

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКОЙ И ГАМКЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМ В ГИППОКАМПЕ КРЫСЫ ПОСЛЕ ОККЛЮЗИИ СРЕДНЕЙ МОЗГОВОЙ АРТЕРИИ И ЦЕНТРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА

© 2023 Т.С. Калинина¹, Г.Т. Шишкина^{1*}, Д.А. Ланшаков¹, Е.В. Сухарева¹, М.В. Онуфриев², Ю.В. Моисеева², Н.В. Гуляева², Н.Н. Дыгало¹

¹ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, 600090 Новосибирск, Россия; электронная почта: gtshi@bionet.nsc.ru

² ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, 117485 Москва, Россия

Поступила в редакцию 23.11.2022

После доработки 14.03.2023

Принята к публикации 14.03.2023

Среди ответов на ранних стадиях инсульта ключевое значение для развития постишемических функциональных последствий имеет активация нейродегенеративных и провоспалительных процессов в гиппокампе. Однако остается не вполне ясным, какие именно гены вовлечены в эти процессы. Целью данной работы было сравнительное исследование экспрессии генов, кодирующих транспортеры и рецепторы глутамата и ГАМК, а также маркеров воспаления в гиппокампе через сутки после двух видов ишемического воздействия (окклюзии средней мозговой артерии (МСАО) по модели Коизуми – МСАО-МК и по модели Лонга – МСАО-МЛ), а также после прямой провоспалительной активации центральным введением бактериального липополисахарида (LPS). Полученные результаты выявили различия и сходства между ответами на примененные в работе воздействия. После МСАО-МЛ и введения LPS обнаружено большее число изменивших экспрессию генов, связанных с активацией апоптоза и нейровоспаления, рецепцией глутамата, а также маркеров ГАМКергической системы, чем после МСАО-МК. В свою очередь, МСАО-МК и LPS характеризовались, по сравнению с МСАО-МЛ, изменением большего числа генов, вовлекаемых в транспорт глутамата. Наиболее ярко проявившимися отличиями МСАО-МЛ от МСАО-МК и LPS явились изменения в экспрессии генов кальмодулина и кальмодулин-зависимых киназ. Выявленные особенности ответов транскриптома гиппокампа на две модели ишемии в результате МСАО и прямой провоспалительный стимул будут способствовать дальнейшему пониманию причин и молекулярных механизмов, лежащих в основе разнообразия последствий инсультов как в модельных исследованиях, так и в клинике.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гиппокамп, окклюзия средней мозговой артерии, липополисахарид, глутамат, ГАМК, экспрессия генов.

DOI: 10.31857/S0320972523040097, **EDN:** ALGGNS

ВВЕДЕНИЕ

Острое нарушение кровоснабжения области мозга, преимущественно неокортекса, в результате ишемии в бассейне средней мозговой артерии в течение нескольких часов провоцирует гибель клеток и формирование очага инфаркта. Причиной этих событий считают нехватку питательных веществ и кислород-

ное голодание. Однако при ишемии погибают клетки и в «отдаленных» структурах мозга, таких как гиппокамп, непосредственно не получающие кровоснабжение по поврежденным сосудам [1]. Гиппокамп играет ключевую роль в контроле психоэмоционального состояния, обучения и памяти [2]. С дегенерацией нейронов этой структуры связывают развитие психопатологий, в том числе и постишемической

Принятые сокращения: LPS – липополисахарид; МСАО – окклюзия средней мозговой артерии; МСАО-МК – модель МСАО Коизуми; МСАО-МЛ – модель МСАО Лонга.

* Адресат для корреспонденции.

деменции [3]. Поэтому выяснение механизмов повреждающего влияния ишемии на гиппокамп важно для дальнейшего поиска средств ослабления негативных функциональных последствий ишемического воздействия. Нарушение кровотока по средней мозговой артерии считают причиной значительной части всех ишемических патологий мозга [4], поэтому окклюзию средней мозговой артерии (МСАО) используют для экспериментального моделирования ишемического инсульта на грызунах.

Среди предполагаемых путей провоцирования острой клеточной гибели после ишемии значительное внимание уделяется эксайтотоксическому действию глутамата [5, 6]. Однако глутаматергическая система вовлекается во множество жизненно важных функций организма [7], в том числе и в положительную регуляцию возбуждающими стимулами дифференцировки нейронов [8]. Неоднозначное влияние глутамата на разные процессы, определяющие жизнеспособность клеток, затрудняет выбор способов воздействия на эту систему для терапии вызванных ишемией повреждений, а также сроков их применения, например, для лигандов глутаматергических рецепторов. Так, накапливаются свидетельства, что увеличение экспрессии одних и тех же типов рецепторов глутамата в острой фазе инсульта может быть усугубляющим постишемическое восстановление, в то время как их увеличение в более поздней фазе, напротив, благоприятным [9]. Очевидно, что из-за неполного понимания роли отдельных компонентов глутаматергической системы в ишемическом повреждении мозга предпринимаемые попытки напрямую воздействовать на эту нейробиохимическую систему с целью предотвращения или замедления гибели клеток не всегда приводили к желаемым эффектам [10, 11].

Ишемическое повреждение мозга сопровождается нейровоспалением – активацией глиальных клеток, продукцией и секрецией цитокинов в гиппокампе [12]. В исследованиях патофизиологических механизмов нейродегенеративных заболеваний, индуцируемых в том числе и ишемией, введение липополисахарида (LPS) получило широкое распространение в качестве эффективного модельного подхода к оценке роли различных участников воспалительного процесса в этих заболеваниях [13]. Полногеномные анализы транскриптомов гиппокампа через сутки после экспериментальной ишемии [14, 15, 16] или центрального введения LPS [16, 17] выявили изменение экспрессии множества генов, в том числе генов регуляторов апоптоза, воспаления, нейро-

трансмиссивных систем. Новые сведения в данной области могут быть получены путем сравнения данных, полученных на разных моделях. Например, оказалось, что две наиболее часто используемые модели МСАО («золотой стандарт» моделирования ишемического инсульта на грызунах [18]) значительно различаются по ряду функциональных параметров, в том числе связанных с эксайтотоксичностью глутамата и воспалительными процессами [19, 20]. С учетом этих результатов целью данной работы было проведение сравнительного исследования экспрессии генов, кодирующих транспортеры и рецепторы глутамата и ГАМК, а также маркеров воспаления в гиппокампе после двух видов ишемического воздействия, модели МСАО Коизуми (МСАО-МК) [21] и модели Лонга (МСАО-ML) [22], а также после прямой провоспалительной активации путем центрального введения LPS. Недавно обнаружено, что модели ишемии по Коизуми и Лонга различаются по накоплению глюкокортикоидных гормонов и провоспалительных цитокинов в гиппокампе в остром периоде после ишемии [20], при этом различия сохраняются в течение месяцев [23]. Исследование особенностей провоспалительной активации, а также нарушений экспрессии генов глутаматергической системы и оценка возможных нарушений в других нейромедиаторных системах, прежде всего, тормозной ГАМКергической, принципиально важно для дальнейшего прояснения механизмов острого ишемического поражения гиппокампа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Влияние центрального введения LPS исследовали на взрослых самцах крыс линии Вистар, содержащихся в стандартных условиях вивария ИЦиГ СО РАН при температуре 22–24°C, световом режиме 14С/10Т и свободном доступе к воде и корму.

Влияние МСАО исследовали на взрослых самцах крыс линии Вистар, содержащихся в стандартных условиях вивария Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН.

Моделирование инсульта проводили по стандартным протоколам экспериментальной ишемии (модель Коизуми [20] и модель Лонга [21]), а также прямой провоспалительной активации путем центрального введения LPS.

Модель Коизуми (МСАО-МК). Под анестезией изофлураном выполняли разрез в области

шеи и, оттесняя мышечную ткань с левой стороны, накладывали лигатуры на общую сонную артерию, а также на наружную и внутреннюю сонные артерии. Нейлоновую нить (3-0) с закругленным концом вводили через отверстие в месте бифуркации на наружную и внутреннюю ветви и продвигали по внутренней сонной артерии до средней мозговой артерии. Затем затягивали лигатуру на внутренней сонной артерии для фиксации нити. Оклюзию проводили в течение 60 мин, при этом общая, наружная и внутренняя сонные артерии оставались перевязанными, а температура тела животного поддерживалась на уровне $37 \pm 0,5$ °С. Затем нить удаляли и затягивали лигатуру на внутренней сонной артерии. Контролем являлись ложнооперированные животные, с которыми выполняли все манипуляции, кроме введения нити.

Модель Лонга (МСаО-ML). Под анестезией изофлураном через разрез на шее животного лигировали общую сонную и наружную сонную артерии. После электрокоагуляции и диссекции фрагмента левой наружной сонной артерии через оставшуюся часть артерии вводили филамент из нейлоновой нити до пересечения со средней мозговой артерией. Оклюзия продолжалась в течение 60 мин, при этом температура тела крысы поддерживалась на уровне $37 \pm 0,5$ °С. Затем нить извлекали, что восстанавливало кровоток по ипсилатеральной общей сонной артерии. Контролем являлись ложнооперированные животные, с которыми выполняли все манипуляции, кроме введения нити.

В связи с необходимостью использования ткани мозга для анализа транскриптома в качестве подтверждения формирования ишемического очага у животных использовали оценку неврологических дефицитов, которая сопровождается формированием ишемического очага [20]. Использовали тест, основанный на 5-балльной поведенческой шкале, позволяющий оценить функциональное состояние конралатеральной передней лапы крыс, наличие поворотов и циркуляции в конралатеральную сторону и общую подвижность животных, а также тест на степень высовывания языка — по способности крысы вылизывать арахисовое масло из стеклянного цилиндра с последующим измерением расстояния от начала цилиндра до уровня оставшегося масла [20]. Все животные с МСаО, взятые в эксперимент, имели выраженные неврологические дефициты, свидетельствующие о формировании ишемического очага, в то время как ложнооперированные животные не демонстрирова-

ли таких дефицитов. По 5-балльной шкале все ложнооперированные животные имели балл 0, в то время как животные после МСаО в моделях Коизуми или Лонга демонстрировали тяжелый дефицит 4 балла во время операции и 3 балла — через сутки после операции перед забоем. Через сутки после операции животные с МСаО независимо от модели демонстрировали неспособность высунуть язык, в то время как у ложнооперированных крыс эта способность сохранялась на 92–100%. Следует отметить, что значения дефицитов в данной работе совпадают с таковыми через сутки после ишемии, представленными в предыдущих экспериментах [20].

Центральное введение LPS. Под анестезией изофлураном в правый стриатум вводили бактериальный эндотоксин липополисахарид (LPS) в дозе 30 мкг в 4 мкл физраствора по стереотаксическим координатам: AP = + 0,5 мм, ML = + 3 мм, DV = –4,5 мм [16] в течение 5 мин. Контрольным животным вводили в аналогичных условиях 4 мкл физраствора. LPS вводили в стриатум, поскольку он входит в число первоочередных повреждаемых ишемическим воздействием структур мозга. Например, у взрослых крыс 30-минутная МСаО по Коизуми вызывала повреждение, ограниченное полосатым телом, тогда как после этой МСаО в течение 2 ч наблюдались «инфаркты» как в стриатуме, так и в коре [24].

Секвенирование РНК. Через 24 ч после каждого из трех воздействий животных забивали декапитацией, на холоду выделяли гиппокамп, который помещали в раствор RNAlater («Life Technologies», США) и хранили при температуре –70 °С до секвенирования, которое выполняли в ООО «Геноаналитика» (<https://genoanalytica.ru>, Москва). Тотальную РНК выделяли из гиппокампа трех животных каждой экспериментальной и контрольной групп при помощи реагента Trizol («Thermo Fisher Scientific», США) в соответствии с рекомендациями производителя. Качество и количество выделенной тотальной РНК проверяли при использовании набора RNA 6000 Nano Kit («Agilent Technologies», США) на приборе BioAnalyzer («Agilent Technologies»). Фракцию полиА из тотальной РНК получали при помощи магнитных шариков олигоТ Dynabeads® mRNA Purification Kit («Thermo Fisher Scientific»). Далее из полиА-РНК были приготовлены библиотеки для массового параллельного секвенирования при помощи набора NEBNext® Ultra™ II RNA Library Prep («NEB», США), согласно инструкции к набору. Концентрацию библиотек определяли при помощи

набора Qubit dsDNA HS Assay Kit («Thermo Fisher Scientific») на приборе Qubit 2.0 («Thermo Fisher Scientific»). Распределение длин фрагментов библиотеки проводили при помощи набора Agilent High Sensitivity DNA Kit («Agilent Technologies»). Секвенирование проводили на приборе HiSeq1500 («Illumina», США) с генерацией не менее 10 млн коротких чтений длиной 50 нуклеотидов. Риды выравнивали на геном версии Rnor_6.0 при помощи программы STAR, и подсчет дифференциально экспрессирующихся генов проводили, используя пакет DESeq2.0.

ПЦР в реальном времени. Выявленные секвенированием изменения в экспрессии генов выборочно верифицировались методом ПЦР в реальном времени на амплификаторе VIIA7 с применением технологии TaqMan («Thermo Fisher Scientific»). Выделение суммарной РНК, оценку ее качества и синтез кДНК проводили по ранее описанным стандартным протоколам [25]. Уровни экспрессии генов: *Casp3* (Rn00563902_m1), *IL1b* (Rn00580432_m1), *Slc1a2* (Rn00691548_m1), *Gria2* (Rn00568514_m1), *Glul* (Rn01483107_m1), *Gad2* (Rn00561244_m1) определяли в двух повторах в образцах РНК после секвенирования с добавлением до восьми образцов РНК из тех же экспериментальных групп. Все реакции проводили в соответствии с рекомендациями производителя, и уровень экспрессии генов рассчитывали по методу ddCt относительно экспрессии гена домашнего хозяйства бета-актина (Rn00667869_m1).

Статистическая обработка данных. Изменение экспрессии генов, определенное мето-

дом массового параллельного секвенирования транскриптома, считалось достоверным при скорректированном p -значении с поправкой на множественность сравнений (adjusted p -value – $padj$) меньшем, чем 0,05. При верификации уровня экспрессии методом ПЦР в реальном времени достоверность устанавливали путем прямых парных сравнений с использованием t -критерия Стьюдента в программе Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гены, ассоциированные с гибелью клеток.

Признаки гибели клеток в гиппокампе через сутки после перенесенных воздействий обнаружены после МСАО-ML, на что, по результатам секвенирования, указывало достоверное увеличение экспрессии гена исполнителя протеазы апоптоза каспазы-3 (*Casp3*) (рис. 1, а), подтвержденное методом ПЦР в реальном времени ($p < 0,05$; рис. 1, б). После всех воздействий – МСАО-ML, МСАО-МК и LPS – была также увеличена экспрессия гена *Casp4*. Кроме того, после LPS были достоверно увеличены экспрессии гена рецептора смерти *Fas*, *Casp1* и *Casp8* на уровне тенденции – p -value = 4,55E-03; $padj$ = 0,0946. Все эти гены были ассоциированы с выявленными в результате анализа геномной онтологии биологическими процессами, такими как «апоптоз» («apoptotic process»), активация апоптоза нейронов («positive regulation of neuron apoptotic process»), активация процесса

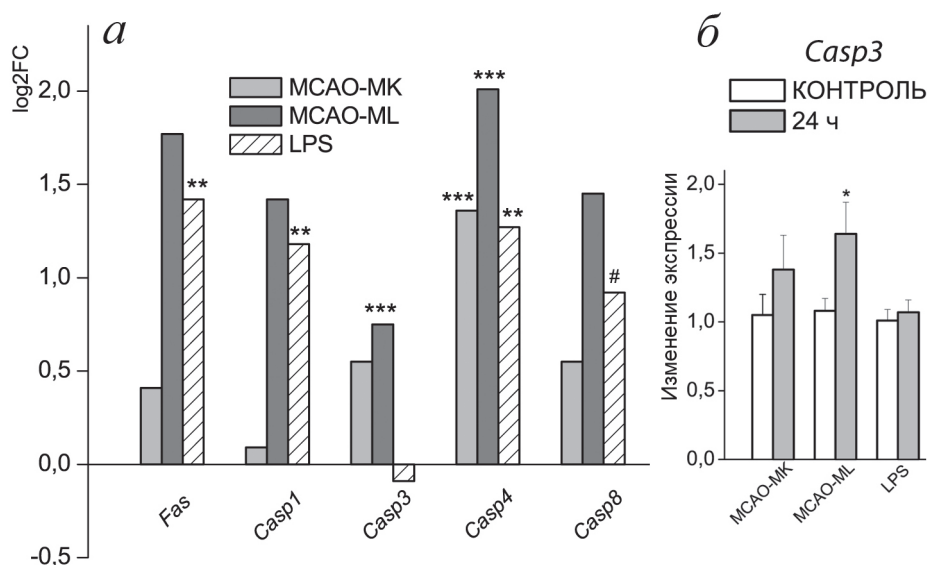


Рис. 1. Изменение экспрессии генов, ассоциированных с гибелью клеток, после двух типов ишемического воздействия и центрального введения LPS. а – По результатам секвенирования; ** $padj < 0,01$; *** $padj < 0,001$; # $padj < 0,1$. б – Верификация ПЦР в реальном времени; * $p < 0,05$

апоптоза («positive regulation of apoptotic process»), усиление гибели клеток («positive regulation of cell death»).

Следует, однако, отметить, что для оценки достоверности различий по результатам секвенирования был использован достаточно строгий критерий – различия считались достоверными лишь при $\text{padj} < 0,05$. Такой строгий отбор может, как отмечается большинством исследователей, приводить к потере генов, также реально изменивших экспрессию, но не на требуемом высоком уровне значимости. Из рис. 1 видно, что такими генами для МСАО-МЛ могут быть гены *Fas*, *Casp1* и *Casp8*, которые значительно изменили экспрессию по сравнению с соответствующими контрольными значениями, но только на уровне $p\text{-value} < 0,05$, в то время как значение padj не достигало достоверности.

Гены, ассоциированные с нейровоспалением.

Через сутки после обоих ишемических воздействий в гиппокампе была достоверно увеличена экспрессия гена *Gfap*, кодирующего маркерный белок астроцитов (рис. 2, а). Экспрессия *Aif* (гена маркерного белка микроглии Iba-1) была увеличена через сутки только после прямого провоспалительного воздействия – центрального введения LPS. По результатам секвенирования, экспрессия ни одного из генов ключевых провоспалительных цитокинов не была достоверно изменена после МСАО-МК, в то время как оба гена (*Il1b* и *Il6*) после МСАО-МЛ и один ген (*Il1b*) после LPS достоверно увеличили экспрессию через сутки после воздействия. Анализ экспрессии мРНК *Il1b* методом ПЦР в реальном времени

(рис. 2, б) верифицировал увеличение экспрессии гена интерлейкина после МСАО-МЛ и LPS, и, кроме того, показал достоверное повышение экспрессии гена *Il1b* и после МСАО-МК, выявленное по результатам секвенирования только на уровне $p\text{-value} = 0,0021$ ($\text{padj} > 1$). К списку провоспалительных маркеров был также добавлен ген *Mmp9*, экспрессия которого была также значительно увеличена через сутки после МСАО-МЛ и LPS.

Маркеры глутаматергической системы.

На рис. 3 представлено изменение экспрессий генов-маркеров глутаматергической системы, транспортеров и рецепторов: на рис. 3, а – по результатам секвенирования, на рис. 3, б – по результатам ПЦР-анализа.

Экспрессия генов ни одного из пяти известных в настоящее время переносчиков глутамата через клеточную мембрану не изменилась в гиппокампе через сутки после МСАО-МК или МСАО-МЛ. Прямая провоспалительная стимуляция центральным введением LPS привела к достоверному увеличению экспрессии гена одного из таких переносчиков – *Slc1a2* (рис. 3, а), этот эффект был подтвержден ПЦР-анализом ($p < 0,05$; рис. 3, б).

Ишемические воздействия не повлияли и на экспрессию в гиппокампе генов везикулярных транспортеров глутамата, в то время как после LPS было обнаружено достоверное снижение экспрессии гена *Slc17a6*.

Экспрессии генов двух транспортеров (*Slc1a4* и *Slc1a5*) нейтральных аминокислот, в их числе также глутамин и глутамат, были достоверно увеличены после МСАО-МК и LPS. После МСАО-МЛ достоверно была увеличена

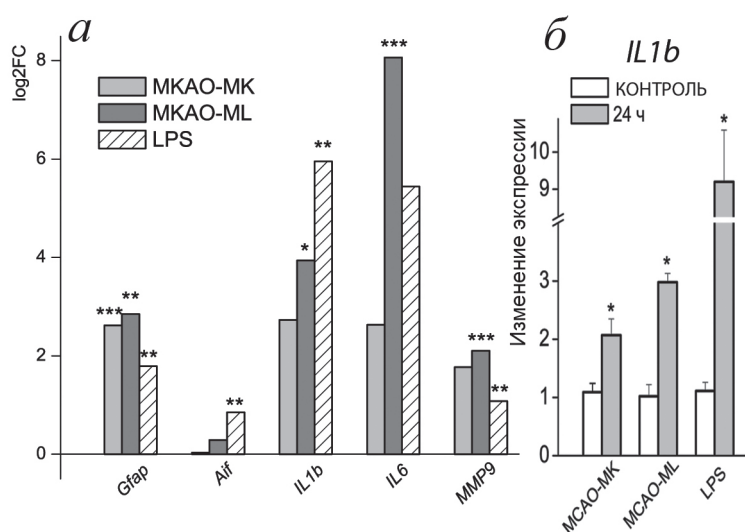


Рис. 2. Изменение экспрессии генов, ассоциированных с нейровоспалением, после двух типов ишемического воздействия и центрального введения LPS. а – По результатам секвенирования; * $\text{padj} < 0,05$; ** $\text{padj} < 0,01$; *** $\text{padj} < 0,001$. б – Верификация ПЦР в реальном времени; * $p < 0,05$

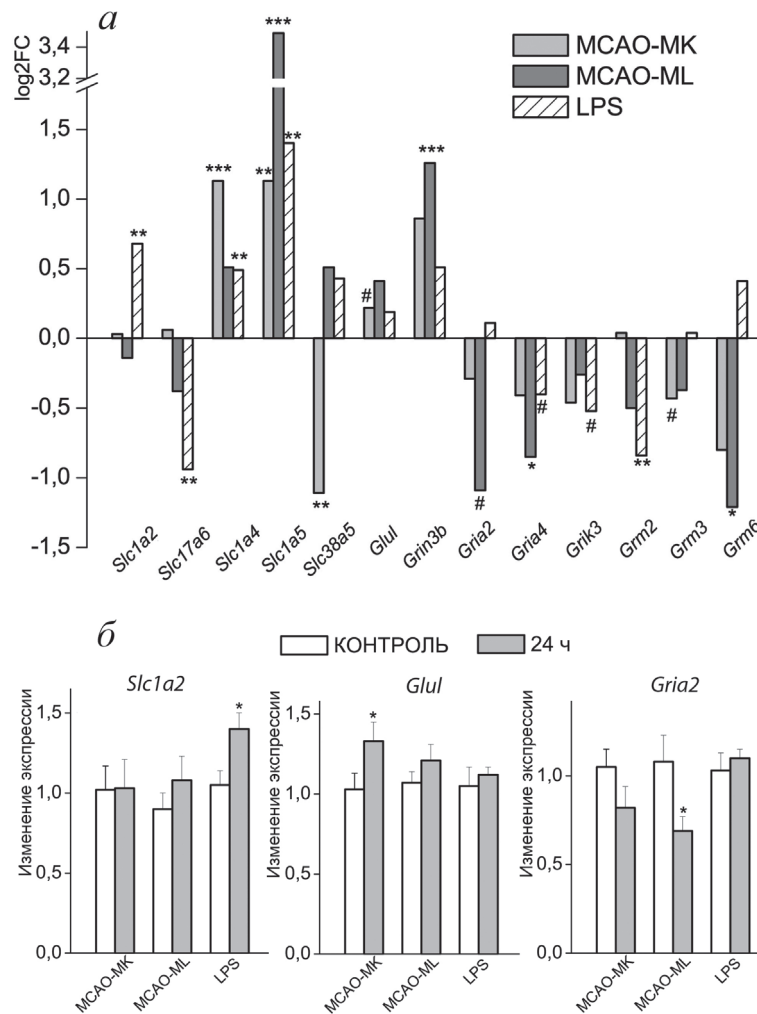


Рис. 3. Изменение экспрессии генов-маркеров глутаматергической системы после двух типов ишемического воздействия и центрального введения LPS. *а* – По результатам секвенирования; * $p_{adj} < 0,05$; ** $p_{adj} < 0,01$; *** $p_{adj} < 0,001$; # $p_{adj} < 0,1$. *б* – Верификация ПЦР в реальном времени; * $p < 0,05$

экспрессия только *Slc1a5*. После МСАО-МК экспрессия еще одного транспортера нейтральных аминокислот (*Slc38a5*) была снижена. Эти результаты указывают на изменение обмена глутамина и глутамата в гиппокампе после как ишемических, так и прямых провоспалительных воздействий. На такую возможность указывает увеличение после МСАО-МК экспрессии гена *Glul* (катализирует синтез глутамина из глутамата), подтвержденное ПЦР в реальном времени ($p < 0,05$).

Рецепторы глутамата представлены у млекопитающих ионотропными и метаботропными типами. Ионотропные рецепторы (NMDA, AMPA и каинатные) являются гетеротетрамерными трансмембранными каналами, пропускающими в клетку при активации нейротрансмиттером положительно заряженные ионы кальция или натрия. Каждая субъединица кодируется отдельным геном, и субъединичный состав тетрамера определяет функцио-

нальные свойства рецептора. Метаботропные рецепторы глутамата, каждый из которых кодируется отдельным геном, относятся к суперсемейству рецепторов, сопряженных с гуанин-связывающими белками – GPCR.

После МСАО-МК обнаружено изменение (снижение) на уровне тенденции ($p\text{-value} = 0,0023$; $p_{adj} = 0,0679$) экспрессии гена только одного рецептора – метаботропного *Grm3*.

МСАО-МЛ привела через сутки к изменениям в экспрессии как ионотропных, так и метаботропных рецепторов. Среди субъединиц ионотропных AMPA-рецепторов достоверное снижение по результатам секвенирования обнаружено для гена *Gria4*. Снижение, по результатам секвенирования, только на уровне тенденции ($p\text{-value} = 0,0272$; $p_{adj} = 0,1437$) экспрессии гена другой субъединицы AMPA-рецепторов – *Gria2*, показало достоверный эффект ($p < 0,05$) при определении методом ПЦР в реальном времени. В отличие от снизивших

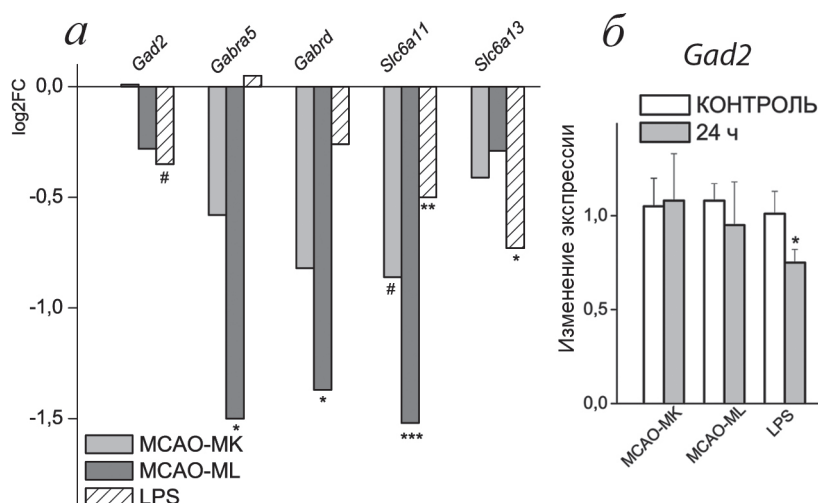


Рис. 4. Изменение экспрессии генов-маркеров ГАМКергической системы после двух типов ишемического воздействия и центрального введения LPS. *а* – По результатам секвенирования; * $\text{padj} < 0,05$; ** $\text{padj} < 0,01$; *** $\text{padj} < 0,001$; # $\text{padj} < 0,1$. *б* – Верификация ПЦР в реальном времени; * $p < 0,05$

экспрессию генов, кодирующих субъединицы AMPA-рецепторов, экспрессия гена субъединицы *Grin3b* ионотропных NMDA-рецепторов была достоверно повышена. Помимо ионотропных AMPA-рецепторов, после МСАО-ML обнаружено также достоверное снижение экспрессии гена метаботропного рецептора *Grm6*.

Через сутки после введения LPS, так же, как и после МСАО-ML, была снижена, но только на уровне тенденции ($p\text{-value} = 0,0022$; $\text{padj} = 0,0531$) экспрессия гена *Gria4*, кодирующего субъединицу AMPA-рецепторов. Также только на уровне тенденции ($p\text{-value} = 0,0033$; $\text{padj} = 0,0734$) после введения LPS была снижена экспрессия гена *Grik3*, кодирующего субъединицу каинатных рецепторов. После введения LPS снижение экспрессии гена метаботропного рецептора *Grm2* достигало достоверного уровня.

Маркеры ГАМКергической нейротрансмиссии. Гены ГАМКергической системы, изменившие экспрессии после воздействий, представлены на рис. 4, *а*. После всех воздействий в гиппокампе снизилась экспрессия гена *Slc6a11*: на уровне тенденции ($p\text{-value} = 0,0038$; $\text{padj} = 0,0932$) после МСАО-МК и достоверно – после МСАО-ML и LPS. Экспрессия гена другого транспортера ГАМК – *Slc6a13*, а также гена фермента синтеза ГАМК *Gad2* ($p\text{-value} = 0,0041$; $\text{padj} = 0,0871$) снизились только после введения LPS. Верификация изменения *Gad2*, подтвержденная ПЦР в реальном времени, показала достоверность снижения после LPS (рис. 4, *б*). После МСАО-ML достоверно снизились экспрессии генов ГАМКергических рецепторов – *Gabra5* и *Gabrd* (рис. 4, *а*).

Кальций/кальмодулин-зависимые протеинкиназы. Важную роль в активности глутаматергических и ГАМКергических рецепторов играют Ca^{2+} /кальмодулин-зависимые киназы или CaM-киназы. По результатам секвенирования выявлено снижение экспрессии генов *Camkk1*, *Camkk2*, *Calm1* и *Camk4* – после МСАО-ML (рис. 5). После МСАО-МК обнаружено снижение экспрессии только одного из этих генов – *Camkk1*, а после LPS не была изменена экспрессия ни одного из этих генов.

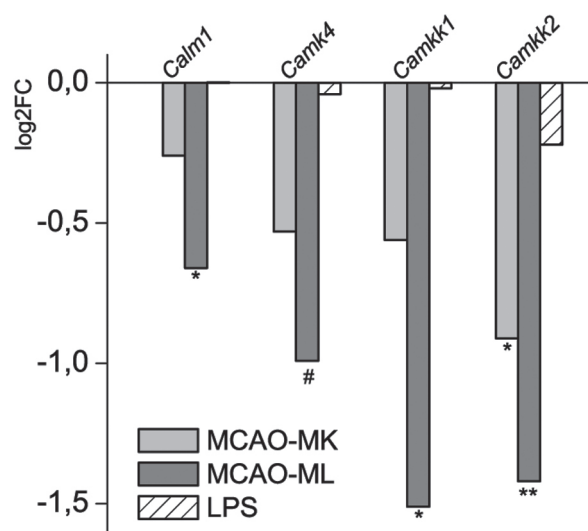


Рис. 5. Изменение экспрессии генов кальмодулина и кальмодулин-зависимых протеинкиназ после двух типов ишемического воздействия и центрального введения LPS (по результатам секвенирования). * $\text{padj} < 0,05$; ** $\text{padj} < 0,01$; # $\text{padj} < 0,1$

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее мы предположили, что фокальные ишемические поражения мозга могут вызывать вторичные, дистантные (расположенные на расстоянии от первичного очага) повреждения гиппокампа, реализуемые иными механизмами. По-видимому, отложенные последствия фокального повреждения мозга, выражающиеся клинически в когнитивных и эмоциональных расстройствах, независимо от размера и локализации первичного повреждения связаны с опосредованными глюкокортикоидами и ассоциированными с нейровоспалением изменениями в гиппокампе – структуре, селективно чувствительной к различным экстремальным воздействиям [26, 27]. Действительно, гиппокамп, несмотря на отсутствие в нем зоны инфаркта, относят к структурам мозга, наиболее уязвимым в постишемический период [3].

МСАО-ML и МСАО-МК – 2 популярные и наиболее часто применяемые в предклинических исследованиях модели инсульта. При этом метаанализ немногочисленных сравнительных исследований этих моделей на грызунах показывает, что данные о сходстве и различиях этих моделей противоречивы, зависят от используемого вида (мыши, крысы), конкретного времени ишемии и наличия или отсутствия реперфузии [28]. Это касается данных об объеме инфаркта, смертности и неврологическом дефиците. В наших предыдущих исследованиях на этих моделях на крысах не удалось найти достоверные различия в объеме инфаркта мозга, оцененном через 72 ч после МСАО с использованием стандартного метода окраски митохондриальным красителем 2,3,5-трифенил тетразолий хлоридом (ТТС) [20]. Не обнаружено также достоверных различий в развитии неврологических дефицитов в первые 14 дней после МСАО и в выживаемости животных [20, 23]. Отсутствие различий в неврологических дефицитах между двумя моделями косвенно подтверждает и сходный объем инфаркта мозга, поскольку между этими показателями существует прямая зависимость [29]. Несмотря на то что при моделировании МСАО-ML и МСАО-МК на крысах ишемический очаг ограничивается областями неокортекса и стриатума [20], экспериментально было показано, что имеются достоверные различия связывания кортикостерона в гиппокампе и фронтальной коре (вне зоны первичного ишемического повреждения) не только в остром периоде [20], но и даже через 3 месяца после ишемии МСАО [23]. Важно отметить, что и в клиническом про-

спективном исследовании нам удалось показать независимость развития постинсультных кортизол-зависимых когнитивных и депрессивных расстройств от неврологических дефицитов (косвенно свидетельствующих о размерах ишемического очага), которые отражают развитие первичного ишемического очага в бассейне средней мозговой артерии [30].

В данной работе уже через сутки после МСАО-ML обнаружены признаки активации апоптоза клеток, на что указывало увеличение экспрессии гена исполнительной протеазы апоптоза каспазы-3. Этот эффект согласуется с результатами предшествующих работ о появлении первых признаков гибели клеток в гиппокампе в первые дни после ишемии/реперфузии [19, 31, 32]. Гибель нейрональных клеток может вызывать воспалительный процесс, однако индуцированное воспаление, в свою очередь, может приводить к дальнейшей гибели клеток [33]. Поэтому не удивительно, что прямое воздействие провоспалительным стимулом – бактериальным эндотоксином – приводило через сутки к увеличению в гиппокампе не только экспрессии гена *Aif* – гена маркерного белка активированной микроглии *Iba-1*, но и гена рецептора смерти *Fas*.

Нейровоспаление проявляется как активацией глиальных клеток, так и увеличением продукции провоспалительных цитокинов. Наиболее быструю активацию после ишемии отмечают у астроцитов. Двухчасовая МСАО сопровождалась через сутки значительным увеличением числа активированных астроцитов в гиппокампе крыс, в то время как заметной активации микроглиальных клеток в этот период не наблюдалось [34]. С этими результатами полностью согласуются наши данные об увеличении в гиппокампе экспрессии гена маркерного белка астроцитов *Gfap* и отсутствие изменений в экспрессии гена *Aif* через 24 ч после обоих ишемических воздействий. Ишемия/реперфузия повышает проницаемость гематоэнцефалического барьера, благодаря чему к секреции провоспалительных цитокинов активированными глиальными клетками подключаются также мигрировавшие из периферической крови лимфоциты [35]. Интересно, что после МСАО по методу Лонга увеличению экспрессии гена матриксной металлопротеиназы-9 (*MMP9*), вовлекаемой в нарушение проницаемости барьера [36], сопутствовала более выраженная у этой модели провоспалительная активация. По результатам секвенирования, после МСАО-ML были достоверно увеличены экспрессии генов двух ключевых провоспалительных цитокинов – *Il1b* и *Il6*,

в то время как достоверное увеличение экспрессии лишь одного из них, *Il1b*, было выявлено после МСАО-МК лишь ПЦР-анализом. Эти данные в значительной степени подтверждают результаты работы Smith et al. [18], которые свидетельствуют о достоверно более выраженных провоспалительных процессах у мышей с МСАО-ML в сравнении с МСАО-МК.

Значительную роль в нейродегенеративных эффектах ишемии отводят глутаматергической эксайтотоксичности, которую связывают с накоплением глутамата в экстраклеточном пространстве и гиперактивацией глутаматных рецепторов [5, 37, 38], логически обусловивших представление, что ослабление этих событий является благоприятным для смягчения клеточной гибели [39]. Действительно, экспериментальная индукция ишемии с помощью широко используемого метода, в том числе и в нашей работе – окклюзии средней мозговой артерии – буквально с первых минут вызывает быстрое увеличение уровня внеклеточного глутамата в гиппокампе [40, 41]. Это острое увеличение уровня внеклеточного глутамата в структуре, однако, также быстро нормализуется, что, очевидно, обеспечивается работой специфических переносчиков нейромедиатора через клеточную мембрану. В настоящее время описано 5 типов таких переносчиков [42], которые переносят высвободившийся глутамат в астроциты, где он под действием глутаматсинтазы превращается в глутамин. Далее белки-переносчики глутамин на плазматической мембране астроцитов и нейронов опосредуют перенос глутамин от астроцитов к нейронам, где под действием глутаминазы глутамин превращается в глутамат, который с помощью везикулярных транспортеров глутамата загружается в синаптические везикулы для дальнейшего использования. Полагают, что более половины глутамата образуется в результате такого глутамато-глутаминового цикла между нейронами и астроцитами [43]. Несмотря на быструю нормализацию острого повышения уровня экстраклеточного глутамата, выяснилось, что ишемия мозга может вызывать длительные изменения в регуляторах глутаматергической нейротрансмиссии, что, в свою очередь, может обуславливать отсроченные изменения как в активности нейротрансмиссии, так и в связанных с нею функциях.

Примененные нами ишемические воздействия приводили через сутки к повышению в гиппокампе экспрессии генов транспортеров нейтральных аминокислот, *Slc1a4* и *Slc1a5*, что может указывать на изменение обмена глута-

мина и глутамата в гиппокампе после ишемии. Увеличение экспрессии гена *Slc1a5* согласуется с обнаруженными нами ранее изменениями после LPS и инсульта по методу Коизуми [16] и расширяет этот эффект ишемии и для модели Лонга. Предположение о связи повышенной экспрессии транспортеров нейтральных аминокислот с возможным изменением обмена глутамин и глутамата косвенно подтверждается увеличением экспрессии гена глутаминсинтетазы *Glul* после МСАО-МК, характеризующейся изменением экспрессии обоих транспортеров. Прямая провоспалительная стимуляция центральным введением LPS привела к достоверному увеличению экспрессии гена переносчика глутамата через клеточную мембрану *Slc1a2* и снижению экспрессии гена везикулярного транспортера *Slc17a6*. Экспрессии генов транспортеров этих типов не были изменены через сутки после обеих ишемий.

Действие глутамата осуществляется через ионотропные и метаботропные глутаматные рецепторы, экспрессии генов которых изменялись через сутки после примененных нами воздействий. Более выраженные изменения наблюдались после МСАО-ML и LPS, которые, как показано выше, приводили к большему провоспалительному ответу, чем МСАО-МК, что, учитывая локализацию глутаматных рецепторов на глиальных клетках [44], являются дополнительным свидетельством взаимодействия ответов глутаматергической и провоспалительной систем. После МСАО-ML и LPS, но не после МСАО-МК в гиппокампе наблюдалось снижение экспрессии гена *Gria4*, кодирующего субъединицу AMPA-рецепторов. Эти результаты согласуются со снижением экспрессии белка AMPA-рецепторов в гиппокампе крыс, обнаруженным через сутки после перманентной окклюзии средней мозговой артерии, обычной или отягощенной диабетическим состоянием [19]. В этой работе было также обнаружено различие в ответах глутаматных рецепторов на тип ишемического воздействия – изменений в экспрессии белка AMPA-рецепторов в гиппокампе крыс не было выявлено через 24 ч после транзиторной ишемии.

После МСАО-ML обнаружено увеличение экспрессии гена *Grin3b*, кодирующего субъединицу NMDA-рецепторов, изменения которого не обнаружено ни после МСАО-МК, ни после LPS. Обнаруженное увеличение может отражать либо развитие у животных посттравматического стрессового расстройства [45], либо, напротив, более раннюю после МСАО-ML активацию восстанавливающих процессов. Относительно второй возможности следует

отметить, что эксайтотоксическую гибель нейронов после ишемического повреждения связывают, прежде всего, с гиперактивацией NMDA-рецепторов, однако клинические испытания антагонистов этих рецепторов не только не улучшали, но даже усугубляли повреждение головного мозга [10]. В отличие от антагонистов, агонисты в острый период после инсульта через модулирующий «сайт глицина» NMDA оказывались более «полезными» для восстановления [11]. мРНК *Grin3b* широко распространена в мозге взрослых крыс [46], а комбинация субъединиц NR1/NR3B (*Grin1/Grin3b*) может представлять собой тип возбуждающего глицинового рецептора [47]. Однако прояснение роли субъединицы *Grin3b* NMDA-рецепторов в постишемический период требует специальных исследований.

Все три примененных в работе воздействия приводили к снижению экспрессии генов метаболитных рецепторов, но если после МСАО-МК это был ген *Grm3*, то после МСАО-ML – *Grm6*, а после LPS – *Grm2*. *Grm3* и *Grm2* относятся ко второй группе метаболитных рецепторов, в то время как *Grm6* – к третьей. Стимуляция метаболитных рецепторов третьей группы, экспрессирующихся на микроглиальных клетках, трансформирует микроглию в нейротропный фенотип, в то время как стимуляция рецепторов второй группы, особенно mGluR2 (*Grm2*) – в нейротоксический фенотип, проявляющийся высвобождением Fas-лиганда и запуском апоптоза через активацию каспазы-3 [45]. После МСАО мыши-нокауты по *Grm2* демонстрировали меньший объем поражения и ускорение поведенческого восстановления [48]. Различные эффекты МСАО-МК и МСАО-ML на экспрессию компонентов глутаматергической системы могут быть ассоциированы с различной аккумуляцией кортикостерона в гиппокампе в этих моделях [20, 23], потому что глюкокортикоидные гормоны являются регуляторами практически всех компонентов этой системы [49], а также контролируют развитие гиперглутаматергической трансмиссии [50], результатом которой является развитие эксайтотоксичности.

Помимо усиления глутаматергического сигнала, нарушение угнетающего влияния ГАМК на возбудимость нейронов также вносит вклад в ухудшение состояния после инсульта [51]. Примененные в работе воздействия повлияли на экспрессию маркеров ГАМКергической системы. Общим ответом на все воздействия было снижение экспрессии гена транспортера ГАМК *Slc6a11*. Кроме того,

после МСАО-ML были также снижены экспрессии генов ГАМКергических рецепторов – *Gabra5* и *Gabrd*.

Хотя проверка в качестве нейрозащитных агентов препаратов, нацеленных на NMDA-рецепторы, потерпела в клинических испытаниях неудачу, имеются отдельные свидетельства смягчения вызываемых ими негативных побочных эффектов через влияние на сигнальный каскад ниже стимуляции рецепторов [52]. Перспективным может быть также путь воздействия на активность ГАМКергических рецепторов через сигнальные пути рецепторов и регуляторы синаптической пластичности, к которым принадлежат, в частности, белковые продукты генов *Camkk1* и *Camkk2*, изменивших экспрессию после МСАО-ML. В недавней работе было показано, что восстановление сниженной ишемией экспрессии рецепторов ГАМК путем блокады механизма их взаимодействия с СаМКII, фосфорилируемой *Camkk1* и *Camkk2*, ингибировало эксайтотоксическую гибель нейронов [53], что, по мнению авторов, может значительно расширить фармакологические возможности торможения прогрессирующей гибели нейронов после ишемического инсульта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, полученные результаты показывают как различие, так и сходство между ответами на примененные в работе воздействия (таблица). Животные после МСАО-ML демонстрировали большее число изменивших экспрессию генов, связанных с активацией апоптоза и нейровоспаления, рецепцией глутамата, а также маркерами ГАМКергической системы, чем МСАО-МК, и были ближе в этом плане к ответам, индуцированным центральным введением LPS. В свою очередь, по сравнению с МСАО-ML, МСАО-МК и LPS характеризовались изменением большего числа генов, вовлекаемых в транспорт глутамата. Наиболее ярко проявившимся отличием МСАО-ML от МСАО-МК и введения LPS явились обнаруженные после этого типа ишемического воздействия изменения в экспрессии генов кальмодулина и кальмодулин-зависимых киназ. Выявленные особенности ответов транскриптома гиппокампа на две модели МСАО и прямой провоспалительный стимул будут способствовать дальнейшему пониманию причин и молекулярных механизмов, лежащих в основе разнообразия последствий инсультов, как в модельных исследованиях, так и в клинике.

Изменение экспрессии генов в гиппокампе после окклюзии средней мозговой артерии или центрального введения липополисахарида по скорректированному *p*-значению (*padj*)

Процесс	Ген	МСАО-МК	МСАО-МЛ	LPS
Апоптоз	<i>Fas</i>	≈	≈	↑**
	<i>Casp1</i>	≈	≈	↑**
	<i>Casp3</i>	≈	↑***	≈
	<i>Casp4</i>	↑***	↑***	↑**
	<i>Casp8</i>	≈	≈	↑#
Нейровоспаление	<i>Gfap</i>	↑***	↑***	↑**
	<i>Aif (IBA1)</i>	≈	≈	↑**
	<i>Il1b</i>	≈	↑*	↑**
	<i>Il6</i>	≈	↑***	≈
	<i>MMP9</i>	≈	↑***	↑**
Маркеры глутаматергической системы	<i>Slc1a2</i>	≈	≈	↑**
	<i>Slc17a6</i>	≈	≈	↓**
	<i>Slc1a4</i>	↑***	≈	↑**
	<i>Slc1a5</i>	↑**	↑***	↑**
	<i>Slc38a5</i>	↓**	≈	≈
	<i>Glul</i>	↑#	≈	≈
	<i>Grin3b</i>	≈	↑***	≈
	<i>Gria2</i>	≈	↓#	≈
	<i>Gria4</i>	≈	↓*	↓#
	<i>Grik3</i>	≈	≈	↓#
	<i>Grm2</i>	≈	≈	↓**
	<i>Grm3</i>	↓#	≈	≈
	<i>Grm6</i>	≈	↓*	≈
Маркеры ГАМКергической системы	<i>Gad2</i>	≈	≈	↓#
	<i>Gabra5</i>	≈	↓*	≈
	<i>Gabrd</i>	≈	↓*	≈
	<i>Slc6a11</i>	↓#	↓***	↓**
	<i>Slc6a13</i>	≈	≈	↓*
CaM-киназы	<i>Calm1</i>	≈	↓*	≈
	<i>Camk4</i>	≈	↓#	≈
	<i>Camkk1</i>	≈	↓*	≈
	<i>Camkk2</i>	↓*	↓**	≈

Примечание. Обозначения: ↑↓ – достоверное увеличение или снижение; ≈ – отсутствие достоверных изменений; * *padj* < 0,05; ** *padj* < 0,01; *** *padj* < 0,001; # *padj* < 0,1; серым цветом выделены гены, экспрессия которых верифицирована методом ПЦР в реальном времени.

Ограничения работы. Основной задачей данной работы было исследование раннего транскрипционного ответа гиппокампа на окклюзию средней мозговой артерии при использовании двух моделей МСАО; для этого производили выделение гиппокампа через 24 ч после ишемии или ложной операции. Дизайн эксперимента не позволял провести прямую оценку ишемического очага у экспериментальных животных и межгрупповое сравнение, однако результаты физиологического тестирования, представленные в работе, позволяют, хотя и косвенно, но достаточно адекватно оценить наличие очагов по развитию неврологического дефицита. Данные использованных методов оценки неврологического дефицита, как было показано ранее, коррелируют с объемом ишемического очага [29].

Вклад авторов. Н.В. Гуляева и Г.Т. Шишкина – концепция и руководство работой; Т.С. Калинина, Д.А. Ланшаков, Е.В. Сухарева, М.В. Онуфриев и Ю.В. Моисеева – проведение экспериментов; Н.В. Гуляева, Г.Т. Шишкина, Т.С. Калинина, Н.Н. Дыгало – обсуждение результатов исследования; Г.Т. Шишкина – на-

писание текста; Н.В. Гуляева, Т.С. Калинина и Н.Н. Дыгало – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-64-47013), а также направленного исключительно на содержание и уход экспериментальных животных бюджетного проекта № FWNR-2022-0023.

Благодарности. Благодарим ООО «Гено-аналитика» (Москва, Россия) за секвенирование образцов и первичный биоинформатический анализ. Благодарим В.Н. Бабенко за первичный биоинформатический анализ данных после введения липополисахарида.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все проводимые исследования выполнялись в соответствии с Международными стандартами по работе с лабораторными животными, согласно Директиве 86/609/ЕЕС и рекомендациям Комиссии по биоэтике ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН (Протокол № 115 от 20.12.2021 г.), а также по протоколам, утвержденным Комиссией по биоэтике Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rudolph, M., Schmeer, C. W., Günther, M., Woitke, F., Kathner-Schaffert, C., Karapetow, L., Lindner, J., Lehmann, T., Jirikowski, G., Witte, O. W., Redecker, C., and Keiner, S. (2021) Microglia-mediated phagocytosis of apoptotic nuclei is impaired in the adult murine hippocampus after stroke, *Glia*, **69**, 2006-2022, doi: 10.1002/glia.24009.
- Rolls, E. T. (1996) A theory of hippocampal function in memory, *Hippocampus*, **6**, 601-620, doi: 10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:6<601::AID-HIPO5>3.0.CO;2-J.
- Gulyaeva, N. V., Onufriev, M. V., and Moiseeva, Y. V. (2021) Ischemic stroke, glucocorticoids, and remote hippocampal damage: a translational outlook and implications for modeling, *Front. Neurosci.*, **15**, 781964, doi: 10.3389/fnins.2021.781964.
- Robinson, R. G., and Jorge, R. E. (2016) Post-stroke depression: a review, *Am. J. Psychiatry*, **173**, 221-231, doi: 10.1176/appi.ajp.2015.15030363.
- Globus, M. Y., Busto, R., Martinez, E., Valdes, I., Dietrich, W. D., and Ginsberg, M. D. (1991) Comparative effect of transient global ischemia on extracellular levels of glutamate, glycine, and gamma-aminobutyric acid in vulnerable and nonvulnerable brain regions in the rat, *J. Neurochem.*, **57**, 470-478, doi: 10.1111/j.1471-4159.1991.tb03775.x.
- Luo, Y., Ma, H., Zhou, J. J., Li, L., Chen, S. R., Zhang, J., Chen, L., and Pan, H. L. (2018) Focal cerebral ischemia and reperfusion induce brain injury through $\alpha 2\delta$ -1-bound NMDA receptors, *Stroke*, **49**, 2464-2472, doi: 10.1161/STROKEAHA.118.022330.
- Magi, S., Piccirillo, S., and Amoroso, S. (2019) The dual face of glutamate: from a neurotoxin to a potential survival factor-metabolic implications in health and disease, *Cell. Mol. Life Sci.*, **76**, 1473-1488, doi: 10.1007/s00018-018-3002-x.
- Deisseroth, K., Singla, S., Toda, H., Monje, M., Palmer, T. D., and Malenka, R. C. (2004) Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells, *Neuron*, **42**, 535-552, doi: 10.1016/s0896-6273(04)00266-1.
- Hu, J., Li, C., Hua, Y., Liu, P., Gao, B., Wang, Y., and Bai, Y. (2020) Constraint-induced movement therapy improves functional recovery after ischemic stroke and its impacts on synaptic plasticity in sensorimotor cortex and hippocampus, *Brain Res. Bull.*, **160**, 8-23, doi: 10.1016/j.brainresbull.2020.04.006.
- Ikonomidou, C., and Turski, L. (2002) Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet Neurol.*, **1**, 383-386, doi: 10.1016/s1474-4422(02)00164-3.

11. Biegon, A., Liraz-Zaltsman, S., and Shohami, E. (2018) Stimulation of N-methyl-D-aspartate receptors by exogenous and endogenous ligands improves outcome of brain injury, *Curr. Opin. Neurol.*, **31**, 687-692, doi: 10.1097/WCO.0000000000000612.
12. Shishkina, G. T., Kalinina, T. S., Gulyaeva, N. V., Lanshakov, D. A., and Dygalo, N. N. (2021) Changes in gene expression and neuroinflammation in the hippocampus after focal brain ischemia: involvement in the long-term cognitive and mental disorders, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 657-666, doi: 10.1134/S0006297921060043.
13. Batista, C. R. A., Gomes, G. F., Candelario-Jalil, E., Fiebich, B. L., and de Oliveira, A. C. P. (2019) Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation as a bridge to understand neurodegeneration, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 2293, doi: 10.3390/ijms20092293.
14. Chung, J. Y., Yi, J. W., Kim, S. M., Lim, Y. J., Chung, J. H., and Jo, D. J. (2011) Changes in gene expression in the rat hippocampus after focal cerebral ischemia, *J. Korean Neurosurg. Soc.*, **50**, 173-178, doi: 10.3340/jkns.2011.50.3.173.
15. Wang, C., Liu, M., Pan, Y., Bai, B., and Chen, J. (2017) Global gene expression profile of cerebral ischemia-reperfusion injury in rat MCAO model, *Oncotarget*, **8**, 74607-74622, doi: 10.18632/oncotarget.20253.
16. Shishkina, G. T., Gulyaeva, N. V., Lanshakov, D. A., Kalinina, T. S., Onufriev, M. V., Moiseeva, Y. V., Sukhareva, E. V., and Babenko, V. N. (2021) Identifying the involvement of pro-inflammatory signal in hippocampal gene expression changes after experimental ischemia: transcriptome-wide analysis, *Biomedicines*, **9**, 1840, doi: 10.3390/biomedicines9121840.
17. Bonow, R. H., Aid, S., Zhang, Y., Becker, K. G., and Bosetti, F. (2009) The brain expression of genes involved in inflammatory response, the ribosome, and learning and memory is altered by centrally injected lipopolysaccharide in mice, *Pharmacogenomics J.*, **9**, 116-126, doi: 10.1038/tpj.2008.15.
18. Smith, H. K., Russell, J. M., Granger, D. N., and Gavins, F. N. (2015) Critical differences between two classical surgical approaches for middle cerebral artery occlusion-induced stroke in mice, *J. Neurosci. Methods*, **249**, 99-105, doi: 10.1016/j.jneumeth.2015.04.008.
19. Shah, F. A., Li, T., Kury, L. T. A., Zeb, A., Khatoon, S., Liu, G., Yang, X., Liu, F., Yao, H., Khan, A.-U., Koh, P. O., Jiang, Y., and Li, S. (2019) Pathological comparisons of the hippocampal changes in the transient and permanent middle cerebral artery occlusion rat models, *Front. Neurol.*, **10**, 1178, doi: 10.3389/fneur.2019.01178.
20. Onufriev, M. V., Moiseeva, Y. V., Zhanina, M. Y., Lazareva, N. A., and Gulyaeva, N. V. (2021) A comparative study of Koizumi and Longa methods of intraluminal filament middle cerebral artery occlusion in rats: early corticosterone and inflammatory response in the hippocampus and frontal cortex, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 13544, doi: 10.3390/ijms222413544.
21. Koizumi, J.Y., Nakazawa, T., and Ooneda, G. (1986) Experimental studies of ischemic cerebral edema. I. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation in the ischemic area can be introduced, *Jpn. J. Stroke*, **8**, 1-8, doi: 10.3995/jstroke.8.1.
22. Longa, E. Z., Weinstein, P. R., Carlson, S., and Cummins, R. (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats, *Stroke*, **20**, 84-91, doi: 10.1161/01.str.20.1.84.
23. Onufriev, M. V., Stepanichev, M. Y., Moiseeva, Y. V., Zhanina, M. Y., Nedogreeva, O. A., Kostryukov, P. A., Lazareva, N. A., and Gulyaeva, N. V. (2022) A comparative study of two models of intraluminal filament middle cerebral artery occlusion in rats: long lasting accumulation of corticosterone and interleukins in the hippocampus and frontal cortex in Koizumi model, *Biomedicines*, **10**, 3119, doi: 10.3390/biomedicines10123119.
24. Arvidsson, A., Kokaia, Z., and Lindvall, O. (2001) N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke, *Eur. J. Neurosci.*, **14**, 10-18, doi: 10.1046/j.0953-816x.2001.01611.x.
25. Dygalo, N. N., Bannova, A. V., Kalinina, T. S., and Shishkina, G. T. (2004) Clonidine increases caspase-3 mRNA level and DNA fragmentation in the developing rat brainstem, *Dev. Brain Res.*, **152**, 225-231, doi: 10.1016/j.devbrainres.2004.06.018.
26. Gulyaeva, N. V. (2019) Biochemical mechanisms and translational relevance of hippocampal vulnerability to distant focal brain injury: the price of stress response, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1306-1328, doi: 10.1134/S0006297919110087.
27. Gulyaeva, N. V. (2019) Functional neurochemistry of the ventral and dorsal hippocampus: stress, depression, dementia and remote hippocampal damage, *Neurochem. Res.*, **44**, 1306-1322, doi: 10.1007/s11064-018-2662-0.
28. Li, Y., Tan, L., Yang, C., He, L., Deng, B., Huang, X., Liu, S., Liu, L., Wang, J., and Guo, J. (2022) Comparison of middle cerebral artery occlusion models conducted by Koizumi and Longa methods: a systematic review and meta-analysis of rodent data [Preprint], *Research Square*, doi: 10.21203/rs.3.rs-2398116/v1.
29. Gulyaeva, N., Thompson, C., Shinohara, N., Lazareva, N., Onufriev, M., Stepanichev, M., Moiseeva, Y., Fliss, H., and Hakim, A. M. (2003) Tongue protrusion: a simple test for neurological recovery in rats following focal cerebral ischemia, *J. Neurosci. Methods*, **125**, 183-193, doi: 10.1016/s0165-0270(03)00056-6.
30. Zhanina, M. Y., Druzhkova, T. A., Yakovlev, A. A., Vladimirova, E. E., Freiman, S. V., Eremina, N. N.,

- Guekht, A. B., and Gulyaeva, N. V. (2022) Development of post-stroke cognitive and depressive disturbances: associations with neurohumoral indices, *Curr. Issues Mol. Biol.*, **44**, 6290-6305, doi: 10.3390/cimb44120429.
31. States, B. A., Honkaniemi, J., Weinstein, P. R., and Sharp, F. R. (1996) DNA fragmentation and HSP70 protein induction in hippocampus and cortex occurs in separate neurons following permanent middle cerebral artery occlusions, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **16**, 1165-1175, doi: 10.1097/00004647-199611000-00011.
32. Uchida, H., Fujita, Y., Matsueda, M., Umeda, M., Matsuda, S., Kato, H., Kasahara, J., Araki, T. (2010) Damage to neurons and oligodendrocytes in the hippocampal CA1 sector after transient focal ischemia in rats, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **30**, 1125-1134, doi: 10.1007/s10571-010-9545-5.
33. Ransohoff, R. M. (2016) How neuroinflammation contributes to neurodegeneration, *Science*, **353**, 777-783, doi: 10.1126/science.aag2590.
34. Xu, A. L., Zheng, G. Y., Ye, H. Y., Chen, X. D., and Jiang, Q. (2020) Characterization of astrocytes and microglial cells in the hippocampal CA1 region after transient focal cerebral ischemia in rats treated with Ilexonin A, *Neural Regen. Res.*, **15**, 78-85, doi: 10.4103/1673-5374.264465.
35. Rosenberg, G. A. (2009) Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases, *Lancet Neurol.*, **8**, 205-216, doi: 10.1016/S1474-4422(09)70016-X.
36. Hannocks, M. J., Zhang, X., Gerwien, H., Chashchina, A., Burmeister, M., Korpos, E., Song, J., and Sorokin, L. (2019) The gelatinases, MMP-2 and MMP-9, as fine tuners of neuroinflammatory processes, *Matrix Biol.*, **75-76**, 102-113, doi: 10.1016/j.matbio.2017.11.007.
37. Liu, Y., Wong, T. P., Aarts, M., Rooyackers, A., Liu, L., Lai, T. W., Wu, D. C., Lu, J., Tymianski, M., Craig, A. M., and Wang, Y. T. (2007) NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both *in vitro* and *in vivo*, *J. Neurosci.*, **27**, 2846-2857, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0116-07.2007.
38. Szydlowska, K., and Tymianski, M. (2010) Calcium, ischemia and excitotoxicity, *Cell Calcium*, **47**, 122-129, doi: 10.1016/j.ceca.2010.01.003.
39. Kalia, L. V., Kalia, S. K., and Salter, M. W. (2008) NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead, *Lancet Neurol.*, **7**, 742-755, doi: 10.1016/S1474-4422(08)70165-0.
40. Yang, Y., Li, Q., Miyashita, H., Yang, T., and Shuaib, A. (2001) Different dynamic patterns of extracellular glutamate release in rat hippocampus after permanent or 30-min transient cerebral ischemia and histological correlation, *Neuropathology*, **21**, 181-187, doi: 10.1046/j.1440-1789.2001.00397.x.
41. Krzyżanowska, W., Pomierny, B., Bystrowska, B., Pomierny-Chamioło, L., Filip, M., Budziszewska, B., and Pera, J. (2017) Ceftriaxone- and N-acetylcysteine-induced brain tolerance to ischemia: influence on glutamate levels in focal cerebral ischemia, *PLoS One*, **12**, e0186243, doi: 10.1371/journal.pone.0186243.
42. Magi, S., Piccirillo, S., Amoroso, S., and Lariccia, V. (2019) Excitatory amino acid transporters (EAATs): glutamate transport and beyond, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 5674, doi: 10.3390/ijms20225674.
43. Jiang, T., Jiao, J., Shang, J., Bi, L., Wang, H., Zhang, C., Wu, H., Cui, Y., Wang, P., and Liu, X. (2022) The differences of metabolites in different parts of the brain induced by Shuxuetong Injection against cerebral ischemia-reperfusion and its corresponding mechanism, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2022**, 9465095, doi: 10.1155/2022/9465095.
44. Pocock, J. M., and Kettenmann, H. (2007) Neurotransmitter receptors on microglia, *Trends Neurosci.*, **30**, 527-535, doi: 10.1016/j.tins.2007.07.007.
45. Lori, A., Schultebrasucks, K., Galatzer-Levy, I., Daskalakis, N. P., Katrinli, S., Smith, A. K., Myers, A. J., Richholt, R., Huentelman, M., Guffanti, G., Wuchty, S., Gould, F., Harvey, P. D., Nemeroff, C. B., Jovanovic, T., Gerasimov, E. S., Maples-Keller, J. L., Stevens, J. S., Michopoulos, V., Rothbaum, B. O., Wingo, A. P., and Ressler, K. J. (2021) Transcriptome-wide association study of post-trauma symptom trajectories identified GRIN3B as a potential biomarker for PTSD development, *Neuropsychopharmacology*, **46**, 1811-1820, doi: 10.1038/s41386-021-01073-8.
46. Andersson, O., Stenqvist, A., Attersand, A., and von Euler, G. (2001) Nucleotide sequence, genomic organization, and chromosomal localization of genes encoding the human NMDA receptor subunits NR3A and NR3B, *Genomics*, **78**, 178-184, doi: 10.1006/geno.2001.6666.
47. Chatterton, J. E., Awobuluyi, M., Premkumar, L. S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y., Cui, J., Tu, S., Sevarino, K. A., Nakanishi, N., Tong, G., Lipton, S. A., and Zhang, D. (2002) Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits, *Nature*, **415**, 793-798, doi: 10.1038/nature715.
48. Mastroiacovo, F., Moyanova, S., Cannella, M., Gaglione, A., Verhaeghe, R., Bozza, G., Madonna, M., Motolese, M., Traficante, A., Riozzi, B., Bruno, V., Battaglia, G., Lodge, D., and Nicoletti, F. (2017) Genetic deletion of mGlu2 metabotropic glutamate receptors improves the short-term outcome of cerebral transient focal ischemia, *Mol. Brain*, **10**, 39, doi: 10.1186/s13041-017-0319-6.
49. Gulyaeva, N. V. (2021) Glucocorticoid regulation of the glutamatergic synapse: mechanisms of stress-dependent neuroplasticity, *J. Evol. Biochem. Physiol.*, **57**, 564-576, doi: 10.1134/S0022093021030091.
50. Gulyaeva, N. V. (2022) Neuroendocrine control of hyperglutamatergic states in brain pathologies: the effects of glucocorticoids, *J. Evol. Biochem. Physiol.*, **58**, 1425-1438, doi: 10.1134/S0022093022050131.

51. Neumann, S., Boothman-Burrell, L., Gowing, E. K., Jacobsen, T. A., Ahring, P. K., Young, S. L., Sandager-Nielsen, K., and Clarkson, A. N. (2019) The delta-subunit selective GABA a receptor modulator, DS2, improves stroke recovery via an anti-inflammatory mechanism, *Front. Neurosci.*, **13**, 1133, doi: 10.3389/fnins.2019.01133.
52. Hoque, A., Hossain, M. I., Ameen, S. S., Ang, C. S., Williamson, N., Ng, D. C. H., Chueh, A. C., Roulston, C., and Cheng, H.-C. (2016) A beacon of hope in stroke therapy-Blockade of pathologically activated cellular events in excitotoxic neuronal death as potential neuroprotective strategies, *Pharmacol. Ther.*, **160**, 159-179, doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.02.009.
53. Balakrishnan, K., Hleihil, M., Bhat, M. A., Ganley, R. P., Vaas, M., Klohs, J., Zeilhofer, H. U., and Benke, D. (2022) Targeting the interaction of GABAB receptors with CaMKII with an interfering peptide restores receptor expression after cerebral ischemia and inhibits progressive neuronal death in mouse brain cells and slices, *Brain Pathol.*, **33**, e13099, doi: 10.1111/bpa.13099.

COMPARATIVE INVESTIGATION OF GLUTAMATE AND GABA GENE EXPRESSION IN THE HIPPOCAMPUS AFTER FOCAL BRAIN ISCHEMIA AND CENTRAL LPS ADMINISTRATION

**T. S. Kalinina¹, G. T. Shishkina^{1*}, D. A. Lanshakov¹, E. V. Sukhareva¹, M. V. Onufriev²,
Y. V. Moiseeva², N. V. Gulyaeva², and N. N. Dygalo¹**

¹ *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,
630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: gtshi@bionet.nsc.ru*

² *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of Russian Academy of Sciences,
117485 Moscow, Russia*

Among the responses in the early stages of stroke, activation of neurodegenerative and proinflammatory processes in the hippocampus is of key importance for the development of negative post-ischemic functional consequences. However, it remains unclear which genes are involved in these processes. The aim of this work was a comparative study of the expression of genes encoding glutamate and GABA transporters and receptors, as well as inflammation markers in the hippocampus one day after two types of ischemic exposure (according to Koizumi – MCAO-MK, and Longa – MCAO-ML), as well as after direct pro-inflammatory activation by central administration of lipopolysaccharide (LPS). The results obtained revealed both differences and similarities between the responses to the impacts applied in the work. A greater number of genes that changed the expression associated with the activation of apoptosis and neuroinflammation, glutamate reception, and markers of the GABAergic system were found after MCAO-ML and LPS, than after MCAO-MK. In turn, MCAO-MK and LPS were characterized, in comparison with MCAO-ML, by changes in a larger number of genes involved in glutamate transport. The most pronounced difference between MCAO-ML and MCAO-MK and LPS was changes in the expression of genes for calmodulin and calmodulin-dependent kinases. The revealed features of the responses of the hippocampal transcriptome to two types of ischemia and a pro-inflammatory stimulus will contribute to further understanding of the causes of the diversity of stroke consequences, both in model studies and in the clinic.

Keywords: hippocampus, middle cerebral artery occlusion, lipopolysaccharide, glutamate, GABA, genes expression