

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-25-39



Влияние дексаметазона на экспрессию и содержание гликозилированных компонентов в ткани головного мозга мышей

С.Д. Аладьев¹, Д.К. Соколов¹, А.В. Строкотова¹, Г.М. Казанская¹, А.М. Волков², М.О. Политко¹, А.И. Шахмурадова¹, Е.Э. Кливер², А.Ю. Цидулко¹, С.В. Айдагулова^{1,3}, Э.В. Григорьева¹

¹Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» Минобрнауки России; Россия, 630117 Новосибирск, ул. Тимакова, 2/12;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России; Россия, 630055 Новосибирск, ул. Речкуновская, 15;

³ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 630091 Новосибирск, Красный проспект, 52

Контакты: Станислав Дмитриевич Аладьев s.aladev@alumni.nsu.ru

Введение. Глюкокортикоиды активно используются при лечении различных заболеваний, однако их длительное применение приводит ко множеству побочных эффектов, молекулярные механизмы развития которых остаются недостаточно изученными.

Цель исследования – изучение краткосрочного (1–10 сут) влияния различных доз дексаметазона (Dex) (0,1–10 мг/кг) на экспрессию глюкокортикоидного рецептора (GR, *Nr3c1*), коровых белков основных протеогликанов и ферментов биосинтеза углеводных цепей гепарансульфата, а также содержание углеводных макромолекул гликозаминогликанов в ткани головного мозга экспериментальных животных.

Материалы и методы. В исследовании использовали мышей линии C57Bl/6. Экспрессию GR, коровых белков протеогликанов и генов, кодирующих ферменты биосинтеза гепарансульфата, определяли с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени. Содержание и локализация белковой молекулы GR были изучены методами Вестерн-блоттинга и иммуногистохимического анализа, а содержание гликозаминогликанов – с помощью дот-блот анализа и окраски альциановым синим.

Результаты. Было показано, что однократное введение Dex приводило к быстрой (на 1–3-и сутки) кратковременной активации экспрессии GR (+1,5 раза; $p < 0,05$) некоторых генов коровых белков протеогликанов (синдекан-3, *Sdc3*; перлекан, *Hspg2*; фосфакан, *Ptprz1*; нейрокан, *Ncan*; +2–3 раза; $p < 0,05$) и генов ферментов биосинтеза гепарансульфатов (*Ndst1*, *Glce*, *Hs2st1*, *Hs6st1*, *Sulf1/2*; +1,5–2 раза; $p < 0,05$) в мозге мышей с возвращением к контрольным показателям к 7–10-м суткам после введения Dex. При этом влияние данного препарата на углеводные макромолекулы гликозаминогликанов имело более отсроченный и стабильный характер, дозозависимо увеличивая содержание общих гликозаминогликанов в ткани мозга, начиная с 1-х суток после введения Dex. Высокосульфатированные гликозаминогликаны демонстрировали более медленный ответ на введение препарата, повышение их содержания наблюдалось только при более высоких дозах (2,5 и 10 мг/кг) и только на 7–10-е сутки после его введения в основном за счет повышения содержания гепарансульфата.

Заключение. Влияние однократного применения Dex на транскрипционную активность GR, протеогликанов и ферментов биосинтеза гепарансульфата носит кратковременный характер, и экспрессия генов быстро возвращается к нормальному уровню. Однако даже однократное применение Dex значительно повышает содержание общих и высокосульфатированных гликозаминогликанов в ткани головного мозга мышей, что может привести к изменению состава и структуры ткани головного мозга, а также его функциональных характеристик.

Ключевые слова: глюкокортикоиды, дексаметазон, головной мозг, глюкокортикоидный рецептор, гликозилирование, протеогликан, гликозаминогликан

Для цитирования: Аладьев С.Д., Соколов Д.К., Строкотова А.В. и др. Влияние дексаметазона на экспрессию и содержание гликозилированных компонентов в ткани головного мозга мышей. Успехи молекулярной онкологии 2023; 10(1):25–39. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-25-39

Dexamethasone effects on the expression and content of glycosylated components of mouse brain tissue

S.D. Aladev¹, D.K. Sokolov¹, A.V. Strokovtova¹, G.M. Kazanskaya¹, A.M. Volkov², M.O. Politko¹, A.I. Shahmuradova¹, E.E. Kliver², A.Y. Tsidulko¹, S.V. Aidagulova^{1,3}, E.V. Grigorieva¹

¹Institute of Molecular Biology and Biophysics of the Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation; 2/12 Timakova St., Novosibirsk 630117, Russia;

²E.N. Meshalkin National Medical Research Center; 15 Rechkunovskaya St., Novosibirsk 630055, Russia;

³Novosibirsk State Medical University; 52 Krasnyi Prospect, Novosibirsk 630091, Russia

Contacts: Stanislav Dmitrievich Aladev s.aladev@alumni.nsu.ru

Introduction. Glucocorticoids are actively used in the treatment of various diseases, however their long-term use leads to numerous negative side-effects, the molecular mechanisms of which remain poorly understood.

Aim. Study of the short-term (1–10 days) effects of various doses of dexamethasone (Dex) (0,1–10 mg/kg) on the expression of the glucocorticoid receptor (GR, *Nr3c1*), core proteins of main proteoglycans and heparan sulfate metabolism-involved genes, as well as the content of carbohydrate macromolecules of glycosaminoglycans in the brain tissue of experimental animals.

Materials and methods. In the study, C57Bl/6 mice were used. The expression of GR, proteoglycan core proteins and heparan sulfate metabolism-involved genes was determined by real-time polymerase chain reaction with reverse transcription. The content and localization of GR protein molecule were studied by Western blot and immunohistochemical analysis, and the glycosaminoglycan content was determined by dot-blot analysis and Alcian Blue staining.

Results. It was shown that a single Dex administration leads to fast (1–3 days) short-term activation of GR expression (+1.5 times, $p < 0.05$), proteoglycan's genes (*syndecan-3*, *Sdc3*; *perlecan*, *Hspg2*; *phosphacan*, *Ptprz1*; *neurocan*, *Ncan*; +2–3-fold; $p < 0.05$) and heparan sulfate-metabolism-involved genes (*Ndst1*, *Glce*, *Hs2st1*, *Hs6st1*, *Sulf1/2*; +1.5–2-fold; $p < 0.05$) in the mouse brain, with a return to control values by 7–10 days after Dex administration. At the same time, the effect of Dex on carbohydrate macromolecules of glycosaminoglycans was more delayed and stable, increasing the content of low-sulfated glycosaminoglycans in the brain tissue in a dose-dependent manner starting from day 1 after Dex administration. Highly-sulfated glycosaminoglycans showed more delayed response to Dex administration, and an increase in their content was observed only at higher doses (2.5 and 10 mg/kg) and only on 7–10 days after its administration, apparently, mainly due to an increase in heparan sulfate content.

Conclusion. In general, the effect of a single injection of Dex on the transcriptional activity of GR, proteoglycan core proteins and heparan sulfate metabolism-involved genes were short-termed, and the genes expression quickly returned to the normal levels. However, even a single use of Dex significantly increased the content of total as well as highly sulfated glycosaminoglycans in the mouse brain tissue, which can lead to the changes in the composition and structure of the brain tissue, as well as its functional characteristics.

Keywords: glucocorticoids, dexamethasone, brain, glucocorticoid receptor, glycosylation, proteoglycan, glycosaminoglycan

For citation: Aladev S.D., Sokolov D.K., Strokovtova A.V. et al. Dexamethasone effects on the expression and content of glycosylated components of mouse brain tissue. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2023;10(1):25–39. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-25-39

ВВЕДЕНИЕ

Дексаметазон (dexamethasone, Dex) – синтетический глюкокортикостероид (glucocorticoid, GC), широко используемый для лечения широкого спектра заболеваний. Несмотря на клиническую эффективность при лечении и/или предотвращении отека головного мозга в терапии злокачественных глиом, применение Dex связано с многочисленными системными побочными эффектами, включая бессонницу, психические изменения, тремор, гипергликемию, мышечную атрофию, гипертензию и иммуносупрессию [1]. Дальнейшее изучение молекулярных механизмов побочных эффектов GC имеет большое значение для оптимизации терапии глиобластомы этими препаратами.

Головной мозг является важной мишенью GC, которые вызывают в мозге плейотропные эффекты, влияя на поведение, познание, настроение и програм-

мирование реакции на стресс. Сдвиги уровней GC связаны со сложными изменениями активности нейронов, которые различаются во времени и в зависимости от исследуемого участка мозга [2]. Глюкокортикоиды оказывают влияние на головной мозг через геномные механизмы, включающие как глюкокортикоидный рецептор (glucocorticoid receptor, GR), так и минералокортикоидные рецепторы, напрямую связывающиеся с ДНК, а также негеномные механизмы. Кроме того, GC взаимодействуют как геномно, так и негеномно с нейротрансмиттерами, нейротрофическими факторами, половыми гормонами и другими медиаторами стресса [3].

Помимо воздействия на клеточные компоненты ткани головного мозга, GC влияют также и на ее межклеточное вещество. Особенностью внеклеточного матрикса (ВКМ) головного мозга является присутствие

большого количества сложных белково-углеводных макромолекул протеогликанов (ПГ), состоящих из корового белка и углеводных цепей гликозаминогликанов (ГАГ) – гепарансульфатов (ГС) и хондроитинсульфатов (ХС) [4]. Влияние ГС на гликозилированные макромолекулы ПГ и ГАГ в различных тканях описано в обзоре [5].

При этом данные о влиянии ГС на ПГ и ГАГ в ткани головного мозга очень немногочисленны. Показано, что метилпреднизолон снижает экспрессию коровых белков фосфакана и нейрокана в модели острого повреждения спинного мозга *in vitro*, причем изменения в экспрессии нейрокана были опосредованы GR [6]. Введение Dex взрослым мышам в течение 7 сут снижает экспрессию корового белка агрина базальной мембраны в коре головного мозга мышей [7]. Показано, что обработка Dex дозозависимо влияет как на экспрессию коровых белков ПГ (синдекан-1, глипикан-1, декорин, бигликан, люмикан, версикан, бревикан и хондроитинсульфат протеогликан-4/NG2), так и на содержание ГС/ХС в органотипической культуре срезов головного мозга крысы *ex vivo* и экспериментальных животных *in vivo* [8]. Аналогичные эффекты Dex были показаны на модели рецидива глиобластомы у мышей SCID, где наблюдалось увеличение экспрессии глипикана-1, синдекана-1 и версикана и снижение содержания ХС в подкорковых структурах головного мозга, тогда как в коре головного мозга происходило только снижение уровня экспрессии бигликана [9]. Эти немногочисленные данные указывают на способность ГС оказывать влияние на гликозилированные компоненты ткани головного мозга, однако молекулярный механизм такого воздействия остается неясным.

Известно, что основная функциональная активность ГС реализуется через их связывание с GR, который кодируется геном *Nr3C1* (nuclear receptor family 3, member 1). В отсутствие внутриклеточных ГС GR находится в цитоплазме в виде мономера в составе сложного белкового комплекса, а после связывания с ГС конформация GR изменяется, белковый комплекс диссоциирует, активированный GR транслоцируется в клеточное ядро и запускает молекулярные механизмы трансактивации и трансрепрессии [10]. Оказавшись внутри ядра, GR связывается с чувствительными к нему ДНК-последовательностями в промоторной области различных генов (glucocorticoid responsive element, GRE) и действует как транскрипционный фактор, напрямую активируя и подавляя экспрессию множества генов, участвующих в различных аспектах развития, метаболизма, стрессовых реакций, воспаления и других ключевых процессах [11].

Нами была высказана гипотеза, что активное приращение Dex в качестве сопровождающей терапии при лечении глиобластомы может влиять на экспрессию и содержание гликозилированных макромолекул (ПГ, ГАГ) в ткани головного мозга через участие GR

в регуляции экспрессии генов, кодирующих коровые белки ПГ и систему биосинтеза их углеводных цепей ГАГ. Согласно имеющимся немногочисленным данным, GRE присутствуют в промоторных областях генов, кодирующих коровые белки серглицина [12], агрекана [13] и нейрокана [14]. Для некоторых коровых белков показано, что под действием ГС экспрессия гена изменяется через GR: синдекан-1 [15], агрекан [16], нейрокан [6], CD44 [17].

Цель исследования – изучить влияние дексаметазона на экспрессию GR, коровых белков основных ПГ и системы биосинтеза углеводных цепей ГС, содержание ГАГ, а также возможную взаимосвязь между этими параметрами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Все исследования проводили на мышах-самцах линии C57Bl/6 (возраст 7–8 нед, масса тела 22–30 г). Животных содержали в поликарбонатных клетках со свободным доступом к пище и воде. Клетки находились в хорошо вентилируемом помещении с 12/12-часовым циклом свет/темнота при температуре 25 ± 1 °C и влажности 50–60 %. В контрольную группу ($n = 15$) вошли мыши, получавшие однократную инъекцию физиологического раствора. Остальным мышам ($n = 99$) внутрибрюшинно выполняли однократную инъекцию Dex (KRKA Pharma, Словения) в дозировке 0,1; 1; 2,5 или 10 мг/кг (24 животных в каждой группе). Дозировки Dex были подобраны согласно данным литературы [18, 19]. Сроки выведения животных из эксперимента для каждой из дозировок Dex составляли 1, 3, 7 и 10 сут. Мышей забивали декапитацией с использованием гильотины согласно руководству по эвтаназии животных (National Research Council Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory, 2011). Головной мозг мышей разделяли на 2 половины: одну фиксировали в растворе RNALater (ThermoFisher Scientific, США) согласно инструкции производителя и использовали для полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), Вестерн-блоттинга и дот-блот анализа, а другую фиксировали в забуференном 10 % растворе формалина и заключали в парафин (BioVital, Россия) для гистологического и иммуногистохимического исследований, а также окрашивания срезов альциановым синим. Все процедуры с экспериментальными животными проводили в соответствии с Директивой Совета Европейского сообщества 2010/63/ЕС.

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени. Суммарную РНК выделяли с использованием QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Германия), обратную транскрипцию проводили с помощью RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Комплементарную ДНК (кДНК) синтезировали из 0,5 мкг суммарной РНК, в ПЦР брали 0,25 мкл итоговой кДНК/реакцию. Полимеразную цепную реакцию в реальном

времени на GR, ПГ и ферменты биосинтеза ГС проводили на приборе CFX-96 (BioRad, США) с использованием HS-qPCR SYBR Blue (Biolabmix, Россия) и праймеров (табл. 1). Программа амплификации: предварительная денатурация 95 °C 5 мин, затем денатурация 95 °C 10 с, отжиг 59 °C 15 с, элонгация 72 °C 30 с в течение 39 циклов; суммарный объем реакции – 20 мкл. Уровень экспрессии определяли по формуле:

$$E = (2^{\Delta Ct}) \cdot 1000,$$

где $\Delta Ct = Ct(\text{Gapdh}) - Ct(\text{гена})$ для каждого образца (животного).

Для статистического анализа использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA).

Вестерн-блоттинг. Ткань головного мозга мыши гомогенизировали в RIPA буфере (ThermoFisher Scientific, США) с ингибиторами протеаз cOmplete Mini (Roche, Германия). Вертикальный электрофорез проводили в 7,5 % полиакриламидном геле, белки переносили на мембрану Immobilon-PVDF (Millipore, Германия) и проводили блокировку с использованием 5 % сухого молока (BioRad, США) в PBST в течение 60 мин. Затем мембраны инкубировали с первичными кроличьими антителами к белкам GR (ab183127, Abcam, Великобритания, 1 : 15000) или Gapdh (ab181602, Abcam, Великобритания, 1 : 5000), а далее – с вторичными антителами (ab3578, Abcam, Великобритания, 1 : 10000) в течение 60 мин при комнатной температуре. Сигнал визуализировали с использованием Amersham ECL Prime (Cytiva, США), детекцию проводили в Bio Rad Chemidoc (BioRad, США). Полученные

данные обрабатывали с помощью ImageLab 6.0.1 (BioRad, США). Статистический анализ проводили в программе MS Excel (Microsoft, США).

Гистологическое исследование. Для гистологического и иммуногистохимического (ИГХ) анализов использовали полушарие головного мозга мышей, которое фиксировали в забуференном 10 % растворе формалина и заключали в парафин (BioVitrum, Россия). Парафиновые срезы толщиной 3–4 мкм монтировали на предметные стекла, окрашивали гематоксилином и эозином (BioVitrum, Россия). На коронарных срезах (полученных на расстоянии $5 \pm 0,5$ мм от Bregma) исследовали неокортекс в пределах первичной (M1) и вторичной (M2) моторной коры и первичной соматосенсорной коры (SIHL, SIFL, S1BF и иногда S1DZ), начиная от центральной борозды по окружности полушария. Окрашенные препараты анализировали с использованием микроскопа AxioScore A1 (Zeiss, Германия) при $\times 400$.

Иммуногистохимический анализ. Для оценки содержания и локализации GR проводили демаскировку антигена с использованием Dewax and HIER Buffer H (Thermo Fisher Scientific, США) и непрямую иммунопероксидазную реакцию с первичными антителами против GR (ab. 183127, Abcam, Великобритания, 1 : 1000). Для визуализации продуктов реакции применяли Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC kit (ab. 64264, Abcam, Великобритания). При подсчете клеток, имеющих ядерную экспрессию GR, тестовая площадь каждого поля зрения была равна 5000 мкм², на каждом препарате анализировали не менее 5 неперекрывающихся полей зрения. Экспрессия GR

Таблица 1. Последовательности праймеров для генов, кодирующих коровые белки протеогликанов и ферменты биосинтеза гепарансульфата, мыши
Table 1. Primer sequences for PG core proteins- and HS biosynthetic enzymes-coding mouse genes

Ген Gen	Обозначение гена Gene designation	Последовательность праймеров The sequence of primers
Синдекан-1 Syndecan-1	<i>Sdc1</i>	F 5'-GGTCTGGGCAGCATGAGAC-3' R 5'-GGAGGAACATTTACAGCCACA-3'
Синдекан-3 Syndecan-3	<i>Sdc3</i>	F 5'-GGTCAGGCTCTGGCTACTTC-3' R 5'-GGGACTGGTGACTGGTTCAG-3'
Глипикан-1 Glypican-1	<i>Gpc1</i>	F 5'-CTTTAGCCTGAGCGATGTGC-3' R 5'-GGCCAAATTCTCCTCCATCT-3'
Перлекан Perlecan	<i>Hspg2</i>	F 5'-CCGTGCTATGGACTTCAACG-3' R 5'-TGAGCTGTGGAGGGTGTATG-3'
Декорин Decorin	<i>Dcn</i>	F 5'-CCCCTGATATCTATGTGCCC-3' R 5'-GTTGTGTCCGGGTGGAAATC-3'
Бигликан Biglycan	<i>Bgn</i>	F 5'-GCCTGACAACCTAGTCCACC-3' R 5'-CAGCAAGGTGAGTAGCCACA-3'
Люмикан Lumican	<i>Lum</i>	F 5'-GCTCGAGCTTGATCTCTCCT-3' R 5'-CAGTGGTCCCAGGATCTTACA-3'
Бревикан Brevican	<i>Bcan</i>	F 5'-GTGGAGTGGCTGTGGCTC-3' R 5'-AACATAGGCAGCGGAAACC-3'

Окончание табл. 1

The end of table 1

Ген Gen	Обозначение гена Gene designation	Последовательность праймеров The sequence of primers
Нейрокан Neurocan	<i>Ncan</i>	F 5'-CCAGCGACATGGGAGTAGAT-3' R 5'-GGGACACTGGGTGAGATCAA-3'
Агрекан Aggrecan	<i>Acan</i>	F 5'-TTCGCAGGGATAAAGGACTG-3' R 5'-CCCTCAGAGTCACAAAGACCA-3'
Версикан Versican	<i>Vcan</i>	F 5'-GGAGGTCTACTTGGGGTGAG-3' R 5'-GGGTGATGAAGTTTCTGCGAG-3'
Хондроитинсульфат протеогликан-4/NG2 Cspg4/NG2	<i>Cspg4/NG2</i>	F 5'-TCTTACCTTGGCCCTGTTGG-3' R 5'-ACTCTGGTCAGAGCTGAGGG-3'
Хондроитинсульфат протеогликан-5 Cspg5	<i>Cspg5</i>	F 5'-TTGGCTTCGTCAGGCACAAT-3' R 5'-GTTACACCTGCAGAAAGCCCC-3'
CD44	<i>CD44</i>	F 5'-CAAGTTTTGGTGGCACACAG-3' R 5'-AGCGGCAGGTTACATTCAA-3'
Фосфакан-1 Phosphacan-1	<i>Ptprz1</i>	F 5'-CCCCTGAAGATGCCGAAC-3' R 5'-GTCGTGGTAGAAACCTGGGG-3'
Ext1	<i>Ext1</i>	F 5'-AGCACAAGGATTCTCGCTGT-3' R 5'-GGAACCAGACAGAAAGTGGC-3'
Ext2	<i>Ext2</i>	F 5'-ACATCCCACAGAGGCAGATT3' R 5'-GATCTGTAGGGTGGCCAGAG3'
Ndst1	<i>Ndst1</i>	F 5'-CACACAGAACGAACCTACGC-3' R 5'-CCCGTTGATGATCTTGTCC-3'
Ndst2	<i>Ndst2</i>	F 5'-TGGTCCAAGGAGAAAACCTG-3' R 5'-GCAGGCTCAGGAAGAAGTGA-3'
Glee	<i>Glee</i>	F 5'-GCTCGCTTCAGTTTTCTCA-3' R 5'-TCTTAGTACATTTCTGGCTTCAATTC-3'
Hs2st1	<i>Hs2st1</i>	F 5'-TCTTGGAGAACCAGATCCAGA3' R 5'-ATGGCGCTGTTCAATTTCTC3'
Hs3st1	<i>Hs3st1</i>	F 5'-GGAGGAGCATTACAGCCAAG-3' R 5'-TTTGGGCGAAGTGAATAGG-3'
Hs3st2	<i>Hs3st2</i>	F 5'-AACTACGGACGAGGACTGGA-3' R 5'-ATTACCTCTGGGGCAAATCC-3'
Hs6st1	<i>Hs6st1</i>	F 5'-TGGCTCTTCTCTCGCTTCTC-3' R 5'-GTCTAGCACACCGGGCAC-3'
Hs6st2	<i>Hs6st2</i>	F 5'-CCAGGCTGAGACCTTCCAG-3' R 5'-TGTGGAGGATGGAGAGTTGG-3'
Sulf1	<i>Sulf1</i>	F 5'-CCTTGCAGGGAAGCTTCAA-3' R 5'-GCTGAGTTCTGGGAGCTTGA-3'
Sulf2	<i>Sulf2</i>	F 5'-GTTCCCTCCGCGATCTAGC-3' R 5'-GTGTCGTGAGGATGGGATTC-3'
Hpse	<i>Hpse</i>	F 5'-GGCTAGAGGCTTATCTCCTGC-3' R 5'-TCTTTCTTCGGAAGTCGGTT-3'
Глюкокортикоидный рецептор Glucocorticoid receptor	<i>Nr3c1</i>	F 5'-ACGGTGGCAGTGTGAAATTG-3' R 5'-GACCTCCAAGGACTCTCGTT-3'
Gapdh	<i>Gapdh</i>	F 5'-CGTCCCGTAGACAAAATGGT-3' R 5'-TTGATGGCAACAATCTCCAC-3'

определена в каждом образце по визуально-аналоговой шкале, согласно S. Franceschi и соавт. [20]: в образце рассчитывали процент ядер клеток с различной интенсивностью окраски (3 балла – сильная, 2 балла – умеренная и 1 балл – слабая).

Поскольку во всех группах ядерная экспрессия GR была практически тотальной и различалась только по интенсивности окрашивания клеточных ядер, после полуколичественной оценки экспрессии по 3-балльной шкале каждое животное во всех группах было отнесено к одному из 3 паттернов фенотипа, которые расценивались как высокий, умеренный и низкий. Если более чем 50 % полей зрения в препарате занимали клетки с ядерной экспрессией GR в 3 балла, его относили к высокому фенотипу, если >50 % полей зрения – к умеренному фенотипу. Если полей зрения с экспрессией маркера в 3, 2 и 1 балл было одинаковое количество, такой фенотип считался низким. Окрашенные препараты анализировали при $\times 400$.

Определение содержания общих и высокосульфатированных гликозаминогликанов. Содержание ГАГ в препаратах определяли с помощью окрашивания парафиновых срезов альциановым синим с различным pH (2,5 для общих ГАГ и 1,0 для ГАГ с высоким содержанием сульфатированных групп) (BioVitrum, Россия) по протоколу, указанному в инструкции производителя, с добавлением гематоксилина Эрлиха. Окрашенные препараты анализировали с использованием микроскопа AxioScore A1 (Zeiss, Германия) при $\times 400$.

Дот-блот анализ на содержание гепарансульфатов и хондроитинсульфатов. Ткань головного мозга мыши гомогенизировали в RIPA буфере (ThermoFisher Scientific, США) с ингибиторами протеаз cOmplete Mini (Roche, Германия), наносили полученные лизаты на активированную в 95 % этаноле мембрану PVDF (Millipore Immobilon-P, Германия), блокировали в 5 % обезжиренном молоке в PBST (BioRad, США), инкубировали с первичными антителами к GC (MAВ2040, Millipore, Германия, 1: 100) или XC (кат. № 8035, Sigma-Aldrich, США, 1: 100), а затем с вторичными антителами (кат. № 150077, ThermoFisher Scientific, США, 1: 1000) в течение 60 мин при комнатной температуре. Сигнал проявляли с использованием Amersham ECL Prime (Cytiva, США). Детекцию проводили в BioRad Chemidoc, полученные данные обрабатывали с помощью ImageLab 6.0.1 (BioRad, США).

Статистическая обработка результатов. Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программы MS Excel 7.0 (Microsoft, США). Проверку соответствия выборок закону нормального распределения оценивали с помощью критерия Колмогорова–Смирнова в программе OriginPro 8.5 (OriginLab, США). Статистическую значимость определяли с использованием однофакторного дисперсионного анализа, для изучения взаимосвязи параметров определяли коэффициент Пирсона. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для изучения воздействия Dex на морфологические и молекулярные характеристики ткани головного мозга мышей были сформированы экспериментальные группы, в которых животные получали однократную инъекцию физиологического раствора (контрольная группа, $n = 15$) или различные дозы Dex (0,1; 1; 2,5 и 10 мг/кг; в каждой группе 24 животных) и исключались из эксперимента на 1, 3, 7 или 10-е сутки после введения Dex (6 животных на каждую временную точку). Такие временные точки для анализа эффектов Dex были выбраны для того, чтобы изучить отдаленные молекулярные последствия, которые могут быть инициированы однократным введением препарата, несмотря на его быстрое (3–8 ч) выведение из плазмы крови. Дозировки Dex подобраны, согласно данным литературы [18, 19], с целью их максимально возможного соответствия применяемым в клинике (0,1–1 мг/кг) и заведомо более высоким (2,5–10 мг/кг) дозам GC.

Чтобы убедиться в отсутствии очевидной токсичности выбранных дозировок Dex, был проведен гистологический анализ препаратов ткани головного мозга мышей в контрольной и экспериментальных группах. Окрашивание гематоксилином и эозином не выявило выраженных структурных изменений ткани неокортекса у животных, получавших Dex, и лишь при воздействии больших дозировок (2,5 и 10 мг/кг) наблюдались очаговые изменения тинкториальных свойств ядер и цитоплазмы клеточных элементов нервной ткани. В целом эти данные подтвердили отсутствие значительной токсичности выбранных дозировок данного препарата на кору головного мозга мышей.

Влияние дексаметазона на экспрессию и содержание глюкокортикоидного рецептора в ткани головного мозга мышей. Основным молекулярным механизмом передачи сигнала от GC является их связывание с GR, который транслоцируется в клеточное ядро и запускает механизмы трансактивации и транскрепции. Чтобы изучить, насколько однократная доза Dex влияет на экспрессию и/или содержание GR в клетках головного мозга, уровень экспрессии и содержания GR был определен с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени и Вестерн-блоттинга (рис. 1).

Согласно данным ОТ-ПЦР, однократное введение Dex в низких дозировках (0,1 и 1 мг/кг) приводило к кратковременному повышению уровня экспрессии матричной РНК (мРНК) GR в 1,5 раза ($p < 0,05$) на 1–3-и сутки после введения препарата, который возвращался к нормальным показателям к 7–10-м суткам (см. рис. 1а). При этом на белковом уровне GR демонстрировал тенденцию к стабильному дозозависимому повышению (на 30–40 %) во всех изученных временных точках, хотя данные изменения не были статистически достоверны (см. рис. 1б, в).

Однако, помимо содержания GR в клетках, большое значение имеют его распределение по клеточным

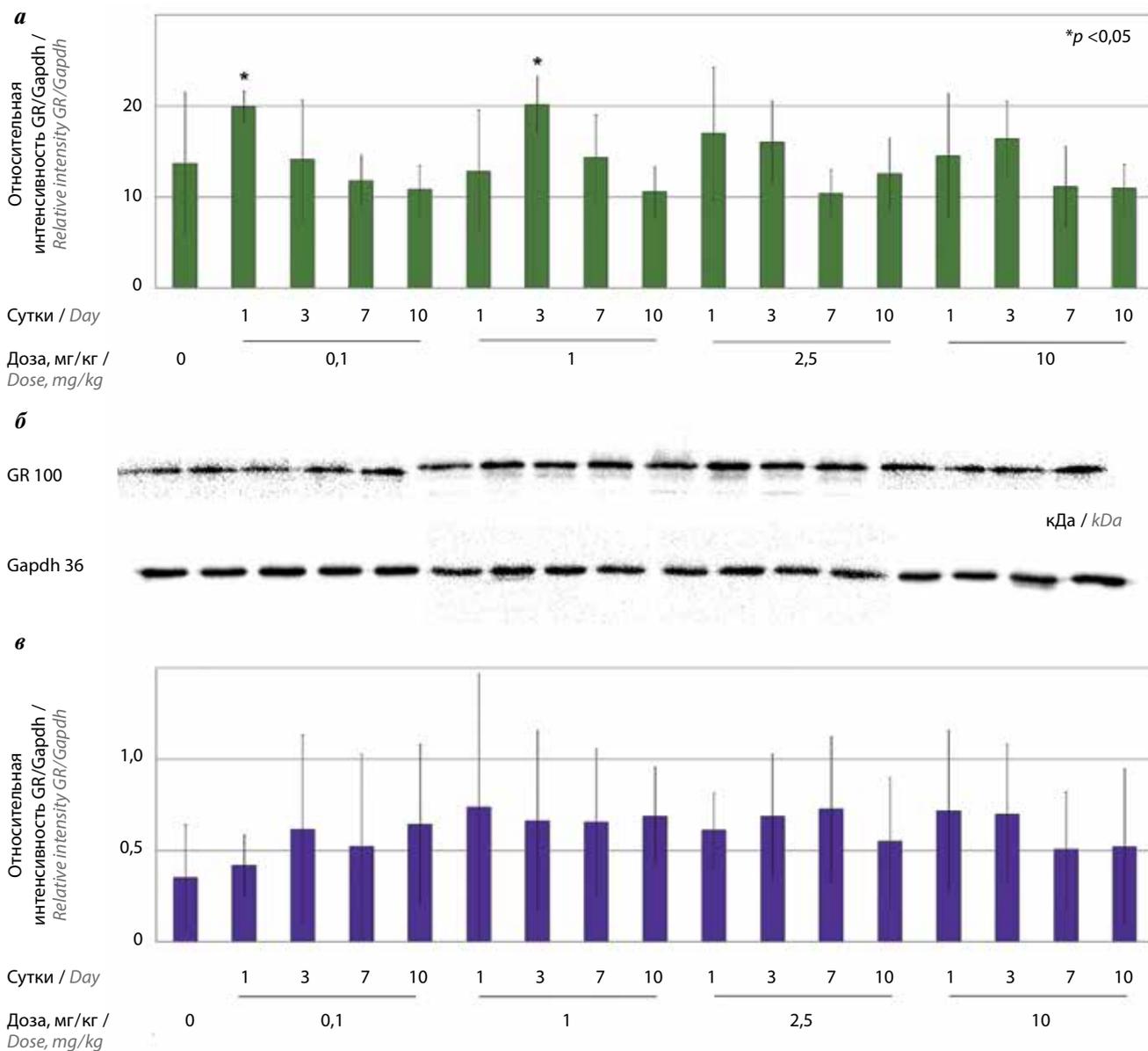


Рис. 1. Экспрессия глюкокортикоидного рецептора (GR) в коре головного мозга под воздействием однократного введения дексаметазона: а – уровень матричной РНК. GR, полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой в реальном времени, нормировка на Gapdh. ANOVA + тест Фишера; б – содержание GR, Вестерн-блоттинг, оригинальные данные; в – полуколичественный анализ Вестерн-блоттинга на GR по отношению к Gapdh. Обсчет – ImageLab 6.0.1, ANOVA + тест Фишера. Контроль – мыши, получавшие физиологический раствор
Fig. 1. Expression of the glucocorticoid receptor (GR) in the cerebral cortex after a single injection of dexamethasone; а – GR matrix RNA level, real-time polymerase chain reaction, normalized for Gapdh. ANOVA + Fisher test; б – GR protein content, Western blotting, original data; в – semiquantitative Western blotting analysis of GR. Calculation – ImageLab 6.0.1, ANOVA + Fisher test. Control – mice treated with saline solution

компартаментам и степень интенсивности окрашивания в клеточных ядрах. Для изучения этого вопроса было проведено ИГХ-окрашивание образцов ткани мозга на GR. В силу того, что согласно результатам Вестерн-блоттинга Дех оказывал влияние на содержание GR только при более высоких дозировках и этот эффект имел отсроченный характер, ИГХ-анализ был проведен для мышей, получавших 2,5 и 10 мг/кг препарата и выведенных из эксперимента через 7 и 10 сут после инъекции. Важно отметить, что во всех группах ядерная экспрессия GR была практически тотальной и различалась только по интенсивности DAB-окрашивания клеточных ядер, которые демонстриро-

вали высокую гетерогенность по этому параметру в каждом препарате мозга. Поэтому для оценки содержания GR мы использовали интегральный показатель, который одновременно учитывал степень интенсивности ядерного окрашивания (от 1 до 3 баллов) и процент клеток, обладающих интенсивностью в 1,2 или 3 балла [20]. Он выражался как фенотип с высоким (>50 % полей зрения в препарате занимали клетки с ядерной экспрессией GR в 3 балла), умеренным (medium – <50 % полей зрения с экспрессией маркера в 3 балла) и низким (low – экспрессия только в 1 и 2 балла) содержанием GR. Распределение животных в зависимости от уровня GR представлено на рис. 2.



Рис. 2. Содержание глюкокортикоидного рецептора (GR) в коре головного мозга мышей до и после однократного введения различных дозировок дексаметазона. Процентное распределение отражает количество животных в экспериментальной группе, относящихся к высокому, умеренному или низкому фенотипам по содержанию GR в коре головного мозга мышей. Экспериментальные животные получали однократную инъекцию дексаметазона в дозах 2,5 и 10 мг/кг. Сроки выведения мышей из эксперимента – 7-е и 10-е сутки

Fig. 2. Glucocorticoid receptor (GR) content in mouse brain before and after administration of various dexamethasone dosages. Percentage of animals belonging to the high, medium and low phenotypes according GR content in mouse brain. Experimental animals received a single dexamethasone injection at a dosage of 2.5 and 10 mg/kg. Animals were sacrificed in 7 and 10 days after injection

Было обнаружено, что однократное введение Dex мышам вызывало изменение фенотипа животных по содержанию GR в ткани головного мозга: при использовании обеих дозировок доля мышей с высокой интенсивностью экспрессии GR уменьшалась, тогда как увеличивалась доля животных, относящихся к группам с низким и умеренным фенотипами. При дозировке 2,5 мг/кг наиболее выраженный эффект Dex проявлялся на 7-е сутки после инъекции, а при дозировке 10 мг/кг – на 10-е сутки.

Таким образом, однократное введение Dex в низких дозировках оказывало кратковременное влияние на уровень мРНК GR (на 1–3-и сутки), в то время как более высокие дозировки вызывали изменение фенотипа мышей по содержанию GR в ткани головного мозга.

Влияние дексаметазона на экспрессию протеогликанов и ферментов биосинтеза гепарансульфата в ткани головного мозга. Для изучения влияния однократного введения Dex на молекулярные характеристики ВКМ ткани головного мозга мышей был определен профиль экспрессии генов, вовлеченных в биосинтез коровых белков основных ПГ и их углеводных цепей ГС. Уровень мРНК гепарансульфат протеогликанов (синдекан-1, синдекан-3, глипикан-1, перлекан), хондроитинсульфат протеогликанов (декорин, бигликан, бревикан, нейрокан, версикан, агрекан, люмикан, CD44, NG2/CSPG4, CSPG5, фосфакан/PPTRZ1) (рис. 3) и генов, вовлеченных в биосинтез углеводных молекул ГС (рис. 4), был выявлен с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени.

Общий уровень транскрипционной активности генов, кодирующих основные ПГ ткани мозга (см. рис. 3а), показал тенденцию к умеренному повышению в ткани головного мозга на 1–3-и сутки после инъекции Dex с последующим возвращением к контрольному уровню к 7–10-м суткам, независимо от дозы. Основной вклад в общий уровень транскрипционной активности изучаемых генов вносило увеличение уровней экспрессии синдекана-3 (+2–3 раза; $p < 0,05$), перлекана (+2–3 раза; $p < 0,05$), фосфакана (+2–3 раза; $p < 0,05$) и нейрокана (+2–3 раза; $p < 0,05$), которые,

таким образом, являются наиболее чувствительными к воздействию Dex (см. рис. 3б). Также было отмечено снижение экспрессии версикана (–2 раза; $p < 0,05$) на 7-е и 10-е сутки почти для всех дозировок препарата.

Введение Dex приводило также к быстрому (на 1–3-и сутки) кратковременному повышению общей транскрипционной активности системы биосинтеза ГС (в 1,5–2 раза) в коре головного мозга мышей (рис. 4а). В основном этому способствовали такие гены, как *Ndst1*, *Glce*, *Hs2st1*, *Hs6st1*, *Sulf1* и *Sulf2*, уровень экспрессии которых повышался в 1,5–2 раза на 1–3-и сутки и возвращался к нормальным значениям к 7–10-м суткам после введения Dex (рис. 4б).

Влияние дексаметазона на экспрессию протеогликанов и ферментов биосинтеза гепарансульфата содержания гликозаминогликанов и степени их сульфатирования в коре головного мозга. Поскольку ПГ являются сложными белково-углеводными молекулами, для функциональной активности которых принципиально важны наличие углеводных цепей ГАГ и степень их модификации, особое внимание было уделено содержанию данных макромолекул в ткани мозга до и после воздействия Dex. Для оценки содержания общих и высокосульфатированных ГАГ в коре левого полушария головного мозга мышей срезы окрашивали альциановым синим с различным pH (2,5 и 1,0, соответственно) (рис. 5).

Однократное введение Dex приводило к быстрому повышению содержания ГАГ в корковых структурах головного мозга мышей уже через сутки (особенно при низких дозировках), которое продолжало дозозависимо усиливаться в течение последующих дней, достигая максимума к 10-м суткам при самой высокой дозировке препарата (10 мг/кг) (рис. 5а). В отличие от общих ГАГ однократное применение Dex в низких дозировках (0,1 и 1 мг/кг) слабо влияло на содержание высокосульфатированных ГАГ в коре головного мозга мышей, хотя наблюдалась тенденция к увеличению интенсивности сигнала (синее окрашивание) в молекулярном слое (рис. 5б). Использование более высоких дозировок этого препарата (2,5 и 10 мг/кг) приводило

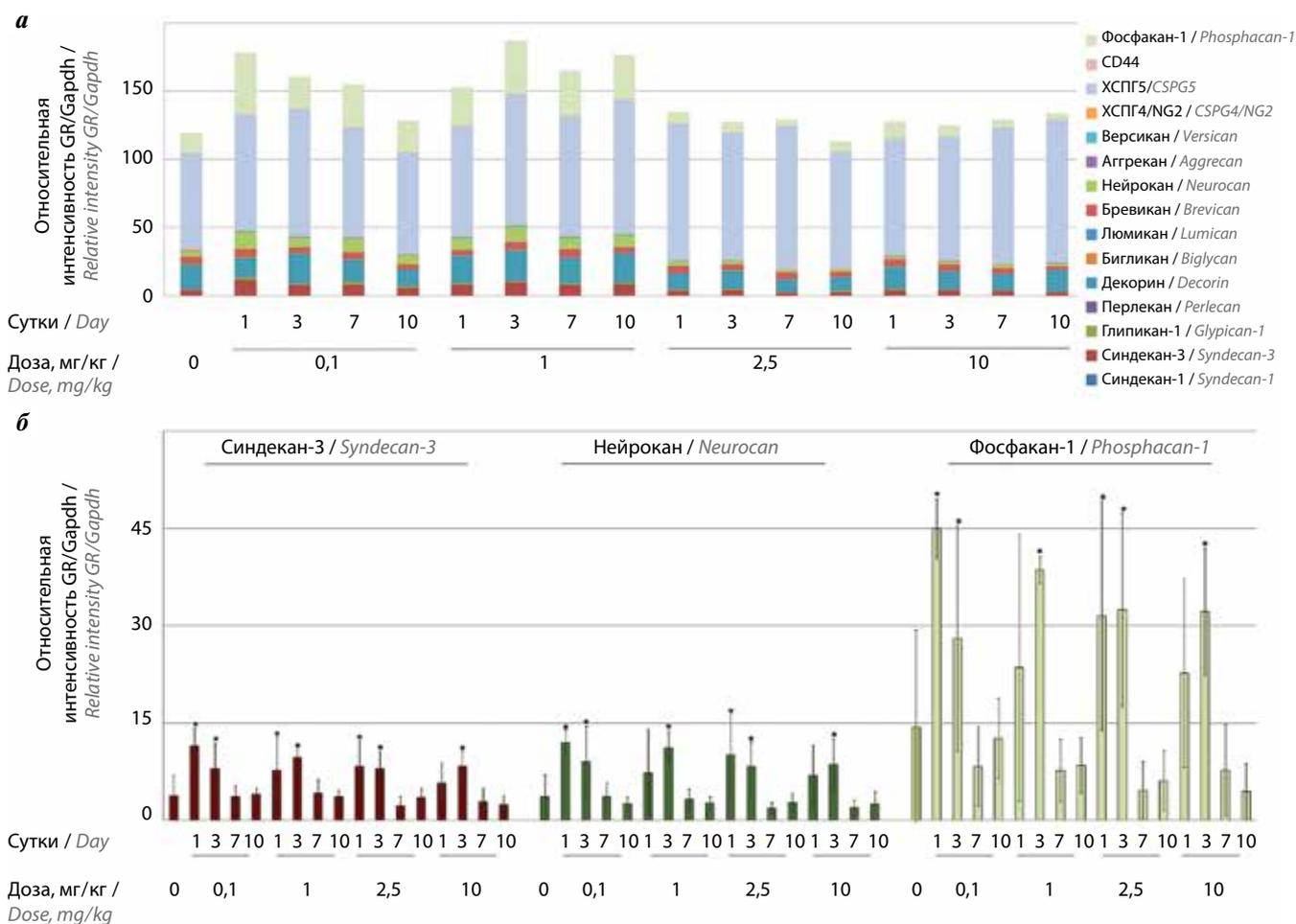


Рис. 3. Относительная экспрессия генов протеогликанов (ПГ) в коре головного мозга под воздействием однократного введения дексаметазона: а – общая транскрипционная активность изучаемых генов, представляющая собой суммарный показатель способности клеток экспрессировать коровые белки основных ПГ; б – уровень матричной РНК индивидуальных ПГ. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени, нормировка на *Gapdh*. Контроль – мыши, получавшие физиологический раствор. ANOVA + тест Фишера. ХСПГ – хондроитинсульфат протеогликан

Fig. 3. Relative expression of proteoglycans (PGs) genes in the cerebral cortex after a single dexamethasone injection: a – a total transcriptional activity of the studied genes is an indicator of the ability of cells to express the core proteins of the main PGs; б – level of matrix RNA of individual PGs. Polymerase chain reaction with reverse transcription normalized to *Gapdh*. Control – mice treated with saline solution. ANOVA + Fisher's test. CSPG5 – chondroitin sulfate proteoglycan

к повышению содержания высокосульфатированных ГАГ на 3–10-е сутки после инъекции, причем если в 1-е сутки сигнал концентрировался в основном в молекулярном слое коры, то в последующие сутки его интенсивность увеличивалась и он все равномернее распределялся в более глубоких ее слоях (к 10-м суткам) (рис. 5б).

Для более детального анализа и определения, какие именно ГАГ вносят основной вклад в значительное повышение содержания общих ГАГ под действием Дех, был использован метод дот-блот анализа с применением специфических антител к углеводным эпитопам ХС и ГС (рис. 6).

Дексаметазон не оказывал заметного влияния на содержание ГС в ткани мозга, хотя при высоких дозировках (2,5 и 10 мг/кг) происходило отсроченное (на 10-е сутки) статистически значимое повышение его уровня, что согласуется с увеличением содержания

общих и высокосульфатированных ГАГ в мозге животных, получавших Дех (см. рис. 6). При этом влияние Дех на ХС имело противоположный характер: приводило к снижению их содержания, которое достигало максимального значения на 7–10-е сутки после введения препарата (рис. 6б). Интересно, что такой эффект оказывали минимальная (0,1 мг/кг) и максимальная (10 мг/кг) дозировки препарата, в то время как промежуточные дозировки не приводили к достоверным изменениям уровня ХС в ткани мозга.

Влияние дексаметазона на корреляцию экспрессии глюкокортикоидного рецептора с экспрессией генов протеогликанов и ферментов биосинтеза гепарансульфатов. Полученные данные свидетельствуют о значительных изменениях в экспрессии различных генов (*GR/Nr3c1*, генов коровых белков ПГ и ферментов биосинтеза ГС) и содержании общих и высокосульфатированных ГАГ. Для выявления возможной взаимосвязи изучаемых

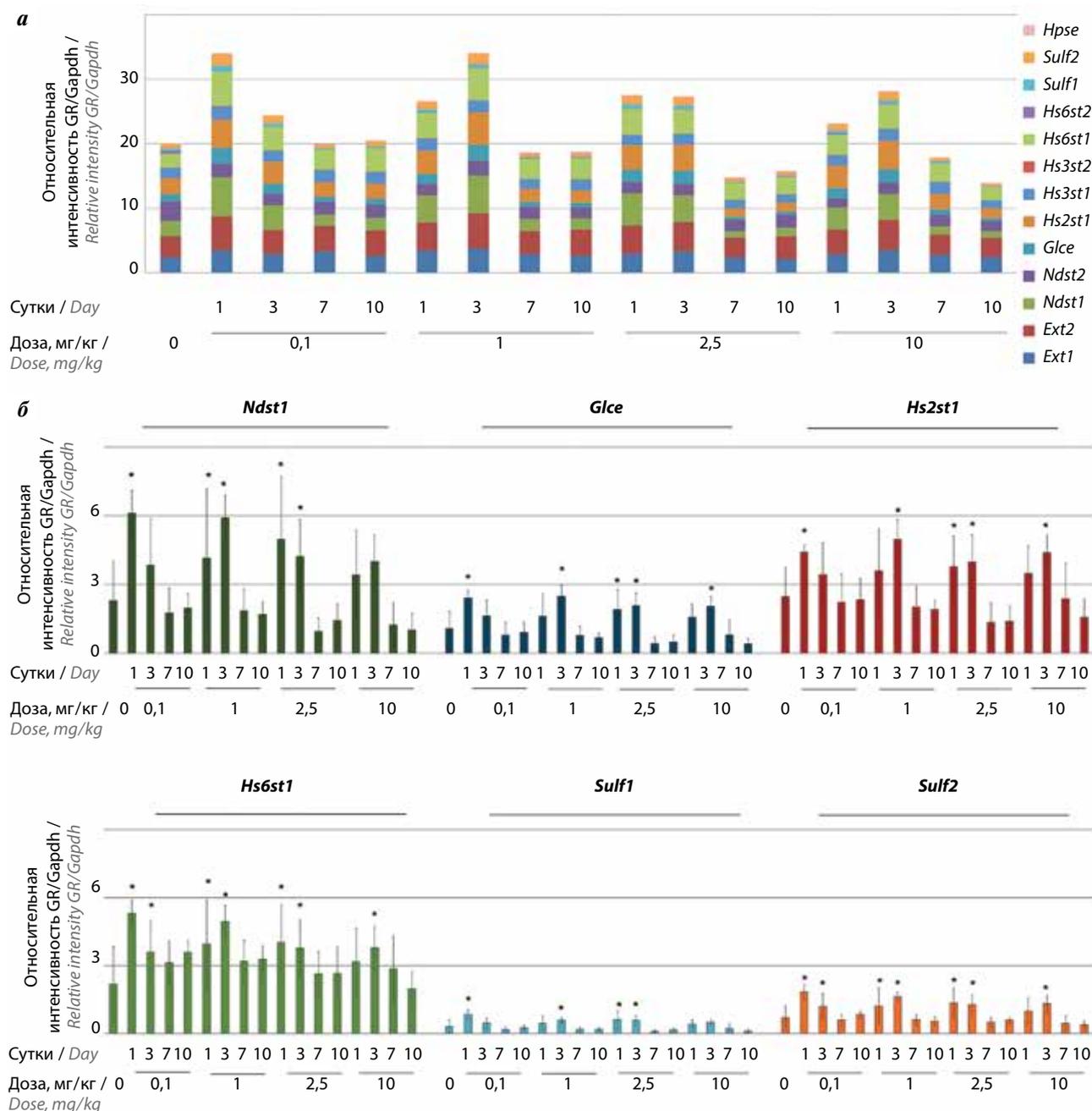


Рис. 4. Относительная экспрессия генов системы биосинтеза гепарансульфатов (ГС) в коре головного мозга после однократного введения дексаметазона: а – общая транскрипционная активность (суммарный показатель уровней экспрессии отдельных генов биосинтеза ГС); б – уровень матричной РНК индивидуальных генов биосинтеза. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени, нормировка на *Gapdh*. Контроль – мыши, получавшие физиологический раствор. ANOVA + тест Фишера

Fig. 4. Relative expression of the heparan sulfate (HS) biosynthesis-involved genes in the cerebral cortex after a single dexamethasone injection; а – total transcriptional activity (a summary measure of the expression levels of individual HS biosynthesis genes); б – level of matrix RNA of individual genes. Real-time polymerase chain reaction with reverse transcription normalized to *Gapdh*. Control – mice treated with saline solution. ANOVA + Fisher's test

параметров был проведен их корреляционный анализ с использованием программы MS Excel 7.0 (рис. 7).

Корреляционный анализ показал, что для нормальной ткани головного мозга характерен высокий уровень корреляции экспрессии GR с большинством генов, вовлеченных в биосинтез ПГ (20 из 28 генов имели коэффициент корреляции с уровнем GR $r = 0,81–0,97$; $p < 0,05$). Однако введение Dex приводило к исчезновению этой корреляционной связи. Данный эффект

зависел от дозировки препарата и усиливался со временем, практически полностью исчезая к 7–10-м суткам после введения Dex (0–2 из 28 генов для дозировок 1–10 мг/кг имели коэффициент корреляции с уровнем GR $r = 0,82–0,87$; $p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование подтвердило, что GR активно экспрессируется в молекулярном, наружном

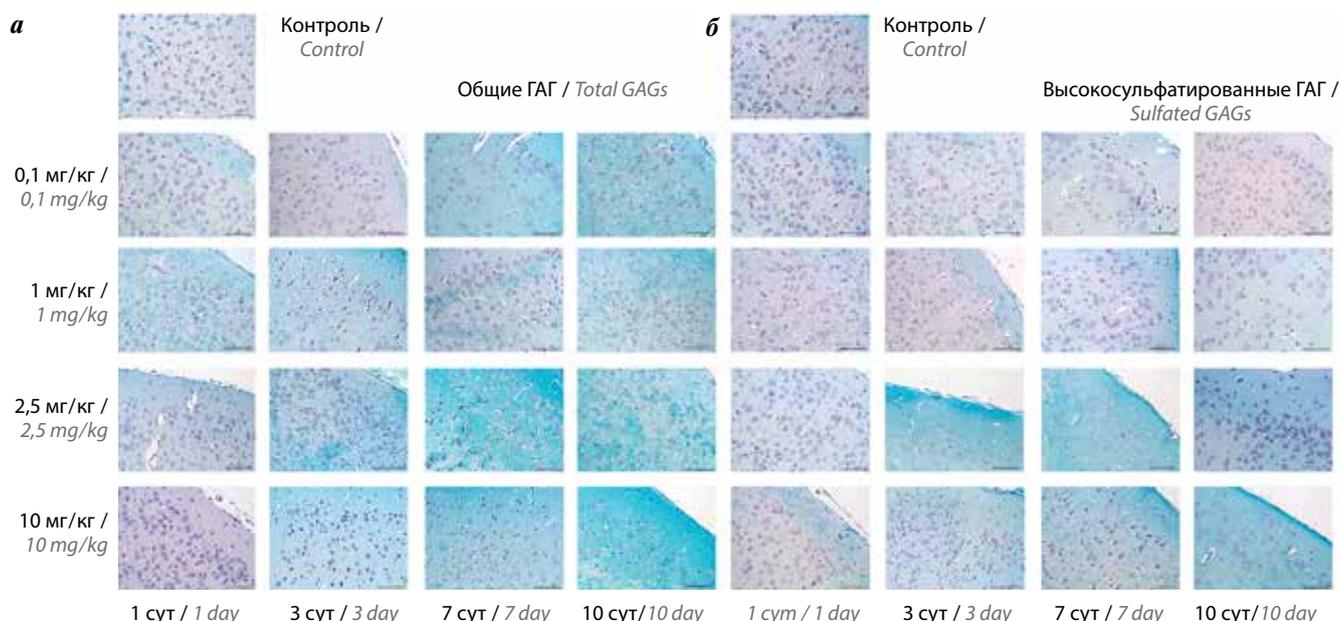


Рис. 5. Содержание общих и высокосульфатированных гликозаминогликанов (ГАГ) в коре головного мозга мышей после однократного введения дексаметазона в дозировке 0,1; 1; 2,5 и 10 мг/кг. Характеристические микрофотографии коры головного мозга мышей каждой группы. Окраска альциановым синим при pH 2,5 (а) и 1,0 (б) соответственно. Сроки выведения животных из эксперимента – 1, 3, 7 и 10-е сутки. $\times 400$
Fig. 5. The content of total glycosaminoglycans (GAGs) in mouse cerebral cortex after a single dexamethasone injection at a dosage of 0,1; 1; 2,5 and 10 mg/kg. Characteristic microphotographs. Alcian blue staining at pH 2.5 (a) and 2.5 (б), respectively. Animals were sacrificed in 7 and 10 days after injection. $\times 400$

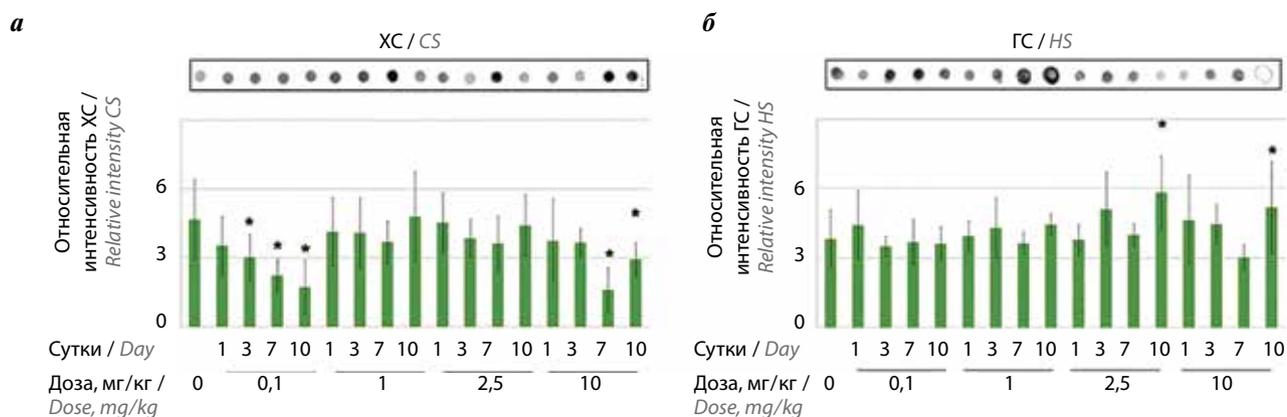


Рис. 6. Содержание углеводных молекул хондроитинсульфатов (XC) и гепарансульфатов (GC) в коре головного мозга мышей после однократного введения дексаметазона: а – оригинальные микрофотографии дот-блот анализа содержания XC и GC; б – полуколичественный анализ содержания гликозаминогликанов, полуколичественный обсчет – ImageLab 6.0.1, ANOVA + тест Фишера
Fig. 6. The content of chondroitin sulfate (CS) and heparin sulfate (HS) carbohydrate molecules in the cerebral cortex of mice after a single dexamethasone injection: а – original microphotographs of dot-blot analysis of CS and HS; б – semiquantitative analysis of glycosaminoglycans content, semiquantitative analysis – ImageLab 6.0.1, ANOVA + Fisher's test

зернистом и пирамидном слоях коры головного мозга мышей, что согласуется с данными литературы о повсеместной экспрессии GR в нервной ткани. Экспрессия GR в сенсорных нейронах может варьировать в зависимости от его подтипа [21]; самый высокий уровень экспрессии имеют нейроны гиппокампа CA1 [22]. Помимо нейронов, все типы глии экспрессируют GR [23], а именно олигодендроглия [24], астроглия [25] и микроглия [26].

Однако в отношении влияния Dex на экспрессию GR однозначное сравнение с данными литературы затруднено. В нашей работе изучены эффекты однократного введения Dex и продемонстрировано, что

экспрессия GR реагирует на этот препарат быстрым кратковременным повышением (на 1–3-и сутки) с возвратом к контрольному уровню на 7–10-е сутки. Многократное подкожное введение Dex (5 мг/кг) крысам в течение 7–28 сут приводит к снижению экспрессии GR α в нейронах гиппокампа как на уровне мРНК, так и на белковом уровне [27]. В модельной системе *ex vivo* обработка органотипических срезов головного мозга крысы Dex (5 мкМ) в течение 3 сут вызывает снижение экспрессии GR в нейронах гиппокампа, что может вносить свой вклад в дегенерацию нейронов и развитие болезни Альцгеймера [28]. В целом результаты нашего исследования дополняют данные литературы,

<i>Sdc1</i>	0,76	0,29	0,91	0,97	0,09	0,86	0,33	0,73	-0,35	0,86	0,80	0,57	0,65	0,50	-0,41	0,55	0,27
<i>Sdc3</i>	0,94	-0,21	0,97	0,92	0,87	0,96	0,00	0,88	-0,16	0,88	0,84	0,89	0,15	0,64	0,68	0,96	0,54
<i>Gpc1</i>	0,94	0,22	0,85	0,79	0,13	0,97	-0,19	0,82	0,58	0,68	0,65	0,81	0,38	0,79	0,73	0,90	0,83
<i>Hspg2</i>	0,94	-0,14	0,76	0,97	0,66	0,93	0,59	0,73	-0,51	0,76	0,72	0,58	0,59	0,77	0,52	0,14	-0,14
<i>Dcn</i>	0,74	-0,42	0,50	0,17	0,85	0,84	0,12	0,47	0,09	0,27	0,02	0,31	0,27	0,06	0,38	-0,10	0,67
<i>Bgn</i>	0,87	-0,02	0,92	0,39	0,59	0,92	0,29	0,41	0,71	0,93	0,81	0,14	0,04	0,79	0,28	0,99	0,56
<i>Lum</i>	0,90	0,57	0,68	0,09	0,27	0,78	-0,47	0,27	0,04	0,89	0,71	0,80	-0,21	0,58	0,73	0,25	0,41
<i>Bcan</i>	0,94	0,16	0,81	0,42	0,37	0,89	0,77	0,80	-0,32	0,83	0,67	0,79	0,09	0,84	-0,16	0,79	0,34
<i>Ncan</i>	0,95	-0,12	0,88	0,93	0,76	0,90	0,74	0,87	0,82	0,81	0,83	0,75	0,55	0,78	0,70	0,90	0,48
<i>Acan</i>	0,75	-0,19	0,80	0,58	0,41	0,89	-0,36	0,69	-0,46	0,50	0,74	-0,57	-0,56	0,54	0,45	0,80	0,09
<i>Vcan</i>	0,81	-0,44	0,89	0,86	0,63	0,98	0,24	0,89	0,80	0,78	0,72	0,66	-0,02	0,74	0,62	0,89	0,48
<i>Cspg4/Ng2</i>	0,70	0,46	0,67	0,46	0,61	0,91	0,18	0,56	0,29	0,87	0,87	0,54	0,49	0,83	0,83	0,48	0,11
<i>Cspg5</i>	0,88	-0,01	0,28	-0,12	0,34	0,92	0,74	0,02	0,47	0,85	0,76	-0,18	0,10	0,68	-0,12	-0,87	-0,67
<i>Cd44</i>	0,92	0,32	0,61	0,83	0,84	0,94	-0,22	0,72	-0,05	0,89	0,52	0,75	0,33	0,95	0,62	0,97	-0,72
<i>Ptprz1</i>	0,83	0,23	0,93	0,92	0,62	0,98	-0,70	0,89	0,48	0,89	0,81	0,49	-0,19	0,86	0,47	0,95	0,54
<i>Ext1</i>	0,94	-0,15	0,89	0,67	0,42	0,91	0,57	0,79	0,45	0,67	0,62	0,67	0,64	0,81	0,58	0,80	0,87
<i>Ext2</i>	0,94	0,54	0,99	0,91	0,88	0,94	0,88	0,69	-0,48	0,90	0,87	0,61	-0,11	0,82	0,48	0,90	0,62
<i>Ndst1</i>	0,97	-0,28	0,96	0,90	0,39	0,97	0,55	0,89	-0,16	0,79	0,89	0,82	0,00	0,81	0,70	0,98	0,57
<i>Ndst2</i>	0,89	0,05	0,95	0,72	0,88	0,91	0,88	0,40	0,10	0,79	0,93	-0,30	-0,18	0,71	0,49	0,86	-0,43
<i>Glce</i>	0,94	0,92	0,93	0,88	0,58	0,97	0,86	0,89	0,56	0,85	0,93	0,54	-0,01	0,89	0,62	0,97	0,53
<i>Hs2st1</i>	0,97	0,00	0,99	0,92	0,63	0,92	0,48	0,92	0,62	0,82	0,89	0,62	0,30	0,85	0,58	0,98	0,70
<i>Hs3st1</i>	0,63	0,24	0,42	0,31	0,78	0,44	0,61	-0,03	0,25	0,50	0,41	0,40	-0,76	0,05	-0,20	0,39	-0,77
<i>Hs3st2</i>	0,21	0,08	0,76	0,52	0,24	0,80	0,82	0,09	0,25	0,36	0,63	0,28	0,45	0,40	0,76	-0,67	-0,64
<i>Hs6st1</i>	0,94	0,54	0,92	0,88	0,84	0,97	0,71	0,78	0,00	0,97	0,91	0,53	-0,13	0,85	0,56	0,84	0,52
<i>Hs6st2</i>	-0,34	0,88	-0,53	0,38	0,68	0,78	0,58	-0,86	0,12	0,70	0,74	0,60	0,55	-0,25	0,06	0,43	0,20
<i>Sulf1</i>	0,91	0,82	0,91	0,79	0,64	0,95	0,62	0,88	0,22	0,69	0,71	0,59	-0,25	0,91	-0,11	0,94	0,65
<i>Sulf2</i>	0,94	-0,65	0,96	0,82	0,65	0,98	0,99	0,97	0,19	0,86	0,79	0,26	-0,09	0,72	0,61	0,91	0,19
<i>Hpse</i>	0,38	0,20	0,38	0,79	0,43	0,11	0,99	0,63	-0,17	0,90	0,68	0,21	0,20	-0,01	0,39	-0,23	0,19

Сутки / Day

Доза, мг/кг /
Dose, mg/kg

	1	3	7	10	1	3	7	10	1	3	7	10	1	3	7	10
	0,1				1				2,5				10			

Рис. 7. Корреляционный анализ экспрессии матричной РНК глюкокортикоидного рецептора (GR) с уровнем матричной РНК генов коровых белков протеогликанов и ферментов биосинтеза гепарансульфатов по всем животным внутри группы. Цифровой показатель – коэффициент корреляции Пирсона. Зеленым цветом выделены статистически значимые различия ($p < 0,05$)

Fig. 7. Correlation analysis of glucocorticoid receptor (GR) matrix RNA level with matrix RNA levels of all studied proteoglycans and heparin sulfate biosynthesis-related genes in all animals within the group. The numerical indicator is the Pearson correlation coefficient, statistically significant differences are highlighted in green color ($p < 0.05$)

которые в основном получены для многократного применения GC.

Важной частью этого исследования является изучение влияния GC (Dex) на транскрипционную активность генов, вовлеченных в биосинтез ПГ. Нами было показано, что однократное введение Dex приводит к быстрому (на 1–3-и сутки) повышению в 1,5–3 раза уровня экспрессии генов некоторых ПГ (синдекан-3/*Sdc3*, нейрокан/*Ncan* и фосфакан/*Ptprz1*) ферментов биосинтеза ГС (*Ndst1*, *Glce*, *Hs2st1*, *Hs6st1*, *Sulf1*, *Sulf2*), которое было непродолжительным: на 7–10-е сутки показатели возвращались к контрольному уровню. К сожалению, данных литературы, с которыми можно провести сравнение, очень немного, и они выполнены на различных экспериментальных моделях с использованием разных дозировок GC и в различные временные периоды после введения GC. Так, в работе W.L. Liu и соавт. было показано, что в модели острого повреждения спинного мозга *in vivo* однократное введение крысам метилпреднизолона в дозировке 30 мг/кг снижало экспрессию нейрокана

через 24 ч после инъекции, а обработка первичных культур астроцитов метилпреднизолоном в концентрации 10 и 50 мкМ *in vitro* уменьшала экспрессию нейрокана и фосфакана [6]. Подавление экспрессии нейрокана было опосредовано GR [6], в промоторной области которого имеются глюкокортикоид-респонсивные элементы [14]. Долговременное многократное введение Dex мышам снижало уровень экспрессии гепарансульфат протеогликанов агрина в коре головного мозга мышей [7]. Обработка Dex органотипических срезов головного мозга крысы в модельной системе *ex vivo* показала значительную дозозависимость его влияния: низкие дозировки препарата (0,01–0,50 мкМ) увеличивали экспрессию глипикана-1 и версикана (в 5–10 раз), в то время как высокие (50–200 мкМ) – подавляли экспрессию синдекана и бигликана (в 3–5 раз) [8]. Однократное введение Dex взрослым крысам (в дозировке 2,5 или 5 мг/кг) дозозависимо увеличивало транскрипционную активность ПГ-кодирующих генов в гиппокампе (но не в коре головного мозга) в основном за счет повышения уровней экспрессии

синдекана-1, глипикана-1, бревикана, хондроитин-сульфат протеогликана 4/NG2, декорина и люмикана (в 2–7 раз) через 24 ч после инъекции [8]. Многократное введение Dex мышам SCID в дозировке 1 мг/кг приводило к увеличению уровней экспрессии глипикана-1, синдекана-1 и версикана (3–4,3 раза) в подкорковых структурах головного мозга мышей [9]. В целом представленные в настоящей работе результаты согласуются с данными литературы и дополняют их, демонстрируя способность GC влиять на ПГ в ткани головного мозга. Также большое значение имеют результаты, свидетельствующие о возможности GC воздействовать на транскрипционную активность системы биосинтеза углеводов молекул GC, что ранее не исследовалось.

Особый интерес вызывает тот факт, что даже однократное применение Dex вызывает отсроченное дозозависимое увеличение содержания общих и высокосульфатированных ГАГ в ткани головного мозга, а также повышение уровня GC и снижение уровня ХС, что свидетельствует об изменении соотношения различных классов ГАГ. Имеющиеся данные по этому вопросу очень немногочисленны: повышение содержания GC в глиобластоме ассоциировано с плохим прогнозом течения заболевания и низкими показателями выживаемости пациентов [29], а локальное введение Dex на нитроцеллюлозном тампоне в головной мозг крысы приводит к уменьшению в 2,5 раза содержания ХС в ткани мозга через 1 нед после имплантации тампона [30]. При этом в модели органотипических срезов головного мозга крысы *ex vivo* обнаружена противоположная тенденция: обработка срезов Dex (10 нМ–200 мкМ) в течение 24 ч приводила к снижению содержания GC в головном мозге (в 2–2,5 раза), а также к повышению уровня ХС в гиппокампе (в 2 раза) и его снижению в коре головного мозга (в 2–2,5 раза) [8].

Многократное введение Dex мышам SCID в дозировке 1 мг/кг также вызывало снижение содержания ХС в подкорковых структурах головного мозга мышей [9].

В целом приведенные данные свидетельствуют о принципиальной способности GC влиять на гликозилированные компоненты ткани головного мозга на уровне как экспрессии их коровых белков, так и биосинтеза их углеводов цепей. Повышение содержания ГАГ и изменение соотношения их различных классов (одновременное увеличение уровня GC и снижение уровня ХС) могут привести к формированию специфических внеклеточных ниш, способствующих развитию различных патологических процессов в головном мозге. Согласно пилотным данным корреляционного анализа, изменения экспрессии генов, кодирующих коровые белки ПГ и ферменты биосинтеза ГАГ, могут осуществляться через GR, что позволяет предложить новый молекулярный механизм регуляции экспрессии ПГ в клетках и тканях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом полученные данные свидетельствуют о том, что даже однократное применение Dex оказывает влияние на молекулярные характеристики ткани головного мозга мышей, в частности гликозилированные макромолекулы ВКМ. Если воздействие этого препарата на экспрессию коровых белков ПГ носит кратковременный характер и быстро возвращается к нормальным показателям, то изменения в содержании общих и высокосульфатированных ГАГ имеют более стабильный характер, усиливаясь к 7–10-м суткам после введения Dex экспериментальным животным. Такие изменения могут вносить значительный вклад в структурно-функциональные характеристики ВКМ головного мозга и способствовать его трансформации в патологическое или проопухоловое микроокружение.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Dubinski D., Hattingen E., Senft C. et al. Controversial roles for dexamethasone in glioblastoma - Opportunities for novel vascular targeting therapies. *J Cereb Blood Flow Metab* 2019;39(8):1460–8. DOI: 10.1177/0271678X19859847
- Liston C., Gan W.B. Glucocorticoids are critical regulators of dendritic spine development and plasticity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(38):16074–9. DOI: 10.1073/pnas.1110444108
- Gray J.D., Kogan J.F., Marrocco J. et al. Genomic and epigenomic mechanisms of glucocorticoids in the brain. *Nat Rev Endocrinol* 2017;13(11):661–73. DOI: 10.1038/nrendo.2017.97
- Nicholson C., Hrabětová S. Brain extracellular space: the final frontier of neuroscience. *Biophys J* 2017;113(10):2133–42. DOI: 10.1016/j.bpj.2017.06.052
- Strokotova A.V., Grigorieva E.V. Glucocorticoid effects on proteoglycans and glycosaminoglycans. *Int J Mol Sci* 2022;23(24):15678. DOI: 10.3390/ijms232415678
- Liu W.L., Lee Y.H., Tsai S.Y. et al. Methylprednisolone inhibits the expression of glial fibrillary acidic protein and chondroitin sulfate proteoglycans in reactivated astrocytes. *Glia* 2008;56(13):1390–400. DOI: 10.1002/glia.20706
- Wei F., Song J., Zhang C. et al. Chronic stress impairs the aquaporin-4-mediated glymphatic transport through glucocorticoid signaling. *Psychopharmacology (Berl)* 2019;236(4):1367–84. DOI: 10.1007/s00213-018-5147-6
- Tsidulko A.Y., Bezier C., de La Bourdonnaye G. et al. Conventional anti-glioblastoma chemotherapy affects proteoglycan composition of brain extracellular matrix in rat experimental model *in vivo*. *Front Pharmacol* 2018;2(9):1104. DOI: 10.3389/fphar.2018.01104
- Tsidulko A.Y., Shevelev O.B., Khotskina A.S. et al. Chemotherapy-induced degradation of glycosylated components of the brain extracellular matrix promotes glioblastoma relapse development in an animal model. *Front Oncol* 2021;19(11):713139. DOI: 10.3389/fonc.2021.713139

10. Timmermans S., Souffriau J., Libert C. A General introduction to glucocorticoid biology. *Front Immunol* 2019;4(10):1545. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01545
11. Weikum E.R., Knuesel M.T., Ortlund E.A. et al. Glucocorticoid receptor control of transcription: precision and plasticity via allostery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017;18(3):159–74. DOI: 10.1038/nrm.2016.152
12. Eklund K.K., Humphries D.E., Xia Z. et al. Glucocorticoids inhibit the cytokine-induced proliferation of mast cells, the high affinity IgE receptor-mediated expression of TNF-alpha, and the IL-10-induced expression of chymases. *J Immunol* 1997;158(9):4373–80.
13. Watanabe H., Gao L., Sugiyama S. et al. Mouse aggrecan, a large cartilage proteoglycan: protein sequence, gene structure and promoter sequence. *Biochem J* 1995;308(Pt 2):433–40. DOI: 10.1042/bj308043
14. Rauch U., Grimpe B., Kulbe G. et al. Structure and chromosomal localization of the mouse neurocan gene. *Genomics* 1995;28(3):405–10. DOI: 10.1006/geno.1995.1168
15. Benad-Mehner P., Thiele S., Rachner T.D. et al. Targeting syndecan-1 in breast cancer inhibits osteoclast functions through up-regulation of osteoprotegerin. *J Bone Oncol* 2013;3(1):18–24. DOI: 10.1016/j.jbo.2013.11.001
16. Derfoul A., Perkins G.L., Hall D.J. et al. Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes. *Stem Cells* 2006;24(6):1487–95. DOI: 10.1634/stemcells.2005-0415
17. Xu C., Sun M., Zhang X. et al. Activation of glucocorticoid receptor inhibits the stem-like properties of bladder cancer via inactivating the β -catenin pathway. *Front Oncol* 2020;10:1332. DOI: 10.3389/fonc.2020.01332
18. Yao Y.Y., Liu D.M., Xu D.F. et al. Memory and learning impairment induced by dexamethasone in senescent but not young mice. *Eur J Pharmacol* 2007;574(1):20–8. DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.07.021
19. Drakulić D., Veličković N., Stanojlović M. et al. Low-dose dexamethasone treatment promotes the pro-survival signalling pathway in the adult rat prefrontal cortex. *J Neuroendocrinol* 2013;25(7):605–16. DOI: 10.1111/jne.12037
20. Franceschi S., Lessi F., Morelli M. et al. Sedoheptulose kinase SHPK expression in glioblastoma: emerging role of the nonoxidative pentose phosphate pathway in tumor proliferation. *Int J Mol Sci* 2022;23(11):5978. DOI: 10.3390/ijms23115978
21. Shaqura M., Li X., Al-Khrasani M. et al. Membrane-bound glucocorticoid receptors on distinct nociceptive neurons as potential targets for pain control through rapid non-genomic effects. *Neuropharmacology* 2016;111:1–13. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2016.08.019
22. Herman J.P., Patel P.D., Akil H. et al. Localization and regulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor messenger RNAs in the hippocampal formation of the rat. *Mol Endocrinol* 1989;3(11):1886–94. DOI: 10.1210/mend-3-11-1886
23. Vielkind U., Walencewicz A., Levine J.M. et al. Type-II glucocorticoid receptors are expressed in oligodendrocytes and astrocytes. *J Neurosci Res* 1990;27(3):360–73. DOI: 10.1002/jnr.490270315
24. Van Gemert N.G., Meijer O.C., Morsink M.C. et al. Effect of brief corticosterone administration on SGK1 and RGS4 mRNA expression in rat hippocampus. *Stress* 2006;9(3):165–70. DOI: 10.1080/10253890600966169
25. Piechota M., Korostynski M., Golda S. et al. Transcriptional signatures of steroidhormones in the striatal neurons and astrocytes. *BMC Neurosci* 2017;18(1):37. DOI: 10.1186/s12868-017-0352-5
26. Tentillier N., Etzerodt A., Olesen M.N. et al. Anti-inflammatory modulation of microglia via CD163-targeted glucocorticoids protects dopaminergic neurons in the 6-OHDA Parkinson's disease model. *J Neurosci* 2016;36(36):9375–90. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1636-16.2016
27. Hu W., Zhang Y., Wu W. et al. Chronic glucocorticoids exposure enhances neurodegeneration in the frontal cortex and hippocampus via NLRP-1 inflammasome activation in male mice. *Brain Behav Immun* 2016;52:58–70. DOI: 10.1016/j.bbi.2015.09.019
28. Zhang B., Zhang Y., Xu T. et al. Chronic dexamethasone treatment results in hippocampal neurons injury due to activate NLRP1 inflammasome *in vitro*. *Int Immunopharmacol* 2017;49:222–30. DOI: 10.1016/j.intimp.2017.05.039
29. Kazanskaya G.M., Tsidulko A.Y., Volkov A.M. et al. Heparan sulfate accumulation and perlecan/HSPG2 up-regulation in tumour tissue predict low relapse-free survival for patients with glioblastoma. *Histochem Cell Biol* 2018;149(3):235–44. DOI: 10.1007/s00418-018-1631-7
30. Zhong Y., Bellamkonda R.V. Dexamethasone-coated neural probes elicit attenuated inflammatory response and neuronal loss compared to uncoated neural probes. *Brain Res* 2007;1148:15–27. DOI: 10.1016/j.brainres.2007.02.024

Благодарность

Авторы выражают благодарность Л.В. Аксеновой за помощь в проведении Вестерн-блоттинга и дот-блот анализа, Т.И. Котюшевой за помощь в иммуногистохимическом окрашивании. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Протеомный анализ» (ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации), поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

Acknowledgment

The authors express their gratitude to L.V. Aksenova for her help in carrying out Western blotting and dot-blot analysis, T.I. Kotyusheva for her help in immunohistochemical staining. The work was performed using the equipment of the CCP “Proteomic Analysis” (Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Ministry of Science and Higher Education of Russia), supported by funding from the Ministry of Education and Science of Russia (Agreement No. 075-15-2021-691).

Вклад авторов

С.Д. Аладьев, Д.К. Соколов, М.О. Политко, А.Ю. Цидулко, А.И. Шахмурадова, Г.М. Казанская: выполнение экспериментов, статистическая обработка данных, написание текста статьи, редактирование;

А.В. Стротова, Э.В. Григорьева: разработка концепции и дизайна исследования, написание текста статьи, анализ и интерпретация результатов;

С.В. Айдагулова, А.М. Волков, Е.Э. Кливер: анализ полученных данных, научное консультирование.

Authors' contribution

S.D. Aladev, D.K. Sokolov, M.O. Politko, A.Y. Tsidulko, A.I. Shakhmuradova, G.M. Kazanskaya: performing experiments, statistical data processing, article writing, editing;

A.V. Strokotova, E.V. Grigorieva: development of the concept and design of the study, article writing, analysis and interpretation of the results;

S.V. Aidagulova, A.M. Volkov, E.E. Kliver: analysis of the obtained data, scientific consulting.

ORCID авторов / ORCID of authors

С.Д. Аладьев / S.D. Aladev: <https://orcid.org/0000-0001-5883-4831>;
К.Д. Соколов / D.K. Sokolov: <https://orcid.org/0000-0002-4145-5277>
А.В. Строкотова / A.V. Strokotova: <https://orcid.org/0000-0001-5336-8552>
Г.М. Казанская / G.M. Kazanskaya: <https://orcid.org/0000-0003-2598-1805>
А.М. Волков / A.M. Volkov: <https://orcid.org/0000-0001-9697-7091>
Е.Э. Кливер / E.E. Kliver: <https://orcid.org/0000-0002-3915-3616>
М.О. Политко / M.O. Politko: <https://orcid.org/0000-0002-9650-9877>
А.Ю. Цидулко / A.Y. Tsidulko: <https://orcid.org/0000-0002-1056-020X>
С.В. Айдагулова / S.V. Aidagulova: <https://orcid.org/0000-0001-7124-1969>
Э.В. Григорьева / E.V. Grigorieva: <https://orcid.org/0000-0003-2457-9179>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-15-00285).
Funding. The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (grant No. 21-15-00285).

Соблюдение правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

Compliance with principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of Institute of Molecular Biology and Biophysics of Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Ministry of Science and Higher Education of Russia.

The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.