

УДК 577.25

**ЭКСПРЕССИЯ мРНК ЦИТОКИНОВ *Il1b*, *Il6*,
Il10, *Tnf*, *Cx3cl1*, *Tgfb1* В ТКАНИ МОЗГА:
МЕТОДИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО
ВКЛАДА мРНК КЛЕТОК КРОВИ
В УСЛОВИЯХ ПЕРФУЗИИ И БЕЗ НЕЕ***

© 2019 А.А. Квичанский, М.Н. Волобуева, Ю.С. Спивак,
Л.В. Третьякова, Н.В. Гуляева**, А.П. Большаков

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
117485 Москва, Россия; электронная почта: nata_gul@mail.ru

Поступила в редакцию 21.03.2019

После доработки 04.05.2019

Принята к публикации 05.05.2019

Цитокины являются важными регуляторами функций мозга как в норме, так и в патологических условиях. Эти белки могут быть синтезированы резидентными клетками центральной нервной системы (эндотелием сосудов, клетками, формирующими гематоэнцефалический барьер и клетками, находящимися в паренхиме центральной нервной системы), клетками в просвете кровеносных сосудов или приходить с кровотоком. Соотношение количества цитокинов, синтезируемых внутри центральной нервной системы и попадающих в нее из внешних источников в различных условиях, остается малоизученным. В данной работе был исследован вклад мРНК из нерезидентных клеток в формирование общего пула мРНК следующих генов: *Tnf*, *Il1b*, *Il6*, *Il10*, *Cx3cl1* и *Tgfb1* в неокортексе, гиппокампе, твердой и мягкой оболочках мозга, а также сосудистом сплетении крыс. Кроме того, по экспрессии генов-маркеров (*Ncf1*, *Tbx21*, *Foxp3*, *RORγc*) была оценена представленность различных популяций резидентных и нерезидентных клеток иммунной системы – возможных источников мРНК цитокинов. Обнаружено, что отмывание крови с помощью транскардиальной перфузии приводит к снижению уровня мРНК *Tnf* в неокортексе и гиппокампе, а также снижению уровня мРНК *Il1b*, *Il6* и *Il10* в твердой мозговой оболочке. Уровень мРНК других исследованных генов в остальных структурах оставался неизменным. Полученные данные свидетельствуют о том, что мРНК *Tnf*, *Il1b*, *Il6* и *Il10*, присутствующая в крови, может вносить существенный вклад в пул мРНК этих цитокинов в тканях ЦНС и оболочек головного мозга, поэтому предварительная перфузия ткани мозга является необходимой стадией экспериментального дизайна для получения корректных результатов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цитокины, *Il1b*, *Il6*, *Il10*, *Tnf*, *Cx3cl1*, *Tgfb1*, перфузия, гиппокамп, неокортекс.

DOI: 10.1134/S0320972519080074

Нейровоспалением называют специфическую форму воспалительного процесса, характерного для центральной нервной системы. Такая реакция впервые была описана как возникающая в ответ на различные повреждения мозга, в т.ч. в результате травмы, действия токсикантов, гипоксии и инфекций. Однако позже было показано, что процессы, характерные для нейровоспаления, наблюдаются также и в норме, в т.ч. при нормальной синаптической пластичности и нейрогенезе, что указывает на их исходно адаптивную роль [1].

В качестве стандартных маркеров активации нейровоспаления используют повышение экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов (*Il1b*, *Il6*, *Tnf*), основными продуцентами которых в мозге являются клетки микроглии [2]. Кроме того, важную роль в регуляции реакции нейровоспаления играет баланс между концентрациями про- и противовоспалительных цитокинов [3]. Было показано, что мРНК *Il10* и цитокинов семейства TGFβ (*Tgfb1*, *Tgfb2*, *Tgfb3*), которые принято считать противовоспалительными медиаторами, присутствуют в различных клетках центральной нервной системы [2, 4, 5]. Особая роль принадлежит системе фракталкина (CX3CL1). Этот цитокин синтезируется преимущественно нейронами в центральной нервной системе [2] и регулирует миграцию макрофагов в центральную нервную систему и их превраще-

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», ВМ 19-086, 10.06.2019.

** Адресат для корреспонденции.

ние в микроглию, особенно в ходе формирования мозга. В свою очередь, в зрелом мозге фракталкин является противовоспалительным медиатором, обеспечивающим отрицательную обратную связь от нейронов к микроглии [6]. Измерение экспрессии мРНК генов различных про- и противовоспалительных цитокинов широко применяется для изучения развития нейровоспалительной реакции.

Ткани оболочек головного мозга могут являться важным источником цитокинов в локальном кровотоке, поскольку в них находится большое количество клеток иммунной системы; кроме того, через них проходят кровеносные сосуды, питающие мозг. Показано, что твердая оболочка является важной частью т.н. «глимфатической системы», ответственной, в том числе, и за регуляцию взаимодействия иммунной и нервной систем [7]. В свою очередь, в субарахноидальном пространстве проходят основные вены и артерии, отвечающие за кровоснабжение мозга, там же расположены венозные синусы, с которыми ассоциированы клетки иммунной системы, регулирующие многие функции мозга [8]. Сосудистое (хороидное) сплетение является еще одной анатомической структурой мозга, которую населяют клетки иммунной системы, регулирующие многие процессы в центральной нервной системе [9].

По отношению к центральной нервной системе цитокины могут иметь как эндогенное (синтезируются резидентными клетками в тканях мозга), так и экзогенное происхождение (синтезируются нерезидентными клетками в просвете сосудов или вообще вне центральной нервной системы). Несмотря на то, что мРНК цитокинов в мозге синтезируется как паренхимными, так и кровяными клетками, в подавляющем большинстве экспериментов по измерению экспрессии цитокинов в головном мозге априори предполагается, что основным источником цитокинов в ткани мозга является именно паренхима, а не клетки крови. При этом ранее не производили сравнения вклада паренхимных и кровяных клеток в уровень мРНК цитокинов в мозге. Это сравнение может оказаться важным для интерпретации получаемых данных, поскольку уровень экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов в мозге сравнительно низок (особенно в нормальных условиях), и примесь крови может существенно повышать измеряемый экспериментально уровень экспрессии этих генов. Потенциальная контаминация кровью образцов ткани мозга может влиять на регистрируемые значения экспрессии мРНК цитокинов, их соотношение и тем самым вносить непредсказуемую погрешность в результаты исследова-

ния. Вышеизложенное стимулировало проведение данного методического исследования.

В работе изучено влияние удаления крови из сосудов головного мозга крысы и его оболочек на относительное количество мРНК основных цитокинов, принимающих участие в регуляции нейровоспаления. Кроме того, исследовали влияние перфузии на относительное количество мРНК генов-маркеров субпопуляций клеток иммунной системы, наиболее важных для регуляции нейровоспаления в тканях мозга и его оболочек.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные процедуры. В работе были использованы крысы линии Wistar мужского пола из питомника «Столбовая» Московской области, массой 250–300 г. Протокол эксперимента был одобрен этической комиссией ИВНДиНФ РАН. Крысы из экспериментальной группы были анестезированы инъекцией 10%-ного (w/v) хлоралгидрата («Sigma», США) в дозе 9 мл/кг веса крысы, после чего они были подвергнуты транскардиальной перфузии ледяным фосфатно-солевым буфером (0,01 М, pH 7,4) («Пан-Эко», Россия) в течение 20 мин. В момент вскрытия правого предсердия отбирали пробу крови (100 мкл). По окончании перфузии, крысы были декапитированы, был извлечен головной мозг, затем мозг был охлажден в ледяном фосфатно-солевом буфере, после чего на положенной на лед фильтровальной бумаге были быстро препарированы образцы тканей неокортекса, гиппокампа, твердая оболочка головного мозга, совместно мягкая и паутинная оболочки, прилежащие к коре, мягкая и паутинная оболочки, прилежащие к гиппокампу, сосудистое сплетение (схема эксперимента представлена на рис. 1). Крысам контрольной группы были проведены те же манипуляции, включая подготовку к транскардиальной перфузии, но без ее проведения.

Выделение РНК и обратная транскрипция. Препарированные ткани и пробы крови помещали в пробирки, содержащие 500 мкл реактива для выделения РНК ExtractRNA («Евроген», Россия). Выделение РНК проводили в соответствии с рекомендациями производителя. Для удаления следов геномной ДНК проводили обработку проб РНК ДНКазой I («Thermo Scientific», США) в соответствии с рекомендациями производителя. Обратную транскрипцию проводили при помощи набора реактивов MMLV RT kit («Евроген», Россия) используя ингибитор РНКазы RNase Inhibitor, Murine («New England Biolabs, США») в соответствии с рекомендациями производителя.

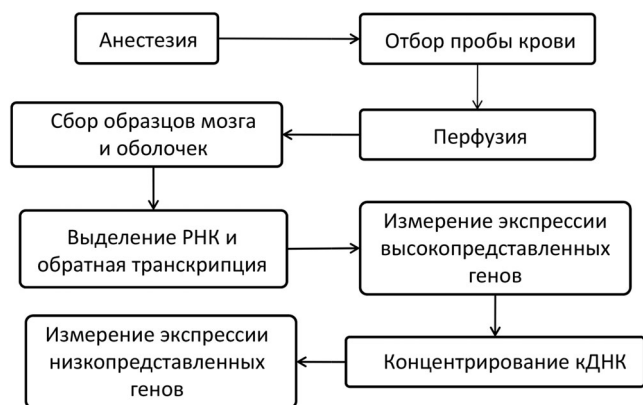


Рис. 1. Схема эксперимента

лей. Использовали эквимоллярную смесь случайного декапраймера и олиго(dT)₁₅ праймера («Евроген», Россия), концентрация каждого праймера в реакционной системе составляла 1 мкМ. После обратной транскрипции полученный продукт разводили 8× деионизованной водой.

ПЦР «в реальном времени». Относительное количество мРНК целевых генов исследовали при помощи станции для ПЦР «в реальном времени» Bio-Rad CFX-384 («Bio-Rad», США) с использованием готовой смеси для ПЦР qPCRmix-HS SYBR+LowROX («Евроген», Россия) в соответствии с рекомендациями производителей. Относительное количество мРНК высокопредставленных генов провоспалительных цитокинов (*Il1b*, *Il6*, *Tnf*) и противовоспалительных цитокинов (*Tgfb1* и фракталкина), маркера моноцитов (*Ncf1*) [10] нормировали на среднее геометрическое экспрессии мРНК генов *Ywhaz* и *Hprt1*. Экспрессию низкопредставленных генов: противовоспалительного цитокина – *Il10* и набора маркеров лимфоцитов: *Tbx21* (Th1-лимфоцитов [11]), *Foxp3* (Treg-лимфоцитов [12]), *RORγc* (Th17-лимфоцитов [13]) оценивали относительно мРНК *Osbp1* после 5× концентрирования кДНК преципитацией при помощи изопропанола с гликогеном («Thermo Scientific», США) в качестве соосадителя. Данная манипуляция позволила повысить концентрацию целевой кДНК в реакционной системе и уменьшила случайную ошибку метода. Для оценки качества ДНКазной обработки для всех проб и генов ставили в одной повторности отрицательный контроль с продуктом ДНКазной обработки. Для оценки качества перфузии использовали мРНК *Alas2* (маркера эритроцитов), относительное количество которой нормировали на экспрессию мРНК генов *Ywhaz* и *Hprt1*. Пробы из перфузированных крыс, в которых относительное количество мРНК *Alas2* снизилось <10× по сравне-

нию со средним значением в контрольной группе, исключали из исследования (средние значения в группах представлены в табл. 1).

Праймеры, использованные в работе (табл. 2), подбирали к последовательностям мРНК из базы данных NCBI при помощи программного пакета PrimerSelect (DNASTAR Lasergene). В качестве нормировочных генов использовали гены выбранные по данным транскриптомного анализа [14].

Анализ данных. Экспрессию генов анализировали по методу E^{ΔΔCt}. Данные в табл. 1 представлены в виде mean ± SD. Данные на графиках представлены в виде сгруппированных точечных диаграмм. Достоверность различий между группами выявляли по методу Манна–Уитни в пакете Statistica 10. Во всех группах *n* ≥ 6.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В неокортексе и гиппокампе было выявлено снижение относительного количества мРНК *Tnf* в результате транскардиальной перфузии (рис. 2, *a* и *b*), хотя относительное количество мРНК других потенциально экзогенных цитокинов, а также генов-маркеров моноцитов и Т-хелперов в неокортексе и гиппокампе не изменялось (табл. 3). В твердой оболочке головного мозга мы обнаружили снижение относительного количества мРНК генов *Il1b*, *Il6* и *Il10* под действием перфузии (рис. 2, *в–д*), однако, не было обнаружено изменений уровня мРНК генов-маркеров клеточных субпопуляций (табл.3).

Полученные данные говорят о том, что в переднем мозге и в твердой оболочке мРНК значительной части иммунных медиаторов синте-

Таблица 1. Влияние перфузии на относительное количество мРНК гена *Alas2*

	Без перфузии	После перфузии
Неокортекс	0,4320 ± 0,2708	0,0053 ± 0,0077
Гиппокамп	0,0058 ± 0,0030	0,0002 ± 0,0001
Оболочки неокортекса	0,4285 ± 0,2879	0,0034 ± 0,0042
Оболочки гиппокампа	0,4396 ± 0,3842	0,0029 ± 0,0036
Твердая оболочка	5,0629 ± 6,2582	0,1130 ± 0,0807
Сосудистое сплетение	0,0125 ± 0,0087	0,0001 ± 0,0001
Кровь	135,9542 ± 38,6557	102,2964 ± 62,9552

Таблица 2. Последовательности праймеров, использованных в работе

Название праймера	Последовательности праймеров (5'–3')	
	Прямой	Обратный
<i>Il1b</i>	TCTGTGACTCGTGGGATGAT	CACTTGTTGGCTTATGTTCTGTC
<i>Il6</i>	GCCACTGCCTTCCCTACTTCAC	GACAGTGCATCATCGCTGTTTCATAC
<i>Tnf</i>	GTCCAACCTCCGGGCTCAGAAT	ACTCCCCCGATCCACTCAG
<i>Hprt1</i>	CGTCGTGATTAGTGATGATGAAC	CAAGTCTTTCAGTCTGTCCATA
<i>Ywhaz</i>	TTGAGCAGAAGACGGAAGGT	GAAGCATTGGGGATCAAGAA
<i>Cx3cl1</i>	ATCACCACCATCACCACCAAC	GAGGAACACTTTAAACCCTCACAGA
<i>Il10</i>	GACAATAACTGCACCCACTTCC	GCATCACTTCTACCAGGTAACCTTG
<i>Foxp3</i>	GGCCGGGACCTGCGAAGTG	GGGTGTGGCCATGTGCGTCTA
<i>RORγc</i>	TGCTGTTAAGAGGATGAAGATGGTG	GGTACAATTGGAGGCTGCTGAA
<i>Tbx21</i>	CTGGAGCCCACGAGCCATTACA	CTCCCACACTGCACCCACTTG
<i>Ncf1</i>	CTGCAGCAAAGGACAGGACTG	GGGTCATGGCCAACAGGTT
<i>Osbp1</i>	TCCGGGAGACTTTACCTTCACTT	GTGTCACCCTCTTATCAACCACC

Таблица 3. Влияние перфузии на относительное количество мРНК генов цитокинов и маркеров клеточных субпопуляций

Структура	Ген									
	<i>Il1b</i>	<i>Il6</i>	<i>Tnf</i>	<i>Tgfb1</i>	<i>Cx3cl1</i>	<i>Il10</i>	<i>Ncf1</i>	<i>Foxp3</i>	<i>RORγc</i>	<i>Tbx21</i>
Неокортекс	=	=	↓ $p < 0,05$	=	=	ниже порога детекции	=	=	ниже порога детекции	=
Гиппокамп	=	=	↓ $p < 0,05$	=	=	ниже порога детекции	=	=	ниже порога детекции	=
Оболочки неокортекса	=	=	=	=	=	=	=	=	ниже порога детекции	=
Твердая оболочка	↓ $p < 0,05$	↓ $p < 0,05$	=	=	=	↓ $p < 0,05$	=	=	ниже порога детекции	=
Оболочки гиппокампа	=	=	=	=	=	=	=	=	ниже порога детекции	=
Сосудистое сплетение	=	=	=	=	=	=	=	↓ $p < 0,05$	ниже порога детекции	↑ $p < 0,05$
Кровь	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=

= Достоверных различий не выявлено.

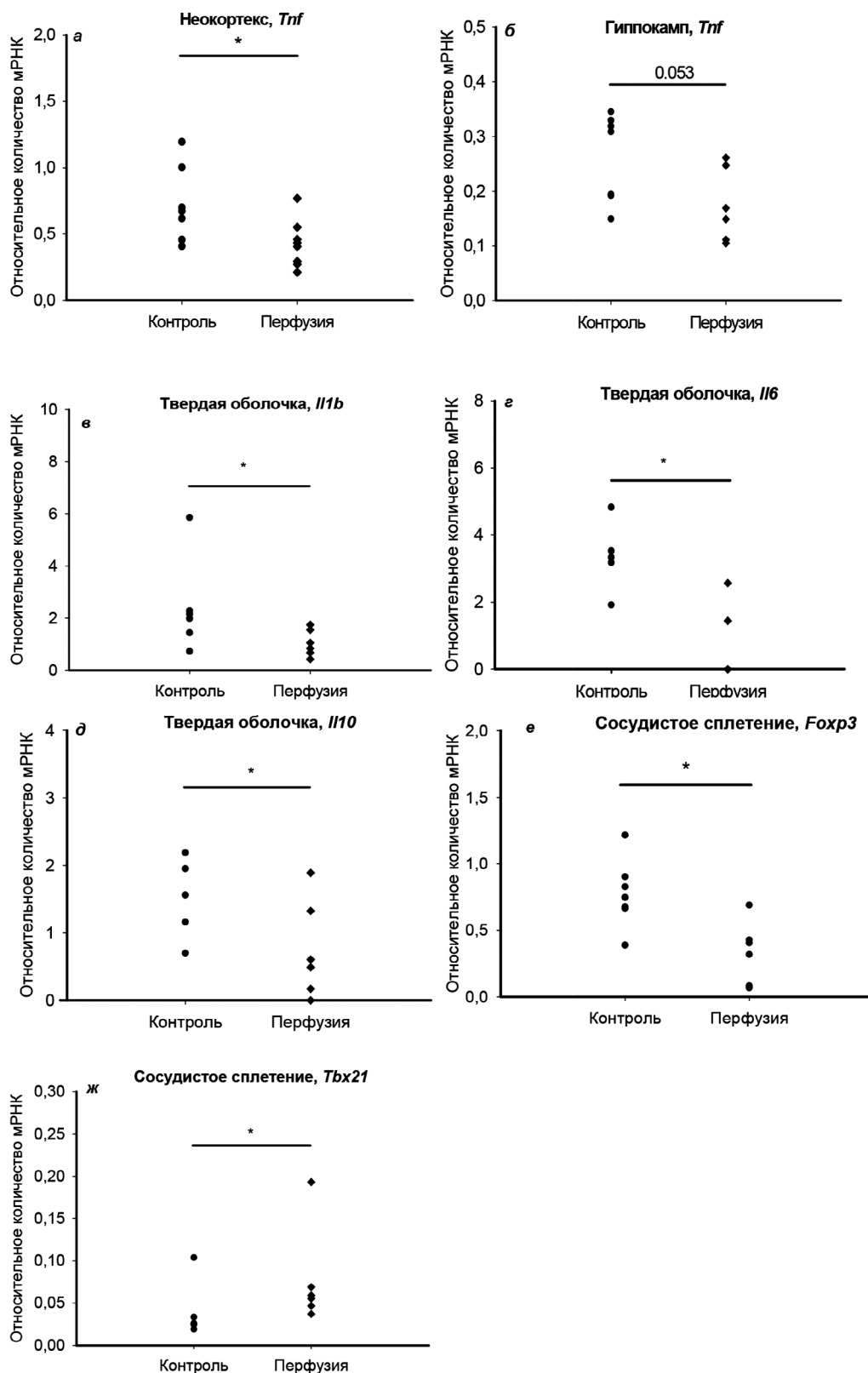


Рис. 2. Влияние перфузии на содержание мРНК основных цитокинов, принимающих участие в нейровоспалении, и ген-маркеров субпопуляций клеток иммунной системы. *a* – Экспрессия мРНК *Tnf* в неокортексе; *б* – экспрессия мРНК *Tnf* в гиппокампе; *в* – экспрессия мРНК *Il1b* в твердой оболочке; *г* – экспрессия мРНК *Il6* в твердой оболочке; *д* – экспрессия мРНК *Il10* в твердой оболочке; *е* – экспрессия мРНК *Foxp3* в сосудистом сплетении; *ж* – экспрессия мРНК *Tbx21* в сосудистом сплетении. * $p \leq 0.05$ – достоверные различия по тесту Манна–Уитни

зируется в резидентных клетках. В то же время, снижение уровня мРНК *Tnf* в неокортексе и гиппокампе и мРНК *Il1b*, *Il6* и *Il10* в твердой оболочке свидетельствует о том, что нерезидентные клетки вносят значительный вклад в пул мРНК указанных генов в этих структурах. Анализ уровня маркеров моноцитов (*Ncf1*) и некоторых типов Т-клеток (*Tbx21*, *Foxp3*, *RORγc*) показал, что перфузия не приводит к значимым изменениям относительного уровня маркеров этих клеточных субпопуляций. Возможно, источником мРНК цитокинов, удаленных при перфузии, являются клетки крови, не входящие ни в одну из исследованных групп клеток, например, нейтрофилы или Th2-лимфоциты.

В сосудистом сплетении, напротив, было обнаружено снижение относительного количества мРНК *Foxp3* (рис. 2, *e*), но не было выявлено изменений относительного количества *Il10* – основного цитокина Трег-лимфоцитов [15]. Вероятно, сосудистое сплетение содержит достаточно большое число резидентных клеток, экспрессирующих *Il10*, поэтому удаление Трег-лимфоцитов из сосудов хороидного сплетения не влияет на уровень этого цитокина. Парадоксальным образом в сосудистом сплетении мы обнаружили повышение относительного количества РНК гена *Tbx21* в результате перфузии (рис. 2, *ж*).

Таким образом, мы показали, что присутствие клеток крови в образцах ткани мозга,

мозговых оболочек и сосудистого сплетения вносит значимый вклад в представленность мРНК генов различных иммунных медиаторов и маркеров клеточных субпопуляций в тканях головного мозга и его оболочек. Этот вклад неодинаков для различных генов и может быть специфичен для различных анатомических структур. В общем случае предсказать вклад экзогенных клеток в общий пул мРНК генов иммунных регуляторов не представляется возможным, тем более что в различных нормальных и патологических условиях этот вклад может быть неодинаков. В связи с этим необходимо рекомендовать проводить перфузию лабораторных животных в качестве важной стадии перед забором биологического материала при исследованиях реакции нейровоспаления в мозге и его оболочках методом ПЦР «в реальном времени».

Финансирование. Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 18-015-00314).

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все принятые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Estes, M.L., and McAllister, A.K. (2014) Alterations in immune cells and mediators in the brain: it's not always neuroinflammation! *Brain Pathol.*, **24**, 623–630, doi: 10.1111/bpa.12198.
- Zeisel, A., Munoz-Manchado, A.B., Codeluppi, S., Lonnerberg, P., La Manno, G., Jureus, A., Marques, S., Munguba, H., He, L., Betsholtz, C., Rolny, C., Castelo-Branco, G., Hjerling-Leffler, J., and Linnarsson, S. (2015) Brain structure. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq., *Science*, **347**, 1138–1142, doi: 10.1126/science.aaa1934.
- Meyer, U., Murray, P.J., Urwyler, A., Yee, B.K., Schedlowski, M., and Feldon, J. (2008) Adult behavioral and pharmacological dysfunctions following disruption of the fetal brain balance between pro-inflammatory and IL-10-mediated anti-inflammatory signaling, *Mol. Psychiatry*, **13**, 208–221, doi: 10.1038/sj.mp.4002042.
- Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S.A., Bennett, M.L., Scholze, A.R., O'Keefe, S., Phatnani, H.P., Guarnieri, P., Caneda, C., Ruderisch, N., Deng, S., Liddelow, S.A., Zhang, C., Daneman, R., Maniatis, T., Barres, B.A., and Wu, J.Q. (2014) An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex, *J. Neurosci.*, **34**, 11929–11947, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014.
- Pisanu, A., Lecca, D., Mulas, G., Wardas, J., Simbula, G., Spiga, S., and Carta, A.R. (2014) Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokines in microglia after PPAR-γ agonist neuroprotective treatment in the MPTPp mouse model of progressive Parkinson's disease, *Neurobiol. Dis.*, **71**, 280–291, doi: 10.1016/j.nbd.2014.08.011.
- Rogers, J.T., Morganti, J.M., Bachstetter, A.D., Hudson, C.E., Peters, M.M., Grimmig, B.A., Weeber, E.J., Bickford, P.C., and Gemma, C. (2011) CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity, *J. Neurosci.*, **31**, 16241–16250, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3667-11.2011.
- Louveau, A., Herz, J., Alme, M.N., Salvador, A.F., Dong, M.Q., Viar, K.E., Herod, S.G., Knopp, J., Setliff, J.C., Lupi, A.L., Da Mesquita, S., Frost, E.L., Gaultier, A., Harris, T.H., Cao, R., Hu, S., Lukens, J.R., Smirnov, I., Overall, C.C., Oliver, G., and Kipnis, J. (2018) CNS lymphatic drainage and neuroinflammation are regulated by meningeal lymphatic vasculature, *Nat. Neurosci.*, **21**, 1380–1391, doi: 10.1038/s41593-018-0227-9.
- Filiano, A.J., Gadani, S.P., and Kipnis, J. (2017) How and why do T cells and their derived cytokines affect the injured and healthy brain? *Nat. Rev. Neurosci.*, **18**, 375–384, doi: 10.1038/nrn.2017.39.
- Marques, F., and Sousa, J.C. (2015) The choroid plexus is modulated by various peripheral stimuli: implications to diseases of the central nervous system, *Front. Cell. Neurosci.*, **9**, 136, doi: 10.3389/fncel.2015.00136.
- Ding, X., Zhang, M., Gu, R., Xu, G., and Wu, H. (2017) Activated microglia induce the production of reactive oxy-

- gen species and promote apoptosis of co-cultured retinal microvascular pericytes, *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **255**, 777–788, doi: 10.3389/fncel.2015.00136.
11. Ferreira, L., Hamey, F., Teichmann, S.A., Cvejic, A., Macaulay, I.C., Svensson, V., Labalette, C., and Voet, T. (2016) Single-cell RNA-sequencing reveals a continuous spectrum of differentiation in hematopoietic cells, *Cell Rep.*, **14**, 966–977, doi: 10.1016/j.celrep.2015.12.082.
 12. Prieto Martin, P., Bending, D., Ono, M., Ducker, C.B., Crompton, T., and Paduraru, A. (2018) A temporally dynamic Foxp3 autoregulatory transcriptional circuit controls the effector Treg programme, *EMBO J.*, **37**, e99013, doi: 10.15252/embj.201899013.
 13. Zhao, Y., Balato, A., Fischelevich, R., Chapoval, A., Mann, D.L., and Gaspari, A.A. (2009) Th17/Tc17 infiltration and associated cytokine gene expression in elicitation phase of allergic contact dermatitis, *Br. J. Dermatol.*, **161**, 1301–1306, doi: 10.1111/j.1365-2133.2009.09400.x.
 14. Dobryakova, Y. V., Kasianov, A., Zaichenko, M.I., Stepanichev, M.Y., Chesnokova, E.A., Kolosov, P.M., Markevich, V.A., and Bolshakov, A.P. (2018) Intracerebroventricular administration of 192IgG-saporin alters expression of microglia-associated genes in the dorsal but not ventral hippocampus, *Front. Mol. Neurosci.*, **10**, doi: 10.3389/fnmol.2017.00429.
 15. Williams, A., Zandee, S.E.J., Mair, I., Anderton, S.M., O'Connor, R.A., and Leech, M.D. (2017) IL-10-producing, ST2-expressing Foxp3 + T-cells in multiple sclerosis brain lesions, *Immunol. Cell Biol.*, **95**, 484–490, doi: 10.1038/icb.2017.3.

EXPRESSION OF mRNAs FOR *Il1b*, *Il6*, *Il10*, *Tnf*, *Cx3cl1*, AND *Tgfb1* CYTOKINES IN THE BRAIN TISSUES: ASSESSMENT OF CONTRIBUTION OF BLOOD CELLS WITH AND WITHOUT PERFUSION

A. A. Kvichansky, M. N. Volobueva, Yu. S. Spivak,
L. V. Tret'yakova, N. V. Gulyaeva*, and A. P. Bolshakov

*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences,
117485 Moscow, Russia; E-mail: nata_gul@mail.ru*

Received March 21, 2019

Revised May 4, 2019

Accepted May 5, 2019

Cytokines are important regulators of brain function under both normal and pathological conditions. Cytokines can be synthesized by resident cells of the central nervous system (CNS) (vascular endothelium, cells of the blood-brain barrier, parenchymal cells of the CNS) or cells in the lumen of blood vessels, as well as introduced with the bloodstream. The ratio between the amounts of cytokines synthesized in the CNS and those entering it from external sources under various conditions remains poorly understood. In this work we studied the contribution of mRNAs from non-resident cells to the common pool of cytokine mRNAs (*Il1b*, *Il6*, *Il10*, *Tnf*, *Cx3cl1*, and *Tgfb1*) in the rat neocortex, hippocampus, dura matter, pia matter, and choroid plexus. We also evaluated the representation of various populations of resident and non-resident immune cells based on the expression of marker genes (*Ncf1*, *Tbx21*, *Foxp3*, *RORγc*). The removal of blood by transcardial perfusion led to a decrease in the amounts of the TNFα mRNA in the neocortex and hippocampus and of the *Il1b*, *Il6*, and *Il10*, mRNAs in the dura mater. The mRNA levels of other cytokines in studied structures were not affected by perfusion. Our findings suggest that mRNAs present in the blood can make a significant contribution to the mRNA levels of some cytokines in the CNS; therefore, preliminary perfusion of brain tissue is a necessary stage of experimental design for correct estimation of mRNA content in the brain.

Keywords: cytokines, *Il1b*, *Il6*, *Il10*, *Tnf*, *Cx3cl1*, *Tgfb1*, perfusion, hippocampus, neocortex