

*На правах рукописи*

*Венедиктов*

**Венедиктов Артем Андреевич**

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

1.5.22. Клеточная биология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва – 2026

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

**Научный руководитель:**

член-корреспондент РАН

доктор медицинских наук, профессор

**Кузнецов Сергей Львович**

**Официальные оппоненты:**

**Боголепова Ирина Николаевна** – академик Российской академии наук, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Российский центр неврологии и нейронаук», Институт мозга, Лаборатория цитоархитектоники и эволюции мозга (с музеем эволюции мозга), руководитель лаборатории

**Румянцева Татьяна Анатольевна** – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра анатомии человека, заведующая кафедрой

**Ведущая организация:** федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «25» мая 2026 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.31 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119048, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, с. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д. 37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>.

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

**Блинова Екатерина Валериевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Нейроны в коре больших полушарий головного мозга подвергаются разнообразным морфофункциональным изменениям при проникновении через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) веществ бактериального происхождения [48]. Постепенное 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, опосредованно приводящую к повреждению нейронов без воспаления в классическом понимании. При этом под термином «хроническое системное воспаление» подразумевается низкоинтенсивное (как правило, повторяющееся) неинфекционное повреждение тканей, которое сопровождается активацией каких-либо клеточных или гуморальных иммунных факторов, но синдром системной воспалительной реакции или сепсис не развиваются.

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. 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.

Изучение морфофункциональных параметров нервных клеток в коре больших полушарий головного мозга при хроническом системном воспалении и нейровоспалении актуально, так как позволит сделать выводы о закономерностях повреждения нейронов.

### Степень разработанности темы

В последние годы ряд исследований посвящен воздействию веществ бактериальной природы, повреждающему нейроны в головном мозге [158, 211]. В основном уделяется внимание либо острому повреждению высокой интенсивности, при котором возникает системная воспалительная реакция с нарушением целостности ГЭБ [145, 197] вплоть до лейкоцитарной 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, 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.

Мало изучены 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.

Задачи исследования:

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. 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. Впервые установлено, что у мышей повышенная экспрессия

человеческого белка теплового шока HSPA1A семейства HSP70 сопровождается умеренно благоприятным эффектом при интракортикальном введении ЛПС.

### **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 морфофункциональных изменений в нейронах и нейроглии на срезах головного мозга при окраске гематоксилином и эозином, толуидиновым синим по методу Ниссля, антителами к маркерам NeuN, GFAP, SOX9, Iba1, ФНО- $\alpha$  и каспазе-3. 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 исследования принадлежат А.А. Венедиктову. Автором спланированы и проведены все эксперименты, 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 опухолей 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 интракортикально 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 диссертационного исследования научных результатов была произведена в форме 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 и 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.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация написана 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.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

Исследование включало 72 мыши линии C57BL/6J и по 8 мышей линий HSP70 (эндо) и HSP70 (экзо), т. е. 88 животных, и выполнено в соответствии с Принципами надлежащей лабораторной практики согласно межгосударственному стандарту ГОСТ 33044-2014. Все манипуляции с животными одобрены Локальным этическим комитетом Сеченовского университета 20.01.2022, протокол № 01-22.

Для введений ЛПС применялся эндотоксин кишечной палочки (*Escherichia coli*) серовара O111:B4. По достижении контрольных точек животных выведены из эксперимента с последующим незамедлительным забором органов (4 суток после введения ЛПС для внутрибрюшинного введения, 2 суток – для стереотаксического введения). Для эвтаназии

вводилось 5 мг/кг ксилазина гидрохлорида (Interchemie, Нидерланды) и 40 мг/кг тилетамина/золазепам (Virbac, Франция) с последующей декапитацией на гильотине (НПК «Открытая наука», Россия).

В первом эксперименте изучены морфофункциональные характеристики нейронов головного мозга при воздействии доз 0,5, 1 и 2 мг/кг массы тела. Мышам внутрибрюшинно был введен физиологический раствор или ЛПС. На срезах головного мозга выполнено гистологическое исследование с окрашиванием гематоксилином и эозином, толуидиновым синим по методу Ниссля с оценкой качественных изменений, иммуногистохимическое исследование с оценкой количественных изменений по экспрессии маркера NeuN. Для оценки структурно-функциональных показателей, характеризующих состояние нейроглии, были проведены эксперименты 2 и 3. 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  $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ).

Для исследования прямого воздействия ЛПС на кору больших полушарий головного мозга был выполнен эксперимент п/п 4. В него было включено шесть групп самок мышей возрастом 3 месяца, а именно: интактные мыши C57Bl6/J; мыши C57Bl6/J, интракортикальное введение физиологического раствора; мыши C57Bl6/J, интракортикальное введение ЛПС; мыши C57Bl6/J, внутрижелудочковое введение ЛПС; мыши HSP70 (эндо), интракортикальное введение ЛПС; 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. 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. 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.

Гистологические препараты изготовлены согласно стандартным протоколам. Для иммуногистохимической окраски антитела к белкам-маркерам использовались 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- $\alpha$  – 1:300, к каспазе-3 – 1:100 (таблица 1).

Таблица 1 – Антитела, использованные для иммуногистохимического исследования

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

Для оценки качественных изменений в нейронах препараты головного мозга мышей, окрашенные по рутинным методикам, были просмотрены на микроскопе Axio Imager.A1 (Carl Zeiss, Германия). Для внутрибрюшинного введения проведен анализ качественных и количественных изменений в поясной коре (Cg1/ACAd), а для оценки состояния нейроглии – близлежащих и однородных с поясной по составу нейроглии передней ретроспленальной (aRSC) и прелимбической коре (PLC). Для стереотаксического исследования изучены также участки первичной и вторичной моторной коры (M1 и M2). Подсчет иммуногистохимических количественных показателей выполнен при помощи программного обеспечения для машинного обучения (нейросети) с открытым кодом QuPath 0.5.0 (Королевский Университет Белфаста, Северная Ирландия, Соединенное Королевство).

Статистическая обработка данных выполнена на ЭВМ при помощи пакета программных решений OriginPro 2024 (OriginLab, США). 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 –  $Me (25L; 75U)$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Во всех экспериментах и группах с внутрибрюшинным введением ЛПС вне зависимости от дозы 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 перичеселлюлярный отек, отмечена гиперхромность отдельных ядер и просветление цитоплазмы, т. е. явления кариоцитолита. Лимфоцитарной инфильтрации в изокортексе не отмечено. Результаты исследования с ферментативным и флуоресцентным окрашиванием к NeuN представлены в таблицах 2 и 3. Изменение характеристик нейронов хорошо различимо при иммунофлуоресцентном окрашивании антителами к NeuN, как показано на рисунке 1.

Таблица 1 – Количество NeuN<sup>+</sup> нейронов в поясной коре (Cg1) у мышей при ферментативном окрашивании,  $M \pm SE$ ,  $n = 12$  ( $p \leq 0,05$ )

Группы сравнения	Количество NeuN <sup>+</sup> нейронов		Значение p
	В поле зрения (об. 10)	На 1 мм <sup>2</sup>	
Физиологический раствор (контрольная группа)	3594,8 ± 207,63	9985,6 ± 576,75	Не применимо
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

Таблица 2 – Количество NeuN<sup>+</sup> нейронов в поясной коре (Cg1) у мышей при флуоресцентном окрашивании,  $M \pm SE$ ,  $n = 6$  ( $p \leq 0,05$ )

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

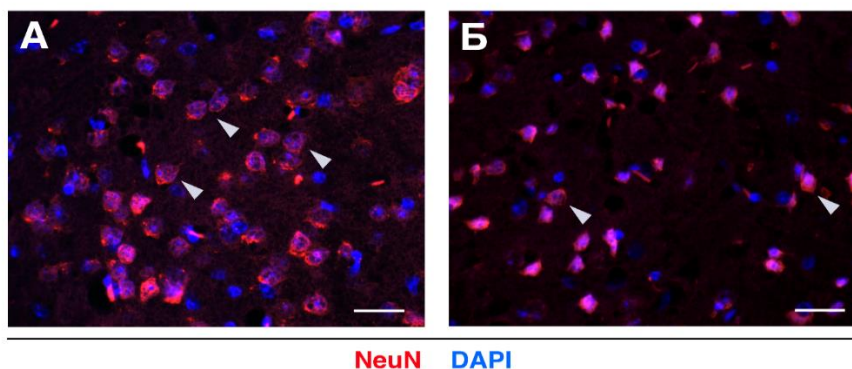


Рисунок 1 – Микрофотографии фрагментов поясной коры (Cg1) в изокортексе у мышей при внутрибрюшинном введении липополисахарида. Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к NeuN: (А) физиологический раствор; (Б) липополисахарид в дозе 1 мг/кг массы тела. Размер шкалы: 100 мкм, об. ×10. Обозначены нейроны,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

Результаты подсчета количества GFAP<sup>+</sup> астроцитов в поясной коре при флуоресцентном иммуногистохимическом окрашивании приведены ниже (таблица 3).

Таблица 3 – Количество GFAP<sup>+</sup> астроцитов в поясной коре (Cg1) у мышей при флуоресцентном окрашивании,  $M \pm SE$ ,  $n = 10$  ( $p \leq 0,05$ )

Группы сравнения	Количество GFAP <sup>+</sup> астроцитов	Значение p
Физиологический раствор (контрольная группа)	$2,0 \pm 0,44$	0,0000077
ЛПС 1 мг/кг массы тела	$9,0 \pm 1,38$	

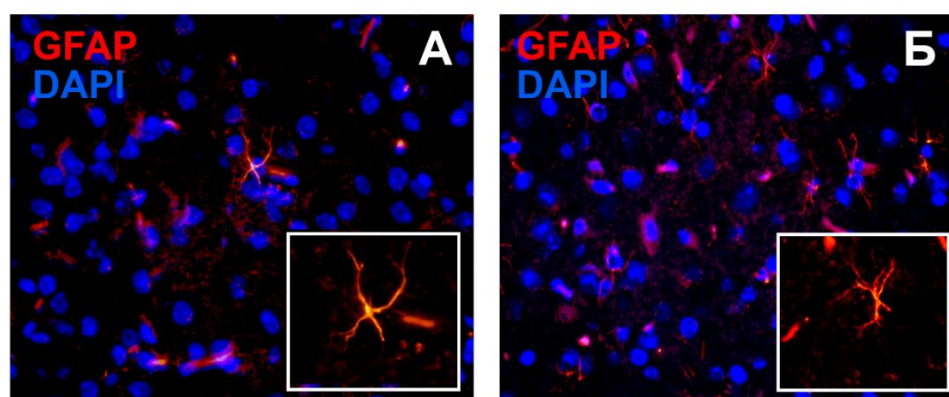


Рисунок 2 – Микрофотографии фрагментов поясной коры (Cg1) в изокортексе у мышей при внутрибрюшинном введении липополисахарида. Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к GFAP; участки коры головного мозга у мышей, которым вводили: (А) физиологический раствор; (Б) липополисахарид в дозе 1 мг/кг массы тела. Об.  $\times 40$ . В правом нижнем углу каждой микрофотографии – окрашенный GFAP<sup>+</sup> астроцит

Астроциты в V и VI пластинках (слоях) поясной коры показаны на рисунке 2. Активация цитоскелета, в котором у астроцитов находится GFAP, происходит не только в телах, но и практически во всех отростках клеток.

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 4).

Таблица 4 – Количество участков Iba1<sup>+</sup> микроглиоцитов в поясной (Cg1) и передней ретроспленальной (aRSC) коре у мышей при ферментативном окрашивании, Me (25L; 75U),  $n = 10$  ( $p \leq 0,05$ )

Группы сравнения	Количество Iba1 <sup>+</sup> 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)	

Изучение количества участков микроглиоцитов с экспрессией Iba1 было повторено для других доз ЛПС с анализом поясной коры без ретроспленальной (таблица 5). Продемонстрировано увеличение этого показателя, у животных, получавших его в дозе 2 мг/кг.

Таблица 5 – Количество участков Iba1<sup>+</sup> микроглиоцитов в поясной коре (Cg1) у мышей при ферментативном окрашивании,  $M \pm SE$ ,  $n = 15$  ( $p \leq 0,05$ )

Группы сравнения	Количество Iba1 <sup>+</sup> 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

Также определено количество Iba1<sup>+</sup> клеток, окрашенных флуорохромом, в поясной коре при введении ЛПС в дозе 1 мг/кг массы тела животных. Выявлено увеличение экспрессии Iba1 при данном режиме дозирования (таблица 6).

Таблица 6 – Количество Iba1<sup>+</sup> клеток микроглии в передней цингулярной коре (Cg1) у мышей при флуоресцентном окрашивании,  $M \pm SE$ ,  $n = 10$  ( $p \leq 0,05$ )

Группы сравнения	Количество Iba1 <sup>+</sup> микроглиоцитов	Значение p
Физиологический раствор (контрольная группа)	4,75 ± 0,97	p = 0,03
ЛПС 1 мг/кг массы тела	9,5 ± 1,80	

На рисунке 3 на микрофотографиях поясной коры при флуоресцентном окрашивании к Iba1 видны отростки микроглиоцитов.

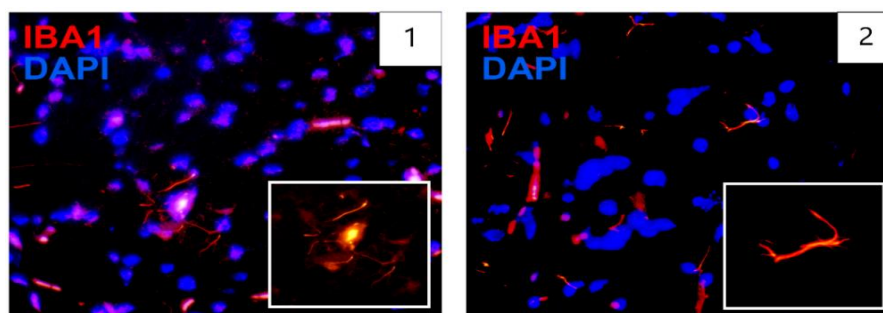


Рисунок 3 – Микрофотографии фрагментов поясной коры (Cg1) в изокортексе у мышей при внутрибрюшинном введении липополисахарида. Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к Iba1: (1) физиологический раствор; (2) липополисахарид в дозе 1 мг/кг массы тела. Об. ×10. В правом нижнем углу каждой микрофотографии – окрашенный флуорохромом микроглиоцит

Изучены 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, учитывали отдельно для поясной и прелимбической коры, при этом для этих двух областей показан различный характер изменений (таблица 7). 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 7 – Площадь поля зрения, окрашенного антителами к ФНО-α, в поясной (Cg1) и прелимбической (PLC) коре у мышей,  $M \pm SE$ ,  $n = 10$  ( $p \leq 0,05$ )

Группы сравнения		Площадь ФНО-α <sup>+</sup> поля зрения, а. у.
NaCl раствор 0,9 % (контрольная группа)	Cg1	620120,5 ± 24302,17
	PLC	617527,1 ± 21441,96
ЛПС 1 мг/кг массы тела	Cg1	740751,92 ± 29563,25*
	PLC	669220,3 ± 18127,65

Экспрессия каспазы-3 (таблица 8) в цитоплазме клеток поясной коры практически не менялась. Среднее значение даже несколько ниже для выборки животных, получавших инъекции ЛПС. Это в целом соответствует данным гистологического исследования при окраске гематоксилином-эозином и толуидиновым синим.

Таблица 8 – Площадь цитоплазмы клеток, окрашенной антителами к каспазе-3, в поясной коре (Cg1) при флуоресцентном окрашивании,  $M \pm SE$ ,  $n = 10$  ( $p \leq 0,05$ )

Группы сравнения	Площадь каспаза-3 <sup>+</sup> цитоплазмы, а. у.	Значение p
NaCl раствор 0,9 % (контрольная группа)	759218,3 ± 22477,84	0,09
ЛПС 1 мг/кг массы тела	663152,0 ± 49667,37	

Стереотаксическое введение принципиально отличалось от внутривентрикулярного не только способом доставки ЛПС, но и выполнением манипуляций под наркозом под контролем физиологических показателей. При лазерной спекл-контрастной визуализации верификация места введения (рисунок 4) проводилась за счет наблюдения за менингеальным кровотоком в области моторной коры.

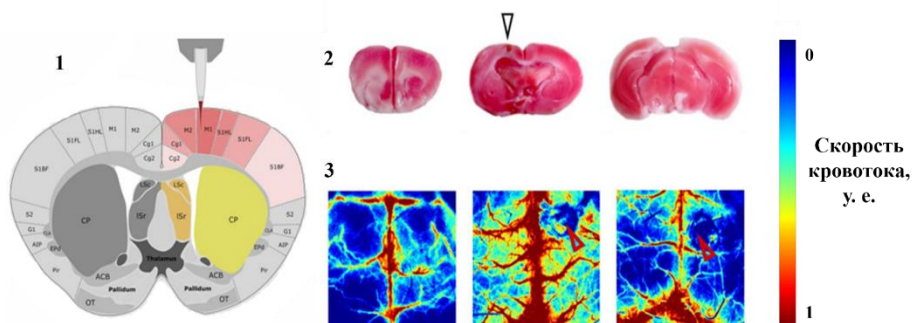


Рисунок 4 – Верификация места введения: (1) схематичное изображение коронального среза головного мозга мыши с целевой зоной для интракортикального введения; (2) обработка тканей головного мозга трифенилтетразолия хлоридом; (3) лазерная спекл-контрастная визуализация в месте введения. Кровоток в области 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

В установке «приподнятый крестообразный лабиринт» мыши перемещались между освещенным (вертикальный на фотографии) и затемненным (горизонтальный на фотографии) рукавами установки. Из рисунка 5 видно, что у мышей без стереотаксических введений происходили относительно равномерно в течение 5 минут прохождения моторного теста с незначительным доминированием затемненного рукава. При введении ЛПС моторная активность предполагает доминирование одного из его отсеков либо почти полное отсутствие перемещений.

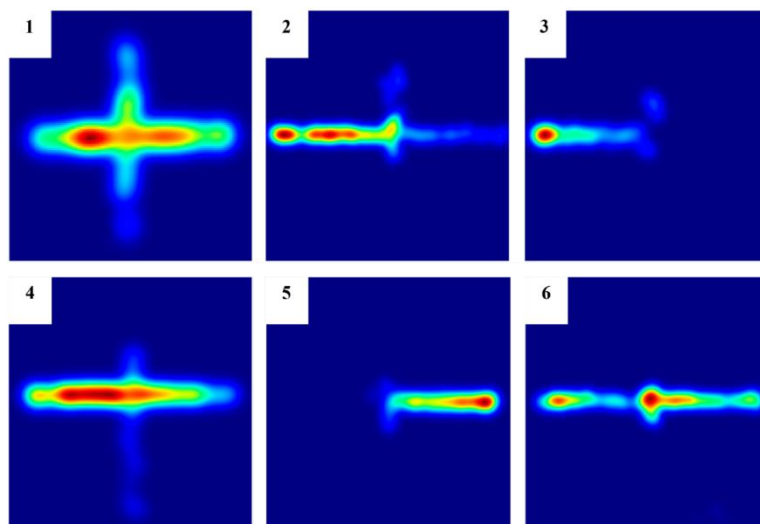


Рисунок 5 – Тепловые карты пребывания мышей в установке «приподнятый крестообразный лабиринт»: (1) интактные мыши C57Bl6/J; (2) мыши C57Bl6/J, интракортикальное введение физиологического раствора; (3) мыши C57Bl6/J, внутрижелудочковое введение ЛПС; (4) мыши C57Bl6/J, интракортикальное введение ЛПС; (5)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

В случае с установкой «открытое поле» динамика моторной активности выражена не так явно, как для теста «приподнятый крестообразный лабиринт» (рисунок 6).

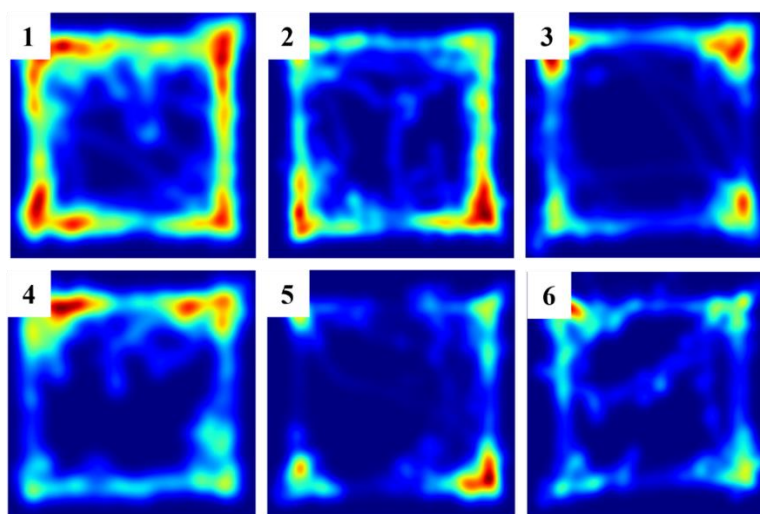


Рисунок 6 – Тепловые карты пребывания мышей в установке «открытое поле»: (1) интактные мыши C57Bl6/J; (2) мыши C57Bl6/J, интракортикальное введение физиологического раствора; (3) мыши C57Bl6/J, внутрижелудочковое введение ЛПС; (4) мыши C57Bl6/J, интракортикальное введение ЛПС; (5) мыши HSP70 (экзо),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

Выполнено также гистологическое исследование соответствующих препаратов. На рисунках 7 и 8 представлены микрофотографии препаратов головного мозга, использовавшиеся для морфометрического исследования с подсчетом количества нейронов в первичной (M1) и вторичной (M2) моторной коре больших полушарий головного мозга

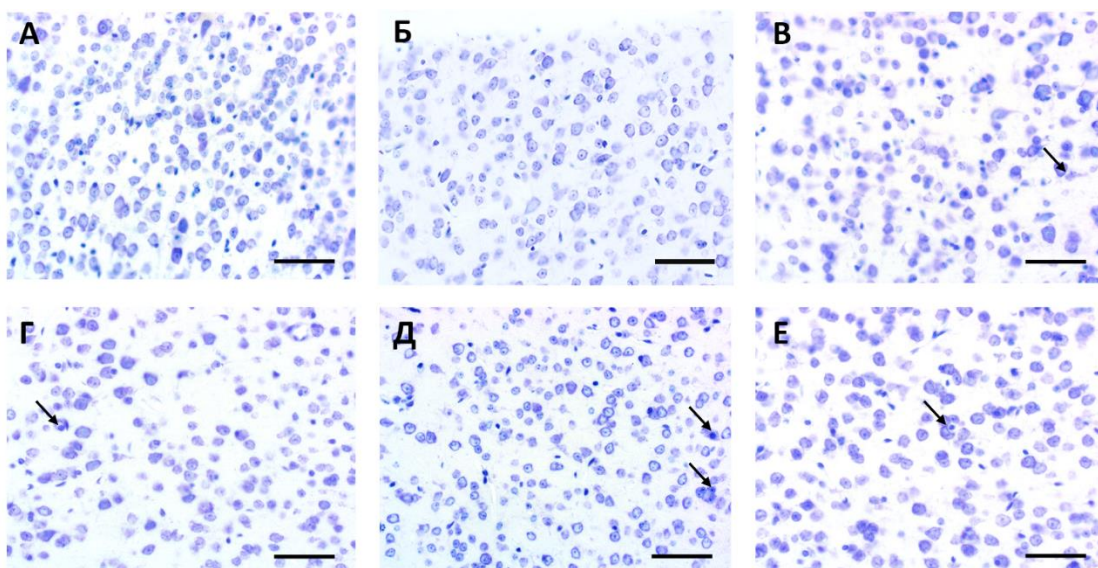


Рисунок 7 – Микрофотографии фрагментов первичной моторной коры (M1): (А) интактные мыши; (Б) интракортикальное введение физиологического раствора; (В) интракортикальное введение ЛПС; (Г) внутрижелудочковое введение ЛПС; (Д) мыши HSP70 (эндо), интракортикальное введение ЛПС; (Е) мыши HSP70 (экзо), интракортикальное введение ЛПС. Окрашивание толуидиновым синим. Шкала: 100 мкм, об.  $\times 10$

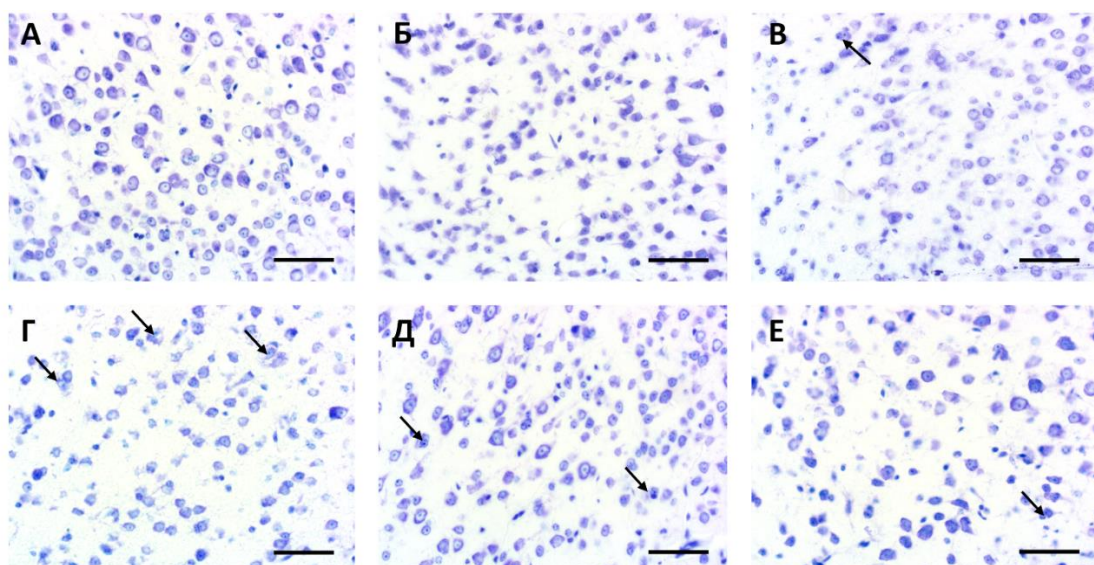


Рисунок 8 – Микрофотографии фрагментов вторичной моторной коры (M2): (А) интактные мыши; (Б) интракортикальное введение физиологического раствора; (В) интракортикальное введение ЛПС; (Г) внутрижелудочковое введение ЛПС; (Д) мыши HSP70 (эндо), интракортикальное введение ЛПС; (Е) мыши HSP70 (экзо), интракортикальное введение ЛПС. Окрашивание толуидиновым синим. Шкала: 100 мкм, об.  $\times 10$

Результаты морфометрического исследования для препаратов, окрашенных толуидиновым синим, приведены ниже в таблицах 9 и 10.

Таблица 9 – количество нейронов в первичной моторной коре (M1) у мышей при окрашивании толуидиновым синим,  $M \pm SE$ ,  $n = 30$  ( $p \leq 0,05$ )

Группы сравнения	Количество нейронов
Интактные мыши C57Bl6/J	231,5 ± 9,93
C57Bl6/J, введение NaCl раствор 0,9 % в моторную кору	154,9 ± 8,51
C57Bl6/J, введение ЛПС 12 мкг/кг в моторную кору	184,4 ± 5,35
C57Bl6/J, введение ЛПС 12 мкг/кг в боковой желудочек	163,9 ± 7,40
HSP70 (эндо), введение ЛПС 12 мкг/кг в моторную кору	198,0 ± 4,87
HSP70 (экзо), введение ЛПС 12 мкг/кг в моторную кору	180,1 ± 4,24

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 M1 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). Для морфометрического исследования в M2 большинство выявленных закономерностей, как видно из табличных и графических значений, во многом идентичны таковым для M1.

Таблица 10 – Количество нейронов во вторичной моторной коре (M2) у мышей при окрашивании толуидиновым синим,  $M \pm SE$ ,  $n = 30$  ( $p \leq 0,05$ )

Группы сравнения	Количество нейронов
Интактные мыши C57Bl6/J	228,6 ± 6,20
C57Bl6/J, введение NaCl раствор 0,9 % в моторную кору	199,2 ± 4,33
C57Bl6/J, введение ЛПС 12 мкг/кг в моторную кору	225,4 ± 3,50
C57Bl6/J, введение ЛПС 12 мкг/кг в боковой желудочек	168,5 ± 4,32
HSP70 (эндо), введение ЛПС 12 мкг/кг в моторную кору	201,1 ± 3,54
HSP70 (экзо), введение ЛПС 12 мкг/кг в моторную кору	200,3 ± 7,13

В ходе исследования установлено, что морфологические особенности нейронов в изокортексе у мышей после 4 суток введения ЛПС в дозе 1 мг/кг массы тела 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].

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 цитоархитектонике и физиологическим характеристикам передней ретроспленальной коре больших полушарий головного мозга астроглиа и микроглиа, 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- $\alpha$  и каспазы-3, выявлены разные закономерности для каждого из них. В поясной коре больших полушарий головного мозга площадь межклеточного вещества с окрашиванием антителами к ФНО- $\alpha$  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- $\alpha$  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. Требуется обсуждения расхождение в уровнях ФНО- $\alpha$  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.

Также необходимо отметить, что астроциты и микроглиоциты не в равной степени образуют ФНО- $\alpha$  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- $\alpha$  в ЦНС [34, 36]. Следовательно, можно предполагать дозозависимый уровень секреции. Кроме того, уровни ФНО- $\alpha$  остаются повышенными спустя длительное время после введения ЛПС [186].

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 наблюдается 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 перипеллюлярного 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 глимфатического 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 нейрона в I и VI пластинках коры и гиппокампе у 8-недельных мышей [32].

Вместе с тем нет сведений об апробировании подобного режима именно для интракортикального 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 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.

## 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- $\alpha$ , 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 интракорткального – не снижается.

3. У животных с повышенной экспрессией белка HSPA1A спустя сутки после интракорткального 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, внутрижелудочно и интракорткально в дозе 12 мкг/кг однократно), позволяющих моделировать реактивные изменения в нервных клетках без признаков воспаления.

5. При внутрибрюшинном, внутрижелудочковом и интракорткальном 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. Внутрибрюшинное 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 сопровождаются 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. 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, В. В. Голоборщева, Г. А. Пьявченко, С. Л. Кузнецов // **Сеченовский вестник**. – 2024. – Т. 15, № 3. – С. 48–57. [Scopus].

2. **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.

3. 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. Ю. Измайлов Г. А. Пьявченко, С. Л. Кузнецов // **Тверской медицинский журнал**. – 2024. – Т. 6. – С. 12–15.

4. 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, Д. М. Оганесян, А. Т. Степаньян, Т. В. Боронихина, Г. А. Пьявченко, С. Л. Кузнецов // **Молекулярная медицина**. – 2024. – Т. 16, № 5. – С. 14–23.

5. Реактивная микроглия при внутрибрюшинном введении липополисахарида / **А. А. Венедиктов**, Е. А. Кузьмин, К. С. Покидова, Г. А. Пьявченко, С. Л. Кузнецов // **Патогенез**. – 2024. – Т. 22, № 2. – С. 48–50.

6. Маркеры GFAP, Iba1, TNF- $\alpha$  и каспаза-3 в цингулярной коре большого мозга у мышей после внутрибрюшинного введения липополисахарида / **А. А. Венедиктов**, Е. А. Кузьмин, К. С. Покидова, Д. М. Оганесян, А. Т. Степаньян, Т. В. Боронихина, Г. А. Пьявченко, С. Л. Кузнецов // **Молекулярная медицина**. – 2025. – Т. 23, № 6. – С. 14–20.

7. Маркеры кортикальных астроцитов при внутрибрюшинном введении липополисахарида / **А. А. Венедиктов**, К. С. Покидова, Е. А. Кузьмин, Г. А. Пьявченко, С. Л. Кузнецов // **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., 11 декабря 2025, г. Новосибирск – С. 55–58.

8. Морфофункциональные изменения у мышей при внутрижелудочковом и интракорткальном 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., 20-21 марта 2025, г. Санкт-Петербург – С. 192–193.

9. Structural features of cerebral cortex in stereotaxic administration of lipopolysaccharide / **A. Venediktov**, E. A. Kuzmin, K. S. Pokidova, G. A. Piavchenko, S. L. Kuznetsov // Сборник научных статей по итогам III Международного научного студенческого форума «Морфоклинические аспекты фундаментальных и прикладных исследований», 15 ноября 2025, г. Воронеж – С. 204–207.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ИГХ – иммуногистохимическое исследование с ферментативным окрашиванием

ИФ – иммуногистохимическое исследование с флуоресцентным окрашиванием

ЛПС – липополисахарид

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)

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

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)