

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Санкт-Петербургский государственный политехнический университет»
Кафедра «Биофизика»

Диссертация допущена к
защите

Зав.кафедрой, проф.

_____ Орлов Ю.Н.

"__" _____ 2014 г.

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени МАГИСТРА

Тема: Реакция клеток стриатума и гиппокампа на введение высоких доз
эндотоксина

Направление: 011200.68 – Физика

Магистерская программа: Биофизика

Выполнил студент гр. 63417

Харина О.В.

(подпись)

Руководитель, к.б.н.,
доц. каф. «Биофизика»

Карпенко М.Н.

(подпись)

Рецензент, к.б.н., н.с.
ЗАО «СПб институт фармации»

Крышень К. Л.

(подпись)

Санкт-Петербург 2014

Содержание

Список сокращений.....	4
1. Введение.....	5
2. Обзор литературы	
2.1. Липополисахарид как индуктор системного воспалительного процесса.....	8
2.2. Механизмы передачи периферического воспаления в ЦНС.....	13
2.3. Роль воспаления в развитии нейродегенеративных заболеваний....	14
2.4. «Воспалительные» модели БП.....	17
3. Материалы и методы	
3.1. Материалы.....	21
3.1.1. Животные.....	21
3.1.2. Препараты.....	21
3.1.3. Схема эксперимента.....	21
3.2. Методы.....	21
3.2.1. Измерение температуры животным.....	21
3.2.2. Индукция БП.....	21
3.2.3. Забор биологического материала.....	21
3.2.4. Выделение тотальной мРНК.....	21
3.2.5. Обратная транскрипция.....	22
3.2.6. Полимеразная цепная реакция в реальном времени (PCR Realtime).....	22
3.2.7. Фиксация.....	25
3.2.8. Обезвоживание материала и заливка в парафин.....	25
3.2.9. Изготовление срезов.....	25
3.2.10. Протокол проведения иммуногистохимической реакции на тирозингидроксилазу.....	26
3.2.11. Окрашивание нервной ткани по методу Ниссля.....	28
4. Результаты и обсуждения.....	29
5. Выводы.....	40
6. Список использованной литературы.....	41

Реферат

Реакция клеток стриатума и гиппокампа на введение высоких доз эндотоксина

Харина Ольга Владимировна

НИИЭМ СЗО РАМН

Липополисахарид, стриатум, гиппокамп, дегенерация, дофаминергические нейроны, провоспалительные цитокины.

44 страницы, 18 рисунков, 1 таблица, 48 источника.

В рамках выпускной работы магистра проведен анализ отдаленных последствий системного воспаления на состояние дофаминергических нейронов в стриатуме и гиппокампе крыс.

Основным бактериальным эндотоксином, обладающим антигенными свойствами высокой токсичности, является липополисахарид (ЛПС) - макромолекулярное соединение клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Системное введение ЛПС приводит к воспалительным процессам на периферии и в ЦНС, которые сопровождаются активацией лейкоцитов и макрофагов; стимуляцией продукции провоспалительных цитокинов (ФНО α , ИЛ-1 β , ИЛ-15, ИЛ-6), iNOS, COX-2 и других медиаторов.

Однако затем, через несколько месяцев, когда воспалительные процессы на периферии давно завершились, наблюдается дегенерация преимущественно дофаминергических нейронов, имеющих свои окончания в стриатуме

Показано, что в ответ на системное введение ЛПС в гиппокампе и стриатуме наблюдаются дегенеративные процессы, при этом способ введения эндотоксина не влияет на их течение.

Список сокращений

LBP – ЛПС-связывающий белок

ЧВ – черное вещество

ЦНС – центральная нервная система

ЛПС – липополисахарид

Iba-1 – маркер активированной микроглии

IL-6 – интерлейкин 6

ПОЛ – перекисное окисление пептидов

PBS – фосфатно-солевой буфер

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

БП - болезнь Паркинсона

TNF- α – фактор некроза опухоли-альфа

TLR – Toll-подобный рецептор

iNOS – индуцибельная NO-синтаза

IL-1 β – интерлейкин 1-бета

GAPDH - дегидрогеназа глицеральдегид-3-фосфата

DA-ергический - дофаминергический

COX-2 – циклооксигеназа-2

1. Введение

Дегенерация дофаминергических нейронов черной субстанции лежит в основе патогенеза болезни Паркинсона (БП) – одного из самых распространенных нейродегенеративных заболеваний. Несмотря на почти 200-летний период исследования БП, конкретная причина дегенерации дофаминергических нейронов до сих пор не установлена. В качестве возможных экзогенных факторов, участвующих в развитии БП, рассматриваются вирусы и бактерии. Основным бактериальным эндотоксином, обладающим антигенными свойствами высокой токсичности, является липополисахарид (ЛПС) - макромолекулярное соединение клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Системное введение крысам высоких доз (1 мг/кг веса животного) ЛПС приводит к развитию воспалительной реакции на периферии и в ЦНС, в случае введения сублетальных доз эндотоксина (3-5 мг/кг веса животного) развивается гипотермия и острая полиорганная недостаточность. На молекулярно-клеточном уровне эти процессы сопровождаются активацией лейкоцитов и макрофагов; стимуляцией продукции провоспалительных цитокинов (ФНО α , ИЛ-1 β , ИЛ-15, ИЛ-6), iNOS, COX-2 и других медиаторов; активацией синтеза белков острой фазы; активацией системы комплемента, тромбоцитов и факторов свертывания крови. Так же было показано, что в ответ на системное введение ЛПС изменяется профиль экспрессии некоторых генов в клетках ЦНС: увеличивается концентрация провоспалительных цитокинов, индуцируется экспрессия iNOS, COX-2.

Однако затем, через несколько месяцев, когда воспалительные процессы на периферии давно завершились, наблюдается дегенерация преимущественно дофаминергических нейронов, имеющих свои окончания в стриатуме.

До сих пор неизвестно, с помощью каких молекулярных и клеточных механизмов периферическое воспаление может приводить к избирательной,

отсроченной и прогрессирующей гибели дофаминергических нейронов в черном веществе. Разобраться в этом может помочь региональный и временной анализ ответа клеток ЦНС на ранних этапах после индукции системного воспалительного процесса.

Целью работы являлось выявление отдаленных последствий системного воспаления на состояние дофаминергических нейронов в стриатуме и гиппокампе крыс Wistar.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Определить уровни мРНК провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF- α), iNOS и IBA-1 в стриатуме и гиппокампе крыс на разных сроках после введения ЛПС.
2. Выявить морфологические изменения в черном веществе и в гиппокампе крыс, вызванные системным введением ЛПС.
3. Сопоставить эффекты ЛПС при его интраперитонеальном и интраназальном способе введения.

2. Обзор литературы

2.1. Липополисахарид как индуктор системного воспалительного процесса

Липополисахарид (ЛПС) является основным компонентом клеточной стенки грамотрицательных бактерий.

Молекула ЛПС состоит из трех структурных компонентов[1]:

1. Липид А;
2. Гидрофильного полисахаридного кора;
3. Повторяющейся олигосахаридной цепи О-антигена.

Липид А – гидрофобная липидная часть, которая заякоривает молекулу ЛПС в бактериальной мембране. Основная часть – дисахарид, построенный из двух фосфорилированных молекул глюкозамина, соединенных между собой β (1→6) связью, и шести ацильных остатков. Липид А является наиболее консервативной частью липополисахаридов и имеет сходную структуру у большинства изученных микроорганизмов.

Кор группируется в две области: внешнюю и внутреннюю. Внутренняя часть кора состоит из остатков высших сахаров, таких как 3-дезоксид-D-манно-окт-2-улозоловой кислоты и гептулозы. Гликаны, которые увеличивают отрицательный заряд мембраны и стабилизируют структуру бактерии, обычно содержат фосфатные группы. Внешняя, удаленная от липида А, часть содержит гексозы и N-ацетилглюкозамин.

О-антиген – олигосахарид, экспонированный в окружающую среду. Он состоит из повторяющихся двух-шести сахарных остатков.

ЛПС обеспечивает структурную целостность бактерии и защищает от вредных химических воздействий, таких как, липофильные антибиотики, соли. Так же он обладает адгезивными свойствами.

Передача сигнала от ЛПС внутрь клетки осуществляется с помощью ЛПС-связывающего белка (LBP) и комплекса рецепторов CD14/TLR4/MD2. TLR4 – основной рецептор, распознающий ЛПС, относится к семейству Toll-подобных рецепторов, которые узнают различные маркеры

микроорганизмов, например, консервативную структуру клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Рецептор данного типа может узнавать не только бактериальные антигены, но и элементы мембран нейронов [2]. TLR4 продуцируется не только антигенпрезентирующими, но и другими типами клеток, такими как нейроны, мышечные клетки, клетки эндотелия [3, 4, 5]. Однако высокая экспрессия TLR4 характерна в большей степени для микроглии и макрофагов, которые, в свою очередь, играют центральную роль в иммунном ответе [6]. Стоит отметить, что рецепторы данного типа участвуют в патогенезе нейродегенеративных заболеваний [7, 8].

Для распознавания и передачи сигнала с TLR4 необходимо наличие вспомогательных белков – LBP, CD14 и MD-2. Сначала LBP, который находится на поверхности клеток и в крови, связывает ЛПС и доставляет его к свободным или мембранно-связным рецепторам CD14. CD14 может находиться как в мембрансвязанной, так и в растворимой формах. Для облегчения переноса эндотоксина к TLR4/MD-2 комплексу существует комплекс CD14/ЛПС. Завершается внеклеточное распознавание ЛПС путем образования комплекса ЛПС/MD-2/TLR4, в результате чего происходит запуск двух волн сигнальных каскадов, один из которых запускается входе эндоцитоза TLR4 [9, 10, 11, 12].

При внутриклеточной передаче сигнала через адапторные белки MyD88 и TIRAP активируются два транскрипционных фактора: NF- κ B и AP-1, которые запускают экспрессию провоспалительных цитокинов и хемокинов [13].

Цитокины – это небольшие пептидные молекулы. Уровень цитокинов определяет выживаемость клеток, стимуляцию или ингибирование их роста, дифференцировку, функциональную активацию и апоптоз. Способность регулировать перечисленные функции обусловлена тем, что после взаимодействия цитокинов с комплементарными рецепторами на поверхности клеток, сигнал через элементы внутриклеточной трансдукции передается в ядро, где активируются соответствующие гены [14]. Помимо

цитокинов стоит выделить индуцибельную NO-синтазу (iNOS) и маркер активированной микроглии (Iba-1).

Индучибельная NO-синтаза (iNOS) – это фермент, который синтезируется в ответ на определенное внешнее воздействие на клетку, например, токсинами, некоторыми медиаторами воспаления (IL-1 β , TNF- α) и проявляет свою активность через, как правило, 6-8 часов после воздействия. Она экспрессируется не только в макрофагах, но и в гепатоцитах, в клетках эндотелия, и является кальций-независимой. NO-синтаза – это ключевой фермент в реакциях образования оксида азота (NO), продуцируя, при этом, огромные количества оксида. Высокие концентрации NO, в свою очередь, токсичны для клеток, поэтому индуцибельная NO-синтаза считается патологической. Токсический эффект NO связанный с прямым действием на железосодержащие ферменты и с образованием сильного окислителя, очень реакционного и токсичного свободнорадикального соединения пероксинитрита, который может непосредственно повреждать ДНК [15].

Белок Iba-1 является одним из немногих маркерных белков микроглиоцитов, впервые охарактеризованный в 1996 г. Iba-1 – это кальцийсвязывающий белок массой 17 кДа, который состоит из 147 аминокислот, образующих компактный домен, который содержит два кальций-связывающих участка, богатых гидрофобными аминокислотами, и сходный по структуре с тремя другими кальций-связывающими белками: тропонин С, белок S-100 и кальмодулин. Белок Iba-1 регулирует процесс фагоцитоза у макрофагов [16]. Белок Iba-1 является селективным маркером микроглии и макрофагов органов ЦНС [17].

Активация или гиперпродукция перечисленных выше молекул приводит к развитию воспалительного процесса. Воспаление - это системная, ответная реакция организма на повреждение тканей и органов. Оно основано на эволюционно древних механизмах защиты и проявляется в реакциях, направленных на устранение продуктов повреждения, которые приводят к

максимальному для данных условий восстановлению в зоне повреждения. Основные факторы защиты – это ферменты, антимикробные белки, естественные киллеры, лейкоциты [цит. по 18].

В классической патологии выделяют три стадии воспаления: альтерация, экссудация, пролиферация.

Стадия альтерации (повреждения) — начальная, пусковая стадия воспаления, характеризующаяся повреждением тканей. В этой стадии развивается привлечение к очагу повреждения клеток, продуцирующих медиаторы воспаления, необходимые для включения в процесс сосудистой реакции. Хемоаттрактанты — вещества, определяющие направление движения клеток в тканях. Они продуцируются микробами, клетками, тканями, содержатся в крови. Непосредственно после повреждения из тканей выделяются такие хемоаттрактанты, как тромбин, кинин, а при повреждении сосудов — фибриноген, активированные компоненты комплемента.

Стадия экссудации наступает в разные сроки вслед за повреждением тканей в ответ на действие клеточных и особенно плазменных медиаторов воспаления, образующихся при активации кининов. В динамике стадии экссудации различают 2 этапа: плазматическая экссудация и клеточная инфильтрация. Продуктивная (пролиферативная) стадия завершает острое воспаление и обеспечивает репарацию (восстановление) поврежденных тканей [19]. Для борьбы с инфекцией необходим воспалительный процесс - из крови в инфицированное место направляются защитные белки; усиливается отток лимфы в прилегающую лимфоидную ткань, несущей патоген и антиген-презентирующие клетки из ткани, что приводит к возникновению адаптивного иммунного ответа [14].

Посредством введения ЛПС можно смоделировать бактериальное инфицирование организма с последующим развитием системного ответа. К примеру, при системном введении эндотоксин попадает в кровоток и может воздействовать на многие органы, в том числе на мозг, уже в первые минуты после введения. Моделирование системного воспалительного процесса с

помощью периферического введения ЛПС, позволяет исследовать реакцию центральной нервной системы на периферический воспалительный стимул, который усиливает секрецию провоспалительных цитокинов [14]. Однако не стоит забывать, что острая фаза - ключевое звено системного воспалительного ответа - развивается в печени и обуславливает защитную реакцию организма: метаболическую и поведенческую. У больных наблюдается апатия, нарушение внимания, гипотермия, сонливость, депрессия, т.е. симптомокомплекс более известный как "поведение больного" [20,21]. Системные изменения в организме, которые появляются непосредственно после введения антигена, отражают сложные нейрохимические и электрофизиологические перестройки в разных областях мозга. Также может меняться профиль экспрессии некоторых генов в мозге [22]. При этом важна доза попадаемого в организм ЛПС.

Для различных экспериментальных задач системный воспалительный процесс задают либо септическими (500-10000 мкг/кг веса животного) либо субсептическими дозами эндотоксина (1-100 мкг/кг веса животного). Принцип ответа клеток ЦНС на введение ЛПС является дозозависимым. При введении септических доз ЛПС наблюдается ответ ЦНС на септический шок, проявляющийся у людей вследствие неконтролируемой бактериальной инфекции. При этом наблюдается массивная экспрессия провоспалительных цитокинов в мозге, катастрофически повышается проницаемость эндотелия. Субсептические дозы (от 10 мкг/кг веса животного) индуцируют экспрессию мРНК цитокинов лишь в оболочках головного мозга и органах, лишенных гематоэнцефалического барьера. Считается, что при использовании низких субсептических доз можно смоделировать ответ ЦНС в более физиологических условиях, чем при септических дозах [23,24]. При введении высоких (1 мг/кг веса животного) и сублетальных (3-5 мг/кг веса животного) доз ЛПС можно наблюдать дегенеративные изменения в ЦНС. На периферии активируются лейкоциты и макрофаги, стимулируется продукция провоспалительных цитокинов, iNOS, COX-2 и других медиаторов;

запускается активация синтеза белков острой фазы; происходит синтез хемокинов и ростовых факторов [25, 26].

2.2. Механизмы передачи периферического воспаления в ЦНС

При обычных условиях ЛПС практически не проникает через гематоэнцефалический барьер [27]. Но при тяжелых инфекционных заболеваниях (таких как сепсис) через ГЭБ проходит достаточное количество эндотоксина, чтобы вызвать продукцию цитокинов в мозге [28]. Однако Singh и Yiang [11] в своих опытах показали, что при введении ЛПС в дозе 100 мкг/кг веса животного он не проникает через ГЭБ, хотя и выявляется в эндотелиальных клетках мозга. Значит, ЛПС вызывает нейровоспаление опосредованно, например, через индукцию синтеза цитокинов, которые могут проникать через ГЭБ [28, 29, 30]. Так, например, системное периферическое введение TNF- α и других провоспалительных цитокинов может приводить к развитию нейровоспаления и вызывать сходные поведенческие реакции, как и в случае системного введения ЛПС [31, 22]. Значит, основную информацию о периферическом воспалении в ЦНС переносят провоспалительные цитокины, имеющие рецепторы в ЦНС.

При системном воспалительном ответе выделившиеся провоспалительные цитокины (например, такие как IL-1 β , IL-6 и TNF- α) циркулируют в крови и взаимодействуют с нейронами головного мозга. Существует несколько возможных вариантов влияния воспалительного ответа на ЦНС:

- 1) Свободная диффузия воспалительных агентов из крови в участки мозга, лишенные ГЭБ. Цитокины здесь свободно диффундируют из крови в паренхиму мозга, где и взаимодействуют с популяциями макрофагов;
- 2) Взаимодействие с тканью мозга, опосредованное ГЭБ. Цитокины из крови активируют эндотелий сосудов, эндотелий в свою очередь передает сигналы близлежащим периваскулярным макрофагам, а периваскулярные макрофаги взаимодействуют с резидентными макрофагами;

3) Посредством блуждающего нерва. По его афферентным волокнам сигналы о воспалении в брюшной полости могут передаваться нейрональным популяциями в стволе мозга;

4) Активный транспорт цитокинов через ГЭБ [32].

В последнее время важную роль в процессе передачи сигнала о периферическом воспалении в ЦНС и запуске комплекса защитных реакций организма отдают системным цитокинам, которые могут индуцировать экспрессию генов в ЦНС, но для самого запуска этого процесса они не важны [33]. Известно, что при периферическом введении эндотоксина, дексаметазон (синтетический глюкокортикоид) ингибирует синтез цитокинов ИЛ-1 β и ИЛ-6, но не приводит к проявлению поведенческих изменений и не ингибирует транскрипцию генов провоспалительных цитокинов в ЦНС.

2.3. Роль воспаления в развитии нейродегенеративных заболеваний

В настоящее время большой интерес вызывает взаимодействие ЦНС и иммунной системы. В последнее время наиболее интересной и изучаемой областью исследований является изучение реакций ЦНС в ответ на возникшее воспаление в периферических тканях, а также роли воспаления в патогенезе нейродегенеративных заболеваний (болезнь Паркинсона, рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера) [32].

Известно, что основными «участниками» воспалительной реакции в ЦНС являются микроглиальные клетки, астроциты и выделяемые ими медиаторы. Ключевая роль в инициации нейровоспаления принадлежит микроглии. Активировать микроглию могут экзогенные токсины, иммунологические факторы, такие как ЛПС, эндогенные «измененные» белки, повреждение нервной ткани. Важно то, что гиперактивация микроглии приводит к дегенерации преимущественно ДА-нейронов посредством выделения провоспалительных цитокинов, активных форм кислорода и протеаз [34]. В условиях нормы микроглия формирует

разветвленную сеть и предохраняет паренхиматозную целостность мозга, выполняя врожденную защитную функцию. Однако под влиянием различных патогенов микроглия меняет свою морфологию и становится фагоцитарной. Если стимуляция продолжается, происходит «прикрепление» микроглии к нейронам, затем, при дальнейшей стимуляции, перестраивается цитоскелет клеток микроглии, увеличивается их объем, возрастает численность и продолжается их дальнейшая функциональная трансформация. Активированная микроглия характеризуется втягиванием отростков, увеличением сомы, экспрессией поверхностных антигенов и продукцией хемокинов и цитокинов (ФНО α , ИЛ-1 β , ИЛ-15, ИЛ-6), а также активных форм кислорода (супероксида и NO). Таким образом, активация микроглии является неотъемлемым звеном процесса нейротоксичности и нейрональной гибели при БП.С другой стороны, микроглия продуцирует и противовоспалительные цитокины (ИЛ-10, ИЛ-1РА), ингибирующие действие ИЛ-1 β .

Немаловажна и роль астроцитов в глия-нейрональных взаимодействиях в условиях нейровоспаления. В норме астроциты вовлечены в поддержание нейромедиаторного гомеостаза и метаболизма нейронов, удалении свободных радикалов, депонировании металлов, развитии и поддержании целостности ГЭБ, а так же выполняют иммунные функции. Астроцитарные клетки экспрессируют различные рецепторы, включая рецепторы к ростовым факторам и цитокинам. Известно, что они способны синтезировать такие нейротрофические факторы как NGF, BDNF, эпидермальный фактор роста, некоторые цитокины, включая ФНО α , ИЛ-1 β , ИЛ-6. В физиологических условиях эти цитокины секретируются на очень низком уровне, однако их количество возрастает при активации астроцитов, происходящей при развитии воспаления. Активация астроцитов и последующая их трансформация в виде астроцитоза и астроглиоза, происходит под влиянием пролиферирующей микроглии и модулируется выделяемыми ею цитокинами.

Дендритные клетки являются антигенпредставляющими клетками, продуцирующими молекулы главного комплекса гистосовместимости II класса и некоторые провоспалительные цитокины, за счет этого поддерживая воспалительный процесс и способствуя вторичному повреждению нейронов. Однако есть данные о способности этих клеток продуцировать ростовые факторы, участвуя в адаптивных и репаративных процессах [35].

В целом схема воспалительной реакции при БП с участием перечисленных эффекторных клеток может быть представлена следующим образом. Под воздействием этиологических факторов происходит, с одной стороны, прямое повреждение нейрона, с другой – активация клеток микроглии. Из поврежденного нейрона высвобождаются нейромеланин (пигмент ДА-нейронов) и агрегированный α -синуклеин. Агрегаты α -синуклеина, в свою очередь, усиливают активацию микроглии, через TLR на поверхности микроглиальных клеток [34]. Нейромеланин, находясь во внеклеточном пространстве, так же является эндогенным фактором стимуляции микроглии. Реактивированная микроглия усиливает синтез нейротоксических факторов (провоспалительных цитокинов, активных форм кислорода), замыкая круг патологической «самоактивации». Процесс носит лавинообразный, непрерывный характер, он неограничен рамками ЦНС, т.к. агрегированный α -синуклеин способен усиливать проницаемость ГЭБ и, взаимодействуя в кровяном русле с антигенпредставляющими клетками, может запускать периферический путь усиления активации микроглии.

Таким образом, воспаление при БП является сложным, многокомпонентным процессом, который запускается экзо- и эндогенными факторами, объединяющим центральные и периферические звенья. Однако точные механизмы передачи сигнала о периферическом воспалении в ЦНС до сих пор остаются неизвестными. Понятно одно: активация микроглии и инициация воспалительного ответа может быть вызвана разнообразными стимулами (механическим повреждением, ишемией, гипоксией и др. [36]) при этом в патогенезе БП наибольшую роль в качестве этиологических

факторов играет воздействие эндотоксинов. На этом основано использование ЛПС в качестве индуктора экспериментальной БП.

2.4. «Воспалительные» модели БП

Существуют различные подходы к моделированию БП: генетические, токсикологические, метаболические. Экспериментальный паркинсонизм можно инициировать у лабораторных животных (крысы, мыши) или смоделировать некоторые патологические звенья БП на клеточных культурах. В рамках тематики представленного исследования интересен «воспалительный» подход к моделированию БП.

Как убедительно показано в обзоре статей Кульчицкий и Стрижак и Wangetal, введение эндотоксина лабораторным животным, может приводить к проявлению патологических симптомов, напоминающих БП [37,38]. Инъекции эндотоксина животным могут быть хронические или однократные. При этом введение может осуществляться интраперитонеально, интраназально, интравагинально и интрацеребрально. Интрацеребральное введение эндотоксина производится в различные отделы мозга. Наибольший интерес представляет внутримозговое введение в черное вещество (ЧВ), стриатум, бледный шар. Рассмотрим подробнее модель с введением ЛПС в ЧВ. В 1998 было показано, что однократное введение ЛПС в ЧВ приводит к потере большого количества дофаминергических нейронов. Причем дегенерация нейронов предшествует активации микроглии. В другой работе показано, что введение ЛПС в ЧВ (2мкг) приводит к быстрой активации микроглии (в течение суток), вызывает снижение уровня дофамина (на 4 день) и необратимую, но не прогрессирующую потерю дофаминергических нейронов (в течение 21 дня). При данном способе индукции БП, потеря дофаминергических нейронов не является прямым следствием активации микроглии. Несмотря на то, что введение ЛПС в ЧВ приводит к быстрой и интенсивной активации микроглии, морфология этих

клеток возвращается к «нормальной» уже в течение 30 дней, что свидетельствует о краткосрочном ответе.

В работе Gao et al. показана возможность индукции хронической дегенерации дофаминергических нейронов при введении ЛПС в ЧВ в дозе 5 нг/час в течение двух недель. У таких животных через 4 и 6 недель начинается прогрессирующая гибель дофаминергических нейронов. К 10 недели погибает порядка 70% дофаминергических нейронов, при этом наблюдается хроническая активация микроглиальных клеток [39].

Наиболее интересной «воспалительной» моделью БП является однократное системное введение высоких доз ЛПС. При данном типе введения эндотоксин вызывает симптомокомплекс "поведение больного", что свидетельствует о проходе ЛПС через ГЭБ. Процесс сопровождается хронической активацией микроглии. Например, при внутрибрюшинной инъекции ЛПС в дозе 5 мг/кг у мышей C57 наблюдается хроническая активация микроглии и прогрессирующая дегенерация дофаминергических нейронов. Причем потеря дофаминергических нейронов ЧВ достигла 23% и 43% через 7 и 10 месяцев после введения соответственно. У этих животных уже на ранних сроках после введения ЛПС, наряду с повышенным уровнем провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α и ИЛ-1 β , была обнаружена активированная микроглия. Стоит отметить, что данные изменения в головном мозге сохраняются на протяжении всего эксперимента (10 месяцев)[40].

Таким образом, при моделировании БП с помощью введения ЛПС на лабораторных животных, необходимо учитывать пути введения и дозы эндотоксина.

До настоящего времени остается непонятным, какие именно механизмы лежат в основе ЛПС-индуцированной нейродегенерации. В последнее время обсуждаются следующие механизмы: пагубное влияние реактивных форм кислорода, оксида азота (NO), провоспалительных цитокинов и

циклооксигеназы-2. Ниже будут рассмотрены некоторые из этих механизмов[41].

Оксид азота способен активировать глию, в том числе микроглию, которая ведет к нейродегенерации дофаминергических нейронов. Известно, что после введения ЛПС в ЧВ, активируется NO-синтаза, причем при подавлении активности именно iNOS снижается степень ЛПС-индуцированной нейродегенерации. Так же, NO ингибирует 1 и 4 комплексы митохондрий и является причиной снижения синтеза АТФ.

Заметный вклад в повреждение клеток ЧВ при БП вносит интенсификация свободнорадикальных процессов. При БП в ЧВ снижено число глиальных клеток, содержащих естественный антиоксидант — глутатионпероксидазу, а также отмечен низкий уровень глутатиона. Глутатион — трипептид, состоящий из цистеина, глутаминовой кислоты и глицина. Его основной антиоксидантный эффект реализуется посредством участия в работе антиоксидантных ферментов глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы. Глутатион, как и другие SH-содержащие белки, является акцептором активных форм кислорода и тем самым ингибирует свободнорадикальное окисление. Снижение содержания глутатиона приводит к повышению чувствительности митохондрий к окислительному стрессу. Активные формы кислорода, вызывая перекисное окисление пептидов (ПОЛ), могут быть токсичными как для нейронов, так и олигодендроцитов, образующих миелин. Высокое содержание в головном мозге липидов и уникальность их структуры определяет характер развития в них ПОЛ. Известно, что изменение состава липидов в мембране клеток, наряду с метаболическими изменениями, чаще всего бывает вызвано процессами свободнорадикального окисления. Низкий уровень антиоксидантов сопровождается высоким уровнем активных форм кислорода, обладающих свойствами ингибировать сульфгидрильные группы ферментов и повреждать NH₂-группы мембранных белков [42]. Низкая активность каталазы в мозге и, напротив, высокая концентрация ионов железа служат факторами, усиливающими реакции образования и

накопления свободных радикалов, которые, в свою очередь, ведут к апоптозу клетки [43].

При активации глии после введения ЛПС высвобождаются различные цитокины, но основными провоспалительными считаются TNF- α и ИЛ- 1 β , принимающие участие в ЛПС-индуцированной нейродегенерации. По сравнению с астроглией, микроглия выпускает большее количество цитокинов. Как показали исследования, продукция TNF- α была заметна уже через несколько часов после введения ЛПС. Вклад этих цитокинов к нейродегенерации дофаминергических нейронов показал, что нейтрализуя антител против TNF- α и ИЛ- 1 β заметно уменьшилась ЛПС-индуцированная потеря нейронов.

ЛПС так же известен как активатор экспрессии циклооксигеназы-2. Введение ЛПС в стриатум приводит к увеличению СОХ-2, также как и увеличение микроглии. Ингибирование СОХ-2, в свою очередь, защищает от ЛПС-индуцированной нейродегенерации.

Таким образом, существует взаимодействие всех факторов нейровоспаления. Например, ЛПС-индуцированная микроглиальная продукция АФК, может приводить к увеличению выработки супероксида, которая в дальнейшем может увеличить продукцию ИЛ- 1 β , TNF- α и СОХ-2. Так же, один фактор может регулировать другой. К примеру, ИЛ- 1 β действует как важный посредник регуляции СОХ-2. Кроме того, провоспалительные и нейротоксические факторы работают в комплексе.

3. Материалы и методы

3.4. Материалы

3.4.1. Животные

Работа выполнена на 60 самцах крыс породы Вистар (Рапполово) весом 240-250 грамм. Животные содержались в стандартных условиях по 5-6 особей в клетке со свободным доступом к еде и воде и световым режимом: с 8 до 20 часов – день, с 20 до 8 часов – ночь, при температуре воздуха 20-22°C.

3.4.2. Препараты

ЛПС (липополисахарид) - макромолекула, состоящая из полисахарида, ковалентно соединённого с липидом, основной компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Использовали ЛПС производства компании Sigma (L-2880). Лиофилизированный ЛПС хранили при температуре +4°C. Перед первым использованием готовили раствор ЛПС в физиологическом растворе с концентрацией 10 мг/мл, аликвотировали и хранили при -10°C.

Праймеры. Оригинальные праймеры были синтезированы в компании «Бигль», поступали в лиофилизованном виде. Все праймеры растворяли в воде для инъекций до концентрации 100 пг/мкл и хранились при температуре – 20°C.

3.4.3. Схема эксперимента

Животных случайным образом разделили на три группы. Животным первой группы – интактной – интраназально и внутрибрюшинно вводили физиологический раствор (n=3-6); второй – интраназально ЛПС (в дозе 1 мкг на кг массы животного) и физиологический раствор внутрибрюшинно (n=10); животные третьей группы получали интраназальную физиологический раствор и внутрибрюшинно–инъекция ЛПС(n=10).

3.5. Методы

3.5.1. Измерение температуры животных.

Перед экспериментом всех животных в течение недели приучали к рукам. Измерение температуры тела животных производили ректально. Перед его употреблением кончик термометра смазывали вазелином и вводили на глубину до 12—13 мм в анальное отверстие при горизонтальном положении животного. Базальную температуру тела фиксировали в течение 7 дней.

3.5.2. Индукция БП

БП вызывали однократной инъекцией ЛПС из расчета 1 мг вещества на килограмм веса животного.

3.5.3. Забор биологического материала.

Через 3 и 6 месяцев после инъекции ЛПС животных декапитировали и извлекали стриатум, гиппокамп. Материал хранили при -70°C до использования.

3.5.4. Выделение тотальной РНК

Проводили по отработанной ранее методике выделения РНК и ДНК Тризолом. На пробу весом 25-50 г добавляли 500 мкл Тризола. Гомогенизировали. Центрифугировали 12 000 оборотов в течение 10 мин при $t\ 4^{\circ}\text{C}$. Отбирали водную часть, осадок выбрасывали. В отобранную пробу добавляли хлороформ в объеме 100 мкл, перемешивали и центрифугировали 15 мин при тех же условиях. Отбирали надосадок (РНК), осадок (ДНК) замораживали в холодильнике на -70°C . В надосадок добавляли 500 мкл пропанола, центрифугировали 10 мин в тех же условиях. Жидкую фазу убирали так, чтобы не затронуть осадок белого цвета. В эппендорф с осадком добавляли 500 мкл 75% этанола, перемешивали и центрифугировали 5 мин при $t\ 4^{\circ}\text{C}$ на 7,500 оборотов в минуту. Спирт отбирали и пробу высушивали в

вакууме. После чего добавляли RNA'sFree воду в объёме 20 мкл и ставили в термостат на 5 мин при t 55°C. После чего пробы хранили в холодильнике на - 70°C.

3.5.5. Обратная транскрипция.

В день выделения мРНК или на следующий день ставили реакцию обратной транскрипции при помощи кита «Реверта» по следующей инструкции:

а) к отобраным 5 мкл пробы добавляли 10 мкл РНК-элюента и 1 мкл Рендом-праймеров, прогревали 5 мин при t 70°C в амплификаторе и охлаждали 5 мин при t 10°C;

б) в это время готовили смесь из расчёта на 1 пробу:

5x ОТ-Буфер (1 мкл), 5x dNTPmix (4 мкл), РНК-элюент (4 мкл), Ревертаза (0,5 мкл);

в) добавляли в прогретую пробу по 10 мкл смеси и амплифицировали 30 мин при t 37°C;

г) полученную ДНК разводили в 2 раза ТЕ-буфером (20 мкл), аккуратно перемешивали и замораживали при - 70°C.

3.5.6. Полимеразная цепная реакция в реальном времени (PCR RealTime).

Полимеразную цепную реакцию проводили по инструкции для проведения ПЦР в настоящем времени на амплификаторе ДНК-технология ДТ-322 для постановки PCR Realtime.

ПЦР-ртвключает в себя одновременно детекцию и количественное определение специфической последовательности ДНК в образце.

К 2 мкл полученной ДНК добавляли по 13 мкл следующей смеси:

Tag буфер (1 мкл), MgCl₂+ (2 мкл), dNTPmix, разбавленный 2/3 (1 мкл), праймер прямая последовательность – F (1 мкл), праймер обратная

последовательность – R (1 мкл), Proba (1 мкл), Tag DNA полимераза (1 мкл), вода RNAsfree (5 мкл).

Для каждого праймера предварительно подбирали оптимальные условия, при которых реакция шла успешно. Для ИЛ-1 температура составляла 64°C, для GAPDH – 53°C. Последовательность праймеров представлена в таблице 2.1.

Название	Последовательность праймеров (5'-3')		Температура отжига
ИЛ-1 β	Прямой	CACCTCTCAAGCAGAGCACAG	64
	Обратный	GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC	
	Зонд	6'FAM TGTCCCGACCATTGCTGTTTCCTAGG BHQ-1	
iNOS	Прямой	CAGAAGCAGAATGTGACCATCAT	64
	Обратный	CGGAGGGACCAGCCAAATC	
	Зонд	6'FAM ACCACCACACAGCCTCAGAGTCCTT BHQ-1	
ФНО α	Прямой	CCAGGTTCTCTTCAAGGGACAA	64
	Обратный	CCAGGTTCTCTTCAAGGGACAA	
	Зонд	6'FAM TGTCCCGACCATTGCTGTTTCCTAGG BHQ-1	
GAPDH	Прямой	TGCACCACCAACTGCTTAG	53
	Обратный	GGATGCAGGGATGATGTTC	
	Зонд	5-R6G- ATCACGCCACAGCTTTCAGAGGG- BHQ2-3	
18S	Прямой	ACGGACCAGAGCGAAAGCAT	60

	Обратный	TGTCAATCCTGTCCGTGTCC	
--	----------	----------------------	--

GAPDH и 18s– это гены домашнего хозяйства, которые использовали в качестве внутреннего контроля.

ПЦР с праймерами для Capn1 и Capn2 с GAPDH проводилась в присутствии интрекалирующего красителя SYBRGreen. SYBRGreen позволяет довольно просто определить количественно ПЦР-продукты в ходе реакции без необходимости использования праймеров. В ходе амплификации SYBR Green I встраивается в малую бороздку ДНК ПЦР-продуктов и испускает более сильный по сравнению с несвязанным красителем флуоресцентный сигнал.

3.5.7. Фиксация.

Головной мозг животных помещали в 10% раствор нейтрального формалина на 2 суток (в объеме, превышающем объем мозга в 30-40 раз).

3.5.8. Обезвоживание материала и заливка в парафин.

После фиксатора мозг промывали в проточной воде в течение суток, обезвоживали в спиртах восходящей крепости (сутки в 70, сутки в 90, сутки в первой смене 96, сутки во второй смене 96), проводили через 2 смены абсолютного спирта (1сутки в каждой смене), пропитывали ткань смесью петролейного эфира и абсолютного спирта 45 минут, держали в двух сменах петролейного эфира по 60 минут и, наконец, оставляли в смеси петролейного эфира и парафина на ночь в термостате при 37⁰С. На следующий день мозг животных проводили через 2 смены расплавленного парафина при 57⁰С и заливали в парафиновые блоки.

3.5.9. Изготовление срезов.

Парафиновые срезы толщиной 7 мкм изготавливали на ротационном микротоме (LeicaRM 2125RT, Германия). Для проведения гистологических и иммуногистохимических реакций предметные стекла обрабатывали запатентованным составом на основе бычьего сывороточного альбумина (BSA)(патент RU 2 386 137 C1) или использовали предметные стекла с поли-L-лизиновым покрытием. На каждом предметном стекле располагалось по 4 - 8 фронтальных срезов головного мозга. Для каждой реакции брали по два предметных стекла со срезами анализируемых областей мозга: черного вещества и гиппокампа. Идентификацию структур мозга проводили по атласу Паксиноса и Уотсона [55].

3.5.10. Протокол проведения иммуногистохимической реакции на тирозингидроксилазу.

Для проведения иммуногистохимической реакции на тирозингидроксилазу использовался протокол, указанный в Руководстве Д.Э. Коржевского [65].

а) Депарафинирование и регидратация парафиновых срезов.

Ксилол 1 смена -10 мин

ксилол 2 смена - 5 мин

96% спирт 1 смена - 5 мин

96% спирт 2 смена - 5 мин

80% спирт - 5 мин

Дистиллированная вода - 5 мин

б) Блокирование эндогенной пероксидазы путем погружения предметных стекол со срезами в 3%-ный водный раствор перекиси водорода на 10 мин.

- c) Промывание срезов после перекиси дистиллированной водой, помещение в 0,01M PBS (фосфатно-солевой буфер) с pH 7,4 на 5 мин.
- d) 10 минутная обработка срезов против неспецифического связывания антител блокировочным раствором Proteinblock (SpringBioscience, США). По окончании процедуры излишек раствора удаляли.
- e) Нанесение первичных поликлональных кроличьих антител против тирозингидроксилазы (ab112, AbCam, Великобритания), разведение 1:1000. Предметные стекла с обработанными срезами ставили во влажной камере в термостат при 40⁰C на 1 час.
- f) Промывание срезов от несвязавшихся первичных антител в растворе PBS в течение 5 мин, удаление фильтровальной бумагой излишков жидкости вокруг срезов.
- g) Обработка срезов реагентом EnVision+/HRP – Anti-Rabbit (Dako, Дания). Стекла со срезами помещались во влажной камере в термостат при 27⁰C на 30 минут.
- h) Промывание срезов от несвязавшихся первичных антител в растворе PBS в течение 5 мин, удаление фильтровальной бумагой излишков жидкости вокруг срезов.
- i) Визуализация реакции обработкой срезов необходимым количеством рабочего раствора 3,3-диаминобензидинтетрагидрохлорида (SpringBioscience, США). В течение 1 - 3 минут происходит образование темноокрашенного продукта гистохимической реакции, во избежание появления неспецифического фона этот процесс контролируется под микроскопом.
- j) Удаление раствора хромогена 3% раствором перекиси водорода и помещения стекол со срезами в 2 смены дистиллированной воды по 5 минут в каждой.
- k) Подкрашивание срезов гематоксилином Джилла (БиоВитрум, Россия) и подсинение в щелочной воде (1 капля 10%-ного аммиака на 100 мл дистиллированной воды).

l) Обезвоживание препаратов в спиртах восходящей крепости, просветление в ксилоле.

Заключение препаратов в синтетическую среду Cytoseal XYL (ThermoScientific, США).

3.5.11. Окрашивание нервной ткани по методу Ниссля

Для окрашивания нервной ткани по методу Ниссля толуидиновым синим, использовался следующий протокол [48]

- a) Депарафинирование срезов в ксилоле и проведение через спирты с нисходящей крепостью до дистиллированной воды;
- b) Окрашивание срезов в растворе красителя 15-30 мин;
- c) Промывание в дистиллированной воде;
- d) Дифференцировка под микроскопом в 96% -ном этаноле (на 100 мл добавлено 2-3 капли ледяной уксусной кислоты) до исчезновения фоновой окраски нейропиля;
- e) Промывка в 96% -ном этаноле;
- f) Обезвоживание в абсолютном этаноле или в смеси равных объемов 96% -ного этанола и ксилола 1-2 мин;
- g) Просветление препаратов в ксилоле;
- h) Заключение в синтетическую среду Cytoseal (ThermoScientific, США).

Анализ и фотографирование гистологических препаратов проводили на микроскопе LeicaDM750 (Германия) с помощью фотокамеры ICC50 и программы обработки изображений LASEZ (Leica, Германия).

4. Результаты и обсуждения.

Инъекция ЛПС в дозе 1 мг/кг веса животных при интраперитонеальном способе введения вызывала изменение глубокой температуры тела. Введение эндотоксина приводило к повышению температуры тела крыс в течение часа на 0,3-1,20С, соответственно в группе животных с интраназальным и с интраперитонеальным способами введения, которая в последствии росла. Через 2 ч температура была выше контрольных значений приблизительно на 0,9-1,30С при интраназальном и интраперитонеальном способах введения, соответственно. Через 4 ч температура оставалась повышенной на 0,8-0,90С. Однако через сутки после введения ЛПС мы наблюдали в экспериментальных группах снижение температуры тела, относительно контрольных значений приблизительно на 0,2-0,50С. Повышение температуры – это проявление классического пирогенного эффекта ЛПС, а ее снижение – признак септического шока. По данным литературы, септический шок у крыс Вистар наблюдается при интраперитонеальном введении ЛПС в дозе 2,5 мг/кг веса и выше. Как оказалось, при выбранной нами дозе, у части животных все-таки наблюдаются признаки септического шока. Из-за небольшого объема групп (n=10) на данном этапе экспериментального исследования не представлялось возможным разделить животных на группы еще и по типу температурной реакции. Базальная температура находилась в диапазоне 37,3–38,50С. Температура тела крыс контрольной группы сохранялась на базальном уровне в течение всего эксперимента, варьируя в пределах 0,20С (рис. 1).

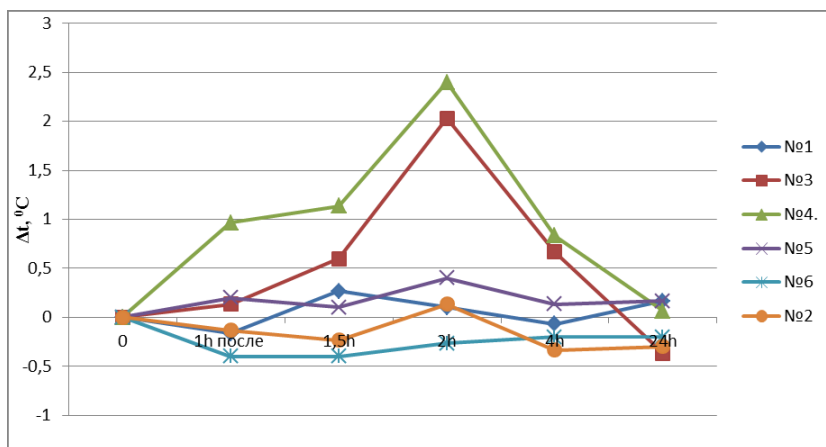


Рис.1. Динамика изменений глубокой температуры тела после введения ЛПС в дозе 1мг/кг веса животного и при сочетанном введении ЛПС и дексаметазона в дозе 2мг/кг.

С целью выявления особенностей реакции клеток ЦНС на развитие системного воспаления с помощью метода ОТ-ПЦР в реальном времени мы проанализировали содержание мРНК основных провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β и ФНО- α) в клетках стриатума и гиппокампа крыс после введения ЛПС, а так же содержание мРНК iNOSи COX2.

Через 30 дней после введения ЛПС экспериментальным животным в клетках гиппокампа выявили увеличение уровня мРНК TNF-альфа и iNOS в 1,5-2 раз по сравнению с контрольной группой; уровень мРНК Iba-1 так же увеличивался в 1,5 раза.

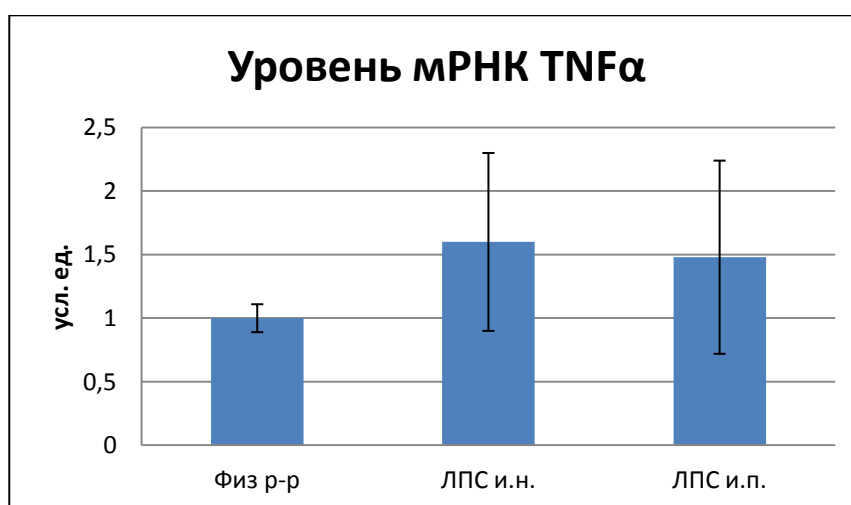


Рис. 2. Динамика изменения уровня мРНК TNF- α в гиппокампе крыс после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг веса животного.

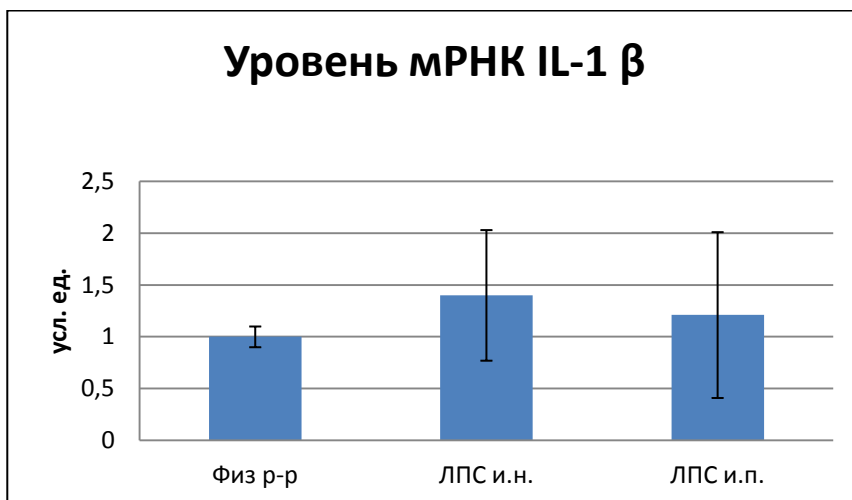


Рис. 3. Динамика изменения уровня мРНК IL-1 β в гиппокампе крыс после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг веса животного.

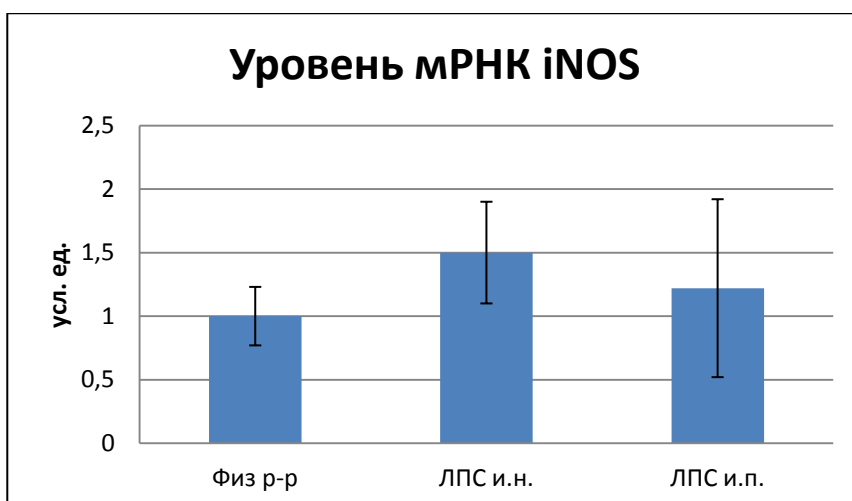


Рис. 4. Динамика изменения уровня мРНКiNOS в гиппокампе крыс после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг веса животного.

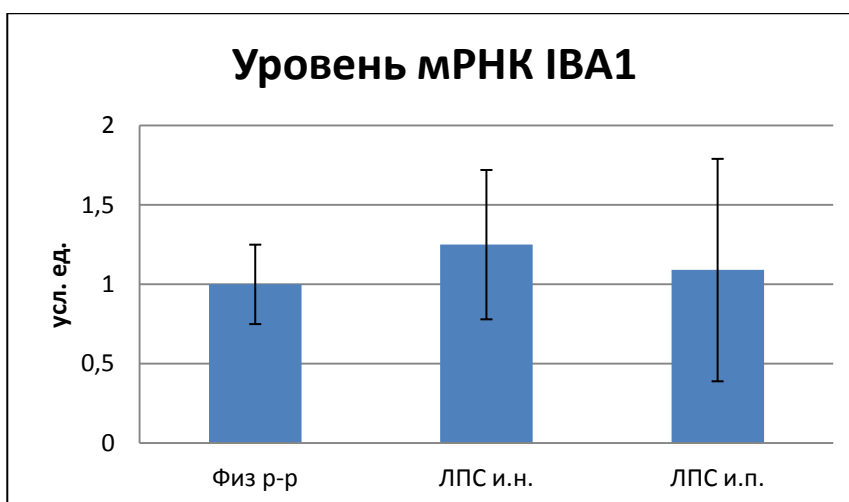


Рис. 5. Динамика изменения уровня мРНК Iba1 в гиппокампе крыс после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг веса животного.

В данной работе нами было проведено сравнение уровня мРНК TNF-альфа, Iba-1 и iNOS между контрольными животными в возрасте 3 месяца, 6 месяцев, 9 месяцев. Оказалось, что со временем в клетках гиппокампа уровень мРНК увеличивается, например, уровень мРНК TNF-альфа у экспериментальных животных в возрасте 9 месяцев был в 2,8 раза выше по сравнению с животными более младшего возраста ($p=0,032$), а уровень мРНК iNOS был в 3,5 раза выше. Уровень мРНК Iba-1 у животных разных возрастов не изменялся.

Ниже рассмотрим данные для точки 180 дней после введения ЛПС, так как на клетках гиппокампа на данном сроке были получены наиболее показательные результаты. Как видно из рис.6 уровень мРНК TNF-альфа в среднем в два раза превышает контрольное значение (1,8 – 2,4 раза) (Рис.6).

При этом уровень мРНК ИЛ-1бета, iNOS и Iba1 практически не изменялся. (Рис. 7, 8, 9 соответственно).

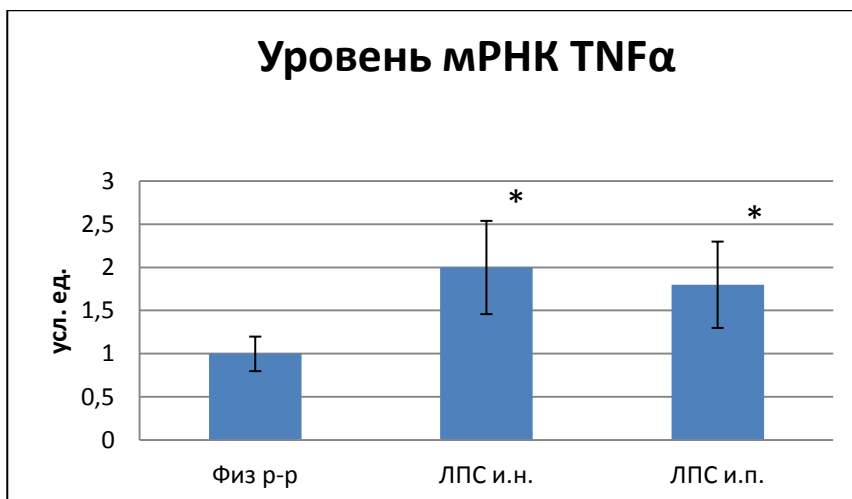


Рис.6. Уровень мРНК TNF- α в гиппокампе крыс через 6 месяцев после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг веса животного. * - $p < 0,05$ по отношению к контролю.

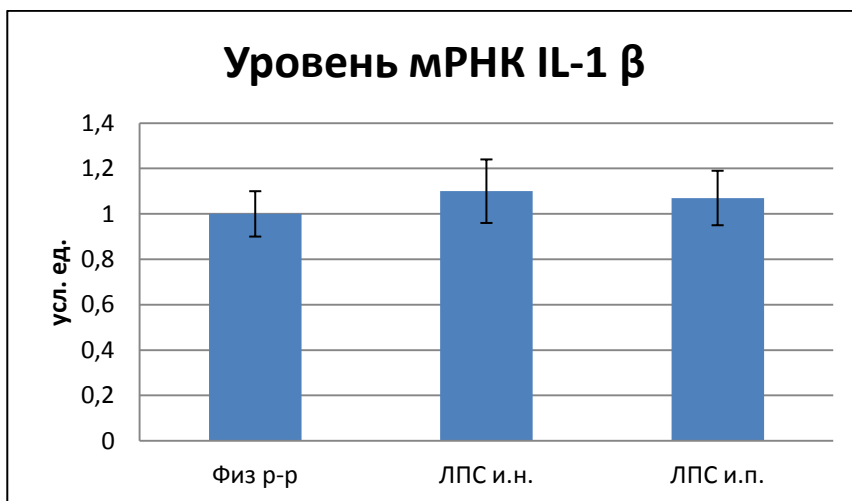


Рис.7. Уровень мРНК ИЛ-1бета в гиппокампе крыс через 6 месяцев после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг веса животного.

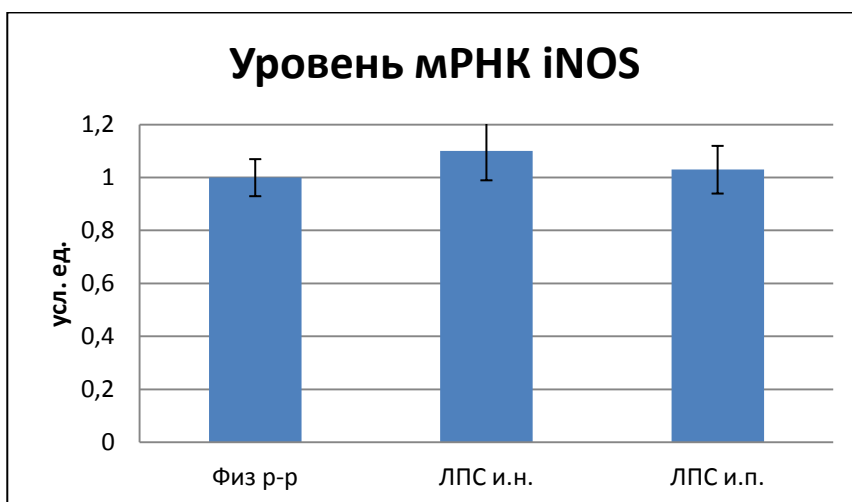


Рис.8. Уровень мРНК iNOS в гиппокампе крыс через 6 месяцев после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг веса животного.

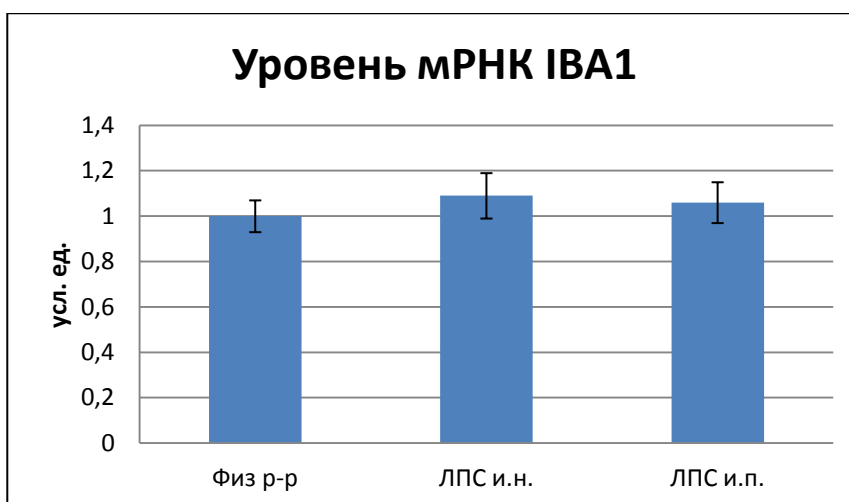


Рис.9. Уровень мРНК Iba-1 в гиппокампе крыс через 6 месяцев после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг веса животного.

Проведя обработку данных, оказалось, что реакция клеток стриатума на введение ЛПС в дозе 1 мг/кг веса животного значительно отличалась от реакции клеток гиппокампа.

Через 30 дней после введения ЛПС экспериментальным животным в клетках стриатума наблюдалось увеличение уровня мРНК iNOS в 8-12 раз по сравнению с контрольной группой (рис. 12); а уровень мРНК Iba-1 увеличивался практически в 20 раз (рис. 13). Однако, уровни мРНК TNF- α и IL-1 β увеличивались в 2-2,5 раза (рис.10, 11 соответственно).

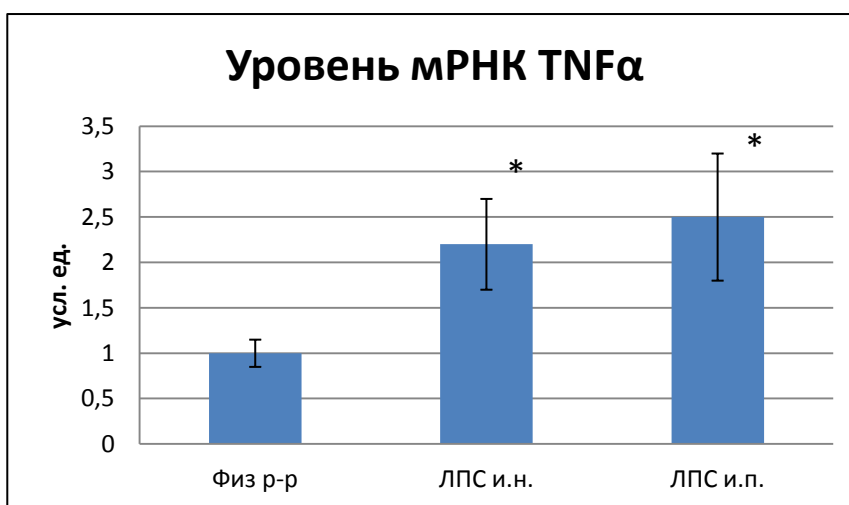


Рис. 10. Динамика изменения уровня мРНК TNF- α в стриатуме крыс после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг веса животного.

* - $p < 0,05$ по отношению к контролю.

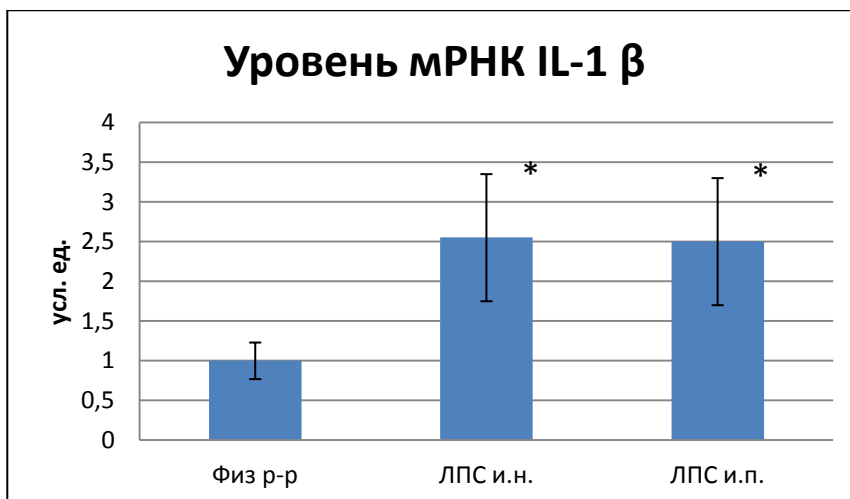


Рис.11. Динамика изменения уровня мРНК IL -1β в стриатуме крыс после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг веса животного.
* - $p < 0,05$ по отношению к контролю.

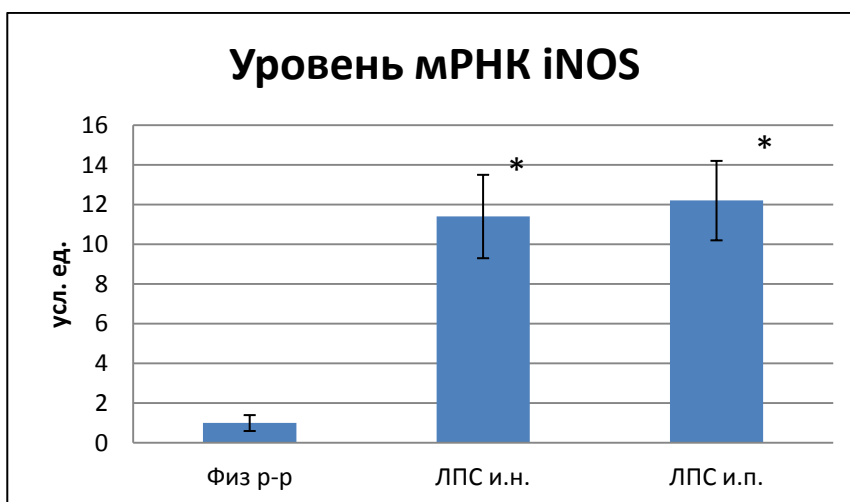


Рис. 12. Динамика изменения уровня мРНКiNOS в стриатуме крыс после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг веса животного
* - $p < 0,05$ по отношению к контролю.

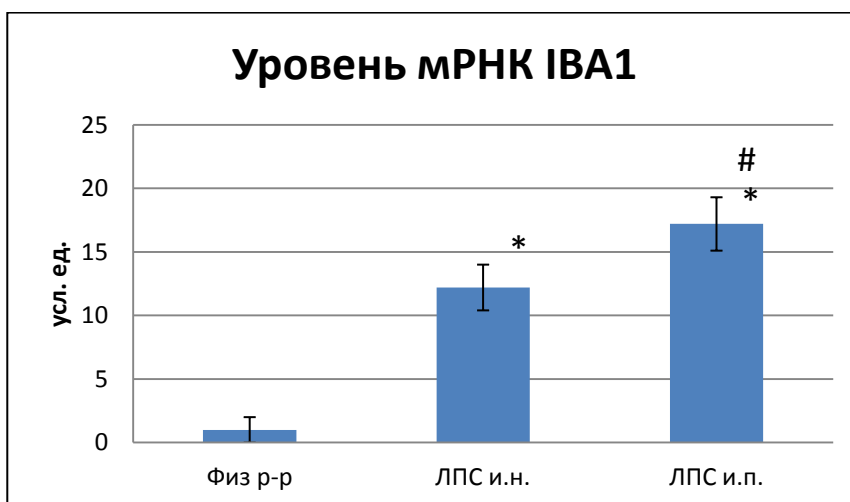


Рис. 13. Динамика изменения уровня мРНК Iba1 в стриатуме крыс после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг веса животного.

* - $p < 0,05$ по отношению к контролю

- $p < 0,05$ по отношению к группе с интраназальным введением ЛПС.

Так же рассмотрим уровень мРНК в стриатуме через 180 дней после введения. Как видно из рис.11 уровень мРНК TNF-альфа был примерно в 2 раза выше по сравнению с контролем, а уровень мРНК ИЛ-1бета практически не отличался. (Рис.12.). Однако, уровень мРНК iNOS во всех экспериментальных группах был примерно в 10-12 раз выше, чем в контроле, то же можно сказать и об уровне мРНК Iba-1.

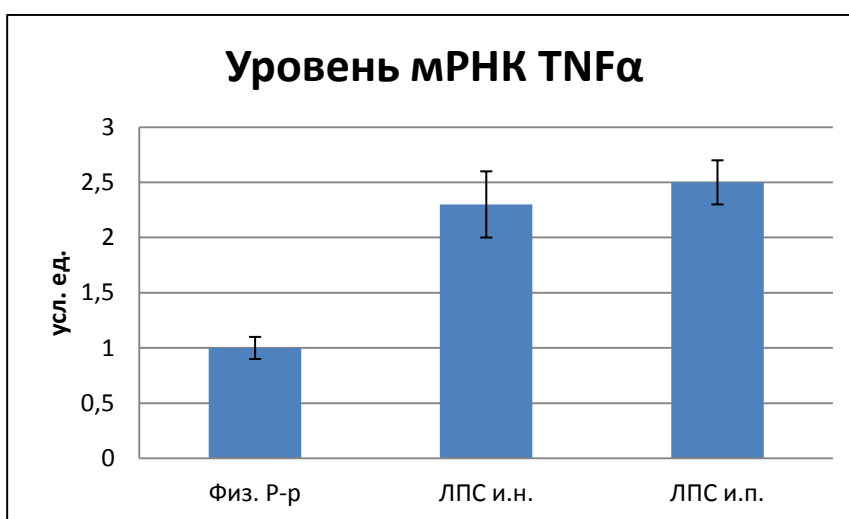


Рис. 6. Уровень мРНК TNF-α в стриатуме крыс через 6 месяцев после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг веса животного. * - $p < 0,05$ по отношению к контролю.

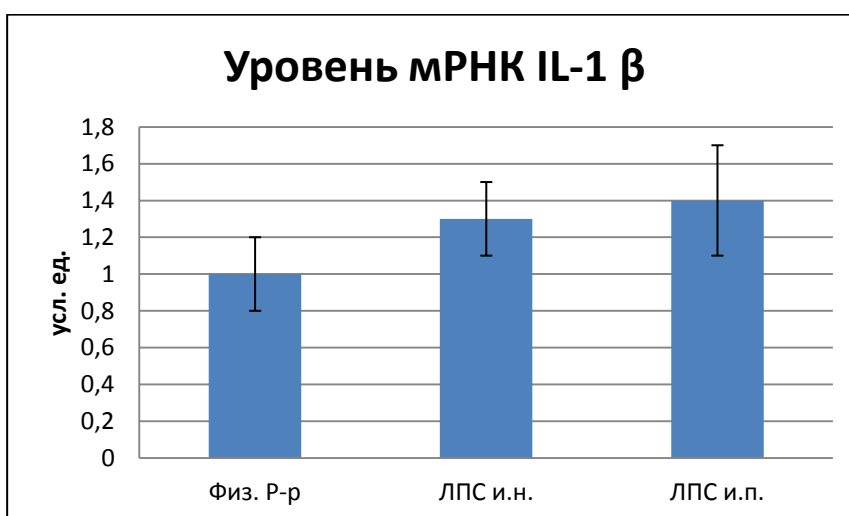


Рис. 7. Уровень мРНК ИЛ-1β в стриатуме крыс через 6 месяцев после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг веса животного. * - $p < 0,05$ по отношению к контролю.

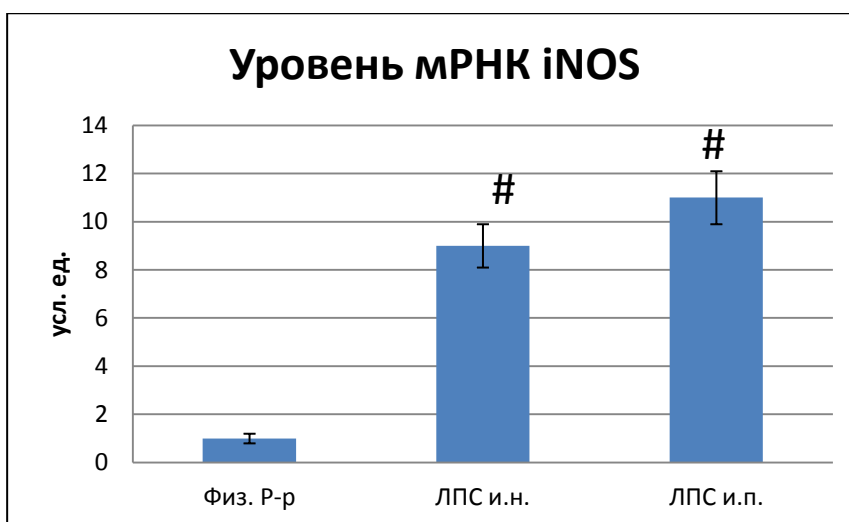


Рис. 8. Уровень мРНКiNOS в стриатуме крыс через 6 месяцев после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг веса животного. * - $p < 0,01$ по отношению к контролю.

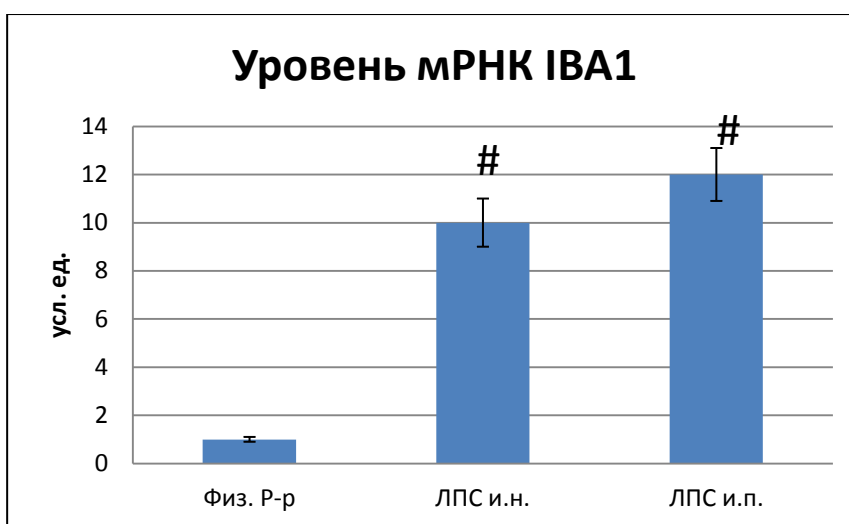


Рис.9. Уровень мРНК Iba1 в стриатуме крыс через 6 месяцев после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг веса животного. * - $p < 0,01$ по отношению к контролю; # $p = 0,0012$ по отношению к группе №3; \$ $p = 0,008$ по отношению к группе №4.

Как видно выше, стриатум реагируют на введение ЛПС остро, так как идет увеличение продукции мРНК провоспалительных цитокинов, которое сохраняется на протяжении всего эксперимента. В гиппокампе же максимальное содержание мРНК провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β) и iNOS наблюдается лишь через сутки, когда в стриатуме уже идет их усиленная продукция, во-вторых, продукция мРНК исследуемых веществ возвращается к норме уже через 7 дней. Однако для окончательного подтверждения полученных нами данных необходимо определение уровня

продукции соответствующих цитокинов с помощью методов ИФА или вестернблоттинга.

Это объясняется тем, что микроглия которая является основной популяцией клеток ЦНС, продуцирующей провоспалительные цитокины, iNOS в ответ на системные воспалительные сигналы, содержится в большем количестве в стриатуме, по сравнению с гиппокампом.

Системное воспаление, заданное с помощью септических доз ЛПС, приводит к появлению симптомов паркинсонизма. В связи с этим для моделирования и изучения воспалительных процессов при БП *invitro* и *invivo* используют ЛПС.

Иммуногистохимическое выявление тирозингидроксилазы в нейронах ЧВ через 30 дней после индукции периферического воспаления

В контрольной группе животных представлено типичное расположение нейронов, характерное для ЧВ. Большинство имеют интенсивно окрашенную цитоплазму, представляя собой иммунопозитивные по ТГ нейроны, ядра округлые, структура не просматривается. Также встречаются единичные сморщенные дегенерирующие нейроны без ТГ.

Через 30 дней после интраперитонеального введения ЛПС в ЧВ наряду с нормальными по структуре нейронами наблюдаются многочисленные дегенерирующие клетки («клетки-тени» и клетки с начальными признаками дегенерации). Дегенерирующие нейроны часто веретеновидной формы, без видимого ядра и со слабым выкрашиванием ТГ по периферии. По литературным данным особая чувствительность нейронов ЧВ к воспалительному стимулу может объясняться помимо обилия микроглии недостатком астроцитов, регулирующих ее деятельность.

Таким образом, в компактной части ЧВ после введения ЛПС наблюдается большое количество дегенерирующих нейронов, в которых ТГ практически не выявляется.

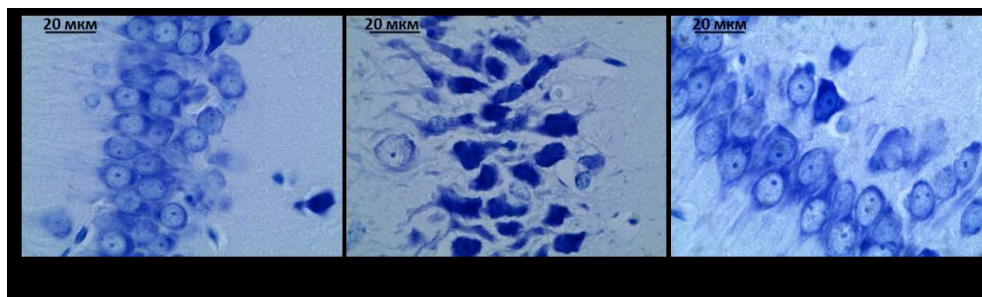


Рис. 15. Гистологическая окраска пирамидных нейронов поля СА1 гиппокампа по методу Ниссля.

Контроль - пирамидные нейроны поля СА1 гиппокампа в контрольной группе крыс (n=3),

ЛПС и.п. - то же в группе крыс с введением ЛПС интраперитонеально (n=3),

ЛПС и.н. - то же в группе крыс с введением ЛПС интраназально (n=3).

5. Выводы

1. В ответ на системное введение ЛПС в клетках гиппокампа и стриатума крыс наблюдается увеличение уровня мРНК основных провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β), iNOS и IBA-1 различной длительности и интенсивности.
2. В стриатуме и гиппокампе крыс в ответ на системное введение ЛПС наблюдаются дегенеративные изменения.
3. Способ введения ЛПС не влияет на течение дегенеративного процесса.

6. Список литературы

1. Knirel Y. A. Bacterial Lipopolysaccharides: Structure, Chemical Synthesis, Biogenesis and Interaction with Host Cells. Berlin: Springer, 2011. 440 p.
2. Jou I. et al. Gangliosides trigger inflammatory responses via TLR4 in brain glia //The American journal of pathology. 2006. V. 168. №5. P. 1619-1630.
3. Leow-Dyke S. et al. Neuronal toll-like receptor 4 signaling induces brain endothelial activation and neutrophil transmigration in vitro //Journal of Neuroinflammation. 2012. V. 9. №. 1. P. 230-240.
4. Hijjya N. et al. Possible involvement of toll-like receptor 4 in endothelial cell activation of larger vessels in response to lipopolysaccharide //Pathobiology. 2002. V. 70. №. 1. P. 18-25.
5. Tsukumo D. M. L. et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance //Diabetes. 2007. V. 56. № 8. P. 1986-1998.
6. Glass C. K. et al. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration //Cell. 2010. V. 140. № 6. P. 918-934.
7. Panaro M. A. et al. Expression of TLR4 and CD14 in the central nervous system (CNS) in a MPTP mouse model of Parkinson's-like disease //Immunopharmacology and immunotoxicology. 2008. V. 30. №4. P. 729-740.
8. Trudler D., Farfara D., Frenkel D. Toll-like receptors expression and signaling in glia cells in neuro-amyloidogenic diseases: towards future therapeutic application //Mediators of inflammation. 2010. V. 2010. 12 p.
9. Thorley A. J. et al. Innate immune responses to bacterial ligands in the peripheral human lung—role of alveolar epithelial TLR expression and signalling //PloS one. 2011. V. 6. №7. P. e21827.
10. Zanoni I. et al. CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4 //Cell. 2011. V. 147. № 4. P. 868-880.

11. Singh A. K., Jiang Y. How does peripheral lipopolysaccharide induce gene expression in the brain of rats? // *Toxicology*. 2004. V. 201. №1. P. 197-207.
12. Jerala R. Structural biology of the LPS recognition // *International journal of medical microbiology*. 2007. V. 297. №5. P. 353-363.
13. Levy E. et al. Distinct roles of TLR4 and CD14 in LPS-induced inflammatory responses of neonates // *Pediatric research*. 2009. V. 66. № 2. P. 179-184.
14. Murphy K. P., Travers P. and Walport M. *Janeway's Immunobiology*. 8th edition. London and Abingdon: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. 2012. 868 p.
15. Соровский образовательный журнал
16. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Карпенко М.Н. (и др). Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии: руководство. СПб.: СпецЛит, 2012. 110 с.
17. Кирик О.В., Сухорукова Е.Г., Коржевский Д.Э. Кальций-связывающий белок Iba-1/AIF-1 в клетках головного мозга крысы. // *Морфология*. 2010. Т.137. №2. С.5-8.
18. Литвицкий П.Ф. Воспаление // *Вопросы современной педиатрии*. 2006. Т. 5. №3. С. 46-51.
19. Патология в 2-х томах: учебник / под ред. М.А. Пальцева, В.С. Паукова - 2010. - 1024 с.
20. Perry V. H., Cunningham C., Holmes C. Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration // *Nature Reviews Immunology*. 2007. V. 7. № 2. P. 161-167.
21. Клименко В.М., Зубарева О.Е. Нейробиология цитокинов: поведение и адаптивные реакции // *Рос.физиол. журн. им. И.М. Сеченова* 1999. Т. 85. № 9. С. 1244-1254.

22. Клименко В. М., Зубарева О. Е., Краснова И. Н. Роль внутримозговых рецепторов интерлейкина-1 в модуляции гомеостатических реакций организма // Нейрохимия. 1995. Т. 12. №2. С. 16-22.
23. Quan N. et al. Induction of pro-inflammatory cytokine mRNAs in the brain after peripheral injection of subseptic doses of lipopolysaccharide in the rat // Journal of neuroimmunology. 1999. V. 93. №1. P. 72-80.
24. Teeling J. L., Perry V. H. Systemic infection and inflammation in acute CNS injury and chronic neurodegeneration: underlying mechanisms // Neuroscience. 2009. V. 158. №3. P. 1062-1073.
25. Rossol M. et al. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages // Critical reviews in immunology. 2011. V. 31. №. 5. P. 379-446.
26. Morris M., Li L. Molecular mechanisms and pathological consequences of endotoxin tolerance and priming // Archivum immunologiae et therapiae experimentalis. 2012. V. 60. №1. P. 13-18.
27. Qin L. et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration // Glia. 2007. V. 55. № 5. P. 453-462.
28. Banks W. A., Robinson S. M. Minimal penetration of lipopolysaccharide across the murine blood-brain barrier // Brain, behavior, and immunity. 2010. V. 24. № 1. P. 102-109.
29. Banks W. A., Kastin A. J., Broadwell R. D. Passage of cytokines across the blood-brain barrier // Neuroimmunomodulation. 1996. V. 2. № 4. P. 241-248.
30. Banks W. A. Blood-brain barrier transport of cytokines: a mechanism for neuropathology // Current pharmaceutical design. 2005. V. 11. № 8. P. 973-984.
31. Соколова Е.С., Людыно В.И., Симбирцев А.С., Клименко В.М. Психомодулирующее действие субпирогенных доз интерлейкина-1 β

- при хроническом введении крысам // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2006. V. 92. №3. P. 299-307.
32. Perry V. H. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease // Brain, behavior, and immunity. 2004. V. 18. № 5. P. 407-413.
33. Murray C. L., Skelly D. T., Cunningham C. Exacerbation of CNS inflammation and neurodegeneration by systemic LPS treatment is independent of circulating IL-1 β and IL-6 // Journal of neuroinflammation. 2011. V. 8. № 1. P. 50-63.
34. MohanKumar SM, MohanKumar PS, Quadri SK. Lipopolysaccharide-induced changes in monoamines in specific areas of the brain: blockade by interleukin-1 receptor antagonist. Brain Res. 1999 Apr 10;824(2):232-7.
- Mosley RL, Hutter-Saunders JA, Stone DK, Gendelman HE. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012 Jan;2(1):a009381.
35. Dendritic cells as vectors for immunotherapy of cancer. Paczesny S, Ueno H, Fay J, Banchereau J, Palucka AK. Semin Cancer Biol. 2003 Dec;13(6):439-47.
36. Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, Knapp DJ, Crews FT. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. Glia. 2007 Apr 1;55(5):453-62.
37. Кульчицкий В.А., Стрижак И.В. Поведенческие реакции крыс при аппликации эндотоксина на слизистую оболочку носа. Фізіологічний журнал, т.57, №5, 2011, 42-43.
38. Wang J, You H, Liu JF, Ni DF, Zhang ZX, Guan J. Association of olfactory bulb volume and olfactory sulcus depth with olfactory function in patients
39. Gao/

40. Perry VH. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. *Brain Behav Immun* 2004;18:407–13.
41. Garima Dutta, Ping Zhang, Bin Liu. The Lipopolysaccharide Parkinson's disease animal model: mechanistic studies and drug discovery. *Fundam Clin Pharmacol*. 2008 October ; 22(5): 453–464.
42. Окислительные процессы и обмен липидов при экспериментальном паркинсоническом синдроме Л.М. Овсепян, Г.С. Казарян, А.В. Закарян, М.В. Львов, М.М. Мелкопян, Г.В. Захарян, А.А. Акопджанян. *Журнал Неврологии и Психиатрии*, 6, 2010
43. Ещенко Н.Д. Биохимия психических и нервных заболеваний – СПб.: Изд-во С.-Петербур. Ун-та, 2004. – 200 с.
44. Matus A., Bernhardt R., Bodmer R. Alaimo S. Microtubule-associated protein 2 and tubulin are differently distributed in the dendrites of developing neurons // *Neuroscience*. 1986. V.17. №2. P. 371-389.
45. Matus A.I., Walters B.B., Mughal S. Immunohistochemical demonstration of tubulin associated with microtubules and synaptic junctions in mammalian brain // *J. Neurocytol*. 1975. V. 4. №6. P. 733 –744.
46. Matus A., Bernhardt R., Bodmer R. Alaimo S. Microtubule-associated protein 2 and tubulin are differently distributed in the dendrites of developing neurons. *Neuroscience*. 1986. V. 17. №2. P. 371-389.
47. Tischfield M. A., Engle E.C. Distinct α - and β -tubulin isoforms are required for the positioning, differentiation, and survival of neurons: new support for the “multi-tubulin” hypothesis // *Biosci. Rep*. 2012. V. 30. №5. P. 319–330.
48. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. СПб.: СпецЛит, 2010. 95 с.