

Т. Е. КУЗНЕЦОВА, Ж. А. ГЛАДКОВА

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПОЛОСАТОГО ТЕЛА КРЫС ПОСЛЕ КУРСОВОГО ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *ESCHERICHIA COLI*

Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Республики Беларусь

Проведено исследование влияния липополисахарида *Escherichia coli* (ЛПС *E. coli*; 0,1; 1; 10 мкг/кг) на частоту разрядов нейронов и морфометрические показатели полосатого тела после его 3-недельного ежедневного интраназального апплицирования.

Анализ полученных данных позволил выявить не только структурные и функциональные изменения нейродегенеративного характера в полосатом теле крыс Вистар, вызванных интраназальным апплицированием малых доз бактериального эндотоксина, но и зафиксировать их асимметрию

Ключевые слова: ЛПС *E. coli*, полосатое тело, спонтанная электрическая активность нейронов, морфометрический анализ.

Введение. В настоящее время наблюдается рост нейродегенеративных заболеваний. Болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и рассеянный склероз являются наиболее распространенными заболеваниями, поражающими миллионы людей во всем мире [1]. Заболевания данной группы характеризуются высокой социально-экономической значимостью, ростом числа случаев заболеваний с ранним началом, быстрым течением, прогрессирующей потерей нейрональной функции, что в конечном итоге приводит к двигательным и/или когнитивным нарушениям [2].

Эпидемиологические исследования показали наличие корреляции между хроническими микробными инфекциями и такими неврологическими расстройствами, как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и рассеянный склероз [3, 4]. Однако в связи со сложностью взаимодействий при микробных инфекциях, механизмы, лежащие в основе формирования нейровоспаления, остаются не до конца изученными [5].

Полученные экспериментальные данные по выявлению инфекционных агентов в тканях головного мозга пациентов с уже диагностированной патологией позволили выдвинуть и обосновать гипотезу о том, что именно микробная инфекция является одним из факторов риска развития нейродегенеративных заболеваний [6, 7]. Кроме того, было показано, что нейровоспаление является сложным многоуровневым механизмом, который обеспечивает компенсаторную реакцию нервной ткани на начальных этапах, однако в дальнейшем приводит к необратимой нейродегенерации и рассматривается учеными как центральный механизм, вызывающий повреждение нейронов при наличии микробных инфекций у пациента [8, 9].

Одной из наиболее изученных гипотез о причинах заболеваний, основанных на гибели нейронов, является предположение о том, что кишечные микробы влияют на мозг через ось «кишечник-мозг». Ось «кишечник-мозг» представляет собой двустороннюю функциональную связь между кишечником и головным мозгом, которая включает нейроэндокринные, нейронные, эндокринные и иммунные сигнальные пути [10]. Через вышеуказанные пути гамма-аминомасляная кислота, серотонин, норадреналин, гистамин и т. д. регулируют физиологические процессы в головном мозге в норме [11, 12]. Однако при изменении состава кишечного микробиома в сторону преобладания патологических бактерий наблюдается слабовыраженное воспаление, усиление окислительного стресса, нарушение энергетического обмена и усиление клеточной дегенерации [13, 14].

Бактериальный эндотоксин используется для изучения воздействия микробных агентов на головной мозг. В научных публикациях показано, что ЛПС *E. coli*, который в значительных количествах содержится в кишечнике может приводить к развитию нейродегенеративных заболеваний за счет активации микроглии [15, 16].

Экспериментальные модели по изучению воздействия чужеродных агентов на головной мозг, основанные на их введении через носовую полость, обоснованы тем, что вещества, вводимые интраназально, способны проникать в головной мозг, минуя гематоэнцефалический барьер [17–19].

Целью данного исследования являлось определение симметрии структурно-функциональных изменений в полосатом теле после длительного интраназального введения ЛПС *E. coli*.

Материалы и методы исследования. Все эксперименты проведены на белых крысах-самцах породы Вистар массой 280–320 г ($n = 40$). Интраназальное введение физиологического раствора натрия хлорида (0,9 %, Sigma-Aldrich, США) и ЛПС *E. coli* в дозе 0,1; 1; 10 мкг/кг (0111: B4; Sigma-Aldrich, США) производилось один раз в день в течение 21-х суток. Экспериментальные животные были разделены на четыре группы. Контрольной группе вводили физиологический раствор натрия хлорида (0,1 мл/кг; $n = 10$); группе 1 – ЛПС *E. coli* в дозе 0,1 мкг/кг ($n = 10$); группе 2 – ЛПС *E. coli* в дозе 1 мкг/кг ($n = 10$); группе 3 – ЛПС *E. coli* в дозе 10 мкг/кг ($n = 10$). Животных содержали в стандартных условиях вивария (температура воздуха 23 ± 1 °C, режим вентиляции 30 мин/ч) при свободном доступе к воде и пище, на одинаковом рационе питания в соответствии со стандартами содержания лабораторных животных, 12/12-часовом ритме света и темноты, с соблюдением режима тишины.

Острые эксперименты проводили на наркотизированных животных (нембутал и уретан в пропорции 30 мг/кг и 500 мг/кг внутривенно; Sigma-Aldrich, США). У крыс под наркозом удаляли шерсть с дорсальной поверхности головы, рассекали мягкие ткани свода черепа, удаляли надкостницу. Голову крыс фиксировали в стереотаксическом устройстве СЭЖ-5 (Конструктор, Украина) таким образом, чтобы краниальные ориентиры лямбда и брегма располагались строго в горизонтальной плоскости. С помощью микродрели (Sae Yang Microtech, Южная Корея) в костях черепа просверливали отверстие диаметром 1 мм в соответствии со стереотаксическими координатами полосатого тела: 0,72 мм каудальнее брегмы, 2,8 мм латеральнее средней линии и 3,5 мм вентрально относительно поверхности черепа [20]. Далее вскрывали твердую мозговую оболочку и через трепанационное отверстие в ткань мозга с помощью микроманипулятора медленно погружали электрод (WPI, США).

Полученные данные записывали и обрабатывали с помощью программы регистрации электрофизиологических данных «InputWin» (Институт физиологии, Беларусь).

Для проведения морфометрического анализа ткань мозга извлекали в течение 3 минут после декапитации. Последующее криосрезирование (Microm GmbH, Германия) проводили при температуре -20 °C для получения 10-мкм срезов для анализа нейрональных и глиальных клеток (модифицированная окраска по Нисслю). Криосрезы высушивали на воздухе в течение 2–3 мин, фиксировали, дегидратировали в этаноле и окрашивали толуидиновым синим в течение 10 минут (Биовитрум, Россия) [21]. Препараты мозга также окрашивали гематоксилином и эозином. Срезы исследовали с помощью светового микроскопа LUM-1, оснащенного цифровой камерой (Альтами, Россия). Морфометрию гистологических препаратов проводили при увеличении $\times 400$ в 10 полях зрения на одно животное. Морфометрия выполнялась автоматически с помощью программы ImageJ 1.52a (National Institutes of Health, USA).

Все эксперименты проведены с учетом рекомендаций Европейской конвенции о гуманном обращении с лабораторными животными [22].

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием табличного процессора Microsoft Excel (Microsoft Office 2021; Microsoft, США), статистической программы «Statistica 10» (StatSoft, США). Нормальность распределения

значений проверяли с помощью W-критерия Шапиро–Уилка. Статистическую значимость полученных результатов в случае нормального распределения оценивали с помощью t-критерия Стьюдента для зависимых/независимых выборок и представляли в виде среднего значения и стандартного отклонения ($M \pm SD$). Для интерпретации данных в случае отклонения распределения от нормального использовали медиану (Me) и интерквартильный размах – 25 и 75 процентиля [LQ; UQ], для сравнения зависимых выборок использовали критерий Вилкоксона, для независимых – U-критерий Манна-Уитни. При анализе полученных данных использовали номинальный уровень статистической значимости ($p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение. Установлено, что интраназальное введение физиологического раствора не сопровождается изменениями нейронов в исследуемых зонах мозга: преобладали нормохромные клетки симметричной формы с равномерно распределенным тигроидным веществом и ядрами округлой формы с крупными ядрышками, расположенными обычно в центре ядра; в небольшом количестве визуализировали гиперхромные и гипохромные нейроны (рисунок 1).

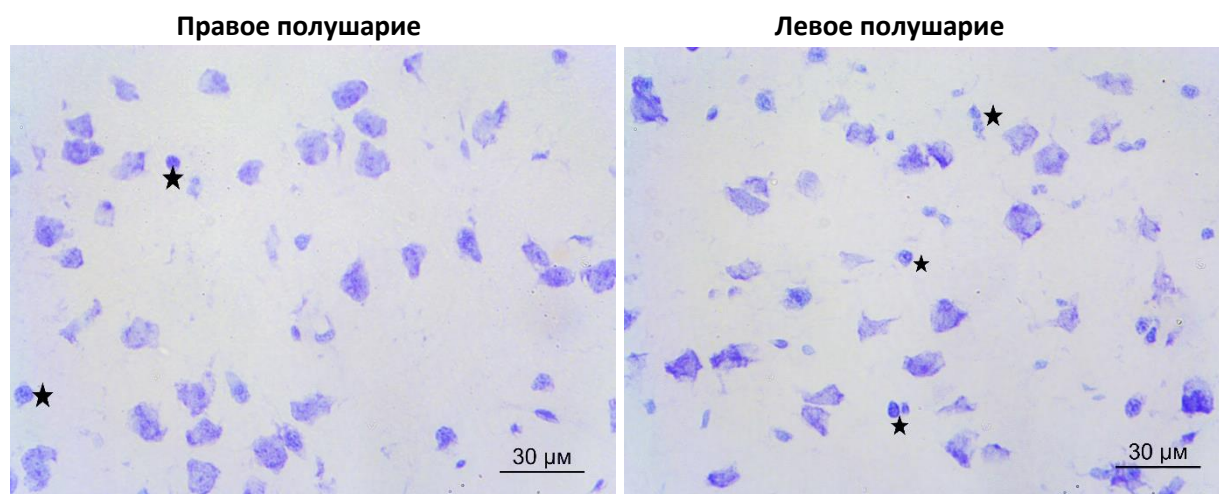


Рисунок 1. Гистоструктура полосатого тела (справа, слева) контрольной группы крыс Вистар, окрашенная по Нисслю. Увеличение: $\times 400$. Звездочки – глиальные клетки. Масштабная линейка = 30 мкм

При проведении морфометрического исследования полосатого тела обоих полушарий мозга крыс у интактных животных не обнаружили выраженной структурной асимметрии (таблица 1).

Таблица 1. Данные морфометрического исследования полосатого тела после ежедневного введения физиологического раствора (0,01 мл/кг) или ЛПС *E. coli* в дозе 0,1; 1; 10 мкг/кг в течение 21-х суток.

	правое полушарие			
	контроль	0,1 мкг/кг	1 мкг/кг	10 мкг/кг
количество нейронов, n	27 $\pm$ 6	31 $\pm$ 5 *	29 $\pm$ 8	27 $\pm$ 7
средний размер нейронов, мкм ²	79 $\pm$ 10	77 $\pm$ 8	76 $\pm$ 7	73 $\pm$ 8 *
количество нейронов с деструктивными изменениями, %	3	6 *	14 *	17 *
количество глиальных клеток, n	15 $\pm$ 3	17 $\pm$ 4 *	16 $\pm$ 5	19 $\pm$ 5 *
электрическая активность нейронов, имп/с	2,8 [1,8;3,4]	2,2 [1,6;6,4]	3,6 [2,4;5,6]	2,3 [1,4;3,1]

Окончание таблицы 1.

	левое полушарие			
количество нейронов, п	25 ± 7	32 ± 7 *	32 ± 7 *	25 ± 8
средний размер нейронов, мкм ²	78 ± 12	67 ± 7 **,*	68 ± 6 **,*	73 ± 6 *
количество нейронов с деструктивными изменениями, %	2	4 **,*	9 **,*	13 *
количество глиальных клеток, п	15 ± 4	19 ± 5 *	16 ± 4	17 ± 7
электрическая активность нейронов, имп/с	2,6 [1,4;4,3]	2,2 [1,4;3,2] **	3,0 [2,0;3,6] **	4,6 [2,7;5,7] **

Примечание: данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение; * $p < 0,05$ – статистически значимые различия между группами ЛПС *E. coli* и контроля; ** $p < 0,05$ – статистически значимые различия между правым и левым полушарием.

После интраназального введения ЛПС *E. coli* в дозе 0,1 мкг/кг выявили увеличение числа нейронов в поле зрения в полосатом теле правого и левого полушарий; размеры нейронов были достоверно меньше в левом полушарии, справа не различались; число нейронов с признаками деструкции также увеличивалось справа и слева; визуализировали гипохромные нейроны, теневые клетки и нейроны с вакуолизацией цитоплазмы; число нервных клеток с деструкцией справа было достоверно больше, чем слева; число глии в поле зрения достоверно увеличивалось справа и слева, следует отметить, слева увеличение было более выражено (таблица 1, рисунок 2).

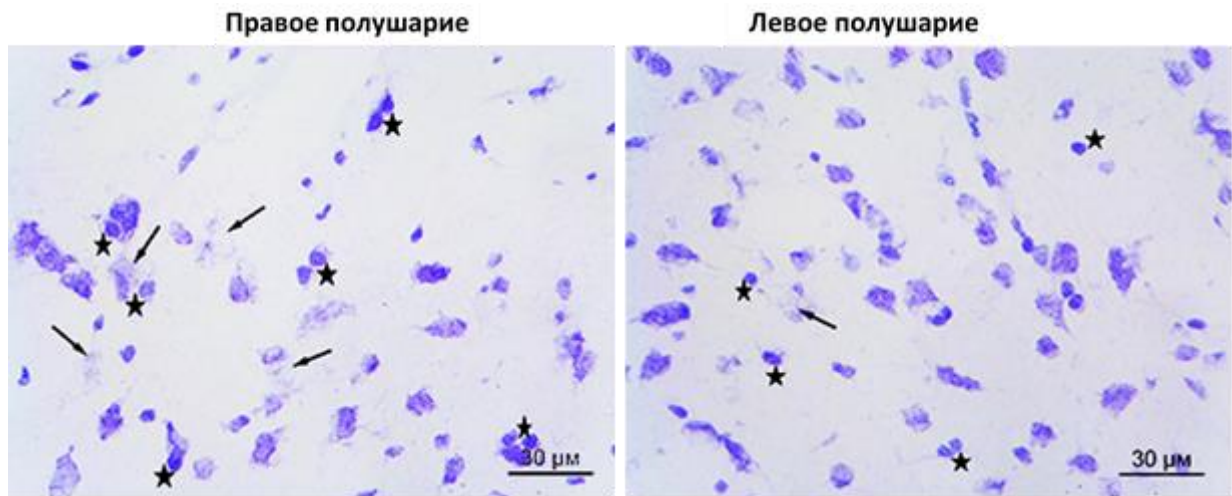


Рисунок 2. Гистоструктура полосатого тела (правое и левое полушарие) крыс Вистар после интраназального применения ЛПС *E. coli* в дозе 0,1 мкг/кг, окрашенного по Нисслю. Увеличение: ×400. Стрелками обозначены нейроны с аномальной морфологией, звездочками – глиальные клетки. Масштабная линейка = 30 мкм

После введения ЛПС *E. coli* в дозе 1 мкг/кг число нейронов в поле зрения увеличивалось, а их размеры уменьшались в левом полушарии; число нейронов с деструктивными изменениями увеличивалось с обеих сторон; количество глиоцитов с обеих сторон не отличалось от контрольных показателей (таблица 1, рисунок 3).

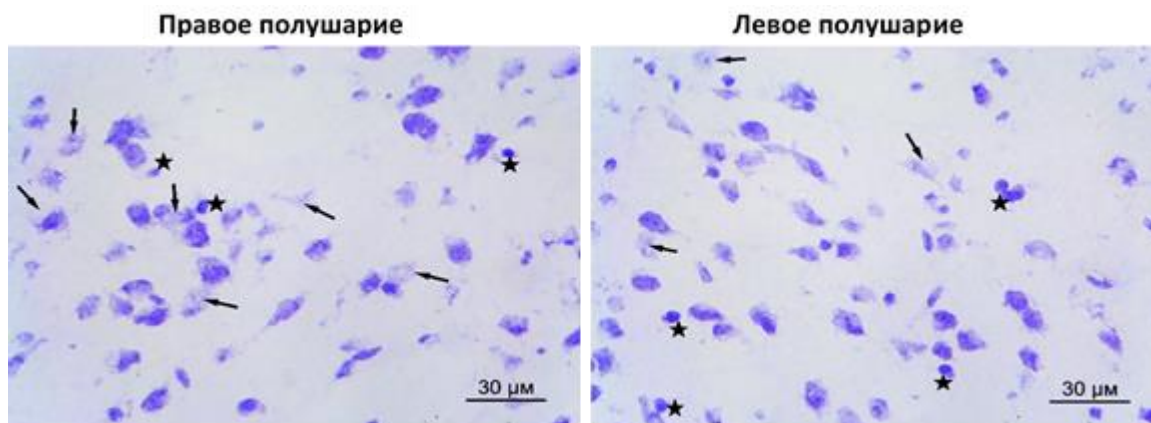


Рисунок 3. Гистоструктура полосатого тела (правое и левое полушарие) крыс Вистар после интраназального применения ЛПС *E. coli* в дозе 1 мкг/кг, окрашенных по Нисслю. Увеличение: $\times 400$. Стрелками обозначены нейроны с аномальной морфологией, звездочками – глиальные клетки. Масштабная линейка = 30 мкм

После введения ЛПС *E. coli* в дозе 10 мкг/кг количество нейронов в поле зрения с обеих сторон не отличалось от контроля, однако их размеры были существенно меньше; количество нейронов с деструктивными изменениями симметрично возрастало, отметили, что справа их было значительно больше; количество глии увеличилось только с правой стороны (таблица 1, рисунок 4).

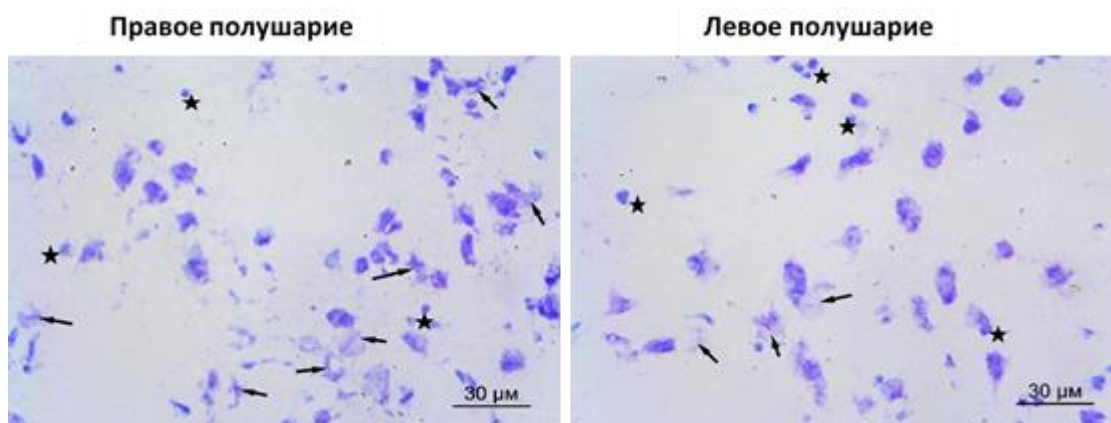


Рисунок 4. Гистоструктура полосатого тела (правое и левое полушарие) крыс Вистар после интраназального применения ЛПС *E. coli* в дозе 10 мкг/кг, окрашенных по Нисслю. Увеличение: $\times 400$. Стрелками обозначены нейроны с аномальной морфологией, звездочками – глиальные клетки. Масштабная линейка = 30 мкм

Количество нервных клеток с деструкцией справа было существенно больше, чем слева; среднее количество глии в поле зрения справа и слева также увеличивалось с преобладанием в левом полушарии (рисунок 4, таблица 1).

В полосатом теле крыс после интраназального введения ЛПС *E. coli* в дозе 10 мкг/кг выявили нарушения микроциркуляции капилляров, артериол и венул во всех полях зрения: венозные сосуды были расширены, имели тонкие стенки, избыточное кровенаполнение, иногда в них наблюдался диapedез эритроцитов; ширина межэндотелиальных пространств в интима увеличивалась, что создавало предпосылки для развития периваскулярного отека; капиллярное русло имело неравномерное кровенаполнение с чередованием полнокровных расширенных и узких щелевидных малокровных сосудов (рисунок 5).

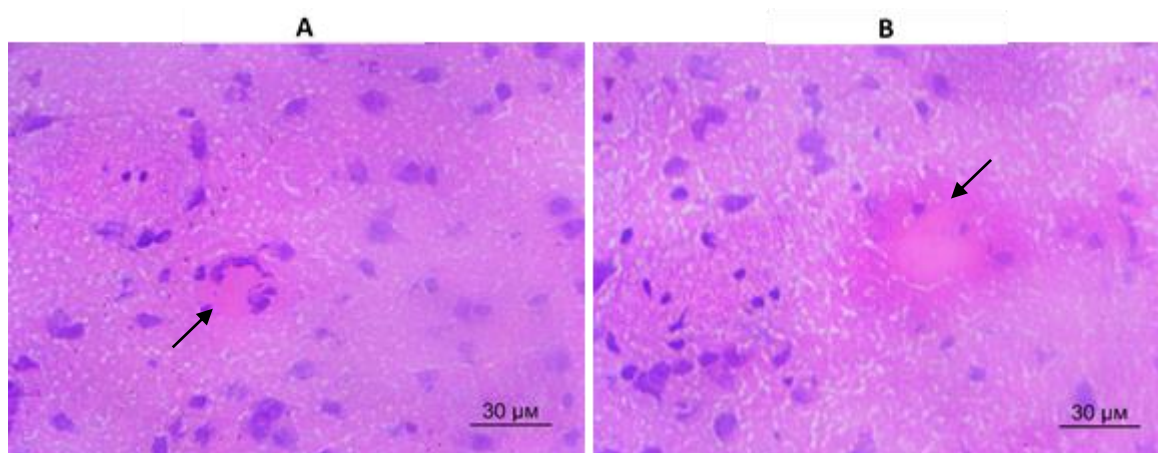


Рисунок 5. Микроциркуляция полосатого тела: артериола (А) и венула (В) крыс Вистар после интраназальной аппликации ЛПС *E. coli* в дозе 10 мкг/кг. Окраска: гематоксилин и эозин. Увеличение: $\times 400$. Масштабная линейка = 30 мкм.

После введения бактериального эндотоксина в максимальной дозе наиболее выраженные изменения зафиксировали в артериолах: в интима эндотелий подвергался очаговой десквамации с обнажением субэндотелиального слоя, в остальных участках с сохраненным эндотелием наблюдалось увеличение объема ядродержащих частей эндотелиоцитов, в мышечной оболочке наблюдались неравномерно выраженная гипертрофия и явления отека, что способствовало повышению ее проницаемости и формированию периваскулярного отека (рисунок 5).

У крыс с меньшими дозами вводимого ЛПС *E. coli* сосудистая реакция была выражена слабее: только единичные артериолы имели аномалии эндотелиальной выстилки; венулы и капилляры сохраняли нормальную структуру.

Установлено, что интраназальное введение физиологического раствора натрия хлорида в дозе 0,01 мкг/кг не оказывало влияние на электрическую активность нейронов в исследуемых областях мозга (таблица 1). При сравнении показателей электрической активности нейронов полосатого тела правого и левого полушарий после интраназального введения ЛПС *E. coli* в дозах 0,1; 1 и 10 мкг/кг не выявили изменений по отношению к контрольной группе (таблица 1). В то время, как при анализе показателей функционирования нейронов левого и правого полушарий после интраназального введения ЛПС *E. coli* в дозе 0,1 мкг/кг и 1 мкг/кг в левом полушарии зарегистрировали снижение частоты разрядов нейронов и усиление импульсной активности после введения бактериального эндотоксина в дозе 10 мкг/кг (таблица 1).

Заключение. Интраназальное введение ЛПС *E. coli* приводит к дозозависимому ассиметричному увеличению количества глиальных клеток, количества нейронов с измененной структурой, что свидетельствует о наличии нейровоспаления, нейродеструкции. Количество нейронов достоверно увеличивалось с обеих сторон при введении бактериального эндотоксина в дозе 0,1 мкг/кг, слева – только при дозе 1 мкг/кг. Уменьшение размеров нейронов слева определялось после введения всех трех доз, справа – при дозе 10 мкг/кг. Наблюдалось увеличение количества нейронов с признаками деструкции в обоих полушариях после введения трех доз бактериального эндотоксина. Количество глиальных клеток справа увеличивалось после введения доз 0,1 мкг/кг и 10 мкг/кг, а слева – только при дозе 0,1 мкг/кг. При изучении импульсной активности нейронов после интраназального введения ЛПС *E. coli* в дозе 0,1 мкг/кг и 1 мкг/кг в левом полушарии выявили снижение частоты разрядов нейронов и ее повышение после введения бактериального эндотоксина в дозе 10 мкг/кг.

Полученные данные свидетельствуют о том, что нейродегенеративные изменения происходят неравномерно и морфологические изменения в полосатом теле не соответствуют изменениям электрической активности нейронов.

Разработка новых методов диагностики, основанных не только на магнитно-резонансной томографии, создание новых тестов, учитывающих особенности работы правого и левого полушарий, позволит не только выявлять изменения на более ранних стадиях, но и заблаговременно начинать их лечение.

Литература:

- [1]. DeTure M., Dickson D. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease // *Mol. Neurodegener.* 2019. Vol. 14, № 32. P. 1–18.
- [2]. Osburg B., Peiser C., Domling D. et al. Effect of endotoxin on expression of TNF receptors and transport of TNF-alpha at the blood-brain barrier of the rat // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2002. Vol. 283, № 5. P. 899–908.
- [3]. McFarland H., Martin R. Multiple sclerosis: A complicated picture of autoimmunity // *Nat. Immunol.* 2007. Vol. 8. P. 913–919.
- [4]. Gabrielli M., Bonazzi P., Scarpellini E. et al. Prevalence of small intestinal bacterial overgrowth in parkinson's disease // *Mov. Disord.* 2011. Vol. 26. P. 889–892.
- [5]. Aisen P., Cummings J., Jr J. et al. On the path to 2025: understanding the Alzheimer's disease continuum // *Alzheimers Res. Ther.* 2017. Vol. 9, № 60. P. 1–10.
- [6]. Sonninen T., Hamalainen R., Koskivi M. et al. Metabolic alterations in Parkinson's disease astrocytes // *Sci Rep.* 2020. Vol. 10, № 14474. P. 1–14.
- [7]. Kwon H., Koh S. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes // *Transl. Neurodegener.* 2020. Vol. 9, № 42. P. 1–12.
- [8]. Saji N., Niida S., Murotani K. et al. Analysis of the relationship between the gut microbiome and dementia: a cross-sectional study conducted in Japan // *Sci Rep.* 2019. Vol. 9, № 1: P. 1–5.
- [9]. Wang H., Liu X., Tan C. et al. Bacterial, viral, and fungal infection-related risk of Parkinson's disease: Meta-analysis of cohort and case-control studies // *Brain Behav.* 2020. Vol. 10, № 3. P. 1–14.
- [10]. Noble E.; Hsu T.; Kanoski S. Gut to Brain Dysbiosis: Mechanisms Linking Western Diet Consumption, the Microbiome, and Cognitive Impairment // *Front. Behav. Neurosci.* 2017. Vol. 11, № 9. P. 1–10.
- [11]. Kennedy P.; Cryan J.; Dinan T. et al. Kynurenine pathway metabolism and the microbiota-gut-brain axis // *Neuropharmacology.* 2017. Vol. 112. P. 399–412.
- [12]. Rowland I.; Gibson G.; Heinken A. et al. Gut microbiota functions: Metabolism of nutrients and other food components // *Eur. J. Nutr.* 2018. Vol. 57, № 1. P. 1–24.
- [13]. O'Toole P., Claesson M. Gut microbiota: Changes throughout the lifespan from infancy to elderly // *International Dairy Journal.* 2010. Vol. 20, № 4. P. 281–291.
- [14]. Mulak A., Bonaz B. Brain-gut-microbiota axis in Parkinson's disease // *World J. Gastroenterol.* 2015. Vol. 21, № 37. P. 10609–10620.
- [15]. Erridge C., Bennett-Guerrero E., Poxton I. Structure and function of lipopolysaccharides // *Microb. Infect.* 2002. Vol. 4, № 8, P. 837–851.
- [16]. Tran V., Kang Y., Kim H-K. et al. Oral pathogenic bacteria-inducing neurodegenerative microgliosis in human neural cell platform // *Int J. Mol Sci.* 2021. Vol. 22, № 6925. P. 1–17.
- [17]. Smith T., Siegel M., Bonar C. et al. The existence of the vomeronasal organ in postnatal chimpanzees and evidence for its homology with that of humans // *J. Anat.* 2001. Vol. 198, № 1. P. 77–82.
- [18]. Hunter R.L., Cheng B., Choi D.-Y. et al. Intrastriatal lipopolysaccharide injection induces parkinsonism in C57/B6 mice // *J. Neurosci Res.* 2009. Vol. 87, № 8. P. 1913–1921.
- [19]. Boyko A.V., Hladkova, Z.A., Kuznetsova T.E. et al. Modeling of parkinsonism syndrome in rats by the administration of lipopolysaccharide // *Journal of the Grodno State Medical University.* 2018. Vol. 16, № 6. P. 690–696.
- [20]. Paxinos Y., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, 1998, 256 p.
- [21]. Xie L., Rong J., Li Q. A Novel Method for Constructing Histological Section Datasets of the Basal Ganglia in Digitized Human Brain // *Anat. Rec. (Hoboken).* 2017. Vol. 300, № 6, P. 1011–1021.
- [22]. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes centry // *Europ. Treaty Series.* 1986. Vol. 123. P. 248–249.

T. E. KUZNETSOVA, Z. A. HLADKOVA

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL FEATURES OF THE RAT STRIATUM AFTER LONG-TERM INTRANASAL ADMINISTRATION OF *ESCHERICHIA COLI* LIPOPOLYSACCHARIDE

State Scientific Institution "Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus", Minsk, Republic of Belarus

Summary

The effects of *Escherichia coli* lipopolysaccharide (*E. coli* LPS; 0,1; 1; 10 µg/kg) on the frequency of neuronal discharges and morphometric indices of the striatum were studied after its 3-week daily intranasal application.

The analysis of the obtained data allowed us to identify not only structural and functional changes of a neurodegenerative nature in the striatum of Wistar rats caused by intranasal application of small doses of bacterial endotoxin, but also to record their asymmetry.

Keywords: *E. coli* LPS, striatum, spontaneous electrical activity of neurons, morphometric analysis.