

© Коллектив авторов, 2016
УДК 611.817.1.018:636.92

О.С. Алексеева^{1,3}, Е.Г. Гилерович¹, О.В. Кирик¹, Д.Э. Коржевский^{1,2}

СТРУКТУРНАЯ И ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МИКРОГЛИОЦИТОВ МОЛЕКУЛЯРНОГО СЛОЯ КОРЫ МОЗЖЕЧКА КРОЛИКА

¹ Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (зав. — проф. РАН Д.Э. Коржевский), отдел общей и частной морфологии, Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург; ² кафедра фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий (зав. — проф. А.Н. Суворов), Санкт-Петербургский государственный университет; ³ лаборатория сравнительной физиологии дыхания (руков. — чл.-кор. РАН А.И. Кривченко), Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова, Санкт-Петербург

Методами иммуноцитохимии и конфокальной лазерной микроскопии изучены структурная организация и пространственное распределение микроглиоцитов молекулярного слоя коры мозжечка у 5 взрослых кроликов-самцов. Реакция на маркер микроглиоцитов Iba-1 была высокоспецифична, в то время как до недавнего времени отсутствовала возможность их селективного выявления у кролика. В молекулярном слое коры мозжечка наблюдали 2 варианта организации микроглиоцитов. Наиболее распространенными были клетки с извилистыми сложноразветвленными отростками, главные ветви которых часто имели радиальное направление. Обнаружены также периваскулярные малоотростчатые микроглиоциты, имеющие форму, близкую к веретеновидной. Особенности структурной организации этих клеток связаны с защитными функциями, выполняемыми ими на уровне гематоэнцефалического барьера.

Ключевые слова: мозжечок, микроглия, Iba-1, кролик

Молекулярный слой коры мозжечка — важнейшая синаптическая зона этого органа. Он характеризуется сложной синаптоархитектоникой, отражающей взаимодействие разветвленных дендритов клеток Пуркиньи и аксонов клеток-зерен, образующих параллельные волокна, а также других афферентных волокон [1, 7]. Поверхностная часть молекулярного слоя коры мозжечка является зоной ликвороэнцефалического барьера, структурная организация которого не изучена в полной мере. Поэтому изучение цитоархитектуры мозжечка — важная задача в рамках проблемы тканевой организации органов нервной системы. Микроглиоциты (тканевые макрофаги ЦНС) участвуют не только в поддержании защитных функций в нервной ткани, но также обеспечивают мониторинг состояния синаптических структур и их реорганизацию при неблагоприятных воздействиях [8]. Роль этих клеток в обеспечении синаптической пластичности коры мозжечка все еще не исследована. Несмотря на важное значение микроглиоцитов, структурная организация этих клеток и их распределение в мозжечке у лабораторных животных, в том числе у кролика, изучены недостаточно. До недавнего времени без

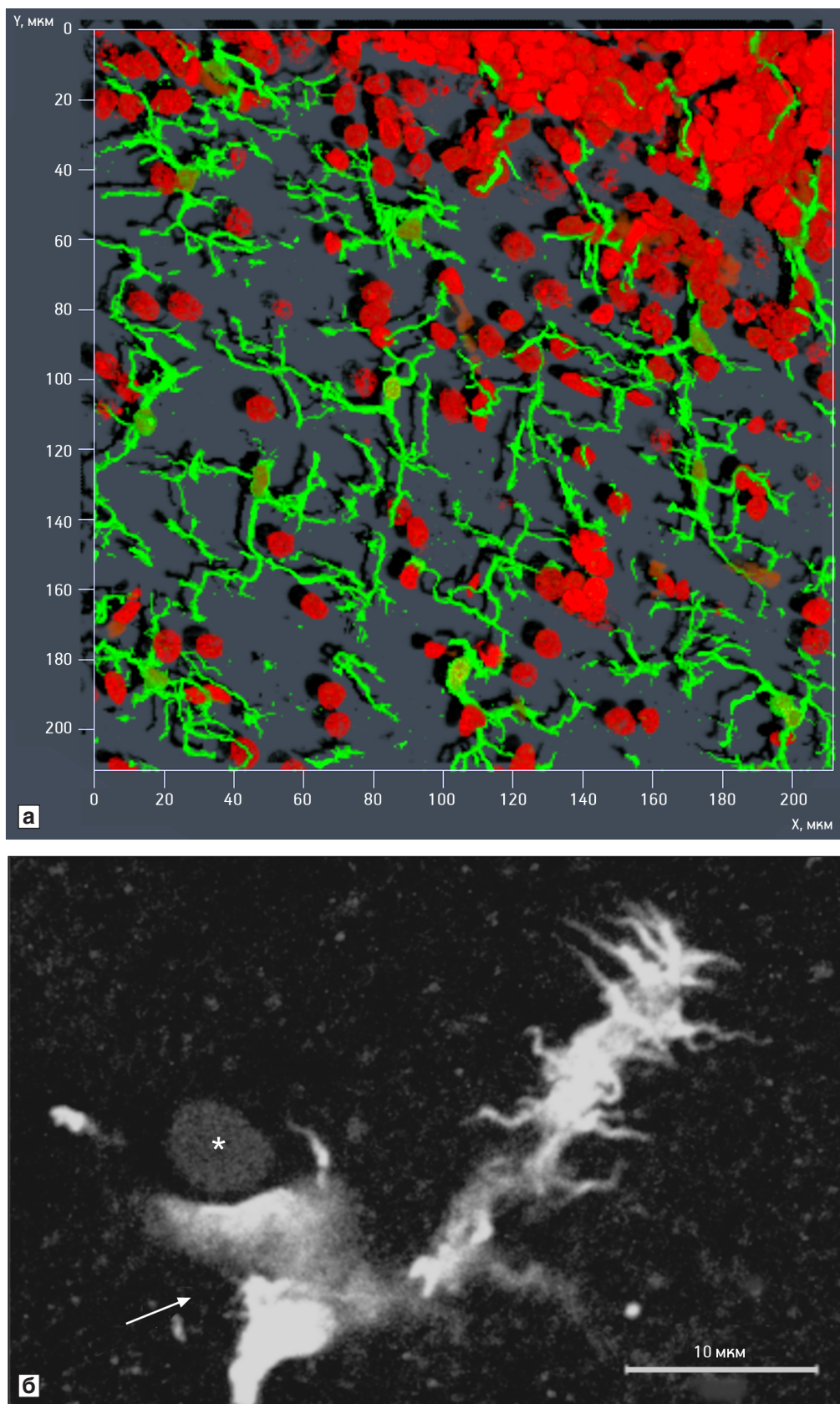
использования методов иммуноцитохимии отсутствовала возможность селективного выявления этой клеточной популяции. Применялись в основном малоселективные лектиновые и импрегнационные методики [3]. В настоящее время разработаны эффективные и универсальные протоколы выявления микроглиоцитов у лабораторных животных и человека, позволяющие проводить трехмерную реконструкцию их сложноорганизованных отростков [5].

Цель настоящего исследования — изучение структурной организации микроглиоцитов молекулярного слоя коры мозжечка кролика с использованием методов иммуноцитохимии и конфокальной лазерной микроскопии.

Материал и методы. Исследование выполнено на половозрелых кроликах-самцах породы шиншилла (n=5), содержащихся в условиях вивария. Мозжечок был фиксирован в цинк-этанол-формальдегиде, обезвожен и залит в парафин по общепринятой методике, из блоков готовили срезы толщиной 5–10 мкм на ротационном микротоме Leica PFM 3003 (PFM Medical AG, Германия) и наклеивали их на предметные стекла с фабричным адгезивным покрытием — HistoBond (Mariefeld, Германия). После стандартной процедуры депарафинирования и регидратации проводили тепловое демаскирование антигена. Для блокирования эндо-

Сведения об авторах:

Алексеева Ольга Сергеевна (e-mail: osa72@inbox.ru), Гилерович Елена Георгиевна, Кирик Ольга Викторовна (e-mail: olga_kirik@mail.ru), Коржевский Дмитрий Эдуардович (e-mail: dek2@yandex.ru), лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12



Микроглиоциты коры мозжечка кролика.

а — общий вид молекулярного слоя коры; б — отростки периваскулярного микроглиоцита молекулярного слоя коры; стрелка — перинуклеарная часть микроглиоцита, находящаяся вблизи кровеносного капилляра, просвет которого отмечен звездочкой. Конфокальная лазерная микроскопия. а, б — иммуноцитохимическая реакция на белок Iba-1. а — флюоресцентная визуализация Cy2 (зеленый цвет) с докраской ядер клеток йодистым пропидием (красный цвет). Пространственная реконструкция в режиме Shadow; AnyView — Zen2012 (Zeiss, Германия)

генной пероксидазы срезы инкубировали в 3% растворе перекиси водорода, а для блокирования неспецифических сайтов связывания антигена — в блокировочном растворе (Protein Block, Spring Bioscience, США). Микроглиоциты выявляли при помощи поликлональных козых антител к белку Iba-1 (разведение 1:200, Abcam, Великобритания). Для выявления комплекса антиген—антитело применяли вторичные антикозьи биотинилированные антитела (разведение 1:200, Dako, Дания). Для флюоресцентной визуализации продукта иммуноцитохимической реакции использовали стрептавидин, конъюгированный с флюорохромом Cy2 (Jackson ImmunoResearch, США). Ядра клеток докрашивали флюоресцентным красителем йодистым пропидием (PI). Исследование полученных препаратов производили при помощи флюоресцентного микроскопа Leica DM 2500 (Leica, Германия) и конфокального лазерного микроскопа LSM 710 (Zeiss, Германия), укомплектованного аргоновым и твердотельным лазерами. Обработку полученных изображений и трехмерную реконструкцию проводили с помощью компьютерных программ Zen-2012 (Zeiss, Германия). Был использован объектив 40x/1.20 W Corr UV-VIS-IR M27 (водная иммерсия) и C-Apochromat 63x/1.20 W Corr M27 (водная иммерсия). Для возбуждения флюоресценции Cy2 и PI использовали лазеры с длиной волны 488 и 561 нм соответственно. Для обеспечения независимого возбуждения флюоресценции красителей и исключения возможности перекрытия их спектров эмиссии использовали рекомендованный производителем оборудование режим «Best Signal». В работе было использовано оборудование, предоставленное в соответствии с программой «Протеом человека» РАН.

Результаты исследования. Изучение препаратов при помощи флюоресцентного микроскопа показало, что реакция на маркер микроглиоцитов Iba-1 была высокоспецифична, а докраска PI позволяла хорошо различать ядра всех клеток, содержащих достаточно большую долю гетерохроматина (в том числе и микроглиоцитов). Ядра клеток Пуркинье, преимущественно содержащие эухроматин, флюоресцировали слабо, тогда как ядра клеток-зерен зернистого слоя коры мозжечка давали интенсивную флюоресценцию. В молекулярном слое наблюдалось более плотное расположение микроглиоцитов и их разветвленных отростков, чем в остальных слоях коры и белом веществе.

Изучение препаратов с использованием конфокального лазерного микроскопа показало, что для микроглиоцитов молекулярного слоя коры мозжечка кролика характерны 2 варианта организации. Наиболее распространенными микроглиоцитами являются клетки с извилистыми сложно-разветвленными отростками (рисунк, а). У таких отростков при построении пространственных реконструкций отчетливо определяются главные стволы и ветви второго и третьего порядков. Нередко главные ветви либо вторичные отростки идут в радиальном направлении, по-видимому, сопровождая дендриты клеток Пуркинье. Ближе

к слою клеток Пуркинье разветвленность отростков микроглиоцитов возрастает.

Второй вариант микроглиоцитов — периваскулярные малоотростчатые клетки. Для них характерно распластывание перинуклеарной части вдоль оси капилляра, из-за чего на продольных реконструкциях они имеют форму, близкую к веретенной. От таких клеток, как правило, отходят по несколько сравнительно коротких и толстых отростков, у которых иногда можно определить многочисленные очень тонкие и короткие веточки (см. рисунок, б).

Обсуждение полученных данных. Представленные данные свидетельствуют о высокой избирательности примененного метода иммуноцитохимического выявления микроглиоцитов мозжечка кролика и о его пригодности для последующего построения пространственных реконструкций по последовательным оптическим срезам. Отсутствие иммунореактивности у каких-либо иных клеток, помимо микроглиоцитов, дает существенное преимущество перед методами лектиновой гистохимии, которые традиционно используются при исследовании микроглии у кролика [2–4]. Так, все 3 из использовавшихся ранее лектинов (*Lycopersicon esculentum*, *Ricinus communis* agglutinin-120, *Griffonia simplicifolia* B4 isolectin), связываются, наряду с микроглиоцитами, и с клетками капилляров (эндотелиоцитами, возможно, перицитами). В последнем случае не представляется возможным отдифференцировать на препаратах периваскулярную микроглию, что было сделано при проведении настоящего исследования.

Наиболее важным наблюдением следует считать определение двух основных структурных типов микроглиоцитов, которые характерны для молекулярного слоя коры мозжечка интактных половозрелых кроликов. Макрофагоподобные клетки и типичные периваскулярные макрофаги, встречающиеся в других областях мозга и сетчатке глаза [4], не были типичным компонентом изучавшейся структуры. Возможно, это свидетельствует о высокой стабильности микроглиальной популяции молекулярного слоя коры мозжечка у взрослых животных в сравнении с ранним постнатальным периодом, для которого характерно присутствие активированной микроглии [6].

Таким образом, полученные новые данные о микроглиоцитах коры мозжечка кролика свидетельствуют о преимущественном присутствии разветвленной микроглии со сложной организацией отростков в наиболее развитой синаптической зоне коры мозжечка — молекулярном слое. Особенности строения периваскулярных микро-

глиоцитов, вероятно, могут указывать на взаимосвязь их структурной организации с выполнением ими защитных функций на уровне гематоэнцефалического барьера.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ (проект 14-04-00049а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Калининченко С.Г., Мотавкин П.А. Кора мозжечка. М.: Наука, 2005.
2. Bass W.T., Singer G.A., Liuzzi F.J. Transient lectin binding by white matter tract border zone microglia in the foetal rabbit brain // *Histochem. J.* 1998. Vol. 30, № 9. P. 657–666.
3. Boya J., Carbonell A.L., Calvo J.L., Borregon A. Microglia cells in the central nervous system of the rabbit and rat: cytochemical identification using two different lectins // *Acta Anat. (Basel)*. 1991. Vol. 140, № 3. P. 250–253.
4. Huang W., Chamberlain C.G., Sarafian R.Y., Chan-Ling T. MHC class II expression by beta2 integrin (CD18)-positive microglia, macrophages and macrophage-like cells in rabbit retina // *Neuron Glia Biol.* 2008. Vol. 4, № 4. P. 285–294.
5. Korzhhevskii D.E., Kirik O., Sukhorukova E. Immunocytochemistry of microglia cells // *Immuno-cytochemistry and related techniques. Neuromethods*. N.Y. Springer (Humana Press) Series Neuromethods. 2015. Vol. 101. P. 209–224.
6. Marin-Teva J.L., Dusart I., Colin C. et al. Microglia promote the death of developing Purkinje cells // *Neuron*. 2004. Vol. 41. P. 535–547.
7. Paxinos G. The rat nervous system. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004.
8. Wake H., Moorhouse A.J., Jinno S. et al. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals // *J. Neurosci.* 2009. Vol. 29. P. 3974–3980.

Поступила в редакцию 27.11.2015

*O.S.Alekseyeva^{1,3}, Ye.G.Gilerovich¹, O.V.Kirik¹,
D.E.Korzhhevskiy^{1,2}*

STRUCTURAL AND SPATIAL ORGANIZATION OF MICROGLIA IN THE MOLECULAR LAYER OF RABBIT CEREBELLAR CORTEX

Using the methods of immunocytochemistry and confocal laser microscopy, structural organization and spatial distribution of microglia cells in the molecular layer of the cerebellar cortex were studied in 5 adult male rabbits. Reaction to microglial cell marker Iba-1 was highly specific, while until recently their selective detection was impossible in rabbits. In the molecular layer of the cerebellar cortex, two patterns of microglia cell organization were observed. Most common were the cells with tortuous intricately ramified processes, the main branches of which often had radial direction. Perivascular sparsely-branched spindle-shaped microglia cells were also found. The peculiarities of the structural organization of these cells are related to the protective functions they perform at the level of the blood-brain barrier.

Key words: *cerebellum, microglia, Iba-1, rabbit*

¹ Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, RAS Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg; ² Department of Fundamental Problems of Medicine and Medical Technology, St. Petersburg State University; ³ Laboratory of Comparative Physiology of Respiration, I.M.Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, St. Petersburg