

## ОПТИМИЗАЦИЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ В ЧЕРНОЙ СУБСТАНЦИИ У МЫШЕЙ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

© В. Г. Хаиндрава,<sup>1</sup> \* П. В. Ершов,<sup>1</sup> В. Е. Анциперов,<sup>2</sup> Ю. В. Обухов,<sup>2</sup>  
А. К. Нанаев,<sup>3</sup> М. В. Угрюмов<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт нормальной физиологии им. П. К. Анохина РАН,

<sup>2</sup>Институт радиотехники и электроники РАН

и <sup>3</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва;

\*электронный адрес: khaindrava82@mail.ru

Прогрессивная дегенерация дофаминергических (ДА-ергических) нейронов компактной части черной субстанции (кЧС) у человека приводит к развитию болезни Паркинсона (БП), что в эксперименте на мышях моделируется путем введения предшественника нейротоксина 1-метил-4-фенил-1, 2, 3, 6-тетрагидропиридина (МФТП). Одним из важнейших показателей эффективности действия нейротоксина является уменьшение числа ДА-ергических нейронов в кЧС. Используемая нами в настоящее время методика подсчета ДА-ергических нейронов на серийных срезах является чрезвычайно трудоемкой и дорогостоящей, что ограничивает ее использование для скринингового анализа большого материала, однако она обладает наибольшей точностью подсчета. Широко известная формула Конигсмарка (ФК) позволяет использовать для подсчета не все серийные срезы с области, а только выбранные с определенным интервалом срезы. Но ее точность снижается с увеличением этого интервала и ряда других параметров. В данной работе предпринята попытка разработать математический метод аппроксимации (МА) путем усовершенствования ФК, что позволит сократить временные и материальные затраты на обработку и анализ материала, сохраняя необходимую точность подсчета. Моделирование БП осуществляли на мышях C56/BL с помощью введения нейротоксина МФТП по двум протоколам. Дегенерация нейронов происходила преимущественно в средней части кЧС в ретро-каудальном направлении, причем в большей степени в группе, подверженной действию более высокой суммарной дозы нейротоксина. Образовавшиеся резкие перепады в числе нейронов от среза к срезу значительно уменьшили точность подсчета с помощью ФК (ошибка составила 6 % при подсчете нейронов уже на каждом пятом срезе). При использовании МА ошибка не превышала 4 % даже при подсчете нейронов на каждом седьмом срезе кЧС. Таким образом, нами разработан МА, который позволяет снизить временные и материальные затраты на оценку изменения содержания ДА-ергических нейронов в кЧС при экспериментальном моделировании БП.

Ключевые слова: метод Конигсмарка, черная субстанция, дофаминергический нейрон, нейротоксин, математический анализ, паркинсонизм, тирозингидроксилаза, мыши.

Принятые сокращения: БП — болезнь Паркинсона, ДА — дофамин, ИР — иммунореактивный, МА — метод аппроксимации, МФТП — 1-метил-4-фенил-1, 2, 3, 6-тетрагидропиридин, ТГ — тирозингидроксилаза, ФК — формула Конигсмарка, ЧС — черная субстанция, кЧС — компактная часть ЧС.

Дофаминергические (ДА-ергические) нейроны черной субстанции (ЧС), проецирующие аксоны в стриатум, являются ключевым звеном регуляции моторного поведения (Alexander et al., 1990; Wichmann et al., 1996). Прогрессивная дегенерация этих нейронов у человека приводит к развитию болезни Паркинсона (БП), причем первые симптомы проявляются через 20—30 лет после начала заболевания при дегенерации 70—80 % нейронов. После этого заболевание быстро прогрессирует, что приводит к инвалидизации и гибели больного. Для углубленного понимания патогенеза, разработки диагностики и лечения БП большое значение имеет ее экспериментальное моделирование, осуществляемое с помощью специфических нейротоксинов, вызывающих дегенерацию ДА-ергических нейронов (Ogawa et al., 1987; Bezard et al., 1997;

Kryzhanovsky et al., 1997; Strome et al., 2007). Например, 1-метил-4-фенилпиридин способен вызывать гибель ДА-ергических нейронов кЧС. Его предшественник 1-метил-4-фенил-1, 2, 3, 6-тетрагидропиридин (МФТП) захватывается астроцитами и с помощью фермента моноаминоксидазы В превращается в 1-метил-4-фенил-дигидроксипиридин. 1-метил-4-фенил-дигидроксипиридин затем спонтанно окисляется с образованием 1-метил-4-фенилпиридина, который высвобождается из глиальных клеток в межклеточное пространство. Затем 1-метил-4-фенилпиридин захватывается мембранным транспортером моноаминов, в частности транспортером дофамина (ДА), в ДА-ергических нейронах (Tipton et al., 1993). В ДА-ергических нейронах внутриклеточный 1-метил-4-фенилпиридин с помощью везикулярного транспортера моноаминов

(VMAT2) заключается в дофаминсодержащие секреторные гранулы или же поступает в митохондрии. В митохондриях 1-метил-4-фенилпиридин связывается с компонентами I комплекса дыхательной цепи, разобщая процесс окислительного фосфорилирования, что приводит к гибели клетки (Nakahara et al., 2001; Schmidt et al., 2001).

Разработка моделей различных стадий БП предполагает скрининговый анализ как минимум моторного поведения, а также метаболизма дофамина и содержания тирозингидроксилаза-иммунореактивных (ТГ-ИР) (ДА-ергических) нейронов в nigrostriatной системе при различных схемах применения нейротоксинов. Одним из важнейших показателей эффективности действия нейротоксина является уменьшение числа ТГ-ИР нейронов компактной части ЧС (кЧС) в результате их дегенерации. Оценка этого показателя является наиболее трудоемкой и дорогостоящей, поскольку в скрининговом исследовании используется материал от сотен животных, в основном грызунов. Для упрощения этой процедуры используется формула Конигсмарка (ФК), которая позволяет брать для подсчета не все серийные срезы с области, а только выбранные с определенным интервалом срезы. Но ее точность снижается с увеличением этого интервала и, как оказалось, зависит от наличия резких перепадов в числе нейронов от среза к срезу, которые возникают при дегенерации кЧС. В данной работе предпринята попытка разработать математический метод аппроксимации (МА) путем усовершенствования ФК, что позволит сократить временные и материальные затраты на обработку и анализ материала.

### Материал и методика

**Реактивы и материалы.** В работе были использованы: МФТП (Sigma, США), бычий сывороточный альбумин (Sigma, США), Triton X-100 (Sigma, США), кроличьи антитела к тирозингидроксилазе (ТГ) (предоставлены д-ром Tibault, Франция), биотинилированные козы антитела к  $\gamma$ -глобулинам кролика (Vector Laboratories, США), авидин-биотиновый комплекс (Vector Laboratories, США), 3,3'-диаминобензидинтетрагидрохлорид (Sigma, США),  $H_2O_2$  (Sigma, США), среда для заключения срезов DePeX (SERVA, США).

**Животные.** Работа проведена на самцах мышей линии C56/BL в возрасте 2.5 мес и массой 22—24 г.

**Моделирование БП.** Использовали следующие группы животных: одну интактную ( $n = 4$ ), две контрольные и две опытные группы по пять животных в каждой. Данные, полученные на интактной группе животных, использовали для разработки МА, который применяли наряду с ФК для оценки степени дегенерации в экспериментальных группах.

В опыте животным подкожно вводили МФТП в физиологическом растворе 2 раза с 7-суточным интервалом в дозе 8 мг/кг или 4 раза с 2-часовым интервалом по 12 мг/кг. Контрольным животным подкожно вводили физиологический раствор по тем же схемам. Через 1 нед после последней инъекции МФТП или физиологического раствора животных декапитировали, а выделенный мозг сагиттально разрезали на две половины. Левую половину мозга фиксировали в 4%-ном параформальдегиде на 0.1 М фосфатном буферном растворе 12 ч, инкубировали в 20%-ном растворе сахарозы на фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ) 48 ч и замораживали в гексане при  $-35^\circ\text{C}$ . Замороженные мозги

до дальнейшей обработки хранили при  $-80^\circ\text{C}$ , но не более 2 нед. Все манипуляции с животными были проведены в соответствии с протоколом, утвержденным комитетом по охране животных Института биологии развития РАН.

**Иммуноцитохимия.** С помощью криостата (Leica-CM1850, Германия) приготавливали серийные фронтальные срезы левой половины мозга толщиной 20 мкм и монтировали их на предметные стекла. На каждое стекло помещали срезы от одного контрольного и одного опытного животного, причем срезы на всех стеклах инкубировали при одинаковых условиях. Срезы последовательно инкубировали в ФСБ с добавлением: а) 0.015%-ной  $H_2O_2$ , 3%-ного бычьего сывороточного альбумина и 0.3%-ного Triton X-100 в течение 30 мин при  $20^\circ\text{C}$ ; б) 1%-го бычьего сывороточного альбумина, 0.1%-ного Triton X-100 и кроличьих антител к ТГ в разведении 1 : 2000 (Arлуison et al., 1984) в течение 40 ч при  $4^\circ\text{C}$ ; в) биотинилированных антител козы к  $\gamma$ -глобулинам кролика в разведении 1 : 200 в течение 2 ч при  $20^\circ\text{C}$ ; г) авидин-биотинового комплекса в разведении 1:100 в течение 1 ч при  $20^\circ\text{C}$ . Пероксидазу авидин-биотинового комплекса выявляли путем инкубации срезов с 0.5%-ным 3,3'-диаминобензидинтетрагидрохлоридом и 0.02%-ной  $H_2O_2$  на PBS при  $20^\circ\text{C}$ . После этого срезы обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заключали в среду DePeX.

Препараты исследовали с помощью микроскопа Olympus BX51 (Olympus, Япония), оснащенного цифровой камерой Olympus DP70, при увеличении объектива 10 $\times$ . Серийные изображения фронтальных срезов кЧС записывали в память персонального компьютера для последующего количественного анализа. С помощью программы Analysis 5.0. (Olympus, Япония) на каждом срезе обводили область кЧС (рис. 1) в соответствии с атласом (Paxinos et al., 2001) по методу Нельсона (Nelson et al., 1996) и после этого подсчитывали число нейронов, отмечая их манипулятором компьютерной мыши (только клетки с видимым ядром).

**Математический анализ.** Сначала данные, полученные при подсчете общего числа нейронов в кЧС на серийных срезах у интактных животных, использовали для разработки МА, позволяющего количественно описать распределение нейронов в этой области мозга на всем ее протяжении в rostro-каудальном направлении, используя выборочные срезы.

После этого осуществляли подсчет нейронов в кЧС у экспериментальных групп животных с помощью формулы Конигсмарка (Konigsmark, 1970). Эта формула позволяет использовать для подсчета не все серийные срезы с области, а только выбранные с определенным интервалом срезы. Затем, используя сумму подсчитанных нейронов на отобранных срезах, рассчитывают общее количество нейронов во всей области:

$$\tilde{N} = N_s \frac{S_t}{S_s},$$

где  $\tilde{N}$  — общее число нейронов на серийных срезах,  $N_s = \sum \tilde{n}_s$  — общее число нейронов на срезах, отобранных для анализа,  $S_t$  — общее число серийных срезов,  $S_s$  — число срезов, отобранных для анализа. Подсчет общего числа нейронов осуществляли с помощью пакета программ MatLab 7.0.4. (The MathWorks, США).

Далее у тех же животных оценивали общее число нейронов в кЧС с помощью предложенного нами МА. Особое внимание было уделено проверке точности рабо-

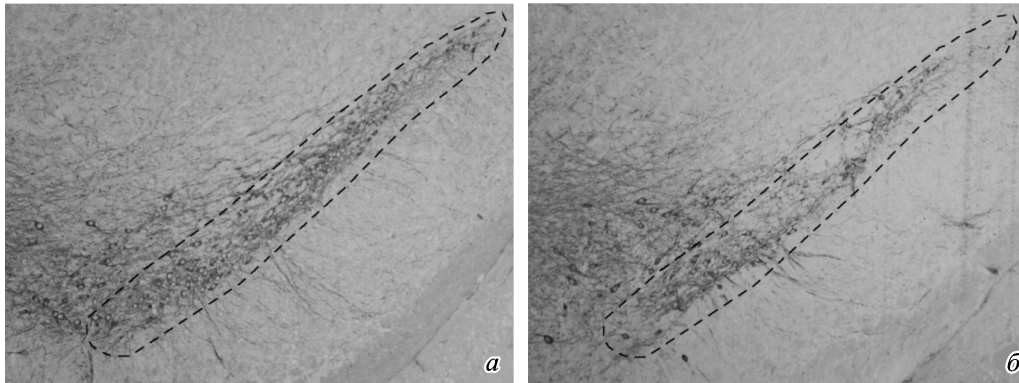


Рис. 1. Выявление тирозингидроксилаза-иммунореактивных нейронов в компактной части черной субстанции (обведена *штриховой линией*) с помощью авидин-биотин-пероксидазного метода.

*а* — интактная мышь, *б* — после введения предшественника нейротоксина МФТП (4 раза с 2-часовым интервалом). Об. 10×.

ты МА на кривых, полученных на животных в опыте, которые отличались от кривых, полученных на интактных и контрольных животных. Поэтому при использовании обоих математических подходов оценивали абсолютную ошибку подсчета общего числа нейронов в кЧС, т. е. процентную разницу между общим числом нейронов, подсчитанным на серийных срезах, и общим числом нейронов, рассчитанным математически по ФК и МА, исходя из подсчета нейронов на отобранных срезах.

Для исключения двойного подсчета нейронов, расположенных на соседних срезах, использовали метод Аберкромби (Abercrombie, 1946):

$$\tilde{n}_s = n \frac{\Delta}{\Delta + d},$$

где  $\tilde{n}_s$  — общее число клеток в слое  $s$ ,  $n_s$  — число подсчитанных клеток в слое  $s$ ,  $\Delta$  — толщина среза,  $d$  — диаметр клетки.

Статистика. Для статистического анализа использовали методы описательной статистики и  $t$ -тест.

### Результаты

Оценка общего числа ТГ-ИР нейронов путем подсчета нейронов на серийных срезах в кЧС. Для всех групп животных было подсчитано число ТГ-ИР нейронов на каждом из серийных срезов и построены кривые их распределения в кЧС. При этом протяженность кЧС в rostro-caudальном направлении составляла 1400 мкм, максимум числа нейронов содержался в срезах на уровне 400 мкм от начала кЧС (рис. 2). Среднее число нейронов в контрольной и опытной группах при дозе МФТП  $2 \times 8$  мг/кг с 1-недельным интервалом составило соответственно  $2073 \pm 53$  и  $1638 \pm 131$  ( $P = 0.015 < 0.05$ ) (рис. 3, *а*). При дозе МФТП  $4 \times 12$  мг/кг с 2-часовым интервалом среднее число нейронов в контрольной и опытной группах составило  $2073 \pm 33$  и  $1283 \pm 69$  соответственно ( $P < 0.0001$ ) (рис. 3, *б*). В обоих случаях найдены достоверные различия. Характер распределения ТГ-ИР нейронов в опыте и в контроле отличается от такового в опыте — основное снижение содержания нейронов после действия нейротоксина наблюдается в среднем отделе кЧС в rostro-caudальном направлении (рис. 2).

Регрессионная модель распределения нейронов и вычисление общего числа нейронов. Данные, полученные при подсчете общего числа нейронов в кЧС на серийных срезах у интактной группы животных, использовали для поиска аппроксимирующей формулы, позволяющей количественно описать распределение нейронов в этой области мозга на всем ее протяжении в rostro-caudальном направлении.

В результате нами получена формула для расчета числа нейронов, уточняющая ФК, в ней величина  $N_s$  вместо простой суммы  $n_1 + \dots + n_s$  чисел нейронов в анализируемых срезах  $s = \Sigma l$  вычисляется в виде скорректированной суммы нейронов:

$$\tilde{N} = G_1 \tilde{n}_1 + \dots + G_l \tilde{n}_l, \quad (1)$$

где  $G_1, \dots, G_l$  — вычисленные на основе регрессионного анализа коэффициенты, их величины порядка единицы (Fox, 1997).

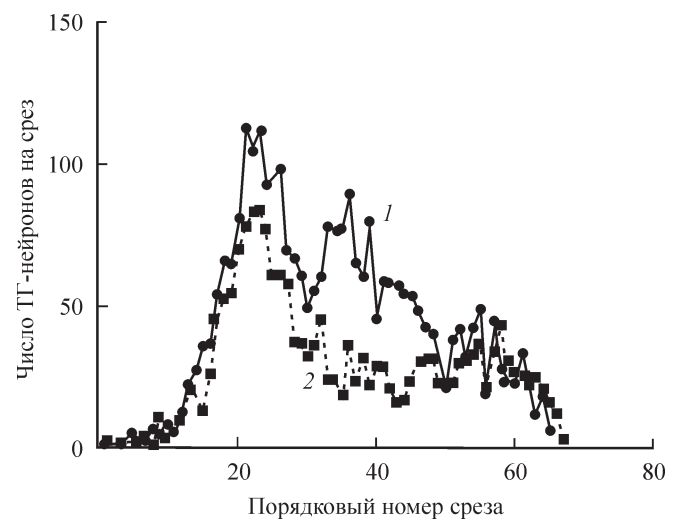


Рис. 2. Пример распределения тирозингидроксилаза-иммунореактивных нейронов в компактной части черной субстанции в rostro-caudальном направлении у животных в опыте и контроле.

*1* — интактная мышь, *2* — после введения МФТП (4 раза с 2-часовым интервалом).

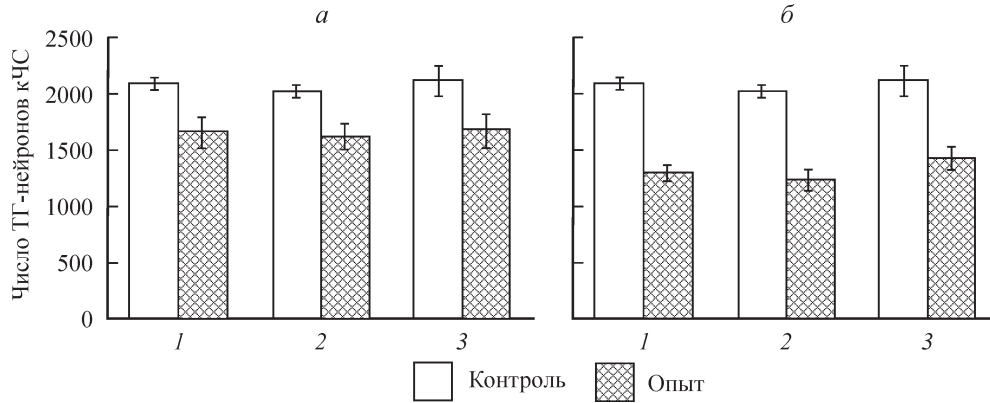


Рис. 3. Результаты подсчета общего количества тирозингидроксилаза-иммунореактивных нейронов в компактной части черной субстанции в контроле и в эксперименте после двукратного введения МФТП по 8 мг/кг с 1-недельным интервалом (а) и после четырехкратного введения МФТП по 12 мг/кг с 2-часовым интервалом (б).

1 — подсчет на серийных срезах, 2 — подсчет с помощью метода аппроксимации, 3 — подсчет с помощью формулы Конигсмарка. Вертикальные отрезки — стандартные ошибки средних значений, звездочкой отмечены достоверные различия между контрольной и опытной группами,  $P < 0.05$ .

Ввиду того обстоятельства, что у реальных образцов распределение нейронов в кЧС в rostro-caudальном направлении на протяжении длины в 5—7 срезов может существенно изменяться, подход, предложенный Конигсмарком, предполагающий постоянство плотности нейронов на длине этого интервала, оказывается относительно неточным. Для преодоления этого недостатка можно использовать регрессионную аппроксимацию распределения нейронов, которая при подходящем выборе регрессоров более точно приближает распределение в пределах каждого интервала выбранного масштаба (числа срезов). Для каждого образца распределение нейронов при выборе оси  $x$  в rostro-caudальном направлении аппроксимируется в рамках линейной регрессии следующим выражением:

$$n(x) = A_1\varphi_1(x) + A_2\varphi_2(x) + \dots + A_k\varphi_k(x), \quad (2)$$

где  $n(x)$  — распределение плотности числа нейронов по сечениям вдоль оси  $x$ ,  $0 \leq x \leq L$  ( $n(x)$  связано с числами подсчитанных нейронов  $\tilde{n}(x)$  соотношением  $n(x) \sim \tilde{n}(x)/\Delta$ , где  $\tilde{n}(x)$  — число нейронов в слое толщины  $\Delta$  сечения в точке  $x$ ),  $L$  — общая длина образца,  $\varphi_1(x), \varphi_2(x), \dots, \varphi_k(x)$  — базис регрессоров — фиксированный набор приближающих функций (для всех образцов),  $k$  — параметрическая размерность аппроксимации,  $A_1, A_2, \dots, A_k$  — параметры регрессии — свои для каждого образца. В соответствии с общими представлениями о поведении распределения плотности, например об обращении ее в нуль на концах интервала  $x=0$  и  $x=L$ , наличием максимумов/минимумов внутри интервала и т. д., выбор регрессоров был осуществлен в виде полиномов степени  $2k$  следующего вида:

$$\varphi_i(x) = C_i \left(\frac{x}{L}\right)^{a+i} \left(1 - \frac{x}{L}\right)^{b-i}, \quad i=1, \dots, k, \quad (3)$$

где  $a = k - k/2$ ,  $b = k + k/2$ ,  $a + b = 2k$ ,  $C_i = (2k+1)! / [(a+i)!(b-i)!]$  — такая нормировочная постоянная, что для всех  $i$   $\int_0^L \varphi_i(x) dx = L$ . Постоянные  $a$  и  $b$  подобраны так, чтобы максимумы регрессоров  $\varphi_i(x)$  —  $\bar{x}_i = L(a+i)/(a+b)$  равномерно располагались на интерва-

ле от  $L/4$  до  $3L/4$  — интервале наибольшей плотности  $n(x)$ .

Полное число нейронов  $N$  определяется интегралом по всему интервалу  $0 \leq x \leq L$  от плотности:  $N = \int_0^L n(x) dx$ . Для аппроксимации (2) эта величина ввиду нормировки регрессоров  $\varphi_i(x)$  принимает вид:

$$N = (A_1 + A_2 + \dots + A_k)L. \quad (4)$$

Имеющиеся экспериментальные данные — подсчитанные числа нейронов  $\tilde{n}_1, \tilde{n}_2, \dots, \tilde{n}_l$  в  $l$  выбранных слоях расположенных в сечениях  $x_1, x_2, \dots, x_l$  (не обязательно расположенных эквидистантно) — накладывают на аппроксимацию (2) следующие связи:

$$n_i = (A_1\varphi_{1,i} + A_2\varphi_{2,i} + \dots + A_k\varphi_{k,i})\Delta + \varepsilon_i, \quad i = 1, \dots, l, \quad (5)$$

где  $\varphi_{1,i} = \varphi_1(x_i), \dots, \varphi_{k,i} = \varphi_k(x_i)$ ,  $i = 1, \dots, l$  — значения регрессоров (3) в точках  $x_1, x_2, \dots, x_l$ , а  $\varepsilon_i$  — независимые ошибки подсчета нейронов, имеющие нулевое среднее  $\langle \varepsilon_i \rangle = 0$  и дисперсию (среднеквадратичную ошибку)  $\langle \varepsilon_i^2 \rangle = \sigma^2$ . Ввиду того что случайные  $\varepsilon_i$  неизвестны, мы не можем найти  $A_1, A_2, \dots, A_k$  непосредственно из (5), а можем на основе (5) строить лишь их оптимальные в том или ином статистическом смысле оценки. Однако вместо того чтобы строить оценки  $A_1, A_2, \dots, A_k$ , а потом на их основе вычислять по (4) общее число нейронов  $N$ , сразу построим по имеющимся данным  $\tilde{n}_1, \tilde{n}_2, \dots, \tilde{n}_l$  наиболее простую — линейную оценку  $\tilde{N}$ :

$$\tilde{N} = G_1\tilde{n}_1 + \dots + G_l\tilde{n}_l \quad (6)$$

и рассмотрим вопрос об оптимальном (в статистическом смысле) выборе коэффициентов  $G_1, G_2, \dots, G_l$ . Отметим, что ФК является частным случаем (6) при равных  $G_i = S_i/S_s$ .

Требование несмещенности оценки  $\tilde{N}$  (6):  $\langle \tilde{N} \rangle = N$  (4), где  $\langle \tilde{N} \rangle$  среднее оценки по случайным  $\tilde{n}_1, \tilde{n}_2, \dots, \tilde{n}_l$ , приводит к ограничениям:

$$G_1\varphi_{1,i} + \dots + G_l\varphi_{l,i} = L/\Delta = S_i, \quad i = 1, \dots, k, \quad (7)$$



где  $S_i$ , как и выше, — общее число серийных срезов. Среднеквадратичный разброс (дисперсия) оценки  $\tilde{N}$  (6) относительно среднего  $\langle \tilde{N} \rangle$  есть

$$D_{\tilde{N}} = \langle (\tilde{N} - \langle \tilde{N} \rangle)^2 \rangle = \langle (G_1 \varepsilon_1 + \dots + G_l \varepsilon_l)^2 \rangle = \sigma^2 (G_1^2 + \dots + G_l^2). \quad (8)$$

Полагая статистически оптимальной такую оценку  $\tilde{N}$  (6), которая обеспечивает минимум среднего разброса (8) (МД — оценка), получаем, что для нахождения соответствующих весов  $G_i$  необходимо решить задачу условной минимизации (8) при ограничениях (7). Эта задача может быть решена стандартным способом, используя метод неопределенных множителей Лагранжа. Опуская детали, выпишем окончательный результат: искомые веса для оценки общего числа нейронов  $\tilde{N}$  (6) находятся в соответствии с приведенной ниже формулой

$$G_i = \lambda_1 \varphi_{1,i} + \dots + \lambda_k \varphi_{k,i}, \quad i = 1, \dots, l. \quad (9)$$

При этом вспомогательные неопределенные множители  $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_k$  предварительно определяются из системы линейных уравнений

$$\sum_{i=1}^k M_{ij} \lambda_i = \frac{S_t}{S_s}, \quad j = 1, \dots, k, \quad (10)$$

$$M_{ij} = \sum_{m=1}^l \varphi_{i,m} \varphi_{j,m} / l, \quad i, j = 1, \dots, k.$$

В соотношениях (10) введены безразмерные параметры  $S_s = l$  и  $S_t/S_s$ , для того чтобы расчеты можно было бы осуществлять в терминах, соответствующих, например, ФК. Следует отметить, что в простейшем случае  $k = 1$  и  $\varphi_1(x) = 1$  из (10) и (9) последовательно получаем:  $M_{11} = 1$ ,  $\lambda_1 = S_t/S_s$ ,  $G_i = S_t/S_s$ , т. е. приходим к ФК.

Итак, процедура вычисления общего числа нейронов  $\tilde{N}$  сводится в соответствии с (6) к вычислению взвешенной суммы подсчитанных чисел нейронов  $\tilde{n}_1, \tilde{n}_2, \dots, \tilde{n}_l$ . При выбранной величине  $S_s = l$  веса  $G_1, G_2, \dots, G_l$  в этой сумме находятся только однажды и затем используются для всех образцов. Процедура нахождения весов осу-

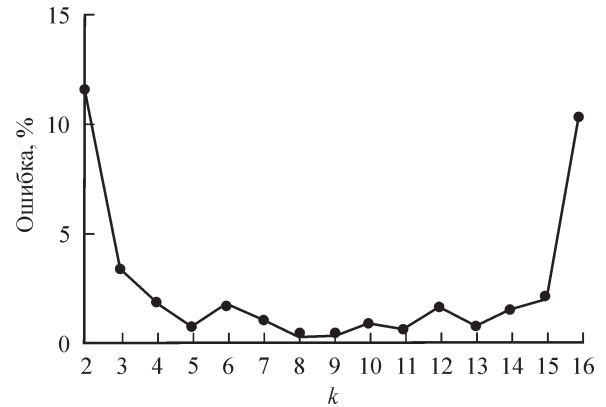


Рис. 4. График относительных ошибок в зависимости от параметрической размерности аппроксимации.  $k$  — параметрическая размерность аппроксимации.

ществляется в три этапа: сначала вычисляется  $k \times k$  матрица  $M_{ij}$  (10), затем из системы (10) определяются величины  $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_k$  и окончательно в соответствии с (9) по ним рассчитываются веса  $G_1, G_2, \dots, G_l$ .

Из соотношений (9) и (10) следует, что веса  $G_1, G_2, \dots, G_l$ , так же как в ФК, пропорциональны отношению  $S_t/S_s$ , которое является внешним параметром аппроксимации — он, как отмечено ниже, определяется из соображений уменьшения ресурсов и затрат на получение первичных данных  $\tilde{n}_1, \tilde{n}_2, \dots, \tilde{n}_l$ . Другой параметр метода — параметрическая размерность аппроксимации  $k$  — подбирается экспериментально, например из результатов сравнения оценок  $\tilde{N}$  и непосредственного подсчета по всем серийным срезам полного числа нейронов  $N$ . Параметр  $k$ , вообще говоря, зависит от  $S_t/S_s$ : при малых  $k$  и больших  $S_t/S_s$ , так же как и ФК, аппроксимация дает достаточно грубые результаты. При очень больших  $k$  оценка  $\tilde{N}$  становится очень чувствительной к ошибкам подсчетов и также дает плохие результаты. Оптимальное значение  $k$  находится между этими предельными случаями, и, как отмечено выше, лучший способ его определения — экспериментальный. В частности, из проведенных экспериментов, в которых  $S_t/S_s$  выбиралось в районе 3 ~ 4,

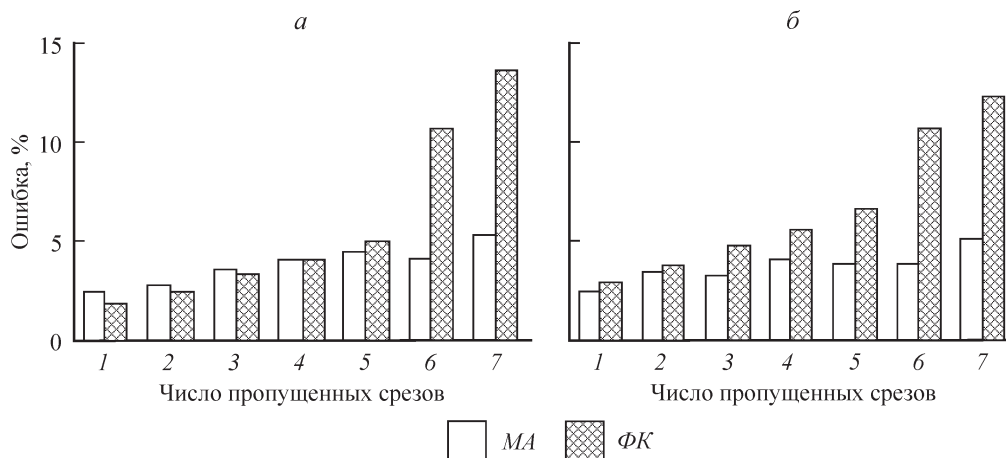


Рис. 5. Ошибка подсчета общего числа тирозингидроксилаза-иммунореактивных нейронов в компактной части черной субстанции в зависимости от числа пропущенных срезов в эксперименте после двукратного введения МФТП по 8 мг/кг с 1-недельным интервалом (а) и после четырехкратного введения МФТП по 12 мг/кг (б).

MA — метод аппроксимации, ФК — формула Конигсмарка.

наилучшая параметрическая размерность аппроксимации оказалась  $k \sim 8$  (рис. 4).

Оценка точности подсчета общего числа ТГ-ИР нейронов в кЧС с помощью ФК и МА на основе подсчета нейронов на отобранных срезах. Эксперимент с дозой МФТП  $2 \times 8$  мг/кг с 1-недельным интервалом. При подсчете общего числа ТГ-ИР нейронов в кЧС у животных в опыте на каждом втором, третьем, четвертом и пятом срезах ошибка обоих методов была одинакова и не превышала 5 % (рис. 5, а). При использовании каждого седьмого среза ошибка при подсчете с помощью МА не изменилась, а при подсчете по ФК резко увеличилась — до 11 % (рис. 5, а). При подсчете нейронов на каждом седьмом срезе с использованием МА были отмечены достоверные различия в опыте и контроле ( $1597 \pm 115$  по сравнению с  $2000 \pm 51$ ,  $P = 0.013$ – $0.05$ ) (рис. 3, а). При подсчете с помощью ФК достоверных различий по числу ТГ-ИР нейронов в кЧС найдено не было ( $2104 \pm 131$  по сравнению с  $1652 \pm 151$ ,  $P = 0.059$ – $0.5$ ) (рис. 3, а).

Оценка точности подсчета общего числа ТГ-ИР нейронов в кЧС с помощью ФК и МА на основе подсчета нейронов на отобранных срезах. Эксперимент с дозой МФТП  $4 \times 12$  мг/кг с 2-часовым интервалом. При подсчете общего числа ТГ-ИР нейронов кЧС у животных в опыте на каждом втором, третьем и четвертом срезах ошибка обоих методов была одинакова и не превышала 5 % (рис. 5, б). При использовании начиная с каждого пятого среза ошибка при подсчете по МА не изменилась, а при подсчете по ФК составила 6.4 % (рис. 5, б). При подсчете общего числа нейронов на каждом седьмом срезе с использованием МА были отмечены достоверные различия в опыте и контроле ( $1220 \pm 85$  по сравнению с  $2031 \pm 53$ ,  $P = 0.0001$ ) (рис. 3, б), как и при подсчете с помощью ФК ( $2137 \pm 131$  по сравнению с  $1419 \pm 99$ ,  $P = 0.025$ – $0.5$ ) (рис. 3, б).

### Обсуждение

Ведущим звеном патогенеза хронических нейродегенеративных заболеваний, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, гиперпролактинемии и др. является про-

грессивная дегенерация специфических нейронов, что со временем приводит к нарушению функций, регуляцию которых они обеспечивают (Bernheimer et al., 1973; Brun et al., 1976; Chui et al., 1999). Так, дегенерация ДА-ергических нейронов nigrostriatной системы при БП приводит к нарушению моторного поведения (Крыжановский и др., 2002). Поэтому важнейшим количественным показателем эффективности моделирования БП на животных при использовании различных схем введения специфического нейротоксина является уменьшение числа ДА-ергических нейронов в кЧС за счет их дегенерации. По трудоемкости и материальным затратам это морфологическое исследование значительно превосходит другие подходы к оценке эффективности модели — оценку изменения моторного поведения (физиология) и метаболизма ДА в различных отделах nigrostriatной системы — в ЧС — в области расположения тел ДА-ергических нейронов и в стриатуме — в области проекции аксонов ДА-ергических нейронов (биохимия). Например, в каждом скрининговом опыте необходимо использовать не менее 10 контрольных и 10 подопытных животных. Один высококвалифицированный специалист-морфолог в состоянии осуществить одновременно обработку материала только от двух животных по следующей схеме: а) приготовление 150 замороженных срезов на криостате (5 ч); б) иммуноцитохимическое выявление ДА-ергических нейронов по ТГ — ключевому ферменту синтеза ДА — и приготовление препаратов (5 дней); в) перенос изображений ТГ-ИР нейронов со срезов в память компьютера, обведение вручную компактной части ЧС и подсчет 2–3 тыс. ТГ-ИР нейронов только в одной половине ЧС (3 дня). Отсюда следует, что на обработку материала от двух животных необходимо затратить 9 дней, а на обработку материала от 20 животных в одном опыте — 90 рабочих дней или почти 4 календарных месяца. Помимо высокой трудоемкости работа требует больших материальных затрат, складывающихся из зарплаты высококвалифицированного исследователя, амортизации дорогостоящего оборудования (криостат, микроскоп, компьютер) и покупки дорогостоящих импортных реактивов, особенно антител.

Из вышеизложенного следует, что разработка моделей БП могла бы продвигаться гораздо быстрее и была бы экономически эффективнее при снижении временных и

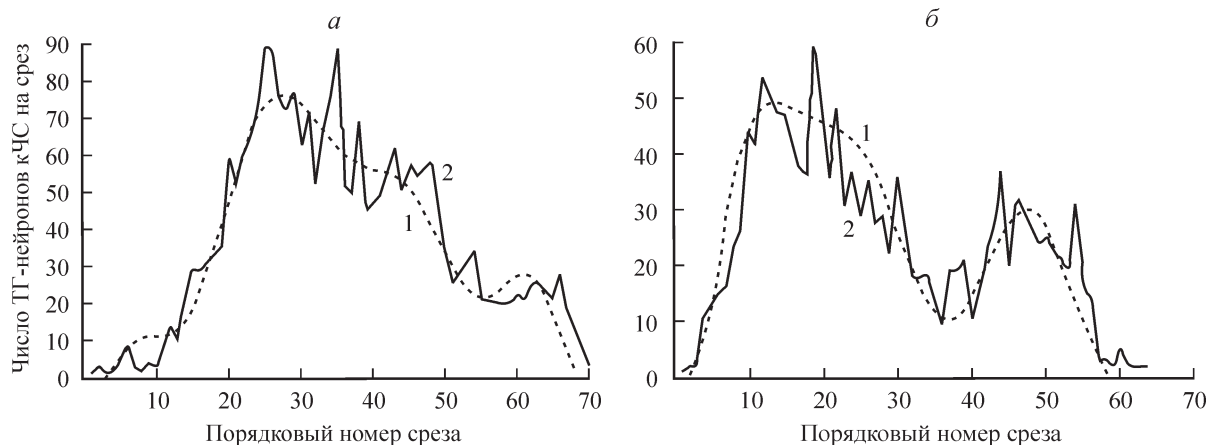


Рис. 6. Иллюстрация работы метода аппроксимации на кривых распределения тирозингидроксилаза-иммунореактивных нейронов в rostro-каудальном направлении в компактной части черной субстанции.

а — интактная мышь, б — после введения предшественника нейротоксина МФТП. Для построения аппроксимирующих кривых (1) использовался каждый седьмой срез, 2 — кривые распределения тирозингидроксилаза-иммунореактивных нейронов, полученные при подсчете на серийных срезах.

материальных затрат на скрининговые морфологические исследования, например за счет оптимизации процедуры обработки и анализа материала. Развитие работы в этом направлении предполагает поиск математических подходов, позволяющих сократить объем обрабатываемого и анализируемого материала, получаемого от каждого животного. При этом общее число животных, используемых в опыте и в контроле, не может меняться.

В данной работе предпринята попытка оптимизировать морфологический анализ двух моделей БП, полученных нами путем различных схем введения нейротоксина МФТП мышам линии C57BL/6. Проведенный подсчет ТГ-ИР нейронов на серийных срезах ЧС от животных после двукратного введения МФТП в дозе  $2 \times 8$  мг/кг показал, что через 1 нед после последней инъекции МФТП число нейронов достоверно снижается на 20 %. Незначительные различия в контрольной и экспериментальной группах позволяют оценить чувствительность используемых методов оптимизации морфологического количественного анализа.

Уже на первом этапе данной работы было понятно, что оптимизация метода оценки общего числа нейронов в ЧС должна быть построена на максимальном сокращении получаемых и обрабатываемых срезов в сравнении с общим числом нейронов, подсчитанных на серийных срезах. С этой целью вначале был применен математический метод, предложенный Конигсмарком (Konigsmark, 1970). Этот подход позволяет использовать для подсчета не все серийные срезы с изучаемой области, а только выборочные срезы, причем по подсчитанному числу микроскопических структур в выборочных срезах определяется общее число микроскопических структур во всей анализируемой области. Согласно данным, полученным при исследовании животных в опыте, при подсчете числа нейронов в каждом шестом срезе кЧС ошибка ФК не превышает 5 %, однако при пропуске еще одного — шестого — среза ошибка резко возрастает до 11 %. Тот факт, что эффективность этого подхода оказалась относительно низкой при анализе опытного материала, объясняется изменением характера распределения нейронов в кЧС в росто-каудальном направлении, не учитываемом в ФК. Это подтверждается тем, что в эксперименте с дозой МФТП  $4 \times 12$  мг/кг, где дегенерация ДА-нейронов кЧС более выражена, точность ФК оказалась еще ниже. Так, уже при анализе каждого пятого среза ошибка достигала 6 %, что связано с наличием более резких перепадов в числе нейронов от среза к срезу по сравнению с первым экспериментом.

Несмотря на то что ФК позволяет в определенных пределах оптимизировать подсчет нейронов в кЧС, нами была предпринята попытка разработать на его основе еще более эффективный подход к решению данной проблемы — МА. Этот метод в отличие от ФК помимо сравнения общего числа ТГ-ИР нейронов в контроле и в опыте учитывает различия в характере распределения нейронов в кЧС в росто-каудальном направлении. Действительно, ФК дает значение общего числа нейронов в грубом приближении исходя из предположения о том, что распределение нейронов по срезам является достаточно плавной функцией. Это может быть не так, когда расстояние между анализируемыми срезами становится больше или когда дегенерация нейронов в опыте происходит локально и, следовательно, увеличивается различие в числе нейронов, находящихся на двух соседних анализируемых срезах. В этом отношении расчет по предлагаемой нами скорректированной «регрессионной» формуле более точно учи-

тывает особенности характера распределения нейронов. В этом случае расчет общего числа нейронов с участием коэффициентов  $k_1, \dots, k_s$  позволяет вычислить число нейронов в более высоком приближении даже при резких изменениях их распределения в кЧС в росто-каудальном направлении. Действительно, аппроксимирующая кривая плавно огибает пики кривых, что позволяет максимально точно подсчитать общее число нейронов с использованием минимального числа срезов (рис. 6).

Полученный в данной работе контрольный и экспериментальный материал был использован для проверки точности и универсальности разработанного нами МА. При этом было показано, что даже при подсчете нейронов на каждом седьмом срезе ошибка метода аппроксимации не превышает 4 %. Кроме того, оказалось, что МА по точности почти не уступает подсчету на серийных срезах и позволяет найти достоверные различия в числе нейронов уже при 20%-ной дегенерации. Использование ФК в свою очередь не позволило получить достоверный результат на этом материале из-за более широкого разброса конечных данных. Таким образом, нами усовершенствована ФК и разработан МА, который позволяет в 7 раз снизить временные и материальные затраты на оценку изменения содержания ДА-ергических нейронов в ЧС при экспериментальном моделировании БП, сохраняя при этом необходимую точность подсчета.

#### Список литературы

- Крыжановский Г. Н., Карабань И. Н., Магаева С. В., Кучеряну В. Г., Карабань Н. В. 2002. Болезнь Паркинсона (этиология, патогенез, клиника, лечение, профилактика). М.: Медицина. 336 с.
- Abercrombie M. 1946. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat. Res.* 94 : 239—247.
- Alexander G. E., Crutcher M. D. 1990. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci.* 13 : 266—271.
- Arluison M., Diel M., Thibault J. 1984. Ultrastructural morphology of dopaminergic nerve terminals and synapses in the striatum of the rat using tyrosine hydroxylase immunocytochemistry: a topographical study. *Brain Res. Bull.* 13 : 269—285.
- Bernheimer H., Birkmayer W., Hornykiewicz O., Jellinger K., Seitelberger F. 1973. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J. Neurol. Sci.* 20 : 415—455.
- Bezard E., Dovero S., Bioulac B., Gross C. 1997. Effects of different schedules of MPTP administration on dopaminergic neurodegeneration in mice. *Exp Neurol.* 148 : 288—292.
- Brun A., Gustafson L. 1976. Distribution of cerebral degeneration in Alzheimer's disease. A clinico-pathological study. *Arch. Psychiatr. Nervenkr.* 223 : 15—33.
- Chui D. H., Tanahashi H., Ozawa K., Ikeda S., Checler F., Ueda O., Suzuki H., Araki W., Inoue H., Shirotani K., Takahashi K., Gallyas F., Tabira T. 1999. Transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. *Nat. Med.* 5 : 560—564.
- Fox J. 1997. Applied regression analysis, linear models, and related methods. Newbury Park: Sage Publ. 624 p.
- Konigsmark B. 1970. Methods for the counting of neurons. In: W. J. H. Nauta, S. O. E. Ebesson (eds). Contemporary research method in neuroanatomy. New York: Springer. 315—380.
- Kryzhanovsky G. N., Kucheryanu V. G., Krupina N. A., Pozdnyakov O. M., Kladkevich E. B., Nikushkin E. V., Oomura Y. 1997. Effects of fibroblast growth factors on MPTP-induced parkinsonian syndrome in mice. *Pathophysiology.* 4 : 59—67.
- Nakahara T., Yamamoto T., Endo K., Kayama H. 2001. Neuronal ectopic expression of tyrosine hydroxylase in the mouse stri-

tum by combined administration of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine and 3-nitropropionic acid. *Neuroscience*. 108 : 601—610.

Nelson E. L., Liang C. L., Sinton C. M., German D. C. 1996. Midbrain dopaminergic neurons in the mouse: computer-assisted mapping. *J. Comp. Neurol.* 369 : 361—371.

Ogawa N., Mizukawa K., Hirose Y., Kajita S., Ohara S., Watanabe Y. 1987. MPTP-induced parkinsonian model in mice: biochemistry, pharmacology and behavior. *Eur. Neurol.* 26 (Suppl. 1) : 16—23.

Paxinos G., Franklin K. 2001. The mouse brain. In: *Stereotaxic coordinates*. Second Edition. Burlington: Acad. Press. 296 p.

Schmidt N., Ferger B. 2001. Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. *J. Neural. Transm.* 108 : 1263—1282.

Strome E. M., Doudet D. J. 2007. Animal models of neurodegenerative disease: insights from *in vivo* imaging studies. *Mol. Imaging Biol.* 9 : 186—195.

Tipton K. F., Singer T. P. 1993. Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds. *J. Neurochem.* 61 : 1191—1206.

Wichmann T., DeLong M. R. 1996. Functional and pathophysiological models of the basal ganglia. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6 : 751—758.

Поступила 7 IX 2009

#### OPTIMIZATION OF COUNTING PROCESS OF DOPAMINERGIC NEURONS IN SUBSTANTIA NIGRA OF PARKINSONIAN MICE

V. G. Khaindrava,<sup>1,\*</sup> P. V. Ershov,<sup>1</sup> V. E. Anciperov,<sup>2</sup> J. V. Obukhov,<sup>2</sup> A. K. Nanaev,<sup>3</sup> M. V. Ugrumov<sup>3</sup>

<sup>1</sup> P. K. Anokhin Institute of Normal Physiology RAMS, <sup>2</sup> Institute of Radiotechnics and Electronics RAS  
and <sup>3</sup> N. K. Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow;

\* e-mail: khaindrava82@mail.ru

Parkinson's disease (PD) results from degeneration of dopaminergic (DA-ergic) neurons of substantia nigra pars compacta (SNc). In experimental studies, this condition is modelled by administration of neurotoxin's precursor 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP). The followed degeneration of DA-ergic neurons is estimated by cell counting. Cell counting with serial sections is exceedingly hard and expensive. Therefore this method is not used extensively in spite of its high precision. Widely known Königsmark's formula (KF) allows not to count cells in all serial section, but only in sections selected at regular interval. However, its precision decreases with increasing the interval and other parameters. In given work we have developed mathematical method of approximation (MA) by improving of KF. MA allows reducing the time and chemical products expenses for processing and analysis of the material with maintenance of necessary counting precision. Two groups of C56/BL mice were used in this study. The first group received MPTP in a dose of 8 mg/kg with 1 week interval and showed 20 % decrease in DA-ergic neurons in SNc. The second group received MPTP in a dose of 12 mg/kg four times with 2-h interval and showed 40 % decrease in DA-ergic neurons in SNc. Degeneration took place mostly in the middle part of SNc within rostra-caudal direction and led to rise of sharp differences in the number of neurons from section to section. These differences substantially decreased precision of KF (6 % error with counting in every 5th section), whereas precision of MA was sufficiently good (4 % error with counting in every 7th section). Thus, we have developed MA, that allows us to decrease expenses of the time and chemicals for estimation of DA-ergic cells number in SNc of parkinsonian mice.

**Key words:** Königsmark's formula, substantia nigra, dopaminergic neurons, neurotoxin, mathematical analysis, parkinsonism, tyrosinhydroxylase, mice.