

**ЭФФЕКТ МОДУЛИРОВАННЫХ *IN VITRO* КОФЕИНОМ
ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК НА ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ
ОТВЕТ ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ**

Нехорошев Е. В. ^{1,2},

Ван Ш. ¹,

Маркова Е. В. ³,

Клещев М. А. ³,

Савкин И. В. ³,

Серенко Е. В. ³,

Княжева М. А. ³,

Акопян А. А. ²,

Амстиславская Т. Г. ^{1,2}

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия.

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины», Новосибирск, Россия.

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия.

EFFECT OF *IN VITRO* CAFFEINE-MODULATED IMMUNE CELLS ON THE INFLAMMATORY RESPONSE IN TRAUMATIC BRAIN INJURY

Nekhoroshev E. V. ^{a, b},
Wang S. ^a,
Markova E. V. ^c,
Kleshchev M. A. ^c,
Savkin I. V. ^c,
Serenko E. V. ^c,
Knyazheva M. A. ^c,
Akopyan A. A. ^b,
Amstislavskaya T. G. ^{a, b}

^a Novosibirsk State University, Novosibirsk, Novosibirsk, Russia.

^b Federal State Budgetary Scientific Institution «Scientific Research Institute of Neurosciences and Medicine», Novosibirsk, Russia.

^c Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology», Novosibirsk, Russia.

Резюме

Введение. Важную роль в патогенезе черепно-мозговой травмы (ЧМТ) играет воспалительная реакция, развивающаяся в ответ на повреждение головного мозга, которая способствует устранению последствий повреждения головного мозга и, в то же время, является одной из ведущих причин посттравматических осложнений. Разработка терапевтических подходов для модуляции воспаления при ЧМТ является актуальной задачей на сегодняшний день. Кофеин обладает выраженными иммуномодулирующими свойствами, влияя как на врожденные, так и на адаптивные иммунные реакции. Ранее была продемонстрирована возможность стимуляции нейрогенеза, процессов нейропластичности и снижения нейровоспаления с помощью модулированных кофеином *in vitro* иммунных клеток селезенки при депрессивно-подобном состоянии. **Цель.** Изучить влияние модулированных *in vitro* кофеином спленоцитов на развитие воспалительного ответа на модели лазер-индуцированной ЧМТ у *Danio rerio*. **Материалы и методы.** Исследования проводились на взрослых рыбах *Danio rerio*. Были определены уровни IL-1 β в головном мозге и периферического кортизола методом ИФА. Оценка уровня Hif-1 α была проведена с помощью ИГХ на криосрезах теленцефалона. Был проведен RNAseq, с последующим анализом дифференциальной экспрессии генов, вовлеченных в контроль нейровоспаления (*il1b* и *vegfaa*). **Результаты.** Внутривенное введение модулированных *in vitro* кофеином сингенных спленоцитов на 1 сутки после ЧМТ не оказывало существенного влияния на уровень IL-1 β и экспрессию его гена *il1b* у рыб с ЧМТ; при этом было установлено повышение уровня периферического кортизола и его снижение до уровня интактных особей на 3 сутки. На 3 сутки после травмы экспрессия гена IL-1 β , равно как и продукция указанного цитокина также снижались в сравнении с таковыми на 1 сутки, что сопровождалось снижением уровня Hif-1 α и экспрессии гена *vegfaa*. **Выводы.** Показано модулирующее действие прекультивированных с кофеином иммунокомпетентных клеток на нейровоспаление при ЧМТ, проявившееся в

ограничении воспалительного ответа на 3 сутки за счет снижения уровней IL-1 β , кортизола, Hif-1 α и экспрессии *vegfaa*. Полученные результаты служат экспериментальным обоснованием перспективности данного терапевтического подхода для модулирования воспалительного ответа при ЧМТ.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма; *Danio rerio*; нейровоспаление; иммунокомпетентные клетки; кофеин; мозг; цитокины.

Abstract

Introduction. The inflammatory response, developing in response to brain injury, plays a crucial role in the pathogenesis of traumatic brain injury (TBI). This response contributes to resolving the consequences of brain damage while simultaneously being a leading cause of post-traumatic complications. The development of therapeutic approaches to modulate inflammation in TBI is a relevant task today. Caffeine possesses pronounced immunomodulatory properties, affecting both innate and adaptive immune responses. Previously, the potential to stimulate neurogenesis, neuroplasticity processes, and reduce neuroinflammation using spleen immune cells modulated *in vitro* with caffeine has been demonstrated in a depression-like state. **Objective.** To investigate the effect of splenocytes modulated *in vitro* with caffeine on the development of the inflammatory response in a laser-induced TBI model in *Danio rerio*. **Materials and Methods.** The studies were conducted on adult *Danio rerio* fish. Levels of IL-1 β in the brain and peripheral cortisol were determined using ELISA. Assessment of Hif-1 α levels was performed using IHC on cryosections of the telencephalon. RNAseq was performed, followed by analysis of the differential expression of genes (DEG) involved in controlling neuroinflammation (*illb* and *vegfaa*). **Results.** Intravenous administration of syngeneic splenocytes modulated *in vitro* with caffeine on day 1 post-TBI did not significantly affect the level of IL-1 β or the expression of its gene, *illb*, in fish with TBI. However, an increase in peripheral cortisol levels was observed, followed by its reduction to the levels of intact individuals by day 3. On day 3 post-injury, the expression of the *illb* gene, as well as the production of the IL-1 β cytokine, decreased compared to day 1 levels. This was accompanied by decreased levels of Hif-1 α and reduced expression of the *vegfaa* gene. **Conclusion.** The study demonstrates the modulatory effect of immunocompetent cells pre-cultured with caffeine on neuroinflammation following TBI. This effect manifested as a limitation of the inflammatory response by day 3, attributed to reduced levels of IL-1 β , cortisol, Hif-1 α , and decreased *vegfaa* expression. The obtained results provide an

experimental rationale for the potential of this therapeutic approach in modulating the inflammatory response in TBI.

Keywords: traumatic brain injury; zebrafish; neuroinflammation; immune cells; caffeine; brain; cytokines.

1 Введение

2 Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является серьезной проблемой
3 современного здравоохранения и считается одной из ведущих причин смерти
4 и инвалидности [9]. Важную роль при ЧМТ играет воспалительная реакция,
5 развивающаяся в ответ на высвобождение эндогенных факторов,
6 ассоциированных с повреждением (DAMPs). Воспалительный ответ
7 сопровождается активацией микроглии и астроглии, нарушением
8 проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и миграцией
9 макрофагов, нейтрофилов и лимфоцитов к месту повреждения. Эти процессы
10 способствуют высвобождению медиаторов воспаления, к которым относятся
11 цитокины (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ) и хемокины (CCL1, CXCL1, CXCL2),
12 усилению воспалительного ответа посредством привлечения других
13 иммунных клеток, межклеточной передаче сигналов в месте повреждения, а
14 также передаче сигналов на системный уровень через кровеносную систему
15 [6, 7]. Развитие воспалительного ответа при ЧМТ играет важную роль в
16 ограничении распространения повреждения, в успешном заживлении травмы,
17 активируя регенерацию и восстановление гомеостаза тканей, способствуя
18 выведению продуктов клеточной гибели [6]. С другой стороны, существуют
19 негативные аспекты реакций на повреждение ЦНС, которые могут усугублять
20 патологию ЧМТ и приводить к гибели нейронов. Неспособность подавить
21 сильную острую воспалительную реакцию может свести на нет
22 положительные аспекты воспалительных процессов, способствовать развитию
23 хронического воспаления и целому ряду долгосрочных последствий для
24 пациента, включая неврологический дефицит и риск развития
25 нейродегенеративных заболеваний [4, 7]. Таким образом, воспалительный
26 ответ играет ключевую роль в патогенезе ЧМТ, способствует устранению
27 последствий повреждения головного мозга и, в то же время, является одной из
28 ведущих причин посттравматических осложнений. Разработка
29 терапевтических подходов для модуляции воспаления при ЧМТ является
30 актуальной задачей на сегодняшний день. Терапевтические подходы,

31 направленные на модуляцию нейровоспаления, должны эффективно
32 ограничивать острую воспалительную реакцию до уровня, необходимого для
33 успешного устранения последствий первичного повреждения и элиминации
34 воспалительных сигналов, способствовать развитию противовоспалительных
35 и прорегенеративных фенотипов клеток, вовлеченных в воспалительный
36 ответ, и предотвращать развитие хронического воспаления.

37 Кофеин обладает иммуномодулирующими свойствами, влияя как на
38 врожденные, так и на адаптивные иммунные реакции; в частности, кофеин
39 снижает рецептор-опосредованную продукцию иммунными клетками ряда
40 провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α) и увеличивает
41 секрецию противовоспалительных цитокинов (IL-10), тем самым ограничивая
42 воспалительные процессы [1, 11]. Однако, несмотря на указанные
43 противовоспалительные свойства кофеина, его применение с этой целью в
44 ряде случаев ограничено из-за возможных негативных осложнений, в
45 частности, при ЧМТ это грозит усилением кровотечения. Ранее была
46 продемонстрирована возможность редактирования депрессивно-подобного
47 поведения с помощью модулированных кофеином *in vitro* иммунных клеток
48 селезенки и показаны центральные механизмы этого эффекта, направленные
49 на стимуляцию нейрогенеза, процессов нейропластичности и снижение
50 нейровоспаления [1, 2, 10, 11].

51 Целью настоящего исследования была оценка влияния модулированных
52 *in vitro* кофеином спленоцитов на развитие воспалительного ответа на модели
53 лазер-индуцированной закрытой ЧМТ у *Danio rerio*.

54 **Материалы и методы.** Эксперименты выполнены на взрослых (6 – 8
55 месяцев) рыбах *Danio rerio* обоих полов, приобретенных у местного
56 дистрибьютора (индивидуальный предприниматель В.А. Федореев,
57 Новосибирск, Россия). В течение эксперимента рыб содержали группами по
58 10-12 особей в аквариумах на 3 литра воды (pH 7,2–7,4; 23-25°C; 14/10 ч.; 920
59 люкс). Все экспериментальные процедуры проводили в соответствии с
60 Руководством National Institutes of Health по уходу и использованию
Russian Journal of Immunology (Russia)

61 лабораторных животных и руководящими принципами, установленными
62 Комитетом по этике животных НИИНМ (протокол № 9 от 19.10.2023) и
63 локально-этического комитета НИИФКИ (протокол заседания № 139 от
64 30.05.2022г.). Для проведения исследования были сформированы следующие
65 группы: контрольная группа травмированных рыб без инъекции спленоцитов
66 (ТБИ); группа травмированных рыб с инъекцией спленоцитов, не
67 обработанных кофеином (S1); группа травмированных рыб с инъекцией
68 спленоцитов, активированных кофеином(S2).

69 Для проведения экспериментальных процедур, рыб наркотизировали с
70 помощью гвоздичного масла (концентрация – 150 ppm; длительность – 1-2
71 мин.). ЧМТ у *Danio rerio* индуцировали воздействием лазерного излучения
72 (мощность – 500 мВт; длительность – 2,5 сек.; диаметр – 1мм) на обо
73 полушария теленцефалона согласно протоколу, опубликованному ранее [12].
74 Сразу после нанесения ЧМТ проводили внутривенную инъекцию спленоцитов
75 (80 000 клеток на рыбу) через ретро-орбитальный синус. В качестве доноров
76 спленоцитов использовали из той же популяции, как и рыбы из
77 экспериментальных групп. У рыб индуцировали ЧМТ с помощью лазерного
78 излучения меньшей мощности (60 % от экспериментальной); на следующие
79 сутки рыб усыпляли с помощью ледяной воды и декапитировали, затем в
80 стерильных условиях вскрывали брюшную полость, извлекали селезенки и
81 помещали во флакон с охлажденной до 4 °С средой RPMI-1640 (Sigma-Aldrich,
82 США). Выделение спленоцитов из селезенки проводили согласно ранее
83 опубликованному протоколу [10, 11]. Перед проведением инъекции,
84 спленоциты обрабатывали *in vitro* кофеином (150мкг/ мл) в присутствии FCS
85 (Nucleo) в течение 25 минут, после чего 3-кратно отмывали от кофеина и
86 ресуспензировали в среде RPMI-1640. Для контрольной группы спленоциты
87 культивировали в отсутствие кофеина 25 мин.

88 Для проведения ИФА на определение уровня IL-1 β , головной мозг
89 выделяли на холоде и фиксировали в 50 мкл стандартного раствора PBS, в
90 каждый образец пулировали по 3 мозга. Далее образцы гомогенизировали

91 ультразвуком, замораживали и хранили при температуре - 20°C. ИФА
92 проводили с помощью готового набора для *Danio rerio* (BlueGene, Китай,
93 E1710010) в соответствии с протоколом производителя.

94 Для оценки уровня периферического кортизола методом ИФА тела рыб
95 взвешивали и гомогенизировали, затем, образцы замораживали и хранили при
96 температуре -20 °C. Перед проведением ИФА образцы трижды экстрагировали
97 5 мл диэтиловым эфиром. Количественное определение концентрации
98 кортизола проводили с использованием набора для анализа уровня кортизола
99 в слюне человека (Хема, Россия, K210S011) в соответствии с инструкциями
100 производителя и выражали в виде содержания, нормированного на
101 соответствующий вес образца.

102 Иммуногистохимический анализ использовали для оценки уровня Hif-1 α .
103 Забой животных производили с помощью декапитации, затем, выделяли мозг
104 и фиксировали 4% параформальдегидом. Далее образцы фиксировали в PBS,
105 содержащем 30% сахарозы, при 4 °C. Иммуногистохимические анализы были
106 выполнены на фронтальных криосрезах (MicroCut-SADV, Labware
107 Manufacturing Co, Китай) толщиной 30 мкм теленцефалона каждой рыбы.
108 Использовали кроличьи поликлональные антитела (NB100-134, разведение -
109 1:100, NovusBiologicals) и флуоресцентно меченые (конъюгированные с
110 AlexaFluor 488) кроличьи антитела IgG (ab150077, разведение - 1:500, Abcam,
111 Великобритания). Интенсивность флуоресценции измеряли как
112 скорректированную по фону оптическую плотность (OD) с вычитанием
113 сигналов окрашивания неиммунореактивных областей на изображениях,
114 преобразованных в оттенки серого. Площадь интереса составляла 18191 мкм²
115 в телецефалоне. Флуоресцентные изображения получали с помощью
116 микроскопа AxioPlan 2 (Carl Zeiss, Германия), а затем анализировали в
117 программном обеспечении Image Pro Plus Software 6.0 (Media Cybernetics,
118 США).

119 Для проведения RNAseq, РНК выделяли тризольным методом и очищали
120 набором Purelink RNA Micro Kit (Life Technologies, США). Остатки ДНК
Russian Journal of Immunology (Russia)

121 удаляли обработкой DNase I (Sigma-Aldrich, США). Качество РНК проверяли
122 на Bioanalyzer 2100 (Agilent, США) с RNA 6000 Pico Kit, концентрацию
123 определяли с помощью Nanodrop (ThermoFisher, США) и Qubit (Invitrogen,
124 США). Из 2–5 мкг общей РНК мРНК выделяли набором NEBNextPoly(A)
125 mRNA MagneticIsolationModule (NEB, США). ДНК-библиотеки готовили с
126 помощью MGIEasy RNA Directional Library PrepSet (MGI Tech, Китай),
127 маркируя образцы уникальными баркодами. Качество библиотек оценивали на
128 Bioanalyzer 2100 с High Sensitivity DNA Kit (Agilent, США), концентрацию
129 измеряли прибором Qubit (Invitrogen, США). Секвенирование проводили на
130 платформе MGISEQ-2000 (MGI Tech, Китай), режим 2×100 п.н. (набор FCL
131 PE100), в ЦКП ИХБФМ СО РАН (Новосибирск).

132 Анализ данных выполняли в CLC GenomicsWorkbench 21.0.5 (Qiagen,
133 Германия): фильтрация по качеству (QV>20), длине (>15 нукл.) и удаление
134 адаптеров; картирование на геном *Danio rerio* (GRCz11, Ensembl v.109),
135 параметры: Similarityfraction и Lengthfraction – 0,8, Mismatchcost – 2, Insertion
136 и Deletioncost – 3. На основе полученных BAM-файлов генерировали таблицы
137 подсчёта прочтений. Дифференциальную экспрессию генов оценивали в
138 пакете DESeq2 (версия 1.40.2) в среде R (версия 1.40.2). Гены считали
139 дифференциально экспрессированными (DEGs) при FDR-adjusted p-value<0.05
140 и |FoldChange| > 1,5, что обеспечивало точность и надёжность полученных
141 результатов. Все данные транскриптома в данном исследовании нормированы
142 на количество транскриптов на миллион (TPM, transcripts per million).

143 Статистический анализ и построение графиков проводили с
144 использованием библиотек Python 3. Данные для ИГХ и ИФА были оценены
145 на нормальное распределение с использованием теста Шапиро-Уилка. Для
146 данных с нормальным распределением использовался дисперсионный анализ
147 (ANOVA) с множественным попарным сравнением с помощью
148 апостериорного теста Тьюки HSD. Уровень значимости был определен как p
149 <0,05.

150 **Результаты исследования и их обсуждение.** IL-1 β является одним из
151 ключевых медиаторов нейровоспаления, участвует в активации врожденного
152 иммунного ответа при ЧМТ, а также способствует нарушению проницаемости
153 ГЭБ [7, 8]. В нашем исследовании не было выявлено различий по уровню IL-
154 1 β (Рисунок 1А) и экспрессии его гена *illa* (Рисунок 1С) между группами на 1
155 сутки после ЧМТ. На 3 сутки после травмы экспрессия гена *illa*, равно как и
156 продукция указанного цитокина снижались в сравнении с таковыми на 1
157 сутки. При этом, уровень IL-1 β в группе S2 был выше в сравнении с группой
158 S1 ($p < 0,05$), однако различий с группой TBI установлено не было ($p > 0,05$).
159 Анализ уровня периферического кортизола показал его повышение в группе
160 S2 по сравнению с группой TBI ($p < 0.01$) на 1 сутки после ЧМТ, у группы S1
161 подобного эффекта не наблюдалось (Рисунок 1В), при этом, на 3 сутки уровень
162 кортизола в группе S2 снизился до уровня остальных групп.

163 Известно, что активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая
164 (НРА) оси модулируется иммунной системой, медиаторы воспаления
165 воздействуя на рецепторы в гипоталамусе, индуцируют выработку кортизола
166 надпочечниками [5]. Анализ уровня кортизола косвенно показал более
167 выраженную реакцию на 1 сутки у *Danio rerio* после введения
168 модулированных кофеином спленоцитов, при этом, мы не наблюдали
169 существенных изменений уровня IL-1 β , что говорит об отсутствии
170 выраженного супрессивного действия введенных сингенных
171 иммунокомпетентных клеток, прекультивированных с кофеином, на острую
172 фазу воспалительного ответа при ЧМТ.

173

174 **Рисунок 1.** Влияние внутривенного введения спленоцитов, модулированных
175 *in vitro* кофеином, на показатели воспалительного ответа у *Danio rerio* на 1-й
176 и 3-й день после черепно-мозговой травмы. А - Уровень IL-1 β ($n = 9$). В -
177 Уровень периферического кортизола ($n = 10$). D - Уровень Hif-1 α ($n = 4$).
178 Данные выражены как среднее значение \pm SEM; x- $p < 0,05$, xx- $p < 0,01$, xxx -
179 $p < 0,001$ (HSD Тьюки). С - Экспрессия гена *illa* в теленцефалоне. Данные

180 выражены как TPM, результаты представлены в виде медианы,
181 межквартильного размаха (IQR) и крайних значений ($n = 4$); $xxx\text{-}padj < 0,001$
182 (FDR). * - по сравнению с группой TBI; # - по сравнению с группой S1; ^ - по
183 сравнению с днем 1 в той же группе. TBI - контрольная группа
184 травмированных рыб без инъекции спленоцитов; S1 - группа травмированных
185 рыб с инъекцией спленоцитов, не обработанных кофеином; S2 - группа
186 травмированных рыб с инъекцией спленоцитов, активированных кофеином.

187 Также были проанализированы уровень *Hif-1 α* и экспрессия его гена *hif-*
188 *1 $\alpha\beta$* , транскрипционная активность и стабильность которого инициируется
189 при ЧМТ [5]. *Hif-1 α* вызывает нейровоспалительные реакции, в том числе
190 опосредованную NLRP3 активацию микроглии и высвобождение
191 провоспалительных цитокинов [15]. В нашем исследовании установлено
192 снижение уровня *Hif-1 α* , но не экспрессии его гена (Рисунок 2А), в группе S2
193 на 1 сутки по сравнению с группой TBI ($p < 0,01$) и S1 ($p < 0,01$), на 3 сутки
194 показано снижения уровня *Hif-1 α* как в группе S2, так и в группе S1 по
195 сравнению с контрольной группой рыб ($p < 0,001$) (Рисунок 1D). Мы также
196 оценили экспрессию гена *vegfaa*, который является геном-мишенью *Hif-1 α* . В
197 нашем исследовании установлено снижение экспрессии гена *vegfaa* после
198 введения спленоцитов на 3 сутки после травмы, снижение экспрессии
199 наблюдается в группе S1 и S2 по сравнению с группой TBI (Рисунок 2В).
200 Известно, что VEGF способен увеличивать проницаемость сосудов и вызывать
201 вазодилатацию, повышение уровня VEGF приводит к развитию отёка и
202 инфильтрации нейтрофилами, усиливая нейровоспаление при ЧМТ [3].
203 Нарушение ГЭБ обусловлено гидролитической деградацией мембранных
204 белков сосудов, VEGF способствует нарушению проницаемости ГЭБ,
205 стимулируя экспрессию матриксной металлопротеиназы-9 (MMP-9) [13].
206 Ранее было показано, что ингибирование экспрессии генов *Hif-1 α* и *Vegf*
207 способно подавлять активацию микроглии и астроцитов при ЧМТ [14].
208 Снижение уровня *Hif-1 α* и экспрессии *vegfaa* подтверждают модулирующие
209 действие прекультивированных с кофеином спленоцитов, направленное на

210 ограничение воспалительного ответа. Снижение VEGF способно ограничить
211 миграцию периферических иммунных клеток к месту повреждение при ЧМТ,
212 тем самым способствовать развитию противовоспалительных и
213 прорегенеративных процессов.

214

215 **Рисунок 2.** Влияние внутривенного введения спленоцитов, модулированных
216 *in vitro* кофеином, на экспрессию генов *hif-1αβ* (A) и *vegfaa* (B) в
217 телянцезелке ответа у *Danio rerio* на 1-й и 3-й день после черепно-мозговой
218 травмы. Данные выражены как TPM; результаты представлены как медиана,
219 межквартильный размах (IQR) и крайние значения; (n = 4). xx- p < 0,01, xxx p
220 < 0,001 FDR *padj*. ** - по сравнению с группой ЧМТ; ^ - по сравнению с 1-м
221 днем той же группе. S1 - группа травмированных рыб с инъекцией
222 спленоцитов, не обработанных кофеином; S2 - группа травмированных рыб с
223 инъекцией спленоцитов, активированных кофеином.

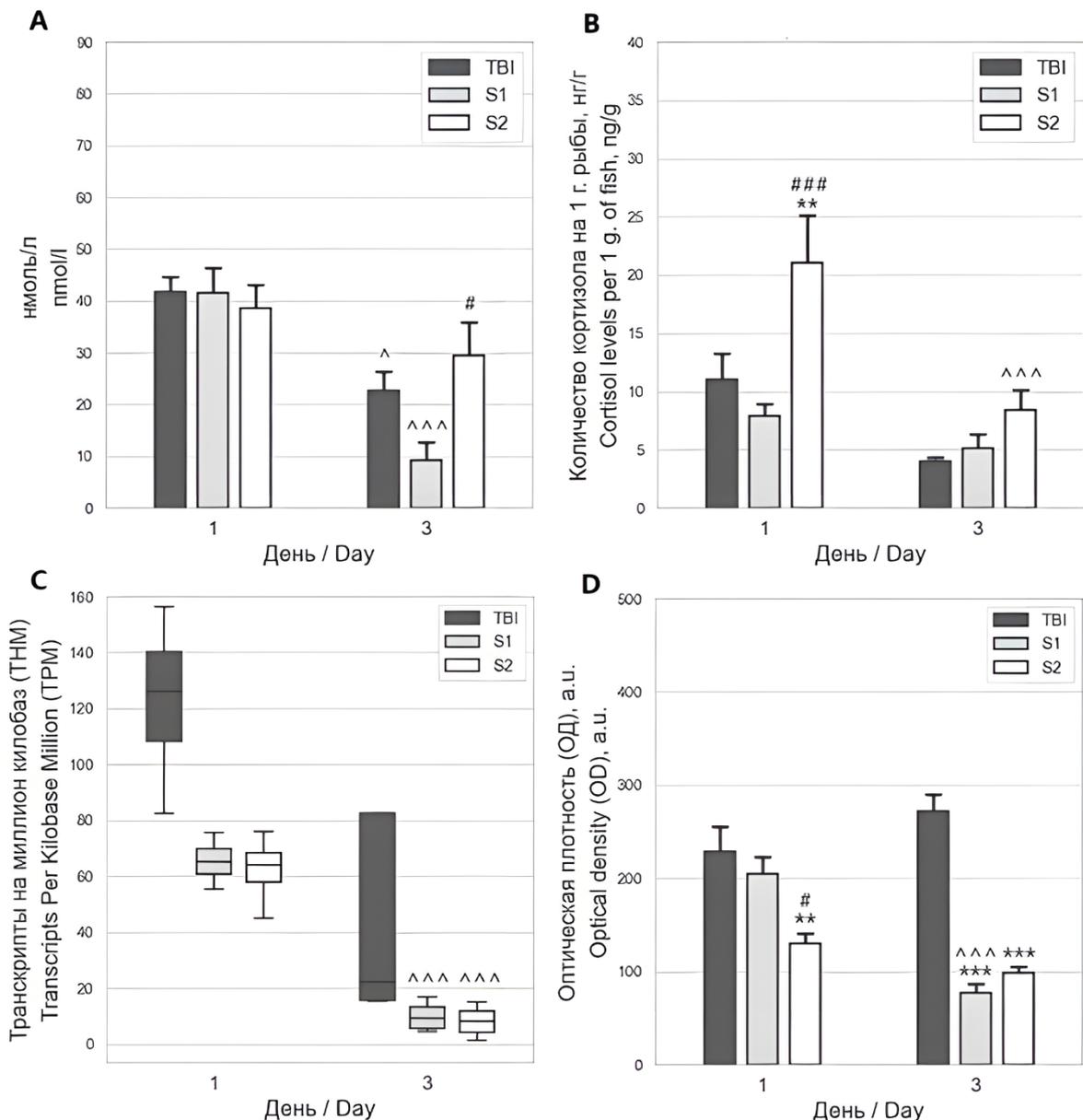
224 Полученные результаты служат экспериментальным обоснованием
225 перспективности данного терапевтического подхода для модулирования
226 воспалительного ответа при ЧМТ.

227 **Выводы.** 1. Терапевтический подход, основанный на внутривенном
228 введении прекультивированных с кофеином сингенных иммунокомпетентных
229 клеток селезенки, показал выраженное модулирующее действие указанных
230 клеток на нейровоспаление на модели лазер - индуцированной ЧМТ у *Danio*
231 *rerio*. 2. Иммуномодулирующий эффект прекультивированных с кофеином
232 иммунокомпетентных клеток селезенки проявляется в ограничении
233 воспалительного ответа на 3 сутки за счет снижения уровней IL-1β, кортизола,
234 Hif-1α и экспрессии *vegfaa*.

РИСУНКИ

Рисунок 1. Влияние внутривенного введения спленоцитов, модулированных *in vitro* кофеином, на показатели воспалительного ответа у *Danio rerio* на 1-й и 3-й день после черепно-мозговой травмы.

Figure 1. Effect of intravenous administration of splenocytes modulated *in vitro* by caffeine on inflammatory response parameters in *Danio rerio* on 1 and 3 days after traumatic brain injury.



Примечание:

A - Уровень IL-1β (n = 9). B - Уровень периферического кортизола (n = 10). D - Уровень Hif-1α (n = 4). Данные выражены как среднее значение ± SEM; x- p<0,05, xx-p<0,01, xxx -p<0,001 (HSD Тьюки).

C - Экспрессия гена IL-1B в теленцефалоне. Данные выражены как TPM, результаты представлены в виде медианы, межквартильного размаха (IQR) и крайних значений (n = 4); xxx- $p_{adj} < 0,001$ (FDR).

* - по сравнению с группой TBI; # - по сравнению с группой S1; ^ - по сравнению с днем 1 в той же группе.

Note:

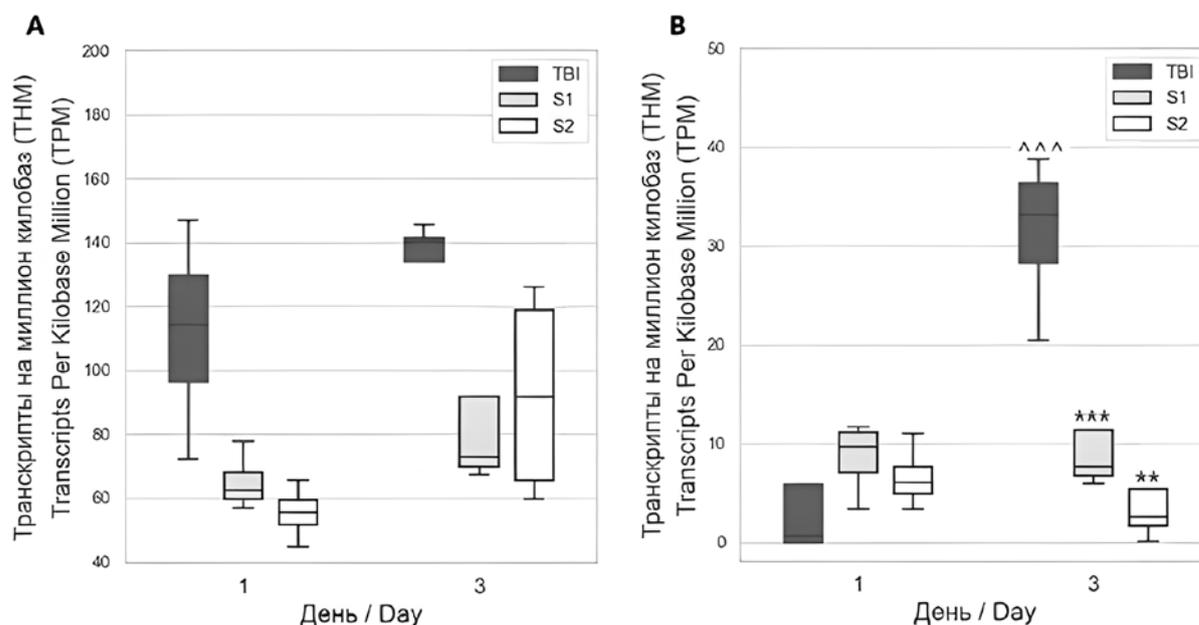
A - IL-1 β level (n = 9). B - peripheral cortisol level (n = 10). D - Hif-1 α level (n = 4). The data are expressed as mean \pm SEM. x $p < 0.05$, xx $p < 0.01$, xxx $p < 0.001$ (Tukey's HSD);

C - IL-1B gene expression in the telencephalon. Data are expressed as TPM, results are presented as median, interquartile range (IQR) and extremes (n = 4); xxx- $p_{adj} < 0.001$ (FDR).

* - vs. TBI group; # - vs. S1 group; ^ - vs. Day1 on the same group.

Рисунок 2. Влияние внутривенного введения спленоцитов, модулированных *in vitro* кофеином, на экспрессию генов *hif-1αβ* (A) и *vegfaa* (B) в теленцефалоне ответа у *Danio rerio* на 1-й и 3-й день после черепно-мозговой травмы.

Figure 2. Effects of intravenous administration of splenocytes modulated *in vitro* by caffeine on the expression of *hif-1αβ* (A) and *vegfaa* (B) genes in the telencephalon of *Danio rerio* on days 1 and 3 post traumatic brain injury.



Примечание:

Данные выражены как TPM; результаты представлены как медиана, межквартильный размах (IQR) и крайние значения; (n = 4). xx- p < 0,01, xxx p < 0,001 FDR p_{adj}. **- по сравнению с группой ЧМТ; ^ - по сравнению с 1-м днем той же группе.

Note:

All data are expressed as TPM and results are presented as median, interquartile range (IQR) and extremes (n = 4); xx p < 0.01, xxx p < 0.001 of FDR p_{adj}. **- vs. TBI group; ^ -vs. Day 1 on the same group.

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Нехорошев Евгений Владиславович, аспирант НГУ, лаборант-исследователь лаборатории экспериментальных моделей нейропсихиатрических нарушений ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины»;

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины», Новосибирск, Россия;

адрес: 630090, Россия, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 4/2, кв. 508;

телефон: 89612296307;

e-mail: e.nekhoroshev@g.nsu.ru

Nekhoroshev Evgeny Vladislavovich, postgraduate student NSU, laboratory research assistant at the Laboratory of Experimental Models of Neuropsychiatric Disorders Federal State Budgetary Scientific Institution “Scientific Research Institute of Neurosciences and Medicine”;

Federal State Budgetary Scientific Institution “Scientific Research Institute of Neurosciences and Medicine”, Novosibirsk, Russia;

address: Nekhoroshev E.V., 630090, Russia, Novosibirsk, Pirogova Str., 4/2, apt. 508;

telephone: 89612296307;

e-mail: e.nekhoroshev@g.nsu.ru

Блок 2. Информация об авторах

Ван Ш., аспирант НГУ;

Wang S., postgraduate student NSU;

Маркова Е. В., д.м.н., главный научный сотрудник и руководитель лаборатории нейроиммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии»;

Markova E. V., MD, PhD, D.Sc., Chief Researcher and Head of Neuroimmunology Laboratory, Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology”;

Клещев М. А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальных моделей нейропсихиатрических нарушений ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины»;

Kleshchev M. A., PhD, senior researcher of the Laboratory of Experimental Models of Neuropsychiatric Disorders, Federal State Budgetary Scientific Institution “Scientific Research Institute of Neurosciences and Medicine”;

Савкин И. В., научный сотрудник лаборатории нейроиммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии»;

Savkin I. V., Researcher of Neuroimmunology Laboratory, Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology”;

Серенко Е.В., младший научный сотрудник лаборатории нейроиммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии»;

Serenko E. V., Junior Researcher of Neuroimmunology Laboratory, Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology”;

Княжева М.А., к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории нейроиммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии»;

Knyazheva M. A., PhD, Junior researcher of Neuroimmunology Laboratory, Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology”;

Акопян А. А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории нейробиологических механизмов нейродегенеративных процессов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины»;

Акопян А. А., PhD, Senior Researcher, Laboratory of Neurobiological Mechanisms of Neurodegenerative Processes, Federal State Budgetary Scientific Institution “Scientific Research Institute of Neurosciences and Medicine”;

Амстиславская Т. Г., д.б.н., главный научный сотрудник и руководитель лаборатории экспериментальных моделей нейропсихиатрических нарушений ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины»;

Amstislavskaya T.G., PhD, D.Sc. (Biol), Chief Researcher and Head of the Laboratory of Experimental Models of Neuropsychiatric Disorders Federal State Budgetary Scientific Institution “Scientific Research Institute of Neurosciences and Medicine”.

Блок 3. Метаданные статьи

ЭФФЕКТ МОДУЛИРОВАННЫХ *IN VITRO* КОФЕИНОМ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК НА ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ОТВЕТ ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ

EFFECT OF *IN VITRO* CAFFEINE-MODULATED IMMUNE CELLS ON THE INFLAMMATORY RESPONSE IN TRAUMATIC BRAIN INJURY

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

**МОДУЛИРОВАННЫЕ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ ПРИ ЧМТ
MODULATED IMMUNE CELLS IN TBI**

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, *Danio rerio*. нейровоспаление, иммунокомпетентные клетки, кофеин, мозг, цитокины.

Keywords: traumatic brain injury, zebrafish, neuroinflammation, immune cells, caffeine, brain, cytokines.

Иммунологические чтения в Челябинске.

Количество страниц текста – 5,

Количество таблиц – 0,

Количество рисунков – 2.

30.03.2025

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес цитируемой статьи или ее doi. (URL)
1	Маркова Е. В. Иммунокомпетентные клетки и регуляция поведенческих реакций в норме и патологии. Красноярск: Научно-инновационный центр, 2021.- 184 с.	Markova E.V. Immune cells and regulation of behavioral reactions in health and disease. Krasnoyarsk: Scientific and Innovation Center, 2021, 184 p. (in Russ).	doi: 10.12731/978-5-907208-67-4
2	Маркова Е.В., Княжева М. А. Центральные эффекты модулированных кофеином иммунокомпетентных клеток в механизмах редактирования депрессивно-подобного поведения //Российский иммунологический журнал. - 2024. -Т. 27,-№ 2.- С. 335-342.	Markova E.V., Knyazheva M.A. 2024. Central effects of ex vivo caffeine-modulated immune cells in the mechanisms of editing depressive-like behavior. Russ. J. of Immunology, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 335-342. (in Russ).	doi: org/10.46235/1028-7221-16621-CEO.
3	Abdul-Muneer P. M., Chandra N. and Haorah J. Interactions of		doi: 10.1007/s12035-014-8752-3.

	oxidative stress and neurovascular inflammation in the pathogenesis of traumatic brain injury. Mol Neurobiol., 2015, Vol. 51, no. 3, pp. 966-979.		
4	Brett B.L., Gardner R.C., Godbout J., Dams-O'Connor K., Keene C.D. Traumatic Brain Injury and Risk of Neurodegenerative Disorder. Biol Psychiatry., 2022, Vol. 91, no. 5, pp. 498-507.	-	doi: 10.1016/j.biopsych.2021.05.025.
5	Chandel N. S. and Budinger G. R. The cellular basis for diverse responses to oxygen. Free Radic Biol Med., 2006, Vol. 42, no. 2, pp. 165-74.		doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.10.048.
6	Jassam Y. N., Izzy S., Whalen M., McGavern D. B., Khoury J. E. Neuroimmunology of Traumatic Brain Injury: Time for a Paradigm Shift. Neuron., 2017, Vol. 95, no. 6, pp. 1246-1265.		doi: 10.1016/j.neuron.2017.07.010.
7	Kalra S., Malik R., Singh G., Bhatia S., Al-Harrasi A., Mohan S., Albratty M., Albarrati A.,		doi: 10.1007/s10787-022-01017-8.

	Tambuwala M.M. Pathogenesis and management of traumatic brain injury (TBI): role of neuroinflammation and anti-inflammatory drugs. <i>Inflammopharmacology</i> , 2022, Vol. 30, no. 4, pp. 1153-1166.		
8	Lindblad C., Rostami E., Helmy A. Interleukin-1 receptor antagonist as therapy for traumatic brain injury. <i>Neurotherapeutics</i> , 2023, Vol. 20, no. 6, pp. 1508-1528.		doi: 10.1007/s13311-023-01421-0.
9	Maas A.I.R., Menon D.K., Manley G.T., Abrams M., Åkerlund C., Andelic N., Aries M., Bashford T., Bell M.J., Bodien Y.G., Brett B.L., Büki A., Chesnut R.M., Citerio G., Clark D., Clasby B., Cooper D.J., Czeiter E., Czosnyka M., Dams-O'Connor K., De Keyser V., Diaz-Arrastia R., Ercole A., van Essen T.A., Falvey É., Ferguson A.R., Figaji A., Fitzgerald M., Foreman B., Gantner D., Gao G., Giacino J., Gravesteyn B., Guiza F., Gupta D., Gurnell M., Haagsma J.A.,		doi: 10.1016/S1474-4422(22)00309-X.

<p>Hammond F.M., Hawryluk G., Hutchinson P., van der Jagt M., Jain S., Jain S., Jiang J.Y., Kent H., Koliass A., Kompanje E.J.O., LeckyF., Lingsma H.F., Maegele M., Majdan M., Markowitz A., McCrea M., Meyfroidt G., Mikolić A., Mondello S., Mukherjee P., Nelson D., Nelson L.D., Newcombe V., Okonkwo D., Orešič M., Peul W., Pisciã D., Polinder S., Ponsford J., Puybasset L., Raj R., Robba C., Røe C., Rosand J., Schueler P., Sharp D.J., Smielewski P., Stein M.B., von Steinbüchel N., Stewart W., Steyerberg E.W., Stocchetti N., Temkin N., Tenovuo O., Theadom A., Thomas I., Espin A.T., Turgeon A.F., Unterberg A., Van Praag D., van Veen E., Verheyden J., Vyvere T.V., Wang K.K.W., Wieggers E.J.A., Williams W.H., Wilson L., Wisniewski S.R., Younsi A., Yue J.K., Yuh E.L., Zeiler F.A., Zeldovich M., Zemek R.; InTBIR Participants and</p>		
---	--	--

	Investigators. Traumatic brain injury: progress and challenges in prevention, clinical care, and research. <i>Lancet Neurol.</i> , 2022, Vol. 21, no. 11, pp. 1004-1060.		
10	Markova E.V., Knyazheva M.A., Tikhonova M.A., Amstislavskaya T.G. Structural and functional characteristics of the hippocampus in depressive-like recipients after transplantation of in vitro caffeine-modulated immune cells. <i>Neurosci. Lett.</i> , 2022, Vol. 786, pp. 136790.		doi: 10.1016/j.neulet.2022.136790.
11	Markova E.V., Knyazheva M A. Immunomodulatory properties of caffeine and caffeine-treated immune cells in depression-like state. <i>Medical Immunology (Russia)</i> , 2023, Vol. 25, no. 3, pp. 533-538.		doi: 10.15789/1563-0625-IPO-2666
12	Tikhonova M.A., Maslov N.A., Bashirzade A.A., Nehoroshev E.V., Babchenko V.Y., Chizhova N.D., Tsibulskaya E.O., Akopyan		doi: 10.3390/pharmaceutics14081751

	A.A., Markova E.V., Yang Y.L., Lu K.T., Kalueff A.V., Aftanas L.I., Amstislavskaya T.G. A novel laser-based zebrafish model for studying traumatic brain injury and its molecular targets. <i>Pharmaceutics</i> , 2022, Vol. 14, no. 8, pp. 1751.		
13	Tsuji K., Aoki T., Tejima E., Arai K., Lee S.R., Atochin D.N., Huang P.L., Wang X., Montaner J., Lo E.H. Tissue plasminogen activator promotes matrix metalloproteinase-9 upregulation after focal cerebral ischemia. <i>Stroke</i> , 2005, Vol. 36, no. 9, pp. 1954-1959.		doi: 0.1161/01.STR.0000177517. 01203.eb.
14	Xu X., Yang M., Zhang B., Dong J., Zhuang Y., Ge Q., Niu F., Liu B. HIF-1 α participates in secondary brain injury through regulating neuroinflammation. <i>Transl. Neurosci.</i> , 2023, Vol. 14, no. 1, pp. 20220272.		doi: 10.1515/tnsci-2022-0272.

15	Yuan D., Guan S., Wang Z., Ni H., Ding D., Xu W., Li G. HIF-1 α aggravated traumatic brain injury by NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis and activation of microglia. J. Chem. Neuroanat., 2021, Vol. 116, no. 10, pp. 101994.		doi: 10.1016/j.jchemneu.2021.101994.
----	--	--	--------------------------------------