

Пискунов Алексей Константинович

**Нейровоспаление при интероцептивном и экстероцептивном стрессе:  
селективная чувствительность гиппокампа**

Специальность  
03.03.01 – физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва 2011

Работа выполнена в лаборатории функциональной биохимии нервной системы (заведующая лабораторией – доктор биологических наук, профессор Наталия Валерьевна Гуляева) Учреждения Российской академии наук Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН (директор - доктор биологических наук, профессор Павел Милославович Балабан).

**Научный руководитель:**

Доктор биологических наук, профессор Наталия Валерьевна Гуляева

**Официальные оппоненты:**

Доктор биологических наук Ара Саакович Базян

Доктор медицинских наук, профессор Владимир Вячеславович Шерстнев

**Ведущая организация** – Биологический Факультет Московского

Государственного Университета им М.В. Ломоносова

Защита состоится 5 октября 2011 г. в 14<sup>00</sup> ч на заседании диссертационного совета Д 002.044.01 при Учреждении Российской академии наук Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН по адресу: 117485, Москва, ул. Бутлерова, д. 5а.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН.

Автореферат разослан «    » августа 2011 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Доктор биологических наук, профессор

В.В. Раевский

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

В последние годы нейровоспаление является предметом многочисленных исследований в связи с его участием в качестве ключевого звена патогенеза разнообразных заболеваний ЦНС, в том числе, нейродегенеративных (Lucas et al., 2006). Медиаторы нейровоспаления могут вызвать гибель нейронов и клеток глии (Harry et al., 2008). Этот факт послужил стимулом для разработки терапевтических стратегий, основанных на подавлении воспалительного ответа мозга при различных патологиях ЦНС. Тем не менее, ингибирование активности провоспалительных цитокинов в клинических испытаниях (Alderson, Roberts, 2005; The Lenccept Group, 1999) и в эксперименте (Scherbel et al., 1999; Mason et al., 2001) привело к ухудшению течения и, в особенности, исхода заболеваний ЦНС, связанных с нейровоспалением. Эти результаты свидетельствуют о том, что медиаторы нейровоспаления реализуют и функции восстановления/репарации ткани мозга в ответ на повреждение. В связи с этим актуальным является изучение адаптивных функций нейровоспаления, а также исследование механизмов срыва регуляции воспалительного ответа в мозге. К сожалению, эти аспекты остаются мало исследованными. Поэтому одними из основных задач настоящей работы было выявление потенциальных защитных механизмов нейровоспаления, а также исследование регуляции воспалительного ответа в нервной ткани.

Активация микроглии и инициация воспалительного ответа может быть вызвана разнообразными стимулами: механическим повреждением, ишемией, гипоксией, аномальной активностью синапса (Balabanov et al., 2001; Brunn et al., 2005; Munhoz et al., 2008). Соответственно, нейровоспаление наблюдается практически при всех заболеваниях ЦНС и даже, вероятно, в условиях физиологической нормы (Wake et al., 2009). Нейровоспаление удается обнаружить в любой структуре мозга (Glass et al., 2010). Однако систематического анализа регионарных отличий воспалительного ответа мозга до сих пор не проводилось, поскольку в отдельных работах нейровоспаление изучалось только в определенных

---

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:** ГК – глюкокортикоиды; ГИФ-1 – фактор-1 индуцируемый гипоксией; ИЛ – интерлейкин; ; ИФР-1 – инсулиноподобный ростовой фактор-1; КС – кортикостерон; ЛПС – липополисахарид; ФНО – фактор некроза опухоли; Эпо – эритропоэтин; Эпо-Рц – рецептор эритропоэтина

структурах, в зависимости от того, с какой физиологической ситуацией или патологией имели дело исследователи. В то же время, сравнительный анализ особенностей протекания процессов воспаления в различных отделах мозга мог бы объяснить, в частности, избирательное повреждение тех или иных церебральных структур при ряде патологий ЦНС.

Одним из наиболее известных примеров избирательной чувствительности отделов мозга к повреждающим воздействиям является селективная чувствительность гиппокампа, описанная как в эксперименте, так и в клинике. Селективные изменения в гиппокампе наблюдаются при стрессовых расстройствах, при различных формах депрессии и других патологических состояниях ЦНС (McEwen and Sapolsky, 1995; Magarinos and McEwen, 1995; McEwen, 1997). Поскольку нарушение функций гиппокампа влечет за собой неблагоприятные изменения в когнитивной, эмоциональной, мотивационной и других сферах ВВД, крайне важны исследования механизмов, лежащих в основе высокой чувствительности этого отдела мозга к повреждающим воздействиям.

Можно предположить, что селективная чувствительность гиппокампа связана с особенностями протекания в нём реакций нейровоспаления. Будучи изначально адаптивной реакцией в ответ на повреждающий стимул, процессы нейровоспаления в гиппокампе, вероятно, могут становиться неконтролируемыми, приводя к гиперпродукции медиаторов, вызывающих гибель нейронов. Поэтому в рамках данной работы была поставлена задача выяснить специфику воспалительных реакций в гиппокампе в сравнении с другими отделами мозга.

Обращает на себя внимание тот факт, что патологии, связанные с селективной чувствительностью гиппокампа, так или иначе ассоциированы со стрессом. Хорошо известно, что хронический стресс провоцирует развитие и проявление депрессий, алкоголизма, тревожных расстройств и т.д. (Esch et al., 2002), хотя молекулярные механизмы этой связи остаются практически неизученными. С другой стороны, известно, что стресс вызывает воспалительный ответ мозга (Munhoz et al., 2008). Это дает основание предположить, что постстрессорное нейровоспаление в гиппокампе может служить механизмом, связывающим хронический стресс и целый ряд патологий ЦНС. Поэтому в данной работе мы исследовали процессы нейровоспаления как на фармакологической модели, так и при эмоционально-

болевым стрессе, а также оценили возможные долговременные изменения в гиппокампе и новой коре в результате перенесенного стресса.

Наиболее вероятно, что бóльшая подверженность развитию нейровоспаления может быть связана, прежде всего, с недостаточностью контролирующих механизмов. Как известно, одними из основных медиаторов, контролирующих воспалительный ответ, являются глюкокортикоиды. Однако реализация эффектов системы глюкокортикоидов в мозге в связи с нейровоспалением пока исследована крайне слабо. По этим причинам, а также в связи с тем, что были использованы модели стресса, в рамках данной работы было изучено участие системы глюкокортикоидов в регуляции нейровоспаления в новой коре и в гиппокампе.

#### **Цель работы и основные задачи исследования.**

Основной целью работы являлся регионарный анализ воспалительного ответа мозга в результате различных видов стресса и исследование участия глюкокортикоидов в регуляции вызванного стрессом нейровоспаления.

Для этого были поставлены следующие задачи:

1. Сравнить характеристики воспалительного ответа в гиппокампе и новой коре крыс (экспрессию про- и противовоспалительных цитокинов, цитопротекторных белков и их рецепторов, транскрипционных регуляторов) при интероцептивном стрессе (моделируемом путем системного введения ЛПС в дозе 5 мг/кг) в динамике.
2. Сравнить характеристики воспалительного ответа в гиппокампе и новой коре крыс (экспрессию про- и противовоспалительных цитокинов, цитопротекторных белков и их рецепторов, транскрипционных регуляторов) в модели острого и хронического эмоционально-болевого стресса.
3. Сравнить динамику воспалительного ответа в неокортексе и гиппокампе крыс, а также выявить возможные долговременные изменения в экспрессии исследуемых белков при различных видах стресса.

В моделях экстеро- и интероцептивного стресса изучить параметры, характеризующие системное (в крови) и локальное (в новой коре и гиппокампе) состояние системы глюкокортикоидов (концентрацию кортикостерона, уровни экспрессии его рецепторов и ряда регулируемых ими генов).

### **Научная новизна**

Впервые проведен систематический анализ регионарных различий воспалительного ответа мозга в условиях интероцептивного и экстероцептивного стресса. Выявлена селективная чувствительность гиппокампа к процессам нейровоспаления. Показано, что высокая подверженность гиппокампа процессам нейровоспаления проявляется не только при эмоционально-болевым, но и при интероцептивном стрессе, который является более общей моделью нейровоспаления. Получены данные о различной временной динамике экспрессии про- и противовоспалительных цитокинов в отделах мозга крыс при интеро- и экстероцептивном стрессе. Впервые разработаны подходы к идентификации точки срыва адаптивного механизма нейровоспаления.

Впервые показаны согласованная экспрессия адаптивных белков, регулируемых ГИФ-1, и провоспалительных цитокинов, а также согласованное изменение экспрессии ламинина-1 $\beta$  и провоспалительных цитокинов. Таким образом, выявлены новые, потенциально цитопротекторные механизмы нейровоспаления

Впервые показано, что усиление нейровоспаления в гиппокампе сопровождается усиленной и селективной доставкой глюкокортикоидов, при этом мозговые уровни гормона становятся независимыми от системных. Показано, что нейровоспаление в гиппокампе сопровождается признаками изменения трансдукции сигнала глюкокортикоидов.

### **Теоретическая ценность и практическая значимость**

Проведенные исследования показали, что гиппокамп в гораздо большей степени, чем новая кора, подвержен развитию нейровоспаления, которое, по всей видимости, со временем приобретает в нём дезадаптивную направленность. Таким образом, в основе известного феномена избирательной чувствительности гиппокампа к повреждающим воздействиям может лежать срыв регуляции нейровоспалительных процессов. Эти данные имеют важнейшее значение для изучения и терапии целого ряда заболеваний ЦНС и когнитивных нарушений, связанных с изменениями в гиппокампе. Поскольку было показано, что процессы нейровоспаления продолжают долгое время после прекращения хронического воздействия стрессоров, полученные результаты также обнаруживают новый

механизм, связывающий стресс и развитие патологий ЦНС сопровождающихся нарушением функций гиппокампа.

Полученные в ходе работы результаты показали, что на ранних этапах нейровоспаления реализуются цитопротекторные механизмы. Этот факт служит важным экспериментальным доказательством изначально адаптивной направленности реакций нейровоспаления и дополнительным обоснованием актуальности изучения внутренних механизмов регуляции воспалительного ответа мозга.

В работе раскрыты потенциальные пути срыва механизмов, контролирующих развитие нейровоспаления, которые связаны с усиленной доставкой глюкокортикоидов в ткань мозга, длительной экспозицией к высоким концентрациям гормона и, как следствие, с изменениями в проведении сигнала глюкокортикоидов. Эти результаты формируют новое направление в изучении патологий ЦНС, поскольку основное внимание в ранее осуществленных исследованиях было сфокусировано на изменениях уровней глюкокортикоидов в крови.

Предложена гипотетическая схема, связывающая процессы нейровоспаления, усиленную доставку и изменения сигналинга глюкокортикоидов в гиппокампе. Высказано предположение, что эти процессы являются взаимоусиливающими и могут приводить к формированию порочного круга, обуславливая срыв контроля воспалительного ответа мозга. Гипотеза подтверждается появлением положительных корреляций между интенсивностью доставки кортикостерона в гиппокамп и выраженностью процессов нейровоспаления, а также данными о специфичности усиления доставки в отношении кортикостерона, но не другого стероида, тестостерона. Таким образом, в работе обозначены точки роста и новые потенциальные мишени для терапии заболеваний ЦНС.

Значимость полученных результатов состоит и в том, что выявленные закономерности могут иметь крайне широкое применение, поскольку нейровоспаление наблюдается практически при всех патологиях ЦНС.

**Положения, выносимые на защиту:**

- 1) Динамика процессов нейровоспаления при стрессе различной природы неодинакова в неокортексе и гиппокампе; в гиппокампе нейровоспаление продолжается в течение более длительного времени.
- 2) Воспалительный ответ в гиппокампе сопровождается усиленной (в сравнении с корой) доставкой кортикостерона в ткань, что может запускать механизмы срыва адаптивного цитопротекторного механизма в гиппокампе.

**Апробация работы**

Основные результаты работы были доложены на Европейской Студенческой Конференции (Берлин, 2007), на первом международном форуме по нанотехнологиям (Москва, 2008), на молодежной конференции COST B30 «Клеточная Нейропатология» (Киев, 2010), на научных конференциях молодых ученых ИВНД и НФ РАН (Москва, 2009, 2010), на международном конгрессе ISTH (Токио, 2011), на конференции Международного Нейрохимического Общества (Афины, 2011), на конференции «Нейрохимические подходы к исследованию функционирования мозга» (Ростов-на-Дону, 2011).

**Объем и структура диссертации**

Диссертация содержит следующие основные разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы и библиографический указатель, включающий 159 работ на русском (2) и иностранных (157) языках. Диссертация изложена на 104 страницах машинописного текста и содержит 38 иллюстраций и 2 таблицы.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**Работа с животными.** В работе было использовано 78 крыс-самцов линии Вистар массой 250-300 г, а также 20 мышей-самцов линии C57BL/6 массой 20-25 г. Животных содержали по пять особей в пластмассовых клетках при свободном доступе к воде и пище. В виварии поддерживали искусственный световой режим (день 8:00-20:00). Проведение экспериментов было согласовано с этической комиссией Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. Были предприняты все усилия, чтобы свести к минимуму страдания животных.

**Интероцептивный стресс** моделировали путем внутрибрюшинного введения липополисахарида (ЛПС) из *E.coli* (Sigma, США) в дозе 5 мг/кг. **Экстероцептивный стресс** был реализован в модели комбинированного эмоционально-болевого стресса

(модель экспериментального невроза), компонентами которого были электроболевое раздражение, его непредсказуемость относительно вспышек света, астенизирующий белый шум (Айрапетянц, Вейн, 1982).

**Биохимические и молекулярно-биологические методы.** Отделы мозга гомогенизировали, гомогенат центрифугировали (12000g, 30 мин, 4°C) и супернатант отбирали для определения ИЛ-1 $\beta$  и белка (по Bradford M.M., 1976). Осадок затем гомогенизировали в тризоле для последующего извлечения мРНК. Уровни цитокинов и стероидов определяли иммуноферментными методами (Perprotech, США; DrG, Германия). Экспрессию генов определяли методом ПЦР в реальном времени на амплификаторе BioRad MiniOpticon (США) с использованием наборов фирмы «Силекс» (Россия), содержащих краситель CyberGreen. Уровень сигнала нормировали по экспрессии 18S рибосомальной субъединицы.

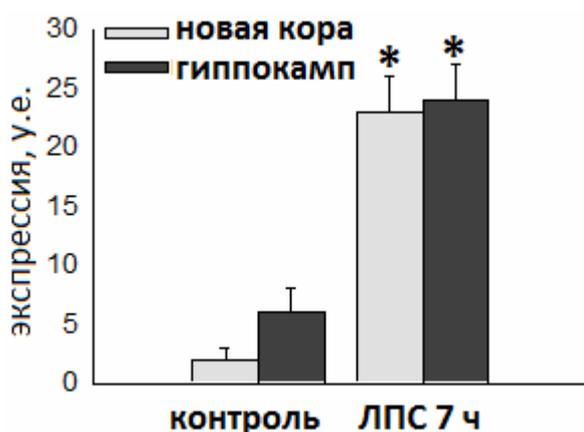
**Статистическую обработку результатов** проводили с использованием программы Statistica 9.0 (StatSoft, USA). Данные представлены в виде  $M \pm S.E.M.$  Достоверность отличий между группами определяли, используя критерий Манна-Уитни, если не указано иное. Корреляционный анализ проводили с использованием ранговых корреляций Спирмана.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Нейровоспаление как адаптивная реакция при остром стрессе различной природы

**Экспрессия цитокинов и цитопротекторных белков на ранних этапах интероцептивного стресса.** Введение высокой дозы (5мг/кг) ЛПС вызвало острый воспалительный ответ в отделах мозга через 7 часов после инъекции. На этом этапе уровни ИЛ-1 $\beta$  были схожими в новой коре и в гиппокампе.

Было выдвинуто предположение, что при нейровоспалении может происходить усиление экспрессии цитопротекторных белков.

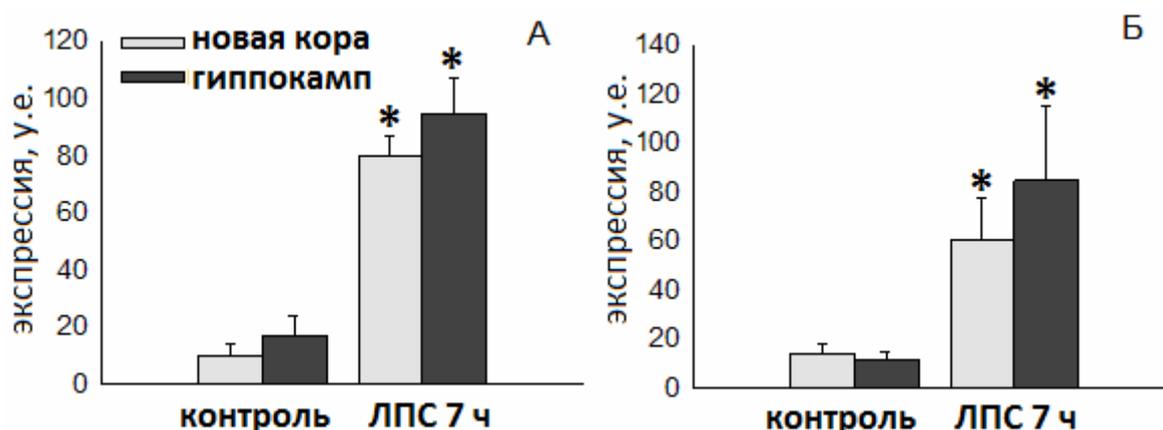


**Рис. 1.** Экспрессия ИЛ-1 $\beta$  в отделах мозга крыс при нейровоспалении, вызванном системным введением ЛПС (5мг/кг, 7 ч).

\* -  $p < 0.05$ , отличие от контроля.

Отдельный интерес представляло изучить экспрессию эритропоэтина (Эпо) и его рецептора (Эпо-Рц), поскольку эти белки

рассматриваются как одни из наиболее значимых эндогенных нейропротекторов (McPherson, Juul, 2008). В то же время, их регуляция, связываемая почти исключительно с гипоксией (Fan et al., 2009), не изучена при нейровоспалении. Через 7 часов после инъекции ЛПС, было выявлено значительно усиление экспрессии как Эпо, так и его рецептора в изученных отделах мозга (рис. 2). При этом, наблюдалась корреляция ( $r=0.9$ ,  $p<0.05$ ) между экспрессией ИЛ-1 $\beta$  и Эпо как в новой коре, так и в гиппокампе. Одновременно было обнаружено усиление экспрессии фактора-1 индуцируемого гипоксией (ГИФ-1) (рис. 3А) – основного транскрипционного регулятора, усиливающего экспрессию Эпо.



**Рис. 2.** Экспрессия эритропоэтина (А) и его рецептора (Б) в неокортексе и гиппокампе крыс при нейровоспалении, вызванном системным введением ЛПС (5 мг/кг, 7 ч).

\* -  $p<0.05$ , отличие от контроля.

Одним из известных адаптивных механизмов, связанных с острым стрессом и воспалением, является снижение синтеза факторов роста, конститутивно экспрессируемых на высоком уровне, таких как инсулиноподобный ростовой фактор-1 (ИФР-1) (Goldspink and Yang, 2001). Считается, что это - механизм временного торможения анаболических процессов. Он хорошо описан в периферических тканях (Fernández-Celemín et al., 2002), но менее изучен в мозге.

При исследовании экспрессии ИФР-1 в новой коре и гиппокампе в ответ на острый интероцептивный стресс было выявлено значительное (в 3-5 раз) снижение уровня мРНК ИФР-1 через 7 часов после системного введения ЛПС (рис. 3Б), одинаково выраженное в обеих структурах.

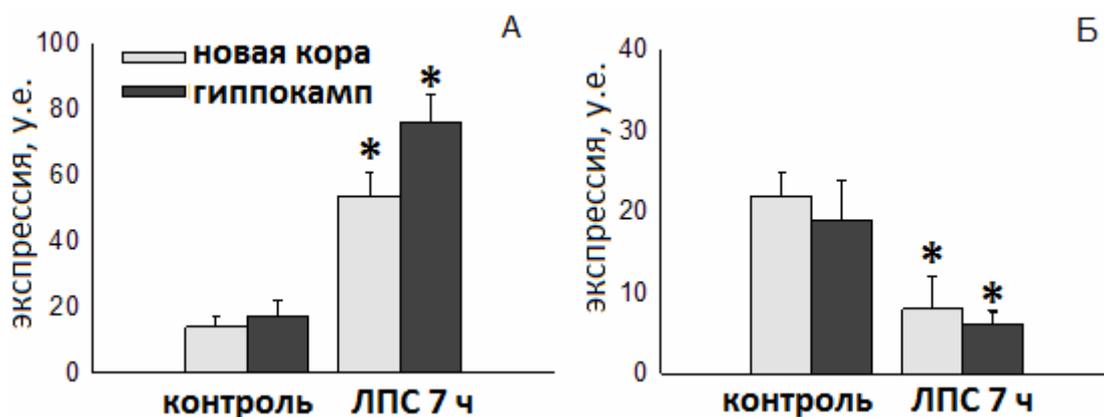


Рис. 3. Экспрессия ГИФ-1 (А) и ИФР-1 (Б) в неокортексе и гиппокампе крыс при нейровоспалении, вызванном системным введением ЛПС (5 мг/кг, 7 ч.).

\* -  $p < 0.05$ , отличие от контроля.

*Экспрессия цитокинов и цитопротекторных белков на ранних этапах экстероцептивного стресса.* Те же параметры были изучены у животных, подвергавшихся острому (6 ч) эмоционально-болевному стрессу. Как видно (рис. 4), острый стресс вызвал воспалительный ответ в отделах мозга. При этом уровень индукции ИЛ-1 $\beta$  в гиппокампе был выше, чем в новой коре.

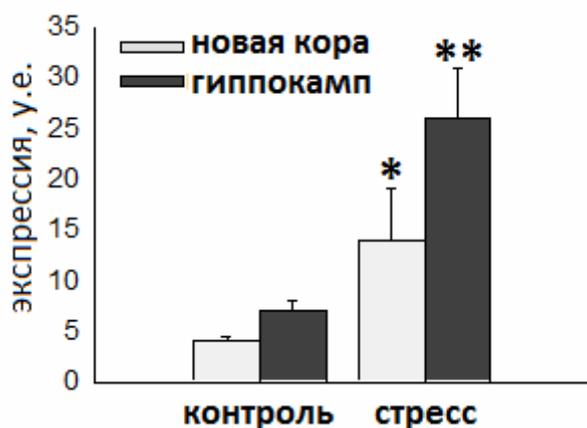


Рис. 4. Экспрессия ИЛ-1 $\beta$  в отделах мозга крыс при остром (6 ч) эмоционально-болевым стрессе.

\*\* -  $p < 0.01$ , \* -  $< 0.05$ , отличие от контроля.

При данном виде стресса, так же, как и при системном введении ЛПС, было выявлено усиление экспрессии Эпо и его рецептора, а также ГИФ-1 (рис. 5 А-В).

При этом не было обнаружено отличий в уровне индукции данных белков между новой корой и гиппокампом. Как и в случае интероцептивного стресса, была обнаружена корреляция между уровнями экспрессии ИЛ-1 $\beta$  и Эпо ( $r=0.7$ ,  $p < 0.05$ ). Острый эмоционально-болевой стресс также привел к значительному снижению экспрессии ИФР-1, одинаково выраженному в новой коре и гиппокампе (рис. 5Г).

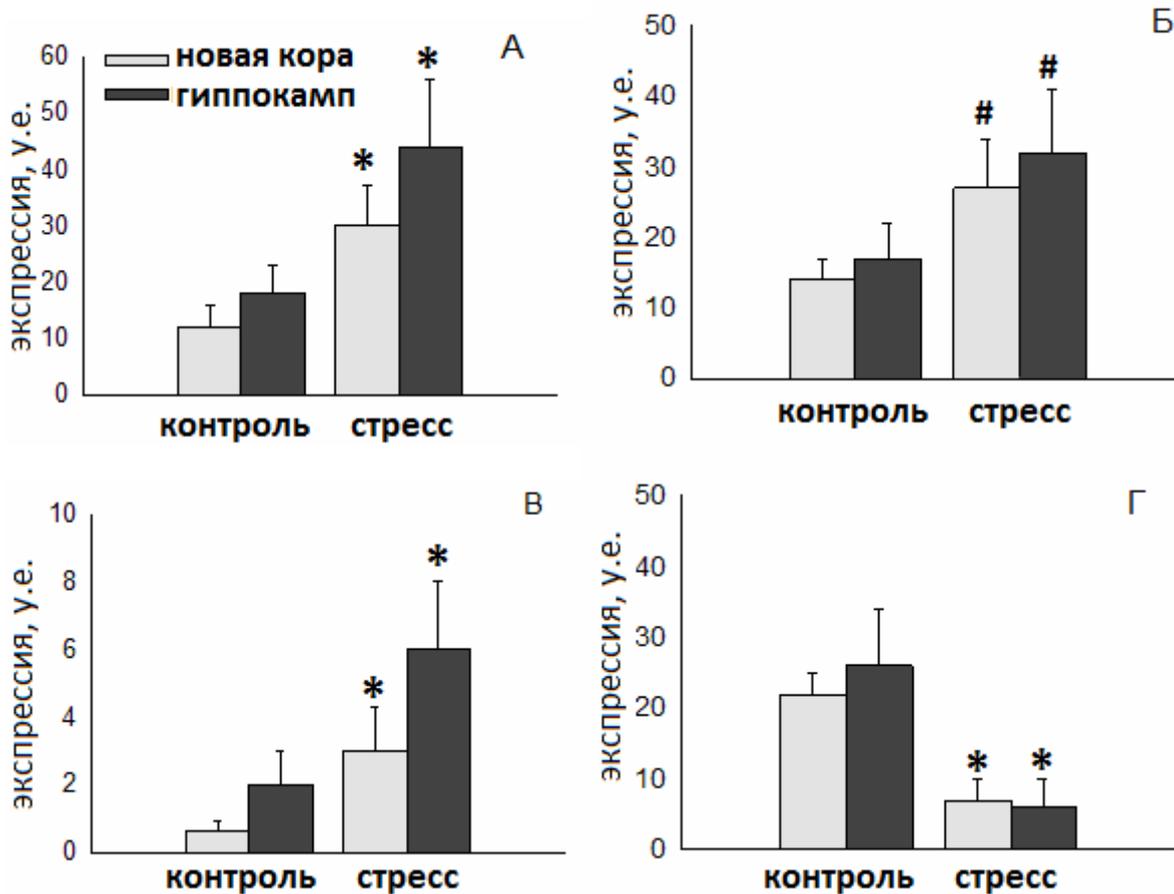
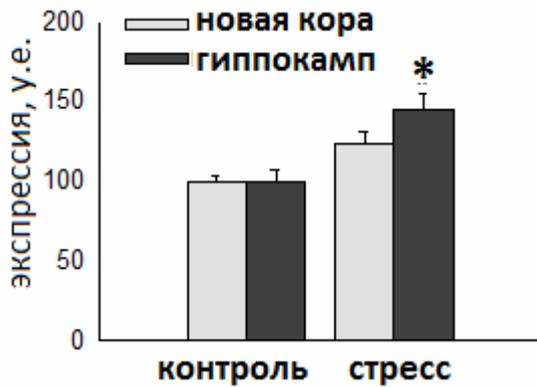


Рис. 5. Экспрессия эритропоэтина (А), его рецептора (Б), ГИФ-1 (В) и ИФР-1 (Г) в неокортексе и гиппокампе крыс при нейровоспалении, вызванном острым (б ч) эмоционально-болевым стрессом.

# -  $p < 0.01$ , \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$ , отличие от контроля.

*Экспрессия ламинина-1 $\beta$  на ранних этапах эмоционально-болевого стресса.* Известно, что стресс усиливает запоминание (McGaugh, 2000; Meaney, 1988). Можно предположить, что одним из механизмов этого явления может быть усиление экспрессии белков, играющих важную роль в нейрональной пластичности, в частности, ламинина-1 $\beta$ . Этот белок эволюционно родственен провоспалительным цитокинам (Beck et al., 1990), что позволяет предположить наличие общих регуляторов. Экспрессию ламинина-1 $\beta$  исследовали на ранних этапах эмоционально-болевого стресса. Было выявлено усиление экспрессии данного белка после 6 часов воздействия стрессоров. При этом обнаружилась корреляция между экспрессией ламинина-1 $\beta$  и провоспалительного ИЛ-1 $\beta$  ( $r=0.7-0.8$ ,  $p < 0.05$ ). Следовательно, усиление экспрессии ламинина-1 $\beta$  и провоспалительных цитокинов при остром эмоционально-болевым стрессе, является согласованным.



**Рис.6.** Экспрессия ламинина-1 $\beta$  в отделах мозга крыс при нейровоспалении, вызванном острым эмоционально-болевым стрессом.

\* -  $p < 0.05$ , отличие от контроля.

Таким образом, показано, что острый экстеро- и interoцептивный стресс вызывают воспалительный ответ мозга, что согласуется с данными литературы о способности различных видов стресса вызывать нейровоспаление (Munhoz C et al., 2008). На ранних этапах interoцептивного стресса не было выявлено отличий в уровне индукции ИЛ-1 $\beta$  между новой корой и гиппокампом, в то время как острый эмоционально-болевой стресс вызвал более выраженное усиление экспрессии ИЛ-1 $\beta$  в гиппокампе по сравнению с новой корой. Можно предположить, что выявленные регионарные различия, обнаруженные при экстероцептивном стрессе, могут быть связаны с наличием выраженного эмоционального компонента в данной модели стресса.

В обеих моделях стресса было обнаружено усиление экспрессии ГИФ-1, который принято рассматривать как транскрипционный фактор, участвующий в адаптации к гипоксии. Он инициирует экспрессию генов целого ряда нейропротекторных белков, среди которых VEGF, Эпо, транспортер глюкозы GLUT-3 (Adams et al., 2009). В нашей работе было обнаружено усиление экспрессии ГИФ-1 в условиях нормоксии. Функциональное значение данного усиления подтвердилось индукцией экспрессии Эпо, одного из ГИФ-зависимых белков, регуляцию которого ранее также связывали преимущественно с гипоксией (Martí et al., 2004). В работе было обнаружено выраженное снижение экспрессии ИФР-1 в новой коре и гиппокампе при нейровоспалении, вызванным различными видами стресса, что может быть еще одним потенциально адаптивным механизмом нейровоспаления, вызванного стрессом. Было выявлено согласованное усиление экспрессии ламинина-1 $\beta$  и провоспалительных цитокинов при остром эмоционально-болевым стрессе, что позволяет предположить связь процессов нейровоспаления с адаптивным изменением синаптической пластичности при стрессе. Таким образом, в двух моделях стресса были выявлены новые,

потенциально адаптивные, механизмы нейровоспаления, одинаково выраженные в коре и гиппокампе.

## 2) Селективная чувствительность гиппокампа к нейровоспалению при стрессе различной природы

*Регионарные различия в экспрессии провоспалительных цитокинов и цитопротекторных белков на разных этапах интероцептивного стресса.* Ранее было показано, что на ранних этапах интероцептивного стресса новая кора и гиппокамп не отличаются по уровню экспрессии провоспалительного ИЛ-1 $\beta$  и эритропоэтина. С целью проследить дальнейшее развитие процессов нейровоспаления, была изучена экспрессия данных белков спустя 24 часа после системной инъекции высокой дозы (5 мг/кг) ЛПС и проведено сравнение с точкой 7 ч.

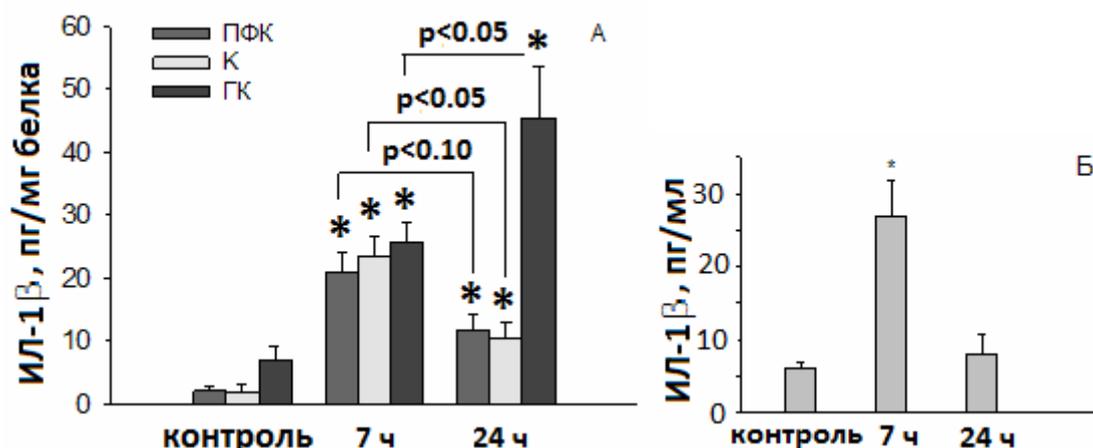
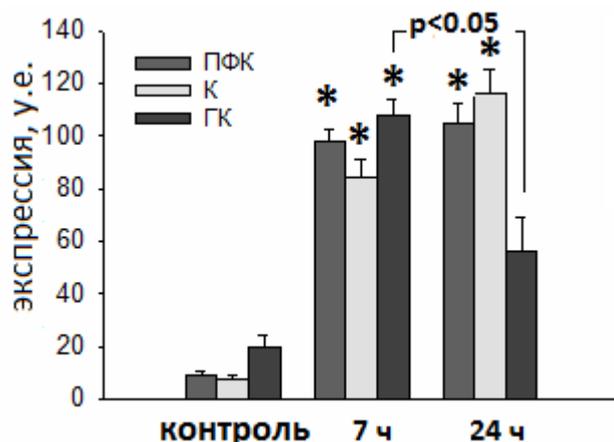


Рис.7. Уровень ИЛ-1 $\beta$  в отделах мозга (А) и крови (Б) крыс после интраперитонеальной инъекции ЛПС в дозе 5 мг/кг.

\* -  $p < 0.05$ , отличие от контроля; отрезками обозначены отличия между временными точками 7 и 24 ч. ПФК – префронтальная часть новой коры; К - фрагмент новой коры, включающий височную, париетальную и окципитальную части; ГК – гиппокамп

Как видно из рис. 7, системное введение ЛПС вызвало значительное увеличение уровня ИЛ-1 $\beta$  в крови и отделах мозга, однако через 24 часа содержание циркулирующего цитокина вернулось к исходным значениям. Однако уровни ИЛ-1 $\beta$  в отделах мозга оставались повышенными. Следовательно, процессы воспаления в мозге имеют более медленную кинетику, по сравнению с системными. При этом, как видно из рис. 7, на данном этапе (24 ч) обнаружили выраженные регионарные различия в уровне ИЛ-1 $\beta$  в ткани мозга: по сравнению с точкой 7 часов, в отделах коры наблюдалось снижение уровня цитокина, а в гиппокампе, напротив, – увеличение.



**Рис. 8.** Эпо в отделах мозга крыс после интраперитонеальной инъекции ЛПС в дозе 5 мг/кг. Обозначения как на рис. 7.

На рис. 8 показана экспрессия Эпо на различных этапах интероцептивного стресса. На ранних этапах нейровоспаления (7 ч) была обнаружена

согласованность между экспрессией Эпо и ИЛ-1 $\beta$  во всех изученных отделах мозга (в областях коры  $r=0.9$ ;  $p<0.05$ ; в гиппокампе  $r=0.82$ ;  $p<0.09$ ). Однако через сутки после введения ЛПС согласованность в экспрессии цитокинов сохранилась только в новой коре ( $r=0.78-0.9$ ;  $p<0.1$ ). В гиппокампе же происходило рассогласование экспрессии провоспалительных и цитопротекторных белков: исчезла корреляция ( $p>0.6$ ), снизился уровень экспрессии Эпо (рис.8).

**Регионарные различия в экспрессии провоспалительных цитокинов и цитопротекторных белков на разных этапах экстероцептивного стресса.** Ранее было выявлено, что уже на ранних этапах (6 ч) эмоционально-болевого стресса в гиппокампе наблюдается более выраженная, по сравнению с новой корой, индукция экспрессии провоспалительного ИЛ-1 $\beta$  (рис. 4). В следующем эксперименте было проведено сравнение экспрессии провоспалительных и цитопротекторных белков в моделях острого (6 ч) и хронического (15 дней) эмоционально-болевого стресса.

Как видно (рис. 9), разница в экспрессии ИЛ-1 $\beta$  между новой корой и гиппокампом, обнаруживаемая уже при остром воздействии, значительно усилилась при хроническом. Несмотря на то, что в результате хронического эмоционально-болевого стресса нейровоспаление в гиппокампе, по сравнению с новой корой, значительно усилилось, разница в экспрессии Эпо между этими отделами осталась прежней (рис 10). Таким образом, при хроническом эмоционально-болевым стрессе обнаруживаются те же закономерности, что и при интероцептивном.

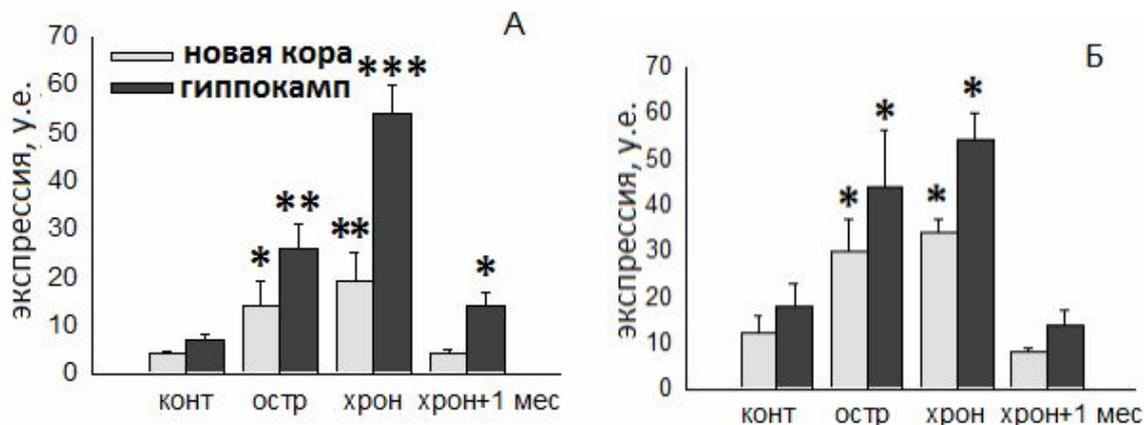


Рис.

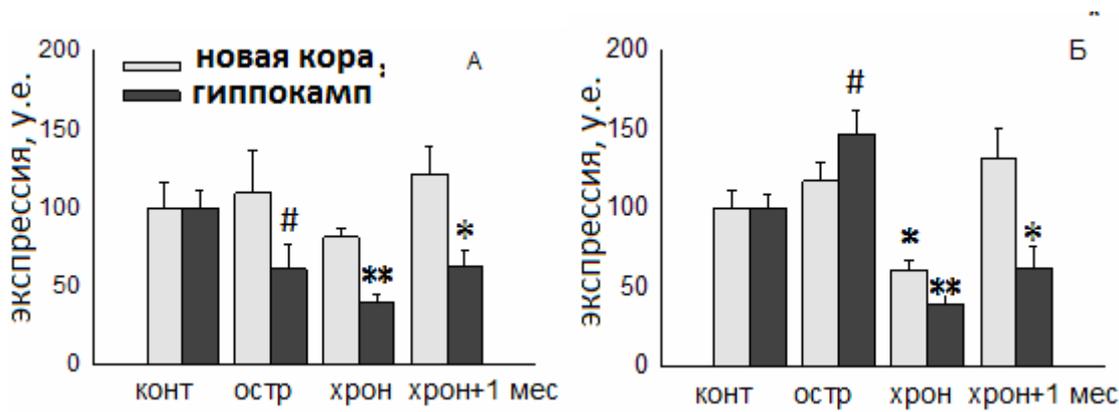
### 9. Экспрессия интерлейкина-1β (А) и эритропоэтина (Б) при нейровоспалении в результате острого и хронического эмоционально-болевого стресса.

Конт – контроль, остр – острый, хрон – хронический стресс, хрон+1 мес – месяц спустя после хронического стресса. # -  $p < 0.1$ , \* -  $< 0.05$ , \*\* -  $< 0.01$ , \*\*\* -  $< 0.001$ , отличие от контроля.

Хронический стресс может приводить к развитию целого ряда патологических состояний ЦНС, в т.ч., связанных с нарушением функций гиппокампа (Esch et al., 2002). По этой причине представляло отдельный интерес выявить возможные долговременные воспалительные изменения в результате эмоционально-болевого стресса. Для этого часть животных после длительного воздействия стрессоров была возвращена в привычные условия на 1 месяц, и лишь после этого было проведено исследование процессов нейровоспаления в отделах мозга.

Было обнаружено, что месяц спустя после прекращения действия стрессоров в гиппокампе сохраняется усиленная экспрессия провоспалительного ИЛ-1β (рис. 9А). При этом уровень мРНК ИЛ-1β в новой коре был уже неотличим от контрольного. Также было выявлено, что хронический стресс вызывает снижение экспрессии белков, играющих важную роль в нейропластичности, ламинина-1β и NCAM-1 (рис. 11) в гиппокампе и новой коре, однако только в гиппокампе эти изменения сохраняются месяц спустя после прекращения воздействия стрессоров.

Таким образом, было выявлено, что по мере развития нейровоспаления, как при интеро-, так и при экстероцептивном стрессе, происходит появление или усиление регионарных различий воспалительного ответа в отделах мозга животных. Экспрессия провоспалительных цитокинов становится значительно выше в гиппокампе, чем в отделах новой коры.



**Рис. 11. Экспрессия белка нейрональной адгезии-1 (А) и ламинина-1β (Б) при нейровоспалении в результате эмоционально-болевого стресса.**

Обозначения как на рис. 9. # -  $p < 0.1$ , \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$ , отличие от контроля.

Было выявлено, что усиление воспалительного ответа в гиппокампе сопровождается ослаблением потенциально адаптивных процессов, обнаруживаемых на ранних этапах нейровоспаления: происходит рассогласование экспрессии провоспалительных цитокинов и цитопротекторного Эпо, снижение экспрессии Эпо, а также снижение экспрессии ламинина-1β и NCAM-1.

Обнаруженная в работе высокая подверженность гиппокампа развитию процессов нейровоспаления может лежать в основе известного феномена избирательной чувствительности этой структуры мозга к повреждающим воздействиям.

Поскольку полученные результаты свидетельствуют о более слабом, по сравнению с новой корой, контроле процессов нейровоспаления в гиппокампе, следующим этапом работы стало выявление потенциальных механизмов нарушения регуляции воспалительного ответа в этом отделе мозга. Одними из основных регуляторов как процессов воспаления, так и стрессорного ответа являются глюкокортикоиды (ГК), поэтому в следующем разделе работы были изучены уровни кортикостерона в крови и отделах мозга животных.

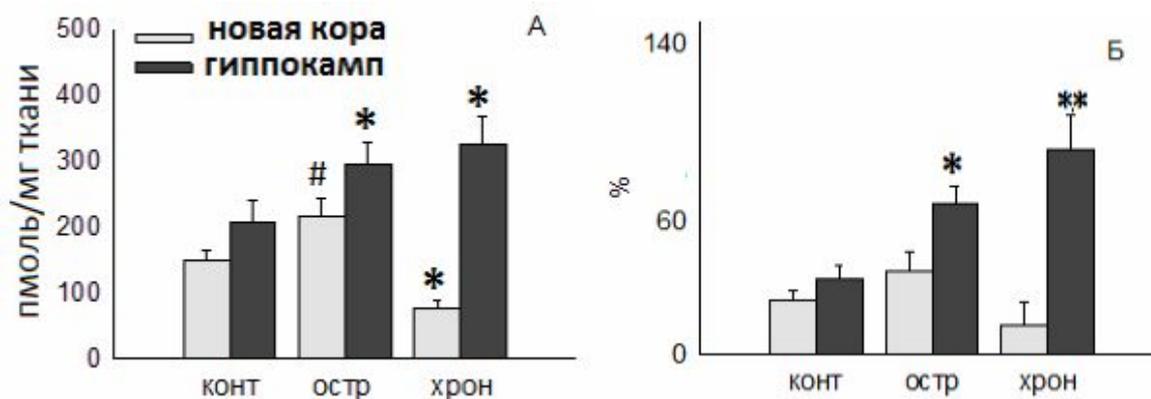
### **3) Глюкокортикоиды при нейровоспалении, вызванном различными видами стресса**

**Уровни глюкокортикоидов в крови при экстероцептивном стрессе.** Как и ожидалось, острый эмоционально-болевым стресс привел к значительному увеличению уровня циркулирующего кортикостерона (КС) (с  $610 \pm 90$  до  $1120 \pm 180$  нмоль/л) (рис. 12). При хроническом стрессе, напротив, был выявлен пониженный, по сравнению с контролем, уровень гормона ( $350 \pm 50$  нмоль/л). Эти данные подтверждают, что при хроническом стрессе происходит дисрегуляция гипоталамо-

гипофизарно-надпочечниковой (ГГН) оси, что, как принято считать, служит одной из причин неадекватного контроля иммунных функций (в т.ч., нейровоспаления) при хроническом стрессе (O'Connor et al., 2000). В то же время, системные изменения уровней ГК не могут объяснить регионарных различий воспалительного ответа мозга. По этой причине уровни КС были определены также в тканях новой коры и гиппокампе животных.

**Уровни глюкокортикоидов в отделах мозга при интероцептивном и экстероцептивном стрессе.** Обнаружено, что при остром стрессе в отделах мозга происходит увеличение уровня КС (рис. 13А). В ситуации хронического стресса, уровни гормона в новой коре, как и в крови, были понижены. В гиппокампе же, несмотря на пониженный уровень циркулирующего КС, концентрации гормона в ткани остались на прежнем, высоком, уровне. Поскольку ранее было показано, что определяемый в нервной ткани кортикостерон имеет периферическое происхождение, высокий уровень гормона в гиппокампе на фоне пониженного в крови свидетельствует об избирательном усилении доставки стероида в гиппокамп.

Для оценки эффективности доставки КС в отделы мозга использовали индекс, равный отношению уровня гормона в ткани к уровню в крови, рассчитанный индивидуально для каждого (рис. 13Б) Как видно, стресс достоверно не изменял эффективность доставки КС в новую кору, но значительно усиливал



**Рис. 13** Уровни кортикостерона в отделах мозга крыс (А) и отношение тканевого КС к циркулирующему (Б).

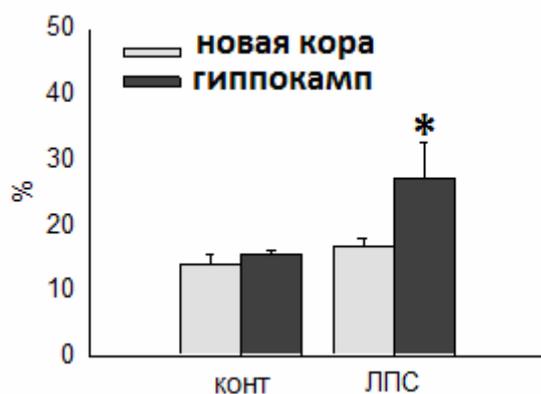
Обозначения как на рис. 9. # -  $P < 0.1$ , \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , отличие от контроля.

доставку в гиппокамп, притом хронический стресс в гораздо большей степени, чем острый. Кроме того, результаты корреляционного анализа показали (табл. 1), что при хроническом стрессе уровни кортикостерона в гиппокампе становятся практически независимыми от уровней в крови.

**Табл. 1. Корреляции между уровнями кортикостерона в отделах мозга и сыворотке крови.**

К группа	новая кора		гиппокамп	
	r	p	r	p
контроль	0.72	p<0.01	0.82	p<0.01
острый	0.77	p<0.01	0.44	p<0.1
хронический	0.87	p<0.1	0.60	p>0.3

**Кортикостерон в отделах мозга крыс при интероцептивном стрессе.** Уровни гормона были определены в крови, новой коре и гиппокампе крыс через сутки после системного введения ЛПС в дозе 5 мг/кг. Как видно из рис. 14, спустя сутки после инъекции ЛПС, интенсивность доставки КС в новую кору осталась на прежнем уровне, но значительно возросла в гиппокампе.



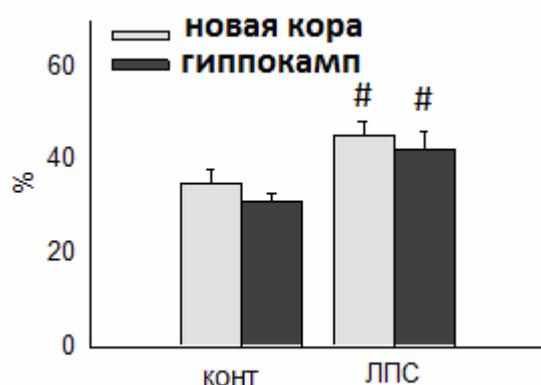
**Рис.14. Отношение уровней КС в отделах мозга к циркулирующему уровню при нейровоспалении в результате интероцептивного стресса.**

\* - p<0.05, отличие от контроля.

Таким образом, в двух моделях стресса было выявлено, что срыв регуляции процессов нейровоспаления в гиппокампе сопровождается усиленной доставкой КС в этот отдел мозга. Поскольку усиление доставки может быть связано с изменением гематоэнцефалического барьера, был проведен сравнительный анализ влияния нейровоспаления на доставку кортикостерона и другого стероида, тестостерона.

### **Сравнительный анализ влияния нейровоспаления на доставку кортикостерона и тестостерона**

На рис. 15 отображено отношение уровня тестостерона в отделах мозга крыс к уровню гормона в сыворотке крови. Как видно, через сутки после системного введения ЛПС наблюдалась тенденция ( $p < 0.1$ ) к увеличению индекса, отражающего эффективность доставки гормона в ткань, как в коре, так и в гиппокампе.



**Рис.15. Отношение уровней тестостерона в отделах мозга к циркулирующему уровню при нейровоспалении в результате интероцептивного стресса.**

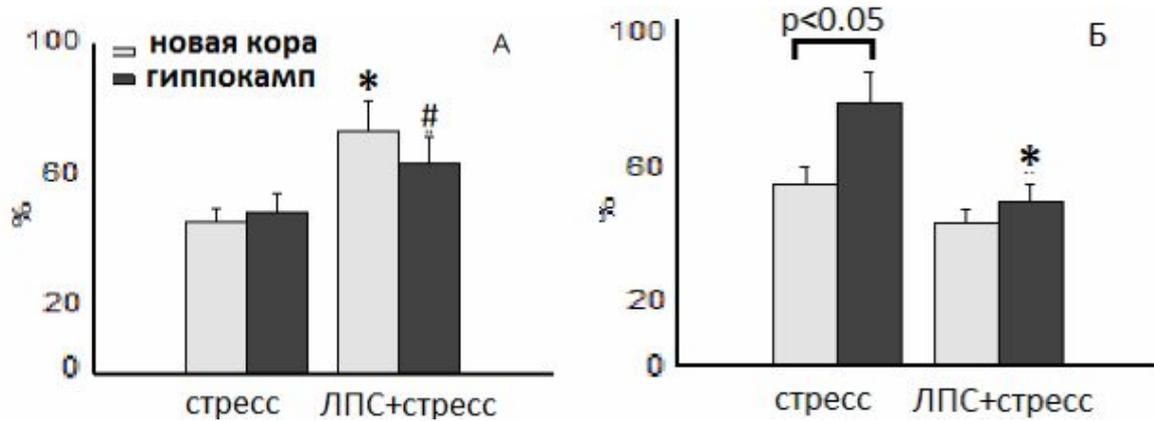
# -  $p < 0.1$ , отличие от контроля.

Таким образом, нейровоспаление, вызванное ЛПС, усиливает доставку тестостерона неспецифически в отношении отделов мозга.

**Влияние предварительного введения ЛПС в низкой дозе на доставку стероидов в отделы мозга крыс при стрессе.** Низкие дозы ЛПС активируют противовоспалительные механизмы в организме, делая его впоследствии менее чувствительным к действию факторов, вызывающих воспаление (Lin et al., 2009; Rosenzweig et al., 2004). Мышам вводили ЛПС в низкой дозе 0.5 мг/кг в течение 10 дней, после чего подвергали комбинированному экстероцептивному стрессу, состоявшему из ежедневных поведенческих тестов (открытого поля, темно-светлой камеры, приподнятого крестообразного лабиринта, подвешивания за хвост, вынужденного плавания в течение двух дней). У животных, подвергавшихся серии стрессорирующих процедур, были обнаружены почти в 5 раз более низкие уровни циркулирующего КС ( $44 \pm 5$  и  $212 \pm 70$  нмоль/л), что подтверждает выраженный стрессорирующий эффект манипуляций, которым подвергались животные.

На рис. 16 представлены значения индексов, отражающих доставку стероидных гормонов в отделы мозга животных. Как видно, у мышей, которым вводили ЛПС до экстероцептивного стресса, наблюдались более высокие уровни тестостерона, как в новой коре, так и в гиппокампе, чем у мышей, которые подвергались только экстероцептивному стрессу (рис. 16А).

Интенсивность доставки КС в отделы мозга под влиянием ЛПС менялась иначе. У животных после экстероцептивного стресса наблюдалась более



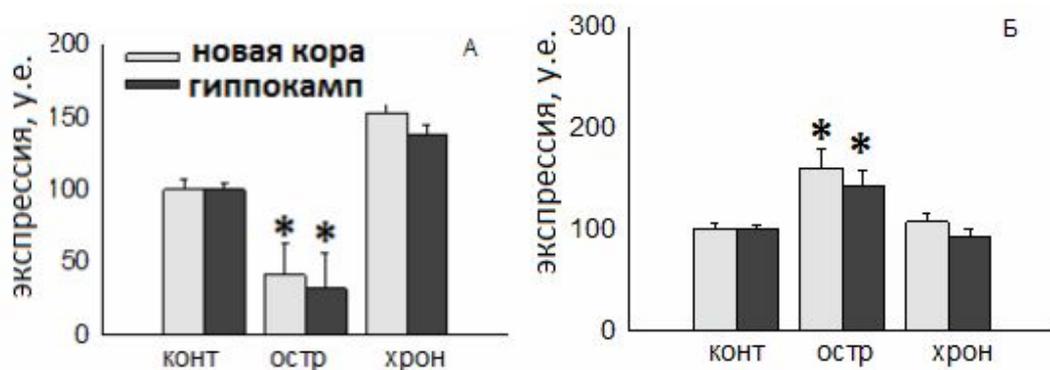
**Рис.16. Отношение уровня тестостерона (А) и кортикостерона (Б) в отделах мозга к циркулирующему уровню.**

# -  $p < 0.1$ , \* -  $p < 0.05$ , отличие от контроля.

доставка КС в гиппокамп, чем в новую кору (рис. 16Б). В то же время, у животных, предварительно получивших серию инъекций низких доз ЛПС, эффективность доставки КС в новую кору и в гиппокамп была практически одинаковой.

Таким образом, в иной экспериментальной парадигме было показано наличие регионарных различий в доставке КС (но не тестостерона) в отделы мозга, а также селективное влияние провоспалительного ЛПС на доставку КС в гиппокамп (но не в новую кору) животных при экстероцептивном стрессе.

**Влияние острого и хронического эмоционально-болевого стресса на экспрессию регулируемых глюкокортикоидами генов.** ГК принято считать противовоспалительными гормонами (Golde et al., 2003). В то же время, высокие концентрации КС в гиппокампе крыс, напротив, сопровождались усиленным, в сравнении с новой корой, воспалительным ответом. Можно предположить, что срыв регуляции процессов нейровоспаления в гиппокампе может быть связан с изменением проведения сигнала ГК в результате длительной экспозиции ткани к высоким уровням гормона. Усиление экспрессии ИЛ-1 $\beta$  в гиппокампе в результате хронического эмоционально-болевого стресса само по себе является признаком так называемой «резистентности к глюкокортикоидам», поскольку экспрессия провоспалительных цитокинов в норме подавляется глюкокортикоидами (Sapolsky et al., 2000). Был проведен сравнительный анализ экспрессии ещё двух регулируемых глюкокортикоидами генов, кортикотропин-рилизинг фактора (КРФ) и инсулиноподобного ростового фактора-1 (ИФР-1).



**Рис. 17.** Экспрессия генов, регулируемых глюкокортикоидами, ИФР-1 (А) и КРФ (Б) в отделах мозга крыс при нейровоспалении в результате острого и хронического эмоционально-болевого стресса.

- $p < 0.05$ , отличие от контроля.

В отличие от гипоталамуса, экспрессия КРФ в новой коре и гиппокампе усиливается КС, определяя ряд поведенческих реакций в ответ на стресс (Schulkin et al., 1998). Действительно, при остром стрессе экспрессия КРФ усиливалась в отделах мозга (рис. 17А). При хроническом стрессе, на фоне пониженных концентраций гормона, в коре, как и следовало ожидать, наблюдалось понижение экспрессии КРФ. В то же время, в гиппокампе, несмотря на значительно повышенный уровень гормона, экспрессия КРФ не была увеличена по сравнению с контролем.

Экспрессия ИФР-1 подавляется ГК (D'Ercole et al., 1996). Такой эффект наблюдался в отделах мозга при остром стрессе, когда концентрации КС в тканях мозга были повышены (рис. 17Б). Но при хроническом стрессе, несмотря на то, что уровни КС в гиппокампе оставались высокими, экспрессия ИФР-1 не была снижена, но, напротив, оказалась усилена по сравнению с контрольной.

***Гипотетическая схема участия ГК в селективной чувствительности гиппокампа к процессам нейровоспаления.*** В работе получены данные о том, что усиленный, по сравнению с новой корой, воспалительный ответ в гиппокампе сопровождается усиленной и избирательной доставкой глюкокортикоидов в этот отдел мозга, а также признаками изменения проведения сигнала глюкокортикоидов. В то же время, в работе напрямую не исследовался вопрос о причинно-следственной связи между этими процессами. Однако анализ собственных результатов и данных литературы позволяет предположить, что эта связь является двусторонней. Действительно, усиление доставки кортикостерона в гиппокамп может происходить за счет локального протеолиза транспортного белка (транскортина) протеазами, неизбежно активируемыми при нейровоспалении. Эта предположение

подтверждается избирательностью усиления доставки в отношении КС, но не тестостерона, который связывается другим транспортным белком. Очевидно, что на первом этапе процесс усиления доставки глюкокортикоидов в воспаленную ткань гиппокампа является адаптивным, имея своей целью завершение воспалительных процессов. Однако постоянное усиление доставки гормона в гиппокамп приводит к длительной экспозиции нервной ткани к высоким концентрациям глюкокортикоидов, что может вызывать изменение проведения сигнала глюкокортикоидов и приобретение ими провоспалительных свойств (Sapolsky, Pulsinelli, 1985; Dinkel et al., 2000). Данное предположение подтвердилось результатами анализа экспрессии генов, регулируемых ГК. Наличие связи между усилением доставки кортикостерона в гиппокамп и процессами нейровоспаления также подтверждается наличием положительной корреляции между этими показателями ( $r=0.9$ ,  $p<0.05$ ).

Таким образом, имеется ряд фактов, позволяющих считать, что процессы форсированной доставки глюкокортикоидов в гиппокамп и усиление воспалительного ответа в этом отделе мозга потенцируют друг друга, формируя порочный круг (рис.19), обуславливающий селективную чувствительность гиппокампа к процессам нейровоспаления при различных видах стресса.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Обнаружено, что ранние этапы нейровоспаления, вызванного различными видами стресса, сопровождаются реализацией потенциально адаптивных механизмов, в одинаковой степени выраженных в новой коре и гиппокампе: усиливается экспрессия цитопротекторных белков (ГИФ-1, эритропоэтина и его рецептора), ламинина-1 $\beta$ , и одновременно снижается экспрессия ИФР-1. Эти данные служат экспериментальным доказательством изначально адаптивной направленности нейровоспаления при стрессе.

На ранних этапах вызванного стрессом нейровоспаления экспрессия провоспалительных цитокинов примерно одинакова в коре и гиппокампе или отличается незначительно. Однако по мере развития воспалительного ответа выявляются выраженные регионарные отличия: экспрессия провоспалительных цитокинов в коре крыс снижается при прекращении действия стрессоров, но сохраняется или усиливается в гиппокампе животных. При этом усиление воспалительного ответа в гиппокампе сопровождается ослаблением потенциально

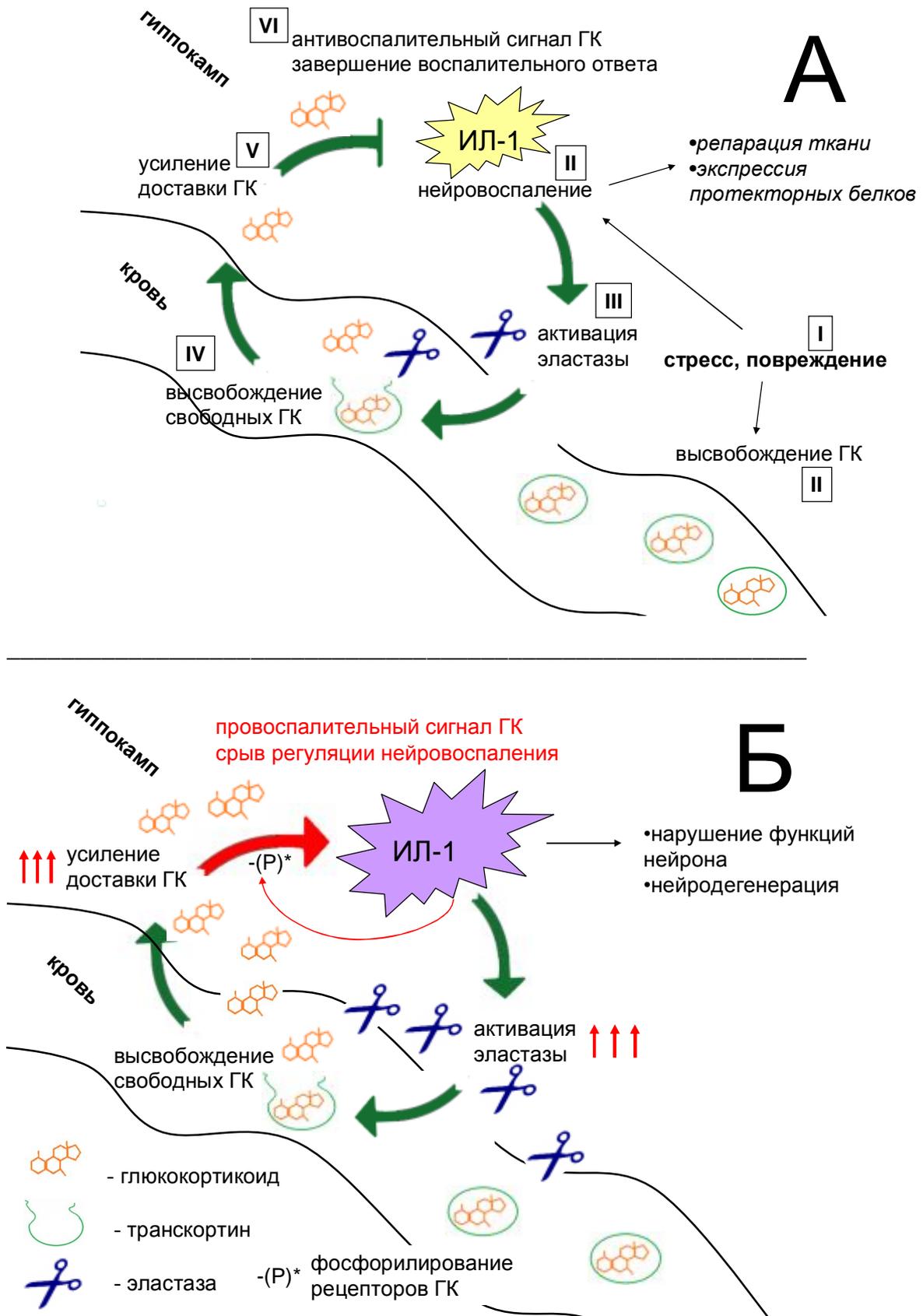


Рис. 19. Гипотетическая схема, связывающая срыв регуляции процессов нейровоспаления, усиленную доставку и изменение сигналинга глюкокортикоидов в гиппокампе. А- адаптивная стадия, Б – дезадаптивная стадия. Римскими цифрами обозначен хронологический порядок.

адаптивных процессов, обнаруживаемых на ранних этапах нейровоспаления: происходит рассогласование экспрессии провоспалительных цитокинов и цитопротекторных белков (эритропоэтина), снижение экспрессии эритропоэтина, а также снижение экспрессии ламинина-1 $\beta$  и NCAM-1.

Таким образом, в основе известного феномена избирательной чувствительности гиппокампа к повреждающим воздействиям может лежать срыв регуляции процессов нейровоспаления. Эти данные имеют важнейшее значение для изучения и терапии целого ряда заболеваний ЦНС и когнитивных нарушений, сопровождающихся изменениями в гиппокампе.

Кроме того, полученные данные обнаруживают новый механизм, связывающий стресс и развитие гиппокамп-зависимых патологий ЦНС, поскольку было обнаружено, что, инициированные стрессом, процессы нейровоспаления могут продолжаться в гиппокампе длительное время (не менее месяца), формируя основу для развития ряда патологий ЦНС.

В работе были обнаружены потенциальные механизмы срыва регуляции процессов нейровоспаления в гиппокампе. Путём анализа уровней ГК в отделах мозга и крови, обнаружено, что в то же самое время, когда обнаруживаются регионарные отличия воспалительного ответа нервной ткани, происходит усиление доставки ГК в гиппокамп, но не в кору больших полушарий. В то же время, высокие уровни ГК в гиппокампе оказываются неспособны подавить воспалительный ответ в этом отделе мозга, что может свидетельствовать об изменении трансдукции сигнала ГК в гиппокампе. Действительно, многими авторами показано, что длительная экспозиция к высоким концентрациям глюкокортикоидов приводит к приобретению им провоспалительного действия (Sapolsky and Pulsinelli, 1995; Dinkel et al., 2003). Анализ экспрессии генов, регулируемых глюкокортикоидами, выявил признаки изменения трансдукции сигнала кортикостерона в гиппокампе, но не в новой коре.

Предложенная в работе гипотетическая схема связывает срыв регуляции процессов нейровоспаления и усиленную доставку ГК в гиппокамп. По-видимому, эти взаимоусиливающие процессы приводят к формированию порочного круга и срыву механизмов контроля воспалительного ответа мозга. Таким образом, в работе выявлены новые точки роста для исследования и потенциальные мишени для терапии заболеваний ЦНС.

## ВЫВОДЫ

- 1) Впервые показано, что при нейровоспалении, вызванном экстероцептивным или интероцептивным стрессом, увеличивается экспрессия цитопротекторных белков (Эпо, рецептора Эпо, ГИФ-1). Эти изменения отражают активацию потенциально адаптивных механизмов.
- 2) На ранних этапах интероцептивного стресса, вызванного введением ЛПС в дозе 5 мг/кг, уровень провоспалительного ИЛ-1 $\beta$  не различается в новой коре и гиппокампе крыс ( $23\pm 2$  и  $26\pm 3$  пг/мг белка соотв.). Однако через 24 часа после введения ЛПС уровень ИЛ-1 $\beta$  снижается в коре ( $12\pm 2$  пг/мг белка), но продолжает расти в гиппокампе животных ( $42\pm 9$  пг/мг белка).
- 3) Острый эмоциональный болевой стресс вызывает увеличение экспрессии ИЛ-1 $\beta$  в мозге, достоверно более выраженное в гиппокампе крыс в сравнении с новой корой. При хроническом стрессе регионарные различия экспрессии ИЛ-1 $\beta$  усиливаются.
- 4) Рассогласование экспрессии Эпо и ИЛ-1 $\beta$ , снижение экспрессии Эпо, снижение экспрессии ламинина-1 и NCAM на поздних этапах интероцептивного стресса и при хроническом эмоционально-болевым стрессе отражают ослабление потенциально адаптивных процессов и указывают на срыв регуляции воспалительных реакций в гиппокампе.
- 5) Усиленная, по сравнению с контролем, экспрессия провоспалительного ИЛ-1 $\beta$  сохраняется в гиппокампе, но не в коре спустя месяц после окончания хронического экстероцептивного стресса. Долговременный постстрессорный срыв регуляции процессов нейровоспаления в гиппокампе можно рассматривать как новый механизм, связывающий стресс и развитие патологических изменений в гиппокампе.
- 6) Усиление экспрессии ИЛ-1 $\beta$  в гиппокампе сопровождается селективным усилением доставки глюкокортикоидов в этот отдел мозга. Отсутствие изменения доставки тестостерона в отделы мозга подтверждает селективность механизмов, связывающих избыточную доставку глюкокортикоидов с патологией гиппокампа.
- 7) При хроническом экстероцептивном стрессе, несмотря на повышенный уровень ГК в гиппокампе, отсутствуют изменения (в сравнении с контролем) в экспрессии регулируемых ГК генов (ИФР-1 и КРФ), что свидетельствует об изменении трансдукции сигнала ГК в этом отделе мозга.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Пискунов А.К. Биомаркеры нейровоспаления. // Нейрохимия. 2010. Т. 27. № 1. С. 67-73. (А.К. Piskunov. Neuroinflammation biomarkers. *Neurochem J.* 2010. V. 4(1) P.55–63).
2. Piskunov A.K. Cytoprotective molecules in LPS-induced neuroinflammation. // Kiev. 2010. COST B-30. Abstr. P. 9-10.
3. Пискунов А. К., Яковлев А.А., Степаничев М.Ю., Онуфриев М.В., Гуляева Н.В. Селективная чувствительность гиппокампа к интероцептивному стрессу: влияния на интерлейкин-1 и эритропоэтин. // Нейрохимия. 2011. Т. 28 № 3. С. 216 - 219. (Piskunov A.K., Yakovlev A.A., Stepanichev M.Yu., Onufriev M.V., Gulyaeva N.V. Selective vulnerability of the hippocampus to interoceptive stress: effects on interleukin-1 $\beta$  and erythropoietin. // *Neurochem J.* 2011. V.28 (3) P.216-219).
4. Piskunov A.K. Chronic stress in rat induces a long-lasting inflammatory response accompanied by changes in glucocorticoid delivery and signaling. *J Neurochem.* 2011. V 118. S. 1. P.MO03-17.
5. Пискунов А.К., Тишкина А.О., Степаничев М.Ю., Онуфриев М.В., Яковлев А.А., Гуляева Н.В. Накопление кортикостерона в ткани мозга при нейровоспалении, вызванном различными видами стресса: гиппокамп селективный эффект. Ростов-На-Дону. 2011 Нейрохимические подходы к исследованию функционирования мозга. Сборник тез. с. 87.

Работа выполнена при частичной поддержке Министерства образования и науки РФ ГК № 14.740.11.0637 и ГК № 16.512.11.2091.