

Оценка нейровоспаления в структурах мозга с использованием стереологического анализа

О.А. Ивлева¹, А.О. Тишкина², Н.В. Гуляева²

¹Московский Физико-Технический Институт (государственный университет)

²Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН

В связи с широкой распространенностью патологий нервной системы крайне важной является задача исследования их этиологии. В патогенезе многих из этих заболеваний ключевую роль играет процесс нейровоспаления. Существует теория, согласно которой повторяющиеся нейровоспалительные эпизоды, вызванные стрессом, могут переходить в хроническую форму, вызывая развитие патологии [1]. Таким образом, в центре внимания оказывается иммунная система ЦНС и ее основной представитель – микроглия, резидентный макрофаг и ключевое звено иммунного и воспалительного ответа в мозге на клеточном уровне.

Активацию микроглии можно отслеживать по пролиферации клеток микроглии. Для этого необходимо как можно более точно оценивать число клеток в структуре мозга. В настоящее время существует несколько методов решения этой задачи, но самым надежным является оптический фракционатор, опирающийся на использование широко известной трехмерной пробы для подсчета клеток (оптического диссектора), дополненного систематической единой схемой выбора (фракционатором) [2]. Этот метод и был выбран, а затем адаптирован с помощью использования макросектора для подсчета микроглии в гиппокампе крыс. Была показана возможность использования данного варианта стереологического анализа для оценки числа клеток микроглии в мозге, и была оценена необходимая для получения точного результата доля структуры в обработке. Для определения точности подсчета вычисляли коэффициент ошибки подсчета (методы Шмитца [3], Гундерсена-Дженсена [4] и Круз-Орайва [5]).

Исследование проведено на модели хронического непредсказуемого стресса на крысах линии Вистар. Использованный метод оптического фракционатора с макросектором (ОФМ) помог установить гетерогенность популяции крыс по реакции микроглии на хроническое непредсказуемое стрессирующее воздействие (рис. 1, 2).

Было проведено сравнение ручного стереологического метода с нестереологическими автоматическим и полуавтоматическим методами подсчета клеток (рис. 3). Показана недостаточная точность последних, тогда как метод ОФМ дает достаточно точную для сравнительного анализа групп оценку числа клеток в структуре: коэффициент ошибки меньше межиндивидуальной вариабельности внутри одной группы.

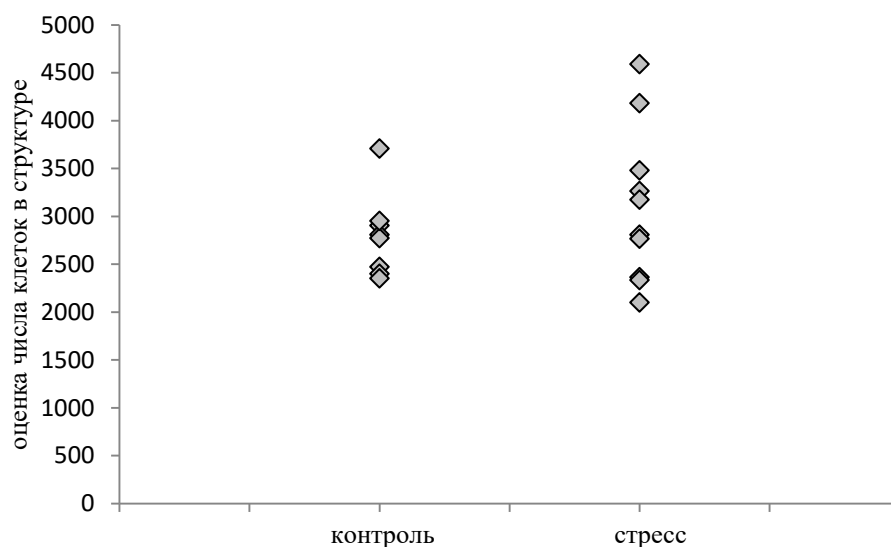


Рис.1. Оценка числа микроглиальных клеток в субгранулярном слое зубчатой фации гиппокампа мозга контрольных и стрессированных крыс.

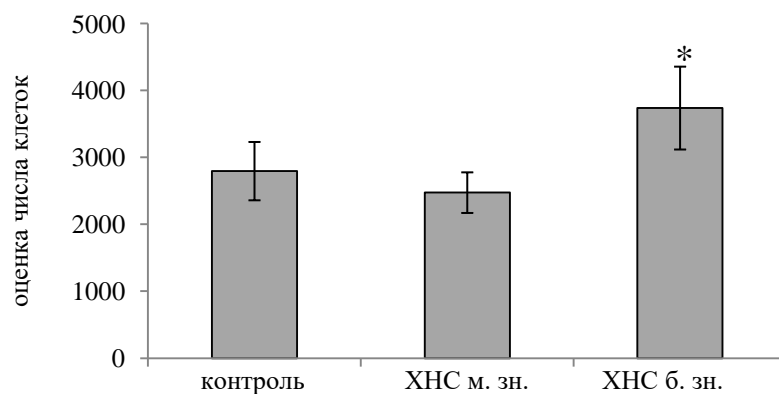


Рис.2. Число клеток микроглии в пересчете на структуру мозга крыс в контрольной группе и в двух половинах группы, подвергнутой ХНС (ХНС м. зн. – половина группы с меньшими значениями, ХНС б. зн. – половина группы с большими значениями). Приведены средние и стандартные ошибки среднего. Подгруппа с достоверным отличием от контроля обозначена *.

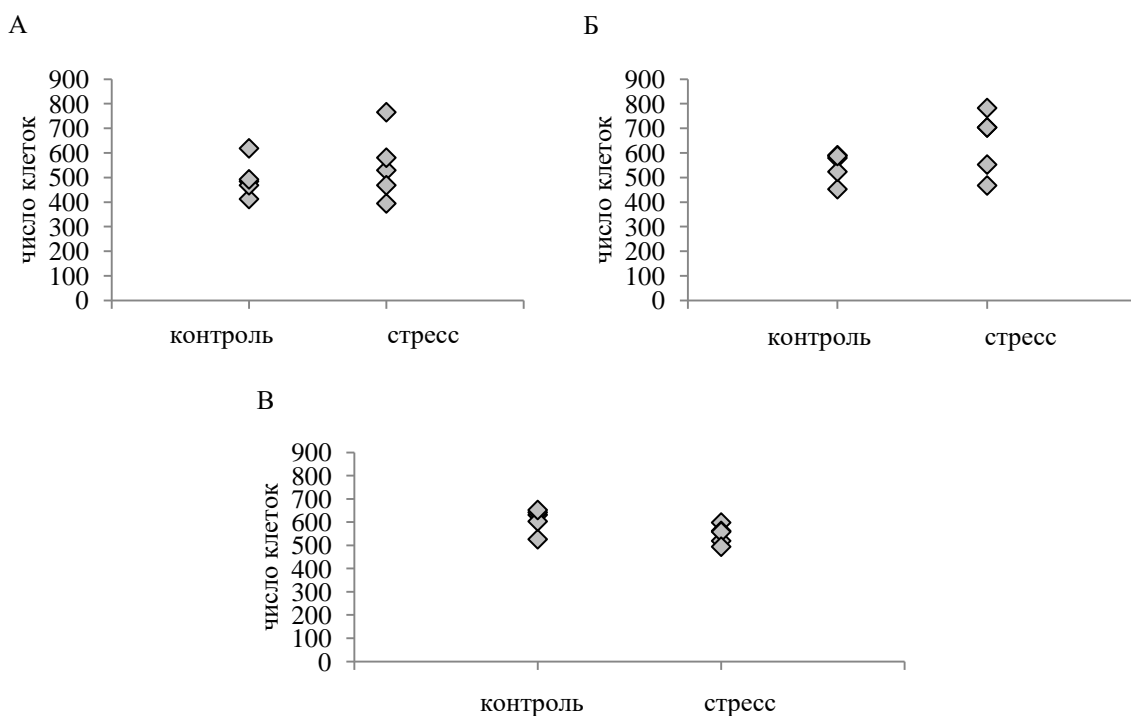


Рис.3. Посчитанное число клеток микроглии в субгранулярном слое зубчатой фасции на десяти срезах: А. стереологическим методом; Б. полуавтоматическим методом; В. автоматическим методом (с постоянным порогом шума).

Работа поддержана грантом РФФ № 14-25-00136.

Литература

1. *Bagot R. C. et al.* Epigenetic signaling in psychiatric disorders: stress and depression // *Dialogues Clin Neurosci.* 2014. V. 16. P. 281-295.
2. *West M.J., Slomianka L., Gundersen H.J.G.* Unbiased Stereological Estimation of the Total Number of Neurons in the Subdivisions of the Rat Hippocampus Using the Optical Fractionator // *The anatomical record.* 1991. V. 231. P. 482.
3. *Schmitz Chr.* Variation of fractionator estimates and its prediction // *Anat Embryol.* 1998, 198:371–397
4. *Gundersen HJG, Jensen EBV, Kieu K, Nielsen J.* The efficiency of systematic sampling in stereology-reconsidered // *J Microsc.* 1999. V.193. P. 199.
5. *Cruz-Orive LM, Geiser M.* Estimation of particle number by stereology: an update // *J Aerosol Med.* 2004. V. 17. P. 197.