

**На правах рукописи**

**Тишкина Анна Олеговна**

**Реакция микроглии и астроцитов мозга грызунов на хронический стресс  
различной модальности**

**03.03.01 – физиология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

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

**Москва, 2013**

Работа выполнена в лаборатории функциональной биохимии нервной системы (заведующая лабораторией – доктор биологических наук, профессор Наталия Валерьевна Гуляева) Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН» (директор – доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН Павел Милославович Балабан).

**Научный руководитель:**

Доктор биологических наук, профессор Наталия Валерьевна Гуляева.

**Официальные оппоненты:**

Доктор биологических наук, профессор Вячеслав Альбертович Дубынин

Доктор биологических наук Елена Владимировна Лосева.

**Ведущая организация**

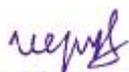
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П. К. Анохина» РАМН

Защита состоится «27»\_марта\_ 2013 года в 14.00 на заседании диссертационного совета Д 002.044.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН» по адресу: 117485, Москва, ул. Бутлерова, д. 5а.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН».

Автореферат разослан «25»\_февраля\_ 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
Доктор биологических наук



Виктор Николаевич Иерусалимский

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Глия выполняет в ЦНС множество функций, направленных на поддержание стабильной работы нейронной сети. Одной из этих функций является организация внутренней иммунной системы мозга. При повреждениях, травмах, инфекции или нарушении гемато-энцефалического барьера активируются резидентные макрофаги нервной ткани – микроглия. Активация микроглии выражается в изменении паттерна экспрессии генов и соответствующих белков, что, в частности, приводит к увеличению уровня цитокинов (про- и противовоспалительных факторов) в ткани. Этот процесс принято называть нейровоспалением. На клеточном уровне основным маркером нейровоспаления является увеличение числа микроглиоцитов. Активированная микроглия начинает секретировать провоспалительные факторы (интерлейкин-6, интерлейкин-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ). На определенной стадии нейровоспаления микроглиальные клетки становятся макрофагами и начинают секретировать, кроме перечисленных цитокинов, интерферон- $\gamma$  и оксид азота [Raivich et al., 1999].

При выраженной активации микроглии в процесс нейровоспаления включается также астроглия [Schubert et al., 2000]. Показано, что на астроцитах есть рецепторы цитокинов, и что астроглия может экспрессировать про- и противовоспалительные факторы [Bohn et al., 1994]. Нейровоспаление, как любой воспалительный процесс в организме, на первом этапе, несомненно, имеет адаптивную природу, выполняя защитные функции. Однако чрезмерная активация воспалительного процесса становится патологическим фактором. Действительно, нейровоспаление сопутствует начальным стадиям нейродегенеративных заболеваний и может вносить существенный вклад в процессы гибели нейронов [Gahtan & Overmier, 1999].

В большинстве работ, направленных на изучение нейровоспаления, исследуют этот процесс на этапе развившейся церебральной патологии. Однако большой

интерес представляет исследование нейровоспаления на начальном этапе развития патологии. Существует предположение, что повторяющиеся эпизоды нейровоспаления, эффекты которых суммируются в течение жизни, могут приводить к возникновению нейродегенерации и развитию заболеваний, часто сопровождающих старение, таких как болезни Альцгеймера или Паркинсона [Gahtan & Overmier, 1999]. Такие эпизоды нейровоспаления могут возникать в результате стрессов, вирусных или бактериальных инфекций. Активация иммунной системы организма приводит к увеличению уровня провоспалительных факторов в циркулирующей крови, проникновению их в мозг и, как следствие, к возникновению нейровоспалительных процессов. Поскольку активация иммунной системы стимулирует гипоталамо-гипофизарно-адреналовую систему [Turnbul & Rivier, 1999; Besedovsky & del Rey, 2000], предложено понятие «интероцептивный стресс», т.е. стресс, вызванный внутренним стимулом [Rinaman, 1999]. Показано, что экстероцептивный стресс (стресс, вызванный внешним стимулом) также может приводить к возникновению нейровоспаления [Braun et al., 2009; Tynan et al., 2010], опосредованного влиянием стресс-реализующей системы на иммунную систему организма в целом и мозга, в частности. Так, Dinkel с соавт. показали, что глюкокортикоиды в мозге не являются иммуносупрессорами, а, наоборот, оказывают провоспалительное действие [Dinkel et al., 2010]. Показана высокая чувствительность гиппокампа к глюкокортикоидам [Conrad, 2008], при этом хронический стресс вызывает селективное продолжительное возрастание уровня провоспалительных факторов в этой структуре [Пискунов, 2011].

Рецепторы к глюкокортикоидам экспрессируются на астроцитах [Maurel et al., 2000], которые чувствительны к изменению уровня глюкокортикоидов в крови. Их число может изменяться в ответ на стресс [Unemara et al., 2012]. Принимая во внимание, что с возрастом реактивность гипоталамо-гипофизарно-адреналовой и иммунной систем мозга усиливается, хроническое воздействие стрессов различной модальности (экстеро- или интероцептивных) со временем может приводить к

нейродегенерации [Jurgens & Johnson, 2012]. Таким образом, исследование последствий хронического стресса на структурно-функциональное состояние мозга может приблизить к пониманию причин развития нейродегенеративных заболеваний. Поскольку глиальные клетки, в первую очередь микроглия и астроциты, играют существенную роль в процессах нейровоспаления, важной частью этой работы является изучение их реакции на хронический стресс различной модальности.

**Цель и задачи исследования.** Цель работы - изучение реакции микроглии и астроцитов мозга на хронический экстеро- и интероцептивный стресс.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать состояние микро- и астроглии в гиппокампе мозга крыс сразу и через месяц после хронического экстероцептивного (эмоционально-болевого) стресса
2. Исследовать состояние микро- и астроглии в структурах мозга мышей, после хронического интероцептивного стресса (введения бактериального липополисахарида), умеренного экстероцептивного стресса, а также их комбинированного воздействия.
3. Исследовать состояние микро- и астроглии в мозге мышей с нокаутом рецептора второго типа кортикотропин-рилизинг фактора после хронического интероцептивного и умеренного экстероцептивного стресса, а также их комбинированного воздействия.

### **Научная новизна**

В работе впервые показано, что в результате хронического эмоционально-болевого стресса в гиппокампе крыс увеличивается число микроглиальных клеток, причем это увеличение сохраняется через месяц после окончания стрессирования.

Впервые показано, что после двухнедельного эмоционально-болевого стресса уменьшается GFAP-иммунореактивность астроцитов в поле СА3 гиппокампа, но

не в поле CA1 гиппокампа или хилусе зубчатой фации. При этом через месяц после окончания стрессирования GFAP-иммунореактивность астроцитов в поле CA3 гиппокампа возвращается к контрольному уровню.

В работе впервые продемонстрированы различия в развитии процесса нейровоспаления в ответ на разные виды стрессирования у мышей дикого типа и мышей, нокаутированных по рецептору кортикотропин-рилизинг фактора. После хронического интероцептивного стресса у мышей дикого типа число микроглиальных клеток увеличивается в хилусе зубчатой фации, а у нокаутированных мышей в поле CA3; после умеренного экстероцептивного стресса у мышей дикого типа не наблюдается изменения числа микроглиальных клеток в гиппокампе, а у нокаутированных мышей их число увеличивается в поле CA3. Учитывая, что увеличение числа микроглиальных клеток отражает развитие нейровоспаления, можно предположить, что нокаутирование гена рецептора CRFR2 изменяет чувствительность структур гиппокампа к провоспалительным факторам: хилус зубчатой фации становится более устойчивым к хроническому интероцептивному стрессу, а поле CA3 - менее устойчивым. Впервые показано, что хронический интероцептивный стресс приводит к уменьшению иммунореактивности астроцитов в поле CA1 гиппокампа мышей. При этом у мышей дикого типа оно наблюдается только в случае подкрепления хронического интероцептивного стресса умеренным экстероцептивным, а у нокаутированных мышей – наоборот, наблюдается только после хронического интероцептивного стресса.

Впервые показано, что реакция микроглии у грызунов не зависит от модальности стресса: увеличение числа микроглиальных клеток происходит в ответ как на экстеро-, так и на интероцептивный хронический стресс. В то же время изменения астроглии более специфичны к типу воздействия. Впервые выявлено, что реакция микроглии и астроцитов на хронический стресс, как правило, реципрочно.

### **Теоретическая и практическая значимость**

В представленной работе было проведено сравнение эффектов стрессов двух принципиально различных типов, что позволило выявить общие черты в процессах нейровоспаления, вызванных разными (внутренними или внешними) стимулами. Выявлено, что пролиферация микроглии в гиппокампе мышей не является стресс-специфичной, но зависит от силы стрессора. При этом реакция астроцитов в мозге мышей на стресс может быть различной (как увеличение, так и уменьшение клеток), и зависит не только от силы стрессора, но и от модальности стресса. Таким образом, проведенное исследование существенно расширяет представление о цитоархитектонических изменениях ткани мозга в результате действия стрессогенных факторов и вносит важный вклад в понимание клеточных механизмов стресс-реактивности мозга и вызванного стрессом нарушения функционирования мозга.

Полученные данные о постстрессорных изменениях глии позволяют более полно понять механизмы развития и протекания процессов нейровоспаления, которые, как принято считать в настоящее время, являются одним из пусковых механизмов нейродегенерации. Знание механизмов развития нейровоспаления принципиально важно для понимания особенностей патогенеза и последующей разработки методов патогенетически обоснованной коррекции социально значимых нейродегенеративных заболеваний (болезни Альцгеймера, Паркинсона и др.).

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Хронический стресс различной модальности (экстеро- и интероцептивный) вызывает пролиферацию микроглии в гиппокампе грызунов.
2. Хронический стресс приводит к уменьшению GFAP-иммунореактивности в гиппокампе грызунов или не влияет на нее. Эта реакция астроцитов зависит от типа стресса и от генетически predetermined состояния гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы.

### **Апробация работы**

Основные результаты работы доложены на Международном симпозиуме «Иммунная система мозга: нейрохимические и нейроэндокринные аспекты» (Ереван, 2010), XVII научной конференции «Ломоносов-2010» (Москва, 2010), XIV Пущинской школе-конференции (Пущино, 2010), Международной школе COSTB30 «Клеточная нейропатология: in vitro модели» (Киев, 2010), на 7 и 8 Форумах FENS (Амстердам, 2010; Барселона, 2012), XXI Съезде Физиологического общества им. И.П.Павлова (Калуга, 2010), Конференции молодых ученых (Санкт-Петербург, 2010), 8 Конгрессе IBRO (Флоренция, 2011), 23 Съезде ISN/ESN (Афины, 2011), конференции «Нейрохимические подходы к исследованию функционирования мозга» (Ростов-на-Дону, 2011), 2 молодежной школе Бион (Нижний Новгород, 2011), 2 Всероссийской конференции «Гиппокамп и память: норма и патология» (Пущино, 2012).

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация содержит следующие основные разделы: введение, обзор данных литературы, главы результатов собственных исследований и их обсуждение, заключение, выводы и библиографический указатель, включающий работы на русском (19) и английском (82) языках. Диссертация изложена на 90 страницах, содержит 5 таблиц и 21 рисунок.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**Работа с животными.** В работе использовано 155 самцов крыс линии Вистар и 29 мышей двух генетических линий: 12 дикого типа (C57BL/6, WT) и 17 нокаутированных по гену CRFR2 (KO). Животных содержали при свободном доступе к воде и пище. В виварии поддерживали искусственный световой режим (12:12). Протоколы экспериментов были одобрены этической комиссией ИВНД и НФ РАН.

**Экстероцептивный стресс** представлял собой комбинированное воздействие астенизирующего белого шума и неожиданного электрокожного раздражения,

сопровожающего вспышки стробоскопа с вероятностью 0,5 [Hecht et al., 1977, Левшина с соавт., 1985]. Стрессирование осуществляли в течение 17 дней. За две недели до начала стрессирования, сразу после и через месяц после окончания стрессирования проводили батарею поведенческих тестов. Две группы животных подвергали хроническому эмоционально-болевному стрессу и декапитировали через день (ХЭС1, n=40) и через месяц (ХЭС2, n=12) после окончания стрессирования. Другие две группы интактных животных служили контролем: К1, n=25, и К2, n=8, и были декапитированы одновременно с группами ХЭС1 и ХЭС2 соответственно. За две недели до начала стрессирования проводили тесты «открытое поле», «темно-светлая камера» и «приподнятый крестообразный лабиринт» для рандомизации животных по группам. Сразу после и через месяц после окончания стрессирования повторно проводили эти тесты и тест «вынужденное плавание» для оценки психофизиологического состояния животных.

**Интероцептивный стресс** моделировали введением мышам WT и KO бактериального липополисахарида (ЛПС) из E.coli (Sigma, США) в дозе 0,5 мг/кг внутрибрюшинно каждые 48 часов, всего было произведено 10 инъекций. **Умеренный экстероцептивный стресс** реализовывали в результате последовательным проведением поведенческих тестов возрастающей стрессогенности: «темно-светлая камера», «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт», «вынужденное плавание» и «подвешивание за хвост». Результаты этих тестов использовали для оценки эмоционального состояния животных (в т.ч. тревожности и депрессивности). Группы животных: ХИС, подвергнутые хроническому интероцептивному стрессу (n=3 WT, n=5 KO); УЭС, подвергнутые умеренному экстероцептивному стрессу (n=3 WT, n=3 KO); ХИС+УЭС, подвергнутые вначале хроническому интероцептивному, а затем умеренному экстероцептивному стрессу (n=3 WT, n=4 KO); К, контрольные,

получавшие дозу изотонического раствора (n=3 WT, n=5 KO) эквивалентного объема.

После окончания эксперимента мозг фиксировали, и изготавливали фронтальные срезы, которые окрашивали по методу Ниссля для **гистологического анализа** или иммуногистохимически для **количественного анализа глии**. Для выявления микроглии использовали антитела к белку Iba-1 (Waco, Япония) или Isolectin B<sub>4</sub> (Sigma, США), для выявления астроглии - антитела к глиальному фибриллярному кислом белку (GFAP) (Dako, Дания). Оценку плотности иммуногистохимически окрашенных клеток проводили полуавтоматическим методом [Тишкина, 2009] по микрофотографиям, полученным с помощью микроскопа Leica DM6000 B, CCD-камеры Leica DFC310 FX и объектива 20× (цифровая апертура 0,5). На фиксированной площади подсчитывали число клеток, среднюю площадь клетки и иммунореактивность ткани (произведение числа клеток на среднюю площадь клетки).

**Статистическую обработку** проводили с помощью программного пакета Statistica 9.0 (StatSoft, США). Для анализа использовали тесты Краскела-Уоллеса, Манна-Уитни и Вилкоксона, отличия считали достоверными при  $p < 0.05$ .

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

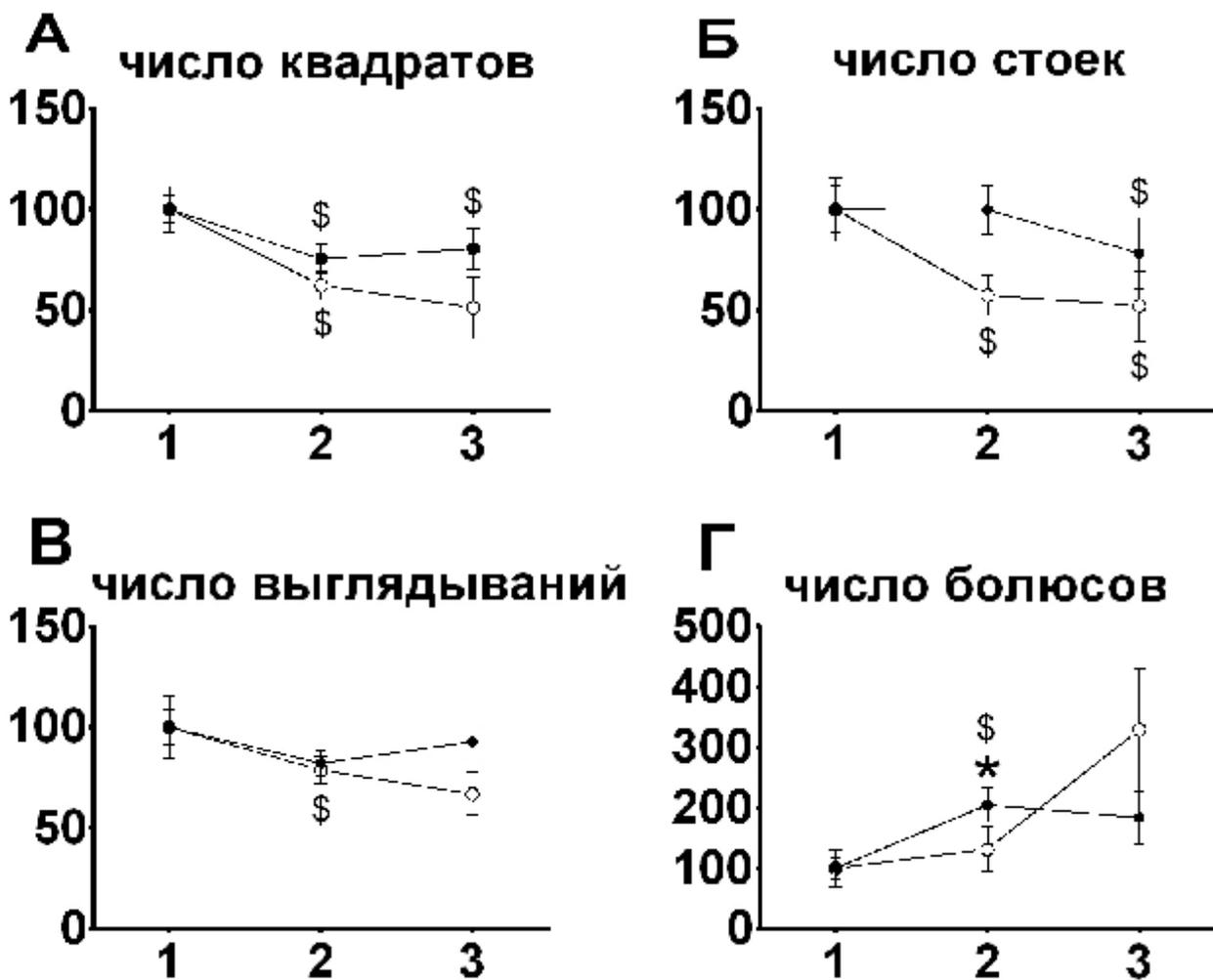
### **1. Сравнение реакции глии гиппокампа грызунов в ответ на стресс различной модальности**

Гиппокамп – одна из наиболее чувствительных к стрессу структур мозга. Стресс приводит к изменению паттерна экспрессии синаптических белков, факторов транскрипции и ростовых факторов в гиппокампе [Alfonso *et al.*, 2005]. Под действием стресса происходят морфологические изменения нейронов (напр. ретракция дендритов пирамидных нейронов) [Conrad, 2008], изменяются долговременная потенция [Kim *et al.*, 2006] и процесс нейрогенеза [Dranovsky & Leonardo, 2012]. Эти изменения приводят к нарушению механизмов пластичности в гиппокампе и связанных с ними форм памяти [Howland, Wang, 2008].

Чувствительность этой структуры к стрессу связывают, в первую очередь, с взаимодействием глюкокортикоидов с их рецепторами, плотность которых в гиппокампе высока [Lupien & Lepage, 2001]. Поскольку нейровоспаление может возникать в ответ как на интеро-, так и на экстероцептивный стимул (при достаточной силе стрессора), представляло интерес сравнение этих двух модальностей стресса по степени индукции глиальной (нейровоспалительной) реакции. Сравнение эффектов стрессирующих факторов различной модальности затруднено тем, что гипоталамо-гипофизарно-адреналовая и иммунная системы вносят различный вклад в стресс-реакцию при разных типах стресса. Мы использовали хронический эмоционально-болевого стресс в качестве модели хронического экстероцептивного стресса (ХЭС) и хроническое введение липополисахарида (ЛПС) в качестве модели хронического интероцептивного стресса (ХИС). О степени воздействия стрессоров судили по изменениям в поведении стрессированных животных и по степени выраженности цитоархитектонических изменений.

### ***Изменения глии при хроническом экстероцептивном стрессе***

Для использованной модели ранее было показано, что к концу второй недели стрессирования состояние крыс характеризуется измененным уровнем окислительного стресса в мозге и локального мозгового кровотока [Гуляева с соавт., 1988], при этом соотношение исследованных показателей соответствует стадии долгосрочной адаптации по Г. Селье [Селье, 1982]. При этом поведение стрессированных крыс практически не отличается от такового контрольной группы, указывая на адаптированность животных. Действительно, после двухнедельного стрессирования мы не наблюдали различий между группами К1 и ХЭС1 по показателям двигательной и исследовательской активности (рис. 1). Уровень тревожности и депрессивности, оцениваемый по показателям тестов «темно-светлая камера», «приподнятый крестообразный лабиринт» и «вынужденное плавание», также не различался между этими двумя группами.



**Рис. 1. Поведение в тестах «открытое поле» (А, Б, Г) и «темно-светлая камера» (В): эффекты ХЭС (% от показателей контрольной группы).**

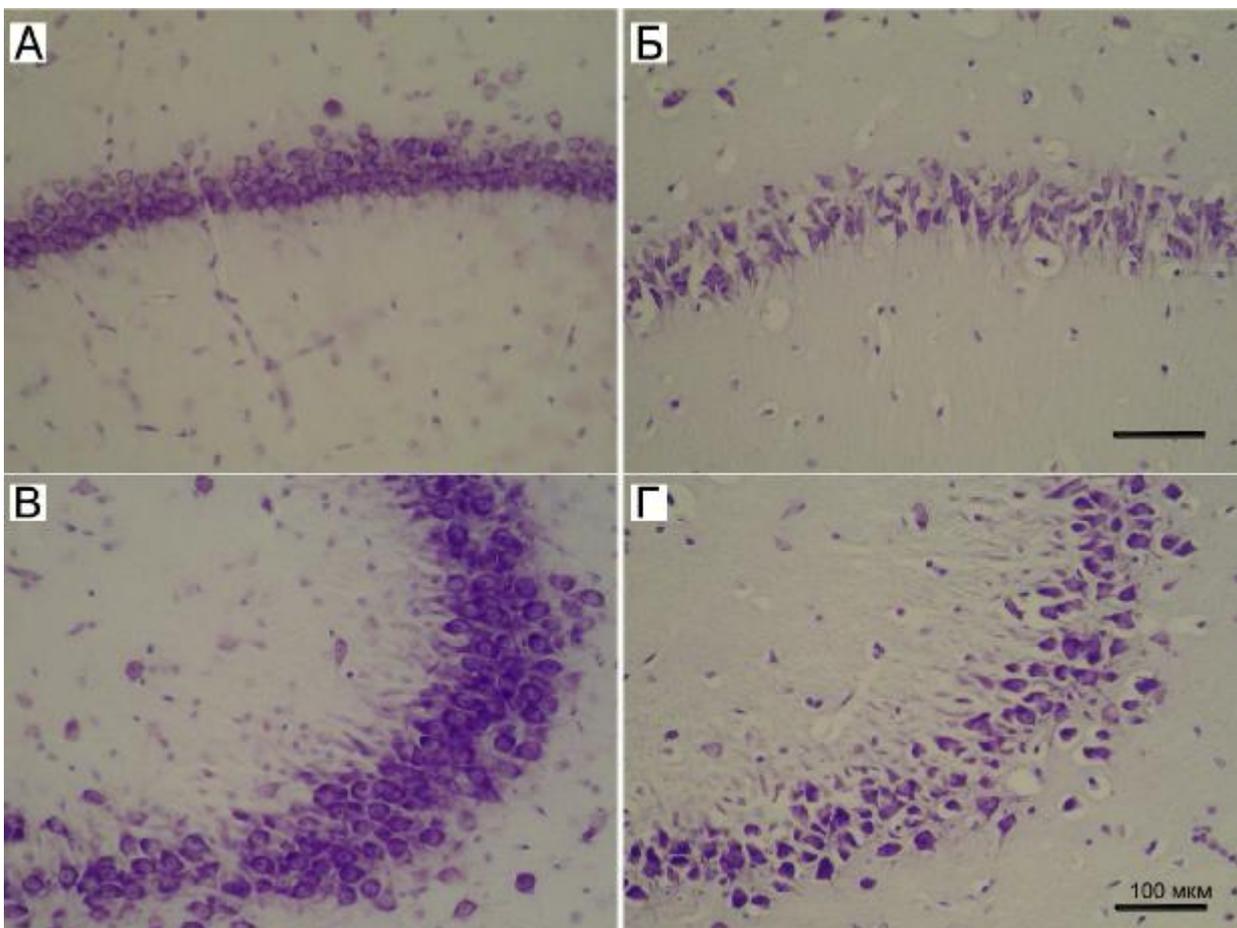
Белые кружки: К1 (2), К2 (3); темные кружки: ХЭС1 (2), ХЭС2 (3).

Точки 1, 2 и 3 – до, через день и через месяц после ХЭС, соответственно.

\* -  $p < 0.05$  по сравнению с контролем, \$ -  $p < 0.05$  по сравнению с показателем до стресса.

Достоверным эффектом хронического эмоционально-болевого воздействия было увеличение числа дефекационных болюсов в группе ХЭС1 по сравнению с этим показателем в группе К1. Это может свидетельствовать об изменении реактивности вегетативной нервной системы, тем более, что ранее на этой модели

хронического стресса были получены данные о соответствующих изменениях артериального давления и индекса Хильдебранта [Гуляева, 1989]. Было также выявлено умеренное ухудшение реакции угашения на знакомую обстановку в тесте «открытое поле»: у крыс группы К1 наблюдалось уменьшение числа пересеченных квадратов и числа стоек при повторном тестировании, в то время как в группе ХЭС1 число стоек осталось на том же уровне, что и до стрессирования (рис. 1).



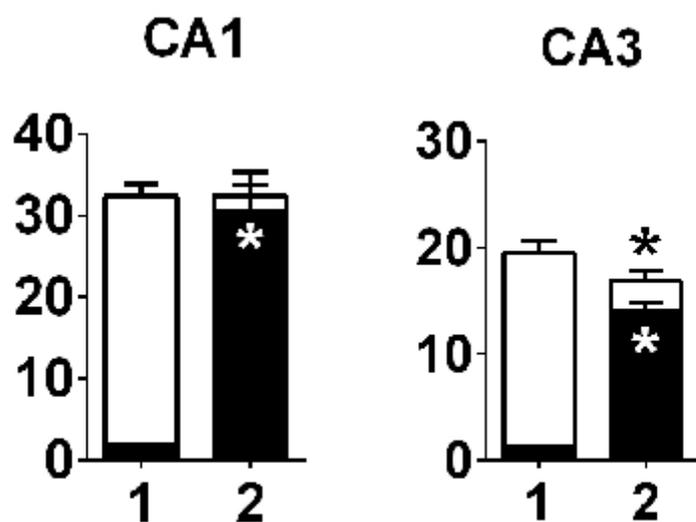
**Рис. 2. Изменения цитоархитектоники гиппокампа после ХЭС.**

Окрашивание по методу Ниссля. А, В: К1; Б, Г: ХЭС1. А, Б – СА1; В, Г – СА3.

Шкала – 100 мкм.

Хронический эмоционально-болевой стресс вызывал в гиппокампе значительное увеличение числа нейронов с измененным функциональным

состоянием, которое характеризовалось измененной (сморщенной) формой тела, более темным (ацидофильным) окрашиванием, иногда извитыми или утолщенными апикальными дендритами (рис. 2). При этом наблюдали небольшое, но достоверное уменьшение общего числа нейронов в группе ХЭС1 по сравнению с группой К1 в поле СА3 гиппокампа (около 7%) (рис. 3). Число глиальных клеток, нейроно-глиальный индекс и число сателлитных глиальных клеток не различались между группами ХЭС1 и К1. Кроме изменений клеток мозга, мы наблюдали также извитость и отечность сосудов, свидетельствующие об изменении их тонуса, а также расслоение между молекулярным и клеточным (пирамидным или гранулярным) слоями в поле СА3 и в хилусе зубчатой фасции.

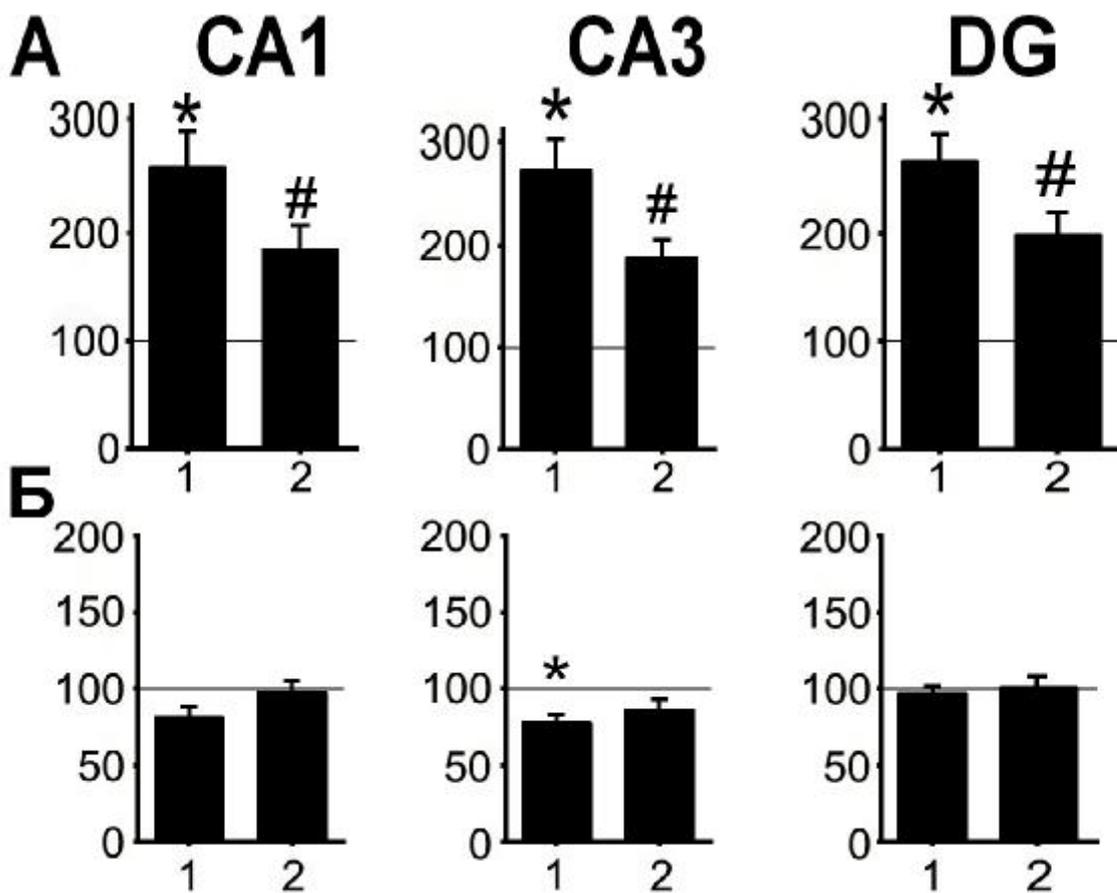


**Рис. 3. Доля нейронов с измененным функциональным состоянием в норме и после ХЭС.**

Белые столбики – общее число нейронов, черные – число нейронов с измененным функциональным состоянием. 1: К1; 2: ХЭС1. \* -  $p < 0.05$  по сравнению с показателем в контроле.

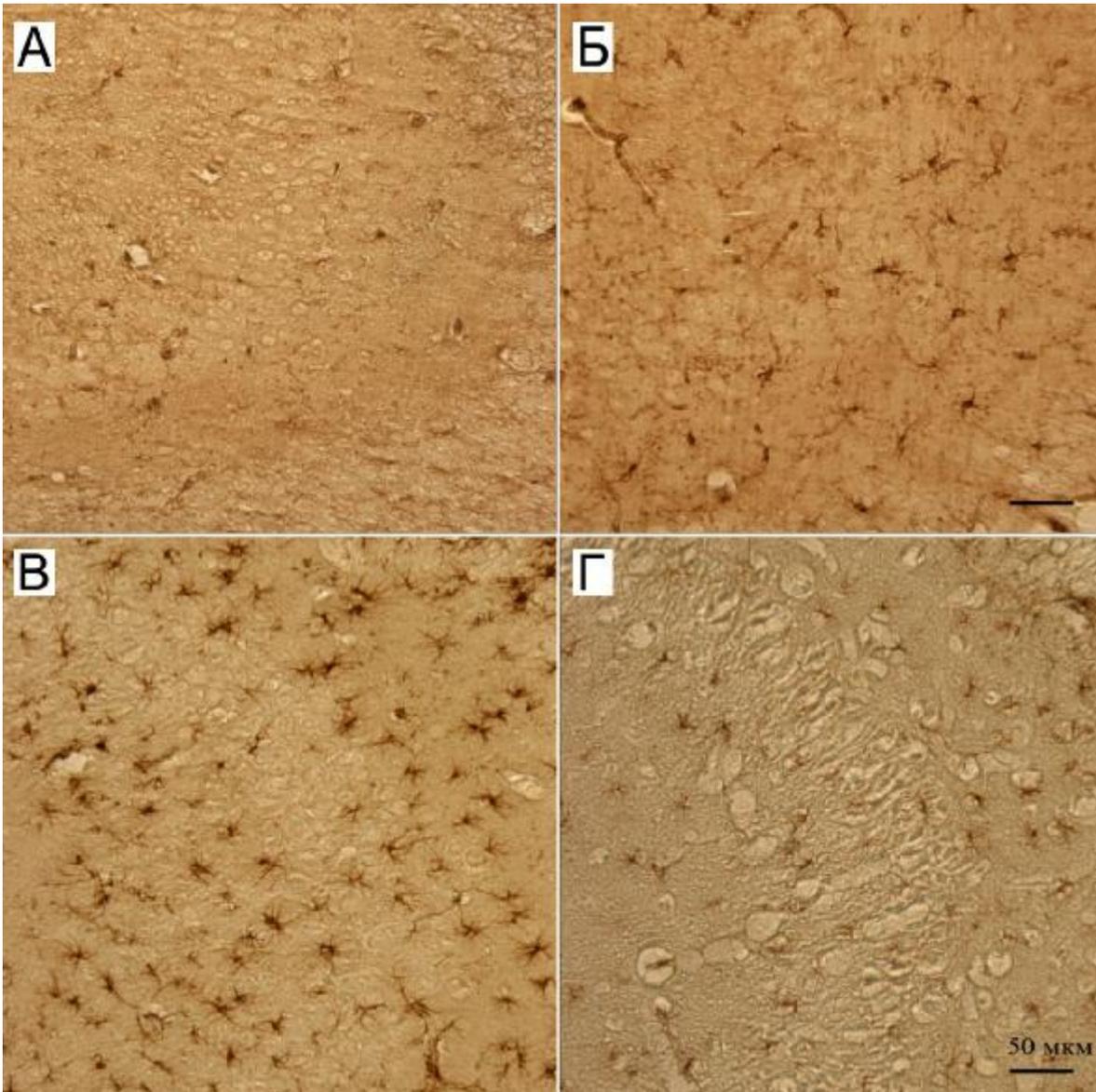
При окрашивании методом TUNEL, мы не обнаружили признаков апоптоза клеток мозга. Действительно, ранее было показано уменьшение активности каспазы-3 в гиппокампе крыс после двухнедельного экстероцептивного стресса [Айрапетянц с соавт., 2006], которое свидетельствует об отсутствии классических

апоптотических процессов нейрональной гибели. Интересно, что на этой же модели ХЭС было показано уменьшение экспрессии мРНК белков, связанных с нейрональной пластичностью (белка нейрональной адгезии-1 и ламинина-1 $\beta$ ) [Пискунов, 2011], что может быть дополнительным свидетельством нейродегенеративных изменений.



**Рис. 4.** Изменение числа микроглиальных (А) и астроглиальных (Б) клеток после ХЭС на следующие сутки и через месяц после окончания стрессирования (% от контроля).

1: ХЭС1; 2: ХЭС2. \*-  $p < 0.05$ ; # -  $p < 0.1$  по сравнению с контролем.



**Рис. 5. Реакция глии поля СА3 гиппокампа на ХЭС.**

А, В: К1; Б, Г: ХЭС1. А, Б: микроглия (Iba-1-позитивные клетки); В, Г: астроциты (GFAP-позитивные клетки). Шкала – 50 мкм.

Наблюдаемые изменения нейронов сопровождались значительным увеличением числа микроглиальных клеток в гиппокампе (в полях СА1 и СА3 гиппокампа и в хилусе зубчатой фассии) (рис. 4). На срезах мозга животных группы ХЭС1 окрашивание клеток микроглии было более интенсивным, сома клетки имела

больший размер, чем в группе К1. В мозге стрессированных животных были обнаружены очаги воспаления - скопления микроглиоцитов, возможно, в местах диапедеза. Астроцитарные изменения были выражены в меньшей степени, чем микроглиальные, однако GFAP-иммунореактивность поля СА3 была меньше в группе ХЭС1, чем в группе К1 (рис. 4, 5).

Ранее было показано, что использованная нами модель ХЭС характеризуется увеличением уровня интерлейкина-1 $\beta$ , фактора некроза опухоли- $\alpha$  и эритропоэтина в гиппокампе крыс [Пискунов, 2011]. Таким образом, наблюдаемое нами увеличение числа микроглиальных клеток в этой структуре подтверждает наличие воспалительных процессов в ткани мозга и указывает на микроглию как на потенциальный источник цитокинов.

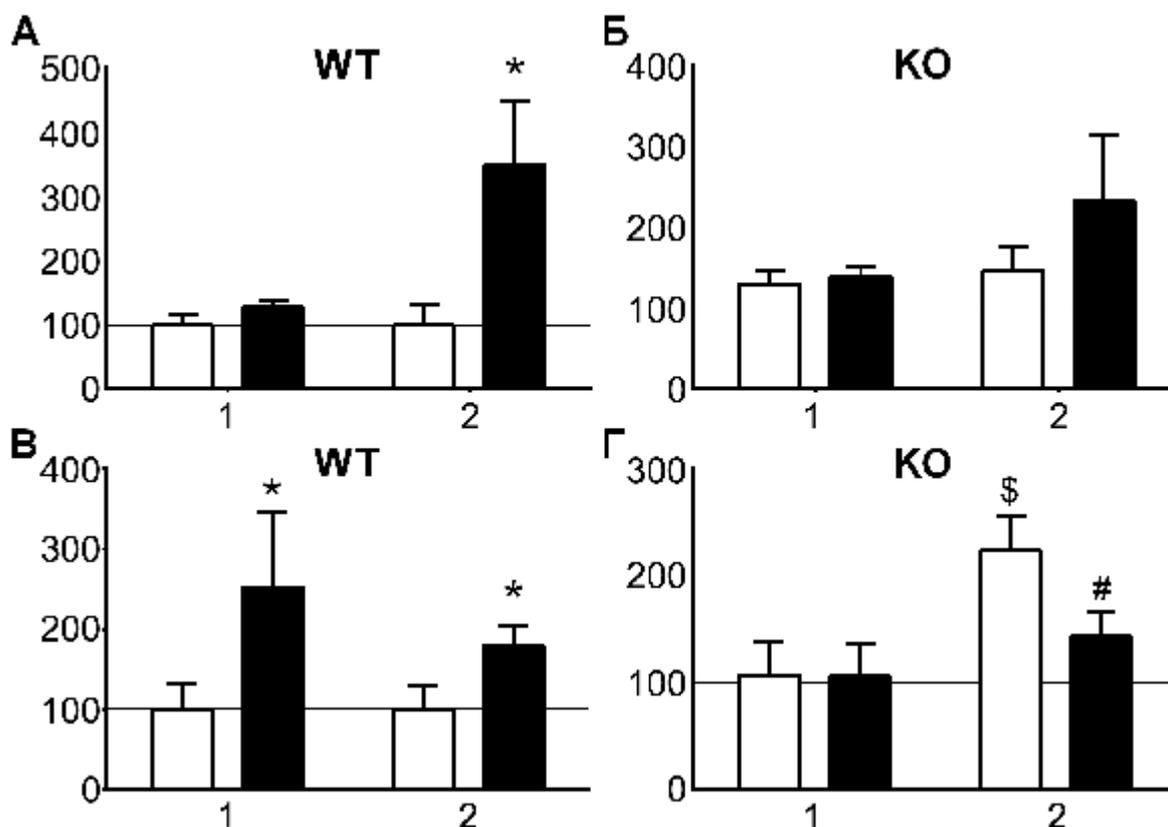
***Реакция глии на хронический интероцептивный, умеренный экстероцептивный стресс и их комбинированное действие у мышей дикого типа (WT)***

ХИС (хроническое введение ЛПС мышам) приводил к изменениям в поведении, вызывая уменьшение тревожности: мыши чаще выходили в центр в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт». Этот эффект не был связан с изменением двигательной активности (рис. 6А, 6В). Мы не наблюдали изменения реактивности вегетативной нервной системы, как это было отмечено при экстероцептивном стрессе.

Качественное гистологическое исследование срезов мозга, окрашенных по Нисслю, не выявило существенных морфологических изменений нейронов. Число измененных нейронов в группе ХИС не превышало этого показателя в группе К. По-видимому, ХИС не приводил и к столь сильным изменениям локального мозгового кровотока, как экстероцептивный стресс: не были отмечены перикапиллярные отеки, свидетельствующие об изменении тонуса сосудов.

Увеличение числа микроглиоцитов после ХИС было заметно уже при качественном иммуногистохимическом анализе некоторых структур мозга, например, хилуса зубчатой фасции гиппокампа (рис. 7). Количественный

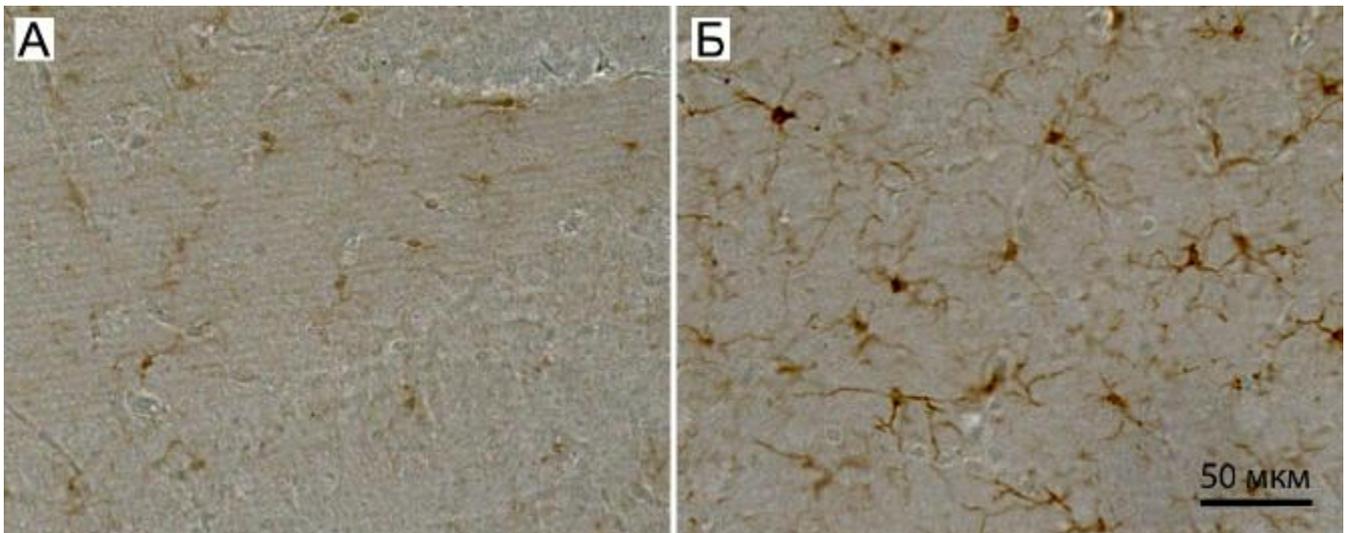
иммуногистохимический анализ подтвердил увеличение иммунореактивности микроглии в этой структуре. При этом мы не наблюдали изменения иммунореактивности астроцитов (рис. 8А).



**Рис. 6. Изменения поведения мышей после ХИС (% от К WT).**

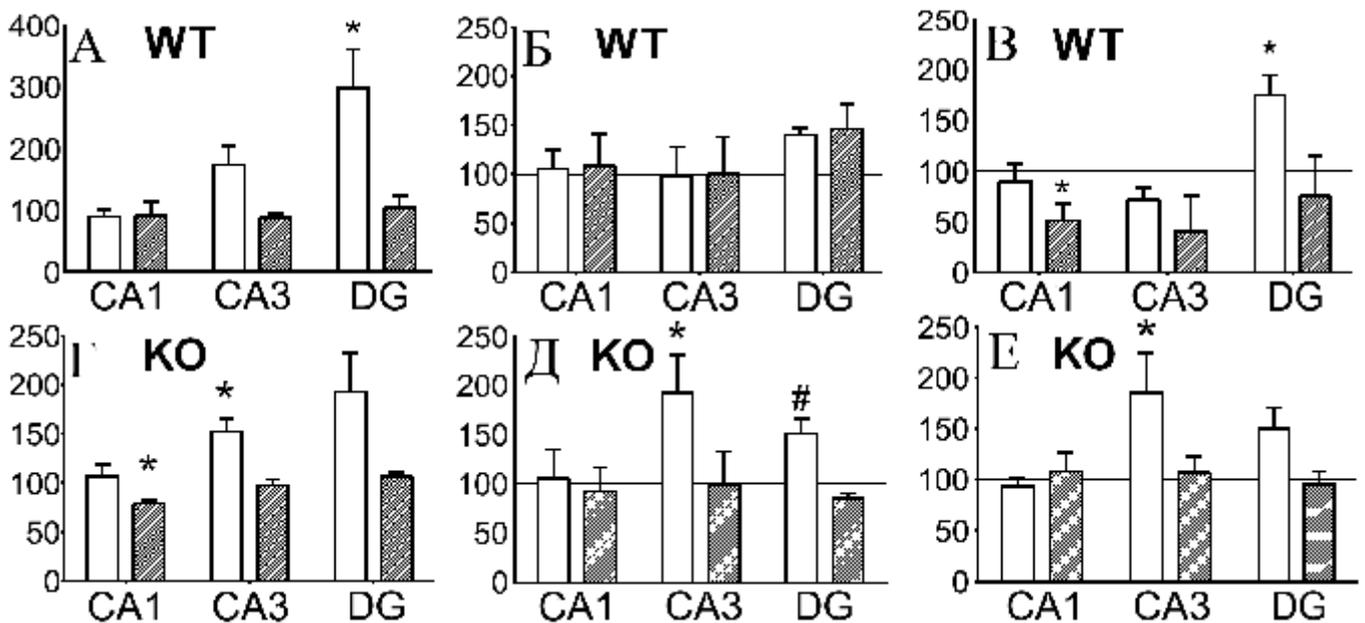
А, Б, тест «открытое поле»: 1 – пройденное расстояние, 2 – число выходов в центр. В, Г, тест «приподнятый крестообразный лабиринт»: 1 – время в открытых рукавах, 2 – время в центре. Белые столбики: К; черные столбики: ХИС. \* -  $p < 0,05$ , # -  $p < 0,10$  по сравнению с К, \$ -  $p < 0,05$  по сравнению с показателем у WT.

Умеренный экстероцептивный стресс (УЭС, проведение батареи поведенческих тестов увеличивающейся стрессогенности) не приводил к изменению иммунореактивности ни микроглии, ни астроцитов (рис. 8В).



**Рис. 7.** Реакция микроглии в хилусе зубчатой фации на ХИС.

А: К, Б: ХИС. Иммуногисто-химическое окрашивание с использованием антител к белку Iba-1. Шкала – 50 мкм.



**Рис. 8.** Изменение микроглии (белые столбики) и астроглии (заштрихованные столбики) после различных стрессорных воздействий (% от К WT).

А, Г: ХИС; Б, Д: УЭС; В, Е: ХИС+УЭС.

А, Б, В: WT; Г, Д, Е: КО. \* -  $p < 0.05$ , # -  $p < 0.1$  по сравнению с К WT.

Комбинированное действие хронического введения ЛПС и УЭС сопровождалось увеличением иммунореактивности микроглии (в хилусе зубчатой фасции) и уменьшением иммунореактивности астроцитов (в поле гиппокампа СА1) (рис. 8Д).

Хронический стресс как экстеро-, так и интероцептивный приводил к увеличению числа микроглиоцитов в гиппокампе. При этом при стрессе обеих модальностей реакция астроцитов была выражена слабее, чем реакция микроглии (табл. 1).

## **2. Отдаленный эффект ХЭС на глию гиппокампа крыс**

Для исследования отдаленного эффекта ХЭС крыс после окончания стрессирования оставляли на месяц в домашних клетках. Через месяц после окончания стрессирования поведение крыс группы ХЭС2 не отличалось от поведения крыс группы К2 (рис. 1). При качественном анализе цитоархитектоники гиппокампа крыс группы ХЭС2 было обнаружено лишь незначительное число нейронов с патологическими изменениями, не отличающееся от этого показателя в группе К2. Количественный иммуногистохимический анализ показал, что Iba-1-иммунореактивность микроглии в группе ХЭС2 оставалась повышенной по сравнению с группой К2 во всех трех исследованных областях гиппокампа, но только на уровне тенденции (рис. 4). В соответствии с этим фактом, уровни интерлейкина-1 $\beta$  и фактора некроза опухоли- $\alpha$  также были повышены в гиппокампе крыс группы ХЭС2 по сравнению с уровнями этих факторов в группе К2. Уровень эритропоэтина на этом сроке не различался между этими двумя группами [Пискунов, 2011]. GFAP-иммунореактивность астроцитов во всех трех областях гиппокампа в группе ХЭС2 не отличалась от этого показателя в группе К2.

Таким образом, через месяц после окончания стрессирования значительно снизилось число темных нейронов и исчезли изменения астроцитарной глии,

которые наблюдали сразу после окончания стрессирования. При этом оставались повышенными число микроглиальных клеток (на уровне тенденции) и уровень цитокинов (интерлейкина-1 $\beta$  и фактора некроза опухоли- $\alpha$ ), что позволяет предположить наличие нейровоспаления и через месяц после окончания стрессирования (табл. 2).

**Табл. 1. Реакция глии гиппокампа на стрессирующие воздействия различной модальности.**

Тип стресса	Микроглия	Астроглия
ХЭС	↑ CA1, CA3, DG	↓ CA3
ХИС	↑ DG	-
УЭС	-	-
ХИС+УЭС	↑ DG	↓ CA1

**Табл. 2. Реакция глии гиппокампа на хронический экстероцептивный стресс через сутки и через месяц после окончания стрессирования.**

Группа	Микроглия	Астроглия
ХЭС1	↑ CA1, CA3, DG	↓ CA3
ХЭС2	↑ CA1, CA3, DG (p<0.10)	-

### 3. Влияние нокаута CRFR2 на реакцию глии в ответ на ХИС, УЭС и их комбинированное действие

Кортикотропин-рилизинг фактор является важным участником стресс-реакции. Показано, что у мышей с нокаутом гена рецептора второго типа кортикотропин-рилизинг фактора (CRFR2) после стрессирующего воздействия более резко увеличивается и дольше держится повышенным уровень адренкортикотропного гормона в крови [Bale & Vale, 2004]. Однако при отсутствии стрессоров нокаутированные мыши мало отличаются от мышей дикого типа. Так, например, по показателям поведения мы обнаружили немногие различия между мышами дикого типа (WT) и нокаутированными (KO): в тесте «открытое поле» мыши КО делали больше стоек, а в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» больше времени проводили в центре и меньше в закрытых рукавах, чем мыши WT.

Рецептор CRFR2 обнаружен в гиппокампе (поля CA1 и CA3), латеральном септуме, базолатеральном и медиальном ядрах миндалины, паравентрикулярном ядре и ядре ложа конечной полоски [Joels & Baram, 2009]. Был проведен иммуногистохимический анализ всех этих структур. Учитывая, что эти структуры являются частью лимбической системы мозга, представляло интерес проследить вовлечение эмоциогенных структур в ответ на интероцептивный стресс, изначально не имеющий эмоциогенной составляющей. Количественный иммуногистохимический анализ не выявил базальных различий по числу микроглиальных и астроцитарных клеток в этих структурах у мышей с разными генотипами. Однако влияние различий на генетическом уровне между мышами WT и КО проявилось при предъявлении стрессора. Например, у мышей КО значительно слабее было выражено изменение поведения после хронического введения ЛПС, чем у мышей WT. В тесте «открытое поле» не было выявлено достоверных различий между группами ХИС КО и К КО; в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» наблюдали только тенденцию к увеличению времени пребывания в закрытых рукавах. Единственным достоверным отличием поведения мышей КО после хронического введения ЛПС было увеличение амплитуды раскачивания в тесте «подвешивание за хвост». У мышей КО мы не выявили такого уменьшения тревожности после хронического введения ЛПС, какое наблюдали у мышей WT (рис. 6Б, 6Г).

Если по показателям поведения реакция нокаутированных мышей на ХИС была выражена слабее, то по гистологическим показателям, наоборот, клеточные изменения были выражены ярче у мышей КО, чем у мышей WT (рис. 8). Так, у мышей КО после хронического введения ЛПС мы наблюдали изменения не только по числу микроглиальных клеток, но и по числу астроцитов (рис. 8Б). Число микроглиальных клеток у мышей КО статистически достоверно увеличилось в поле CA3 гиппокампа, базомедиальном ядре миндалины и в энторинальной коре, а средняя площадь клетки - в вентролатеральном ядре септума. Число астроцитов и

средняя площадь клетки статистически достоверно уменьшились в поле гиппокампа CA1, а в медиальном септуме число GFAP-позитивных клеток увеличилось.

После УЭС мы наблюдали увеличение числа микроглиальных клеток у мышей КО в поле гиппокампа CA3 (рис. 8Г). При этом у мышей WT в ответ на это воздействие не было отмечено никакой глиальной реакции, т.е. глия мышей КО оказалась более стресс-реактивной в ответ и на этот вид стресса (Рис. 8В-Г). Как указано выше, у мышей с нокаутом CRFR2 наработка пиковой концентрации адренкортикотропного гормона в плазме крови происходит быстрее, и его повышенная концентрация держится дольше, чем у мышей дикого типа. Возможно, с этим связан тот факт, что в ответ на УЭС мы наблюдали активацию микроглии в гиппокампе у мышей КО, но не у мышей WT, т.к. активация микроглии связана с уровнем глюкокортикоидов в плазме крови. Хроническое введение ЛПС также вызывало у мышей WT активацию только микроглии, а у мышей КО кроме того и астроцитарные изменения, т.е. один и тот же интероцептивный стресс вызывал более выраженные цитоархитектонические перестройки у мышей с более активной реализацией стресс-реакции.

В ответ на комбинированное действие хронического введения ЛПС и умеренного экстероцептивного стресса у мышей КО увеличивалось число микроглиоцитов в поле CA3 гиппокампа и не изменялась GFAP-иммунореактивность астроцитов (рис. 8Е). В то же время у мышей WT именно этот тип воздействия вызывал наибольшую активацию как микро-, так и астроглии (табл. 3).

Таким образом, мыши КО с потенцированной системой стресс-реализации реагируют на стресс иначе, чем мыши дикого типа, несмотря на то, что базальные показатели у этих двух типов мышей значительно не различаются. Изменение реакции на стресс выражены и на уровне поведения, и на уровне глиальной реакции.

	Микроглия		Астроглия	
	WT	КО	WT	КО
ХИС	↑ DG	↑ CA3	-	↓ CA1
УЭС	-	↑ CA3	-	-
ХИС+УЭС	↑ DG	↑ CA3	↓ CA1	-

**Табл. 3. Сравнение реакции глии в ответ на стресс различной модальности у мышей дикого типа и мышей с измененной стресс-реакцией. WT – мыши дикого типа, КО – мыши с нокаутом CRFR2.**

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашем эксперименте все воздействия, кроме УЭС, приводили к увеличению микроглии в исследованных областях мозга. По-видимому, хронический стресс с большой вероятностью вызывает активацию микроглии в гиппокампе грызунов, вне зависимости от модальности (экстеро- или интероцептивный). Не всегда активации микроглии сопутствуют астроцитарные изменения: мы наблюдали изменения астроцитов только в ответ на экстероцептивный стресс у крыс и на комбинированное действие хронического интероцептивного и умеренного экстероцептивного стресса у мышей. Хронический интероцептивный стресс сам по себе вызывал реакцию астроцитов только у нокаутированных по рецептору второго типа кортикотропин-рилизинг фактора мышей, т.е. у животных с измененной стресс-реакцией. Таким образом, реакция астроцитов в гиппокампе при хроническом стрессе разной модальности зависит от типа стресса и от генетически предопределенного состояния гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы.

Принимая во внимание все вышесказанное, можно заключить, что пролиферация микроглии является более общим, не специфичным относительно типа хронического стресса процессом. В то же время изменения астроглии в ответ на хронический стресс являются более гибкой и специфической компонентой глиальной реакции. Проявление реакции астроглии зависит от многих факторов, в частности, от силы стрессора и состояния гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы.

## **ВЫВОДЫ**

1. Хронический (двухнедельный) экстероцептивный стресс у крыс вызывает умеренное уменьшение реакции угашения на знакомую обстановку.

2. Хронический экстероцептивный стресс вызывает увеличение числа нейронов с измененным функциональным состоянием, сопровождающееся увеличением числа микроглиоцитов (в полях СА1 и СА3 гиппокампа и в хилусе зубчатой фасции) и уменьшением иммунореактивности астроцитов (в поле СА3 гиппокампа).

3. Через месяц после окончания стрессирования число микроглиоцитов уменьшается, а GFAP-иммунореактивность астроцитов в поле СА3 гиппокампа возвращается к контрольному уровню.

4. Хронический интероцептивный стресс (введение бактериального липополисахарида) приводит к уменьшению тревожности мышей линии C57BL/6 (дикий тип) и сопровождается увеличением числа микроглиоцитов в хилусе зубчатой фасции. Умеренный экстероцептивный стресс (батарея поведенческих тестов с возрастающей стрессогенностью) не приводит к глиальным изменениям в мозге мышей, а комбинированное действие хронического интероцептивного и умеренного экстероцептивного стресса вызывает увеличение иммунореактивности микроглии в хилусе зубчатой фасции и уменьшение иммунореактивности астроцитов в поле СА1 гиппокампа.

5. Нокаутирование гена рецептора второго типа кортикотропин-рилизинг фактора (CRFR2) изменяет развитие нейровоспаления. У нокаутированных мышей хронический интероцептивный стресс вызывает увеличение числа микроглиоцитов в поле СА3 гиппокампа и уменьшение числа астроцитов в поле СА1 гиппокампа. Умеренный экстероцептивный стресс и комбинированное действие хронического интероцептивного и умеренного экстероцептивного стресса приводят к увеличению числа микроглии в поле СА3 гиппокампа.

6. У грызунов увеличение числа микроглиальных клеток происходит в ответ как на экстеро-, так и на интероцептивный хронический стресс, при этом изменения астроглии более специфичны к типу воздействия. Реакция микроглии и астроцитов на хронический стресс, как правило, реципрокна.

**Список опубликованных по теме диссертации статей:**

1. Тишкина А.О., Метод автоматического количественного анализа микрофотографий срезов мозга, Нейрохимия, 2009, т.26, №4, стр.341-347 (Tishkina A.O., A Method of Automated Quantitative Analysis of Brain Slices Microphotographs, Neurochemical Journal, 2009, V3, №4, PP309–313).
2. Тишкина А.О., Левшина И.П., Лазарева Н.А., Пасикова Н.В., Степаничев М.Ю., Айрапетянц М.Г., Гуляева Н.В., Хронический стресс вызывает неапоптотическую гибель нейронов в гиппокампе крыс, Доклады Академии Наук, 2009, т.428, №1, стр.130-134.
3. Tishkina A, Rukhlenko A, Stepanichev M, Levshina I, Pasikova N, Onufriev M, Moiseeva Y, Piskunov A, Gulyaeva N., Region-specific changes in activities of cell death-related proteases and nitric oxide metabolism in rat brain in a chronic unpredictable stress model, Metab Brain Dis., 2012, V27, №4, PP431-441.

По теме работы опубликовано 12 тезисов (6 на английском языке).

Работа поддержана грантами РФФИ 08-04-90013-Бел\_а, 10-04-90049-Бел\_а, 12-04-31575-мол\_а.

**Список использованных сокращений:**

CA1 и CA3 – поля гиппокампа

DG – хилус зубчатой фасции

GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок

CRFR2 – рецептор второго типа кортикотропин-рилизинг фактора

КО – мыши, с нокаутированным геном CRFR2

WT – мыши дикого типа (C57BL/6)

ЛПС – липополисахарид

ХИС – хронический интероцептивный стресс

ХЭС – хронический экстероцептивный стресс

УЭС – умеренный экстероцептивный стресс