежащих областях гиппокампа, кровеносных сосудах, механических артефактах).

2.3.9. Статистический анализ

Ведение учета численных данных для количественных характеристик производилось в программе Microsoft Excel 2021 (Microsoft, США). Статистическая

обработка этих данных выполнена на ЭВМ при помощи пакета программных решений OriginPro 2024 (OriginLab, США). Данные пилотного (1-го) эксперимента использовались исключительно для расчета размера выборки в последующих. В остальных экспериментах для групповых выборок средних значений показателей у каждого животного проводилась оценка характера распределения исходя из количества животных, выполненная при помощи критерия Шапиро-Уилка.

Во 2-м, 4-м и 5-м экспериментах выборки имели нормальный характер распределения. Число сравнений между отдельными группами заранее не планировалось. Для межгруппового анализа при трех и четырех сравниваемых выборках применялся однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), а апостериорное сравнение выборок выполнялось по критерию Тьюки с учетом равного размера выборок в группах. При наличии только двух выборок с нормальным распределением сравнение производилось по *t*-критерию Стьюдента.

В 3-м эксперименте выборки имели характер распределения, отличный от нормального, в связи с чем выборки сравнивались по U-критерию Манна-Уитни с верификацией по критерию Краскела-Уоллиса и апостериорным сравнением по Данну. Уровень статистической значимости *p* для всех экспериментов и характеристик расценивался как достоверный при $p < 0,05$. Во всех экспериментах проводился перерасчет статистической мощности после сравнения выборок во избежание отклонения от изначальных целевых значений пилотного эксперимента.

Выборки с нормальным характером распределения представлены в виде средних арифметических значений со стандартной ошибкой среднего ($M \pm SE$), выборки с иным характером распределения – в виде медианных значений и межквартильного размаха между 25-м и 75-м перцентилями – $Me (25L; 75U)$.

2.3.10. Выводы по методам исследования

Таким образом, материал и методы исследования адекватны цели и задачам работы. Количество животных достаточно для постановки экспериментов и позволяет делать выводы о наличии или отсутствии изучаемых эффектов и явлений.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Изменения нейронов при внутрибрюшинном введении липополисахарида

При макроскопическом исследовании головного мозга мышей в ходе забора органов выявлены единичные гемorragии в коре больших полушарий у всех животных с внутрибрюшинным введением эшерихиозного ЛПС. Дистрофических изменений или кальцинатов при вырезке биоматериала не обнаружено.

На препаратах головного мозга, окрашенных гематоксилином и эозином, а также толуидиновым синим по Нисслю, сохранна нормальная цито- и миелоархитектоника поясной, ретроспленальной и прелимбической коры в изокортексе. При этом отмечены морфологические изменения у мышей с введением ЛПС по сравнению с контрольными животными (рисунок 1) [3, 184].

Так, при гистологическом исследовании во всех экспериментах и группах с введением ЛПС отмечены пикнотические изменения в части нейронов II–VI пластинок (слоев): сморщивание, иногда сегментация ядер. У отдельных нервных клеток выявлены гидропические изменения: вакуолизация цитоплазмы, реже ядер. У многих нейронов отмечен перицеллюлярный отек, в единичных случаях на препаратах головного мозга у мышей с введением физиологического раствора. Кроме того, на препаратах изокортекса у мышей, получавших инъекции ЛПС, отмечена гиперхромность отдельных ядер и просветление цитоплазмы, т. е. явления кариоцитолита. На рисунке 1 пикнотические и гиперхромные изменения, лучше визуализируемые при окрашивании толуидиновым синим по методу Ниссля, обозначены красными стрелками; гидропические изменения и перицеллюлярный отек – черными стрелками.

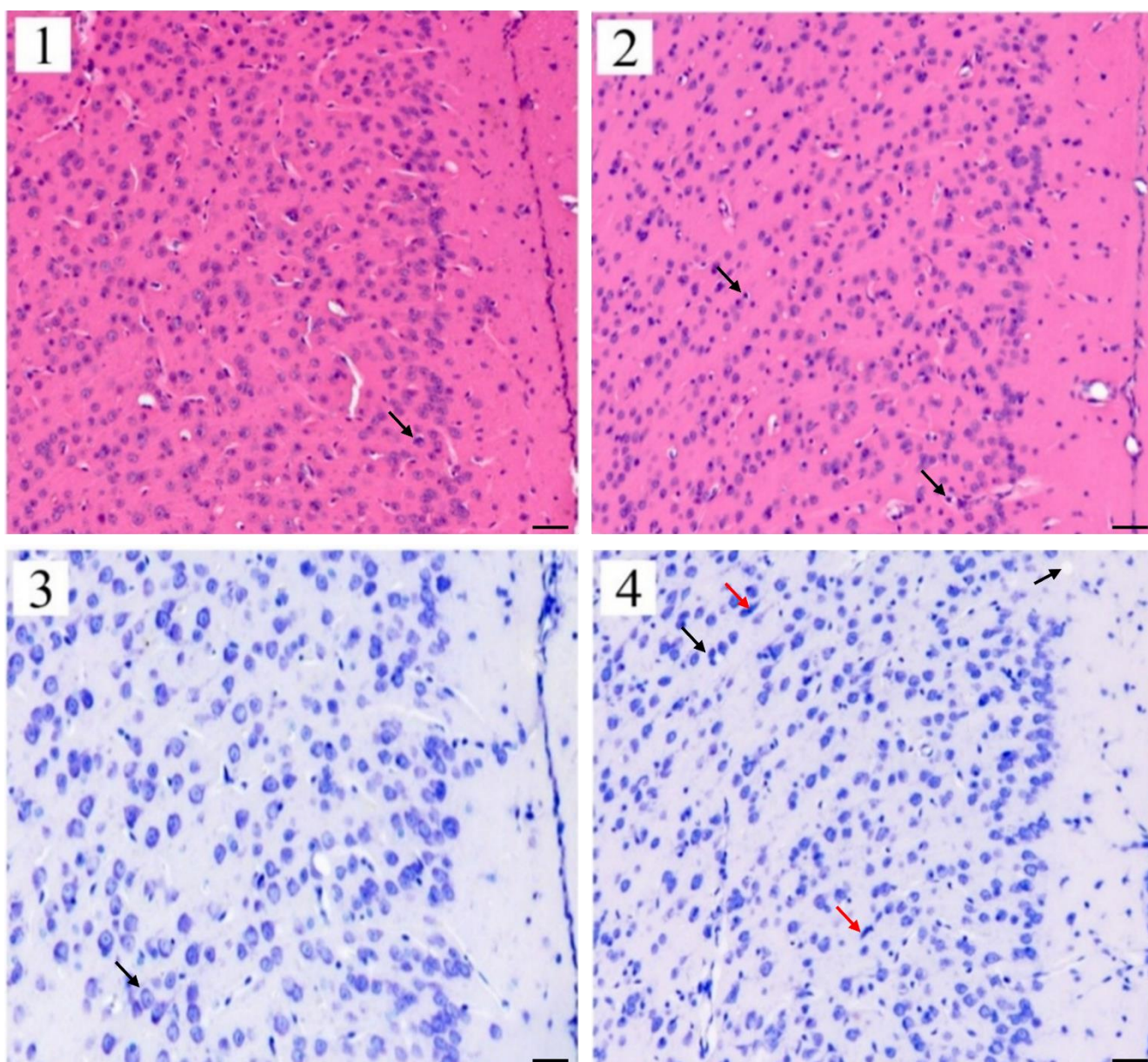


Рисунок 1 – Участки микрофотографий фрагментов поясной коры (Cg1) в изокортексе у мышей при внутрибрюшинном введении липополисахарида. Окрашивание гематоксилином и эозином (шкала 100 мкм, об. $\times 20$), толуидиновым синим по Нисслю (шкала 50 мкм, об. $\times 40$): (1) и (3) введение физиологического раствора; (2) и (4) введение ЛПС в дозе 1 мг/кг массы тела. Черные стрелки: пикнотические и гиперхромные изменения, красные стрелки: гидропические изменения и перицеллюлярный отек

В исследовании не отмечены тяжелые или характерные для ишемии изменения морфологических характеристик нейронов при введении ЛПС. Зон пенумбры не отмечено. Дистрофические явления не обнаружены, в том числе по жировому и пигментному типу. Периваскулярные пространства около артериол, венул и капилляров на препаратах не расширены, эндотелиальные клетки

сохранны, без морфологических признаков повреждения. Лимфоцитарной инфильтрации в изокортексе не отмечено.

На некоторых препаратах выявлено близкое расположение групп глиальных клеток и нейронов в V и VI пластинках (слоях) поясной коры, однако без признаков нейрофагии клетками микроглии и без явлений сателлитоза. Также на препаратах видны единичные разрывы в области аксонального холмика, которые могут быть как артефактами, так и редкими случаями сармоптоза, т. е. аксональной деградации.

Результаты исследования с ферментативным окрашиванием к NeuN представлены в таблице 4 [3]. Количество NeuN⁺ нейронов в поясной коре у мышей при введении ЛПС в течение 4 суток дозозависимо снижается. Доза 0,5 мг/кг массы тела находится на пограничном значении статистической значимости ($p = 0,043$), а для доз 1 мг/кг и 2 мг/кг массы тела в сутки статистическая значимость позволяет считать различия с контрольной группой достоверными. Статистическая мощность сравнения выборок составляет 0,98, что выше величины целевой статистической мощности (80 %) и подтверждает адекватность эффективного размера выборки.

Таблица 4 – Количество NeuN⁺ нейронов в поясной коре (Cg1) у мышей при ферментативном окрашивании, $M \pm SE$, $n = 12$ ($p \leq 0,05$)

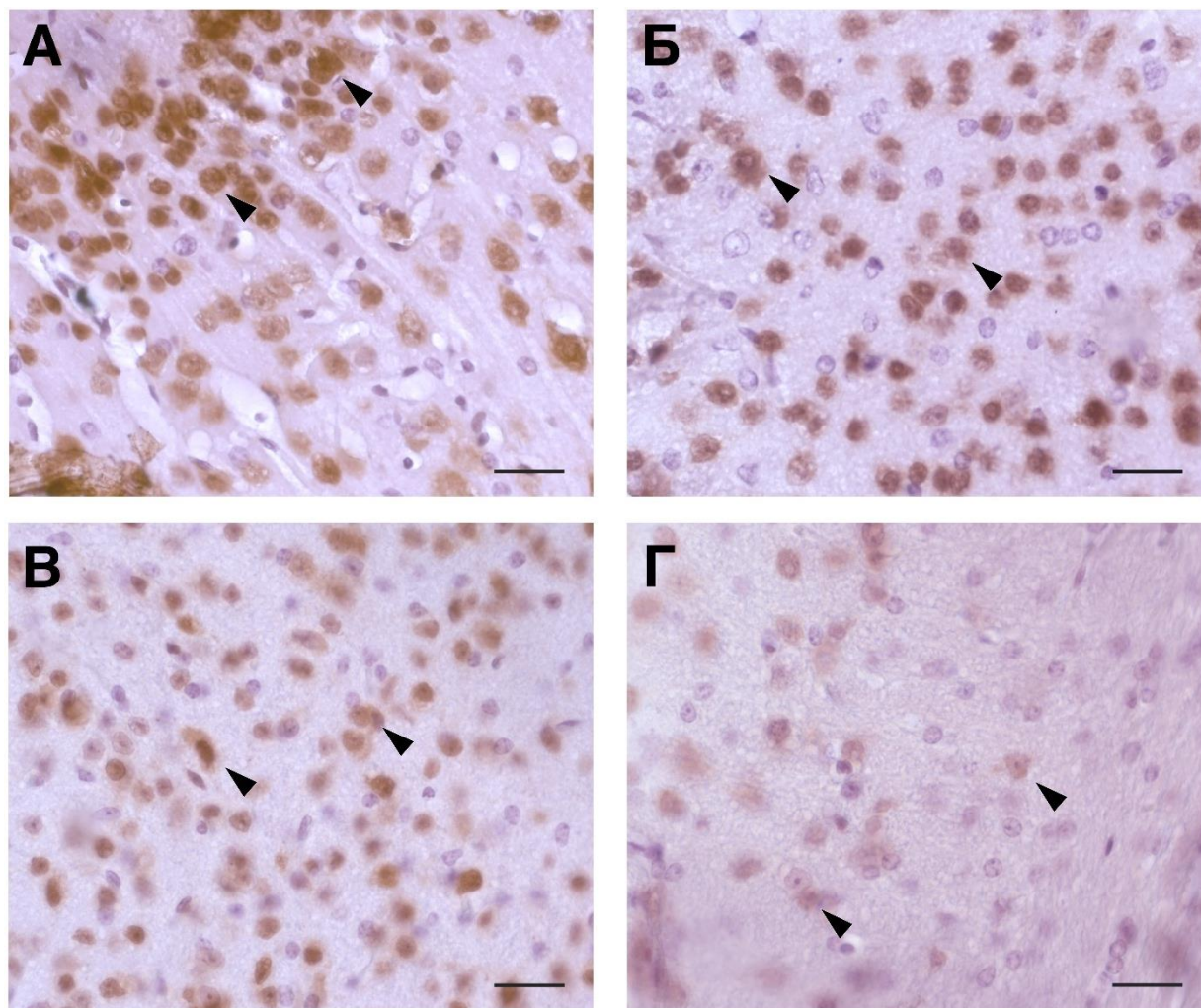
Группа сравнения	Количество NeuN ⁺ нейронов		Значение p^*
	В поле зрения (об. 10)	На 1 мм ²	
Физиологический раствор (контрольная группа)	3594,8 ± 207,63	9985,6 ± 576,75	н/п
ЛПС 0,5 мг/кг массы тела	2961,7 ± 121,3	8226,9 ± 336,94	0,043
ЛПС 1 мг/кг массы тела	2840,2 ± 76,26	7889,4 ± 211,83	0,0112
ЛПС 2 мг/кг массы тела	2534,3 ± 208,95	7039,7 ± 580,42	0,0002

Примечание: * – статистически значимы различия между всеми группами с введением ЛПС и контрольной группой; н/п – не применимо

Для выявления количества клеток с положительной реакцией антител к NeuN проведено также флуоресцентное окрашивание срезов головного мозга для мышей контрольной группы и группы с введением ЛПС в дозе 1 мг/кг массы тела в сутки (таблица 5) [3]. В обеих выборках в поясной коре определяется значительное количество NeuN⁺ нейронов. Различия между группами не значимы статистически.

Таблица 5 – Количество NeuN⁺ нейронов в поясной коре (Cg1) у мышей при флуоресцентном окрашивании, $M \pm SE$, $n = 6$ ($p \leq 0,05$)

Группа сравнения	Количество NeuN ⁺ нейронов		Значение p
	В поле зрения (об. 10)	На 1 мм ²	
Физиологический раствор (контрольная группа)	$184,6 \pm 14,79$	$512,8 \pm 41,08$	0,7
ЛПС 1 мг/кг массы тела	$192,6 \pm 15,54$	$535,0 \pm 320,94$	



NeuN Н

Рисунок 2 – Микрофотографии фрагментов поясной коры (Cg1) в изокортексе у мышей при внутривенном введении липополисахарида. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к NeuN: (А) физиологический раствор; (Б) липополисахарид в дозе 0,5 мг/кг массы тела; (В) липополисахарид в дозе 1 мг/кг массы тела; (Г) липополисахарид в дозе 2 мг/кг массы тела. Размер шкалы: 100 мкм, об. $\times 10$. Н – гематоксилин Карazzi. Стрелками обозначены нейроны с реакцией между 3,3'-диаминобензидином и пероксидазой хрена

Уменьшение количества нейронов при ИГХ окрашивании антителами к NeuN хорошо различимо на рисунке 2. Как и при гистохимическом окрашивании, здесь видны пикнотические изменения в нервных клетках.

Вместе с тем значительное сморщивание ядер нейронов видно и для иммунофлуоресцентной реакции, несмотря на отсутствие различий между группами по количеству окрашенных клеток (рисунок 3).

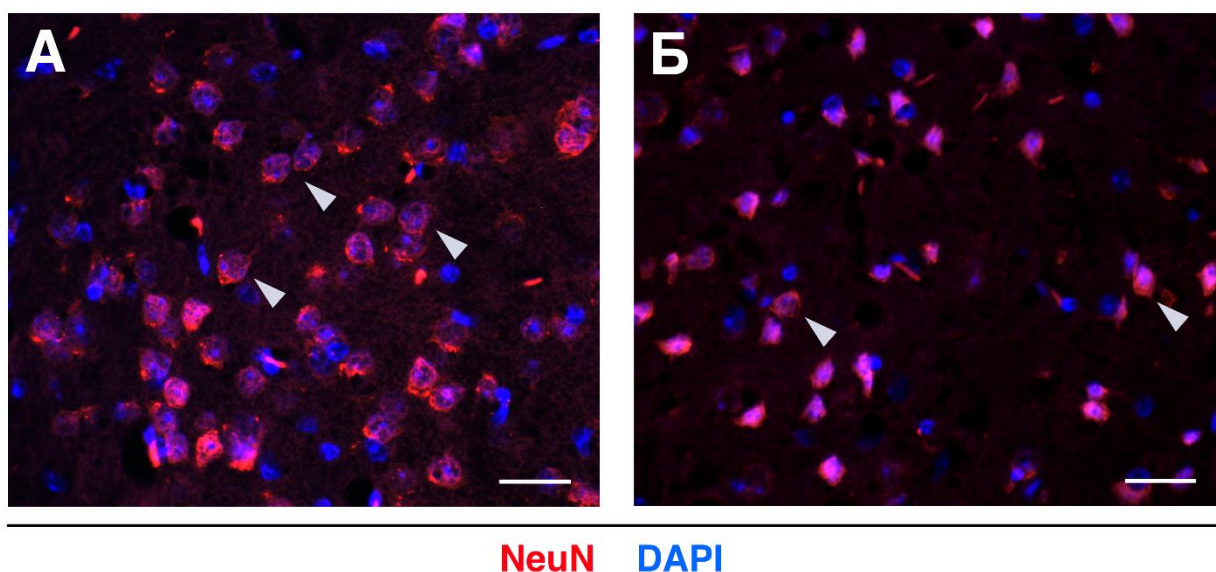


Рисунок 3 – Микрофотографии фрагментов поясной коры (Cg1) в изокортексе у мышей при внутрибрюшинном введении липополисахарида. Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к NeuN: (А) физиологический раствор; (Б) липополисахарид в дозе 1 мг/кг массы тела. Размер шкалы: 100 мкм, об. $\times 10$. Обозначены нейроны, флуоресцирующие в спектре излучения 620 нм

Таким образом, в нейронах изокортекса у мышей при внутрибрюшинном введении ЛПС в дозах 0,5 мг/кг, 1 мг/кг и 2 мг/кг массы тела животных выявлены такие морфологические изменения, как кариопикноз, гидропические явления и перичеллюлярный отек. Иммуногистохимическое исследование с подсчетом количества NeuN-положительных нейронов показало дозозависимое снижение данного показателя по мере увеличения дозы ЛПС, при этом режим дозирования, выбранный основным в настоящем исследовании, 1 мг/кг массы тела, обеспечил наименьшую эффективную дозу ЛПС при уровне статистической значимости значительно меньше 0,05.

3.2. Активация нейроглии при внутрибрюшинном введении липополисахарида

Подсчет количества активированных (GFAP⁺) астроцитов в поясной и ретроспленальной коре у мышей при ферментативном окрашивании (таблица 6) [13, 21] показал, что их количество при введении ЛПС повышается по сравнению с контрольной группой с высоким уровнем статистической значимости. Обращает на себя внимание характер распределения, отличный от нормального, а также большой разброс данных в пределах выборки.

Таблица 6 – Количество GFAP⁺ астроцитов в поясной (Cg1) и передней ретроспленальной (aRSC) коре у мышей при ферментативном окрашивании, Me (25L; 75U), n = 10 (p ≤ 0,05)

Группа сравнения	Количество GFAP ⁺ астроцитов	Значение p
Физиологический раствор (контрольная группа)	9,0 (4,3; 17,0)	0,0038
ЛПС 1 мг/кг массы тела	22,5 (8,0; 32,0)	

Вместе с тем нормальное распределение продемонстрировано при оценке количества GFAP⁺ астроцитов отдельно в поясной коре без ретроспленальной при повторе того же эксперимента, но с флуоресцентным иммуногистохимическим окрашиванием (таблица 7) [12]. Более того, значение p в данном случае еще меньше, что увеличивает статистическую значимость.

Таблица 7 – Количество GFAP⁺ астроцитов в поясной коре (Cg1) у мышей при флуоресцентном окрашивании, M ± SE, n = 10 (p ≤ 0,05)

Группа сравнения	Количество GFAP ⁺ астроцитов	Значение p
Физиологический раствор (контрольная группа)	2,0 ± 0,44	0,0000077
ЛПС 1 мг/кг массы тела	9,0 ± 1,38	

Астроциты в V и VI пластинках (слоях) поясной коры показаны на рисунках 4 и 5. Активация цитоскелета, в котором у астроцитов находится GFAP, происходит не только в телах, но и практически во всех отростках клеток. Кроме того, во всех случаях отростки этих астроцитов контактируют более, чем с одним нейроном.

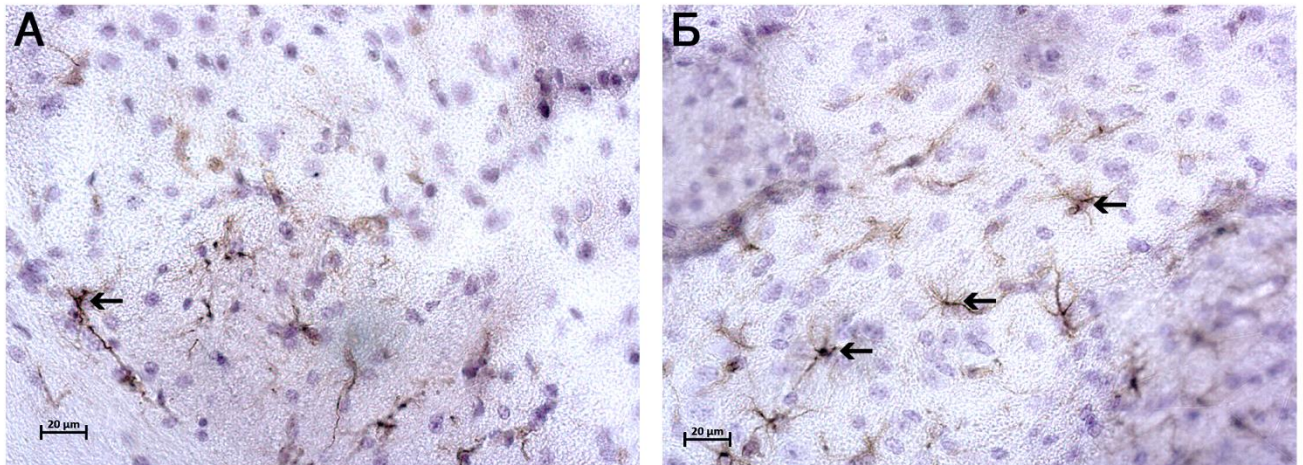


Рисунок 4 – Микрофотографии фрагментов поясной коры (Cg1) в изокортексе у мышей при внутривенном введении липополисахарида. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к GFAP: (А) физиологический раствор; (Б) липополисахарид в дозе 1 мг/кг массы тела. Об. $\times 40$. Стрелками обозначены астроциты с положительной реакцией между 3,3'-диаминобензидином и пероксидазой хрена

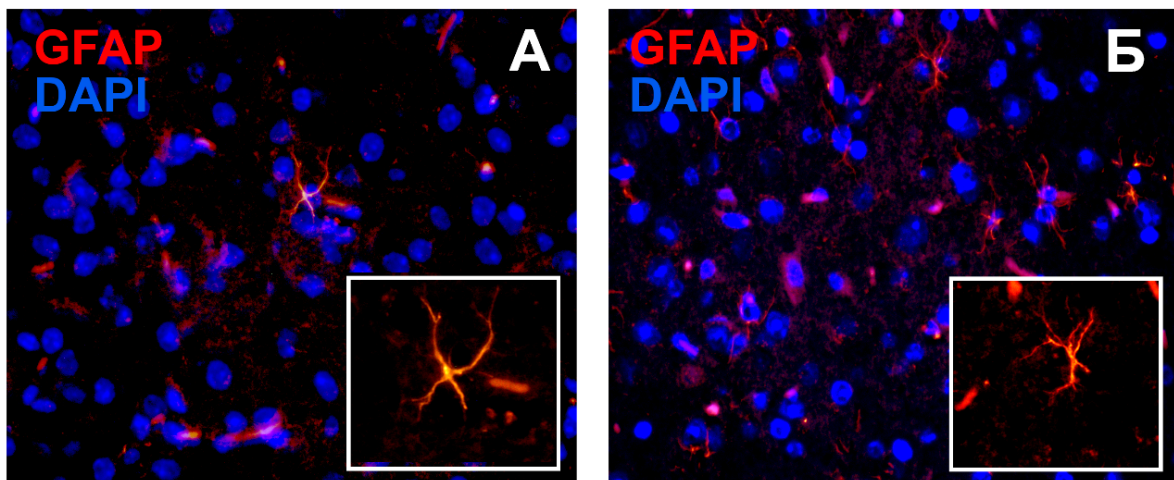


Рисунок 5 – Микрофотографии фрагментов поясной коры (Cg1) в изокортексе у мышей при внутривенном введении липополисахарида. Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к GFAP; участки коры головного мозга у мышей, которым вводили: (А) физиологический раствор; (Б) липополисахарид в дозе 1 мг/кг массы тела. Об. $\times 40$. В правом нижнем углу каждой микрофотографии – окрашенный GFAP⁺ астроцит

Экспрессия маркера Iba1, которая, как показано при обзоре литературных источников, увеличивается у реактивной микроглии, оценивалась по количеству Iba1-положительных участков и Iba1-положительных клеток. Продемонстрирован рост числа Iba1-положительных участков у животных, получавших введения ЛПС (таблица 8) [21].

Таблица 8 – Количество участков Iba1⁺ микроглиоцитов в поясной (Cg1) и ретроспленальной (aRSC) коре у мышей при ферментативном окрашивании, Me (25L; 75U), $n = 10$ ($p \leq 0,05$)

Группа сравнения	Количество Iba1 ⁺ участков микроглиоцитов	Значение p
Физиологический раствор (контрольная группа)	128 (89,3;165,5)	0,014
ЛПС 1 мг/кг массы тела	207,5 (154,8; 295,8)	

Поэтому изучение количества участков микроглиоцитов с экспрессией Iba1 было повторено для других доз ЛПС, но только для поясной коры без ретроспленальной (таблица 9) [19]. Продемонстрировано увеличение этого показателя у животных, получавших его из расчета 2 мг/кг массы тела.

Таблица 9 – Количество участков Iba1⁺ микроглиоцитов в поясной коре (Cg1) у мышей при ферментативном окрашивании, $M \pm SE$, $n = 15$ ($p \leq 0,05$)

Группа сравнения	Количество Iba1 ⁺ участков микроглиоцитов
Физиологический раствор (контрольная группа)	159,8 ± 14,11
ЛПС 0,5 мг/кг массы тела	313,9 ± 20,37
ЛПС 2 мг/кг массы тела	431,6 ± 92,73*
Примечание: * – различия с контрольной группой статистически значимы	

Также определено количество Iba1⁺ клеток, окрашенных флуорохромом, в поясной коре больших полушарий головного мозга при внутрибрюшинном введении эшерихиозного ЛПС в дозе 1 мг/кг массы тела животного. Выявлено увеличение экспрессии маркера Iba1 при данном режиме дозирования (таблица 10) [12]. Различия статистически значимы при нормальном распределении.

Таблица 10 – Количество Iba1⁺ клеток микроглии в поясной коре (Cg1) у мышей при флуоресцентном окрашивании, $M \pm SE$, $n = 10$ ($p \leq 0,05$)

Группа сравнения	Количество Iba ⁺ микроглиоцитов	Значение p
Физиологический раствор (контрольная группа)	4,75 ± 0,97	p = 0,03
ЛПС 1 мг/кг массы тела	9,5 ± 1,80	

Микрофотографии, на которых визуализируются IV, V и VI пластинки (слои) поясной коры при ферментативном окрашивании к Iba1, приведены на рисунке 6. Отростки в клетках микроглии различимы слабо.

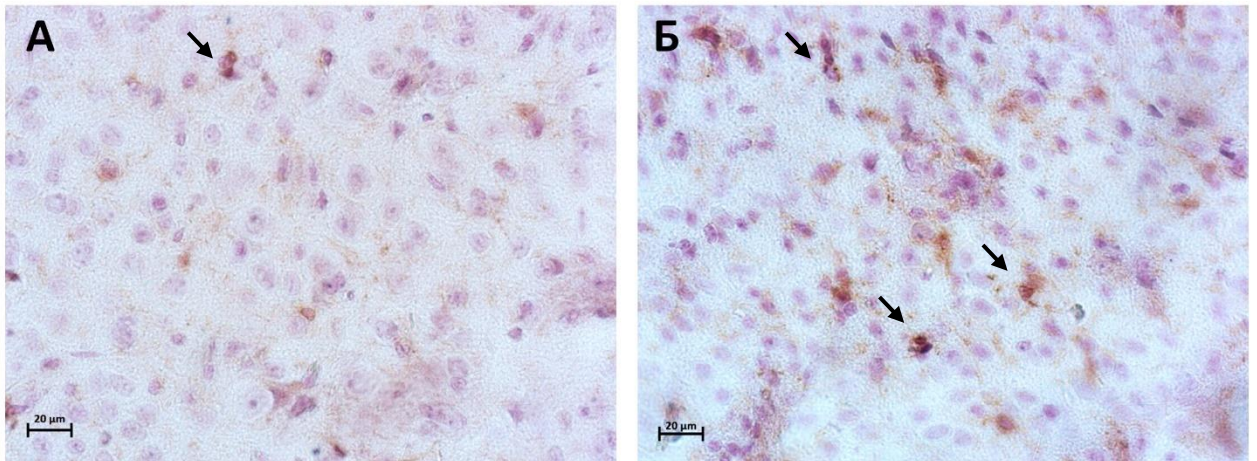


Рисунок 6 – Микрофотографии фрагментов поясной коры (Cg1) в изокортексе у мышей при внутрибрюшинном введении липополисахарида. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к Iba1; участки коры головного мозга у мышей, которым вводили: (А) физиологический раствор; (Б) липополисахарид в дозе 1 мг/кг массы тела. Об. $\times 40$. Клетки микроглии коричневого цвета, обозначены стрелками

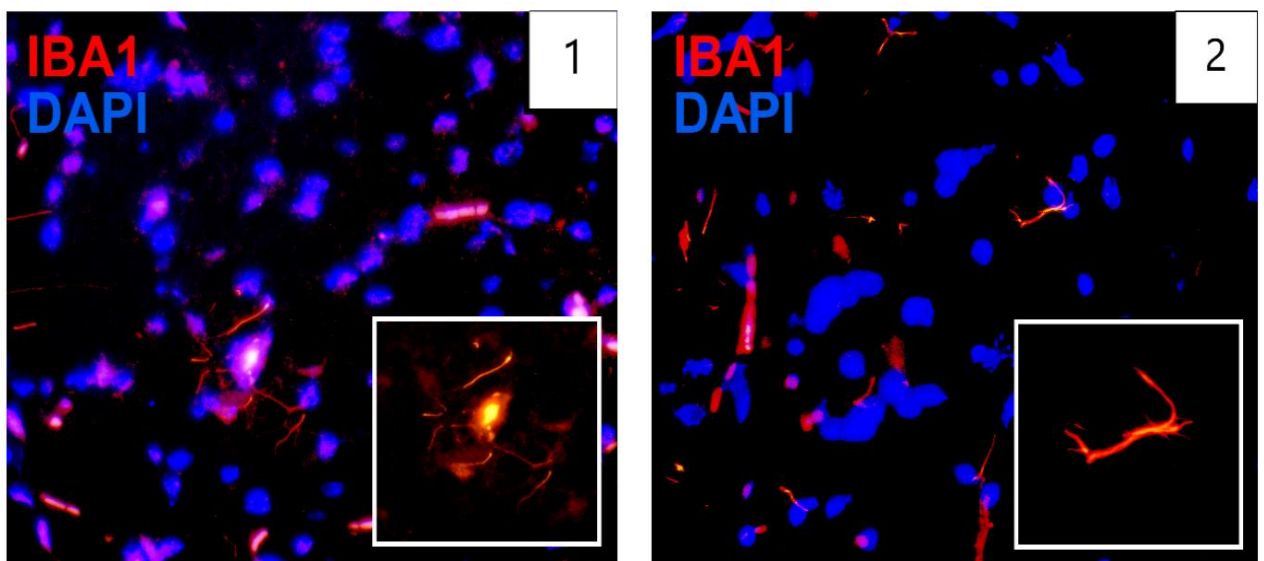


Рисунок 7 – Микрофотографии фрагментов поясной коры (Cg1) в изокортексе у мышей при внутрибрюшинном введении липополисахарида. Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к Iba1: (1) физиологический раствор; (2) липополисахарид в дозе 1 мг/кг массы тела. Об. $\times 10$. В правом нижнем углу каждой микрофотографии – окрашенный флуорохромом микроглиоцит

На рисунке 7 на микрофотографиях поясной коры при флуоресцентном окрашивании к Iba1 отростки микроглиоцитов видны, и окрашивание к Iba1 более равномерное. Высокий уровень аутофлуоресценции характерен для маркера Iba1 по

сравнению с флуоресцентным окрашиванием антителами к NeuN и GFAP в этом же исследовании (аутофлуоресцирующие клетки не учитывались).

Помимо этого, изучены количественные характеристики, демонстрирующие функциональные изменения в нейроглии в ответ на введение ЛПС, т. е. уровни ФНО- α и каспазы-3. Площадь поля зрения, окрашенного антителами к ФНО- α , учитывалась отдельно для поясной и прелимбической коры, при этом для этих двух областей показан различный характер изменений (таблица 11) [9, 12]. В поясной коре площадь межклеточного вещества с положительной реакцией к ФНО- α в поле зрения при введении ЛПС статистически значимо выше, чем в контрольной группе.

Таблица 11 – Площадь поля зрения, окрашенного антителами к ФНО- α , в поясной (Cg1) и прелимбической (PLC) коре у мышей при флуоресцентном окрашивании, $M \pm SE$, $n = 10$ ($p \leq 0,05$)

Группа сравнения		Площадь ФНО- α^+ поля зрения, а. у.
Физиологический раствор (контрольная группа)	Cg1	620120,5 \pm 24302,17
	PLC	617527,1 \pm 21441,96
ЛПС 1 мг/кг массы тела	Cg1	740751,92 \pm 29563,25*
	PLC	669220,3 \pm 18127,65
Примечание: * – различия с контрольной группой статистически значимы при $p < 0,05$		

При данном способе часть аутофлуоресценции не удастся учесть и исключить из подсчета, поскольку он проводится в конвертированном режиме. Возможные искажения одинаковы для обеих групп, и во избежание их выставлены одинаковые параметры пороговой интенсивности при машинной обработке для каждой микрофотографии, а съемка проводилась при одинаковой освещенности.

Экспрессия каспазы-3 (таблица 12) [12] в цитоплазме клеток поясной коры практически не менялся. Среднее значение даже несколько ниже для выборки животных, получавших инъекции ЛПС, впрочем, без статистической значимости. Это в целом соответствует данным гистологического исследования при окраске гематоксилином-эозином и толуидиновым синим, не продемонстрировавшим погибших клеток, нейронофагии и схожих явлений.

Таблица 12 – Площадь цитоплазмы клеток, окрашенной антителами к каспазе-3, в поясной коре (Сg1) у мышей при флуоресцентном окрашивании, $M \pm SE$, $n = 10$ ($p \leq 0,05$)

Группа сравнения	Площадь каспаза-3 ⁺ цитоплазмы, а. у. (у. е.)	Значение p
Физиологический раствор (контрольная группа)	759218,3 ± 22477,84	0,09
ЛПС 1 мг/кг массы тела	663152,0 ± 49667,37	

На рисунке 8 представлены микрофотографии препаратов, окрашенных антителами к ФНО- α и каспазе-3. Отдельные клетки хорошо различимы только на контрокрашивании при помощи DAPI, при этом каспаза-3 обнаружена в основном внутри клеток, а ФНО- α – преимущественно в межклеточном веществе.

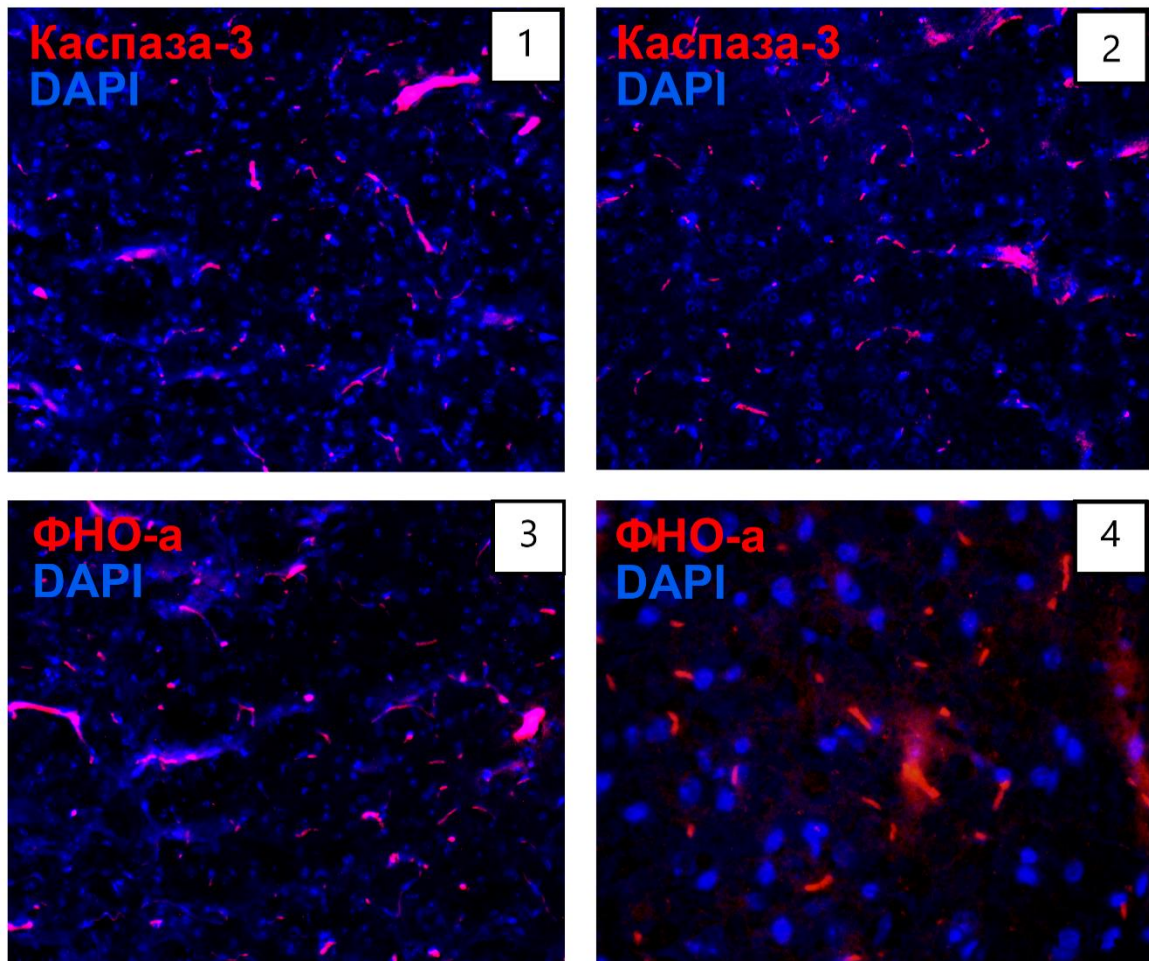


Рисунок 8 – Микрофотографии фрагментов поясной коры (Сg1) в изокортексе у мышей при введении липополисахарида. Иммунофлуоресцентное окрашивание окраска антителами к каспазе-3 и ФНО- α : (1) физиологический раствор, антитела к каспазе-3; (2) липополисахарид в дозе 1 мг/кг массы тела, антитела к каспазе-3; (3) физиологический раствор, антитела к ФНО- α ; (4) липополисахарид в дозе 1 мг/кг массы тела, антитела к ФНО- α . Об. $\times 40$

Таким образом, при иммуногистохимическом исследовании показано, что при внутрибрюшинном введении мышам эшерихиозного ЛПС в дозе 1 мг/кг массы тела в сутки в течение 4 дней повышается экспрессия маркеров GFAP и Iba1 в поясной коре, т. е. происходит активация клеток микроглии и астроцитов. Кроме того, выявлена повышенная экспрессия маркера ФНО- α в межклеточном пространстве поясной коры.

3.3. Изменения при повышенной экспрессии белков теплового шока

Стереотаксическое введение принципиально отличалось от внутрибрюшинного не только способом доставки ЛПС, но и выполнением манипуляций под наркозом с контролем физиологических показателей (рисунок 9). Данные электрокортикографических показателей и температуры тела оставались в пределах нормы на протяжении проведенных манипуляций.

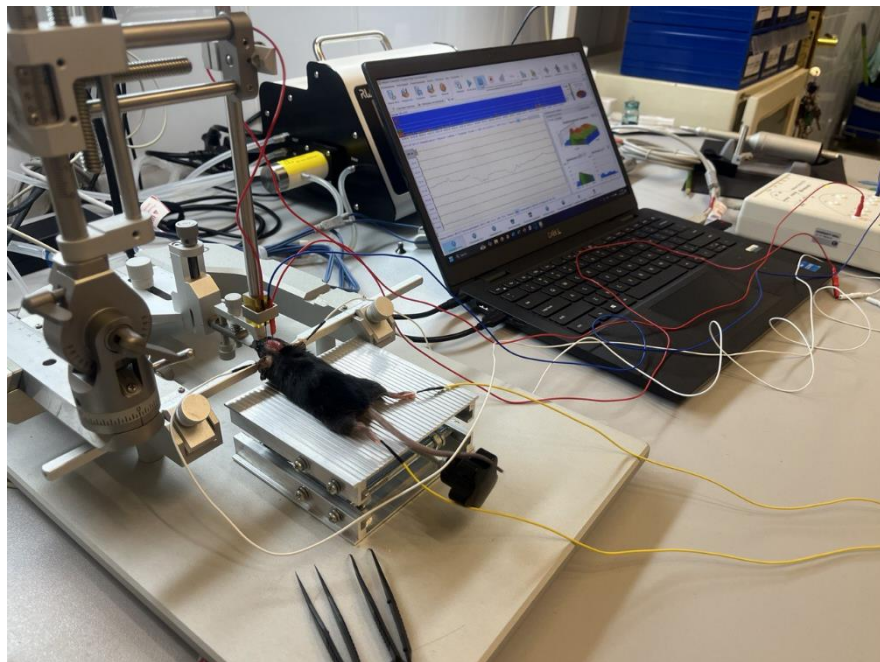


Рисунок 9 – Стереотаксическая установка, использованная для интракортикальных и внутрижелудочковых введений, с зафиксированной на ней мышью

Поскольку ключевой составляющей внутрижелудочкового и интракортикального введения является максимально точное введение действующих веществ по заданным в программно-аппаратный комплекс

координатам, верификация места введения выполнялась как в процессе манипуляции (рисунок 10), так и после нее.



Рисунок 10 – Оперативный доступ для стереотаксического введения. Скальпирован участок кожного покрова и истончена теменная кость под ним с электрокортикографическим контролем состояния мышцы

При лазерной спекл-контрастной визуализации верификация места введения (рисунок 11) проводилась за счет наблюдения за менингеальным кровотоком в области моторной коры. Как видно из фотографий, кровоток рефлекторно усиливался в месте введения ЛПС непосредственно после манипуляции по сравнению с состоянием перед ней. Перед выведением животных из эксперимента скорость кровотока в той же области значительно уменьшалась, визуально приближаясь по тепловой карте к показателям до введения.

Поскольку соответствующая динамика изменений по лазерной спекл-контрастной визуализации наблюдалась только для моторной коры у всех перенесших стереотаксические введения мышей, сделан вывод о верификации места введения по совокупности функциональных методов и допустимости выведения животных из эксперимента для гистологического исследования.

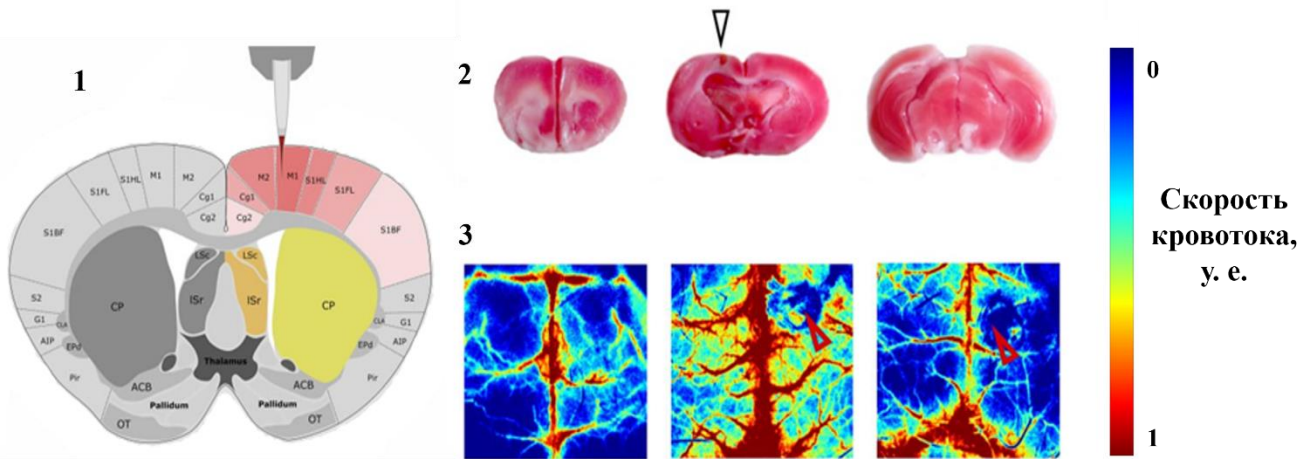


Рисунок 11 – Верификация места введения. 1 – схематичное изображение коронального среза головного мозга мыши с целевой зоной для интракортикального введения; 2 – обработка тканей головного мозга трифенилтетразолия хлоридом; 3 – лазерная спекл-контрастная визуализация в месте введения. Кровоток в области верхнего сагиттального синуса (слева) усиливается сразу же после введения липополисахарида (по центру), далее ослабевая к концу вторых суток после введения (справа). Стрелками обозначено место введения липополисахарида

Для дополнительной верификации пригодности нервной ткани изокортекса к гистологическому исследованию часть материала головного мозга, изъятая при аутопсии мыши, выдерживалась в растворе трифенилтетразолия хлорида. Значительная часть макропрепаратов головного мозга при этом была обесцвечена (рисунок 11В), т. е. сукцинатдегидрогеназа нейронов не вступила в реакцию с трифенилтетразолия хлоридом по причине ишемизации и гибели митохондрий. Выявлено, что в связи с введением стеклянного капилляра нанолитровой помпы повреждено не более четверти от объема моторной коры, из которых не производился анализ данных в рамках гистологического исследования. Это позволило считать объем механических повреждений в моторной коре несущественным для возможного искажения достоверности результатов. Соответственно, данные прижизненной визуализации и окрашивания трифенилтетразолия хлоридом позволяют учитывать качественные и количественные морфофункциональные характеристики, зарегистрированные в настоящем эксперименте, как нативные.

Далее в таблице 13 и на рисунке 12 представлены численные данные, полученные в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт», и тепловые карты, сформированные в программном обеспечении соответствующей установки.

Таблица 13 – Численные значения, использованные для построения тепловых карт в установке «приподнятый крестообразный лабиринт»; $M \pm SE$, $n = 30$

Группа сравнения	Дистанция, см	Число переходов, ед.	Доля времени в открытых отсеках, %	Число замираний, ед.	Скорость, см/с
Интактные мыши C57Bl6/J	1244 ± 247,6	66 ± 33,6	47 ± 2,9	2 ± 2,6	4 ± 0,8
C57Bl6/J, физ. раствор	1011 ± 195,2	104 ± 39,9	22 ± 9,3	1 ± 0,6	4 ± 0,9
C57Bl6/J, и/к введение ЛПС	1412 ± 353,5	80 ± 29,1	25 ± 9,0	0	5 ± 1,1
C57Bl6/J, в/ж введение ЛПС	718 ± 291,2	74 ± 21,8	22 ± 7,1	0	5 ± 1,1
HSP70 (эндо), и/к ЛПС	1136 ± 293,0	43 ± 31,1	14 ± 10,3	1 ± 0,1	4 ± 1,0
HSP70 (экзо), и/к ЛПС	843 ± 146,7	31 ± 3,8	11 ± 2,4	2 ± 1,2	3 ± 0,5

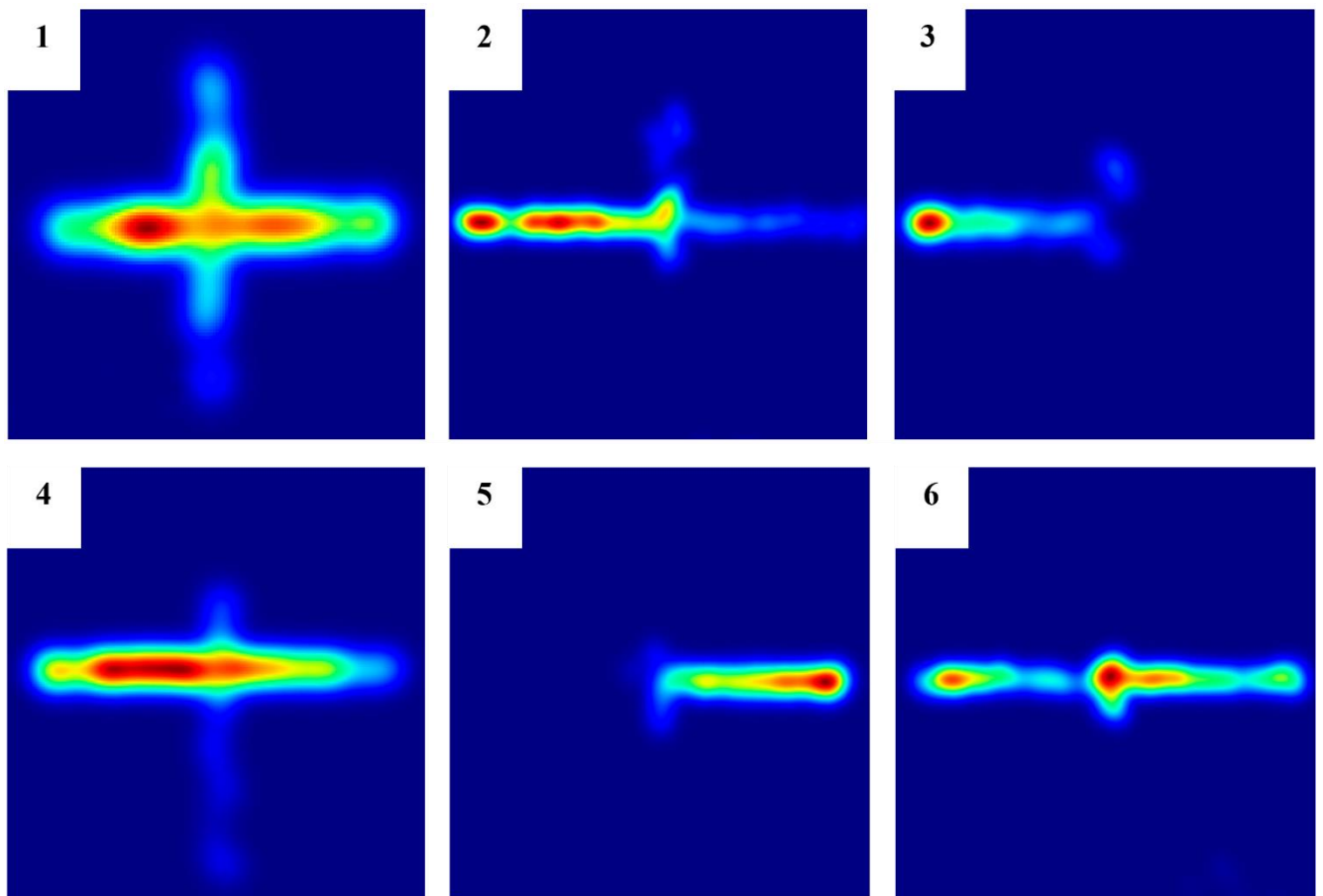


Рисунок 12 – Тепловые карты пребывания мышей в установке «приподнятый крестообразный лабиринт»: (1) интактные мыши C57Bl6/J; (2) мыши C57Bl6/J, интракортикальное введение физиологического раствора; (3) мыши C57Bl6/J, внутрижелудочковое введение ЛПС; (4) мыши C57Bl6/J, интракортикальное введение ЛПС; (5) мыши HSP70 (экзо), интракортикальное введение ЛПС; (6) мыши HSP70 (эндо), интракортикальное введение ЛПС

В установке «приподнятый крестообразный лабиринт» (рисунок 12) мыши перемещались между освещенным (вертикальный на фотографии) и затемненным (горизонтальный на фотографии) рукавами установки. Следовательно, на перемещения влиял уровень дезориентации и нарушения моторной активности. Данные для внутрижелудочкового введения не представлены как нерелевантные, поскольку только интракортикальное введение обеспечивало целевое повреждение моторной коры без искажения тестов нарушенной функцией мозжечка или гиппокампа. Остальные данные можно наблюдать в виде тепловых карт, т. е. окрашивания в более теплые цвета участков установки «приподнятый крестообразный лабиринт», где по анализу отснятого видеоматериала мышь находилась дольше (данные усреднены по всем животным одной группы).

Из рисунка 12 видно, что у мышей без стереотаксических введений перемещения происходили относительно равномерно в течение 5 минут прохождения моторного теста с незначительным доминированием затемненного рукава, что адекватно поведенческой активности здорового животного. При введении ЛПС мышам линии C57Bl/6J моторная активность не просто резко ограничивается затемненным рукавом, а (две верхних правых тепловых карты) предполагает либо доминирование одного из его отсеков, либо почти полное отсутствие перемещений.

У животных с внутриклеточной, HSP70 (эндо), и внеклеточной, HSP70 (экзо), локализацией избыточно синтезированных белков теплового шока и введениями ЛПС тепловые карты демонстрируют отсутствие доминантного участка установки, хотя геометрия их перемещений не настолько равномерна, как у мышей, вообще не получивших стереотаксических введений.

Далее в таблице 14 и на рисунке 13 представлены численные данные, полученные в тесте «открытое поле», и тепловые карты, сформированные в программном обеспечении соответствующей установки.

Таблица 14 – Численные значения параметров, использованные для построения тепловых карт в установке «открытое поле»; $M \pm SE$, $n = 30$

Группа сравнения	Дистанция, см	Число переходов, ед.	Время остановок, с	Число остановок, ед.	Скорость, см/с
Интактные мыши C57Bl6/J	2316 ± 150,9	93 ± 6,2	1,8 ± 1,61	1	9,6 ± 0,83
C57Bl6/J, физ. раствор	1536 ± 255,7	39 ± 5,0	1,0 ± 1,56	3	7,5 ± 0,55
C57Bl6/J, и/к введение ЛПС	2209 ± 624,4	63 ± 14,1	2,2 ± 2,06	2	9,5 ± 2,28
C57Bl6/J, в/ж введение ЛПС	1689 ± 164,3	48 ± 34,6	2,3 ± 1,96	2,3	9,4 ± 1,50
HSP70 (эндо), и/к введение ЛПС	2040 ± 363,0	49 ± 13,9	2,8 ± 0,64	3,3	9,1 ± 1,56
HSP70 (экзо), и/к введение ЛПС	1421,3 ± 173,8	18 ± 6,2	2,9 ± 0,95	3,7	6,8 ± 0,38

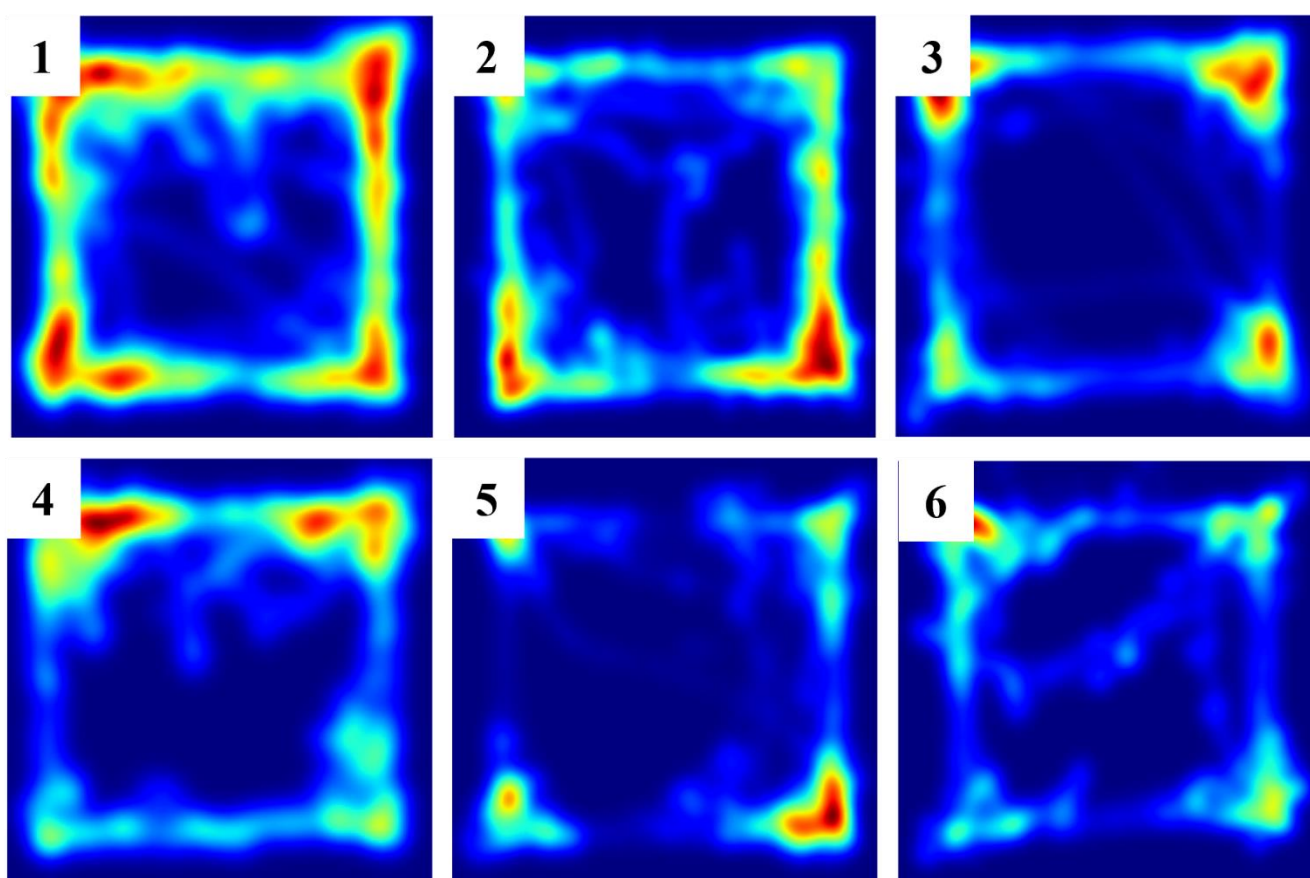


Рисунок 13 – Тепловые карты пребывания мышей в установке «открытое поле»: (1) интактные мыши C57Bl6/J; (2) мыши C57Bl6/J, интракортикальное введение физиологического раствора; (3) мыши C57Bl6/J, внутрижелудочковое введение ЛПС; (4) мыши C57Bl6/J, интракортикальное введение ЛПС; (5) мыши HSP70 (экзо), интракортикальное введение ЛПС; (6) мыши HSP70 (эндо), интракортикальное введение ЛПС

В случае с установкой «открытое поле» мышь может свободно перемещаться по квадратному участку, у которого сильнее освещена центральная зона. В данном

случае визуально прослеживаются различия между интактными группами и группами со стереотаксическим введением. Тем не менее динамика моторной активности у трансгенных мышей с избытком HSP70 выражена не так явно, как для теста «приподнятый крестообразный лабиринт».

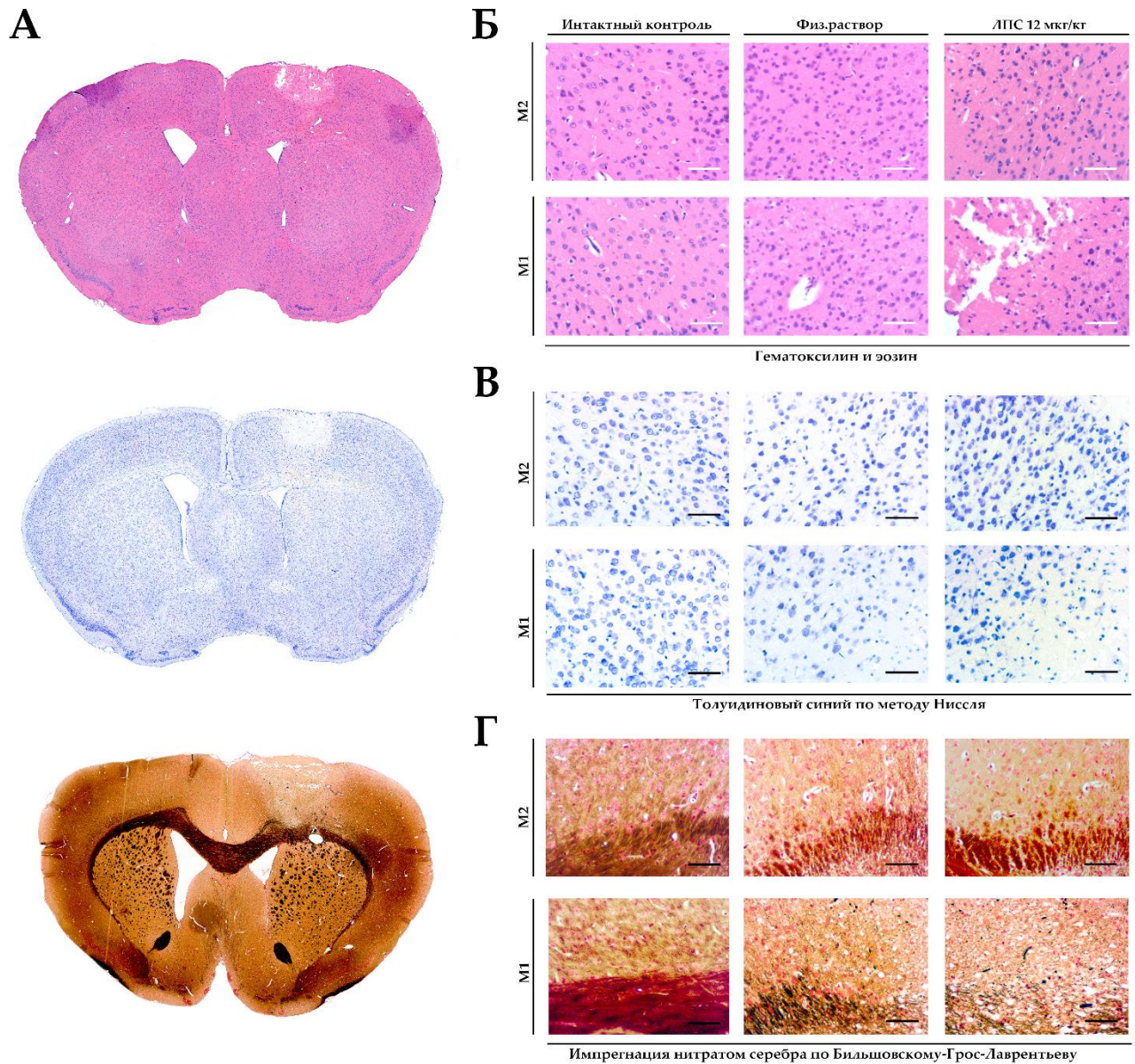


Рисунок 14 – Гистохимическая визуализация изокортекса у мышей после интракортикального введения липополисахарида; (А): гистосканы корональных срезов головного мозга; фрагменты моторной коры мышей, увеличение объектива $\times 40$: (Б) окрашивание гематоксилином и эозином; (В) окрашивание толуидиновым синим по Нисслю; (Г) импрегнация серебром по Бильшовскому-Грос-Лаврентьеву

Выполнено также гистологическое исследование соответствующих препаратов. На рисунке 14 изображены гистосканы и препараты головного мозга мышей, иллюстрирующих выполнение третьей задачи, а именно для групп интактных животных, с интракортикальным введением 0,9 % раствора NaCl или ЛПС в дозе 12 мкг/кг массы тела.

При изучении качественных изменений в изокортексе во всех группах не обнаружено лейкоцитарной инфильтрации. На препаратах головного мозга после стереотаксических введений липополисахарида отмечено расширение желудочков. При окраске гематоксилином и эозином, толуидиновым синим и импрегнации серебром по Бильшовскому-Грос-Лаврентьеву в группах с введением NaCl раствора 0,9 % и ЛПС отмечены пикнотичность ядер и перичеселлюлярный отек, в т. ч. в моторной коре (M1 и M2 по G. Paxinos [183]). У животных с введением физиологического раствора эти явления выражены гораздо слабее.

Данные качественные характеристики не подлежат сравнению. Количественные результаты приведены ниже, т. к. в рамках 5-го эксперимента их подсчет проводился вместе с морфометрическим исследованием для препаратов групп животных с введением ЛПС и избытком HSP70.

Далее (рисунки 15, 16 и 17) приведены микрофотографии, иллюстрирующие ИФ исследование по маркерам NeuN [184], GFAP и SOX9 для групп интактных животных, а также мышей с интракортикальным и внутрижелудочковым введением ЛПС (все C57Bl/6J). Как видно из рисунков, экспрессия NeuN мало меняется при введении NaCl раствора 0,9 %, но резко сокращается при введении ЛПС 12 мкг/кг массы тела.

Кроме того, количество GFAP- и SOX9-положительных клеток возрастает для всех групп со стереотаксическими введениями, особенно у животных с интракортикальным введением ЛПС.

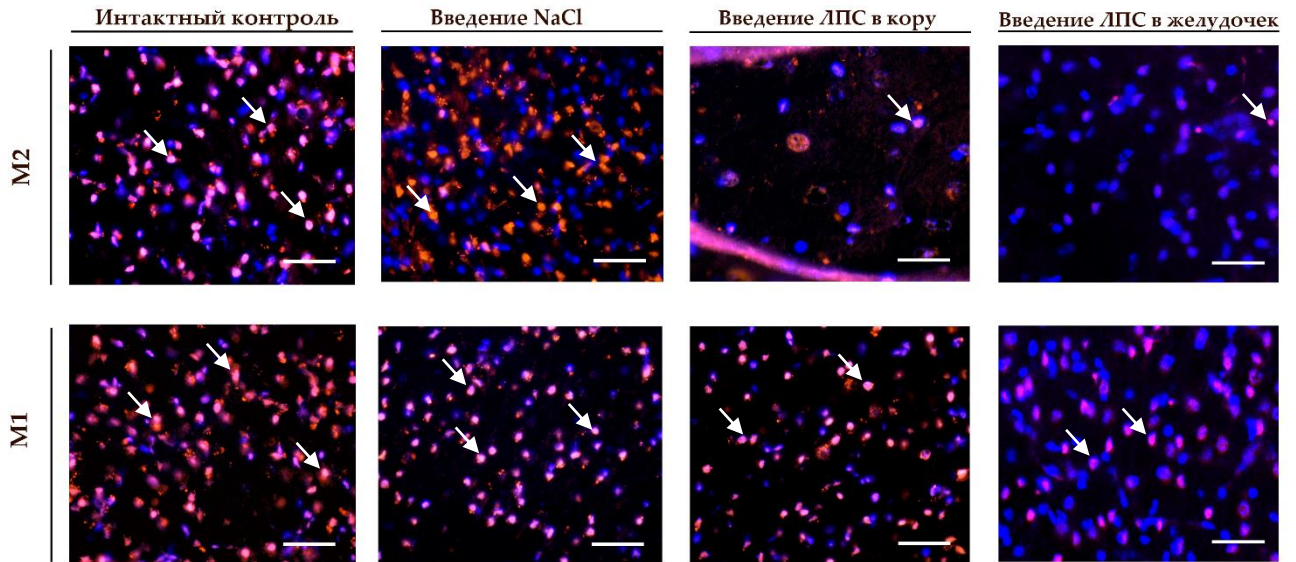


Рисунок 15 – Микрофотографии фрагментов первичной (M1) и вторичной (M2) моторной коры в изокортексе у мышей при стереотаксическом введении липополисахарида. Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к NeuN. Размер шкалы: 100 мкм. Увеличение объектива $\times 10$. Количество иммуноположительных клеток (NeuN⁺-нейронов, показаны стрелками) снижается в группах с интракортикальным и внутривентрикулярным введением ЛПС

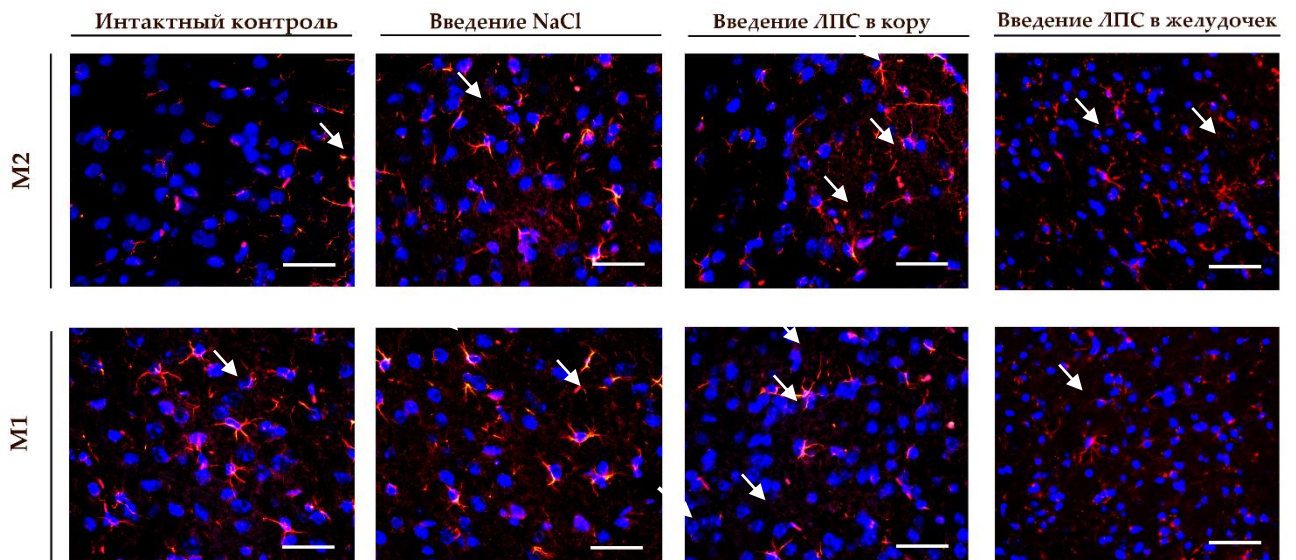


Рисунок 16 – Микрофотографии фрагментов первичной (M1) и вторичной (M2) моторной коры в изокортексе у мышей при стереотаксическом введении липополисахарида. Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к GFAP. Размер шкалы: 100 мкм. Увеличение объектива $\times 10$. Количество иммуноположительных клеток (GFAP⁺-астроцитов, показаны стрелками) увеличивается в группах с интракортикальным введением ЛПС

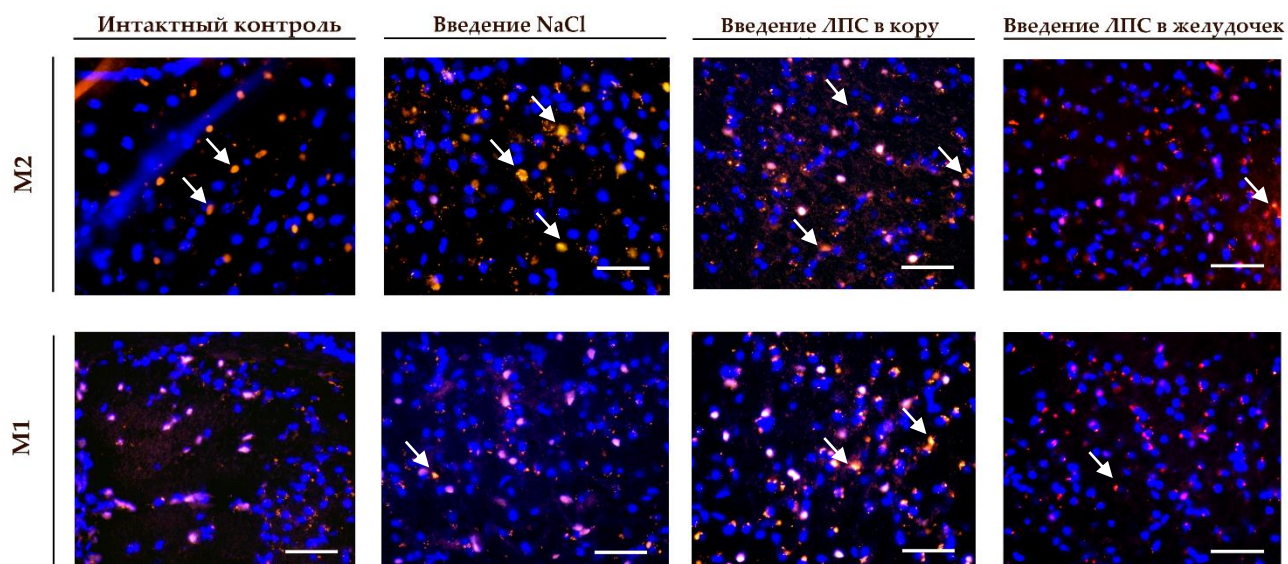


Рисунок 17 – Микрофотографии фрагментов первичной (M1) и вторичной (M2) моторной коры в изокортексе у мышей при стереотаксическом введении липополисахарида. Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к SOX9. Размер шкалы: 100 мкм. Увеличение объектива $\times 10$. Количество иммуноположительных клеток (SOX9⁺-астроцитов, показаны стрелками) увеличивается в группах с интракортикальным введением ЛПС

На рисунках 18 и 19 представлены микрофотографии препаратов головного мозга, изготовленных для всех групп животных в 5-м эксперименте и использовавшиеся для морфометрического исследования с подсчетом количества нейронов в первичной (M1) и вторичной (M2) моторной коре больших полушарий головного мозга [16]. Для обеих областей коры характерно отсутствие морфологических признаков повреждения нейронов у интактных животных и незначительные признаки при введении физиологического раствора. У групп с введением ЛПС отмечены множественные участки перичеллюлярного отека, гиперхромные и пикнотические изменения в нейронах, включая группы с избытком HSP70 (на рисунках обозначены черными стрелками).

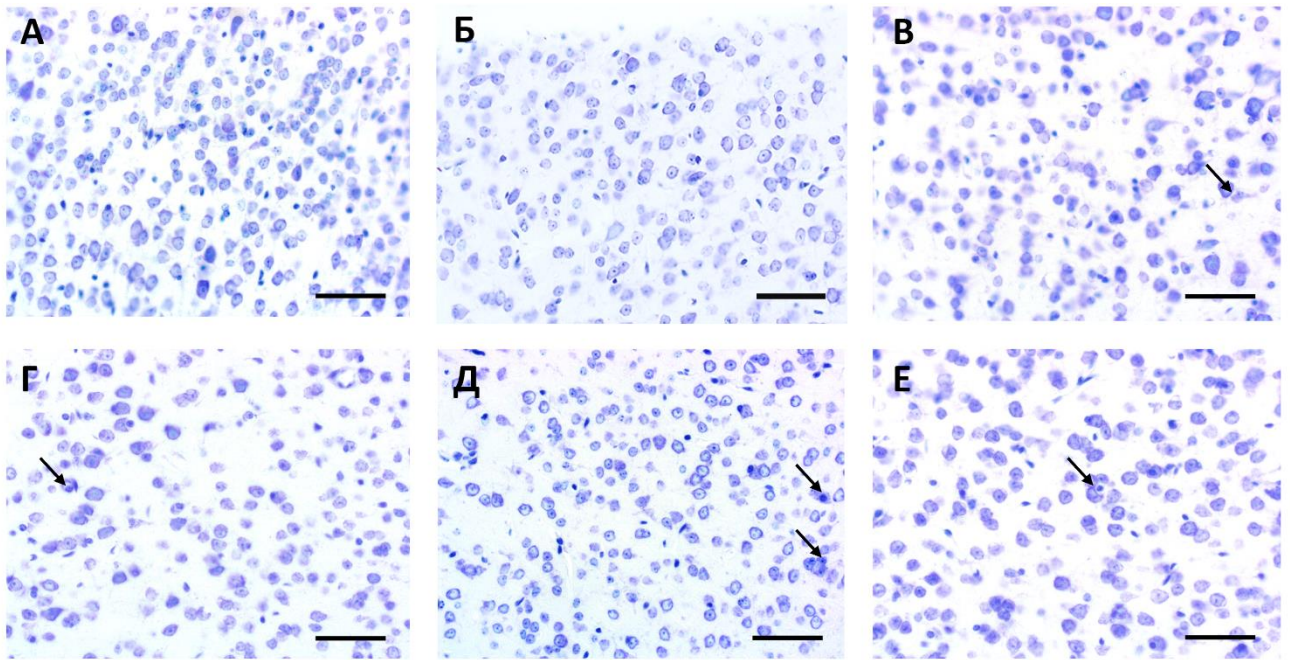


Рисунок 18 – Микрофотографии фрагментов первичной моторной коры (M1): (А) интактные мышцы; (Б) интракортикальное введение физиологического раствора; (В) интракортикальное введение ЛПС; (Г) внутрижелудочковое введение ЛПС; (Д) мышцы HSP70 (эндо), интракортикальное введение ЛПС; (Е) мышцы HSP70 (экзо), интракортикальное введение ЛПС. Окрашивание толуидиновым синим по методу Ниссля. Шкала: 100 мкм, об. $\times 10$

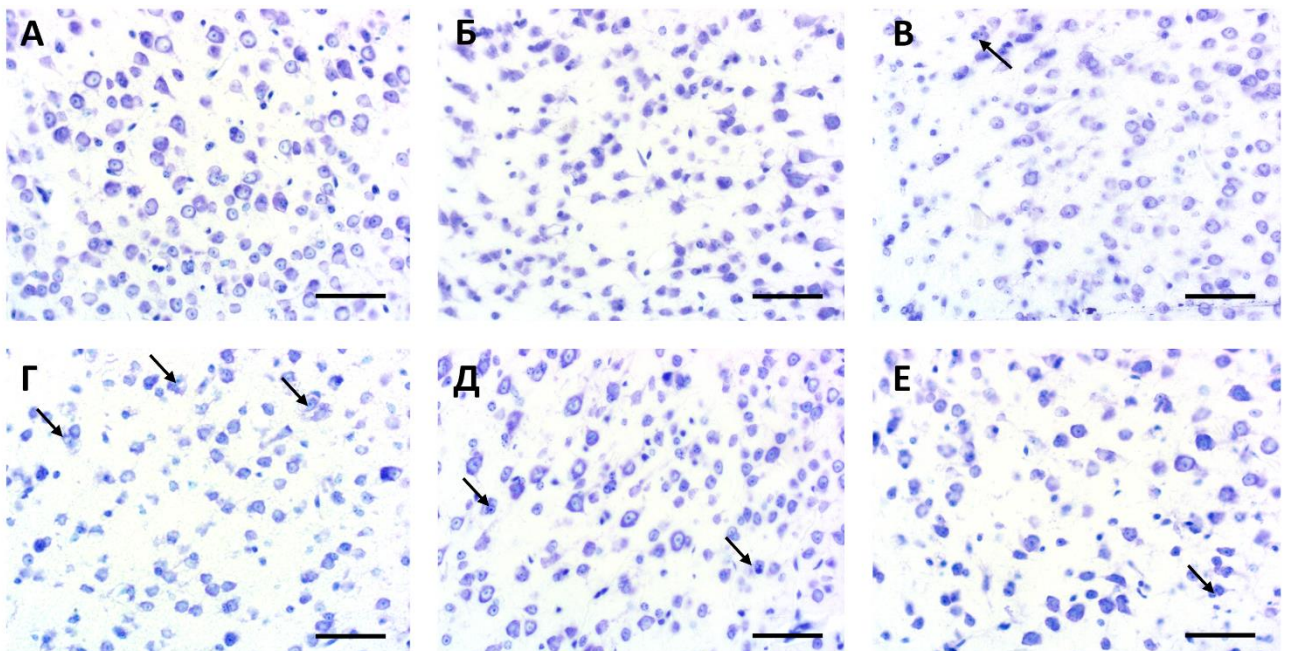


Рисунок 19 – Микрофотографии фрагментов вторичной моторной коры (M2): (А) интактные мышцы; (Б) интракортикальное введение физиологического раствора; (В) интракортикальное введение ЛПС; (Г) внутрижелудочковое введение ЛПС; (Д) мышцы HSP70 (эндо), интракортикальное введение ЛПС; (Е) мышцы HSP70 (экзо), интракортикальное введение ЛПС. Окрашивание толуидиновым синим по методу Ниссля. Шкала: 100 мкм, об. $\times 10$

Результаты морфометрического исследования для препаратов, образцы которых в виде микрофотографий представлены на рисунках 18 и 19, приведены ниже в таблицах 15 и 16.

Таблица 15 – Количество нейронов в первичной моторной коре (M1) у мышей при окрашивании толуидиновым синим по методу Ниссля, $M \pm SE, n = 30 (p \leq 0,05)$

Группа сравнения	Количество нейронов
Интактные мыши C57Bl6/J	231,5 ± 9,93
C57Bl6/J, интракортикальное введение физиологического раствора	154,9 ± 8,51
C57Bl6/J, интракортикальное введение ЛПС	184,4 ± 5,35
C57Bl6/J, внутрижелудочковое введение ЛПС	163,9 ± 7,40
HSP70 (эндо), интракортикальное введение ЛПС	198,0 ± 4,87
HSP70 (экзо), интракортикальное введение ЛПС	180,1 ± 4,24

Данные статистической обработки результатов морфометрии, объединенные в таблице 15 для первичной моторной коры (M1), демонстрируют единообразное снижение количества нейронов в группах со стереотаксическим введением относительно интактных животных, в т. ч. при стереотаксическом введении физиологического раствора.

Ниже на рисунке 20 приведен график, иллюстрирующий разброс значений для каждой из групп в первичной моторной коре, а на рисунке 21 – статистическое распределение апостериорных сравнений по критерию Тьюки, демонстрирующее различия при сравнении между конкретными группами.

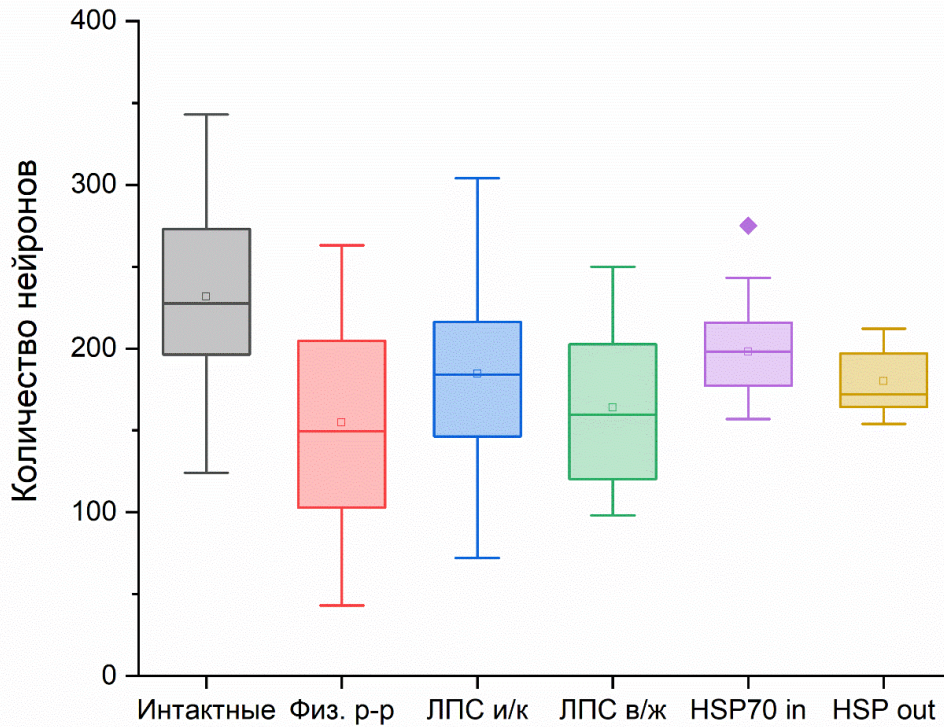


Рисунок 20 – График количества нейронов в поле зрения для первичной моторной коры (M1) при окраске толуидиновым синим по методу Ниссля. Интактные: мыши C57Bl6/J; Физ. p-p: C57Bl6/J, интракортикальное введение физиологического раствора; ЛПС и/к: C57Bl6/J, интракортикальное введение ЛПС; ЛПС в/ж: C57Bl6/J, внутрижелудочковое введение ЛПС; HSP70 (in): HSP70 (эндо), интракортикальное введение ЛПС; HSP70 (out): HSP70 (экзо), интракортикальное введение ЛПС. Горизонтальная линия: медиана, квадрат: среднее арифметическое; Т-образные отрезки: 25-й и 75-й процентиля; ромб: отклоняющиеся значения

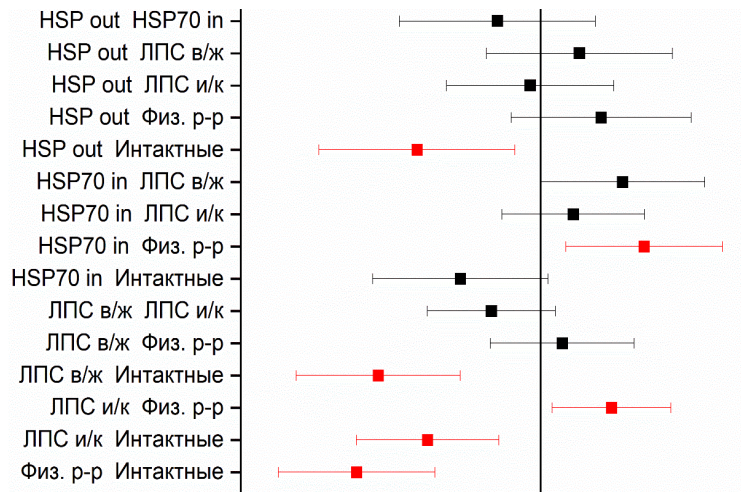


Рисунок 21 – Статистическая значимость сравнений между группами, морфометрическое исследование для первичной моторной коры (M1). Красные отрезки: различия между группами статистически значимы при $p < 0,05$. Черные отрезки: различия между группами статистически не значимы

Из межгруппового сравнения по критерию Тьюки после выполнения однофакторного дисперсионного анализа следует, что все статистически значимые различия были характерны только между группами с введением ЛПС и контрольными группами (физиологический раствор и интактные мыши).

Обращает внимание тот факт, что количество нейронов у мышей с интракортикальным введением ЛПС статистически значимо изменяется по отношению к группе с введением физиологического раствора, а с внутрижелудочковым введением – не изменяется. При первом рассмотрении это можно воспринимать как меньшее снижение нейронов при внутрижелудочковом введении. Однако следует отметить, что введение ЛПС в М1 привело к снижению относительно интактных животных, а для физиологического раствора статистически значимая разница заключается в том, что нейронов выявлено больше в группе с интракортикальным введением ЛПС. Внутрижелудочковое введение ЛПС не отличается от введения физиологического раствора, но только потому, что они оба привели к большему сокращению количества нейронов, чем интракортикальное введение ЛПС.

Примечательно также отсутствие различий между группами с введением ЛПС мышам дикого типа (C57Bl/6J) и животным обеих трансгенных линий с повышенной экспрессией HSP70, а именно HSP70 (эндо) и HSP70 (экзо). Аналогичные табличные значения и графики представлены ниже в таблице 16 и на рисунках 22 и 23 для вторичной моторной коры (M2).

Таблица 16 – Количество нейронов во вторичной моторной коре (M2) у мышей при окрашивании толуидиновым синим по методу Ниссля, $M \pm SE, n = 30 (p \leq 0,05)$

Группа сравнения	Количество нейронов
Интактные мыши C57Bl/6J	228,6 ± 6,20
C57Bl/6J, интракортикальное введение физиологического раствора	199,2 ± 4,33
C57Bl/6J, интракортикальное введение ЛПС	225,4 ± 3,50
C57Bl/6J, внутрижелудочковое введение ЛПС	168,5 ± 4,32
HSP70 (эндо), интракортикальное введение ЛПС	201,1 ± 3,54
HSP70 (экзо), интракортикальное введение ЛПС	200,3 ± 7,13

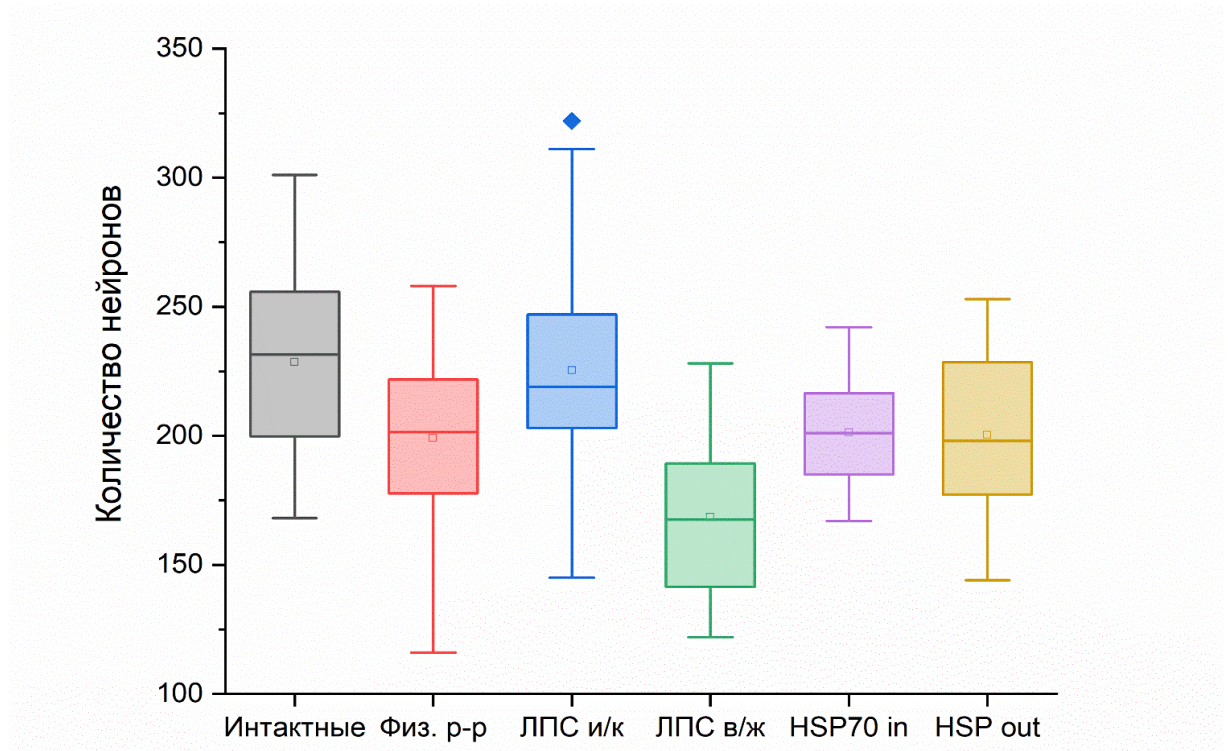


Рисунок 22 – График количества нейронов в поле зрения для вторичной моторной коры (M2) при окраске толуидиновым синим по методу Ниссля. Интактные: мыши C57Bl6/J; Физ. р-р: C57Bl6/J, интракортикальное введение физиологического раствора; ЛПС и/к: C57Bl6/J, интракортикальное введение ЛПС; ЛПС в/ж: C57Bl6/J, внутрижелудочковое введение ЛПС; HSP70 (in): HSP70 (эндо), интракортикальное введение ЛПС; HSP70 (out): HSP70 (экзо), интракортикальное введение ЛПС. Горизонтальная линия: медиана, квадрат: среднее арифметическое; Т-образные отрезки: 25-й и 75-й процентиля; ромб: отклоняющиеся значения

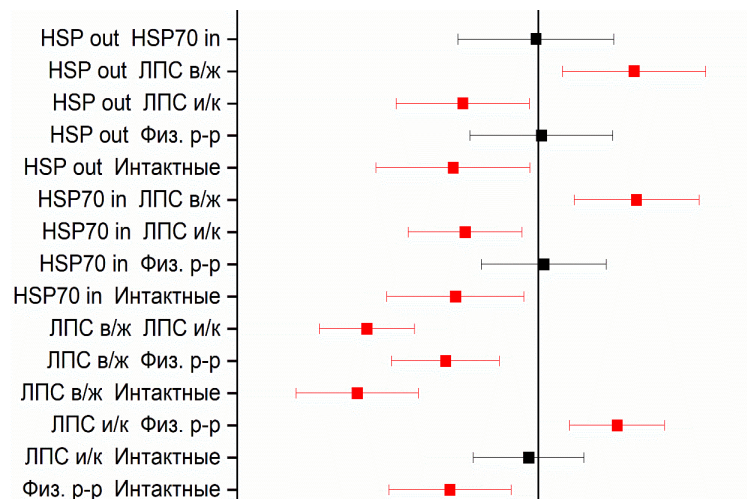


Рисунок 23 – Статистическая значимость сравнений между группами, морфометрическое исследование для вторичной моторной коры (M2). Красные отрезки: различия между группами статистически значимы при $p < 0,05$. Черные отрезки: различия между группами статистически не значимы

Для морфометрического исследования в М2 большинство выявленных закономерностей, как видно из табличных и графических значений, идентичны таковым для М1. Тем не менее есть и определенные различия, связанные с группами с избытком белков теплового шока.

Так, во вторичной моторной коре введение ЛПС в боковые желудочки не просто приводило к большему уменьшению количества нейронов, чем введение ЛПС интракортикально, а было статистически значимо меньше, чем при введении ЛПС животным с повышенной экспрессией белков теплового шока.

Таким образом, при изучении изменений в моторной коре при стереотаксическом введении мышам ЛПС в дозе 12 мкг/кг массы тела установлено, что данный режим дозирования приводит к снижению моторной активности животных спустя сутки после введения и уменьшению количества нейронов в первичной и вторичной моторной коре спустя двое суток после введения. Отмечены признаки активации нейроглии по маркерам GFAP и SOX9 в иммунофлуоресцентном исследовании.

Для сочетанной повышенной экспрессии белка теплового шока HSPA1A семейства HSP70 и стереотаксического введения ЛПС в той же дозе продемонстрировано меньшее снижение моторной активности, чем при изолированном введении ЛПС без изменений в экспрессии HSPA1A.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В связи с поставленными целью и задачами представляется важным обсудить полученные результаты, характеризующие морфофункциональные особенности нейронов и нейроглии в изокортексе у мышей при введении им липополисахарида, в частности:

1. Морфологические и иммуноморфологические изменения в нейронах поясной коры больших полушарий головного мозга у мышей при внутрибрюшинном введении ЛПС.

2. Иммуноморфологические характеристики активации астроцитов и микроглиоцитов в изокортексе у мышей при внутрибрюшинном введении ЛПС.

3. Морфофункциональные особенности нейронов и нейроглии в моторной коре больших полушарий головного мозга у мышей при стереотаксическом введении липополисахарида, а также у мышей с повышенной экспрессией белков теплового шока при стереотаксическом введении липополисахарида.

4.1. Сокращение количества нейронов в поясной коре большого мозга

Морфологические особенности нейронов в изокортексе у мышей после 4 суток введения ЛПС в дозе 1 мг/кг массы тела внутрибрюшинно визуализированы при окраске гематоксилином и эозином, а также толуидиновым синим по Нисслю. Несмотря на отсутствие морфологических признаков нейродегенерации, сармоптоза, нейронофагии и других показателей массовой гибели нервных клеток [15], при данных гистологических окрасках выявлены структурные особенности, позволяющие считать запланированное моделирование повреждения с нейровоспалением адекватным.

Так, в нейронах отмечены пикнотические изменения клеток и ядер; на препаратах, окрашенных толуидиновым синим по методу Ниссля (рисунок 1), особенно хорошо заметно уменьшение клеток, сморщивание ядер с характерной гиперхромностью. В несколько меньшей степени нейронам животных, которым

вводили ЛПС, свойственны гидропические изменения. Вместе с тем не выявлено ни одного признака тяжелого повреждения нервной ткани по общепринятой классификации [7]. Геморрагии, единично присутствовавшие в других областях мозга при макроскопическом исследовании, на препаратах коры не определяются.

Наблюдаемые при гистологических окрасках препаратов головного мозга изменения в поясной коре больших полушарий головного мозга (и в изокортексе в целом) позволяют считать выбранный режим дозирования ЛПС и прочие условия проведения экспериментов адекватным целям и задачам исследования.

Количественные характеристики нейронов исследованы по экспрессии маркера NeuN, при этом выявленные в поясной коре больших полушарий головного мозга у мышей NeuN-положительные нейроны фактически являются зрелыми и функционально активными клетками. Следовательно, данная характеристика демонстрирует не общее количество нейронов, а более востребованный в настоящем исследовании показатель – количество нейронов, не поврежденных или умеренно поврежденных при экспериментальном воздействии.

По количеству NeuN-положительных клеток в поле зрения и на единицу площади препарата все группы животных, получавших введения ЛПС (0,5 мг/кг массы тела в сутки, 1 мг/кг массы тела в сутки и 2 мг/кг массы тела в сутки), статистически значимо уступали контрольной группе с введением физиологического раствора. Основная доза ЛПС в настоящем исследовании – 1 мг/кг массы тела в сутки – соотносится со снижением числа NeuN-положительных клеток более, чем на 20 %.

NeuN – нейрональный ядерный маркер, он может присутствовать либо в самих ядрах, либо в цитоплазме непосредственно около кариолеммы [6]. Следовательно, меньшие значения такой величины, как количество NeuN-положительных нейронов, свидетельствуют о гибели нервных клеток или, как минимум, о значительном угнетении их нормальной функциональной активности. Вместе с выявленной гистологической картиной при гистохимических окрасках, а именно отсутствием геморрагий, воспалительной инфильтрации, дистрофии,

разница в количестве NeuN-положительных клеток позволяет сделать вывод об опосредованном повреждении нейронов при введении ЛПС.

В принятой в современной литературе терминологии данные изменения зачастую трактуют как «нейровоспаление» [27, 175, 211]. Однако в этих статьях подразумевают не классические признаки воспаления, а именно опосредованное, реактивное повреждение нейронов; таким образом, термин «нейровоспаление», несмотря на распространенность в публикациях последних лет, не имеет отношения к понятию воспаления.

Более того, изолированное воздействие бактериальных факторов повреждения без других предрасполагающих условий не всегда приводит к нарушению целостности ГЭБ для иммунокомпетентных клеток, включая экспериментальные режимы с высокой частотой введения и/или дозой [39]. При проникновении ЛПС к астроглии последующие активация сигнальных путей и вовлечение микроглиоцитов [200] принципиально носят адаптивный характер, и механизмы повреждения нейронов при них реализуются медленно и лишь при продолжающемся или высокодозовом введении ЛПС. При лейкоцитарной инфильтрации и иных видах тяжелых, патологических изменений в нервной ткани изокортекса реакция астроглии и микроглии будет иной, включая коренные изменения в секреторном профиле клеток [25, 168].

4.2. Активация нейроглии в поясной коре большого мозга

При ферментативной окраске в ИГХ исследовании проведена оценка количества GFAP-положительных клеток и Iba1-положительных участков клеток в цингулярной и ретроспленальной коре изокортекса у мышей при введении ЛПС в дозе 1 мг/кг массы тела в сутки на протяжении 4 дней. В аналогичном эксперименте с флуоресцентной окраской тот же режим введения оценен исключительно для цингулярной коры, но с подсчетом клеток для обоих маркеров. При этом в обоих случаях отмечено увеличение числа окрашенных антителами астроцитов и участков микроглиоцитов по сравнению с контрольной группой, т. е. активация

астроглии и микроглии при введении ЛПС. Количество Iba1-положительных участков в клетках микроглии изучено также для доз ЛПС 0,5 и 2 мг/кг массы тела в сутки, при этом статистически значимая активация микроглии продемонстрирована только для дозы в 2 мг/кг массы тела.

Следовательно, как изолированно в поясной коре больших полушарий головного мозга, так и в близкой к ней по citoархитектонике и физиологическим характеристикам передней ретроспленальной коре больших полушарий головного мозга астроглия и микроглия, вероятно, перешли в активированное (соответственно, A1 и M1) состояние при введении ЛПС, что особенно четко продемонстрировано для основной выбранной в настоящем исследовании дозы ЛПС при 4-дневном введении – 1 мг/кг массы тела в сутки.

Аналогичные режимы введения в других работах, в основном посвященных моделированию конкретных нозологий, приводили к согласующимся с полученными в настоящем исследовании результатам [90, 94]. Следует отметить, что активация микроглии может наступать и более выражено, например, при высоких дозах повреждающих факторов [93, 115, 120, 128].

Имеются сведения, что увеличение экспрессии GFAP неодинаково при разных вариантах воздействия на астроциты, хотя механизм их активации не меняется. Вводимый инъекционно ЛПС приводит к изменениям, характерным также для воздействия кишечной микробиоты [125], т. е. естественных бактериальных сигналов о повреждении. Эффект этих повреждений накапливается с возрастом и, вероятно, вносит свой вклад в старение головного мозга и сопутствующие ему нейродегенеративные изменения.

Кроме того, экспрессия GFAP в коре больших полушарий всегда несколько ниже, чем в подлежащем белом веществе [38]. На экспрессию GFAP может влиять и вероятная неспецифичность данного маркера в отдельных случаях. Так, при механическом воздействии на нейроны они могут синтезировать GFAP в ходе структурных изменений в нервной ткани при травматическом повреждении [80]. В настоящем исследовании эта ложноположительная трактовка исключена, поскольку: а) мыши не подвергались травматизации; б) учитывались не просто

GFAP-положительные клетки, а клетки, обладающие морфологическими признаками протоплазматических астроцитов.

При исследовании таких маркеров активации нейроглии, как ФНО- α и каспаза-3, выявлены разные закономерности для каждого из них. В поясной коре больших полушарий головного мозга площадь межклеточного вещества с окрашиванием антителами к ФНО- α статистически значимо увеличивается при введении ЛПС в дозе 1 мг/кг массы тела в сутки в течение 4 дней. В соседней с поясной областью коры, прелимбической (мало отличающейся по своим молекулярным характеристикам), статистически значимого увеличения экспрессии ФНО- α не наблюдается. При этом уровни каспазы-3 остались у животных, получавших введения ЛПС, на том же уровне, что и у животных, получавших введения физиологического раствора, несмотря на реактивность антител к каспазе-3 при иммуногистохимическом контроле в том же цикле окрашивания.

Полученные данные можно трактовать как первоочередную активацию цитокиновой секреции нейроглией при введении ЛПС, причем эта цитокиновая секреция предшествует развитию апоптотических явлений. Тем не менее требует обсуждения расхождение в уровнях ФНО- α между двумя рядом расположенными и схожими по многим параметрам областями коры больших полушарий головного мозга, поясной (Cg1) и прелимбической (PLC).

Можно предположить, что в прелимбической коре больших полушарий головного мозга запущенные ЛПС сигнальные пути модифицируются дополнительными факторами. Так, Sampredo-Piquero с коллегами показали, что стрессовое воздействие на прелимбическую кору больших полушарий головного мозга способно значительно увеличить в клетках ее нейроглии содержание рецепторов к гормонам пучковой зоны надпочечников [117]. Аналогичных данных для поясной коры больших полушарий головного мозга не обнаружено. При этом кортикостероидные гормоны подавляют молекулярную сигнализацию провоспалительных интерлейкинов и факторов некроза опухоли. Можно предположить, что модуляция цитокиновой секреции в нейроглии обуславливает наблюдаемую в проведенном исследовании разницу между поясной и

прелимбической корой больших полушарий головного мозга. Возможно, эта разница способна оказывать воздействие на адаптивные способности нейронов. Эта гипотеза могла бы частично объяснить большую склонность тех или иных областей коры больших полушарий головного мозга к более ранним нейродегенеративным изменениям в ответ на воздействие факторов повреждения, проникающих из системного кровотока.

Также необходимо отметить, что астроциты и микроглиоциты не в равной степени образуют ФНО- α в ответ на сигнализацию, активированную ЛПС. Микроглиоциты при опосредованном воздействии ЛПС на нервную ткань начинают цитокиновую секрецию несколько позже, однако секретируют активнее [101, 107, 169]. В исследованиях с введением более высоких доз ЛПС отмечено более быстрое повышение уровней ФНО- α в ЦНС [34, 36]. Следовательно, можно предполагать дозозависимый уровень секреции. Кроме того, уровни ФНО- α остаются повышенными спустя длительное время после введения ЛПС [186].

4.3. Изменения при повышенной экспрессии белков теплового шока

Эксперимент с введением ЛПС в моторную кору больших полушарий головного мозга и оценкой сначала функциональных, а потом и морфологических показателей продемонстрировал ряд результатов, требующих обсуждения. Во-первых, в тестах «приподнятый крестообразный лабиринт» и «открытое поле» при визуализации обработанных данных видеозаписей при помощи тепловых карт установлено, что моторная активность животных снижается после введения ЛПС в дозе 12 мкг/кг в моторную кору больших полушарий головного мозга. При этом у мышей с трансгенным белком теплового шока HSPA1A человеческого происхождения наблюдаемое снижение меньше визуально и по численным результатам. Таким образом, с точки зрения функциональных изменений в нейронах выбранный режим дозирования ЛПС сопровождался ухудшением моторной функции, а присутствие HSPA1A компенсировало развитие нарушений.

Морфологически для всех групп с введением ЛПС показаны пикнотические и гиперхромные изменения в нейронах моторной коры, а также зоны перичеллюлярного отека. Вместе с тем количественное сравнение морфологических характеристик продемонстрировало закономерности изменений между группами, которые несколько отличались от закономерностей, предполагаемых по данным для физиологических тестов. В частности, для первичной моторной коры больших полушарий головного мозга все группы со стереотаксическим введением, включая введение физиологического раствора, продемонстрировали статистически значимое по сравнению с интактными животными снижение количества нейронов при окраске толуидиновым синим по методу Ниссля.

Это можно объяснить механическим повреждением, поскольку ЛПС в эксперименте на стереотаксической установке поступал непосредственно в первичную моторную кору больших полушарий головного мозга. Средние значения содержания нейронов в поле зрения для групп с интракортикальным введением ЛПС и экспрессией HSPA1A выше, чем для животных дикого типа с введением ЛПС, хотя статистически значимой разницы между этими группами и не выявлено.

Во вторичной моторной коре больших полушарий головного мозга, где не было механического повреждения, присутствуют различия и между группами с введением ЛПС при том же самом воздействии. В этих условиях максимальное снижение количества нейронов относительно интактных контрольных животных наблюдалось у мышей с внутрижелудочковым введением ЛПС, что может объясняться неизбирательным проникновением ЛПС с деградацией лимфатического дренажа и, за счет этого, усугублением повреждения нейронов в моторной коре больших полушарий головного мозга [192].

При этом группа с интракортикальным введением ЛПС мышам дикого типа вообще статистически не отличалась от интактных грызунов при подсчете нервных клеток. Аналогичные результаты отмечены и для мышей с интракортикальным введением и повышенной экспрессией белков теплового шока. Следовательно, присутствие белков теплового шока, представляющееся благоприятным с

функциональной точки зрения, не демонстрирует значимых преимуществ по выживаемости нейронов при статистическом подсчете.

Морфологические признаки повреждения нейронов при моделировании аналогичного повреждения показаны и в литературе. Так, при введении эшерихиозного ЛПС серовара O111:B4 в желудочки головного мозга выявляли высокую численность пикнотических и гиперэозинофильных пирамидных нейронов и выраженный перинейрональный отек с дегенерацией нейропиля в I и VI пластинках коры и гиппокампе у 8-недельных мышей [32].

Вместе с тем нет сведений об апробировании подобного режима именно для интракорткального введения, и тем более при сравнении с повышенной экспрессией белков теплового шока. Возможно, отсутствие морфологических изменений, говорящих о лучшей сохранности нейронов в моторной коре больших полушарий головного мозга у трансгенных животных с повышенной экспрессией HSPA1A, связано с эффектами самого HSPA1A.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе изучены закономерности морфофункциональных изменений нейронов в коре больших полушарий головного мозга при хроническом системном воспалении и повреждении нервных клеток. По результатам проведенного анализа выявлены морфофункциональные изменения, развивающиеся в нейронах и нейроглии коры больших полушарий головного мозга у мышей при внутрибрюшинном введении липополисахарида на модели хронического системного воспаления, определены морфологические особенности нейронов в изокортексе у мышей при внутрижелудочковом и интракортикальном введениях липополисахарида на моделях прямого повреждения нейронов, установлен характер морфофункциональных изменений в нейронах изокортекса у мышей при введении липополисахарида и повышенной экспрессии белка теплового шока HSPA1A в качестве модели нейропротекции.

В работе научно обоснованы следующие положения:

- реактивные изменения в нейронах и нейроглии являются характерными морфофункциональными изменениями в коре больших полушарий головного мозга при хроническом системном воспалении с внутрибрюшинным введением эшерихиозного липополисахарида;
- внутрижелудочковое введение мышам липополисахарида приводит к более выраженному повреждению нейронов, чем интракортикальное введение;
- у мышей новый предлагаемый режим введения липополисахарида однократно интракортикально в дозе 12 мкг/кг массы тела животного позволяет моделировать нейровоспаление, причем в сочетании с повышенной экспрессией молекулярного шаперона, белка HSPA1A, выраженность повреждения уменьшается.

Основные научные результаты, полученные в ходе решения поставленных в настоящем исследовании задач, приведены ниже в разделе «Выводы». Рекомендации по использованию научных выводов, обоснованных в настоящей работе, приведены в разделе «Практические рекомендации».

ВЫВОДЫ

1. В поясной коре больших полушарий головного мозга у мышей при внутрибрюшинном введении липополисахарида в дозе 1 мг/кг в сутки в течение 4 дней в нервных клетках развиваются пикнотические и гидропические изменения, количество зрелых нейронов (NeuN-положительных клеток) сокращается, увеличивается количество активированных клеток астро- и микроглии (GFAP- и Iba1-положительных), а также возрастает экспрессия ФНО- α , что выявлено при классическом гистологическом и иммуногистохимическом исследовании.

2. В моторной коре больших полушарий головного мозга у мышей при внутрижелудочковом и интракортикальном введениях липополисахарида в дозе 12 мкг/кг в нейронах выявляются гиперхромные и пикнотические изменения, а также перичеселлюлярный отек, при этом после внутрижелудочкового введения количество нейронов снижается, а после интракортикального – не снижается.

3. У животных с повышенной экспрессией белка HSPA1A спустя сутки после интракортикального введения липополисахарида в дозе 12 мкг/кг двигательная активность нарушается меньше, чем у мышей без повышенной экспрессии белка HSPA1A, а количество нейронов в моторной коре больших полушарий головного мозга не снижается.

4. Выявлены три режима введения липополисахарида (внутрибрюшинно в дозе 1 мг/кг массы тела мыши в течение 4 дней, внутрижелудочково и интракортикально в дозе 12 мкг/кг однократно), позволяющих моделировать реактивные изменения в нервных клетках без признаков воспаления.

5. При внутрибрюшинном, внутрижелудочковом и интракортикальном введениях липополисахарида у мышей выявляются изменения качественных (пикнотические изменения в нейронах, перичеселлюлярный отек) количественных (уменьшение числа NeuN-положительных и увеличение числа GFAP-, SOX9-, Iba1-положительных клеток, нарушение моторной активности) характеристик нейронов и нейроглии в коре больших полушарий головного мозга, причем повышенная экспрессия белка HSPA1A связана с меньшей выраженностью этих изменений.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Внутривентрикулярное введение эшерихиозного липополисахарида серовара O111:B4, очищенного путем экстракции фенолом, в дозе 1 мг/кг массы тела в сутки в течение 4 дней является адекватной и технически легко воспроизводимой моделью хронического системного воспаления у мышей с повреждением нервной ткани без развития признаков воспаления в классическом понимании. Данный режим дозирования липополисахарида рекомендуется для фундаментальных научных исследований, а также может быть применим для доклинических исследований лекарственных препаратов.

2. При оценке функциональных и молекулярных характеристик отдельных областей коры больших полушарий головного мозга в рамках фундаментальных научных исследований необходимо делать поправку на разные уровни экспрессии рецепторов к гормонам и цитокинам, модулирующим эти характеристики (например, рецепторы кортикостероидных гормонов), а также на изменения этих уровней экспрессии при самом экспериментальном воздействии.

3. Иммуногистохимические маркеры NeuN, GFAP и Iba1 адекватно применять в качестве показателей нейровоспаления при воздействии типовых сигналов о повреждении, например, бактериального липополисахарида, в фундаментальных научных исследованиях.

4. Сочетание гиперэкспрессии белка теплового шока HSPA1A у трансгенных животных со стереотаксическим введением липополисахарида в дозе, приводящей к повреждению нейронов и нейроглии изокортекса, но без развития воспаления, не сопровождается лучшей выживаемостью нейронов по сравнению со стереотаксическим введением липополисахарида мышам дикого типа. Это рекомендуется учитывать при дальнейших фундаментальных исследованиях роли молекулярных шаперонов в модификации нейровоспаления и ассоциированных с ним заболеваний, например, нейродегенеративных заболеваний.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ГАМК – γ -аминомасляная кислота

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДАБ – 3,3'-диаминобензидин

ИГХ – иммуногистохимическое исследование с ферментативным окрашиванием

ИФ – иммуногистохимическое исследование с флуоресцентным окрашиванием

ЛПС – липополисахарид

МКА – моноклональное антитело

НСЕ – нейрососудистая единица

а. е. – условная единица (arbitrary unit) для измерения площади в программе QuPath

aRSC – передняя ретроспленальная кора (anterior retrosplenial cortex)

Cg1 / ACAd – поясная (цингулярная) кора I / дорсальная часть передней цингулярной коры (cingulate cortex I / anterior cingulate cortex, dorsal part)

DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол

GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок (glial fibrillary acidic protein)

HRP – пероксидаза хрена (horseradish peroxidase)

HSP70 – белки теплового шока молекулярной массой 70 кДа (тыс. а. е. м.)

Iba1 – 1-ый белок-адаптер, связывающий ионизированный кальций (ionized calcium-binding adapter molecule 1)

$M \pm SE$ – представление данных в виде среднего арифметического значения выборки и его стандартной ошибки (mean \pm standard error)

Me (25L; 75U) – представление данных в виде медианы и межквартильного размаха (median, 25 lower, 75 upper)

NeuN – нейрональный ядерный антиген (neuronal nuclear antigen)

PBS – фосфатно-солевой буферный раствор (phosphate-buffered saline)

PLC – прелимбическая кора (prelimbic cortex)

SOX9 – 9-ый фактор транскрипции в области Y, определяющей пол (sex determining region Y box transcription factor 9)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анацкая, Л. Н. Эндогенный неоваскулогенез в постинсультной репарации мозга / Л. Н. Анацкая, Н. В. Гончарова // Международный неврологический журнал. – 2013. – Т. 6, № 60. – С. 11–19.
2. Бонь, Е. И. Структурная и нейромедиаторная организация различных отделов коры головного мозга / Е. И. Бонь, С. М. Зиматкин // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2018. – Т. 17, № 2. – С. 85–90.
3. Венедиктов, А. А. Особенности экспрессии NeuN в цингулярной коре больших полушарий головного мозга мышей при введении эшерихиозного липополисахарида / А. А. Венедиктов // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2024. – Т. 13, № 4. – С. 22–28.
4. Гематоэнцефалический барьер в нейроиммунных взаимодействиях и патологических процессах / А. С. Дятлова, Н. С. Новикова, Б. Г. Юшков [и др.] // Вестник Российской академии наук. – 2022. – Т. 92, № 5. – С. 590–599. – DOI: 10.1134/S1019331622050100
5. Гистологическая техника / В. В. Семченко, С. А. Барашкова, В. И. Ноздрин, В. Н. Артемьев. – Омск, Орел, 2006. – 290 с.
6. Гусельникова, В. В. NeuN – нейрональный ядерный антиген и маркер дифференцировки зрелых клеток / В. В. Гусельникова, Д. Э. Коржевский // Acta Naturae. – 2015. – Т. 7, № 2. – С. 42–47.
7. Ермохин, П. Н. Гистопатология центральной нервной системы: атлас микрофотографий / П. Н. Ермохин; под редакцией А. П. Авцына. – М.: Медицина, 1969. – 243 с.
8. Зайцев, А. В. Классификация и функции гамкергических интернейронов новой коры млекопитающих / А. В. Зайцев // Биологические мембраны. – 2013. – Т. 30, № 4. – С. 253.
9. Изучение экспрессии фактора некроза опухоли альфа в прелимбической коре большого мозга мышей при введении эшерихиозного липополисахарида / А. А.

Венедиктов, Е. А. Кузьмин, К. С. Покидова [и др.] // Тверской медицинский журнал. – 2024. – Т. 6. – С. 12–15.

10. Калашникова, С. А. Использование бактериального липополисахарида для моделирования патологических процессов в медико-биологических исследованиях (обзор литературы) / С. А. Калашникова, Л. В. Полякова // Вестник новых медицинских технологий. – 2017. – Т. 24, № 2. – С. 209–219.

11. Коржевский, Д. Э. Нейроглия и ее участие в патогенезе заболеваний нервной системы. Актовая речь на заседании Ученого совета ФГБУ «Институт экспериментальной медицины» 12 декабря 2019 г. / Д. Э. Коржевский. – СПб, 2019. – 29 с.

12. Маркеры GFAP, Iba1, TNF- α и каспаза-3 в цингулярной коре большого мозга у мышей после внутрибрюшинного введения липополисахарида / А. А. Венедиктов, Е. А. Кузьмин, К. С. Покидова [и др.] // Молекулярная медицина. – 2025. – Т. 23, № 6. – С. 14–20.

13. Маркеры кортикальных астроцитов при внутрибрюшинном введении липополисахарида / А. А. Венедиктов, К. С. Покидова, Е. А. Кузьмин [и др.] // Материалы X Международной морфологической научно-практической конкурс-конференции студентов и молодых ученых «Морфологические науки – фундаментальная основа медицины», посвященной 90-летию кафедры патологической анатомии Новосибирского государственного медицинского университета. – Новосибирск, 2025. – С. 55–58.

14. Механизмы структурных изменений в коре больших полушарий головного мозга на моделях преждевременного старения нервной ткани при введении бактериального липополисахарида / А. А. Венедиктов, Е. А. Кузьмин, К. С. Покидова [и др.] // Молекулярная медицина. – 2024. – Т. 16, № 5. – С. 14–23.

15. Молекулярные и морфологические маркеры гибели нейронов при острых нарушениях мозгового кровообращения / В. А. Кудрявцева, Е. А. Кузьмин, А. В. Моисеева [и др.] // Сеченовский вестник. – 2022. – Т. 13, № 4. – С. 18–32. – DOI: 10.47093/2218-7332.2022.13.4.18-32

16. Морфофункциональные изменения у мышей при внутрижелудочковом и интракортикальном введении эшерихиозного липополисахарида / А. А. Венедиктов, К. С. Покидова, Е. А. Кузьмин, Г. А. Пьявченко // Актуальные проблемы биомедицины–2025. Материалы XXXI Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием. Санкт-Петербург. – СПб, 2025. – С. 192–193.
17. Принципы надлежащей лабораторной практики: ГОСТ 33044-2014: [введен 01.08.15]. – Москва: Стандартинформ, 2015. – 12 с.
18. Развитие пирамидных нейронов коры полушарий конечного мозга человека во втором триместре гестации / Е. И. Краснощекова, П. А. Зыкин, Л. А. Ткаченко, Т. Ю. Смолина // Физиология человека. – 2010. – Т. 36, № 4. – С. 65–71.
19. Реактивная микроглия при внутрибрюшинном введении липополисахарида / А. А. Венедиктов, Е. А. Кузьмин, К. С. Покидова [и др.] // Патогенез. – 2024. – Т. 22, № 2. – С. 48–50.
20. Тинкториальные свойства нервной ткани неокортекса человека в зоне ишемической полутени (интраоперационный материал) / А. В. Сергеев, В. А. Акулинин, С. С. Степанов [и др.] // Байкальский медицинский журнал. – 2014. – Т. 128, № 5. – С. 35–39.
21. Экспрессия маркеров нейроглии в цингулярной и ретроспленальной коре больших полушарий головного мозга мышей при введении несептической дозы липополисахарида / А. А. Венедиктов, К. С. Покидова, Д. М. Оганесян [и др.] // Сеченовский вестник. – 2024. – Т. 15, № 3. – С. 48–57.
22. A chemical proteomic atlas of brain serine hydrolases identifies cell type-specific pathways regulating neuroinflammation / A. Viader, D. Ogasawara, C. M. Joslyn [et al.] // eLife. – 2016. – Vol. 5. – P. e12345. – DOI: 10.7554/eLife.12345
23. A combined use of silver pretreatment and impregnation with consequent Nissl staining for cortex and striatum architectonics study / G. Piavchenko, V. Soldatov, A. Venediktov [et al.] // Frontiers in neuroanatomy. – 2022. – Vol. 16. – P. 940993. – DOI: 10.3389/fnana.2022.940993

24. A comprehensive atlas of perineuronal net distribution and colocalization with parvalbumin in the adult mouse brain / L. Lupori, V. Totaro, S. Cornuti [et al.] // *Cell reports*. – 2023. – Vol. 42, № 7. – P. 112788. – DOI: 10.1016/j.celrep.2023.112788
25. A novel co-culture model for investigation of the effects of LPS-induced macrophage-derived cytokines on brain endothelial cells / J. Yang, Y. Li, A. Bhalla [et al.] // *PloS one*. – 2023. – Vol. 18, № 7. – P. e0288497. – DOI: 10.1371/journal.pone.0288497
26. A small-molecule TLR4 antagonist reduced neuroinflammation in female E4FAD mice / D. Balu, A. C. Valencia-Olvera, A. Nguyen [et al.] // *Alzheimer's research & therapy*. – 2023. – Vol. 15, № 1. – P. 181. – DOI: 10.1186/s13195-023-01330-6
27. *Achyranthes bidentata* polypeptide alleviates neurotoxicity of lipopolysaccharide-activated microglia via PI3K/Akt dependent NOX2/ROS pathway / Y. Wang, X. Ge, S. Yu, Q. Cheng // *Annals of translational medicine*. – 2021. – Vol. 9, № 20. – P. 1522. – DOI: doi.org/10.21037/atm-21-4027
28. ACSL4 promotes microglia-mediated neuroinflammation by regulating lipid metabolism and VGLL4 expression / X. Zhou, R. Zhao, M. Lv [et al.] // *Brain, behavior, and immunity*. – 2023. – Vol. 109. – P. 331–343. – DOI: 10.1016/j.bbi.2023.02.012
29. Acute systemic LPS-exposure impairs perivascular CSF distribution in mice / O. Manouchehrian, M. Ramos, S. Bachiller [et al.] // *Journal of neuroinflammation*. – 2021. – Vol. 18, № 1. – P. 34. – DOI: 10.1186/s12974-021-02082-6
30. Aging, sexual dimorphism, and hemispheric asymmetry of the cerebral cortex: replicability of regional differences in volume / N. Raz, F. Gunnung-Dixon, D. Head [et al.] // *Neurobiology of Aging*. – 2004. – Vol. 25, № 3. – P. 377–396.
31. Alzheimer's disease and inflammaging / A. M. Kosyreva, A. V. Sentyabreva, I. S. Tsvetkov, O. V. Makarova // *Brain sciences*. – 2022. – Vol. 12, № 9. – P. 1237. – DOI: 10.3390/brainsci12091237
32. Apigenin attenuates LPS-induced neurotoxicity and cognitive impairment in mice via promoting mitochondrial fusion/mitophagy: role of SIRT3/PINK1/Parkin pathway / O. A. Ahmedy, T. M. Abdelghany, M. E. A. El-Shamarka [et al.] // *Psychopharmacology*. – 2022. – Vol. 239, № 12. – P. 3903–3917. – DOI: 10.1007/s00213-022-06262-x

33. Astrocyte-secreted chordin-like 1 drives synapse maturation and limits plasticity by increasing synaptic GluA2 AMPA receptors / E. Blanco-Suarez, T. F. Liu, A. Kopelevich, N. J. Allen // *Neuron*. – 2018. – Vol. 100, № 5. – P. 1116–1132. – DOI: 10.1016/j.neuron.2018.09.043
34. Atorvastatin prevents lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice / E. H. Taniguti, Y. S. Ferreira, I. J. V. Stupp [et al.] // *Brain research bulletin*. – 2019. – Vol. 146. – P. 279–286. – DOI: 10.1016/j.brainresbull.2019.01.018
35. Banks, W.A. Minimal penetration of lipopolysaccharide across the murine blood-brain barrier / W. A. Banks, S. M. Robinson // *Brain, behavior, and immunity*. – 2010. – Vol. 24, № 1. – P. 102–109. – DOI: 10.1016/j.bbi.2009.09.001
36. Behavioral, inflammatory and neurochemical disturbances in LPS and UCMS-induced mouse models of depression / X. Zhao, F. Cao, Q. Liu [et al.] // *Behavioral brain research*. – 2019. – Vol. 364. – P. 494–502. – DOI: 10.1016/j.bbr.2017.05.064. Erratum in: *Behavioral brain research*. – 2023. – Vol. 452. – P. 114573. – DOI: 10.1016/j.bbr.2023.114573
37. Behfar, Q. Aging, Senescence, and Dementia / Q. Behfar, A. Ramirez Zuniga, P. V. Martino-Adami // *The journal of prevention of Alzheimer's disease*. – 2022. – Vol. 9, № 3. – P. 523–531. – DOI: 10.14283/jpad.2022.42
38. Beyond the GFAP – astrocyte protein markers in the brain / A. M. Jurga, M. Paleczna, J. Kadluczka, K. Z. Kuter // *Biomolecules*. – 2021. – Vol. 11, № 9. – P. 1361. – DOI: 10.3390/biom11091361
39. Blocking osteopontin expression attenuates neuroinflammation and mitigates LPS-induced depressive-like behavior in mice / T. Li, L. Yuan, Y. Zhao [et al.] // *Journal of affective disorders*. – 2023. – Vol. 330. – P. 83–93. – DOI: 10.1016/j.jad.2023.02.105
40. Bolarinwa, O. A. Sample size estimation for health and social science researchers: the principles and considerations for different study designs / O. A. Bolarinwa // *The Nigerian postgraduate medical journal*. – 2020. – Vol. 27, № 2. – P. 67–75. – DOI: 10.4103/npmj.npmj_19_20

41. Bortone, D. S. Translaminar inhibitory cells recruited by layer 6 corticothalamic neurons suppress visual cortex / D. S. Bortone, S. R. Olsen, M. Scanziani // *Neuron*. – 2014. – Vol. 82, № 2. – P. 474–485. – DOI: 10.1016/j.neuron.2014.02.021
42. Brain structure. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq / A. Zeisel, A. B. Muñoz-Manchado, S. Codeluppi [et al.] // *Science (New York)*. – 2015. – Vol. 347, № 6226. – P. 1138–1142. – DOI: 10.1126/science.aaa1934
43. Brown, G. C. The endotoxin hypothesis of Alzheimer's disease / G. C. Brown, M. T. Heneka // *Molecular neurodegeneration*. – 2024. – Vol. 19, № 1. – P. 30. – DOI: 10.1186/s13024-024-00722-y
44. Burkholderia pseudomallei aerosol infection results in differential inflammatory responses in BALB/c and C57Bl/6 mice / G. G. Tan, Y. Liu, S. P. Sivalingam [et al.] // *Journal of medical microbiology*. – 2008. – Vol. 57, № Pt 4. – P. 508–515. – DOI: 10.1099/jmm.0.47596-0
45. Cavaillon, J. M. Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines / J. M. Cavaillon // *Toxicon*. – 2018. – Vol. 149. – P. 45–53. – DOI: 10.1016/j.toxicon.2017.10.016
46. Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: clinical relevance for multiple sclerosis / J. Praet, C. Guglielmetti, Z. Berneman [et al.] // *Neuroscience and biobehavioral reviews*. – 2014. – Vol. 47. – P. 485–505. – DOI: 10.1016/j.neubiorev.2014.10.004
47. Chaperone signaling complexes in Alzheimer's disease / J. Koren III, U. K. Jinwal, D. C. Lee [et al.] // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2009. – Vol. 13, № 4. – P. 619–630. – DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00557.x
48. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span / D. Furman, J. Campisi, E. Verdin [et al.] // *Nature medicine*. – 2019. – Vol. 25, № 12. – P. 1822–1832. – DOI: 10.1038/s41591-019-0675-0
49. Coleman, W. G., Jr. Genetic analysis of Escherichia coli O111:B4, a strain of medical and biochemical interest / W. G. Coleman, Jr, P. J. Goebel, L. Leive // *Journal of*

bacteriology. – 1977. – Vol. 130, № 2. – P. 656–660. – DOI: 10.1128/jb.130.2.656-660.1977

50. Conserved gene regulation during acute inflammation between zebrafish and mammals / G. Forn-Cuní, M. Varela, P. Pereiro [et al.] // *Scientific reports*. – 2017. – Vol. 7. – P. 41905. – DOI: 10.1038/srep41905

51. Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage / J. A. Gorski, T. Talley, M. Qiu [et al.] // *The journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. – 2002. – Vol. 22, № 15. – P. 6309–6314. – DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-15-06309.2002

52. Cortical somatostatin interneuron subtypes form cell-type-specific circuits / S. J. Wu, E. Sevier, D. Dwivedi [et al.] // *Neuron*. – 2023. – Vol. 111, № 17. – P. 2675–2692. – DOI: 10.1016/j.neuron.2023.05.032

53. Cortical somatostatin long-range projection neurons and interneurons exhibit divergent developmental trajectories / J. Fisher, M. Verhagen, Z. Long [et al.] // *Neuron*. – 2024. – Vol. 112, № 4. – P. 558–573. – DOI: 10.1016/j.neuron.2023.11.013

54. Cserép, C. Shaping neuronal fate: functional heterogeneity of direct microglia-neuron interactions / C. Cserép, B. Pósfai, Á. Dénes // *Neuron*. – 2021. – Vol. 109, № 2. – P. 222–240. – DOI: 10.1016/j.neuron.2020.11.007

55. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis / B. Olsson, R. Lautner, U. Andreasson [et al.] // *The Lancet. Neurology*. – 2016. – Vol. 15. – P. 673–84. – DOI: 10.1016/S1474-4422(16)00070-3

56. Cytosolic Hsp70 and Hsp40 chaperones enable the biogenesis of mitochondrial β -barrel proteins / T. Jores, J. Lawatscheck, V. Beke [et al.] // *Journal of Cell Biology*. – 2018. – Vol. 217, № 9. – P. 3091–3108. – DOI: 10.1083/jcb.201712029

57. Damage to the cingulum contributes to Alzheimer's disease pathophysiology by deafferentation mechanism / M. Bozzali, G. Giulietti, B. Basile [et al.] // *Human brain mapping*. – 2012. – Vol. 33, № 6. – P. 1295–1308. – DOI: 10.1002/hbm.21287

58. Dasatinib regulates LPS-induced microglial and astrocytic neuroinflammatory responses by inhibiting AKT/STAT3 signaling / K. Y. Ryu, H. J. Lee, H. Woo [et al.] //

Journal of neuroinflammation. – 2019. – Vol. 16, № 1. – P. 190. – DOI: 10.1186/s12974-019-1561-x

59. Development and arealization of the cerebral cortex / C. R. Cadwell, A. Bhaduri, M. A. Mostajo-Radji [et al.] // *Neuron*. – 2019. – Vol. 103, № 6. – P. 980–1004. – DOI: 10.1016/j.neuron.2019.07.009

60. Development and functional diversification of cortical interneurons / L. Lim, D. Mi, A. Llorca, O. Marín // *Neuron*. – 2018. – Vol. 100, № 2. – P. 294–313. – DOI: 10.1016/j.neuron.2018.10.009

61. Dogan, M. D. Effects of different serotypes of *Escherichia coli* lipopolysaccharides on body temperature in rats / M. D. Dogan, H. Ataoglu, E. S. Akarsu // *Life sciences*. – 2000. – Vol. 67, № 19. – P. 2319–29. – DOI: 10.1016/s0024-3205(00)00821-3

62. Donepezil regulates LPS and A β -stimulated neuroinflammation through MAPK/NLRP3 inflammasome/STAT3 signaling / J. Kim, H. J. Lee, S. K. Park [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2021. – Vol. 22, № 19. – P. 10637. – DOI: 10.3390/ijms221910637

63. Dual lineage origins of neocortical astrocytes / J. Zhou, I. Vitali, S. Roig-Puiggros [et al.] // *BioRxiv*. – 2023. – DOI: 10.1101/2023.09.12.557313

64. Dual microglia effects on blood brain barrier permeability induced by systemic inflammation / K. Haruwaka, A. Ikegami, Y. Tachibana [et al.] // *Nature communications*. – 2019. – Vol. 10. – P. 5816. – DOI: 10.1038/s41467-019-13812-z

65. Dynamic interleukin-1 receptor Type 1 signaling mediates microglia-vasculature interactions following repeated systemic LPS / D. P. Nemeth, X. Liu, D. B. McKim [et al.] // *Journal of inflammation research*. – 2022. – Vol. 15. – P. 1575–1590. – DOI: 10.2147/JIR.S350114

66. Elorriaga, V. Cajal-Retzius cells: recent advances in identity and function / V. Elorriaga, A. Pierani, F. Causeret // *Current opinion in neurobiology*. – 2023. – Vol. 79. – P. 102686. – DOI: 10.1016/j.conb.2023.102686

67. Energy management and mitochondrial dynamics in cerebral cortex during endotoxemia / J. S. Adán Areán, T. A. Vico, T. Marchini [et al.] // *Archives of*

- biochemistry and biophysics. – 2021. – Vol. 705. – P. 108900. – DOI: 10.1016/j.abb.2021.108900
68. Ethical considerations in animal research: the principle of 3R's / L. Díaz, E. Zambrano, M. E. Flores [et al.] // *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion.* – 2020. – Vol. 73, № 4. – P. 199–209. – DOI: 10.24875/RIC.20000380
69. Fan, Y. Y. A1/A2 astrocytes in central nervous system injuries and diseases: angels or devils? / Y. Y. Fan, J. Huo // *Neurochemistry international.* – 2021. – Vol. 148. – P. 105080. – DOI: 10.1016/j.neuint.2021.105080
70. Farhy-Tselnicker, I. Astrocytes, neurons, synapses: a tripartite view on cortical circuit development / I. Farhy-Tselnicker I., N. J. Allen // *Neural development.* – 2018. – Vol. 13, № 1. – P. 7. – DOI: 10.1186/s13064-018-0104-y
71. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages / F. Ginhoux, M. Greter, M. Leboeuf [et al.] // *Science (New York).* – 2010. – Vol. 330, № 6005. – P. 841–845. – DOI: 10.1126/science.1194637
72. Femi-Akinlosotu, O. M. Changes in neuronal density of the sensorimotor cortex and neurodevelopmental behavior in neonatal mice with kaolin-induced hydrocephalus / O. M. Femi-Akinlosotu, M. T. Shokunbi // *Pediatric neurosurgery.* – 2010. – Vol. 55, № 5. – P. 244–253. – DOI: 10.1159/000510603
73. Festing, M. F. W. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals / M. F. W. Festing, D. G. Altman // *ILAR Journal.* – 2002. – Vol. 43, № 4. – P. 244–258. – DOI: 10.1093/ilar.43.4.244.
74. Fishell, G. Pyramidal neurons grow up and change their mind / G. Fishell, C. Hanashima // *Neuron.* – 2008. – Vol. 57, № 3. – P. 333–338. – DOI: 10.1016/j.neuron.2008.01.018
75. Francis-Oliveira, J. Are the anterior and mid-cingulate cortices distinct in rodents? / J. Francis-Oliveira, O. Leitzel, M. Niwa // *Frontiers in neuroanatomy.* – 2022. – Vol. 16. – P. 914359. – DOI: 10.3389/fnana.2022.914359
76. Gajewski, M. P. Design, synthesis, and characterization of novel system xC-transport inhibitors: inhibition of microglial glutamate release and neurotoxicity / M. P.

- Gajewski, S. W. Barger // *Journal of neuroinflammation*. – 2023. – Vol. 20, № 1. – P. 292. – DOI: 10.1186/s12974-023-02972-x
77. Galea, I. The blood-brain barrier in systemic infection and inflammation / I. Galea // *Cellular & molecular immunology*. – 2021. – Vol. 18, № 11. – P. 2489–2501. – DOI: 10.1038/s41423-021-00757-x
78. GCaMP – семейство однофлуорофорных генетически-кодируемых кальциевых индикаторов / А. И. Ерофеев, Е. К. Винокуров, О. Л. Власова, И. Б. Безпрозванный // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. – 2023. – Т. 109, № 7. – С. 819–843.
79. Genetic dissection of the glutamatergic neuron system in cerebral cortex / K. Matho, D. Huilgol, W. Galbavy [et al.] // *Nature*. – 2021. – Vol. 598, № 7879. – P. 182–187. – DOI: 10.1038/s41586-021-03955-9
80. GFAP positivity in neurons following traumatic brain injuries / J. Zwirner, J. Lier, H. Franke [et al.] // *International journal of legal medicine*. – 2021. – Vol. 135, № 6. – P. 2323–2333. – DOI: 10.1007/s00414-021-02568-1
81. Ghosh, S. K. Evolution of staining methods in neuroanatomy: impetus for emanation of neuron doctrine during the turn of 20th century / S. K. Ghosh, J. A. Walocha // *Anatomical record (Hoboken, New Jersey: 2007)*. – 2024. – Vol. 307, № 10. – P. 3398–3412. – DOI: 10.1002/ar.25436
82. Giuffrida, M. A. Type II error and statistical power in reports of small animal clinical trials / M. A. Giuffrida // *Journal of the American Veterinary Medical Association*. – 2014. – Vol. 244, № 9. – P. 1075–1080. – DOI: 10.2460/javma.244.9.1075
83. Gomez, C. R. Role of heat shock proteins in aging and chronic inflammatory diseases / C. R. Gomez // *GeroScience*. – 2021. – Vol. 43, № 5. – P. 2515–2532. – DOI: 10.1007/s11357-021-00394-2
84. Gorman, A. Lipopolysaccharide structure and the phenomenon of low endotoxin recovery / A. Gorman, A. P. Golovanov // *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. – 2022. – Vol. 180. – P. 289–307. – DOI: 10.1016/j.ejpb.2022.10.006
85. Gut microbiota interacts with the brain through systemic chronic inflammation: Implications on neuroinflammation, neurodegeneration, and aging / Y. Mou, Y. Du, L.

- Zhou [et al.] // *Frontiers in immunology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 796288. – DOI: 10.3389/fimmu.2022.796288
86. Hablitz, L. M. The glymphatic system: a novel component of fundamental neurobiology / L. M. Hablitz, M. Nedergaard // *The journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. – 2021. – Vol. 41, № 37. – P. 7698–7711. – DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0619-21.2021
87. Hashioka, S. Glia-driven neuroinflammation and systemic inflammation in Alzheimer's disease / S. Hashioka, Z. Wu, A. Klegeris // *Current neuropharmacology*. – 2021. – Vol. 19, № 7. – P. 908–924. – DOI: 10.2174/1570159X18666201111104509
88. Heat shock proteins in Alzheimer's disease: role and targeting / C. Campanella, A. Pace, C. Caruso Bavisotto [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – Vol. 19, № 9. – Art. № 2603. – DOI: 10.3390/ijms19092603
89. Herculano-Houzel, S. / The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution / S. Herculano-Houzel // *Glia*. – 2014. – Vol. 62, № 9. – P. 1377–1391. – DOI: 10.1002/glia.22683
90. Hesperetin, a citrus flavonoid, attenuates LPS-induced neuroinflammation, apoptosis and memory impairments by modulating TLR4/NF- κ B signaling / T. Muhammad, M. Ikram, R. Ullah [et al.] // *Nutrients*. – 2019. – Vol. 11, № 3. – P. 648. – DOI: 10.3390/nu11030648
91. Homer1 promotes the conversion of A1 astrocytes to A2 astrocytes and improves the recovery of transgenic mice after intracerebral hemorrhage / X. Fei, Y. N. Dou, L. Wang [et al.] // *Journal of neuroinflammation*. – 2022. – Vol. 19, № 1. – P. 67. – DOI: 10.1186/s12974-022-02428-8
92. Human microbiota from drug-naive patients with obsessive-compulsive disorder drives behavioral symptoms and neuroinflammation via succinic acid in mice / Y. D. Zhang, D. D. Shi, B. B. Liao [et al.] // *Molecular psychiatry*. – 2024. – Vol. 29, № 6. – P. 1782–1797. – DOI: 10.1038/s41380-024-02424-9
93. Hydrogen-rich saline regulates NLRP3 inflammasome activation in sepsis-associated encephalopathy rat model / J. S. Dumbuya, X. Chen, J. Du [et al.] //

International immunopharmacology. – 2023. – Vol. 123. – P. 110758. – DOI: 10.1016/j.intimp.2023.110758

94. Ibrutinib alleviates LPS-induced neuroinflammation and synaptic defects in a mouse model of depression / W. Li, T. Ali, K. He [et al.] // Brain, behavior, and immunity. – 2021. – Vol. 92. – P. 10–24. – DOI: 10.1016/j.bbi.2020.11.008

95. Ibrutinib suppresses LPS-induced neuroinflammatory responses in BV2 microglial cells and wild-type mice / H. Y. Nam, J. H. Nam, G. Yoon [et al.] // Journal of neuroinflammation. – 2018. – Vol. 15. – P. 271. – DOI: 10.1186/s12974-018-1308-0

96. Imaging neurons within thick brain sections using the Golgi-Cox method / E. Louth, C. D. Sutton, A. L. Mendell [et al.] // Journal of visualized experiments. – 2017. – Vol. 122. – P. 55358. – DOI: 10.3791/55358

97. Impairments of cerebral blood flow microcirculation in rats brought on by cardiac cessation and respiratory arrest / G. Piavchenko, I. Kozlov, V. Dremin [et al.] // Journal of biophotonics. – 2021. – Vol. 14. – e202100216. – DOI: 10.1002/jbio.202100216

98. Improvement of astrocytic gap junction involves the anti-depressive effect of celecoxib through inhibition of NF- κ B / X. X. Zheng, C. F. Zhang, L. Q. Li [et al.] // Brain research bulletin. – 2024. – Vol. 207. – Art. № 110871. – DOI: 10.1016/j.brainresbull.2024.110871

99. Individual human cortical progenitors can produce excitatory and inhibitory neurons / R. N. Delgado, D. E. Allen, M. G. Keefe [et al.] // Nature. – 2022. – Vol. 601, № 7893. – P. 397–403. – DOI: 10.1038/s41586-021-04230-7

100. Inducible nitric oxide synthase gene expression in the brain during systemic inflammation / M. L. Wong, V. Rettori, A. al-Shekhlee [et al.] // Nature medicine. – 1996. – Vol. 2, № 5. – P. 581–584. – DOI: 10.1038/nm0596-581

101. Interaction of microglia and astrocytes in the neurovascular unit / L. R. Liu, J. C. Liu, J. S. Bao [et al.] // Frontiers in immunology. – 2020. – Vol. 11. – P. 1024. – DOI: 10.3389/fimmu.2020.01024

102. Intracellular and extracellular lipopolysaccharide signaling in sepsis: avenues for novel therapeutic strategies / R. S. Gabarin, M. Li, P. A. Zimmel [et al.] // Journal of innate immunity. – 2021. – Vol. 13, № 6. – P. 323–332. – DOI: 10.1159/000515740

103. Jefferis, G. S. Sparse and combinatorial neuron labelling / G. S. Jefferis, J. Livet // *Current opinion in neurobiology*. – 2012. – Vol. 22, № 1. – P. 101–110. – DOI: 10.1016/j.conb.2011.09.010
104. Jeong, H. K. Systemic LPS administration induces brain inflammation but not dopaminergic neuronal death in the substantia nigra / H. K. Jeong, I. Jou, E. H. Joe // *Experimental & molecular medicine*. – 2010. – Vol. 42, № 12. – P. 823–832. – DOI: 10.3858/emm.2010.42.12.085
105. Johnson, M. B. Cerebral cortical neuron diversity and development at single-cell resolution / M. B. Johnson, C. A. Walsh // *Current opinion in neurobiology*. – 2017. – Vol. 42. – P. 9–16. – DOI: 10.1016/j.conb.2016.11.001
106. Kaplan, L. Neuronal regulation of the blood-brain barrier and neurovascular coupling / L. Kaplan, B. W. Chow, C. Gu // *Nature reviews. Neuroscience*. – 2020. – Vol. 21, № 8. – P. 416–432. – DOI: 10.1038/s41583-020-0322-2
107. Kolos, E. A. Spinal cord microglia in health and disease / E. A. Kolos, D. E. Korzhevskii // *Actae Naturae*. – 2020. – Vol. 12, № 1. – P. 4–17. – DOI: 10.32607/actanaturae.10934
108. Kunduru, B. R. EK3D: an E. coli K antigen 3-dimensional structure database / B. R. Kunduru, S. A. Nair, T. Rathinavelan // *Nucleic acids research*. – 2016. – Vol. 44, № D1. – P. D675–D681. – DOI: 10.1093/nar/gkv1313
109. Lapshina, K. V. Aquaporin-4 and Parkinson's Disease / K. V. Lapshina, I. V. Ekimova // *International journal of molecular sciences*. – 2024. – Vol. 25, № 3. – P. 1672. – DOI: 10.3390/ijms25031672
110. Lassmann, H. Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: its value as an experimental model for multiple sclerosis / H. Lassmann // *Journal of neurology*. – 1983. – Vol. 229, № 4. – P. 207–220. – DOI: 10.1007/BF00313549
111. Lee, C. K. Martinotti cells: community organizers / C. K. Lee, J. R. Huguenard // *Neuron*. – 2011. – Vol. 69, № 6. – P. 1042–1045. – DOI: 10.1016/j.neuron.2011.03.003
112. Lemon, R. N. Classification of cortical neurons by spike shape and the identification of pyramidal neurons / R. N. Lemon, S. N. Baker, A. Kraskov // *Cerebral*

- cortex (New York: 1991). – 2021. – Vol. 31, № 11. – P. 5131–5138. – DOI: 10.1093/cercor/bhab147
113. Lipopolysaccharide-induced animal models for neuroinflammation – an overview / A. A. F. da Silva, M. B. Fiadeiro, L. I. Bernardino [et al.] // *Journal of neuroimmunology*. – 2024. – Vol. 387. – P. 578273. – DOI: 10.1016/j.jneuroim.2023.578273
114. Lodato, S. Generating neuronal diversity in the mammalian cerebral cortex / S. Lodato, P. Arlotta // *Annual review of cell and developmental biology*. – 2015. – Vol. 31. – P. 699–720. – DOI: 10.1146/annurev-cellbio-100814-125353
115. Lomerizine inhibits LPS-mediated neuroinflammation and tau hyperphosphorylation by modulating NLRP3, DYRK1A, and GSK3 α/β / J. H. Park, J. W. Hwang, H. J. Lee [et al.] // *Frontiers in immunology*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1150940. – DOI: 10.3389/fimmu.2023.1150940
116. Long-range inhibition from prelimbic to cingulate areas of the medial prefrontal cortex enhances network activity and response execution / N. Utashiro, D. A. A. MacLaren, Y. C. Liu [et al.] // *Nature communications*. – 2024. – Vol. 15, № 1. – P. 5772. – DOI: 10.1038/s41467-024-50055-z
117. Long-term consequences of alcohol use in early adolescent mice: focus on neuroadaptations in GR, CRF and BDNF / P. Sampedro-Piquero, R. D. Moreno-Fernández, A. Begega [et al.] // *Addiction biology*. – 2022. – Vol. 27, № 2. – P. e13158. – DOI: 10.1111/adb.13158
118. LPS induces microglial activation and GABAergic synaptic deficits in the hippocampus accompanied by prolonged cognitive impairment / H. Jung, D. Lee, H. You [et al.] // *Scientific reports*. – 2023. – Vol. 13, № 1. – P. 6547. – DOI: 10.1038/s41598-023-32798-9
119. LPS-induced acute kidney injury is mediated by Nox4-SH3YL1 / J. Y. Yoo, D. R. Cha, B. Kim [et al.] // *Cell reports*. – 2020. – Vol. 33, № 3. – P. 108245. – DOI: 10.1016/j.celrep.2020.108245
120. LPS-induced systemic inflammation affects the dynamic interactions of astrocytes and microglia with the vasculature of the mouse brain cortex / E. Xingi, P. N.

- Koutsoudaki, I. Thanou [et al.] // *Cells*. – 2023. – Vol. 12, № 10. – P. 1418. – DOI: 10.3390/cells12101418
121. LRRC37B is a human modifier of voltage-gated sodium channels and axon excitability in cortical neurons / B. Libé-Philippot, A. Lejeune, K. Wierda [et al.] // *Cell*. – 2023. – Vol. 186, № 26. – P. 5766–5783. – DOI: 10.1016/j.cell.2023.11.028
122. Lu, Y. C. LPS/TLR4 signal transduction pathway / Y. C. Lu, W. C. Yeh, P. S. Ohashi // *Cytokine*. – 2008. – Vol. 42, № 2. – P. 145–151. – DOI: 10.1016/j.cyto.2008.01.006
123. Mao, X. Multimodal cortical neuronal cell type classification / X. Mao, J. F. Staiger // *Pflügers Archiv: European journal of physiology*. – 2024. – Vol. 476, № 5. – P. 721–733. – DOI: 10.1007/s00424-024-02923-2
124. Marín-Padilla, M. / The mammalian neocortex new pyramidal neuron: a new conception / M. Marín-Padilla // *Frontiers in neuroanatomy*. – 2014. – Vol. 7. – P. 51. – DOI: 10.3389/fnana.2013.00051
125. Mayer, E. A. The gut-brain axis / E. A. Mayer, K. Nance, S. Chen // *Annual review of medicine*. – 2022. – Vol. 73. – P. 439–453. – DOI: 10.1146/annurev-med-042320-014032
126. Mazgaeen, L. Recent advances in lipopolysaccharide recognition systems / L. Mazgaeen, P. Gurung // *International journal of molecular sciences*. – 2020. – Vol. 21, № 2. – P. 379. – DOI: 10.3390/ijms21020379
127. Mekada, K. Substrains matter in phenotyping of C57BL/6 mice / K. Mekada, A. Yoshiki // *Experimental animals*. – 2021. – Vol. 70, № 2. – P. 145–160. – DOI: 10.1538/expanim.20-0158
128. Melatonin attenuates LPS-induced acute depressive-like behaviors and microglial NLRP3 inflammasome activation through the SIRT1/Nrf2 pathway / B. I. Arioz, B. Tastan, E. Tarakcioglu [et al.] // *Frontiers in immunology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1511. – DOI: 10.3389/fimmu.2019.01511
129. Menon, V. Saliency, switching, attention and control: a network model of insula function / V. Menon, L. Q. Uddin // *Brain structure & function*. – 2010. – Vol. 214, № 5–6. – P. 655–667. – DOI: 10.1007/s00429-010-0262-0

130. Mestre, H. The brain's glymphatic system: current controversies / H. Mestre, Y. Mori, M. Nedergaard // *Trends in neurosciences*. – 2020. – Vol. 43, № 7. – P. 458–466. – DOI: 10.1016/j.tins.2020.04.003
131. Michalikova, M. Extracellular waveforms reveal an axonal origin of spikelets in pyramidal neurons / M. Michalikova, M. W. H. Remme, R. Kempter // *Journal of neurophysiology*. – 2018. – Vol. 120, № 4. – P. 1484–1495. – DOI: 10.1152/jn.00463.2017
132. Microglia-neuron interaction at nodes of Ranvier depends on neuronal activity through potassium release and contributes to remyelination / R. Ronzano, T. Roux, M. Thetiot [et al.] // *Nature communications*. – 2021. – Vol. 12, № 1. – P. 5219. – DOI: 10.1038/s41467-021-25486-7
133. Modulation of hippocampal neuronal resilience during aging by the Hsp70/Hsp90 co-chaperone STI1 / R. E. Lackie, A. R. Razzaq, S. M. K. Farhan [et al.] // *Journal of Neurochemistry*. – 2020. – Vol. 153, № 6. – P. 727–758. – DOI: 10.1111/jnc.14882
134. Moffat, A. The control of cortical folding: multiple mechanisms, multiple models. / A. Moffat, C. Schuurmans // *The neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. – 2024. – Vol. 30, № 6. – P. 704–722. – DOI: 10.1177/10738584231190839
135. Molecular and functional properties of cortical astrocytes during peripherally induced neuroinflammation / B. Diaz-Castro, A. M. Bernstein, G. Coppola [et al.] // *Cell reports*. – 2021. – Vol. 36, № 6. – P. 109508. – DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109508
136. Molecular architecture of the mouse nervous system / A. Zeisel, H. Hochgerner, P. Lönnerberg [et al.] // *Cell*. – 2018. – Vol. 174, № 4. – P. 999–1014. – DOI: 10.1016/j.cell.2018.06.021
137. Molecular basis of astrocyte diversity and morphology across the CNS in health and disease / F. Endo, A. Kasai, J. S. Soto [et al.] // *Science (New York)*. – 2022. – Vol. 378, № 6619. – P. eadc9020. – DOI: 10.1126/science.adc9020
138. Molecular basis of lipopolysaccharide heterogeneity in *Escherichia coli*: envelope stress-responsive regulators control the incorporation of glycoforms with a third 3-deoxy- α -D-manno-oct-2-ulosonic acid and rhamnose / G. Klein, B. Lindner, H. Brade,

- S. Raina // *The Journal of biological chemistry*. – 2011. – Vol. 286, № 50. – P. 42787–42807. – DOI: 10.1074/jbc.M111.291799
139. Molecular logic of cellular diversification in the mouse cerebral cortex / D. J. Di Bella, E. Habibi, R. R. Stickels [et al.] // *Nature*. – 2021. – Vol. 595, № 7868. – P. 554–559. – DOI: 10.1038/s41586-021-03670-5
140. Mullen, R. J. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates / R. J. Mullen, C. R. Buck, A. M. Smith // *Development (Cambridge, England)*. – 1992. – Vol. 116, № 1. – P. 201–211. – DOI: 10.1242/dev.116.1.201
141. Multiple signals in anterior cingulate cortex / N. Kolling, T. Behrens, M. K. Wittmann, M. Rushworth // *Current opinion in neurobiology*. – 2016. – Vol. 37. – P. 36–43. – DOI: 10.1016/j.conb.2015.12.007
142. Natural product HTP screening for antibacterial (*E. coli* 0157:H7) and anti-inflammatory agents in (LPS from *E. coli* O111:B4) activated macrophages and microglial cells; focus on sepsis / E. A. Mazzio, N. Li, D. Bauer [et al.] // *BMC complementary and alternative medicine*. – 2016. – Vol. 16, № 1. – P. 467. – DOI: 10.1186/s12906-016-1429-x
143. Neocortical glial cell numbers in human brains / D. P. Pelvig, H. Pakkenberg, A. K. Stark, B. Pakkenberg // *Neurobiology of aging*. – 2008. – Vol. 29, № 11. – P. 1754–1762. – DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.013
144. Neuron densities vary across and within cortical areas in primates / C. E. Collins, D. C. Airey, N. A. Young [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2010. – Vol. 107, № 36. – P. 15927–15932. – DOI: 10.1073/pnas.1010356107
145. Neuronal mitochondria modulation of LPS-induced neuroinflammation / M. Harland, S. Torres, J. Liu, X. Wang // *The Journal of neuroscience*. – 2020. – Vol. 40, № 8. – P. 1756–1765. – DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2324-19.2020
146. New HSF1 inducer as a therapeutic agent in a rodent model of Parkinson's disease / I. V. Ekimova, D. V. Plaksina, Y. F. Pastukhov [et al.] // *Experimental neurology*. – 2018. – Vol. 306, P. 199–208. – DOI: 10.1016/j.expneurol.2018.04.012

147. New insights in animal models of neurotoxicity-induced neurodegeneration / C. Sanfeliu, C. Bartra, C. Suñol, E. Rodríguez-Farré // *Frontiers in neuroscience*. – 2024. – Vol. 17. – P. 1248727. – DOI: 10.3389/fnins.2023.1248727
148. New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons / J. Defelipe, P. L. López-Cruz, R. Benavides-Piccione [et al.] // *Nature reviews. Neuroscience*. – 2013. – Vol. 14, № 3. – P. 202–216. – DOI: 10.1038/nrn3444
149. New insights into the development of the human cerebral cortex / Z. Molnár, G. J. Clowry, N. Šestan [et al.] // *Journal of anatomy*. – 2019. – Vol. 235, № 3. – P. 432–451. – DOI: 10.1111/joa.13055
150. Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity / L. E. Clarke, S. A. Liddelow, C. Chakraborty [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2018. – Vol. 115, № 8. – P. E1896–E1905. – DOI: 10.1073/pnas.1800165115
151. Oligodendrocyte heterogeneity in the mouse juvenile and adult central nervous system / S. Marques, A. Zeisel, S. Codeluppi [et al.] // *Science (New York)*. – 2016. – Vol. 352, № 6291. – P. 1326–1329. – DOI: 10.1126/science.aaf6463
152. Oligodendroglia-to-pericyte conversion after lipopolysaccharide exposure is gender-dependent / Q. Yu, L. Zhang, T. Xu [et al.] // *PloS one*. – 2024. – Vol. 19, № 8. – P. e0308132. – DOI: 10.1371/journal.pone.0308132
153. Origins of cortical interneuron subtypes / Q. Xu, I. Cobos, E. De La Cruz [et al.] // *The journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. – 2004. – Vol. 24, № 11. – P. 2612–2622. – DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5667-03.2004
154. Outbreak of diarrhoea due to *Escherichia coli* O111:B4 in schoolchildren and adults: association of Vi antigen-like reactivity / M. K. Viljanen, T. Peltola, S. Y. Junnila [et al.] // *Lancet*. – 1990. – Vol. 336, № 8719. – P. 831–834. – DOI: 10.1016/0140-6736(90)92337-h
155. Outer membrane vesicles of gram-negative bacteria: an outlook on biogenesis / E. D. Avila-Calderón, M. D. S. Ruiz-Palma, M. G. Aguilera-Arreola [et al.] // *Frontiers in microbiology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 557902. – DOI: 10.3389/fmicb.2021.557902

156. Overstreet-Wadiche, L. Neurogliaform cells in cortical circuits / L. Overstreet-Wadiche, C. J. McBain // *Nature reviews. Neuroscience.* – 2015. – Vol. 16, № 8. – P. 458–468. – DOI: 10.1038/nrn3969
157. Pakkenberg, B. Neocortical neuron number in humans: effect of sex and age / B. Pakkenberg, H. J. Gundersen // *The journal of comparative neurology.* – 1997. – Vol. 384, № 2. – P. 312–320.
158. Paouri, E. Systemic and CNS inflammation crosstalk: implications for Alzheimer's disease / E. Paouri, S. Georgopoulos // *Current Alzheimer research.* – 2019. – Vol. 16, № 6. – P. 559–574. – DOI: 10.2174/1567205016666190321154618
159. Peripheral immune cells contribute to the pathogenesis of Alzheimer's disease / H. Zhang, F. Cao, Y. Zhou [et al.] // *Molecular neurobiology.* – 2025. – Vol. 62, № 1. – P. 264–270. – DOI: 10.1007/s12035-024-04266-6
160. Perivascular spaces and their role in neuroinflammation / B. V. Ineichen, S. V. Okar, S. T. Proulx [et al.] // *Neuron.* – 2022. – Vol. 110, № 21. – P. 3566–3581. – DOI: 10.1016/j.neuron.2022.10.024
161. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex / Petilla Interneuron Nomenclature Group, G. A. Ascoli, L. Alonso-Nanclares [et al.] // *Nature reviews. Neuroscience.* – 2008. – Vol. 9, № 7. – P. 557–568. – DOI: 10.1038/nrn2402
162. Pharmacologic suppression of neuronal oxidative damage and dendritic degeneration following direct activation of glial innate immunity in mouse cerebrum / D. Milatovic, S. Zaja-Milatovic, K. S. Montine [et al.] // *Journal of neurochemistry.* – 2003. – Vol. 87, № 6. – P. 1518–1526. – DOI: 10.1046/j.1471-4159.2003.02120.x
163. Pyramidal neuron subtype diversity governs microglia states in the neocortex / J. A. Stogsdill, K. Kim, L. Binan [et al.] // *Nature.* – 2022. – Vol. 608, № 7924. – P. 750–756. – DOI: 10.1038/s41586-022-05056-7
164. QuPath: Open-source software for digital pathology image analysis / P. Bankhead, M. B. Loughrey, J. A. Fernández [et al.] // *Scientific reports.* – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 16878. – DOI: 10.1038/s41598-017-17204-5

165. Ramón y Cajal, S. *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. Traduite de l'espagnol / S. Ramón y Cajal. – Paris, France, 1909. – Vol. 1–2. – P. 986.
166. Reconstruction of LPS transfer cascade reveals structural determinants within LBP, CD14, and TLR4-MD2 for efficient LPS recognition and transfer / J. K. Ryu, S. J. Kim, S. H. Rah [et al.] // *Immunity*. – 2017. – Vol. 46, № 1. – P. 38–50. – DOI: 10.1016/j.immuni.2016.11.007
167. Resistance physical exercise alleviates lipopolysaccharide-triggered neuroinflammation in cortex and hippocampus of rats via purinergic signaling / V. V. Miron, C. E. Assmann, V. B. Mostardeiro [et al.] // *Neurotoxicology*. – 2023. – Vol. 99. – P. 217–225. – DOI: 10.1016/j.neuro.2023.10.011
168. Roe, K. An inflammation classification system using cytokine parameters / K. Roe // *Scandinavian journal of immunology*. – 2021. – Vol. 93, № 2. – P. e12970. – DOI: 10.1111/sji.12970
169. Roles of neuropathology-associated reactive astrocytes: a systematic review / J. M. Lawrence, K. Schardien, B. Wigdahl, M. R. Nonnemacher // *Acta Neuropathologica Communications*. – 2023. – Vol. 11, № 1. – P. 42. – DOI: 10.1186/s40478-023-01526-9
170. Sambuchi, N. Cingulate cortex in pre-MCI cognition / N. Sambuchi, Y. E. Geda, B. F. Michel // *Handbook of clinical neurology*. – 2019. – Vol. 166. – P. 281–295. – DOI: 10.1016/B978-0-444-64196-0.00015-7
171. Schaefers, A. T. Rearing conditions and domestication background determine regulation of hippocampal cell proliferation and survival in adulthood-laboratory CD1 and C57Bl/6 mice versus wild house mice / A. T. Schaefers // *Neuroscience*. – 2013. – Vol. 228. – P. 120–127. – DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.10.020
172. Schneider, C. A. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis / C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri // *Nature methods*. – 2012. – Vol. 9, № 7. – P. 671–675. – DOI: 10.1038/nmeth.2089
173. Schröder, N. W. Non-LPS targets and actions of LPS binding protein (LBP) / N. W. Schröder, R. R. Schumann // *Journal of endotoxin research*. – 2005. – Vol. 11, № 4. – P. 237–242. – DOI: 10.1179/096805105X37420

174. Seemann, S. Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation / S. Seemann, F. Zohles, A. Lupp // *Journal of biomedical science*. – 2017. – Vol. 24, № 1. – P. 60. – DOI: 10.1186/s12929-017-0370-8
175. Semaglutide attenuates seizure severity and ameliorates cognitive dysfunction by blocking the NLR family pyrin domain containing 3 inflammasome in pentylenetetrazol-kindled mice / L. Wang, J. Ding, C. Zhu [et al.] // *International journal of molecular medicine*. – 2021. – Vol. 48, № 6. – P. 219. – DOI: 10.3892/ijmm.2021.5052
176. Shi, C. Combination of intracellular staining of retrogradely labeled neurons and anterograde fluorescent tracing: use of the confocal laser scanning microscope / C. Shi, M. D. Cassell // *Journal of neuroscience methods*. – 1993. – Vol. 47, № 1–2. – P. 23–31. – DOI: 10.1016/0165-0270(93)90018-m
177. Signature morphoelectric properties of diverse GABAergic interneurons in the human neocortex / B. R. Lee, R. Dalley, J. A. Miller [et al.] // *Science (New York)*. – 2023. – Vol. 382, № 6667. – P. eadf6484. – DOI: 10.1126/science.adf6484
178. Single step in vitro bioassay mimicking TLR4-LPS pathway and the role of MD2 and CD14 coreceptors / P. Jagtap, P. Prasad, A. Pateria [et al.] // *Frontiers in immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 5. – DOI: 10.3389/fimmu.2020.00005
179. Skrzypczak-Wiercioch, A. Lipopolysaccharide-induced model of neuroinflammation: mechanisms of action, research application and future directions for its use / A. Skrzypczak-Wiercioch, K. Sałat // *Molecules (Basel, Switzerland)*. – 2022. – Vol. 27, № 17. – P. 5481. – DOI: 10.3390/molecules27175481
180. Somogyi, P. The axo-axonic interneuron in the cerebral cortex of the rat, cat and monkey / P. Somogyi, T. F. Freund, A. Cowey // *Neuroscience*. – 1982. – Vol. 7, № 11. – P. 2577–2607. – DOI: 10.1016/0306-4522(82)90086-0
181. Sonic hedgehog signaling in astrocytes mediates cell type-specific synaptic organization / S. A. Hill, A. S. Blaeser, A. A. Coley [et al.] // *eLife*. – 2019. – Vol. 8. – P. e45545. – DOI: 10.7554/eLife.45545
182. Spatial atlas of the mouse central nervous system at molecular resolution / H. Shi, Y. He, Y. Zhou [et al.] // *Nature*. – 2023. – Vol. 622, № 7983. – P. 552–561. – DOI: 10.1038/s41586-023-06569-5

183. Stoufflet, J. Shaping the cerebral cortex by cellular crosstalk / J. Stoufflet, S. Tielens, L. Nguyen // *Cell*. – 2023. – Vol. 186, № 13. – P. 2733–2747. – DOI: 10.1016/j.cell.2023.05.040
184. Structural features of cerebral cortex in stereotaxic administration of lipopolysaccharide / A. A. Venediktov, E. A. Kuzmin, K. S. Pokidova [et al.] // Сборник научных статей по итогам III Международного студенческого научного форума «Морфоклинические аспекты фундаментальных и прикладных исследований». – Воронеж, 2025. – С. 204–207.
185. Systemic inflammation changes the site of RAGE expression from endothelial cells to neurons in different brain areas / J. Gasparotto, C. T. Ribeiro, H. T. da Rosa-Silva [et al.] // *Molecular neurobiology*. – 2019. – Vol. 56, № 5. – P. 3079–3089. – DOI: 10.1007/s12035-018-1291-6
186. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration / L. Qin, X. Wu, M. L. Block [et al.] // *Glia*. – 2007. – Vol. 55, № 5. – P. 453–462. – DOI: 10.1002/glia.20467
187. The Allen reference atlas: a digital color brain atlas of the C57BL/6J male mouse / H.-W. Dong, the Allen Institute for Brain Science. – New York: Wiley, 2008. – 376 p.
188. The anterior retrosplenial cortex encodes event-related information and the posterior retrosplenial cortex encodes context-related information during memory formation / S. Trask, S. E. Pullins, N. C. Ferrara, F. J. Helmstetter // *Neuropsychopharmacology*. – 2021. – Vol. 46, № 7. – P. 1386–1392. – DOI: 10.1038/s41386-021-00959-x
189. The development of modified human Hsp70 (HSPA1A) and its production in the milk of transgenic mice / Y. G. Gurskiy, D. G. Garbuz, N. V. Soshnikova [et al.] // *Cell stress & chaperones*. – 2016. – Vol. 21, № 6. – P. 1055–1064. – DOI: 10.1007/s12192-016-0729-x
190. The diverse members of the mammalian HSP70 machine show distinct chaperone-like activities / J. Hageman, M. A. van Waarde, A. Zylicz [et al.] // *The Biochemical journal*. – 2011. – Vol. 435. – P. 127–142. – DOI: 10.1042/BJ20101247

191. The influence of anterior cingulate GABA⁺ and glutamate on emotion regulation and reactivity in adolescents and adults / E. Widegren, M. A. Frick, J. M. Hoppe [et al.] // *Developmental psychobiology*. – 2024. – Vol. 66, № 4. – P. e22492. – DOI: 10.1002/dev.22492
192. The intracerebroventricular injection of lipopolysaccharide may induce neurogenic detrusor overactivity symptoms in mice / P. Chen, L. Yang, Y. Tong [et al.] // *Neurourology and urodynamics*. – 2022. – Vol. 41, № 4. – P. 894–904. – DOI: 10.1002/nau.24890
193. The mouse brain in stereotaxic coordinates, 5th edition / G. Paxinos, K. B. J. Franklin. – New York: Academic Press. – 2019. – 376 p.
194. The mouse nervous system / Eds.: C. Watson [et. al.] – San Diego: Elsevier Academic Press, 2012. – 814 p.
195. The NAD-dependent deacetylase sirtuin 2 is a suppressor of microglial activation and brain inflammation / T. F. Pais, É. M. Szegő, O. Marques [et al.] // *The EMBO journal*. – 2013. – Vol. 32, № 19. – P. 2603–2616. – DOI: 10.1038/emboj.2013.200
196. The NKCC1 ion transporter modulates microglial phenotype and inflammatory response to brain injury in a cell-autonomous manner / K. Tóth, N. Lénárt, P. Berki [et al.] // *PloS biology*. – 2022. – Vol. 20, № 1. – Art. № e3001526. – DOI: 10.1371/journal.pbio.3001526
197. The transcription factor nuclear factor interleukin 6 mediates pro- and anti-inflammatory responses during LPS-induced systemic inflammation in mice / J. Schneiders, F. Fuchs, J. Damm [et al.] // *Brain, behavior, and immunity*. – 2015. – Vol. 48. – P. 147–164. – DOI: 10.1016/j.bbi.2015.03.008
198. TLR4-dependent DUOX2 activation triggered oxidative stress and promoted HMGB1 release in dry eye / B. Wang, H. Zeng, X. Zuo [et al.] // *Frontiers in medicine*. – 2022. – Vol. 8. – P. 781616. – DOI: 10.3389/fmed.2021.781616
199. TLR4-dependent neuroinflammation mediates LPS-driven food-reward alterations during high-fat exposure / S. J. P. Huwart, C. Fayt, G. Gangarossa [et al.] // *Journal of neuroinflammation*. – 2024. – Vol. 21, № 1. – P. 305. – DOI: 10.1186/s12974-024-03297-z

200. TLR-mediated signal transduction and neurodegenerative disorders / S. V. Adhikarla, N. K. Jha, V. K. Goswami [et al.] // *Brain sciences*. – 2021. – Vol. 11, № 11. – P. 1373. – DOI: 10.3390/brainsci11111373
201. Total ginsenosides decrease A β production through activating PPAR γ / S. He, J. Shi, L. Ma [et al.] // *Biomedicine & pharmacotherapy*. – 2024. – Vol. 174. – P. 116577. – DOI: 10.1016/j.biopha.2024.116577
202. Transcriptomic and anatomic parcellation of 5-HT₃AR expressing cortical interneuron subtypes revealed by single-cell RNA sequencing / S. Frazer, J. Prados, M. Niquille [et al.] // *Nature communications*. – 2017. – Vol. 8. – P. 14219. – DOI: 10.1038/ncomms14219
203. TRIF is a key inflammatory mediator of acute sickness behavior and cancer cachexia / K. G. Burfeind, X. Zhu, P. R. Levasseur [et al.] // *Brain, behavior, and immunity*. – 2018. – Vol. 73. – P. 364–374. – DOI: 10.1016/j.bbi.2018.05.021
204. TRPV1 is crucial for proinflammatory STAT3 signaling and thermoregulation-associated pathways in the brain during inflammation / A. Yoshida, E. Furube, T. Mannari [et al.] // *Scientific reports*. – 2016. – Vol. 6. – P. 26088. – DOI: 10.1038/srep26088
205. Turturici, G. HSP70 and its molecular role in nervous system diseases / G. Turturici, G. Sconzo, F. Geraci // *Biochemistry Research International*. – 2011. – Vol. 2011. – P. 618127. – DOI: 10.1155/2011/618127
206. Upregulation of insulin-like growth factor binding protein 3 in astrocytes of transgenic mice that express Borna disease virus phosphoprotein / T. Honda, K. Fujino, D. Okuzaki [et al.] // *Journal of virology*. – 2011. – Vol. 85, № 9. – P. 4567–4571. – DOI: 10.1128/JVI.01817-10
207. Vogt, B. A. Cingulate cortex in Parkinson's disease / B. A. Vogt // *Handbook of clinical neurology*. – 2019. – Vol. 166. – P. 253–266. – DOI: 10.1016/B978-0-444-64196-0.00013-3
208. Vogt, B. A. Cytoarchitecture of mouse and rat cingulate cortex with human homologies / B. A. Vogt, G. Paxinos // *Brain structure and function*. – 2014. – Vol. 219, № 1. – P. 185–192.

209. Westphal, O. Bacterial lipopolysaccharides extraction with phenol-water and further applications of the procedure / O. Westphal, K. Jann // *Methods in carbohydrate Chemistry*. – 1965. – Vol. 5. – P. 83–91.
210. Where is cingulate cortex? A cross-species view / S. van Heukelum, R. B. Mars, M. Guthrie [et al.] // *Trends in neurosciences*. – 2020. – Vol. 43, № 5. – P. 285–299. – DOI: 10.1016/j.tins.2020.03.007
211. Woodburn, S. C. The semantics of microglia activation: neuroinflammation, homeostasis, and stress / S. C. Woodburn, J. L. Bollinger, E. S. Wohleb // *Journal of neuroinflammation*. – 2021. – Vol. 18. – P. 258. – DOI: 10.1186/s12974-021-02309-6
212. Xin, Y. Y. Electroacupuncture ameliorates neuroinflammation in animal models / Y. Y. Xin, J. X. Wang, A. J. Xu // *Acupuncture in medicine: journal of the British Medical Acupuncture Society*. – 2022. – Vol. 40, № 5. – P. 474–483. – DOI: 10.1177/09645284221076515
213. Yang, R. A potential new pathway for heparin treatment of sepsis-induced lung injury: inhibition of pulmonary endothelial cell pyroptosis by blocking hMGB1-LPS-induced caspase-11 activation / R. Yang, X. Zhang // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. – 2022. – Vol. 12. – P. 984835. – DOI: 10.3389/fcimb.2022.984835
214. Yi, Y. S. Caspase-11 non-canonical inflammasome: a critical sensor of intracellular lipopolysaccharide in macrophage-mediated inflammatory responses / Y. S. Yi // *Immunology*. – 2017. – Vol. 152, № 2. – P. 207–217. – DOI: 10.1111/imm.12787
215. Zamyatina, A. Lipopolysaccharide recognition in the crossroads of TLR4 and caspase-4/11 mediated inflammatory pathways / A. Zamyatina, H. Heine // *Frontiers in immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 585146. – DOI: 10.3389/fimmu.2020.585146
216. Zhan, X. Lipopolysaccharide associates with amyloid plaques, neurons and oligodendrocytes in Alzheimer's disease brain: a review / X. Zhan, B. Stamova, F. R. Sharp // *Frontiers in aging neuroscience*. – 2018. – Vol. 10. – P. 42. – DOI: 10.3389/fnagi.2018.00042
217. Zhang, M. Connexin 43 phosphorylation: implications in multiple diseases / M. Zhang, Z. Z. Wang, N. H. Chen // *Molecules (Basel, Switzerland)*. – 2023. – Vol. 28, № 13. – P. 4914. – DOI: 10.3390/molecules28134914

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность:

Сергею Львовичу Кузнецову за возможность научного роста и внимательное руководство;

Геннадию Александровичу Пьявченко за плодотворную дискуссию и содействие любым начинаниям;

Андрею Альбертовичу Венедиктову за глубокое и тщательное обсуждение работы и всеобъемлющую поддержку;

Егору Александровичу Кузьмину и **Ксении Сергеевне Покидовой** за помощь в освоении методов и удовольствие трудиться вместе с профессионалами высочайшего уровня.