

УДК 61.1+616 (411)

*Т.Н. Сергеева, Л.А. Климова, Е.С. Заколюкина***МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЧЕРНОЙ СУБСТАНЦИИ МОЗГА КРЫС ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА РАЗЛИЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ**

Исследовали морфологические изменения в компактной части черной субстанции (ЧСк) через 8 недель после одностороннего стереотаксического введения в эту область 2 мкл бактериального липополисахарида (ЛПС) в концентрации 0,5; 5 и 20 мкг/мкл. В качестве контроля использовали контрлатеральную сторону ЧСк. Дополнительной контрольной группой служили животные, которым интранигрально вводили стерильный физиологический раствор. Введение ЛПС в дозе 0,5 мкг/мкл вызывало увеличение площади тел нейронов без изменения их количества. При этом численность глиоцитов не превышала значений, полученных в контрольных группах. В случае инъекции ЛПС в дозе 5 и 20 мкг/мкл площадь тел нейронов увеличивалась на фоне уменьшения их числа, сопровождающегося увеличением количества гиперхромных клеток среди оставшихся нейронов. При этом наблюдалось повышение численности глии и глионейронального показателя. Полученные результаты могут свидетельствовать о разнонаправленном эффекте действия малых и больших доз эндотоксина.

Ключевые слова: черная субстанция, липополисахарид, нейроны, глиа, нейровоспаление, нейродегенерация.

Черная субстанция (ЧС) среднего мозга является частью нигростриатной системы, вовлеченной в регуляцию моторной функции и мышечного тонуса. Большую роль в реализации данной функции играют дофаминсинтезирующие нейроны компактной части черной субстанции, аксоны которых проецируются в стриатум. Значительное снижение уровня дофамина в стриатуме, связанное с гибелью дофаминергических нейронов черной субстанции, ведет к манифестации двигательных нарушений при болезни Паркинсона [1].

Основными этиологическими факторами данного нейродегенеративного заболевания являются генетическая предрасположенность, действие различных токсических веществ, инфекционные и вирусные агенты, черепно-мозговые травмы, окислительный стресс, эксайтотоксичность [2]. Многочисленные модельные эксперименты с использованием бактериального липополисахарида (ЛПС), являющегося компонентом клеточной стенки грамотрицательных бактерий [3], показали роль нейровоспаления, обусловленного системным или локальным действием нейротоксина, в индукции прогрессирующей нейродегенерации в черной субстанции мозга [4-6]. Кроме того, проведенными исследованиями выявлено, что степень ЛПС-опосредованной нейродегенерации зависит от способа введения ЛПС, кратности и длительности его действия [5; 7].

Известно, что в основе механизмов нейровоспаления лежит активация клеток глии и секреция ими провоспалительных цитокинов, провоцирующих повреждение и гибель нейронов [8; 9]. Однако накапливаются свидетельства того, что, помимо провоспалительных цитокинов, глиоциты способны синтезировать ростовые факторы, такие как BDNF, GDNF, CNTF, NGF [10] и антиоксиданты (глутатион, аскорбат) [11], препятствующие развитию воспалительного процесса.

Логично полагать, что экспрессия того или иного вида антагонистических факторов глиальными клетками, оказывающих, соответственно, нейропротективный или нейродегенеративный эффект нейровоспаления, может зависеть от степени активации глиальных клеток. Для проверки этого предположения мы исследовали морфофункциональные изменения черной субстанции крыс при моделировании нейровоспаления, достигаемого стереотаксическим введением в эту область мозга бактериального липополисахарида различной концентрации.

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено на 22 самках крыс линии Вистар, массой 180–230 г., содержащихся в стандартных условиях вивария Удмуртского государственного университета (12-часовой световой день, свободный доступ к пище и воде). Эксперимент проведен в соответствии с биоэтическими нормами работы с лабораторными животными, утвержденными МЗ СССР №755 от 12.08.1977г. Животным экспериментальной группы стереотаксически однократно в область ЧС правого полушария вводили ЛПС в объеме 2 мкл и концентрации 0,5 мкг/мкл (6 крыс), 5 мкг/мкл (6 крыс), 20 мкг/мкл (6 крыс), а контрольной группе (4 крысы) в том же объеме – стерильный физиологический раствор

(СФР) по координатам: AP=4.9, L=1.5, DV=7.5 [12]. Через 8 недель под эфирным наркозом проводили стандартную процедуру интракардиальной перфузии, после чего животных декапитировали и фиксировали мозг в 4 %-ом растворе параформальдегида. Далее выполняли парафиновую заливку ткани и изготавливали срезы толщиной 7 мкм на уровне черной субстанции. Полученные срезы депарафинировали и окрашивали 0,1 %-ым раствором кризолового фиолетового по методу Ниссля. Окрашенные препараты исследовали в микроскоп «Nikon Eclipse E200» и фотографировали с помощью фотоприставки CanonPowerShot A640. Далее проводили подсчет количества нейронов и глиоцитов, а также измерение площади тел нейронов на стороне введения и контрлатеральной стороне (контроль). При этом исследовали не менее 80 полей зрения с помощью компьютерной программы ImagePro Insight 7.0 (MediaCybernetics, USA) и рассчитывали глионейрональный показатель – отношение числа клеток нейроглии к нейронам [13].

Статистический анализ осуществляли в программе Statistica 10. Для оценки достоверности полученных результатов использовали непараметрический дисперсионный анализ Крускала-Уоллиса. Достоверными считали отличия при уровне значимости $P < 0,05$. Данные представляли в процентах относительно контроля (интактная область), принимаемого за 100 %. Исследуемые величины представляли как среднее арифметическое \pm стандартное отклонение.

Результаты и их обсуждение

Через 8 недель после унилатерального введения бактериального липополисахарида (ЛПС) в концентрации 0,5 мкг/мкл, 5 мкг/мкл, 20 мкг/мкл обнаружены дозозависимые изменения морфологии компактной части черной субстанции (ЧСк). В группе животных с введением ЛПС в концентрации 0,5 мкг/мкл не наблюдалось видимых отличий между ЧСк области введения от интактной области. Компактная часть черной субстанции представлена симметрично расположенными крупными нейронами вытянутой и округлой формы, распределенными, соответственно, в верхнем и нижнем слоях. При этом в исследуемой области не наблюдалось увеличения количества нейроглии и выраженной сосудистой реакции, а в нейронах отсутствуют признаки дегенеративных изменений (рис.1). Изучение микропрепаратов контрольной группы животных также не выявило существенных отличий в состоянии исследуемой области мозга правого и левого полушария.

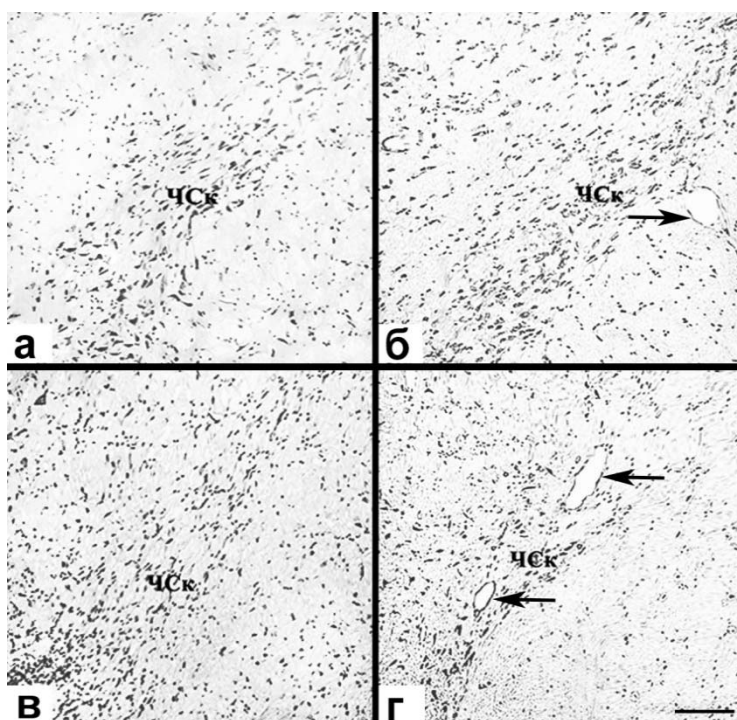


Рис. 1. Морфологическая картина компактной части черной субстанции через 8 недель после введения СФР (а) и ЛПС в дозе 0,5 мкг/мкл (б), 5 мкг/мкл (в) и 20 мкг/мкл (г). Стрелками обозначены кровеносные сосуды. Обозначения: ЧСк – компактная часть черной субстанции.

Длина линии = 100 мкм

Напротив, введение в черную субстанцию ЛПС в концентрациях 5 и 20 мкг/мкл сопровождалось значительными негативными изменениями, характеризующимися снижением количества нейронов и увеличением числа глиоцитов. Причем наблюдаемые изменения коррелировали с повышением концентрации бактериального эндотоксина (рис. 1). Кроме того, введение высоких доз эндотоксина вызывало значительное увеличение диаметра сосудов (рис. 1), характеризующее реактивные изменения в ходе развития воспалительного ответа.

Данные морфометрического анализа показали, что введение ЛПС в концентрации 0,5 мкг/мкл вызывало увеличение площади тел нейронов на $12 \pm 5,3 \%$ ($P < 0,05$) в сравнении с интактной областью и областью введения СФР в контрольной группе животных. Такой характер изменений данного показателя сохранялся и в группах с введением ЛПС в концентрации 5 мкг/мкл ($+15,1 \pm 6,2 \%$; $P < 0,001$) и 20 мкг/мкл ($+28,4 \pm 6,4 \%$; $P < 0,001$). Увеличение площади тел нейронов может свидетельствовать о функциональных изменениях, обусловленных токсическим действием липополисахарида.

Введение высоких доз эндотоксина индуцировало дегенерацию нейронов компактной части черной субстанции. В группе животных, получивших инъекцию ЛПС в концентрации 5 мкг/мкл и 20 мкг/мкл, количество нервных клеток составило, соответственно, $65,3 \pm 13,0 \%$ ($P < 0,001$) и $47,8 \pm 12,3 \%$ ($P < 0,001$) по сравнению с интактной областью (рис. 1). Введение в черную субстанцию СФР и ЛПС в концентрации 0,5 мкг/мкл не приводило к достоверному уменьшению количества нейронов ($96,8 \pm 11,6 \%$ и $98,6 \pm 7,5 \%$, соответственно). Снижение численности нейронов в ЧСк сочеталось с увеличением процента гиперхромных нервных клеток на $47,5 \pm 8,7 \%$ ($P < 0,05$) (рис. 2). Подобные изменения тинкториальных свойств цитоплазмы могут свидетельствовать об усилении синтетической активности клеток, что может быть обусловлено компенсаторными процессами, происходящими на фоне снижения их количества.

Инъектирование высоких доз ЛПС в черную субстанцию сопровождалось достоверным увеличением числа глиоцитов в данной области. В случае введения эндотоксина в концентрации 5 мкг/мкл и 20 мкг/мкл прирост количества глиальных клеток составил, соответственно, $+30,9 \pm 8,3 \%$ ($P < 0,05$) и $+41,4 \pm 9,7 \%$ ($P < 0,01$) относительно интактного полушария и области ЧСк с введением СФР в (соответственно $P < 0,05$ и $P < 0,01$) (рис.3).

Вместе с количеством глиоцитов увеличивался и глионейрональный показатель, составляющий $221,1 \pm 14,0 \%$ ($P < 0,01$) при введении эндотоксина в концентрации 5 мкг/мкл и достигающий своего максимума при введении ЛПС в концентрации 20 мкг/мкл ($281,6 \pm 15,0 \%$, $P < 0,001$) (рис.3). Введение же в черную субстанцию СФР или ЛПС в концентрации 0,5 мкг/мкл не влекло за собой изменения численности глиоцитов и значений глионейронального показателя.

Увеличение глионейронального показателя может свидетельствовать об ЛПС - индуцированной активации глиоцитов, которая проявляется в пролиферации и участии в процессе нейрональной гибели. Доказательством этого может служить, в частности, появление группирующихся глиоцитов и увеличение количества перинейрональной глии в компактной части черной субстанции через 8 недель после инъекции липополисахарида в дозировке 5 и 20 мкг/мкл.

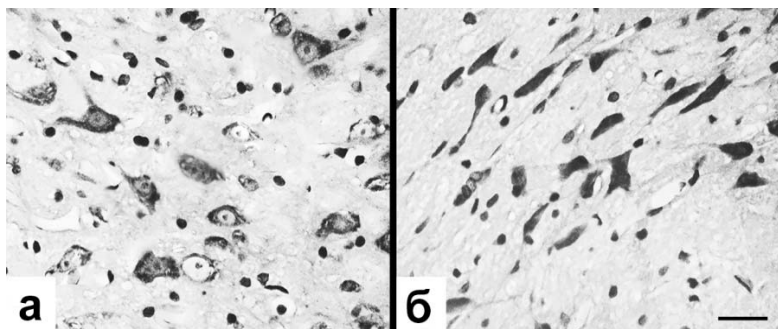


Рис. 2. Гиперхроматоз нейронов компактной части черной субстанции через 8 недель после инъекции высоких доз ЛПС: а) интактная область; б) область введения ЛПС в концентрации 20 мкг/мкл.

Длина линии = 20 мкм

Таким образом, введение в черную субстанцию ЛПС в низкой дозировке (0,5 мкг/мкл) сопровождается увеличением площади нейронов, численность которых остается неизменной. При этом мы не наблюдаем морфологических признаков нейровоспаления, таких как глиоз и реактивные изме-

нения сосудов микроциркуляторного русла. Можно предположить, что в этом случае происходит усиление синтеза астроцитамифакторов антиоксидантного действия, факторов роста и нейротрофинов, необходимых для выживания нейронов и препятствующих развитию воспалительного процесса [8; 14]. Введение в черную субстанцию высоких доз эндотоксина (5 и 20 мкг/мкл) сопровождается сосудистыми реакциями, глиозом и увеличением глионейронального показателя, что свидетельствует о развитии ярко выраженного воспалительного процесса. Известно, что в таких случаях активированная глия активно секретирует целый спектр провоспалительных факторов (ФНО α , ИЛ-1 β , монооксид азота) [15; 16], что, в свою очередь, вызывает повреждение нейронов. Наблюдаемое нами увеличение площади и гиперхроматоз в оставшихся нейронах могут быть следствием компенсаторных изменений в условиях воздействия негативных факторов. Известно, что до определенного порогового уровня нейроны, сохраняющиеся в области повреждения, способны адаптироваться к изменившимся условиям за счет усиления синтетической активности, поддерживая, таким образом, функционирование nigrostriatalной системы на достаточном уровне [17].

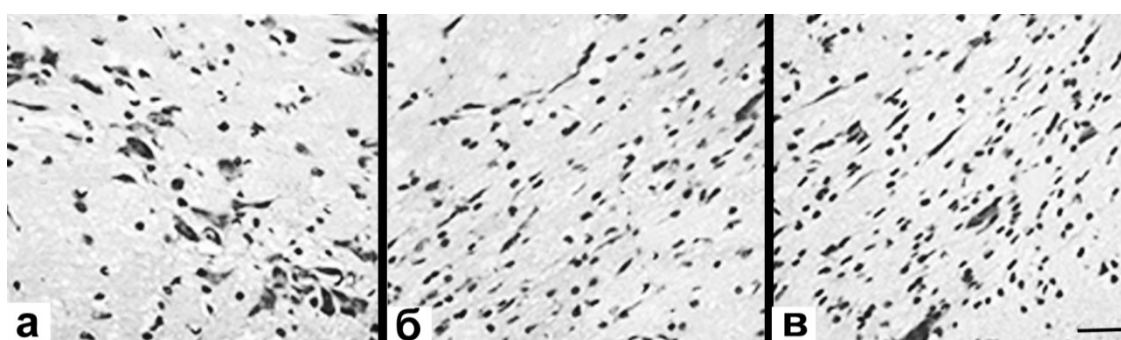


Рис. 3. Увеличение количества глиальных клеток в компактной части черной субстанции через 8 недель после инъекции ЛПС в концентрации 5 и 20 мкг/мкл: а) интактная область; б) область введения ЛПС в дозе 5 мкг/мкл; в) область введения ЛПС в дозе 20 мкг/мкл. Длина линии = 50 мкм

Заключение

Морфологическое исследование компактной части черной субстанции через 8 недель после инъекции в эту область бактериального липополисахарида различной концентрации позволило обнаружить дозозависимый эффектнейроглиососудистых реакций. Введение малой дозы ЛПС приводило к усилению синтетической активности нейронов, не вызывая при этом морфологических проявлений нейровоспаления и нейродегенерации. Большие дозы ЛПС индуцировали нейровоспаление и гибель нейронов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hornykiewicz O. Biochemical aspects of Parkinson's disease // *Neurology*. 1998. Vol. 51. P. 2-9.
2. Delamarré A., Meissner W.G. Epidemiology, environmental risk factors and genetics of Parkinson's disease // *Presse Med*. 2017. № 2. P. 175-181.
3. Raetz C., Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins // *Annu. Rev. Biochem*. 2002. № 71. P. 635-700.
4. Liu Y., Qin L., Wilson B., Wu X., Qian L., Granholm A-C., Crews F. T., Hong J-S. Endotoxin induces a delayed loss of TH-IR neurons in substantianigra and motor behavioral deficits // *Neurotoxicology*. 2008. Vol. 29, № 5. P. 864-870.
5. Qin L., Wu X., Block M.L., Liu Y., Breese G.R., Hong J-S., Knapp D.J., Crews F.T. Systemic LPS Causes Chronic Neuroinflammation and Progressive Neurodegeneration // *Glia*. 2007. Vol. 55, №5.P.453-462.
6. Сергеева Т.Н., Сергеев В.Г., Стенькина А.В. Индукция хронического нейровоспаления в области черной субстанции мозга, вызванная однократным внутримозжочковым введением бактериального липополисахарида // *Вестн. Уральской мед. академической науки*. 2012. № 4. С. 161.
7. Gao H.M., Jiang J., Wilson B., Zhang W, Hong J.S., Liu B. Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease // *J Neurochem*.2002. Vol.81. P. 1285-1297.

8. Kirkley K.S., Popichak K.A., Afzali M.F., Legare M.E., Tjalkens R.B. Microglia amplify inflammatory activation of astrocytes in manganese neurotoxicity // *J Neuroinflammation*. 2017. Vol. 14, № 1. P. 99.
9. McKenzie J.A., Spielman L.J., Pointer C.B., Lowry J.R., Bajwa E., Lee C.W., Klegeris A. Neuroinflammation as a Common Mechanism Associated with the Modifiable Risk Factors for Alzheimer's and Parkinson's Diseases// *Curr Aging Sci*. 2017. Vol. 10, № 3. P. 158-176.
10. Rangasamy S.B., Soderstrom K., Bakay R.A., Kordower J.H. Neurotrophic factor therapy for Parkinson's disease // *Prog Brain Res*. 2010. Vol. 184. P. 237-264.
11. Fernandez-Fernandez S., Almeida A., Bolaños J.P. Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes // *Biochem J*. 2012. Vol. 443, № 1. P. 3-11.
12. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* Amsterdam; Boston: Elsevier Science, 2007. P. 456.
13. Худоерков Р.М. Методы компьютерной морфометрии в нейроморфологии: учеб. пособие (базовый курс). М.: ФГБУ «НЦН» РАМН, 2014. 53 с.
14. Заколюкина Е.С., Тукмачева К.А., Сергеев В.Г. Дозозависимый эффект ЛПС-индуцированной экспрессии BDNF в черной субстанции мозга крыс // *Вестн. Удм. ун-та Сер. Биология. Науки о Земле*. 2017. Т. 27, вып. 1. С. 80-86.
15. Leonoudakis D., Rane A., Angeli S., Lithgow G.J., Andersen J.K., Chinta S.J. Anti-Inflammatory and Neuroprotective Role of Natural Product Securinine in Activated Glial Cells: Implications for Parkinson's Disease // *Mediators Inflamm*. 2017. Vol. 2017. P. 11.
16. Aguilera G., Colin-Gonzalez A. L., Rangel E., Chavarria A., Santamaria A. Redox signaling, neuroinflammation and neurodegeneration // *Antioxid Redox Signal*. 2017. P. 1-97.
17. Kuter K., Olech L., Glowacka U. Prolonged Dysfunction of Astrocytes and Activation of Microglia Accelerate Degeneration of Dopaminergic Neurons in the Rat Substantia Nigra and Block Compensation of Early Motor Dysfunction Induced by 6-OHDA // *Mol. Neurobiol*. 2017. № 2. P. 12035.

Поступила в редакцию 06.10.17

T.N. Sergeeva, L.A. Klimova, E.S. Zakolyukina

MORPHOLOGICAL CHANGES IN SUBSTANTIA NIGRA OF RATS

UNDER THE ACTION OF LIPOPOLYSACCHARIDE OF VARIOUS CONCENTRATION

Morphological changes in the substantia nigra were studied 8 weeks after the stereotaxic introduction of 2 µl of bacterial lipopolysaccharide in a concentration of 0.5; 5 and 20 µg/µl. As a control, the contralateral side of the substantia nigra was used. An additional control group was animals intranigally injected with a sterile saline solution. It was found that the administration of LPS at a dose of 0.5 µg/µl caused an increase of the area of neurons soma without changing their number. The number of gliocytes did not exceed the values obtained in the control groups. In the case of LPS injection at a dose of 5 and 20 µg/µl, the area of neurons soma increased against a background of a decrease in their number, accompanied by an increase in the number of hyperchromic forms among the remaining neurons. At the same time there was an increase in the number of glia and glioneuronal index. The obtained results may indicate a multidirectional effect of small and large doses of endotoxin.

Keywords: substantia nigra, lipopolysaccharide, neurons, glia, neuroinflammation, neurodegeneration.

REFERENCE

1. Hornykiewicz O. Biochemical aspects of Parkinson's disease, in *Neurology*, 1998, vol. 51, pp. 2-9.
2. Delamarre A. and Meissner W.G. Epidemiology, environmental risk factors and genetics of Parkinson's disease, in *Presse Med.*, 2017, no 2, pp. 175-181.
3. Raetz C. and Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins, in *Annu. Rev. Biochem.*, 2002, no 71, pp.635–700.
4. Liu Y., Qin L., Wilson B., Wu X., Qian L., Granholm A-C., Crews F. T. and Hong J-S. Endotoxin induces a delayed loss of TH-IR neurons in substantianigra and motor behavioral deficits, in *Neurotoxicology*, 2008, vol.29, no 5, pp. 864–870.
5. Qin L., Wu X., Block M.L., Liu Y., Breese G.R., Hong J-S., Knapp D.J. and Crews F.T. Systemic LPS Causes Chronic Neuroinflammation and Progressive Neurodegeneration, in *Glia*, 2007, vol. 55, no 5, pp. 453–462.
6. Sergeeva T.N., Sergeev V.G., and Stenkina A.V. [Induction of chronic neuroinflammation in the area of the black substance of the brain, caused by a single intraventricular injection of bacterial lipopolysaccharide], in *Bulletin of the Ural Medical Medical Science*, 2012, no 4, p. 161 (in Russ.)
7. Gao H.M., Jiang J., Wilson B., Zhang W., Hong J.S. and Liu B. Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease, in *J. Neurochem*, 2002, vol. 81, pp. 1285-1297.
8. Kirkley K.S., Popichak K.A., Afzali M.F., Legare M.E. and Tjalkens R.B. Microglia amplify inflammatory activation of astrocytes in manganese neurotoxicity, in *J. Neuroinflammation*, 2017, vol.14, no 1, pp. 99.

9. McKenzie J.A., Spielman L.J., Pointer C.B., Lowry J.R., Bajwa E., Lee C.W. and Klegeris A. Neuroinflammation as a Common Mechanism Associated with the Modifiable Risk Factors for Alzheimer's and Parkinson's Diseases, in *Curr Aging Sci.*, 2017, vol. 10, no 3, pp. 158-176.
10. Rangasamy S.B., Soderstrom K., Bakay R.A. and Kordower J.H. Neurotrophic factor therapy for Parkinson's disease, in *Prog Brain Res.*, 2010, vol.184, pp. 237-264.
11. Fernandez-Fernandez S., Almeida A. and Bolaños J.P. Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes, in *Biochem J.*, 2012, vol. 443, no. 1, pp. 3-11.
12. Paxinos G. and Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* Amsterdam; Boston: Elsevier, 2007. pp. 456.
13. Khudoerov R.M. *Metody komp'yuternoj morfometrii v nejromorfologii: uchebnoe posobie (bazovyj kurs)* [Methods of computer morphometry in neuromorphology: a study guide (basic course)]. M.: FGBU "NTSN" RAMS, 2014, 53 p. (in Russ.)
14. Zakolyukina E.S., Tukmacheva K.A. and Sergeev V.G. [LPS Dose-dependent expression of BDNF in the Rat substantia nigra], in *Vestn. Udm. Un-ta. Ser. Biologija. Nauki o Zemle*, 2017, vol. 27, iss. 1, pp. 80-86 (in Russ.).
15. Leonoudakis D., Rane A., Angeli S., Lithgow G.J., Andersen J.K. and Chinta S.J. Anti-Inflammatory and Neuroprotective Role of Natural Product Securinine in Activated Glial Cells: Implications for Parkinson's Disease, in *Mediators Inflamm.*, 2017, vol. 2017, p. 11.
16. Aguilera G., Colin-Gonzalez A. L., Rangel E., Chavarria A. and Santamaria A. Redox signaling, neuroinflammation and neurodegeneration, in *Antioxid Redox Signal.*, 2017, pp. 1-97.
17. Kuter K., Olech L. and Glowacka U. Prolonged Dysfunction of Astrocytes and Activation of Microglia Accelerate Degeneration of Dopaminergic Neurons in the Rat Substantia Nigra and Block Compensation of Early Motor Dysfunction Induced by 6-OHDA, in *Mol Neurobiol.*, 2017, no. 2, p. 12035.

Сергеева Татьяна Николаевна,
кандидат биологических наук, доцент
кафедры физиологии, клеточной биологии
и биотехнологии
E-mail: tnbio@yandex.ru

Климова Людмила Алексеевна, магистр первого курса
E-mail: mila.klimova.95@mail.ru

Заколюкина Елена Сергеевна, аспирант
кафедры физиологии, клеточной биологии
и биотехнологии
E-mail: alena-immun@yandex.ru

ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»
426034, Россия, г. Ижевск, ул. Университетская, 1 (корп. 1)

Sergeeva T.N.,
Candidate of Biology, Associate Professor
at Department of physiology, cell biology
and biotechnology
E-mail: tnbio@yandex.ru

Klimova L.A., master of the first year
E-mail: mila.klimova.95@mail.ru

Zakolyukina E.S., postgraduate student
at Department of physiology, cell biology
and biotechnology
E-mail: alena-immun@yandex.ru

Udmurt State University
Universitetskaya st., 1, Izhevsk, Russia, 426034