Оригінальна стаття = Original article = Оригинальная статья

Ukr Neurosurg J. 2020;26(4):20-25
doi: 10.25305/unj.205793

Дослідження функціональної активності імунокомпетентних клітин мозку в різні терміни після експериментальної черепно-мозкової травми

Лісяний М.І., Бєльська Л.М.

Відділ нейроімунології, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, Україна

Надійшла до редакції 15.07.2020
Прийнята до публікації 01.10.2020

Адреса для листування:
Бєльська Людмила Миколаївна, Відділ нейроімунології, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова, вул. Платона Майбороди, 32, Київ, 04050, Україна, e-mail: adsg@ukr.net

Мета: дослідити функціональну активність мікроглії та моноцитарно-макрофагальних клітин у різні терміни після експериментальної черепно-мозкової травми (ЧМТ) у щурів.

Матеріали і методи. Експериментальну ЧМТ моделювали у щурів шляхом падіння вантажу вагою 100 г з висоти 120 см. Мікроглію та моноцити, котрі інфільтрують центральну нервову систему, виділяли з тканини мозку щурів у ступеневому градієнті перколу. Визначення активності клітин мозку, які фагоцитують, проводили в НСТ-тесті спектрофотометричним методом. Активність мієлопероксидази визначали в лізаті клітин кількісним спектрофотометричним методом.

Результати. Після ЧМТ у головному мозку виявлено підвищення кількості мікрогліально-моноцитарних клітин та збільшення спонтанної продукції цими клітинами токсичних молекул кисню, яке залежало від терміну травми і локалізації травматичного ушкодження. Найбільше (триразове) збільшення кількості мікрогліальних та моноцитарно-макрофагальних клітин відзначено на 5-ту добу після ЧМТ у півкулі з травматичним ураженням. Максимальне підвищення спонтанної продукції супероксидного радикала спостерігали також на 5-ту добу після ЧМТ. Мієлопероксидазна активність зазначеної популяції клітин підвищувалася вже через 24 год після ЧМТ та поступово зменшувалася до контрольних показників на 10-ту добу після травми, що свідчить про етапність процесу.

Висновки. На 5-ту добу після ЧМТ у вогнищі запалення переважали мікрогліальні та моноцитарно-макрофагальні клітини М1-прозапального фенотипу. Вплив на клітинні та молекулярні механізми, які регулюють функціональні реакції мікроглії/макрофагів після ЧМТ, можливо, сприятиме розробці терапевтичних втручань, спрямованих на перехід зазначених клітин з М1-фенотипу в М2-фенотип, що необхідно для поліпшення відновлення центральної нервової системи.

Ключові слова: *черепно-мозкова травма; мікроглія; макрофаги мозку; фагоцитоз; експериментальні дослідження*

Research of the functional activity of immunocompetent brain cells on separate occasions after experimental traumatic brain injury

Mykola I. Lisianyi, Lyudmyla M. Belska

Neuroimmunology Department, Romodanov Neurosurgery Institute, Kyiv, Ukraine

Received: 15 July 2020
Accepted: 01 October 2020

Address for correspondence:
Lyudmyla M. Belska, Neuroimmunology Department, Romodanov Neurosurgery Institute, 32 Platona Mayborody st., Kyiv, 04050, Ukraine, e-mail: adsg@ukr.net

Objective: To investigate the functional activity of microglia and monocytic/macrophage cells on separate occasions after the rat model of experimental brain injury.

Materials and methods. The rat model of experimental brain injury was simulated by dropping a load weighing 100 g from a height of 120 cm. Microglia and infiltrating CNS monocytes were isolated from rat brain tissue in a stepwise Percoll cushion. The activity of phagocytic brain cells was determined in the HCT test by the spectrophotometric method. Myeloperoxidase activity was determined in cell lysate by a quantitative spectrophotometric method.

Results. It was found that after brain injury there is an increase in the number of microglial / monocyte cells and an increase in spontaneous production of toxic oxygen molecules by these cells, which depends on the duration of injury and the location of the injury. The greatest threefold increase in microglial and monocytic/macrophage cells is determined on the 5th day after brain injury in the hemisphere with a traumatic injury. The maximum increase in spontaneous production of superoxide anion radical by these cells is also determined on the 5th day after brain injury. In contrast, myeloperoxidase activity of this cell population increases as early as 24 h after brain injury and

Copyright © 2020 Mykola I. Lisianyi, Lyudmyla M. Belska

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

gradually decreases to control values on the 10th day after the injury, which indicates the gradual development of the process.

Conclusion. The result of the researches demonstrated that on the 5th day after brain injury microglial and monocytic/macrophage M1 cells of pro-inflammatory phenotype prevail in the inflammation site. Influences on the cellular and molecular mechanisms that regulate the functional responses of microglia/macrophages after brain injury may facilitate the development of future therapeutic interventions aimed at the phenotypic transition of these cells from M1 to M2, which is necessary to improve CNS recovery.

Keywords*: brain injury; microglia; brain macrophages; phagocytosis; experimental studies*

Исследование функциональной активности иммунокомпетентных клеток мозга в разные сроки после экспериментальной черепно-мозговой травмы

Лисяный Н.И., Бельская Л.Н.

Отдел нейроиммунологии, Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины, Киев, Украина

Поступила в редакцию 15.07.2020
Принята к публикации 01.10.2020

Адрес для переписки:
Бельская Людмила Николаевна, Отдел нейроиммунологии, Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова, ул. Платона Майбороды, 32, Киев, 04050, Украина, e-mail: adsg@ukr.net

Цель: исследовать функциональную активность микроглии и моноцитарно-макрофагальных клеток в разные сроки после экспериментальной черепно-мозговой травмы (ЧМТ) у крыс.

Материалы и методы. Экспериментальную ЧМТ моделировали у крыс путем падения груза весом 100 г с высоты 120 см. Микроглию и инфильтрирующие центральную нервную систему моноциты выделяли из ткани мозга крыс в ступенчатом градиенте перколла. Определение активности фагоцитирующих клеток мозга проводили в НСТ-тесте спектрофотометрическим методом. Активность миелопероксидазы определяли в лизате клеток количественным спектрофотометрическим методом.

Результаты. После ЧМТ в головном мозге выявлено повышение количества микроглиально-моноцитарных клеток и увеличение спонтанной продукции данными клетками токсичных молекул кислорода, которое зависело от срока травмы и локализации травматического повреждения. Наибольшее (трехкратное) увеличение количества микроглиальных и моноцитарно-макрофагальных клеток отмечено на 5-е сутки после ЧМТ в полушарии с травматическим поражением. Максимальное повышение спонтанной продукции супероксидного радикала наблюдали также на 5-е сутки после ЧМТ. Миелопероксидазная активность упомянутой популяции клеток повышалась уже через 24 ч после ЧМТ и постепенно приближалась к контрольным показателям на 10-е сутки после травмы, что свидетельствует об этапности процесса.

Выводы. На 5-е сутки после ЧМТ в очаге воспаления преобладали микроглиальные и моноцитарно-макрофагальные клетки М1-провоспалительного фенотипа. Влияние на клеточные и молекулярные механизмы, регулирующие функциональные реакции микроглии/макрофагов после ЧМТ, возможно, будет способствовать разработке терапевтических вмешательств, направленных на переход данных клеток из М1-фенотипа в М2-фенотип, что необходимо для улучшения восстановления центральной нервной системы.

Ключевые слова: *черепно-мозговая травма; микроглия; макрофаги мозга; фагоцитоз; экспериментальные исследования*

Вступ

Нейрозапалення є характерною рисою багатьох нейродегенеративних захворювань і дедалі частіше розглядається як важливий патофізіологічний механізм, який лежить в основі хронічної нейродегенерації після черепно-мозкової травми (ЧМТ). Як первинний медіатор вродженої імунної відповіді в центральній нервовій системі (ЦНС), мікроглія відіграє критичну роль у нейрозапаленні та вторинному пошкодженні після ЧМТ [1].

Мікроглія – основний клітинний компонент вродженої імунної системи мозку. На її частку припадає близько 10% від загальної кількості клітин у ЦНС дорослих осіб. У підтриманні мікроглії в нормальному фізіологічному стані важливу роль відіграє імуносупресивний потенціал ЦНС. У здоровому мозку нейрони експресують низку імуносупресивних білків, які діють як "вимкнені" сигнали, котрі разом зі специфічними рецепторами мікроглії підтримують її в неактивному стані. Крім того, розчинні фактори, такі як нейротрофіни, протизапальні цитокіни і простагландини, локально вивільняються нейронами, астроцитами та мікроглією і пригнічують імунну відповідь, підтримуючи мікроглію в неактивному стані [2].

Після ЧМТ протягом короткого часу спостерігається сильна нейрозапальна відповідь, яка опосередкується складними молекулярними і клітинними механізмами. Залежно від інтенсивності ушкодження ЧМТ спричиняє миттєву загибель клітин у місці удару. Пошкоджені клітини вивільняють DAMP, які пере-

дають сигнали іншим локальним та імунним клітинам, які інфільтрують. Астроцити, мікроглія та пошкоджені нейрони в місці травми секретують цитокіни і хемокіни. Ці потужні імунні медіатори спричиняють подальшу активацію мікроглії і астроцитів в місці пошкодження та залучають периферичні імунні клітини, які проходять крізь пошкоджений гематоенцефалічний бар'єр протягом гострого посттравматичного періоду. Гематогенні моноцити залучаються у пошкоджений мозок у відповідь на локальні сигнали хемокінів (CCL2, CXCL10, CCL5 тощо), де відбувається їх диференціювання в макрофаги [3]. Показано переважання в місці ураження через 3 дні після травми запальних моноцитів з експресією хемокінового рецептора CCR2 (CD11b + CD45hiCCR2 + Ly6Chi) [4]. Дендритні клітини, Т-лімфоцити і природні кілери (NK) також проникають у мозок з ЧМТ протягом цього періоду, але в набагато меншій кількості, ніж моноцити, які інфільтрують. Крім того, протягом цього періоду активуються резидентні гліальні клітини мозку. Астроцити в місці травми активуються і продукують цитокіни та хемокіни, які сприяють додатковому залученню і активації резидентної мікроглії та периферичних імунних клітин. Мікроглія трансформується з розгалуженої в амебоїдну форму і морфологічно не відрізняється від залучених гематогенних макрофагів. Вони секретують прозапальні цитокіни та вільні радикали, які є цитотоксичними для нейронів і можуть призвести до нейродегенерації після ЧМТ [5].

Нині активно вивчають роль і внесок у розвиток ЧМТ M1- і M2-подібної поляризованої мікроглії та макрофагів, які інфільтрують. Описано, що мікроглія і макрофаги реагують на прозапальні молекули, такі як бактеріальний ліпополісахарид, Th1-цитокін, інтерферон-γ (ІФН-γ), щоб набути "класичнного" M1-подібного фенотипу, який продукує високі рівні прозапальних цитокінів (інтерлейкін (IL)-1β, IL-12, фактор некрозу пухлини-α (ФНП-α), хемокіни (CCL2, CXCL9, CXCL10) і активні форми кисню [6]. До M1-подібних маркерів фенотипу належать CD16, CD32, CD86, молекули гістосумісництва класу 2 (MHC II) та індукована NO-синтетаза (iNOS). M1-подібна активація пов'язана з фагоцитозом, здатністю знищувати патогенні мікроорганізми за рахунок обмеження заліза, підкислення фагосом і вивільнення активних форм кисню [7]. У багатьох випадках M1-подібна відповідь є захисною і пригнічується після усунення пошкодження або патогену, але нерегульована або надмірна M1-подібна активація в головному мозку може спричинити нейротоксичність через вивільнення прозапальних чинників і нейротоксичних медіаторів, які запускають цикли опосередкованої мікроглією нейродегенерації. Мікроглія і макрофаги також відповідають на Th2-цитокіни, такі як IL-4 і IL-13, щоб індукувати "альтернативний" M2a-подібний стан, пов'язаний із залученням Th2-клітин, відновленням тканин і стимуляцією росту [8]. Мікроглія/макрофаги можуть набувати проміжного M2b-подібного фенотипу у відповідь на вплив імунного комплексу і ліганду Toll-рецепторів [8]. M2b-подібний фенотип володіє прозапальною або протизапальною дією і пов'язаний з імунними реакціями пам'яті (перемикання класу B-клітин і залучення Т-регуляторних клітин). Фенотип M2b має характеристики як клітин M1 (MHC II, CD86), так і клітин M2 (IL-10high, IL-12low). Коли макрофаги M2b стимулюють Т-клітини, вони зміщуються в бік Th2-відповіді [8] , що припускає їх можливість бути потенційним регулятором M2-відповіді в цілому.

Експериментальні дослідження на моделях ішемічної травми головного мозку показали, що більшість клітин мікроглії і залучених макрофагів у місці пошкодження мають змішані M1- і M2-подібні профілі активації, M2-подібна відповідь є короткочасною та є фенотипічний зсув у бік M1-відповіді протягом 1 тиж після травми [9].

Отже, після нейротравми мікрогліальні клітини є першими клітинами, які реагують на пошкодження і можуть чинити як захисну, так і пошкоджувальну дію на нейрони залежно від фенотипу. В зв'язку з цим актуальним є вивчення функціональної активності мікрогліальних клітин на різних етапах розвитку ЧМТ, оскільки можливість перемикання мікроглії з M1-фенотипу на M2 розглядають як нову стратегію в лікуванні зазначеної патології мозку.

Мета: дослідити функціональну активність мікроглії та моноцитарно-макрофагальних клітин у різні терміни після експериментальної черепно-мозкової травми у щурів.

Матеріали і методи

Проведено одноцентрове проспективне когортне дослідження. В роботі використано експериментальні тварини (29 аутбредних статевозрілих щурів-самок розведення віварію Інституту нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України). До групи дослідження залучено 20 тварин, до групи контролю (інтактні тварини) – 9.

Усі роботи з експериментальними тваринами проводили з дотриманням законодавчих норм та вимог Закону України №3447 IV "Про захист тварин від жорстокого поводження", Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), принципів біоетики та норм біологічної безпеки.

Тварин утримували у стандартних умовах акредитованого віварію. Знеболювання та евтаназію проводили під наркозом.

Проведення дослідження затверджене комісією з етики та біоетики Інституту нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України (протокол №26 від 11 травня 2018 р.).

Дизайн дослідження

Моделювання черепно-мозкової травми в експериментальних щурів

Черепно-мозкову травму моделювали шляхом падіння вантажу (вагою 100 г) з висоти 120 см на голову щурів, які перебували в стані наркотичного сну (внутрішньочеревно 0,5 мл 5,0% розчину тіопенталу), котрий тривав 30 хв. Голову тварин розташовували під пластиковою вертикальною трубою діаметром 2,5 см заввишки 120 см таким чином, щоб удар (контакт) вантажу, який падав, припадав на ліву півкулю в ділянці тім'яної та потиличної часток головного мозку.

Після отримання травми у тварин рефлекторно відбувалася затримка дихання на декілька секунд, яке

потім відновлювалося до звичайного ритму. Судом та інших порушень або виділення сечі та калу не було. Через 20–30 хв тварини виходили із наркозу і починали ворушитися та пересуватися по клітці. У трьох тварин після ЧМТ спостерігали швидку смерть через зупинку дихання або судомну реакцію, яка виникала протягом 3–10 хв після травми. При дослідженні причин смерті цих тварин виявлено пошкодження венозних синусів та крововилив у головний мозок у ділянці лобово-скроневої частки. Крім того, зафіксували загибель 5 тварин протягом 48–72 год після ЧМТ, які після виходу із наркозу були дуже кволі та малорухливі, що свідчило про наявність дуже тяжкої травми. При дослідженні головного мозку померлих тварин мікроскопічно виявлено набряк, гіперемію та невеликі зони забою лівої півкулі розміром близько 3–5 мм. У щурів, котрі вижили, змодельовано ЧМТ у вигляді забою мозку легкого та середнього ступеня тяжкості.

Виділення клітин мікроглії та імунокомпетентних клітин, які інфільтрують ЦНС

Мікроглію та моноцити, які інфільтрують ЦНС, виділяли з тканини мозку щурів у ступінчастому градієнті перколу за методом J. Sedgwick та співавт. [10]. Застосування цього методу дало змогу виділити фракцію клітин, які містять резидентні макрофаги мозку, гематогенні моноцити/макрофаги і фракцію, збагачену $OX1^{low}$-мікрогліальними клітинами. За даними авторів методу, в запальній ЦНС на градієнті щільності виділялися не лише $OX1^{low}$-клітини, а і $OX1^{hight}$-клітини інфільтрату ЦНС лімфоїдно-макрофагального ряду. Частка мікроглії ($OX1^{low}$) у дорослих інтактних тварин при цьому методі виділення становить 82,9 % від загального числа виділених клітин, як виявили автори методики за даними цитофлуорометричного аналізу з використанням моноклональних антитіл щурів.

Після отримання клітини відмивали від залишків перколу в CMF-буфері, ресуспендували в середовищі Ігла, підраховували в розчині трипанового синього та 3% оцтової кислоти і використовували в подальших дослідженнях.

Визначення активності імунокомпетентних клітин мозку в НСТ-тесті

Визначення активності клітин мозку, які фагоцитують, проводили в НСТ-тесті (спонтанному та стимульованому) [11]. Результати вираховували спектрофотометрично на спектрофотометрі Immunohem (США) за довжини хвилі 570 нм. Спонтанну фагоцитарну активність виражали в умовних одиницях.

Визначення активності внутрішньоклітинної мієлопероксидази імунокомпетентних клітин

Активність мієлопероксидази (МПО) визначали в лізаті клітин кількісним спектрофотометричним методом з використанням суміші 0,04% ортофенілдіаміну та 0,014% H_2O_2 у фосфатно-цитратному буфері, оптичну густину – за довжини хвилі 492 нм на спектрофотометрі Immunohem (США). Активність МПО виражали в умовних одиницях [12].

Статистичний аналіз

Статистичну обробку даних проводили з використанням комп'ютерної програми Statistica-8 з визначенням середньої арифметичної, квадратичного відхилення (σ) та рівня статистичної значущості (p) та програми Microsoft Excel 2007 з визначенням середньої арифметичної, стандартного статистичного відхилення і t-критерію Стьюдента. Статистично значущими вважали відмінності при $p<0,05$.

Результати та обговорення

Кількість клітин, які виділяли з тканини ЦНС на градієнті, який ми використовували, змінювалася залежно від терміну дослідження після ЧМТ. Вміст у ЦНС цієї фракції клітин через 24 год після нанесення травми збільшувався в 1,4 разу в правій півкулі (без травматичного пошкодження) і в 2,2 разу – в лівій півкулі (з травматичним ураженням) порівняно з показниками контрольних тварин ***(Табл. 1)***.

Найбільшу інфільтрацію тканини мозку в обох півкулях клітинами, які виділялися на ступеневому градієнті, відзначено на 5-ту добу після травми. Більш виражене статистично значуще ($p<0,05$) збільшення кількості цих клітин спостерігали в півкулі з травматичним ушкодженням, що, можливо, свідчить про проліферацію резидентних макрофагів та інтенсивну інфільтрацію тканини ЦНС у цей період гематогенними клітинами моноцитарно-макрофагального і лімфоїдного ряду. На 10-ту добу після травми виявлено поступове зниження кількості виділених мікрогліальних та моноцитарно-макрофагальних клітин як у правій, так і в лівій півкулі, але показники не досягали контрольних значень (див. ***Табл. 1***), що може свідчити про зменшення запальної реакції.

Ми також вивчали функціональну активність зазначених клітин у НСТ-тесті. Цей тест ґрунтується на здатності клітин, які фагоцитують, поглинати нітросиній тетразолій і відновлювати його продуктами окисно-відновних реакцій "метаболічного вибуху", котрі супроводжують процес фагоцитозу. Результати спонтанного тесту характеризують інтенсивність вироблення активних метаболітів кисню під час фагоцитозу. Результати стимульованого тесту дають уявлення про функціонально-метаболічні резерви клітини і здатність до активації *in vitro* [11].

В інтактному мозку дорослої тварини продуцентами активних форм кисню є резидентні макрофаги ЦНС – мікроглія, периваскулярні макрофаги, для яких, так само, як і для тканинних макрофагів, за нашими даними, у фізіологічних умовах характерна низька спонтанна і висока стимульована продукція супероксидного радикала ***(Табл. 2)*** [13].

Таблиця 1. Кількість імунокомпетентних клітин мозку в різні терміни після черепно-мозкової травми

Термін після травми	Кількість клітин, 10^6 на 0,5 г мозку	
	Права півкуля	Ліва півкуля
24 год (n=6)	2,41 ± 0,51	3,7 ± 0,26*
5-та доба (n=9)	2,85 ± 1,09	4,95 ± 1,38*
10-та доба (n=5)	2,2 ± 0,63	2,8 ± 0,91
Контроль (n=9)	1,68 ± 0,62	1,74± 0,67

Примітка: * – статистично значуща ($p<0,05$) різниця з показниками інтактних тварин.

Таблиця 2. Функціональна активність імунних клітин мозку в різні терміни після черепно-мозкової травми

Термін після травми	НСТ тест (спонтанна активність), у. о.		НСТ-тест (стимульована активність), % зимозан		Активність мієлопероксидази	
	Права півкуля мозку	Ліва півкуля мозку	Права півкуля мозку	Ліва півкуля мозку	Права півкуля мозку	Ліва півкуля мозку
24 год (n=6)	53,33±9,38	66,65±5,44*	115,64±13,56	104,63±12,09	13,35±1,20	15,5±1,69
5-та доба (n=9)	59,53±8,27	81,32±10,95*	112,07±16,98	102,65±15,07	8,75±0,80	9,44±1,48
10-та доба (n=5)	51,49±6,83	60,41±5,72	110,62±10,34	101,56±9,34	7,95±1,44	8,12±1,32
Контроль (n=9)	45,81±7,43	48,25±7,54	129,71±7,03	124,95±5,58	7,6±2,33	6,84±1,41

Примітка: * – статистично значуща (p<0,05) різниця з показниками інтактних тварин.

Як показало наше дослідження, в 1-шу добу після ЧМТ мало місце деяке підвищення спонтанної продукції супероксидного радикала клітинами мозку, які фагоцитують (у середньому (59,98 ± 7,91) у. о. для тварин з ЧМТ та (47,03 ± 7,48) у. о. для інтактних тварин). У клітин, які виділялися з травмованої півкулі, визначено підвищення продукції супероксидного радикала в 1,4 разу порівняно з контролем. Це супроводжувалося деяким зниженням функціонально-метаболічних резервів макрофагів, про що свідчило зменшення продукції супероксидного радикала порівняно з контролем (див. ***Табл. 2***) у відповідь на додатковий стимул (зимозан) *in vitro*.

На 5-ту добу після ЧМТ відзначено статистично значуще (p<0,05) підвищення спонтанної продукції супероксидного радикала клітинами, які фагоцитують, котрі виділялися з півкулі мозку з травматичним пошкодженням, що, на нашу думку, спричинено міграцією мікрогліальних та макрофагальних клітин у зону ураження та активацією їх *in vivo* внаслідок порушення гомеостазу. Можливим підтвердженням такого припущення є відсутність статистично значущої різниці між контрольними показниками спонтанної продукції супероксидного радикала клітинами мозку, які фагоцитують, та відповідними показниками клітин, котрі виділяли з півкулі без травматичного враження в експериментальних щурів у цей термін.

Поступове зменшення спонтанної продукції реактивних молекул кисню мікрогліальними та моноцитарно-макрофагальними клітинами, котрі виділялися з травмованої півкулі мозку, спостерігали на 10-ту добу після ЧМТ.

Також ми вивчали активність МПО, яка відображує функціональну активність клітин, які фагоцитують. Установлено, що активність МПО у цих клітин вдвічі зростала через 24 год після травми (див. ***Табл. 2***). Такі зміни виявлено у клітин, які виділяли як із правої півкулі, так і з лівої півкулі. На 5-ту добу після ЧМТ відзначено поступове зниження активності МПО клітинами мозку, які фагоцитують, але показники перевищували контрольні значення. На 10-ту добу після травми активність МПО клітин, які виділяли з неушкодженої півкулі, не відрізнялася від контрольних показників, а у клітин, виділених з травмованої півкулі, – в 1,2 разу перевищувала контрольні показники.

Таким чином, установлено, що в 1-шу добу після ЧМТ в обох півкулях головного мозку збільшується кількість клітин мікроглії та моноцитарно-макрофагального ряду. Подальше підвищення вмісту цих клітин визначається на 5-ту добу після ЧМТ, зокрема в 2,5–3,0 рази – в півкулі з травматичним ушкодженням. На 10-ту добу кількість зазначених клітин не досягає контрольних значень, що, можливо, свідчить про наявність залишкового запального процесу в цей термін.

Через 24 год після травматичного ушкодження мозку відбувається початкова активація мікрогліальних клітин, що супроводжується підвищенням продукції супероксидного радикала. На 5-ту добу після ЧМТ у запальному вогнищі спостерігається значне підвищення вмісту мікрогліально-макрофагальних клітин, переважання М1-прозапального фенотипу цих клітин і висока продукція токсичних молекул кисню. Клітини М1-фенотипу, для яких характерна висока секреція не лише активних молекул кисню, а і прозапальних та нейротоксичних медіаторів, можуть посилювати пошкодження і робити внесок у розвиток патологічного процесу. Крім того, М1-подібні макрофаги порушують регенерацію аксонів за допомогою активації регуляції протеогліканів сульфату хондроїтину, які є потужним інгібітором відростання аксонів [4,6].

Підвищення спонтанної продукції токсичного супероксидного радикала і поляризація клітин моноцитарно-макрофагального ряду в М1-фенотип, можливо, зумовлена клітинами лімфоїдного ряду, які інфільтрують тканину мозку та можуть спричинити активацію мікроглііі та макрофагів за рахунок продукції прозапальних цитокінів, таких як, ІФН-γ та ФНП-α. C. Colton і співавт. [13] продемонстрували збільшення форболміристатацетат індукованої продукції супероксидного радикала мікрогліальними клітинами дорослих інтактних тварин під впливом ІФН-γ. M. Woodroofe і співавт. [14] також показали можливість збільшення продукції токсичних молекул кисню мікрогліальними клітинами дорослих інтактних щурів після впливу ІФН-γ. Наведені дані, на нашу думку, можуть свідчити про поляризацію клітин макрофагального ряду за М1-фенотипом, що спричиняє розвиток запального процесу і може розглядатися як етіопатогенетичний чинник при ЧМТ. Глибше розуміння молекулярних механізмів, які регулюють функціональні реакції мікроглії/макрофагів після ЧМТ, можливо, сприятиме розробці терапевтичних втручань, спрямованих на фенотипічне перемикання зазначених клітин для поліпшення функціонального відновлення після ЧМТ.

Висновки

1. Після ЧМТ у головному мозку спостерігається підвищення кількості мікрогліально-моноцитарних клітин, яке залежить від терміну травми та локалізації травматичного ушкодження. Найбільше (триразове) збільшення кількості мікрогліальних клітин та клітин інфільтрату виявлено на 5-ту добу після ЧМТ у півкулі з травматичним ураженням.

2. У щурів після експериментального травматичного ушкодження мозку підвищується спонтанна продукція токсичних молекул кисню мікрогліально-макрофагальними клітинами, яка змінюється залежно від терміну після ЧМТ. Найбільше підвищення спонтанної продукції супероксидного радикала мікрогліально-моноцитарними клітинами відзначене на 5-ту добу після ЧМТ, що свідчить про переважання в цей термін у вогнищі запалення клітин М1-фенотипу.

3. Мієлопероксидазна активність мікроглії та клітин моноцитарно-макрофагального ряду підвищувалася вже через 24 год після ЧМТ і поступово знижувалася до контрольних показників на 10-ту добу після травми.

Розкриття інформації

Конфлікт інтересів

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Етичні норми

Дослідження проведено відповідно до принципів біоетики, регламентованих Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, яких використовують для дослідних та інших наукових цілей (1986), Директивою 2010/63/ЄС "Про захист тварин, що використовуються в наукових цілях" (2010), Законом України №3447-IV "Про захист тварин від жорстокого поводження" (2006). Проведення дослідження затверджене комісією з питань етики та біоетики Інституту нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України (протокол №26 від 11 травня 2018 р.).

Фінансування

Дослідження не мало спонсорської підтримки.

References

1. Karve IP, Taylor JM, Crack PJ. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. Br J Pharmacol. 2016 Feb;173(4):692-702. doi: 10.1111/bph.13125. PMID: 25752446; PMCID: PMC4742296.
2. Loane DJ, Kumar A. Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. Exp Neurol. 2016 Jan;275 Pt 3(0 3):316-327. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.08.018. PMID: 26342753; PMCID: PMC4689601.
3. Jassam YN, Izzy S, Whalen M, McGavern DB, El Khoury J. Neuroimmunology of Traumatic Brain Injury: Time for a Paradigm Shift. Neuron. 2017 Sep 13;95(6):1246-1265. doi: 10.1016/j.neuron.2017.07.010. PMID: 28910616; PMCID: PMC5678753.
4. Hsieh CL, Kim CC, Ryba BE, Niemi EC, Bando JK, Locksley RM, Liu J, Nakamura MC, Seaman WE. Traumatic brain injury induces macrophage subsets in the brain. Eur J Immunol. 2013 Aug;43(8):2010-22. doi: 10.1002/eji.201243084. PMID: 23630120; PMCID: PMC4210355.
5. Jin Y, Wang R, Yang S, Zhang X, Dai J. Role of Microglia Autophagy in Microglia Activation After Traumatic Brain Injury. World Neurosurg. 2017 Apr;100:351-360. doi: 10.1016/j.wneu.2017.01.033. PMID: 28108422.
6. Xu H, Wang Z, Li J, Wu H, Peng Y, Fan L, Chen J, Gu C, Yan F, Wang L, Chen G. The Polarization States of Microglia in TBI: A New Paradigm for Pharmacological Intervention. Neural Plast. 2017;2017:5405104. doi: 10.1155/2017/5405104. PMID: 28255460; PMCID: PMC5309408.
7. Gao HM, Liu B, Hong JS. Critical role for microglial NADPH oxidase in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. J Neurosci. 2003 Jul 16;23(15):6181-7. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-15-06181.2003. PMID: 12867501; PMCID: PMC6740554.
8. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. J Clin Invest. 2012 Mar;122(3):787-95. doi: 10.1172/JCI59643. PMID: 22378047; PMCID: PMC3287223.
9. Jin Y, Wang R, Yang S, Zhang X, Dai J. Role of Microglia Autophagy in Microglia Activation After Traumatic Brain Injury. World Neurosurg. 2017 Apr;100:351-360. doi: 10.1016/j.wneu.2017.01.033. PMID: 28108422.
10. Sedgwick JD, Schwender S, Imrich H, Dörries R, Butcher GW, ter Meulen V. Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Aug 15;88(16):7438-42. doi: 10.1073/pnas.88.16.7438. PMID: 1651506; PMCID: PMC52311.
11. Lisyanyy MI, Belska LM, Semenova VM, Rozumenko VD, Stajno LP. [Study of effect of rat embryonic neural tissue peptides on intracerebral tumor cells and functional activity of peripheral blood mononuclears]. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2008 Dec 22;18(4):441-444. Ukrainian. http://cryo.org.ua/journal/index.php/probl-cryobiol-cryomed/article/view/347
12. Rudenko VA, Gnedkova IO, Pichkur LD, Verbovska SA, Pokholenko YaO. [Influence of xenogenic transplantation of mesenchymal stem cells and Il- 10 on cellular immunity in rats with experimental allergic encephalomyelitis]. Coliection of Scientific Works of Staff Member of P. L. Shupyk NMAPE. 2014;(23(2)):434-41. Ukrainian. http://nbuv.gov.ua/UJRN/Znpsnmapo_2014_23%282%29__59
13. Colton CA, Gilbert DL. Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. FEBS Lett. 1987 Nov 2;223(2):284-8. doi: 10.1016/0014-5793(87)80305-8. PMID: 2822487.
14. Woodroofe MN, Hayes GM, Cuzner ML. Fc receptor density, MHC antigen expression and superoxide production are increased in interferon-gamma-treated microglia isolated from adult rat brain. Immunology. 1989 Nov;68(3):421-6. PMID: 2556346; PMCID: PMC1385458.