

## Физиологические исследования

УДК 577.1+615.074

*Е.С. Заколюкина, О.А. Вежеева, К.А. Тукмачева, В.Г. Сергеев*

### ВОЗРАСТНЫЕ РАЗЛИЧИЯ В ИЗМЕНЕНИИ ЦИТОФЕНОТИПОВ МИКРОГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕРНОЙ СУБСТАНЦИИ МОЗГА КРЫС, ВЫЗЫВАЕМЫХ СТЕРЕОТАКСИЧЕСКИМ ВВЕДЕНИЕМ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЭНДОТОКСИНА\*

Для количественной характеристики морфологии микроглиоцитов черной субстанции мозга крыс линии Вистар разного возраста в норме и в ответ на стереотаксическое введение в эту область липополисахарида определяли их фрактальную (дробную) размерность и некоторые традиционные морфометрические показатели: общая длина ветвей, число конечных ветвей и точек ветвления, площадь ядра и цитоплазмы. На основе этих количественных критериев предложена классификация из 4 микроглиоцитарных цитофенотипов. Показано достоверное различие в соотношении цитофенотипов у молодых (4 недели) и старых (32 недели) крыс как в норме, так и после введения в черную субстанцию липополисахарида. Только у старых животных введение эндотоксина вызывало гибель нейронов и интенсивное нейровоспаление с появлением фагоцитирующих форм микроглиоцитов.

*Ключевые слова:* микроглиальный фенотип, нейровоспаление, старение, нейродегенерация.

Микроглиоциты (резидентная для нервной ткани форма клеток миеломоноцитарного ряда) – один из главных эффекторов врожденного иммунитета, опосредующих воспалительные реакции в центральной нервной системе (ЦНС). Микроглиоциты реагируют на действие широкого спектра факторов, таких как патогены [1-3], стресс [4; 5], травмы [6-8] быстрым изменением клеточного метаболизма [9; 10] и градуальным изменением своей морфологии [11-13]. В зависимости от интенсивности активации микроглиоциты могут оказывать нейропротективный или цитотоксический эффект.

Одной из актуальных проблем современной нейроморфологии является поиск морфологических коррелятов различных функциональных состояний микроглиоцитов. Затруднения в такого рода исследованиях вызваны отсутствием единой, согласованной классификации микроглиальных цитофенотипов. В зависимости от поставленных задач исследователи используют классификационные системы из двух, трех или четырех параметров [14-16]. Отсутствие стандартной классификации, размытость морфологических и морфометрических критериев, лежащих в основе выделения категориальных групп, зачастую делают невозможным проведение сравнительного анализа описаний глиальных реакций в экспериментах, проведенных разными авторами.

Мы предлагаем для количественной характеристики морфологии различных групп микроглиоцитов наряду с традиционными морфометрическими показателями (общая длина отростков, число конечных ветвей и точек ветвления, площадь клетки) определять их фрактальную (дробную) размерность. Отростчатые клетки обладают свойствами фракталов и характеризуются масштабной инвариантностью, или самоподобием. Считается, что паттерн заполняющих пространство ветвящихся фрактальных (дробных) биологических структур оптимален для выполнения функций распределения потока информации внешней среды в организме животного [17; 18]. Морфология покоящегося микроглиоцита подчиняется определенному повторяющемуся биологическому алгоритму: от клеточного тела отходят отростки первого порядка, которые, в свою очередь, неоднократно повторно ветвятся. Можно предполагать, что фрактальная морфология микроглии оптимизирована для выполнения их основной функции – мониторинга межклеточной среды на наличие потенциально опасных факторов.

Квазифрактальные биологические структуры могут быть количественно охарактеризованы путем определения фрактальной размерности – показателя заполнения пространства фрактальной структурой (в частности, ветвящимися отростками клеток) и меры сложности пространственной ор-

\* Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации по теме «Патофизиологические механизмы функциональных и нейродегенеративных нарушений центральной нервной системы» и гранта РФФИ № 10-04-00246-а «Возрастные изменения в экспрессии микроглиальных провоспалительных белков и нейронального шаперона GRP78 как предрасполагающие факторы болезни Паркинсона».

ганизации этой структуры. Ранее определение фрактальной размерности было успешно применено для характеристики морфологии и классификации нейронов мозга и ганглиозных клеток сетчатки млекопитающих [19-22].

Использование фрактального метода в описании изменяющейся морфологии микроглиоцитов в ответ на воздействие стимулирующих факторов позволяет предложить универсальный и объективный критерий классификации микроглиоцитарных фенотипов, что, в свою очередь, позволит описывать качественно различающиеся стадии нейровоспалительного процесса при помощи количественных параметров. Такой подход может оказаться весьма полезным при оценке возрастзависимых особенностей реагирования микроглиального микроокружения на повреждающие стимулы, которые лежат в основе нейродегенеративных заболеваний, развивающихся с возрастом.

Старение – основной фактор риска для большинства нейродегенеративных заболеваний. Есть основания полагать, что возрастзависимые изменения морфофункциональных свойств микроглиоцитов могут оказывать значительное влияние на развитие дисфункции нейронов и последующую нейродегенерацию [23; 24]. Для проверки этого предположения мы исследовали изменение соотношений микроглиоцитарных фенотипов молодых (4 недели) и старых (32 недели) крыс в области черной субстанции мозга в норме и после стереотаксического унилатерального введения в нее бактериального липополисахарида (ЛПС).

### Материалы и методы исследований

Исследование проведено на 32 крысах-самцах линии Вистар весом от 150 до 280 грамм, которые содержались в стандартных условиях с соблюдением правил проведения работ с использованием экспериментальных животных, утвержденных приказами МЗ СССР № 1045 от 06.04.1973 г., № 1179 от 10.10.1983. Контрольным животным (8-ми молодым в возрасте 4 недель и 8-ми старым, в возрасте 32 недель) при помощи стереотаксической установки инъецировали в область черной субстанции 2 мкл стерильного физраствора. Животным двух экспериментальных групп – молодым и старым (по 8 крыс в каждой группе) – аналогичным образом вводили по 2 мкл раствора липополисахарида (*Escheria coli*). Введение растворов в область черной субстанции производили по следующим координатам: 5,2 мм каудальной брегмы, 2,0 мм латеральной осевого шва, на глубину 7,2 мм относительно твердой оболочки мозга.

Спустя 2 недели после введения растворов в мозг ткани животных контрольных и экспериментальных групп фиксировали транскардиальной перфузией 4 % параформальдегида и отбирали мозг для иммуногистохимического исследования. Мозг выдерживали в 10 %-ном растворе сахарозы, готовили криостатные срезы толщиной 14 мкм. Для иммуногистохимического окрашивания использовали антитела против тирозингидроксилазы (мышинные IgG, 1:2000; Chemicon, Temecula, CA) и CD11b (мышинные IgG, 1:1000; Santa Cruse, USA). Для визуализации локусов связывания первых антител использовали вторые биотилированные антимышинные антитела осли (в разведении 1:200) (BA2001; Vector Laboratories, Burlingame, CA) и авидин-биотин-пероксидазный комплекс (ABC Elite; Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Морфометрический анализ нервных и глиальных клеток в области черной субстанции проводили на коронарных срезах на стороне введения раствора и противоположной стороне мозга, которая рассматривалась как контроль. Обсчитывался каждый пятый срез, средние значения представлялись в процентном выражении относительно контрольных, которые принимались за 100 %. Фрактальная размерность изображений определялась методами разбиения на квадраты (box-counting) и информационной размерности (information dimension) для выборок из 10 клеток каждого класса. Значение лакуарности определяли в программе ImageJ 1.20 (National Institutes of Health, USA) при помощи плагина FracLac (Audrey Karperin, Charles Sturt University).

Статистический анализ данных проводили с использованием программы Statistica 10.0. Различия в количестве клеток и интенсивности экспрессии иммунореактивного сигнала между группами животных анализировали посредством использования метода двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA).

### Результаты и их обсуждение

Подсчет нейронов, иммунореактивных к тирозингидроксилазе, в черной субстанции мозга у животных разного возраста через неделю после введения в эту область эндотоксина показал достоверное

падение их количества по сравнению с контрольной стороной мозга лишь в группе старых животных ( $56,7 \pm 12,4\%$ ,  $P < 0,01$ ). Количество микроглиальных клеток в черной субстанции старых животных контрольной группы достоверно превышало таковое у молодых (на  $186,8 \pm 24,8\%$ ). Введение ЛПС индуцировало микроглиоз как у молодых ( $+68,4 \pm 14,8\%$ ), так и старых крыс ( $+94,5 \pm 15,6\%$ ), однако у старых животных этот рост был достоверно выше ( $P < 0,01$ ). Помимо ЛПС-индуцированного увеличения количества микроглиальных клеток значительно менялось соотношение их морфологических типов.

Для описания последних мы провели морфометрическое исследование иммунопозитивных к CD11b микроглиоцитов, в ходе которого подсчитывалось количество отростков, их разветвлений, измерялись площади цитоплазмы и ядер, а также определялись средние значения фрактальной размерности нейронов каждой исследованной группы. Подсчет показал, что значения фрактальной размерности колебались в диапазоне от одной до двух единиц. Между этими целыми числами размерности на соответствующей шкале в порядке увеличения располагались средние значения фрактальной размерности (Df) анализируемых микроглиоцитов. Значения фрактальной размерности на гистограммах, определенные методами разбиения на квадраты (Dbox), и информационной размерности (Dinf), а также площади клетки и общей длины отростков позволили выделить 4 основных фенотипических типа.

Первая клеточная группа (цитофенотип А), аналогичная описанной в литературе как «покоящаяся микроглия», характеризовалась незначительным количеством отростков ( $8,2 \pm 4,4$ ) и небольшим количеством ветвлений ( $12,4 \pm 5,4$  бифуркаций на клетку). В эту группу включались микроглиоциты с фрактальной размерностью в диапазоне от 1,5 до 1,7 условных единиц. Вторая микроглиоцитарная группа (цитофенотип Б) по морфологическим характеристикам оказалась сходной с описанным ранее некоторыми авторами типом «премированных микроглиоцитов». Для них характерно достоверное увеличение количества отростков и разветвлений относительно «покоящейся микроглии» на  $67,5 \pm 8,4\%$  и  $94,4 \pm 12,6\%$  соответственно. Площадь ядер и цитоплазмы микроглиоцитов в этой группе по сравнению с цитофенотипом А также достоверно выше (на  $48,6 \pm 18,4\%$  и  $56,5 \pm 15,7\%$  соответственно). В эту группу включались клетки с фрактальной размерностью в диапазоне от 1,7 до 2 единиц. Третья микроглиальная группа, или «реактивная микроглия» (цитофенотип С), отличается дальнейшим нарастанием площадей цитоплазмы и ядра относительно покоящейся микроглии (на  $54,6 \pm 16,1\%$  и  $66,5 \pm 12,4\%$  соответственно), но значительной редукцией количества отростков и бифуркаций относительно клеток с цитофенотипом Б. Эту группу характеризует диапазон фрактальной размерности от 1,3 до 1,5 единиц. В четвертую группу вошли клетки, аналогичные ранее описанной «фагоцитирующей» форме микроглиоцитов (цитофенотип Д). Эти клетки характеризуются либо редкими короткими неветвящимися отростками, либо их полным отсутствием. На фрактальной шкале они занимали интервал от 1 до 1,2 единиц.

Анализ соотношения различных типов в исследуемых группах животных продемонстрировал следующую тенденцию. У молодых животных доминирует А-цитофенотип, свойственный для «покоящейся микроглии». Введение ЛПС вызывает не только увеличение абсолютного количества микроглиоцитов, но и достоверное нарастание микроглиоцитов с Б-цитофенотипом (от  $4,2 \pm 1,1\%$  в контроле до  $46,8 \pm 2,2\%$  после введения ЛПС). Важно отметить, что у молодых животных ни в норме, ни после интраназального введения ЛПС не обнаруживаются С- и Д-микроглиоциты. Сопоставляя это наблюдение с данными об отсутствии в области черной субстанции ЛПС-индуцированных нейродегенеративных изменений, логично полагать, что функциональная активность Б-микроглии носит репаративный характер.

Исследование мозга старых животных продемонстрировало наличие в контрольной группе всех идентифицированных микроглиальных цитофенотипов с относительным преобладанием Б- и С-микроглии ( $36,5 \pm 13,2\%$  и  $32,9 \pm 15,6\%$  от общего количества соответственно). С учетом того, что помимо этих клеток в черной субстанции присутствовали Д-микроглиоциты ( $8,4 \pm 8,2\%$ ), можно предположить, что даже в отсутствие действия экзогенного инфламogensа нервная ткань черной субстанции находится в состоянии воспаления. Вероятно, в исследованной ткани еще сохраняется баланс репаративных и продегенеративных популяций микроглиоцитов. Логично полагать, что дополнительное воздействие на эту систему эндотоксина способно сместить баланс в сторону цитофенотипов, индуцирующих дегенеративные изменения в нейронах. Действительно, введение ЛПС в черную субстанцию мозга старых животных ведет к достоверному увеличению С- и Д-микроглиоцитов относительно старых контрольных крыс (на  $42,8 \pm 14,6\%$  и  $12,7 \pm 9,1\%$  соответственно).

Таким образом, мы обнаружили, что черная субстанция мозга старых животных содержит повышенное количество активированных микроглиоцитов. Такое состояние облегчает индукцию нейродегенеративных изменений в ответ на введение бактериального эндотоксина. Анализ соотношения четырех основных микроглиальных фенотипов позволяет судить о характере воспалительного процесса в черной субстанции мозга.

### Заключение

Количество микроглиальных клеток в области черной субстанции старых животных достоверно выше, чем у молодых животных. Стереотаксическое введение в эту область бактериального эндотоксина вызывает различные биологические эффекты. У старых животных на фоне преобладания провоспалительных С- и Д-цитотипов индуцируется гибель нейронов, тогда как у молодых доминирует В-цитотип, вероятно обладающий репаративным действием на нейроны. Используемый нами для характеристики различных цитотипов показатель фрактальной размерности дает адекватную количественную оценку качественных изменений морфологии микроглиоцитов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Garvey L.J., Pavese N., Politis M. et al. Increased microglia activation in neurologically asymptomatic HIV-infected patients receiving effective ART; an 11C-PK11195 PET study // *AIDS*. 2013. Vol. 28. P. 67–72.
2. Ding T., Zhou X., Kouadir M. et al. Cellular prion protein participates in the regulation of inflammatory response and apoptosis in BV2 Microglia during infection with mycobacterium bovis // *J Mol Neurosci*. 2013. Vol. 51. P. 118-126.
3. Dellacasa-Lindberg I., Fuks J.M., Arrighi R.B. et al. Migratory activation of primary cortical microglia upon infection with *Toxoplasma gondii* // *Infect Immun*. 2011. Vol. 79. P. 3046-3052.
4. Sugama S., Takenouchi T., Fujita M. et al. Corticosteroids limit microglial activation occurring during acute stress // *Neuroscience*. 2012. Vol. 232. P. 13-20.
5. Kopp B.L., Wick D., Herman J.P. Differential effects of homotypic vs. heterotypic chronic stress regimens on microglial activation in the prefrontal cortex // *Physiol Behav*. 2013. Vol. 122. P. 246-252.
6. Morrison H.W., Filosa J.A. A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion // *J Neuroinflammation*. 2013. Vol. 10. P. 4-12.
7. Gulyas B., Toth M., Schain M. et al. Evolution of microglial activation in ischaemic core and peri-infarct regions after stroke: a PET study with the TSPO molecular imaging biomarker [(11)C] vinpocetine // *J Neurol Sci*. 2012. Vol. 320. P. 110-117.
8. Smith C., Gentleman S.M., Leclercq P.D. et al. The neuroinflammatory response in humans after traumatic brain injury // *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2012. Vol. 39. P. 654-666.
9. Kettenmann H., Hanisch U.K., Noda M., Verkhratsky A. Physiology of microglia // *Physiol Rev*. 2011. Vol. 91. P. 461-553.
10. Graeber M.B., Streit W.J. Microglia: biology and pathology // *Acta Neuropathol*. 2010. Vol. 119. P. 89-105.
11. Stence N., Waite M., Dailey M.E. Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices // *Glia*. 2001. Vol. 33. P. 256-266.
12. Soltys Z., Ziaja M., Pawlinski R., Setkowicz Z., Janeczko K. Morphology of reactive microglia in the injured cerebral cortex. Fractal analysis and complementary quantitative methods // *J Neurosci Res*. 2001. Vol. 63. P. 90-97.
13. Karperien A., Ahammer H., Jelinek H.F. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis // *Front Cell Neurosci*. 2013. Vol. 7. P. 3-8.
14. Stence N., Waite M., Dailey M.E. Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices // *Glia*. 2001. Vol. 33. P. 256-266.
15. Sheng J.G., Mrak R.E., Griffin W.S. Neuritic plaque evolution in Alzheimer's disease is accompanied by transition of activated microglia from primed to enlarged to phagocytic forms // *Acta Neuropathol*. 1997. Vol. 94. P. 1-5.
16. Norden D.M., Godbout J.P. Review: microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation // *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2013. Vol. 39. P. 19-34.
17. Goldberger A.L. Fractal variability versus pathological periodicity: complexity and stereotypy in disease // *Perspect. Biol. Med*. 1997. Vol. 40. P. 543-561.
18. Исаева В.В., Чернышев А.В., Шкуратов Д.Ю. Фракталы и хаос в биологическом морфогенезе. Владивосток: Дальнаука, 2004. 162 с.
19. Kniffki K.-D., Pawlak M., Vahle-Hinz C. Fractal dimensions and dendritic branching of neurons in the somatosensory thalamus // *Fractals in biology and medicine*. Basel: Birkhäuser. 1994. P. 221-229.
20. Jelinek H.F., Spence I. Categorization of physiologically characterized non- $\alpha$ /non- $\beta$  cat retinal ganglion cells using fractal geometry // *Fractals*. 1997. Vol. 5. P. 673-684.
21. Fernandez E., Bolea J.A., Ortega G., Louis E. Are neurons multifractals? // *J. Neurosci. Meth*. 1999. Vol. 89. P. 151-157.

22. Исаева В.В., Пуцина Е.В., Каретин Ю.А. Изменения морфометрических показателей и фрактальной размерности нейронов спинного мозга в онтогенезе симы *Oncorhynchus Masou* // Биология моря. 2006. Т. 32, № 2. С. 125-133.
23. Frank M.G., Barrientos R.A., Biedenkapp J.C. et al. mRNA up-regulation of MHC II and pivotal pro-inflammatory genes in normal brain aging // *Neurobiology of Aging*. 2006. Vol. 27. P. 717-722.
24. Godbout J.P., Chen J., Abraham J. et al. Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice after activation of the peripheral innate immune system // *Faseb Journal*. 2005. Vol. 19. P. 1329-1331.

Поступила в редакцию 10.09.15

*E.S. Zakolukina, O.A. Vezeeva, K.A. Tykmacheva, V.G. Sergeev*

**AGE DIFFERENCES IN THE RATIO OF MICROGLIA PHENOTYPE IN THE SUBSTANTIA NIGRA OF RATS IN RESPONSE TO LIPOPOLYSACCHARIDE ADMINISTRATION**

Measurements of fractal dimension and some morphometric parameters (total length of branches, number of terminal branches, number of branching points, and cell area) were used for the quantification of morphological patterns of microglia in rats substantia nigra at two different age (4 and 32 weeks) in response to stereotactic administration of lipopolysaccharide (LPS). A microglial phenotype classification based on these quantitative criteria was proposed. There is the significant difference in the phenotype ratio in young and old animals in normal state and after LPS injection. Administration of endotoxin caused neuronal death and neuroinflammation with phagocytic phenotype of microglia only in old animals.

*Keywords:* microglial phenotype, neuroinflammation, aging, neurodegeneration.

Заколюкина Елена Сергеевна, магистрант профиля «Биология клетки» кафедры анатомии и физиологии человека и животных  
E-mail: alena-immun@ya.ru

Вежеева Ольга Александровна, аспирант кафедры анатомии и физиологии человека и животных  
E-mail: promo-olga@yandex.ru

Тукмачева Ксения Андреевна, студентка бакалавриата направления «Биология»  
E-mail: kseniyatukmasheva@rambler.ru

Сергеев Валерий Георгиевич, доктор биологических наук, профессор кафедры анатомии и физиологии человека и животных  
E-mail: cellbio@ya.ru

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

Zakolukina E.S., master student of profile "Cell biology" at Department of Anatomy and Physiology of Human and Animals  
E-mail: alena-immun@ya.ru

Vezeeva O.A., postgraduate student at Department of Anatomy and Physiology of Human and Animals  
E-mail: promo-olga@yandex.ru

Tykmacheva K.A., student  
E-mail: kseniyatukmasheva@rambler.ru

Sergeev V.G., Doctor of Biology, Professor at Department of Anatomy and Physiology of Human and Animals  
E-mail: cellbio@ya.ru

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