

АКТИВАЦИЯ МИКРОГЛИИ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ СПОНТАННО ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС

В. В. Гусельникова^{1,2}✉, В. А. Разенкова¹, Д. А. Суфиева¹, Д. Э. Коржевский¹¹ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Артериальная гипертензия является одной из наиболее значимых медико-социальных проблем, что обусловлено широкой распространенностью этого заболевания и сопутствующим риском развития почечной недостаточности, сердечно-сосудистых и сосудисто-мозговых осложнений. Целью работы было изучение морфофункционального состояния микроглии разных отделов головного мозга крысы в условиях развития артериальной гипертензии. Материалом для исследования служили образцы головного мозга спонтанно гипертензивных крыс линии SHR в возрасте 3–8 месяцев ($n = 4$). В качестве контроля использовали нормотензивных крыс линии WKY той же возрастной группы ($n = 3$). Работа выполнена с применением методов иммуногистохимического анализа и конфокальной лазерной микроскопии. При проведении количественного анализа определяли количество тел микроглияцитов и площадь, занимаемую телами и отростками этих клеток, на 1 мм^2 нервной ткани. В результате постановки иммуногистохимической реакции на кальций-связывающий белок Iba1 обнаружено, что у крыс с артериальной гипертензией микроглия в коре головного мозга, стриатуме, субкортикальном белом веществе и субфорникальном органе имеет морфологические признаки активации (увеличение размера тела и утолщение отростков). Наиболее сильную активацию демонстрирует микроглия субфорникального органа, которая у нормотензивных крыс находится в преактивированном состоянии. Проведенный статистический анализ позволил выявить тенденцию увеличения количества микроглии в головном мозге у крыс линии SHR по сравнению с животными контрольной группы. При двойной иммунофлуоресцентной реакции Iba1/CD68 не выявлено изменений в количестве и/или распределении лизосомного белка CD68 у спонтанно гипертензивных крыс по сравнению с контролем. Полученные результаты свидетельствуют о хронической активации микроглии в головном мозге у крыс на фоне развития артериальной гипертензии. Активация микроглии в данном случае не сопровождается усилением фагоцитарной активности этих клеток.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, микроглия, SHR, Iba1, CD68, субфорникальный орган

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, проект № 22-25-00105, <https://rscf.ru/project/22-25-00105/>.

Вклад авторов: Гусельникова В. В. — анализ литературы, анализ и интерпретация результатов, подготовка рукописи; Разенкова В. А. — отработка протоколов иммунофлуоресцентных реакций, проведение конфокальной лазерной микроскопии; Суфиева Д. А. — гистологическая проводка биологического материала, постановка иммуногистохимических реакций для световой микроскопии; Коржевский Д. Э. — разработка концепции, планирование исследования, редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (протокол №1/22 от 18 февраля 2022 г., протокол № 3/19 от 25 апреля 2019 г.), проведено в соответствии с положениями Хельсинкской декларации (2013 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Валерия Владимировна Гусельникова
ул. Акад. Павлова, д. 12, г. Санкт-Петербург, 197376, Россия; guselnicova.valeriia@yandex.ru

Статья получена: 05.06.2023 **Статья принята к печати:** 20.06.2023 **Опубликована онлайн:** 27.06.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.024

ACTIVATION OF MICROGLIA IN THE BRAIN OF SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

Guselnikova VV^{1,2}✉, Razenkova VA¹, Sufieva DA¹, Korzhevskii DE¹¹ Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia² St Petersburg University, St. Petersburg, Russia

Arterial hypertension is one of the most significant medical and social problems, being widespread and associated with the risk of renal failure, cardiovascular and cerebrovascular complications. The aim was to investigate the morphofunctional state of microglia in different regions of the rat brain in the setting of arterial hypertension. Brain samples from spontaneously hypertensive SHR rats aged 3–8 months ($n = 4$) were used as study material. Normotensive WKY rats of the same age ($n = 3$) were used as the control group. The work was performed using immunohistochemical analysis and confocal laser microscopy. During the quantitative analysis, we were seeking to determine the number of microgliaocyte bodies and the area occupied by the bodies and processes of these cells per 1 mm^2 of the nervous tissue. An immunohistochemical reaction for calcium-binding protein Iba1 revealed that in rats with arterial hypertension, microglia in the cerebral cortex, striatum, subcortical white matter and subfornical organ showed morphological signs of activation: increased body size and thickening of the processes of these cells. The strongest activation is demonstrated by microglia of the subfornical organ, which is in a preactivated state in normotensive rats. The performed statistical analysis revealed a trend towards an increase in the amount of microglia in the brain in SHR rats compared to animals in the control group. The Iba1/CD68 double immunofluorescence reaction showed no changes in the amount and/or distribution of lysosomal CD68 protein in spontaneously hypertensive rats compared to control group. The results obtained indicate chronic activation of microglia in the brain of spontaneously hypertensive rats. Activation of microglia in this case is not accompanied by an increase in the phagocytic activity of these cells.

Keywords: arterial hypertension, microglia, SHR, Iba1, CD68, subfornical organ

Funding: the study was funded by the Russian Science Foundation, project № 22-25-00105, <https://rscf.ru/project/22-25-00105/>.

Author contribution: Guselnikova VV — literature analysis, analysis and interpretation of the results, preparation of the manuscript; Razenkova VA — development of protocols for immunofluorescent reactions, confocal laser microscopy; Sufieva DA — histological examination of biological material, performing immunohistochemical reactions for light microscopy; Korzhevskii DE — concept development, research planning, manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Federal State Budgetary Scientific Institution "IEM" (protocol № 1/22 dated February 18, 2022, protocol № 3/19 dated April 25, 2019), and was conducted in accordance with the provisions of the Declaration of Helsinki (2013)

✉ **Correspondence should be addressed:** Valeria V. Guselnikova
Acad. Pavlov, 12, Saint-Petersburg, 197376, Russia; guselnicova.valeriia@yandex.ru

Received: 05.06.2023 **Accepted:** 20.06.2023 **Published online:** 27.06.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.024

На сегодняшний день артериальная гипертензия (АГ) остается одной из наиболее значимых медико-социальных проблем во всем мире. Согласно результатам совместного исследования ВОЗ и Имперского колледжа Лондона, количество людей с АГ за 30 лет (с 1990 по 2019 г.) увеличилось почти вдвое — с 650 млн до 1,28 млрд человек [1]. Распространенность АГ в России, по данным исследования ЭССЕ-РФ (Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний и их факторов риска в регионах Российской Федерации), в 2014 г. составила 44% в репрезентативной выборке пациентов в возрасте 25–65 лет. В результате эпидемиологического исследования, проведенного в 2019 г. с участием 20 607 жителей Российской Федерации, АГ была зарегистрирована у 14 853 (72,1%) обследованных [2]. Очевидно, что АГ является широко распространенным заболеванием в нашей стране, представляя серьезную проблему для отечественного здравоохранения. Несмотря на более чем столетний период изучения, АГ по-прежнему плохо поддается лечению, что, вероятно, связано со сложностью механизмов патогенеза, включающих множество взаимодействующих факторов, и нашим ограниченным пониманием этих механизмов на клеточном и молекулярном уровнях [3]. Это обуславливает актуальность дальнейших исследований в этой области.

При высокой распространенности в популяции Российской Федерации и недостаточной эффективности лечения и контроля АГ остается плохо управляемым фактором риска развития инфаркта миокарда, хронической сердечной недостаточности, внезапной смерти, почечной недостаточности, а также ишемического и геморрагического инсульта. Головной мозг является одним из органов-мишеней, наиболее рано поражаемых при АГ: в первую очередь страдают сосуды малого диаметра, в результате чего наблюдаются микрокровоизлияния, подкорковые лакунарные инфаркты и диффузное поражение белого вещества, что сопровождается снижением когнитивных функций [4]. Отмечено, что АГ сопровождается развитием в головном мозге хронического нейровоспаления [5]. Однако клеточные механизмы нейровоспаления, ассоциированные с АГ, неизвестны, и неясно, способствует ли нейровоспаление прогрессированию АГ. Так как воспаление в головном мозге вызывает и поддерживает главным образом микроглию, актуальным представляется проведение детального анализа этой клеточной популяции в условиях развития АГ. Получение новых данных о функциональном статусе микроглии головного мозга на фоне развития АГ может способствовать лучшему пониманию молекулярных и клеточных механизмов, лежащих в основе развития этого заболевания. Целью работы было изучить морфофункциональное состояние микроглии разных отделов головного мозга крысы в условиях развития АГ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве экспериментальной модели АГ использовали линию крыс SHR (Spontaneously Hypertensive Rats). У животных этой линии, выведенной К. Окамото и К. Аоки (1963) из нормотензивных крыс линии Wistar-Kyoto (WKY), спонтанно (без каких-либо предшествующих первичных заболеваний) развивается хроническая гипертензия, что является следствием нарушения функции 1–6 генов, участвующих в регуляции артериального давления. Стойкое повышение артериального давления до 190–200 мм рт. ст. у крыс линии SHR начинается с 12 недель

[6]. Линию SHR считают наиболее адекватной моделью эссенциальной гипертензии человека и широко используют для изучения патогенеза этого заболевания и разработки новых подходов к ее терапии [7, 8].

Материалом для исследования послужили образцы головного мозга спонтанно гипертензивных крыс-самцов линии SHR в возрасте 3–8 месяцев ($n = 4$). В качестве контроля использовали головной мозг крыс-самцов линии WKY того же возраста ($n = 3$). Систолическое артериальное давление у животных определяли в хвостовой артерии с использованием системы неинвазивного измерения кровяного давления у грызунов «Систола» («Нейроботикс»; Россия). Показатели артериального давления у крыс линии SHR составили 220 мм рт. ст., у крыс линии WKY — 85–100 мм рт. ст. Образцы головного мозга фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде описанным ранее способом [9], после чего обезвоживали и заливали в парафин Type 6 (ThermoScientific; США). С парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 5 мкм с использованием ротационного микротомы Microm HM 325 (ThermoScientific; США). Полученные препараты после депарафинирования и регидратации подвергали процедуре теплового демаскирования в 10%-м водном растворе тиосульфата натрия в течение 23 мин.

Для иммуногистохимического выявления Iba1 использовали кроличьи поликлональные антитела к Iba1 (Biocare Medical; США) в разведении 1 : 500. В качестве вторичных реагентов для выявления первичных антител использовали реагент HRP Conjugate из набора Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System (Spring Bioscience; США). Пероксидазную метку выявляли с использованием диаминобензидинового хромогена из набора DAB+ (Agilent; США). После постановки иммуногистохимической реакции часть срезов подкрашивали квасцовым гематоксилином.

Для одновременного выявления Iba1 и CD68 на срезы наносили смесь кроличьих поликлональных антител к Iba1 (Biocare medical; США) в разведении 1 : 500 и мышинных моноклональных антител к CD68 (Agilent; США) в разведении 1 : 1000. Смесь первичных антител готовили в соотношении 1 : 1. В качестве вторичных реагентов применяли смесь (1 : 1) антител против иммуноглобулинов кролика, меченных биотином (из набора R&D Systems; США), и реагента EnVision+/HRP-AntiMouse (Agilent; США), в состав которого была добавлена нормальная сыворотка крысы для предотвращения неспецифичного связывания антител. После инкубации в смеси вторичных антител срезы последовательно обрабатывали раствором конъюгата стрептавидина с флуорохромом Cy2 (Jackson ImmunoResearch; США) и раствором антител против HRP, конъюгированных с флуорохромом Cy3 (Jackson Immuno Research; США).

Для отрицательного контроля антител иммуногистохимическую обработку препаратов проводили без использования первичных антител, вместо которых на срезы наносили PBS. Положительная реакция в данном случае отсутствовала.

Анализ препаратов проводили на световом микроскопе Leica DM750 (Leica; Германия) и конфокальном лазерном микроскопе LSM800 (Zeiss; Германия). Для возбуждения флуоресценции Cy2 применяли лазер с длиной волны 488 нм, для Cy3 — лазер с длиной волны 561 нм. Анализ полученных изображений осуществляли при помощи компьютерных программ LSM Image Browser и ZEN2012 (Zeiss; Германия).

При проведении количественного анализа определяли количество тел Iba1+ микроглиоцитов и площадь,

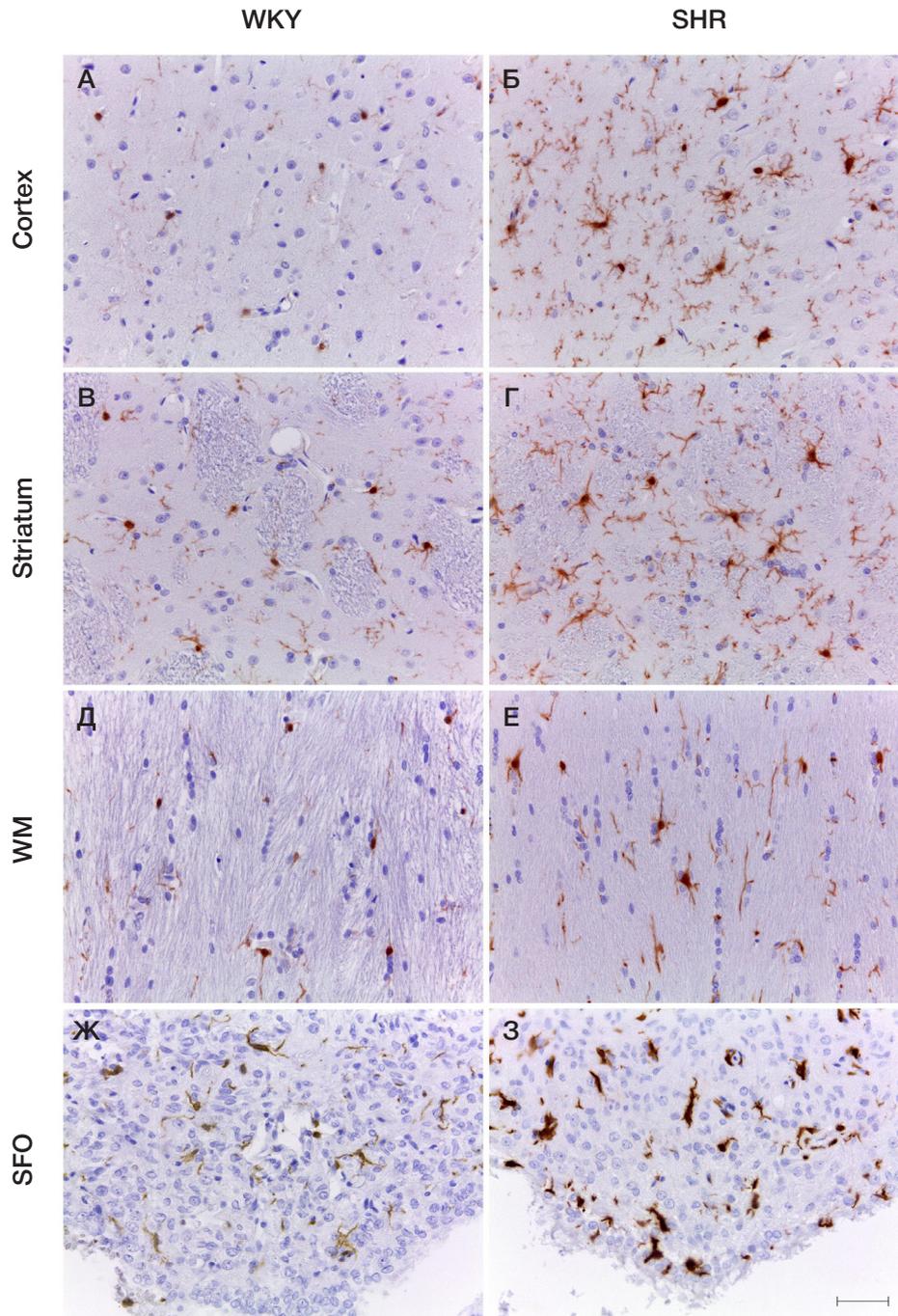


Рис. 1. Микроглия головного мозга крысы. WKY — нормотензивная линия крыс Wistar–Kyoto, SHR — линия спонтанно гипертензивных крыс. Cortex — участок коры больших полушарий головного мозга, Striatum — стриатум (*полосатое тело*), WM — субкортикальное белое вещество, SFO — субфорникальный орган. Иммуногистохимическая реакция на Iba1, подкраска квасцовым гематоксилином. Масштабный отрезок равен 50 мкм

занимаемую телами и отростками Iba1-иммунопозитивных микроглиоцитов, на 1 мм² нервной ткани. Измерения проводили по трем полям зрения размером 270 × 203 мкм для каждого случая в каждой изучаемой области (кора, стриатум, белое вещество, субфорникальный орган) с применением программы для морфометрического анализа Fiji (ImageJ). Количество тел клеток считали с использованием плагина «Cell Counter». Площадь, занимаемую микроглиоцитами, оценивали после разделения каналов (DAPI/hematoxylin) с использованием опции «Color Deconvolution» и последующим применением опции «Threshold» и «Measure Particles» [10]. Статистический анализ проводили в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software; США). Данные представляли в виде mean ± SEM.

Для сравнения данных использовали критерий Манна–Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

После постановки иммуногистохимической реакции на кальций-связывающий белок Iba1 иммунопозитивные клетки были обнаружены во всех изученных областях головного мозга. Продукт реакции был сосредоточен в отростчатых клетках, имеющих типичное для микроглии строение. Было отмечено морфологическое разнообразие Iba1⁺-клеток в зависимости от их локализации в пределах головного мозга. В коре головного мозга животных контрольной группы (WKY) присутствовала типичная

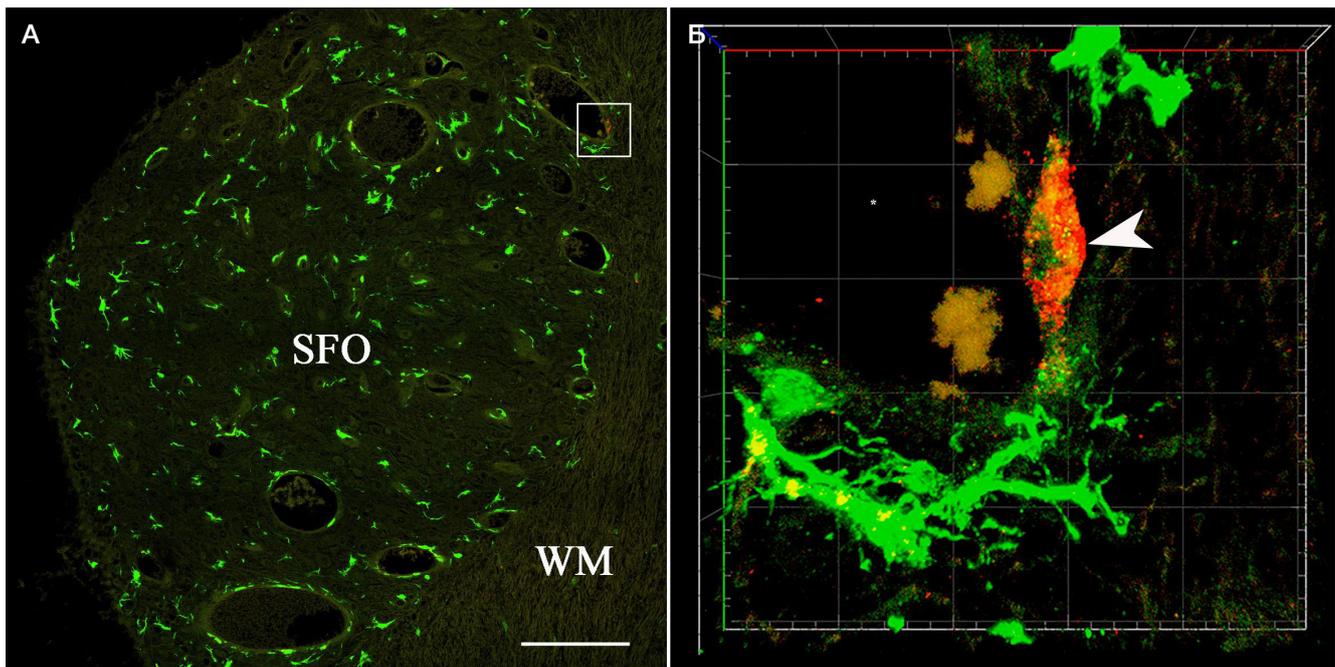


Рис. 2. Субфорникальный орган головного мозга спонтанно гипертензивной крысы линии SHR. Двойная иммунофлуоресцентная реакция на Iba1 (зеленая флуоресценция) и CD68 (красная флуоресценция). Желтый цвет маркирует участки колокализации сигналов зеленого и красного каналов. Рисунок Б является увеличенным фрагментом рисунка А (белая рамка). SFO — субфорникальный орган; WM — белое вещество; звездочка — просвет кровеносного сосуда, головка стрелки указывает на клетку с высоким содержанием CD68. Конфокальная микроскопия. А. Панорамное изображение; масштабный отрезок равен 100 мкм. Б. Трехмерная реконструкция серии оптических срезов, размер ячеек масштабной сетки составляет 10×10 мкм

рамуфицированная микроглия без признаков активации (рис. 1А). Iba⁺-клетки в данном случае характеризовались некрупной сомой и наличием длинных тонких ветвящихся в разных направлениях отростков. Тело клетки часто не попадало в плоскость среза, вследствие чего на некоторых участках коры визуализировались только части отростков микроглиоцитов в виде иммунопозитивных нитей и/или точек. Выявленные иммунопозитивные элементы были равномерно распределены в пределах коры (рис. 1А). В аналогичных участках коры головного мозга спонтанно гипертензивных крыс (SHR) микроглия имела ряд отличий (рис. 1Б). Как и в контроле, иммунопозитивные клетки в данном случае располагались равномерно, не формируя скоплений, однако плотность Iba⁺-элементов визуально была существенно выше. Наблюдалось увеличение размеров тела микроглиальных клеток, а также утолщение их отростков, которые характеризовались интенсивным ветвлением (рис. 1Б). Такие морфологические особенности были характерны для микроглии во всех слоях коры больших полушарий головного мозга спонтанно гипертензивных крыс.

Средняя площадь, занимаемая Iba⁺-микроглией, в коре головного мозга у животных контрольной группы составила $27\,547 \pm 3100$ мкм²/мм², у спонтанно гипертензивных крыс — $18\,790 \pm 2717$ мкм²/мм² ($p = 0,2$). Количество тел Iba⁺-микроглиоцитов у крыс линии WKY было равно $89,56 \pm 10,86$ тел клеток/мм², у крыс линии SHR — $130,1 \pm 19,9$ клеток/мм² ($p = 0,2$).

В стриатуме у контрольных животных, как и в коре головного мозга, была обнаружена типичная рамуфицированная микроглия (рис. 1В). При этом толщина отростков микроглиоцитов была больше в сравнении с корой головного мозга контрольных животных, благодаря чему сложное ветвление отростков у микроглии в этой локализации просматривалось лучше. Как и в коре больших полушарий, в стриатуме микроглия была распределена равномерно, без формирования скоплений.

Тела клеток характеризовались небольшим размером, имели округлую или овальную форму и не всегда попадали в плоскость среза. Микроглия была локализована преимущественно в сером веществе стриатума, в участках белого вещества визуализировались только короткие участки отростков этих клеток (рис. 1В). Средняя площадь Iba⁺-микроглии составила $33\,887 \pm 3944$ мкм²/мм², количество тел Iba⁺-клеток — $111,7 \pm 14,31$ тел клеток/мм². В стриатуме спонтанно гипертензивных крыс форма и характер распределения микроглии не отличались от таковых у контрольных животных, однако было отмечено увеличение размера тел этих клеток и утолщение их отростков, которые при этом характеризовались высокой интенсивностью ветвления (рис. 1Г). Средняя площадь Iba⁺-микроглии в данном случае составила $21\,516 \pm 2589$ мкм²/мм², а количество тел клеток — $146,3 \pm 12,68$ тел клеток/мм², что не имело статистически достоверных различий с контролем ($p = 0,2$).

В субкортикальном белом веществе у контрольных животных присутствовали Iba⁺-клетки веретеновидной формы, тела и отростки которых были ориентированы вдоль нервных волокон (рис. 1Д). Выявленные микроглиоциты характеризовались наличием одного или двух длинных неветвящихся или слабобетвящихся отростков, отходящих от разных полюсов тела клетки в противоположных направлениях (рис. 1Д). У спонтанно гипертензивных крыс в области субкортикального белого вещества наблюдалось увеличение размеров тел и толщины отростков Iba⁺-клеток. Было отмечено присутствие не только веретеновидной микроглии, но и клеток с тремя отростками, отходящими от тела и пронизывающими волокна белого вещества в разных направлениях. При этом усиления интенсивности ветвления отростков показано не было (рис. 1Е). Средняя площадь Iba⁺-микроглии в белом веществе у животных контрольной группы составила $11\,791 \pm 4540$ мкм²/мм², у спонтанно гипертензивных крыс — 9208 ± 1368 мкм²/мм²

($p > 0,9999$). Количество тел Iba1⁺-микроглиоцитов у крыс линии WKY было равно $8107,7 \pm 26,97$ клеток/мм², у крыс линии SHR — $111,7 \pm 2$ клеток/мм² ($p = 0,6$).

В субфорникальном органе животных контрольной группы было отмечено присутствие большого количества Iba1-иммунопозитивных клеток, распределенных относительно равномерно в пределах органа (рис. 1Ж). Морфология микроглии в этой области мозга существенно отличалась от типичной рамифицированной морфологии, характерной для микроглии в норме. Большинство присутствующих в этой локализации Iba1⁺-клеток имели веретеновидную уни- или биполярную форму. Их отростки характеризовались очень слабым ветвлением (частью — его отсутствием) и не имели единого направления. В пределах субфорникального органа встречались также единичные безотростчатые микроглиоциты, характеризующиеся гипертрофией тел и отсутствием выраженных отростков (рис. 1Ж). В субфорникальном органе спонтанно гипертензивных крыс все обнаруженные Iba1⁺-клетки были представлены малоотростчатыми формами. Они характеризовались выраженной гипертрофией тел и наличием немногочисленных коротких толстых неветвящихся отростков (рис. 13). Средняя площадь Iba1⁺-микроглии в субфорникальном органе у животных контрольной группы составила $37\ 831 \pm 8283$ мкм²/мм², у спонтанно гипертензивных крыс — $45\ 783 \pm 4318$ мкм²/мм² ($p = 0,4$). Количество тел Iba1⁺-микроглиоцитов у крыс линии WKY было равно $337,4 \pm 8,84$ клеток/мм², у крыс линии SHR — $465,4 \pm 27,05$ клеток/мм² ($p = 0,1$).

После постановки двойной иммунофлуоресцентной реакции Iba1/CD68 было отмечено, что во всех исследованных областях головного мозга большинство визуализируемых клеток содержит белок Iba1, равномерно распределенный в телах и отростках (рис. 2; *зеленая флуоресценция*). Морфология этих клеток в каждой исследованной области соответствовала таковой, описанной при постановке иммуногистохимической реакции на белок Iba1 для световой микроскопии. При анализе препаратов на малом увеличении микроскопа создавалось впечатление, что белок CD68 в таких клетках полностью отсутствует. Однако при анализе на большом увеличении CD68 обнаруживались в цитоплазме некоторых клеток в виде локальных скоплений (рис. 2Б; желтый цвет является результатом колокализации зеленого и красного сигналов). Размер, количество и распределение скоплений CD68 в цитоплазме сильно варьировали между отдельными микроглиоцитами, однако какой-либо зависимости этих параметров от локализации клеток обнаружено не было. Также не было отмечено увеличения содержания и/или изменения распределения белка CD68 у спонтанно гипертензивных крыс по сравнению с контролем ни в одной из изученных областей головного мозга.

Помимо микроглиоцитов, содержащих большое количество Iba1 и локальные скопления CD68 в цитоплазме, во всех проанализированных областях головного мозга было показано присутствие единичных клеток с высоким содержанием CD68 (рис. 2Б; *голова стрелки*). Белок CD68 выявлялся в цитоплазме этих клеток в виде мелкогранулярных структур, что придавало цитоплазме зернистый вид (рис. 2Б; *красная флуоресценция*). Белок Iba1 в пределах цитоплазмы таких клеток присутствовал в незначительном количестве (в виде точечных включений) или не определялся. Клетки с высоким содержанием CD68 присутствовали в головном мозге и нормотензивных, и спонтанно гипертензивных животных, и были обнаружены

во всех изученных областях. Они существенно отличались от типичной микроглии по морфологическим характеристикам — имели овальную или вытянутую форму, характеризовались отсутствием ветвящихся отростков и были локализованы преимущественно периваскулярно, редко — в пределах паренхимы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В рамках представленной работы получены морфологические свидетельства хронической активации микроглии в разных отделах головного мозга у крысы на фоне развития АГ. Проведенный статистический анализ позволил выявить тенденцию увеличения количества микроглии в головном мозге у крыс линии SHR по сравнению с животными контрольной группы. Однако продемонстрировать статистически достоверные различия по проанализированным показателям на имеющемся материале не удалось, что может быть связано с недостаточным объемом выборки. Обращает на себя внимание также выраженный разброс показателей среди животных контрольной группы. Это может быть следствием того, что линия WKY, которую широко используют в качестве контроля для линии SHR, имеет ряд особенностей, связанных с состоянием нервной ткани. Так, в недавно проведенных исследованиях нами было отмечено, что в отличие от крыс Wistar, в головном мозге у крыс линий WKY можно наблюдать признаки активации Iba1⁺-клеток Колмера, а в полости мозговых желудочков присутствуют супрапендимные CD68⁺ и Iba1⁺-клетки округлой формы. Это указывает на наличие у крыс линии WKY повреждений гематоликворного барьера и активацию клеток моноцитарно-макрофагального ряда [11]. Вместе с полученными нами в рамках представленной работы данными это ставит под вопрос адекватность использования крыс линии WKY в качестве контроля при проведении нейробиологических исследований.

Ранее сообщалось, что у крыс линии SHR в продолговатом мозге наблюдается умеренное состояние активации микроглии [5]. Было отмечено, что экспрессия генов метаботропного пуринергического рецептора P2Y12 и фракталкинового рецептора CX3CR1 снижена у крыс линии SHR по сравнению с нормотензивными крысами линии WKY, что коррелирует с фенотипическими признаками активации — снижением плотности клеток микроглии в продолговатом мозге и укорочением микроглиальных отростков [5]. Кроме того, в глубоких слоях коры головного мозга у 35-недельных крыс линии SHR была показана гипертрофия микроглии, что указывает на ее активацию [12]. Активация микроглии в этом исследовании была дополнительно подтверждена с использованием метода проточной цитометрии, который показал значительное увеличение экспрессии CD11b в микроглии головного мозга у крыс линии SHR. В дополнение к этим данным, свидетельствующим об активации микроглии в ряде отделов головного мозга у спонтанно гипертензивных крыс, нами были получены свидетельства активации микроглии в коре головного мозга, стриатуме, белом веществе и субфорникальном органе крыс линии SHR по сравнению с крысами WKY того же возраста. Интересно, что наиболее выраженные морфологические признаки активации демонстрировали микроглиоциты в пределах субфорникального органа. Ранее нами было отмечено, что в норме микроглия в этой области находится в преактивированном состоянии,

что может быть связано с отсутствием здесь гемато-энцефалического барьера [13]. С позиции этих данных кажется закономерным, что под влиянием дополнительной стимуляции, связанной с состоянием артериальной гипертензии, микроглиоциты субфорникального органа легче переходят в активированное состояние по сравнению с микроглией в других областях мозга, где в норме микроглия представлена неактивной (рамыфицированной) формой.

Вопрос о роли активации микроглии при АГ в зависимости от локализации остается на сегодня открытым. Показано, что направленное «выключение» микроглии приводит к значительному снижению артериального давления и уменьшению нейровоспаления у мышей с экспериментальной гипертензией. И наоборот, адоптивный перенос активированной микроглии предрасполагал реципиентов к гипертензивным стимуляторам. В совокупности эти результаты указывают на то, что микроглия является ключевым клеточным элементом в нейрогенной регуляции гипертонии [14]. Дальнейшие исследования в области изучения вклада микроглии и опосредованного ею нейровоспаления в патогенез АГ могут привести к обнаружению новых молекулярных мишеней для таргетной терапии этого заболевания.

Факт активации микроглии в условиях развития АГ может иметь важное терапевтическое значение. Так, установлено, что хроническая АГ является одним из факторов риска развития болезни Альцгеймера — наиболее распространенного нейродегенеративного заболевания, которое в настоящее время не поддается профилактике или эффективному лечению. Как полагают, нейровоспаление, вызываемое глиальными клетками, может быть одним из возможных механизмов, связывающих гипертензию и повышенный риск развития болезни Альцгеймера [15]. Более того, имеющиеся экспериментальные данные указывают на то, что активацию глии и развитие нейровоспаления можно обратить вспять применением разных классов антигипертензивных препаратов. Эти исследования позволяют предположить, что антигипертензивные средства могут быть эффективны при болезни Альцгеймера не только благодаря их способности влиять на артериальное давление, но и благодаря их противовоспалительному действию [15].

Известно, что активация микроглии сопровождается усилением фагоцитарной активности этих клеток. Фагоцитоз, осуществляемый микроглией, критически важен для нормального функционирования центральной нервной системы на всех этапах ее развития. Во время эмбрионального и раннего постнатального развития микроглия посредством фагоцитоза очищает развивающийся головной мозг от апоптотических нейронов и олигодендроцитов. Во взрослом мозге микроглия осуществляет фагоцитоз фрагментов гибнущих клеток, а также неактивных синапсов, внося вклад в регуляцию синаптической пластичности и поддержание гомеостаза нервной ткани. При старении микроглия фагоцитирует остатки погибающих нейронов и разрушающихся синапсов. Фагоцитарная активность микроглии усиливается при

развитии патологии: при таких заболеваниях, как болезнь Альцгеймера или рассеянный склероз, микроглия может осуществлять фагоцитоз не только гибнущих нейронов, но и β -амилоида, а также миелина [16, 17].

Одним из маркерных белков, позволяющих судить о фагоцитарной активности клеток, является трансмембранный белок-рецептор CD68. Он локализован в лизосомных и эндосомных мембранах клеток моноцитарно-макрофагального ряда и микроглии. Количество CD68 сильно возрастает в условиях развития воспаления, поэтому CD68 традиционно считают маркером активированной микроглии [18]. Основываясь на этих сведениях, а также полученных морфологических свидетельствах активации микроглии в разных отделах головного мозга у спонтанно гипертензивных крыс линии SHR, мы предположили увеличение содержания белка CD68 в микроглиоцитах у крыс линии SHR по сравнению с контролем. Неожиданно, мы не выявили такого увеличения ни в одной из исследованных областей мозга. Это свидетельствует о том, что активация микроглии на фоне развития АГ, вероятно, не сопряжена с усилением фагоцитарной активности этих клеток, и возможно несет регуляторный (секреторный) характер.

Интересной находкой в наших исследованиях стало обнаружение популяции CD68-иммунопозитивных клеток с очень низким содержанием белка Iba-1. Ранее об обнаружении Iba1⁺/CD68⁺ клеток в головном мозге у человека сообщали другие авторы [19]. Они отметили, что при поражениях глубоких подкорковых структур мозга происходят увеличение количества микроглии, содержащей CD68, трансформация разветвленной микроглии в амелоидную и потеря ею экспрессии Iba-1. Согласно результатам проведенной количественной оценки, Iba1⁺/CD68⁺ клетки составляют около 32,5% от общего количества микроглии при поражениях глубоких подкорковых структур мозга [19]. Также, было отмечено, что при болезни Альцгеймера развитие деменции положительно коррелирует с уровнем CD68 и отрицательно — с уровнем Iba1, и что разные по экспрессии этих двух белков популяции микроглии могут сосуществовать в головном мозге [20]. Вопрос о том, являются обнаруженные нами и другими авторами Iba1⁺/CD68⁺-клетки микроглиоцитами нового типа или особой популяцией макрофагов, требует дополнительного изучения.

Выводы

При развитии хронической АГ у крыс линии SHR происходит активация микроглии в коре головного мозга, стриатуме, субкортикальном белом веществе и субфорникальном органе. Микроглия субфорникального органа у нормотензивных крыс находится в преактивированном состоянии. Активация микроглии в органе усиливается на фоне развития АГ. Активация микроглии при АГ не сопровождается усилением фагоцитарной активности этих клеток. Микроглия участвует в развитии процесса нейровоспаления при АГ и поэтому может быть потенциальной мишенью для направленной фармакотерапии этого заболевания.

Литература

1. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control

from 1990 to 2019: a pooled analysis of 1201 population-representative studies with 104 million participants. *Lancet*. 2021;

- 398 (10304): 957–980. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)01330-1.
2. Erina AM, Rotar OP, Solntsev VN, Shalnova SA, Deev AD, Baranova EI, et al. Epidemiology of arterial hypertension in Russian Federation — importance of choice of criteria of diagnosis. *Kardiologiya*. 2019; 59 (6): 5–11. DOI: 10.18087/cardio.2019.6.2595
 3. Ma J, Li Y, Yang X, Liu K, Zhang X, Zuo X, et al. Signaling pathways in vascular function and hypertension: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther*. 2023; 8 (1): 168. DOI: 10.1038/s41392-023-01430-7.
 4. Meissner A. Hypertension and the brain: a risk factor for more than heart disease. *Cerebrovasc Dis*. 2016; 42 (3–4): 255–62. DOI: 10.1159/000446082.
 5. Cohen EM, Mohammed S, Kavurma M, Nedoboy PE, Cartland S, Farnham MMJ, Pilowsky PM. Microglia in the RVLM of SHR have reduced P2Y12R and CX3CR1 expression, shorter processes, and lower cell density. *Auton Neurosci*. 2019; 216: 9–16. DOI: 10.1016/j.autneu.2018.12.002.
 6. Doris PA. Genetics of hypertension: an assessment of progress in the spontaneously hypertensive rat. *Physiol genomics*. 2017; 49 (11): 601–17. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00065.2017.
 7. Pravenec M, Kurtz TW. Recent advances in genetics of the spontaneously hypertensive rat. *Curr Hypertens Rep*. 2010; 12 (1): 5–9. DOI: 10.1007/s11906-009-0083-9.
 8. Leong XF, Ng CY, Jaarin K. Animal Models in Cardiovascular Research: Hypertension and Atherosclerosis. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 528757. DOI: 10.1155/2015/528757.
 9. Korzhevskii DE, Sukhorukova EG, Kirik OV, Grigorev IP. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde. *Eur J Histochem*. 2015; 59 (3): 2530. DOI: 10.4081/ejh.2015.2530.
 10. Crowe AR, Yue W. Semi-quantitative Determination of Protein Expression Using Immunohistochemistry Staining and Analysis: An Integrated Protocol. *Bio-protocol*. 2019; 9 (24): e3465. DOI: 10.21769/BioProtoc.3465.
 11. Кирик О. В., Коржевский Д. Э. Маркер макрофагов ED1(CD68) в клетках головного мозга крысы. В сборнике: Материалы IV международной научной конференции «Современные проблемы нейробиологии»; 18–20 мая 2023 г.; Ярославль: ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России, 2023; 85 с.
 12. Kaiser D, Weise G, Möller K, Scheibe J, Pösel C, Baasch S, et al. Spontaneous white matter damage, cognitive decline and neuroinflammation in middle-aged hypertensive rats: an animal model of early-stage cerebral small vessel disease. *Acta Neuropathol Commun*. 2014; 2: 169. DOI: 10.1186/s40478-014-0169-8.
 13. Guselnikova VV, Razenkova VA, Sufieva DA, Korzhevskii DE. Microglia and putative macrophages of the subfornical organ: structural and functional features. *Bulletin of RSMU*. 2022; (2): 50–7. DOI: 10.24075/brsmu.2022.020.
 14. Shen XZ, Li Y, Li L, Shah KH, Bernstein KE, Lyden P, Shi P. Microglia participate in neurogenic regulation of hypertension. *Hypertension*. 2015; 66 (2): 309–16. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05333.
 15. Bajwa E, Klegeris A. Neuroinflammation as a mechanism linking hypertension with the increased risk of Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research*. 2022; 17 (11): 2342–6. DOI: 10.4103/1673-5374.336869.
 16. Galloway DA, Phillips AEM, Owen DRJ, Moore CS. Phagocytosis in the Brain: Homeostasis and Disease. *Front Immunol*. 2019; 10: 790. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00790.
 17. Gabandé-Rodríguez E, Keane L, Capasso M. Microglial phagocytosis in aging and Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 2020; 98 (2): 284–98. DOI: 10.1002/jnr.24419.
 18. Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Front Cell Neurosci*. 2020; 14: 198. DOI: 10.3389/fncel.2020.00198.
 19. Waller R, Baxter L, Fillingham DJ, Coelho S, Pozo JM, Mozumder M, et al. Iba-1-/CD68+ microglia are a prominent feature of age-associated deep subcortical white matter lesions. *PLoS One*. 2019; 14 (1): e0210888. DOI: 10.1371/journal.pone.0210888.
 20. Minett T, Classey J, Matthews FE, Fahrenhold M, Taga M, Brayne C, et al. MRC CFAS. Microglial immunophenotype in dementia with Alzheimer's pathology. *J Neuroinflammation*. 2016; 13 (1): 135. DOI: 10.1186/s12974-016-0601-z.

References

1. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control from 1990 to 2019: a pooled analysis of 1201 population-representative studies with 104 million participants. *Lancet*. 2021; 398 (10304): 957–980. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)01330-1.
2. Erina AM, Rotar OP, Solntsev VN, Shalnova SA, Deev AD, Baranova EI, et al. Epidemiology of arterial hypertension in Russian Federation — importance of choice of criteria of diagnosis. *Kardiologiya*. 2019; 59 (6): 5–11. DOI: 10.18087/cardio.2019.6.2595
3. Ma J, Li Y, Yang X, Liu K, Zhang X, Zuo X, et al. Signaling pathways in vascular function and hypertension: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther*. 2023; 8 (1): 168. DOI: 10.1038/s41392-023-01430-7.
4. Meissner A. Hypertension and the brain: a risk factor for more than heart disease. *Cerebrovasc Dis*. 2016; 42 (3–4): 255–62. DOI: 10.1159/000446082.
5. Cohen EM, Mohammed S, Kavurma M, Nedoboy PE, Cartland S, Farnham MMJ, Pilowsky PM. Microglia in the RVLM of SHR have reduced P2Y12R and CX3CR1 expression, shorter processes, and lower cell density. *Auton Neurosci*. 2019; 216: 9–16. DOI: 10.1016/j.autneu.2018.12.002.
6. Doris PA. Genetics of hypertension: an assessment of progress in the spontaneously hypertensive rat. *Physiol genomics*. 2017; 49 (11): 601–17. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00065.2017.
7. Pravenec M, Kurtz TW. Recent advances in genetics of the spontaneously hypertensive rat. *Curr Hypertens Rep*. 2010; 12 (1): 5–9. DOI: 10.1007/s11906-009-0083-9.
8. Leong XF, Ng CY, Jaarin K. Animal Models in Cardiovascular Research: Hypertension and Atherosclerosis. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 528757. DOI: 10.1155/2015/528757.
9. Korzhevskii DE, Sukhorukova EG, Kirik OV, Grigorev IP. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde. *Eur J Histochem*. 2015; 59 (3): 2530. DOI: 10.4081/ejh.2015.2530.
10. Crowe AR, Yue W. Semi-quantitative Determination of Protein Expression Using Immunohistochemistry Staining and Analysis: An Integrated Protocol. *Bio-protocol*. 2019; 9 (24): e3465. DOI: 10.21769/BioProtoc.3465.
11. Kirik OV, Korzhevskij DEh. Marker makrofagov ED1(CD68) v kletkax golovnogo mozga krysy. V sbornike: Materialy IV mezhdunarodnoj nauchnoj konferencii «Sovremennye problemy neyrobiologii»; 18-20 maya 2023 g.; Yaroslavl': FGBOU VO YaGMU Minzdrava Rossii, 2023; 85 c. Russian.
12. Kaiser D, Weise G, Möller K, Scheibe J, Pösel C, Baasch S, et al. Spontaneous white matter damage, cognitive decline and neuroinflammation in middle-aged hypertensive rats: an animal model of early-stage cerebral small vessel disease. *Acta Neuropathol Commun*. 2014; 2: 169. DOI: 10.1186/s40478-014-0169-8.
13. Guselnikova VV, Razenkova VA, Sufieva DA, Korzhevskii DE. Microglia and putative macrophages of the subfornical organ: structural and functional features. *Bulletin of RSMU*. 2022; (2): 50–7. DOI: 10.24075/brsmu.2022.020.
14. Shen XZ, Li Y, Li L, Shah KH, Bernstein KE, Lyden P, Shi P. Microglia participate in neurogenic regulation of hypertension. *Hypertension*. 2015; 66 (2): 309–16. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05333.
15. Bajwa E, Klegeris A. Neuroinflammation as a mechanism linking hypertension with the increased risk of Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research*. 2022; 17 (11): 2342–6. DOI: 10.4103/1673-5374.336869.
16. Galloway DA, Phillips AEM, Owen DRJ, Moore CS. Phagocytosis in the Brain: Homeostasis and Disease. *Front Immunol*. 2019; 10: 790. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00790.

17. Gabandé-Rodríguez E, Keane L, Capasso M. Microglial phagocytosis in aging and Alzheimer's disease. *J Neurosci Res.* 2020; 98 (2): 284–98. DOI: 10.1002/jnr.24419.
18. Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Front Cell Neurosci.* 2020; 14: 198. DOI: 10.3389/fncel.2020.00198.
19. Waller R, Baxter L, Fillingham DJ, Coelho S, Pozo JM, Mozumder M, et al. Iba-1-/CD68+ microglia are a prominent feature of age-associated deep subcortical white matter lesions. *PLoS One.* 2019; 14 (1): e0210888. DOI: 10.1371/journal.pone.0210888.
20. Minett T, Classey J, Matthews FE, Fahrenhold M, Taga M, Brayne C, et al. MRC CFAS. Microglial immunophenotype in dementia with Alzheimer's pathology. *J Neuroinflammation.* 2016; 13 (1): 135. DOI: 10.1186/s12974-016-0601-z.