

УДК 612.826.4. 612.822.81. 616.8-092
<https://doi.org/10.17816/MAJ19347-56>

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОНОВ ГИПОТАЛАМУСА, УЧАСТВУЮЩИХ В РЕГУЛЯЦИИ ЦИКЛА СОН – БОДРСТВОВАНИЕ, ПОСЛЕ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Ю.В. Гаврилов¹, К.З. Деревцова¹, Е.А. Корнева^{1,2}

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург;

² ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург

Для цитирования: Гаврилов Ю.В., Деревцова К.З., Корнева Е.А. Морфофункциональные изменения нейронов гипоталамуса, участвующих в регуляции цикла сон – бодрствование, после черепно-мозговой травмы в эксперименте // Медицинский академический журнал. – 2019. – Т. 19. – № 3. – С. 47–56. <https://doi.org/10.17816/MAJ19347-56>

Поступила: 02.07.2019

Одобрена: 01.08.2019

Принята: 29.08.2019

Актуальность. Механизмы, лежащие в основе нарушений сна после черепно-мозговой травмы, достаточно сложны и изучены мало. Травматическое поражение структур, ответственных за регуляцию цикла сон – бодрствование, и соответствующих проводящих путей, служит частой причиной расстройств сна после черепно-мозговой травмы. Установлено, что ряд гипоталамических нейромедиаторных систем, участвующих в регуляции цикла сон – бодрствование, изменяет свою функциональную активность после травмы, что предположительно является одним из ключевых факторов развития нарушений этого процесса.

Цель исследования заключалась в изучении морфофункциональных изменений нейронов гипоталамуса, регулирующих сон и бодрствование после черепно-мозговой травмы в эксперименте.

Методы. Для сочетанного анализа посттравматических нарушений и морфофункциональных изменений нейромедиаторных систем, вовлеченных в регуляцию цикла сон – бодрствование, на экспериментальной модели черепно-мозговой травмы проводили полисомнографию у крыс в течение месяца, а затем применяли иммуногистохимический метод для количественного определения содержания орексина А, меланин-концентрирующего гормона, гистидиндекарбоксилазы и тирозингидроксилазы.

Результаты. Выявлено снижение числа гистамин-синтезирующих клеток в тубермамиллярных ядрах гипоталамуса. Снижение степени иммунореактивности гистамин-синтезирующих клеток после черепно-мозговой травмы коррелировало с изменениями длительности сна у животных. Нейроны гипоталамуса, содержащие норадреналин и орексин, после черепно-мозговой травмы не изменялись.

Заключение. Можно предположить, что изменение функциональной активности гистамин-синтезирующих нейронов после черепно-мозговой травмы может быть причиной посттравматических расстройств сна и бодрствования.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма; гистамин; орексин; меланин-концентрирующий гормон; цикл сон – бодрствование.

MORPHOFUNCTIONAL ALTERATIONS OF THE HYPOTHALAMIC NEURONS ACTIVITY DURING SLEEP-WAKE CYCLE REGULATION DISTURBANCES AFTER EXPERIMENTAL TRAUMATIC BRAIN INJURY

Yu.V. Gavrilov¹, K.Z. Derevtsova¹, E.A. Korneva^{1,2}

¹ Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia;

² Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

For citation: Gavrilov YuV, Derevtsova KZ, Korneva EA. Morphofunctional alterations of the hypothalamic neurons activity during sleep-wake cycle regulation disturbances after experimental traumatic brain injury. *Medical Academic Journal*. 2019;19(3):47-56. <https://doi.org/10.17816/MAJ19347-56>

Received: July 2, 2019

Revised: August 1, 2019

Accepted: August 29, 2019

Relevance. The study of sleep disorders mechanisms after traumatic brain injury is complicated and poorly understood. Traumatic damage to the structures that are responsible for the sleep-wake cycle regulation is a common cause of sleep disorders after traumatic brain injury. The number of hypothalamic neurotransmitter systems, which are involved in the sleep-wake cycle regulation, could change its functional activity after trauma that suggests their key role in the development of disturbances of this process.

The aim of the study was to assess the morphological alterations of the hypothalamus neurons that is involved in the regulation of sleep and wakefulness after traumatic brain injury in an experiment.

Methods. For a combined analysis of posttraumatic disturbances of the sleep-wake cycle and morphofunctional changes in the neurotransmitter systems which are involved in the regulation of the sleep-wake cycle, we used

Список сокращений

ЧМТ — черепно-мозговая травма; HDC — гистидиндекарбоксилаза.

a polysomnography in rats during a month and then an immunohistochemical method for estimating the quantify the orexin A, melanin-concentrating hormone, histamine and tyrosine hydroxylase.

Results. The number of histamine-containing cells in the tuberomammillary nuclei of the hypothalamus is obviously decreased after traumatic brain injury in animals. This alteration of the degree of immunoreactivity of histamine-containing cells after traumatic brain injury correlated with sleep duration changes in animals. The number of noradrenergic and orexinergic neurons was compared with control animal group.

Conclusion. These results suggest that a change in the functional activity of histamine-containing neurons after traumatic brain injury may be the cause of post-traumatic sleep and wakefulness disorders. Our results may lead to a creating of a new approach for a therapy for posttraumatic sleep-wake disturbances.

Keywords: traumatic brain injury; histamine; orexin; melanin-concentrating hormone; sleep-wake cycle.

Введение

Общеизвестно, что травматическое поражение структур, ответственных за регуляцию цикла сон – бодрствование [1–4], и соответствующих проводящих путей считается самой распространенной причиной расстройств сна после черепно-мозговой травмы (ЧМТ) [5–9]. Оценка изменений морфофункциональной активности нейромедиаторных систем мозга, отвечающих за регуляцию этих процессов после ЧМТ, является важной задачей, решение которой приведет к выявлению механизмов, обуславливающих стойкие расстройства сна у таких пациентов. Анализ образцов тканей мозга позволил установить снижение количества гистамин-синтезирующих нейронов, локализованных в области tuberomammillary ядер гипоталамуса после ЧМТ [10]. Причина таких изменений не ясна, так как различный характер травмы и трудности систематического анализа специфических изменений функций головного мозга с помощью электроэнцефалограммы сразу после ЧМТ осложняют оценку патогенеза этих нарушений [11, 12]. Экспериментальная модель ЧМТ у крыс дает возможность провести детальный морфологический анализ изменений нейромедиаторных систем клеток мозга, а сопоставление этих результатов с данными полисомнографии, зарегистрированными у этих животных, определить, какие изменения структур мозга, в частности гипоталамуса, могут приводить к нарушению регуляции цикла сон – бодрствование.

Ранее на экспериментальных моделях ЧМТ продемонстрированы изменения функциональной активности различных популяций нейронов, в которых синтезируются нейромедиаторы, участвующие в регуляции цикла сон – бодрствование. Willie et al. наблюдали атипичную динамику выброса орексина в сочетании со снижением периодов бодрствования у мышей после ЧМТ [13]. Lim et al. констатировали неспособность поддерживать состояние бодрствования и наряду с этим снижение степени активации орексин-содержащих нейронов гипоталамуса после легкой ЧМТ у мышей [14].

Широкий спектр научных данных об изменении функции тех или иных нейромедиатор-

ных систем не позволяет представить единую картину взаимодействия этих систем при регулировании сна и бодрствования. Между тем знание механизмов интеграции этих систем и корегулирования цикла сон – бодрствование после перенесенной ЧМТ, важно для дальнейшей разработки эффективных методов терапевтической коррекции посттравматических нарушений. Таким образом, целью этого исследования явилось сочетанное изучение длительности сна и бодрствования после ЧМТ у крыс и изменение нейромедиаторных систем, вовлеченных в регуляцию цикла сон – бодрствование у этих животных.

Материалы и методы исследования

Представленная модель ЧМТ была описана ранее [15].

Крыс-самцов линии Sprague-Dawley (Харлан Laboratories Inc., NL) весом 300–350 г содержали в одиночных клетках со свободным доступом к воде и пище при 12-часовом световом режиме, который начинался в 8.00 или 9.00 утра в зависимости от сезона. Температуру в помещении поддерживали на уровне 21–23 °С. Все эксперименты были одобрены ветеринарной службой Цюриха и проведены в соответствии с местными правилами по уходу и использованию лабораторных животных.

Иммуногистохимический анализ нейронов мозга выполняли у животных, у которых ранее регистрировали электрофизиологические параметры сна и бодрствования [17]. Наблюдаемое в эксперименте увеличение продолжительности медленноволновой (NREM) фазы сна у крыс с ЧМТ сохранялось в течение 28 дней после травмы во время темного периода (активная фаза), длительность периодов бодрствования, напротив, соответственно снижалась по сравнению с этими показателями у животных контрольной группы.

Крысам ($n = 7$) под глубокой анестезией (бупренорфин в дозе 0,05 мг/кг) делали разрез кожи головы длиной 0,5–0,7 см и обнажали кость в префронтальной области черепа роstralнее брегмы, не затрагивая зону

с имплантированными электродами. Для нанесения ЧМТ на свободную от кожи область черепа под углом 70° опускали металлический стержень весом 2500 г длиной 25 см (рис. 1).

Повреждающая поверхность стержня была покрыта силиконовым наконечником для смягчения удара и предотвращения перелома костей. После нанесения травмы кожу зашивали и дезинфицировали раневую поверхность. Далее животных возвращали в клетки, где они находились под непрерывным наблюдением до стабилизации состояния.

Животным группы контроля (ложнооперированные животные, $n = 6$) выполняли разрез кожи без нанесения травмы. Как и животным с нанесенной травмой, кожу ложнооперированных крыс зашивали и дезинфицировали. Затем животных помещали в одиночные клетки под наблюдение на весь опытный период. По истечении 30 дней была проведена перфузия с последующим гистологическим окрашиванием.

Классическую кардиальную перфузию проводили под анестезией пентобарбитала (75 мг/кг). Мозг животных вскрывали, фиксировали и выдерживали в 4 % растворе PFA/15 % сахарозы (Sigma-Aldrich) в PBS при 4°C в течение ночи. Далее образцы ткани помещали в PBS с 30 % содержанием сахарозы. После полного обезвоживания мозг замораживали, помещая его на сухой лед, а затем образцы хранили при температуре -80°C .

Для оценки посттравматических изменений анализировали нейроны, содержащие орексин, меланин-концентрирующий гормон, ферменты гистидиндекарбоксилазу (для оценки количества гистамина) и тирозингидроксилазу (для оценки активности катехоламинергических нейронов головного мозга). Для этих целей замороженные фронтальные срезы мозга толщиной 40 мкм обрабатывали первичными антителами против: а) орексина (козы анти-herc1 [C19], 1 : 5000, Santa Cruz, SC-8070); б) меланин-концентрирующего гормона (кроличьи анти-МСН, 1 : 10 000, Phoenix Europe GmbH, H-070-47); в) гистидиндекарбоксилазы (кроличьи анти-НА, 1 : 100, Millipore, Cat#AB5885, и кроличьи анти-тела с анти-HDC, 1 : 5000, American Research Products, Cat#03-16045); г) тирозингидроксилазы (мышинные анти-тела анти-ТН, 1 : 8000, Millipore, MAB318).

В структурах мозга, в которых наблюдалось существенное снижение количества нейронов, содержащих искомым нейротрансмиттер, также определяли степень разрушения нейронов и диффузные аксональные повреждения в зависимости от количества белка — предше-

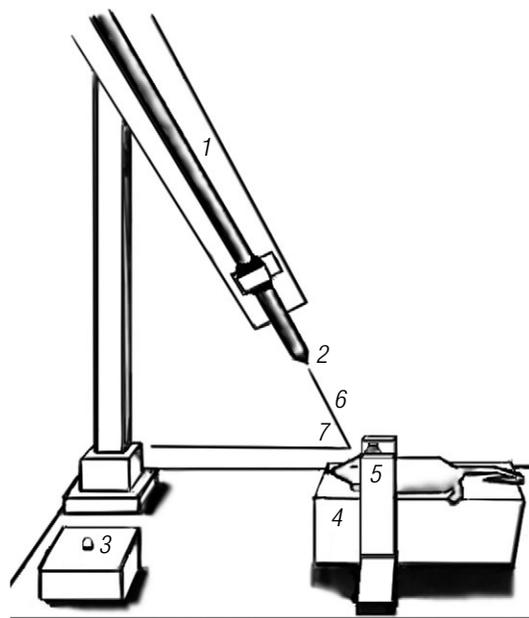


Рис. 1. Устройство для нанесения травмы в эксперименте. Экспериментальная модель черепно-мозговой травмы [21]: 1 — алюминиевый или стальной стержень (весом 2500 г); 2 — силиконовый наконечник (2,5 мм); 3 — электронный переключатель магнитного держателя стержня; 4 — площадка из поролона для ускорения или замедления удара (10 см); 5 — устройство, обеспечивающее боковую фиксацию головы; 6 — высота падающего стержня (25 см); 7 — угол падения стержня (70°)

Fig. 1. Device for causing injury in an experiment. An experimental model of traumatic brain injury [21]: 1 — aluminum or steel rod (weighing 2500 grams); 2 — 2.5 mm silicone tip; 3 — electronic switch of magnetic rod holder; 4 — foam pad to accelerate or slow down the impact (10 cm); 5 — a device providing lateral fixation of the head; 6 — the height of the falling rod (25 cm); 7 — the angle of incidence of the rod (70°)

ственного амилоида (мышы анти-APP, 1 : 300, Millipore, MAB348), степень нейровоспаления в нервной ткани, используя первичные антитела Oх42 (mouse anti-Oх42/anti-CD11b/c, 1 : 500, Abcam, ab1211), а также антитела к белку GFAP (anti-gial fibrillary acidic protein), который является маркером астроцитарной активации (mouse anti-GFAP, coupled with Cy3, 1 : 400, Sigma-Aldrich, C9205). Для этой цели мы на срезы мозга наносили классические иммунофлуоресцентные антитела goat anti-rabbit Alexa 488 (Molecular Probes, 1 : 500) и donkey anti-mouse Alexa 568 (Molecular Probes, 1 : 500). Окрашенные флуоресцентными красителями срезы монтировали на стекла и закрывали покровными стеклами (Aquamount, Fischer sci) сразу после промывания от вторичных антител. Остальную часть срезов инкубировали с авидин-биотинным комплексом и затем детектировали с помощью 0,025 % DAB в TBS в присутствии 0,05–0,1 % H_2O_2 .

Количество нейронов гипоталамуса и ствола мозга оценивали по методике слепого полуавтоматического подсчета с помощью микроскопа Zeiss Axio Imager M2 (Karl Zeiss, Йена, Германия), оборудованного камерой Ludl MAC 6000 (Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY), и программного обеспечения MicroBrightField StereoInvestigator 10.5 (MBF Bioscience, Williston, VT). Для выявления областей мозга с иммунопозитивными клетками использовали объектив на 2,5 и объектив на 40 с иммерсией (числовая апертура 1,3) для стереологического подсчета. В окончательный анализ включали только животных с полным набором неповрежденных срезов. Рассчитывали коэффициент погрешности Гундерсена (CE) $< 0,08$. Во время подсчета ячеек применяли защитное расстояние 2,0 мкм, чтобы избежать ошибок из-за случайного наложения.

Для статистической обработки выполняли односторонний, двусторонний, парный и непарный Т-тесты с/без поправок Бонферрони, ANOVA-тест, post-hoc-анализ Фишера и линейный регрессивный анализ в зависимости от обстоятельств. Все столбцы на графиках представляют средние значения, а планки погрешностей показывают стандартную ошибку среднего. Анализ обеспечивает достоверность изменений на уровне 90–95 %.

Результаты исследования

Снижение иммунореактивности гистаминергических нейронов гипоталамуса после ЧМТ.

Степень окрашивания нейронов, в которых синтезируются гистамин, меланин-концентрирующий гормон, орексин и тирозингидроксила-

за, определяли в группах ложнооперированных животных и животных с ЧМТ. Как уже отмечено выше, у животных с ЧМТ выявлены увеличение продолжительности медленной фазы сна через 28 дней после получения травмы и сокращение длительности периодов бодрствования [17].

Однако анализ содержания нейромедиаторов, вовлеченных в регуляцию цикла сон – бодрствование (меланин-концентрирующий гормон (рис. 2), орексин (рис. 3), норадреналин (рис. 4)), не показал различий в уровне синтеза этих веществ в нейронах.

Благодаря исследованию количества нейронов мозга, в которых наблюдали синтез гистамина, было выявлено 36 % снижение степени иммунореактивности нейронов, содержащих гистидиндекарбоксилазу (рис. 5, ложнооперированные животные ($n = 6$) в сравнении с животными с ЧМТ ($n = 7$), $***p < 0,001$, двусторонний непарный t -тест).

При помощи корреляционного анализа установлен обратный характер взаимосвязи между числом нейронов, синтезирующих гистидиндекарбоксилазу, и длительностью медленной фазы сна в темном периоде спустя 28 дней после травмы (рис. 6, *a*, корреляция числа клеток, синтезирующих гистидиндекарбоксилазу, и длительности медленной фазы сна в темном периоде: $p = 0,01$, r -Пирсона $-0,6384$).

Кроме того, удалось обнаружить прямую корреляцию между длительностью состояния бодрствования у животных и количеством нейронов, в которых синтезируется гистидиндекарбоксилаза (рис. 6, *b*, корреляция числа клеток, синтезирующих гистидиндекарбоксилазу, и длительности бодрствования в темном периоде: $p = 0,008$, r -Пирсона $0,6931$).

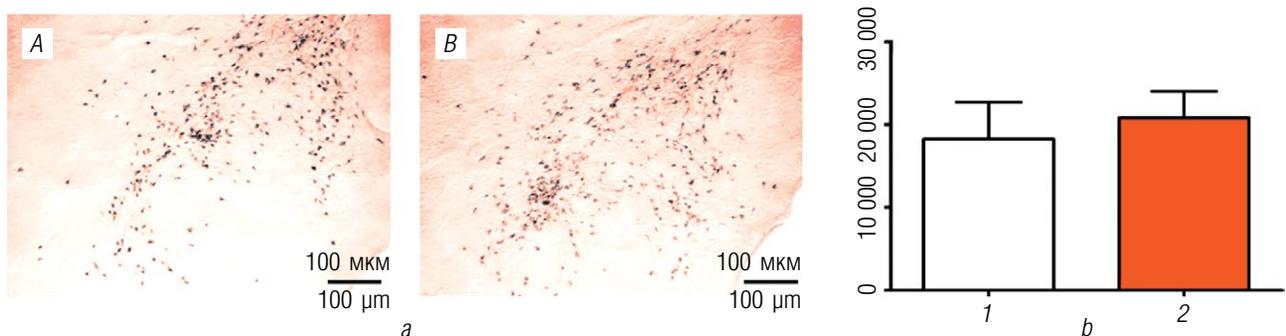


Рис. 2. Микрофотография перифорникальной зоны латерального гипоталамуса с нейронами, содержащими меланин-концентрирующий гормон (*a*): *A* — срезы мозга ложнооперированных животных, *B* — срезы мозга животных после черепно-мозговой травмы; количество иммунореактивных нейронов, содержащих меланин-концентрирующий гормон (*b*). По оси ординат (Y) — абсолютное количество иммунореактивных нейронов в мозге; по оси абсцисс (X) — группы животных. 1 — ложнооперированные животные, 2 — животные после черепно-мозговой травмы

Fig. 2. Microphotography of the perifornical zone of the lateral hypothalamus with neurons containing melanin-concentrating hormone. *A* — brain sections of SHAM-operated animals, *B* — brain sections of animals after traumatic brain injury (*a*); the number of immunoreactive neurons containing melanin-concentrating hormone (*b*). On the ordinate axis (Y) — the absolute number of immunoreactive neurons in the brain; abscissa (X) — groups of animals. 1 — SHAM-operated animals, 2 — animals after traumatic brain injury

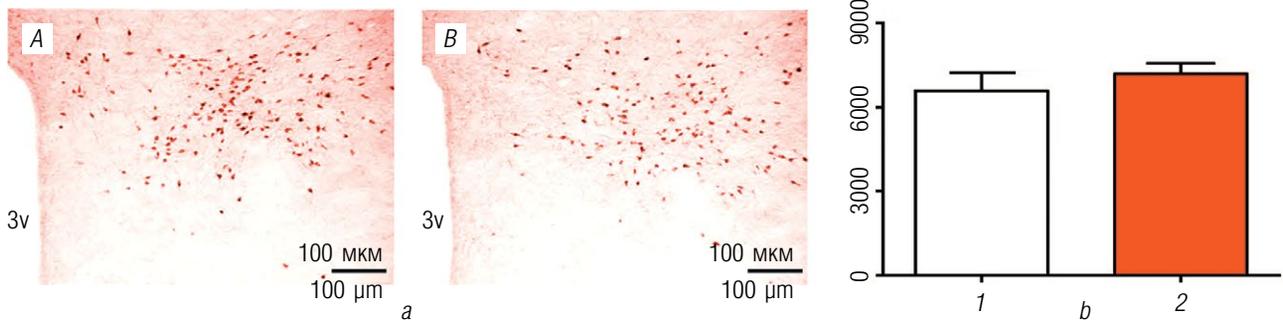


Рис. 3. Микрофотография перифорникальной зоны латерального гипоталамуса с нейронами, содержащими орексин (*a*). *A* — срезы мозга ложнооперированных животных, *B* — срезы мозга животных после черепно-мозговой травмы; количество иммунореактивных нейронов, содержащих орексин (*b*). По оси ординат (Y) — абсолютное количество иммунореактивных нейронов в мозге; по оси абсцисс (X) — группы животных. 1 — ложнооперированные животные, 2 — животные после черепно-мозговой травмы

Fig. 3. A micrograph of the perifornical zone of the lateral hypothalamus with neurons containing orexin. *A* — sections of the brain of SHAM-operated animals, *B* — sections of the brain of animals after traumatic brain injury (*a*); the number of immunoreactive neurons containing orexin (*b*). On the ordinate axis (Y) — the absolute number of immunoreactive neurons in the brain; abscissa (X) — groups of animals. 1 — SHAM-operated animals, 2 — animals after traumatic brain injury

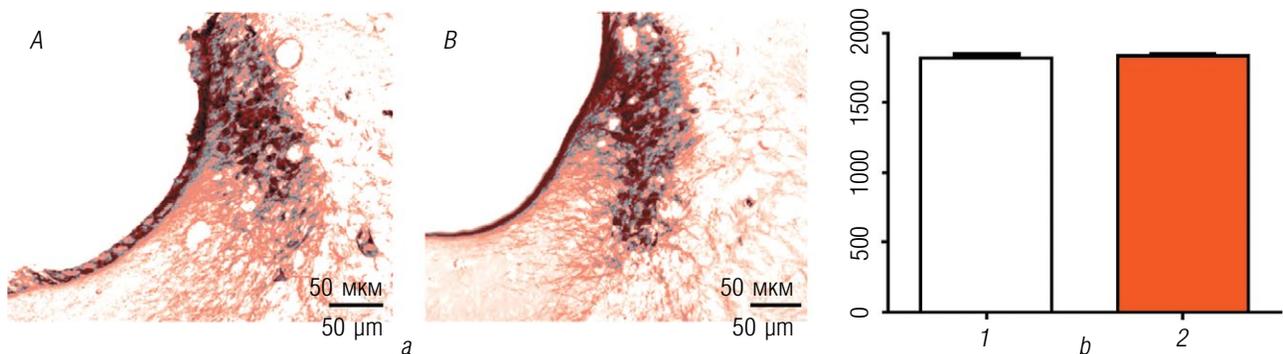


Рис. 4. Микрофотография срезов мозга с нейронами, содержащими тирозингидроксилазу (*a*): *A* — срезы мозга ложнооперированных животных, *B* — срезы мозга животных после черепно-мозговой травмы; количество иммунореактивных нейронов, содержащих тирозингидроксилазу (*b*). По оси ординат (Y) — абсолютное количество иммунореактивных нейронов в мозге; по оси абсцисс (X) — группы животных. 1 — ложнооперированные животные, 2 — животные после черепно-мозговой травмы

Fig. 4. Micrograph of brain sections with neurons containing tyrosine hydroxylase (*a*): *A* — sections of the brain of SHAM-operated animals, *B* — sections of the brain of animals after traumatic brain injury; the number of immunoreactive neurons containing tyrosine hydroxylase (*b*). On the ordinate axis (Y) — the absolute number of immunoreactive neurons in the brain; abscissa (X) — groups of animals. 1 — SHAM-operated animals, 2 — animals after traumatic brain injury

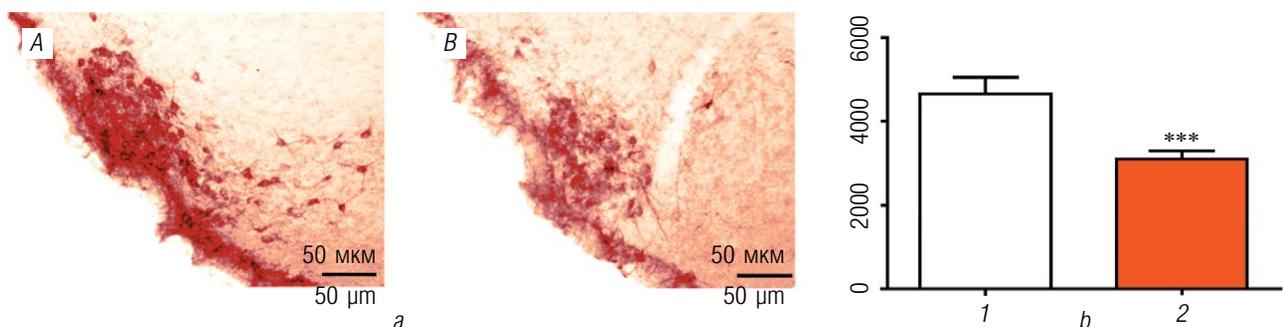


Рис. 5. Микрофотография tuberomammиллярных ядер гипоталамуса с гистамин-синтезирующими нейронами (*a*): *A* — срезы мозга ложнооперированных животных, *B* — срезы мозга животных после черепно-мозговой травмы; количество иммунореактивных нейронов, содержащих гистидингидроксилазу (*b*). По оси ординат (Y) — абсолютное количество иммунореактивных нейронов в мозге; по оси абсцисс (X) — группы животных. 1 — ложнооперированные животные, 2 — животные после черепно-мозговой травмы

Fig. 5. Micrograph of tuberomammillary nucleus of the hypothalamus with histamine-synthesizing neurons (*a*): *A* — brain sections of SHAM-operated animals, *B* — brain sections of animals after traumatic brain injury; the number of immunoreactive neurons containing histidine hydroxylase (*b*). On the ordinate axis (Y) — the absolute number of immunoreactive neurons in the brain; abscissa (X) — groups of animals. 1 — SHAM-operated animals, 2 — animals after traumatic brain injury

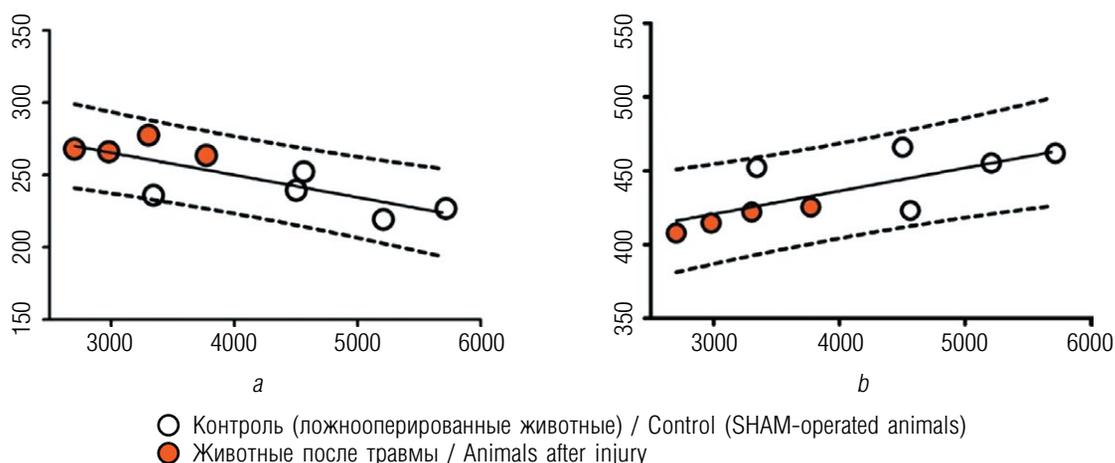


Рис. 6. Корреляционная зависимость между длительностью медленноволновой фазы сна в течение суток и количеством нейронов, синтезирующих гистидиндекарбоксилазу в тубермамиллярном ядре (количество ложнооперированных животных — 5, животных после травмы — 4) через 28 дней после черепно-мозговой травмы у крыс. Пунктирные линии указывают 90 % вероятность корреляции: *a* — обратная корреляция числа клеток, синтезирующих гистидиндекарбоксилазу, и продолжительность медленной фазы сна в темном периоде: $p = 0,01$, r -Пирсона $-0,6384$; *b* — прямая корреляция числа клеток, синтезирующих гистидиндекарбоксилазу, и продолжительность бодрствования в темном периоде: $p = 0,008$, r -Пирсона $0,6931$

Fig. 6. Correlation between the duration of the slow-wave phase of sleep of sleep during the day and the number of neurons synthesizing histidine-decarboxylase in the tubermammyl nucleus SHAM-operated animals ($n = 5$), Animals after injury ($n = 4$) 28 days after cranial brain injury in rats. Dotted lines indicate a 90% chance of correlation: *a* — the inverse correlation of the number of cells synthesizing histidine decarboxylase and the duration of the slow phase of sleep in the dark period: $p = 0.01$, r -Pearson -0.6384 ; *b* — a direct correlation of the number of cells synthesizing histidine decarboxylase and the duration of wakefulness in the dark period: $p = 0.008$, r -Pearson 0.6931

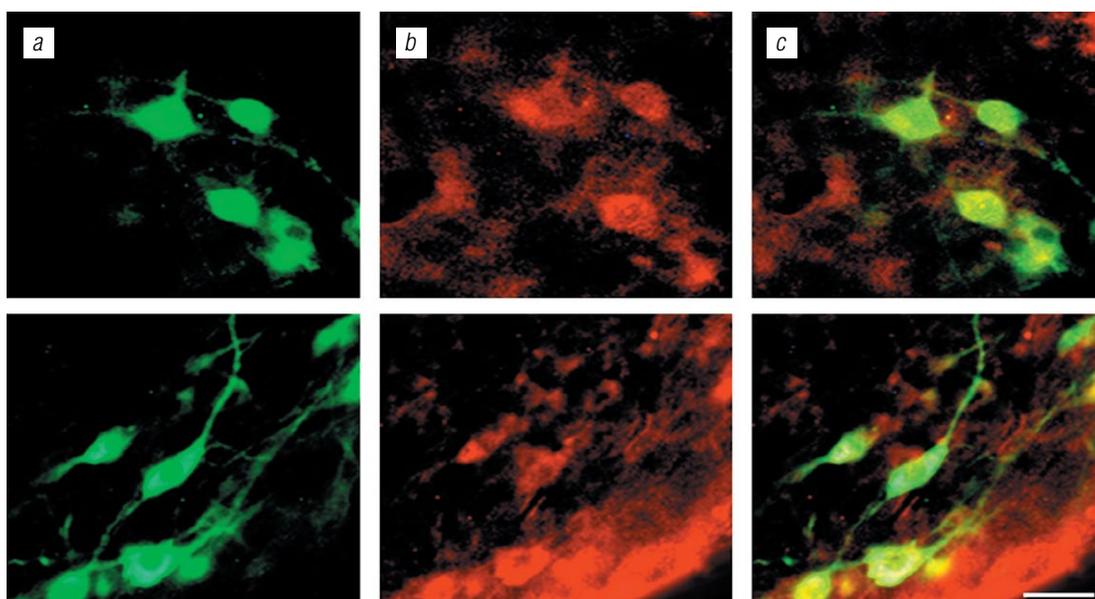


Рис. 7. Микрофотографии срезов, меченных иммунофлуоресцентными антителами к гистидиндекарбоксилазе, являющейся маркером синтеза гистамина в нейронах и белку — предшественнику амилоида APP-1 (а маркером диффузного аксонального повреждения). Верхний ряд изображений — фотографии срезов мозга ложнооперированных животных, нижний ряд — фотографии срезов мозга животных после черепно-мозговой травмы: *a* — гистидиндекарбоксилаза (HDC, Alexa488, green); *b* — белок — предшественник амилоида (APP-1, Cy3, red); *c* — наложение фильтров, визуализирующих характер совместной локализации гистидиндекарбоксилазы и APP-1. Размер масштабного маркера — 25 мкм

Fig. 7. Microphotographs of sections labeled with immunofluorescence antibodies to histidine decarboxylase, which is a marker of histamine synthesis in neurons and the amyloid precursor protein APP-1 (a marker of diffuse axonal damage). The upper row of images is photographs of slices of the brain of SHAM-operated animals, the lower row is photographs of slices of the brain of animals after traumatic brain injury: *a* — histidine decarboxylase (HDC, Alexa488, green); *b* — amyloid precursor protein (APP-1, Cy3, red); *c* — use of filters visualizing the pattern of the co-localization of histidine decarboxylase and APP-1 amyloid precursor protein. The size of the scale marker is 25 μm

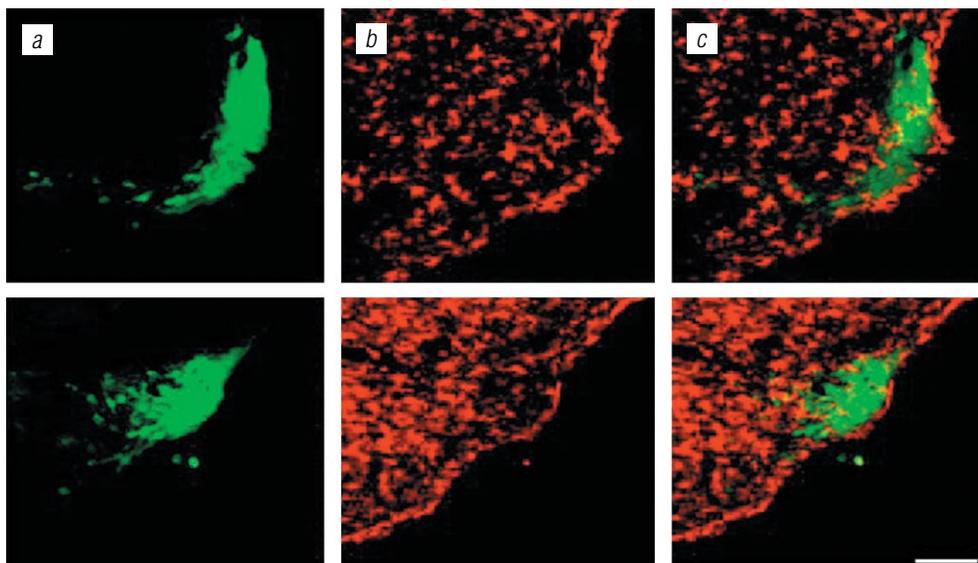


Рис. 8. Микрофотографии срезов, меченных иммунофлуоресцентными антителами к гистидиндекарбоксилазе, являющейся маркером синтеза гистамина в нейронах, и белку CD11b/c (OX42). Верхний ряд изображений — фотографии срезов мозга ложнооперированных животных, нижний ряд — фотографии срезов мозга животных после черепно-мозговой травмы: *a* — гистидиндекарбоксилаза (HDC, Alexa488, green); *b* — OX42; *c* — наложение фильтров, визуализирующих характер совместной локализации гистидиндекарбоксилазы и OX42. Размер масштабного маркера — 100 мкм

Fig. 8. Micrographs of sections labeled with immunofluorescence antibodies to histidine decarboxylase (HDC), which is a marker of histamine synthesis in neurons and CD11b/c protein (OX42) (marker of neuroinflammation). The upper row of images is photographs of slices of the brain of SHAM-operated animals, the lower row is photographs of slices of the brain of animals after traumatic brain injury: *a* — histidine decarboxylase (HDC, Alexa488, green); *b* — OX42 (marker of neuroinflammation); *c* — Merging of filters visualizing the nature of the joint localization of histidine decarboxylase (HDC) and OX42 (marker of neuroinflammation). The size of the scale marker is 100 μm

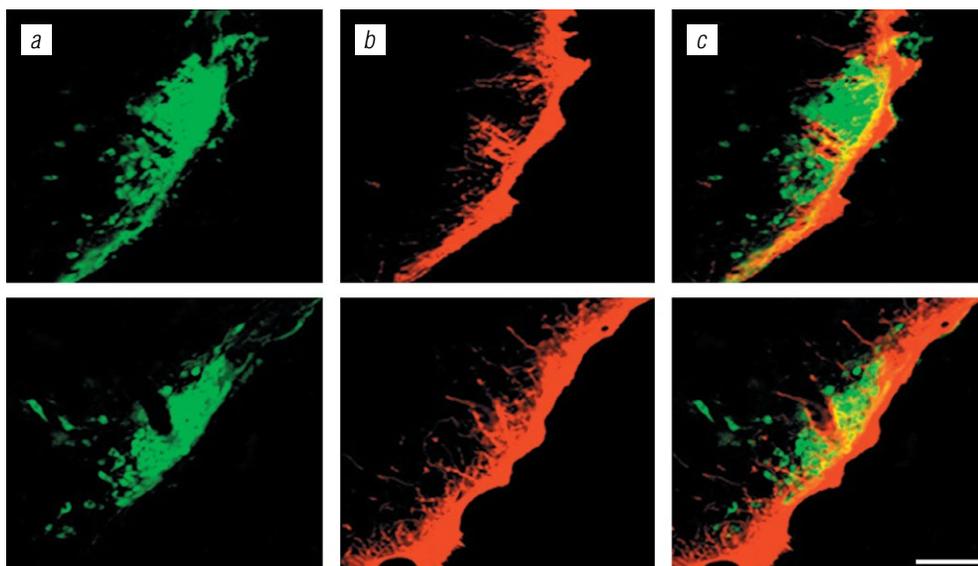


Рис. 9. Микрофотографии срезов, меченных иммунофлуоресцентными антителами к гистидиндекарбоксилазе, являющейся маркером синтеза гистамина в нейронах, и белку GFAP. Верхний ряд изображений — фотографии срезов мозга ложнооперированных животных, нижний ряд — фотографии срезов мозга животных после травмы: *a* — гистидиндекарбоксилаза (HDC, Alexa488, green); *b* — белок GFAP; *c* — наложение фильтров, визуализирующих характер совместной локализации гистидиндекарбоксилазы и белка GFAP. Размер масштабного маркера — 100 мкм

Fig. 9. Micrographs of brain sections labeled with immunofluorescence antibodies to histidine decarboxylase, which is a marker of histamine synthesis in neurons and GFAP protein (marker of astrocyte activation). The top row of images is photographs of sections of the brain of SHAM-operated animals, the bottom row is photographs of sections of the brain of animals after injury: *a* — histidine decarboxylase (HDC, Alexa488, green); *b* — GFAP protein (marker of astrocyte activation); *c* — the application of both filters visualizing the character of the joint localization of histidine decarboxylase and GFAP protein. The size of the scale marker is 100 μm

Для оценки потенциальных механизмов, лежащих в основе снижения иммунореактивности нейронов, в которых синтезируется гистамин, мы исследовали колокализацию фермента гистидиндекарбоксилазы (HDC) с маркерами нейровоспаления (Ox42), астроцитарной активации (GFAP) и диффузного повреждения аксонов (APP-1) на срезах мозга в области тубермамиллярных ядер гипоталамуса.

Установлено, что в области тубермамиллярных ядер возрастала степень нейровоспаления, оцениваемого по маркеру Ox42, у животных после ЧМТ в сравнении с ложнооперированными животными (рис. 7). При этом активации астроцитов и признаков диффузного аксонального повреждения не наблюдали. Небольшая степень иммунореактивности по APP-1 у животных обеих групп свидетельствует о небольшом накоплении APP-1 независимо от наличия травмы (рис. 8).

Степень нейровоспаления в области тубермамиллярных ядер гипоталамуса повышалась у животных после ЧМТ в сравнении с ложнооперированными (см. рис. 8). Тогда как степень астроцитарной активации вследствие воспаления (рис. 9) и диффузного повреждения аксонов не отличалась среди животных обеих групп.

Таким образом, снижение уровня синтеза гистамина в клетках мозга не являлось результатом аксональной дегенерации, воспаления или рубцевания нервной ткани, которые могли быть вызваны ЧМТ.

Обсуждение

Ранее на экспериментальной модели ЧМТ продемонстрированы изменения длительности и качества всех фаз сна и бодрствования [16]. Увеличение продолжительности медленной фазы сна в течение длительного периода после получения травмы и сокращение длительности бодрствования у этих животных согласуется с клиническими наблюдениями, описанными у людей после ЧМТ [16]. Выявленные в настоящем исследовании гистологические изменения, ассоциированные с травмой, затрагивают области мозга, вовлеченные в регуляцию цикла сон – бодрствование. Сопоставляя результаты настоящего исследования с данными, полученными ранее с помощью полисомнографии на этих животных, можно предположить, что снижение степени иммунореактивности гипоталамических нейронов, может обуславливать повышенную сонливость, увеличение медленной фазы сна и сокращение периодов бодрствования. Следует отметить, что наряду со столь выраженными изменениями активности

гистамин-синтезирующих нейронов гипоталамуса, функциональная активность других нейромедиаторных систем, причастных к регуляции цикла сон – бодрствование, не изменялась.

Снижение иммунореактивности гистаминергических клеток в тубермамиллярных ядрах задней области гипоталамуса было описано при гистологическом исследовании посмертных образцов тканей мозга человека после ЧМТ. В ряде работ были высказаны предположения, что описанные патофизиологические изменения связаны с диффузным аксональным повреждением мозга, характерным для тяжелых травм с летальным исходом. Исследование содержания белка APP-1 в области локализации гистамин-синтезирующих клеток позволило исключить это, поскольку накопление белка APP-1 в структурах задней части гипоталамуса было незначительным. Наконец, уязвимость гистаминергических нейронов гипоталамуса можно объяснить их открытым анатомическим положением и близостью к основанию черепа. Таким образом, даже при умеренной ЧМТ эта область может подвергаться механическим воздействиям.

Заключение

Установленные на экспериментальной модели нарушения регуляции цикла сон – бодрствование по большей части совпадают с посттравматическими проявлениями, описанными ранее в клинике у пациентов с ЧМТ.

Изменение морфофункциональных характеристик гистаминергических нейронов гипоталамуса, проявляющееся в снижении уровня синтеза гистамина в этих клетках, позволяет рассматривать исследованные структуры в качестве мишеней для коррекции хронических нарушений регуляции сна и бодрствования у пациентов, перенесших ЧМТ.

Дополнительная информация

Благодарности. Авторы выражают глубочайшую признательность специалистам отделения неврологии и травматологии больницы университета Цюриха и отделения неврологии в Inselspital Bern: Д. Ноайн, Ф. Бюхеле, С.Р. Шрегльман, Ф.О. Валко, М.М. Моравской, Л.Л. Имбах, К.Р. Бауманн (Швейцария) за предоставленную возможность выполнения части работы на базе этих учреждений и за оказанную помощь в проведении исследований.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

- Viola-Saltzman M, Watson NF. Traumatic brain injury and sleep disorders. *Neurol Clin*. 2012;30(4):1299-1312. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2012.08.008>.
- Rao V, Spiro J, Vaishnavi S, et al. Prevalence and types of sleep disturbances acutely after traumatic brain injury. *Brain Inj*. 2008;22(5):381-386. <https://doi.org/10.1080/02699050801935260>.
- Rajaratnam SW, Cohen DA, Rogers NL. Melatonin and melatonin analogues. *Sleep Med Clin*. 2009;4(2):179-193. <https://doi.org/10.1016/j.jsmc.2009.02.007>.
- Shekleton JA, Parcell DL, Redman JR, et al. Sleep disturbance and melatonin levels following traumatic brain injury. *Neurology*. 2010;74(21):1732-1738. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181e0438b>.
- Clinchot DM, Bogner J, Mysiw WJ, et al. Defining sleep disturbance after brain injury. *Am J Phys Med Rehabil*. 1998;77(4):291-295. <https://doi.org/10.1097/00002060-199807000-00006>.
- Castriotta RJ, Murthy JN. Sleep disorders in patients with traumatic brain injury: a review. *CNS Drugs*. 2011;25(3):175-185. <https://doi.org/10.2165/11584870-000000000-00000>.
- Kaufman Y, Tzischinsky O, Epstein R, et al. Long-term sleep disturbances in adolescents after minor head injury. *Pediatr Neurol*. 2001;24(2):129-134. [https://doi.org/10.1016/S0887-8994\(00\)00254-X](https://doi.org/10.1016/S0887-8994(00)00254-X).
- Tobe EH, Schneider JS, Mrozek T, Lidsky TI. Persisting insomnia following traumatic brain injury. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 1999;11(4):504-506. <https://doi.org/10.1176/jnp.11.4.504>.
- Ayalon L, Borodkin K, Dishon L, et al. Circadian rhythm sleep disorders following mild traumatic brain injury. *Neurology*. 2007;68(14):1136-1140. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000258672.52836.30>.
- Valko PO, Gavrilov YV, Yamamoto M, et al. Damage to histaminergic tuberomammillary neurons and other hypothalamic neurons with traumatic brain injury. *Ann Neurol*. 2015;77(1):177-182. <https://doi.org/10.1002/ana.24298>.
- Harada M, Minami R, Hattori E, et al. Sleep in brain-damaged patients. An all night sleep study of 105 cases. *Kumamoto Med J*. 1976;29(3):110-127. <https://doi.org/10.1093/sleep/11.2.139>.
- George B, Landau-Ferey J, Benoit O, et al. [Night sleep disorders during recovery of severe head injuries (author's transl). (In French)]. *Neurochirurgie*. 1981;27(1):35-38.
- Willie JT, Lim MM, Bennett RE, et al. Controlled cortical impact traumatic brain injury acutely disrupts wakefulness and extracellular orexin dynamics as determined by intracerebral microdialysis in mice. *J Neurotrauma*. 2012;29(10):1908-1921. <https://doi.org/10.1089/neu.2012.2404>.
- Lim MM, Elkind J, Xiong G, et al. Dietary therapy mitigates persistent wake deficits caused by mild traumatic brain injury. *Sci Transl Med*. 2013;5(215):215ra173. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007092>.
- Вьчеде F, Morawska MM, Schreglmann SR, et al. Novel rat model of weight drop-induced closed diffuse traumatic brain injury compatible with electrophysiological recordings of vigilance states. *J Neurotrauma*. 2016;33(13):1171-1180. <https://doi.org/10.1089/neu.2015.4001>.
- Imbach LL, Valko PO, Li T, et al. Increased sleep need and daytime sleepiness 6 months after traumatic brain injury: a prospective controlled clinical trial. *Brain*. 2015;138(Pt 3):726-735. <https://doi.org/10.1093/brain/awu391>.
- Гаврилов Ю.В., Деревцова К.З., Корнева Е.А. Функциональные изменения цикла «сон – бодрствование» после черепно-мозговой травмы в эксперименте // Патогенез. – 2019. – Т. 17. – № 1. – С. 50–56. [Gavrilov YuV, Derevtsova KZ, Korneva EA. Functional changes in the sleep-wake cycle after experimental traumatic brain injury. *Pathogenesis*. 2019;17(1):50-56. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.25557/2310-0435.2019.01.50-56>.

Сведения об авторах / Information about the authors

Юрий Владимирович Гаврилов — канд. мед. наук, старший научный сотрудник отдела общей патологии и патологической физиологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0003-1409-7686>. SPIN-код: 7358-2649. E-mail: yury-doctor@mail.ru.

Кристина Зурабовна Деревцова (Шаинидзе) — канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела общей патологии и патологической физиологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0001-9855-4519>. SPIN-код: 5397-7357. E-mail: derevtcova19@ya.ru.

Yuri V. Gavrilov — MD, Senior Researcher, Department of General Pathology and Pathological Physiology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0003-1409-7686>. SPIN-code: 7358-2649. E-mail: yury-doctor@mail.ru.

Kristina Z. Derevtsova (Shainidze) — PhD, Senior Researcher, Department of General Pathology and Pathological Physiology, Institute of Experimental Medicine Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0001-9855-4519>. SPIN-code: 5397-7357. E-mail: derevtcova19@ya.ru.

Елена Андреевна Корнева — д-р мед. наук, академик РАМН, главный научный сотрудник отдела общей патологии и патологической физиологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург; профессор кафедры патофизиологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0002-4999-5913>. SPIN-код: 8777-2879. E-mail: korneva_helen@mail.ru.

Elena A. Korneva — Doctor of Medical Science, Academician of the Russian Academy of Medical Sciences, Chief Senior Researcher of the Department of General Pathology and Pathological Physiology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia; Professor of the Pathophysiology Department of the Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-4999-5913>. SPIN-code: 8777-2879. E-mail: korneva_helen@mail.ru.

✉ **Контактное лицо / Corresponding author**

Кристина Зурабовна Деревцова (Шаинидзе) / Kristina Z. Derevtsova (Shainidze)
E-mail: derevtcova19@ya.ru