

## ЦЕНТРАЛЬНЫЕ ОТВЕТЫ НА ПЕРИФЕРИЧЕСКОЕ ВОСПАЛЕНИЕ МОГУТ ВКЛЮЧАТЬ СНИЖЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ КЛЮЧЕВОЙ ПРОТЕАЗЫ АПОПТОЗА КАСПАЗЫ-3 В СТВОЛЕ МОЗГА

© 2024 г. А. В. Баннова<sup>1, \*</sup>, Г. Т. Шишкина<sup>1</sup>, Н. Н. Дыгало<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

\*e-mail: anitik@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 14.03.2024 г.

После доработки 16.04.2024 г.

Принята к публикации 18.04.2024 г.

Активация микроглии провоспалительными стимулами, включающими липополисахарид (ЛПС), рассматривается среди факторов риска нейродегенерации, однако ЛПС может оказывать также нейропротективный эффект, что обуславливает дальнейший анализ взаимосвязи микроглиальной активации и регуляторов клеточной гибели. В настоящей работе было проведено сравнительное исследование экспрессии белков маркера активированной микроглии Iba-1 и исполнительной протеазы апоптоза каспазы-3 в стволе мозга и префронтальной коре крыс в зависимости от дозы и режима внутрибрюшинного введения эндотоксина. Через сутки после ЛПС в дозе 0.5 мг/кг, однократно, экспрессии Iba-1 и каспазы-3 в обеих структурах не отличались от контрольных значений. Введение эндотоксина в этой же дозе четырехкратно в течение 7-ми дней (1 раз в 2 дня) привело через сутки после последнего введения к значительному увеличению уровня Iba-1 в стволе мозга, которому сопутствовало достоверное уменьшение экспрессии каспазы-3. Такие же эффекты в этой структуре наблюдались и через 7 дней после однократного введения ЛПС в более высокой дозе — 5 мг/кг. В 7-дневном эксперименте во фронтальной коре, в отличие от ствола мозга, не было обнаружено изменений в экспрессии каспазы-3, а увеличение экспрессии Iba-1 наблюдалось только после однократного введения ЛПС в высокой дозе. Выявленное снижение уровня каспазы-3 в стволе мозга в условиях нейровоспаления может отражать развитие адаптивных нейропротективных процессов, особенно важных для структуры, отвечающей за такие ключевые функции организма, как дыхание, артериальное давление и сердцебиение.

**Ключевые слова:** липополисахарид, активная каспаза-3, Iba-1, ствол мозга, префронтальная кора

**DOI:** 10.31857/S0044452924030071, **EDN:** YXBZRE

### ВВЕДЕНИЕ

В последнее время среди патофизиологических механизмов нейродегенеративных заболеваний, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона, постишемические психопатологии, значительное внимание привлекает нейровоспаление. Развитие этого состояния связывают с дисфункцией микроглиальных клеток — резидентной популяции макрофагов центральной нервной системы (ЦНС) [1–6]. Активированная микроглия участвует в распознавании и фагоцитарном удалении дегенерирующих нейронов, однако длительная активация этих клеток может повредить и нормальные нейроны [7]. Для моделирования нейровоспаления в экспериментальных работах на животных наиболее часто используют липополисахарид (ЛПС) [8], представляющий собой иммуностимулирующий эндотоксин клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Источником ЛПС в системной циркуляции челове-

ка и животных являются патогенные бактерии желудочно-кишечного тракта [9]. Уровень эндотоксина в крови может быстро повышаться при различных патологических состояниях. Например, повышенный уровень ЛПС, ассоциируемый с развитием постишемических неврологических расстройств, наблюдался уже через сутки у больных, перенесших инсульт [10, 11]. В экспериментальных исследованиях на грызунах обнаружено, что внутрибрюшинные инъекции ЛПС приводят к активации микроглии и митохондриально-зависимых путей апоптоза в отделах мозга, а также возникновению специфических симптомов, таких как нарушение двигательной функции и способности к обучению, сходных с клиническими симптомами нейродегенеративных психиатрических расстройств [12, 13]. Ключевая роль в реализации процесса клеточной гибели в ЦНС принадлежит исполнительной протеазе апоптоза каспазе-3 [14, 15]. На связь индуцированных ЛПС повышений активности микроглии и экс-

прессии каспазы-3 указывает наблюдаемая на грызунах синхронность этих изменений в гиппокампе и префронтальной коре через сутки после однократных [16, 17] и повторных [18, 19] внутрибрюшинных введений эндотоксина. Однако в некоторых условиях ЛПС может оказывать и нейропротективное действие. Например, предварительное введение ЛПС ослабляло апоптоз нейронов, вызванный травматическим повреждением мозга [20], а также снижало уровни мРНК и белка каспазы-3, повышенные ишемическим воздействием [21]. Предварительное введение ЛПС мышам в низких дозах ослабляло активацию микроглии, а также развитие депрессивно-подобного поведения при последующих введениях высоких доз эндотоксина [22]. Таким образом, ЛПС может провоцировать не только негативные нейродегенеративные, но и адаптивные нейропротективные изменения в мозге, включающие влияние на экспрессию каспазы-3, однако опосредуется ли это влияние через изменение активности микроглии в структурах мозга, остается неясным.

Нейроны разных областей мозга различаются по чувствительности к индуцируемой ЛПС нейродегенерации. Например, однократное введение ЛПС в гиппокамп, кору или черную субстанцию приводило через 7 дней к гибели клеток только в черной субстанции, в то время как нейроны коры и гиппокамп не реагировали даже на значительно более высокие, чем вводимые в черную субстанцию дозы [23]. Целью нашего исследования явилось дальнейшее выяснение связи между изменениями экспрессии маркера микроглиальной активации и уровня каспазы-3 в префронтальной коре и стволе мозга крыс после периферического введения ЛПС в разных дозах и режимах. Полученные в рамках достижения этой цели результаты могут быть полезны для исследователей в области изучения нейровоспаления.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Дизайн эксперимента*

В работе использовали 2-месячных самцов крыс линии Wistar. Животных содержали поодиночке в поликарбонатных клетках (27,7 × 44 × 15 см = ш × д × в) при температуре 22–24°C и свободном доступе к воде и корму. Условия содержания животных и примененные воздействия соответствовали рекомендациям Комиссии по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 8 от 19.03.2012 г.) и рекомендациям Минздрава России (приложение к приказу № 267 от 19 июня 2003 г.), а также директивам Совета Европы (86/609/ЕЕС).

Нейровоспаление индуцировали липополисахаридом из *Escherichia coli*, серотип O55:B5 (Sigma-

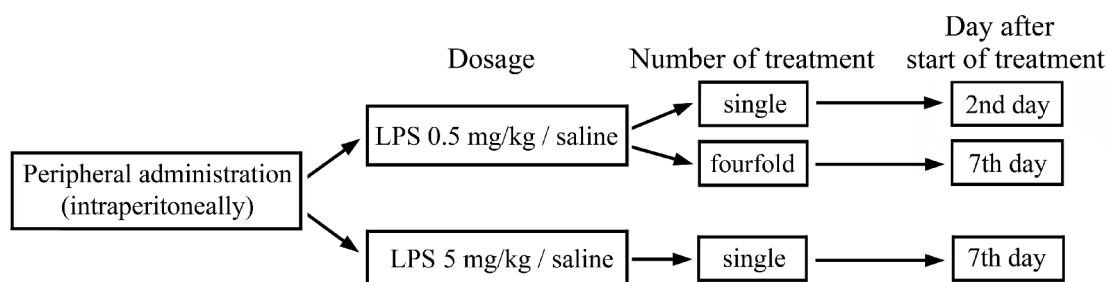
Aldrich Corp., St Louis, MO, USA), который животные получали внутрибрюшинно (рис. 1) в дозах 0.5 мг/кг (однократно и четырехкратно 1 раз в 2 дня в течение 7 дней) и 5 мг/кг (однократно). Контрольные животные получали соответствующие инъекции физиологического раствора. В каждой экспериментальной группе было по 5–6 животных. Животных, получавших ЛПС в дозе 0.5 мг/кг, выводили из эксперимента путем быстрой декапитации через сутки после последнего введения, 5 мг/кг — через 7 дней. Выделенные образцы префронтальной коры (срез префронтальной коры толщиной 1.5–3.0 мм в координатах от +3.20 до +2.70 мм относительно брегмы) и ствола мозга (задний мозг и область моста — весь блок ткани каудальнее задних бугров четверохолмия и роstralнее овального отверстия до –10.5 мм относительно брегмы без мозжечка) были быстро заморожены в жидком азоте.

### *Вестерн блот анализ*

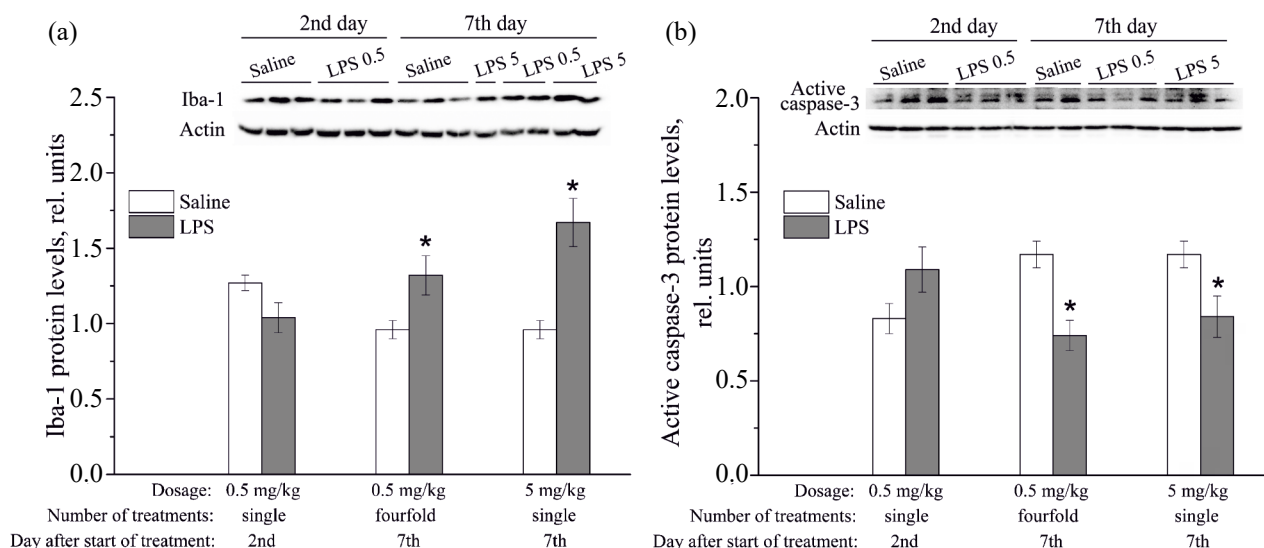
Уровни белков определяли методом Вестерн блота как описано ранее [24]. Ткани мозга гомогенизировали в лизирующем буфере (150 mM NaCl, 50 mM Трис, 1% Тритон X-100, 2 mM PMSF, 2 мкг/мл леупептина, 2 мкг/мл пепстатина и 2 мкг/мл апротинина). Супернатант, содержащий 50 мкг белка, разделяли методом электрофореза в 12% полиакриламидном геле с SDS (система Mini-Protean 3 Dodeca Cell, Bio-Rad, США). Белки переносили на 0.45 мкм нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США) с помощью системы Trans-Blot (Bio-Rad, США). Мембраны инкубировали в присутствии антител: первичных Iba-1 (1:500, rabbit monoclonal antibodies, EPR16589, ab178847, Abcam, США), активной каспазы-3 (1:500, rabbit monoclonal antibodies, #9664, Cell Signaling, США), β-актина (1:20000, rabbit polyclonal antibodies, I-19, sc-1616, Santa Cruz Biotechnology, США) и вторичных, конъюгированных с пероксидазой хрена (1:1000 для Iba-1 и активной каспазы-3 или 1:10000 для β-актина, goat anti-rabbit IgG antibody, Bio-Rad, США). Хемилюминисцентный сигнал усиливали с помощью набора SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific, США) в течение 1 мин. Интенсивность окрашивания полос определяли после сканирования мембран (Chemidoc™ Touch Imaging System, Bio-Rad, США) с последующей компьютерной денситометрией (программа Scion Image 4.0.3.2 Scion Corporation, США). Количество белка Iba-1 и активной каспазы-3 оценивали в относительных единицах к β-актину того же образца.

### *Реактивы*

Помимо вышеуказанных, все реактивы, используемые в работе, были производства компании «Sigma-Aldrich», США.



**Рис. 1.** Схема эксперимента. Взрослым самцам крыс внутрибрюшинно вводили ЛПС в дозах 0.5 мг/кг (однократно и четырехкратно 1 раз в 2 дня в течение 7 дней, животных выводили из эксперимента через сутки после последнего введения) и 5 мг/кг (однократно, животных выводили из эксперимента через 7 дней после введения препаратов). Контрольные животные получали соответствующие инъекции физиологического раствора.



**Рис. 2.** Уровень белков Iba-1 (a) и активной каспазы-3 (b) в стволе мозга взрослых крыс после периферического введения ЛПС в разных дозах и режимах.  $M \pm m$ , выраженные в условных единицах относительно уровня белка  $\beta$ -актина,  $n = 5-6$  животных на группу. \* —  $p < 0.05$  по сравнению группой, получавшей инъекцию физиологического раствора (one-way ANOVA, критерий LSD).

### Статистический анализ

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Результаты представлены как  $M \pm m$ ; межгрупповые различия считали достоверными при  $p < 0.05$ .

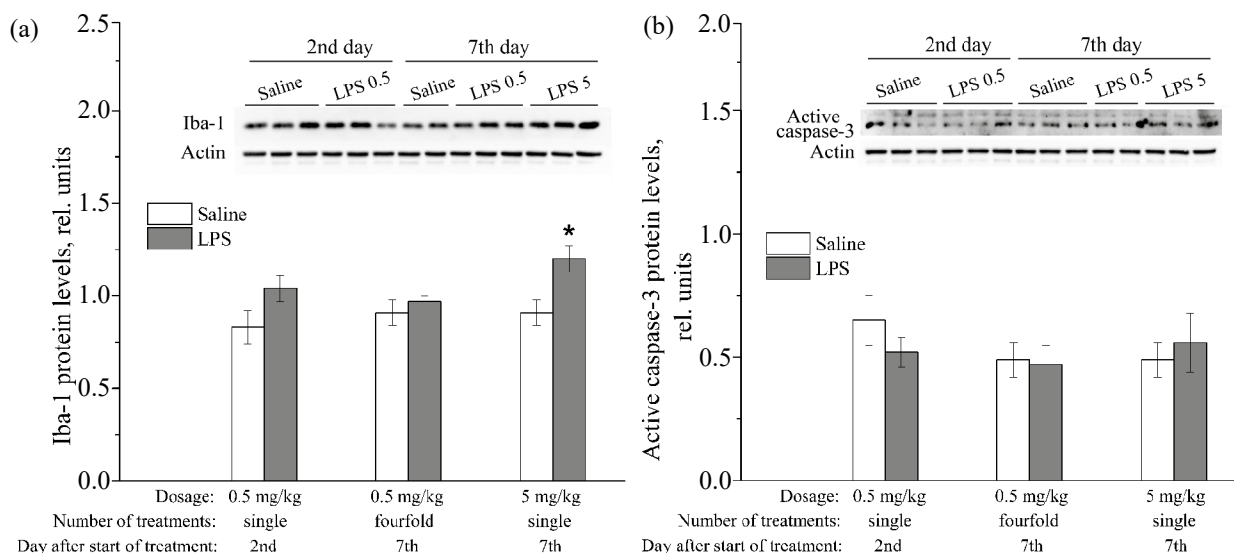
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Влияние ЛПС на уровень белков Iba-1 и активной каспазы-3 в стволе мозга взрослых крыс после внутрибрюшинного введения эндотоксина

В стволе мозга однократное внутрибрюшинное введение ЛПС в дозе 0.5 мг/кг не повлияло на измеренную через сутки экспрессию маркерного бел-

ка активированной микроглии Iba-1 ( $F_{(1,8)} = 3.73$ ,  $p < 0.09$ ) (рис. 2a). Однако уровень этого белка был достоверно повышен через сутки после окончания повторных в течение недели инъекций эндотоксина (1 раз в 2 дня; 4 инъекции) ( $F_{(1,8)} = 6.35$ ,  $p < 0.05$ ). Уровень Iba-1 в стволе мозга был также повышен через неделю после однократной инъекции ЛПС в более высокой дозе (5 мг/кг) ( $F_{(1,8)} = 17.29$ ,  $p < 0.01$ ). Эти данные свидетельствуют, что внутрибрюшинное введение эндотоксина вызывает активацию микроглии в стволе мозга при применении высокой дозы ЛПС, как однократной, так и суммарной (повторные инъекции).

В стволе мозга через 24 ч после однократного введения ЛПС в дозе 0.5 мг/кг не наблюдалось отличий от контрольных значений в уровне экспрессии ключевой исполнительной протеазы апоптоза



**Рис. 3.** Уровень белков Iba-1 (а) и активной каспазы-3 (б) в префронтальной коре взрослых крыс после периферического введения ЛПС в разных дозах и режимах.  $M \pm m$ , выраженные в условных единицах относительно уровня белка  $\beta$ -актина,  $n = 5-6$  животных на группу. \* —  $p < 0.05$  по сравнению группой, получавшей инъекцию физиологического раствора (one-way ANOVA, критерий LSD).

(активной каспазы-3) (рис. 2b). Однако вопреки нашему ожиданию, при увеличении числа инъекций ЛПС в этой дозе до 4 в стволе обнаружено достоверное снижение уровня активной каспазы-3 ( $F_{(1,8)} = 14.72$ ,  $p < 0.01$ ). Снижение экспрессии активной каспазы-3 наблюдалось также через неделю после однократного введения ЛПС в дозе 5 мг/кг ( $F_{(1,9)} = 5.47$ ,  $p < 0.05$ ).

#### *Влияние ЛПС на уровень белков Iba-1 и активной каспазы-3 в префронтальной коре взрослых крыс после внутрибрюшинного введения эндотоксина*

В префронтальной коре, внутрибрюшинное введение ЛПС в дозе 0.5 мг/кг не влияло на экспрессии белка Iba-1, измеренные через сутки после окончания как однократного, так и повторяющихся каждые 2 дня в течение недели воздействий (рис. 3а). Через неделю после однократного введения ЛПС в дозе 5 мг/кг в коре мозга обнаружено повышение уровня белка Iba-1 ( $F_{(1,8)} = 8.99$ ,  $p < 0.05$ ).

Уровень активной формы каспазы-3 в префронтальной коре не изменялся после всех использованных в работе доз и режимов воздействий эндотоксином (рис. 3б).

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основным результатом работы явилось обнаружение противоположных изменений экспрессий

белков маркера активированной микроглии Iba-1 и исполнительный протеазы апоптоза каспазы-3 в стволе мозга после периферического воздействия провоспалительным стимулом. Увеличение уровня белка Iba-1 в этой структуре как через сутки после окончания повторных введений ЛПС (0.5 мг/кг; 1 раз в 2 дня в течение 7 дней), так и через 7 дней после однократного введения эндотоксина в более высокой дозе (5 мг/кг) сопровождалось достоверным снижением экспрессии активной формы каспазы-3. Хотя активацию микроглии рассматривают среди факторов индукции нейродегенеративных процессов [5, 8, 25], полученные нами данные свидетельствуют, что в стволе мозга под воздействием провоспалительного стимула, помимо микроглии, также активируются механизмы, связанные с подавлением апоптоза через снижение экспрессии каспазы-3. Повышенная экспрессия каспазы-3 описана при инсульте, травме спинного мозга, травме головы и болезни Альцгеймера, в то время как ингибиторы каспаз предотвращали потерю нейронов на животных моделях этих патологий [26]. Выявленное в нашей работе снижение экспрессии каспазы-3 в стволе мозга в ответ на системную индукцию воспаления может указывать на развитие в структуре нейроадаптивных защитных изменений, обеспечивающих нейроны ствола мозга большей устойчивостью к повреждающим провоспалительным стимулам. Одним из таких защитных изменений может быть переключение микроглии с M1 на M2-противовоспалительный фенотип [5, 27–29]. Ствол мозга отвечает за такие ключевые для орга-

низма функции как дыхание, артериальное давление и сердцебиение [30], кроме того, там расположен главный источник норадреналина — *Locus coeruleus*, участвующий в регуляции циркадных ритмов, внимания и поведения, а также некоторых аспектов памяти и обучения [31]. Поэтому устойчивость клеток ствола мозга к повреждающим воздействиям, в том числе и активирующим нейровоспаление, является жизненно важной.

Хотя в условиях наших экспериментов описанный эффект (повышение экспрессии Iba-1 и снижение экспрессии каспазы-3) обнаружен только в стволе, свидетельства защиты от индуцированной гибели клеток в результате острой активации иммунной системы опубликованы также и для других структур, прежде всего для гиппокампа. Введение крысам ЛПС внутривентрально в дозах 0.1 и 0.5 мг/кг за 5 дней до травматического повреждения мозга снижало экспрессию каспазы-3 и число погибших нейронов в областях гиппокампа через 4 и 12 ч после травмы [20]. Однократная инъекция ЛПС (0.1 мг/кг) двухдневным крысам за 14 ч до гипоксии-ишемии эффективно защищала мозг от повреждений, связанных с патологическим воздействием [32]. Ослабление апоптоза нейронов после предварительного введения ЛПС обнаружено также на экспериментальных моделях церебральной ишемии (ишемия/реперфузия) [21] и травматического повреждения спинного мозга [33] у взрослых животных. Среди механизмов анти-нейродегенеративного влияния ЛПС рассматривают эндотелиальную синтазу оксида азота (eNOS) [32], PI3K/Akt/FoxO1 путь [21], снижение экспрессии матриксной металлопротеазы-9 [34]. Важное значение для нейропротективного эффекта может иметь ингибирование каскада каспаз именно в клетках микроглии [35].

В отличие от ствола мозга, в префронтальной коре не было обнаружено активации микроглии и изменений в экспрессии активной каспазы-3 через сутки ни после однократного внутривентрального введения ЛПС в дозе 0.5 мг/кг, ни после четырехкратного введения эндотоксина в этой же дозе в течение недели. Повышение экспрессии маркера активированной микроглии белка Iba-1 было обнаружено только через 7 дней после однократного введения ЛПС в высокой дозе 5 мг/кг, что указывает на зависимость эффекта от дозы вводимого эндотоксина. Существенный вклад в развитие эффекта вносит, очевидно, и продолжительность введения. ЛПС, вводимый в дозе 0.5 мг/кг один раз в два дня в течение не одной, а двух недель, достоверно увеличивал экспрессию Iba-1 в префронтальной коре [13]. Способность ЛПС индуцировать активацию микроглии в этой структуре согласуется с данными также и других авторов [8, 36, 37]. Несмотря

на то, что имеется множество свидетельств прямой связи между активностью микроглии и повышением экспрессии каспазы-3 в префронтальной коре [16–19, 38], в нашем исследовании такой связи не выявлено. Отличия в эффектах ЛПС в коре мозга от данных других исследователей могли быть обусловлены различиями в используемых дозах эндотоксина, способах и продолжительности его введения, временем, прошедшим после воздействия ЛПС, а также видом экспериментальных животных [8, 39].

Выявленные региональные различия в ответах исследованных белков на ЛПС могут быть связаны с неоднородностью распределения микроглии в структурах мозга [40–42]. Кроме того, на взрослых крысах обнаружены региональные отличия в восприимчивости к нейротоксичности, индуцированной ЛПС. В этих исследованиях введение бактериального эндотоксина непосредственно в гиппокамп, кору или черную субстанцию вызывало спустя неделю нейродегенерацию только в черной субстанции, в то время как нейроны коры и гиппокампа оставались нечувствительными к ЛПС даже при значительно более высоких концентрациях эндотоксина [23].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом обнаруженное в работе снижение уровня активной формы каспазы-3 в стволе мозга в условиях индуцированной эндотоксином микроглиальной активации указывает на развитие нейроадаптивных процессов, направленных на повышение устойчивости нейронов ствола мозга к повреждающим провоспалительным стимулам.

## ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Г.Т.Ш., Н.Н.Д.), сбор и обработка данных (А.В.Б., Г.Т.Ш.), написание и редактирование рукописи (А.В.Б., Г.Т.Ш., Н.Н.Д.).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям биоэтической комиссии Института Цитологии и Генетики СО РАН (протокол № 8 от 19.03.2012 г.).

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана бюджетным проектом № FWNR-2022-0023.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с публикацией данной рукописи.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG* (1988) Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38:1285–1291. <https://doi.org/10.1212/wnl.38.8.1285>
2. *Nguyen MD, Julien JP, Rivest S* (2002) Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci* 3:216–227. <https://doi.org/10.1038/nrn752>
3. *Leng F, Edison P* (2021) Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nat Rev Neurol* 17:157–172. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-00435-y>
4. *Shishkina GT, Kalinina TS, Gulyaeva NV, Lanshakov DA, Dygalo NN* (2021) Changes in Gene Expression and Neuroinflammation in the Hippocampus after Focal Brain Ischemia: Involvement in the Long-Term Cognitive and Mental Disorders. *Biochemistry (Mosc)* 86:657–666. <https://doi.org/10.1134/S0006297921060043>
5. *Guo S, Wang H, Yin Y* (2022) Microglia Polarization From M1 to M2 in Neurodegenerative Diseases. *Front Aging Neurosci* 14:815347. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.815347>
6. *Xu Y, Gao W, Sun Y, Wu M* (2023) New insight on microglia activation in neurodegenerative diseases and therapeutics. *Front Neurosci* 17:1308345. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1308345>
7. *Liu B, Wang K, Gao HM, Mandavilli B, Wang JY, Hong JS* (2001) Molecular consequences of activated microglia in the brain: overactivation induces apoptosis. *J Neurochem* 77:182–189. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.t01-1-00216.x>
8. *Batista CRA, Gomes GF, Candelario-Jalil E, Fiebich BL, de Oliveira ACP* (2019) Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation as a Bridge to Understand Neurodegeneration. *Int J Mol Sci* 20:2293. <https://doi.org/10.3390/ijms20092293>
9. *Kalyan M, Tousif AH, Sonali S, Vichitra C, Sunanda T, Praveenraj SS, Ray B, Goranila VR, Rungratanawanich W, Mahalakshmi AM, Qoronfleh MW, Monaghan TM, Song BJ, Essa MM, Chidambaram SB* (2022) Role of Endogenous Lipopolysaccharides in Neurological Disorders. *Cells* 11:4038. <https://doi.org/10.3390/cells11244038>
10. *Klimiec E, Pera J, Chrzanowska-Wasko J, Golenia A, Slowik A, Dziedzic T* (2016) Plasma endotoxin activity rises during ischemic stroke and is associated with worse short-term outcome. *J Neuroimmunol* 297:76–80. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.05.006>
11. *Klimiec E, Pasinska P, Kowalska K, Pera J, Slowik A, Dziedzic T* (2018) The association between plasma endotoxin, endotoxin pathway proteins and outcome after ischemic stroke. *Atherosclerosis* 269:138–143. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.12.034>
12. *Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW* (2008) From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 9:46–56. <https://doi.org/10.1038/nrn2297>
13. *Shishkina GT, Bannova AV, Komysheva NP, Dygalo NN* (2020) Anxiogenic-like effect of chronic lipopolysaccharide is associated with increased expression of matrix metalloproteinase 9 in the rat amygdala. *Stress* 23:708–714. <https://doi.org/10.1080/10253890.2020.1793943>
14. *Morris G, Walker AJ, Berk M, Maes M, Puri BK* (2018) Cell Death Pathways: a Novel Therapeutic Approach for Neuroscientists. *Mol Neurobiol* 55:5767–5786. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0793-y>
15. *Holbrook J, Lara-Reyna S, Jarosz-Griffiths H, McDermott M* (2019) Tumour necrosis factor signalling in health and disease. *F1000Res* 8:(F1000 Faculty Rev):111. <https://doi.org/10.12688/f1000research.17023.1>
16. *Yeh CH, Hsieh LP, Lin MC, Wei TS, Lin HC, Chang CC, Hsing CH* (2018) Dexmedetomidine reduces lipopolysaccharide induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. *PLoS One* 13: e0191070. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191070>
17. *Chen PL, Xu GH, Li M, Zhang JY, Cheng J, Li CF, Yi LT* (2023) Yamogenin Exhibits Antidepressant-like Effects via Inhibition of ER Stress and Microglial Activation in LPS-Induced Mice. *ACS Chem Neurosci* 14:3173–3182. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.3c00306>
18. *Khan MS, Ali T, Abid MN, Jo MH, Khan A, Kim MW, Yoon GH, Cheon EW, Rehman SU, Kim MO* (2017) Lithium ameliorates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the cortex and hippocampus of the adult rat brain. *Neurochem Int* 108:343–354. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.05.008>
19. *Muhammad T, Ikram M, Ullah R, Rehman SU, Kim MO* (2019) Hesperetin, a Citrus Flavonoid, Attenuates LPS-Induced Neuroinflammation, Apoptosis and Memory Impairments by Modulating TLR4/NF- $\kappa$ B Signaling. *Nutrients* 11:648. <https://doi.org/10.3390/nu11030648>
20. *Eslami M, Alizadeh L, Morteza-Zadeh P, Sayyah M* (2020) The effect of Lipopolysaccharide (LPS) pretreatment on hippocampal apoptosis in traumatic rats. *Neurol Res* 42:91–98. <https://doi.org/10.1080/01616412.2019.1709139>
21. *He F, Zhang N, Lv Y, Sun W, Chen H* (2019) Low-dose lipopolysaccharide inhibits neuronal apoptosis induced by cerebral ischemia/reperfusion injury via the PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway in rats. *Mol Med Rep* 19:1443–1452. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.9827>
22. *Yu H, Kan J, Tang M, Zhu Y, Hu B* (2023) Lipopolysaccharide preconditioning restricts microglial Overactivation and alleviates inflammation-induced depressive-like behavior in mice. *Brain Sci* 13:549. <https://doi.org/10.3390/brainsci13040549>
23. *Kim WG, Mohnney RP, Wilson B, Jeohn GH, Liu B, Hong JS* (2000) Regional difference in susceptibility

- to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci* 20:6309–6316.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-16-06309.2000>
24. *Bannova AV, Menshanov PN, Dygalo NN* (2019) The Effect of Lithium Chloride on the Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Neonatal Brain. *Neurochem J* 13:344–348.  
<https://doi.org/10.1134/S1819712419030048>
  25. *Marogianni C, Sokratous M, Dardiotis E, Hadjigeorgiou GM, Bogdanos D, Xiromerisiou G* (2020) Neurodegeneration and Inflammation-An Interesting Interplay in Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci* 21:8421.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21228421>
  26. *Robertson GS, Crocker SJ, Nicholson DW, Schulz JB* (2000) Neuroprotection by the inhibition of apoptosis. *Brain Pathol* 10:283–292.  
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2000.tb00262.x>
  27. *Tang Y, Le W* (2016) Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol* 53:1181–1194.  
<https://doi.org/10.1007/s12035-014-9070-5>
  28. *Kwon HS, Koh SH* (2020) Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener* 9:42.  
<https://doi.org/10.1186/s40035-020-00221-2>
  29. *Sangaran PG, Ibrahim ZA, Chik Z, Mohamed Z, Ahmadi-ani A* LPS (2021) Preconditioning Attenuates Apoptosis Mechanism by Inhibiting NF- $\kappa$ B and Caspase-3 Activity: TLR4 Pre-activation in the Signaling Pathway of LPS-Induced Neuroprotection. *Mol Neurobiol* 58:2407–2422.  
<https://doi.org/10.1007/s12035-020-02227-3>
  30. *Nicholls JG, Paton JFR* (2009) Brainstem: neural networks vital for life. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364:2447–2451.  
<https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0064>
  31. *Minné D, Marnewick JL, Engel-Hills P* (2023) Early Chronic Stress Induced Changes within the Locus Coeruleus in Sporadic Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res* 20:301–317.  
<https://doi.org/10.2174/1567205020666230811092956>
  32. *Lu D, Evangelou AV, Shankar K, Dewji FI, Lin J, Levison SW* (2023) Neuroprotective effect of lipopolysaccharides in a dual-hit rat pup model of preterm hypoxia-ischemia. *Neurosci Lett* 795:137033.  
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2022.137033>
  33. *Hu J, Huang K, Bao F, Zhong S, Fan Q, Li W* (2023) Low-dose lipopolysaccharide inhibits spinal cord injury-induced neuronal apoptosis by regulating autophagy through the lncRNA MALAT1/Nrf2 axis. *PeerJ* 11: e15919.  
<https://doi.org/10.7717/peerj.15919>
  34. *Wang TH, Xiong LL, Yang SF, You C, Xia QJ, Xu Y, Zhang P, Wang SF, Liu J* (2017) LPS pretreatment provides neuroprotective roles in rats with subarachnoid hemorrhage by downregulating MMP9 and Caspase3 associated with TLR4 signaling activation. *Mol Neurobiol* 54:7746–7760.  
<https://doi.org/10.1007/s12035-016-0259-7>
  35. *Burguillos MA, Deierborg T, Kavanagh E, Persson A, Hajji N, Garcia-Quintanilla A, Cano J, Brundin P, Englund E, Venero JL, Joseph B* (2011) Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. *Nature* 472:319–324.  
<https://doi.org/10.1038/nature09788>
  36. *Ji MH, Lei L, Gao DP, Tong JH, Wang Y, Yang JJ* (2020) Neural network disturbance in the medial prefrontal cortex might contribute to cognitive impairments induced by neuroinflammation. *Brain Behav Immun* 89:133–144.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.06.001>
  37. *Bowyer JF, Sarkar S, Burks SM, Hess JN, Tolani S, O'Callaghan JP, Hanig JP* (2020) Microglial activation and responses to vasculature that result from an acute LPS exposure. *Neurotoxicology* 77:181–192.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.01.014>
  38. *Badshah H, Ali T, Kim MO* (2016) Osmotin attenuates LPS-induced neuroinflammation and memory impairments via the TLR4/NF $\kappa$ B signaling pathway. *Sci Rep* 6:24493.  
<https://doi.org/10.1038/srep24493>
  39. *Lopes PC* (2016) LPS and neuroinflammation: a matter of timing. *Inflammopharmacology* 24:291–293.  
<https://doi.org/10.1007/s10787-016-0283-2>
  40. *Savchenko VL, Nikonenko IR, Skibo GG, McKanna JA* (1997) Distribution of microglia and astrocytes in different regions of the normal adult rat brain. *Neurophysiology* 29:343–351.
  41. *Savchenko VL, McKanna JA, Nikonenko IR, Skibo GG* (2000) Microglia and astrocytes in the adult rat brain: comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity. *Neuroscience* 96:195–203.  
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(99\)00538-2](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(99)00538-2)
  42. *Tan YL, Yuan Y, Tian L* (2020) Microglial regional heterogeneity and its role in the brain. *Mol Psychiatry* 25:351–367.  
<https://doi.org/10.1038/s41380-019-0609-8>

## CENTRAL RESPONSES TO PERIPHERAL INFLAMMATION MAY INCLUDE DECREASED EXPRESSION OF KEY APOPTOTIC PROTEASE CASPASE-3 IN BRAINSTEM

A. V. Bannova<sup>a, #</sup>, G. T. Shishkina<sup>a</sup> and N. N. Dygalo<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: anitik@bionet.nsc.ru*

Microglia activation by proinflammatory stimuli, including lipopolysaccharide (LPS), is considered among the risk factors for neurodegeneration, but the LPS treatment may also have a neuroprotective effect, which leads to further analysis of the relationship between microglial activation and regulators of cell death. In the present work, a comparative study was carried out on proteins expression of marker for activated microglia Iba-1 and the apoptotic executor protease caspase-3 in the brainstem and prefrontal cortex of rats injected intraperitoneally with endotoxin at different doses and schedules. One day after LPS at a dose of 0.5 mg/kg, single, the Iba-1 and caspase-3 expression in both structures did not differ from control values. Endotoxin administration fourfold at the same dose over 7 days (once every 2 days) led one day after the last injection to a significant increase in the Iba-1 level in the brainstem, which was accompanied by a significant decrease in the expression of caspase-3. The same effects in this structure were observed 7 days after a single injection of LPS at a higher dose of 5 mg/kg. In a 7-day experiment, in contrast to the brainstem, no changes in caspase-3 expression were found in the frontal cortex, and an increase in Iba-1 expression was observed only after a single injection of LPS at a high dose. The detected decrease of caspase-3 level in the brain stem under neuroinflammatory conditions may reflect the development of neuroprotective processes, especially important for the structure responsible for such key body functions as respiration, blood pressure and heartbeat.

**Keywords:** lipopolysaccharide, active caspase-3, Iba-1, brainstem, prefrontal cortex