

Д. Э. Коржевский¹, О. В. Кирик¹, Е. Г. Сухорукова¹ и Т. Д. Власов²

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МИКРОГЛИОЦИТОВ СТРИАТУМА ПОСЛЕ ТРАНЗИТОРНОЙ ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

¹ Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (зав. — д-р мед. наук Д. Э. Коржевский), отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург; ² кафедра патологической физиологии (зав. — проф. Т. Д. Власов), Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова

Известно, что микроглиоциты не являются структурно стабильными клеточными элементами, а, изменяя длину отростков, контролируют синаптическую организацию головного мозга. Цель данной работы состояла в изучении структурной организации микроглии стриатума и перивентрикулярной области конечного мозга крысы после транзиторной фокальной ишемии. Установлено, что ишемическое повреждение, при отсутствии инфаркта мозга, приводит к активации микроглии, способствующей реорганизации нейрональной микроглии. Микроглиоциты по мере их активации меняют свою форму с характерной отростчатой на овальную и округлую, что соответствует типичным формам амёбоидной микроглии. Показано, что микроглиоциты после ишемии способны пролиферировать.

Ключевые слова: головной мозг, ишемия, микроглия, белок Iba-1

Клетки микроглии — резидентные клетки макрофагального ряда в ЦНС [7] изучаются с начала XX в., однако, до сих пор продолжается дискуссия о функциях, выполняемых ими в мозгу. В последнее время было показано, что микроглиоциты не являются структурно стабильными клеточными элементами, а находятся в постоянном движении и, изменяя длину отростков, контролируют синаптическую организацию головного мозга [12]. Считается, что структура этих клеток неразрывно связана с их функциональным состоянием [11], поэтому изучение морфологических характеристик микроглиоцитов при различных патологических процессах может способствовать пониманию их патогенеза.

Недавно разработанная модель транзиторной фокальной ишемии [4] позволяет изучать нейродегенеративные процессы, происходящие при пост-ишемической энцефалопатии [2]. Предполагается, что эта модель может быть удобна и для изучения реакции микроглии при избирательной гибели нейронов.

Цель настоящей работы состояла в изучении структурной организации микроглии стриатума и перивентрикулярной области конечного мозга у крыс после транзиторной фокальной ишемии.

Материал и методы. Материалом для исследования служил головной мозг крыс-самцов массой 150–250 г линии Вистар (n=14). При содержании и умерщвлении животных руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.).

Индукцию ишемии проводили с использованием эндоваскулярной методики под нембуталовым наркозом [4].

Продолжительность нарушения кровообращения в бассейне левой средней мозговой артерии в каждом случае составляла 30 мин, а время реперфузии — 48 ч (n=5) и 10 сут (n=4). Контролем служил мозг 5 интактных крыс.

Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [3], обезжизняли и заливали в парафин по общепринятой методике. Для идентификации микроглиоцитов использовали поликлональные козы антигена к антигену Iba-1 (AbCam, Великобритания, по каталогу — ab5076) [8]. После стандартной процедуры депарафинирования, регидратации, проводили тепловое демаскирование антигена в модифицированном цитратном буфере (S1700, Dako, Дания). Для блокирования неспецифических сайтов связывания антигена срезы инкубировали с блокировочным раствором («Protein block», Spring Bioscience, США). Инкубацию с первичными антителами к Iba-1 в разведении 1:200 проводили в течение 80 мин при 40 °С. Для выявления комплекса антиген — антитело применяли набор реагентов LSAB+ (Dako, Дания). Для выявления продукта иммуногистохимической реакции использовали хромоген DAB+ (Dako, Дания). После проведения реакций часть срезов докрашивали квасцовым гематоксилином. Контрольные процедуры при постановке иммуногистохимических реакций осуществляли с учетом рекомендаций производителей реагентов.

На препаратах у всех исследованных животных измеряли диаметр ядросодержащей части микроглиоцитов, а также (при ув. 400) определяли относительную площадь среза, занимаемую микроглиоцитами, как их телами, так и отростками, с использованием компьютерной программы ImageJ (США). Для каждого случая вычисляли различия между показателями, характеризующими правое и левое полушарие. Сравнение наблюдений проводили с использованием t-критерия (Стьюдента). Различия считали значимыми при $P < 0,05$.

Результаты исследования. У контрольных животных в сером веществе стриатума обнаружены многочисленные тонкие отростки

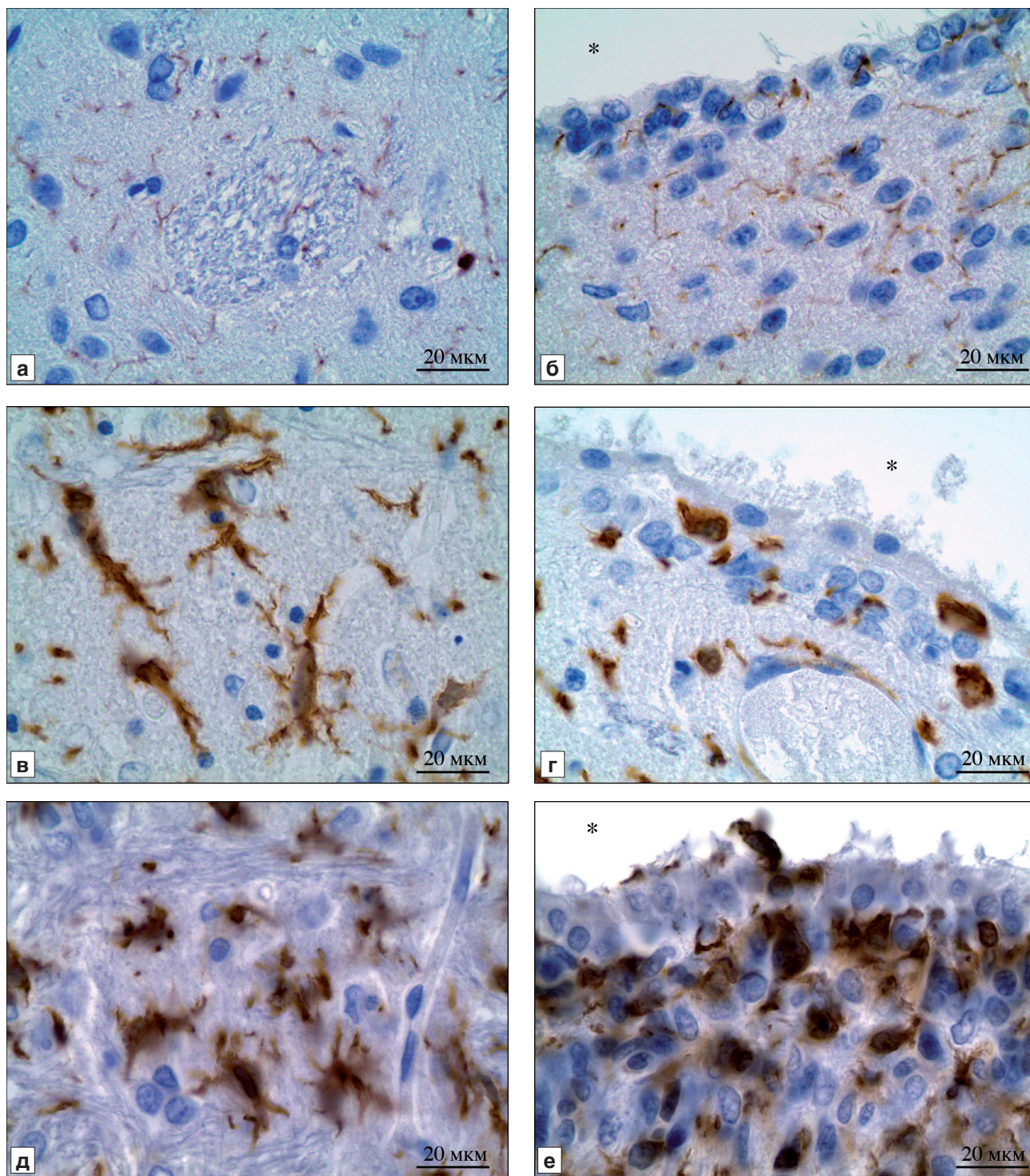


Рис. 1. Микроглия в стриатуме и субвентрикулярной зоне конечного мозга крысы.

а, б — без ишемии; в, г — через 48 ч после ишемии; д, е — через 10 сут после ишемии. Звездочка — полость бокового желудочка. Иммуноцитохимическая реакция на белок Iba-1 с докраской гематоксилином.

Iba-1-иммунопозитивных (Iba-1⁺) клеток (рис. 1), тела которых редко попадают в плоскость среза. Рядом с капиллярами встречаются эти клетки палочковидной формы, вытянутые вдоль проходящего капилляра. В белом веществе стриатума очень редко обнаруживаются ядросодержащие части микроглиоцитов, однако оно пронизано

немногочисленными отростками этих клеток, преимущественно ориентированными вдоль хода нервных волокон. Различия между показателями относительной площади, занимаемой профилями микроглиоцитов, правого и левого полушария для контрольной группы незначимы ($0,41 \pm 0,20\%$). Редкие Iba-1⁺-микроглиоциты выявляются под

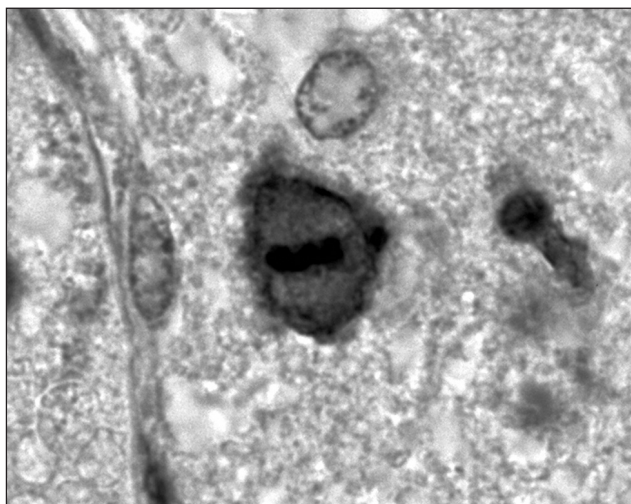


Рис. 2. Метафаза митоза микроглиоцита на границе стриатума с субвентрикулярной зоной конечного мозга крысы через 48 ч после ишемии.

Иммуноцитохимическая реакция на белок Iba-1. Об. 100, ок. 10.

эпендимой боковых желудочков. Часто в плоскости среза обнаруживаются только их отростки (см. рис. 1). Ядродержащая часть этих клеток имеет небольшие размеры (диаметр 5–8 мкм) и округлую, реже — овальную форму с многочисленными тонкими отростками, которые вытягиваются вдоль эпендимы и проникают между эпендимиоцитами, иногда достигая полости желудочка.

Использование окраски препаратов по методу Ниссля показало, что после 30-минутной ишемии в головном мозгу сохраняются анатомические соотношения, в стриатуме не формируются крупноочаговые повреждения, сопровождающиеся деструкцией нервной ткани и развитием воспалительной реакции, а происходит, преимущественно, локальное повреждение нейронов.

Через 48 ч после ишемического воздействия в ипсилатеральном полушарии под эпендимой встречаются крупные Iba-1⁺-микроглиоциты округлой или овальной формы (диаметр 10–12 мкм), которые могут иметь по 1–2 толстых и коротких отростка. Иногда типичные отростки не определяются. Встречаются митотически делящиеся Iba-1⁺-клетки (рис. 2).

В сером веществе стриатума и субвентрикулярной зоне этого полушария рядом с областью повреждения количество микроглиоцитов увеличивается, их форма претерпевает значительные изменения: исчезают отростки, микроглиоцит принимает округлую или амeboидную форму с небольшими цитоплазматическими выростами. В белом веществе встречаются ядродержащие части Iba-1⁺-клеток, плотность расположения

пронизывающих белое вещество отростков возрастает.

В контралатеральном полушарии в субэпендимной зоне выявляются Iba-1⁺-микроглиоциты, которые имеют более толстые и менее многочисленные отростки, чем микроглиоциты интактного мозга. В стриатуме этого полушария и в сером, и белом веществе количество микроглиоцитов возрастает, однако их форма не претерпевает значительных изменений, отростки становятся более толстыми и лучше выявляются на срезе. В белом веществе также встречаются ядродержащие части клеток, и возрастает плотность расположения пронизывающих его отростков. Вокруг крупных сосудов, артериол и венул наблюдается скопление микроглиоцитов. Так же, как и у контрольных животных, встречаются клетки палочковидной формы, расположенные вдоль капилляров. Показатель относительной площади, занимаемой профилями микроглиоцитов в левом полушарии, больше, чем в правом (контралатеральном) на $3,8 \pm 1,3\%$, что статистически значимо отличается от аналогичного показателя в группе контроля ($P < 0,001$).

После ишемического воздействия через 10 сут в ипсилатеральном полушарии мозга в субэпендимной зоне микроглиоциты располагаются образуя особый субэпендимный слой. В сером веществе стриатума обнаруживаются многочисленные микроглиоциты, имеющие неправильной формы ядродержащую часть и очень короткие толстые отростки. В белом веществе стриатума видны многочисленные отростки клеток, перинуклеарные участки клеток редко попадают в плоскость среза.

В контралатеральном полушарии мозга количество микроглиоцитов увеличивается, составляя ряд из ядродержащих частей клеток и их отростков под эпендимой боковых желудочков. В сером веществе стриатума количество микроглиоцитов также возрастает, у некоторых клеток сохраняется характерная отростчатая форма с округлой ядродержащей частью и длинными тонкими отростками, у других клеток она имеет неправильную овальную форму, с короткими толстыми отростками. Белое вещество стриатума пронизано отростками микроглиоцитов, часто в нем видны и ядродержащие части клеток. Однако большинство микроглиоцитов находятся в сером веществе. Различия между показателями относительной площади, занимаемой профилями микроглиоцитов, правого и левого полушария составляют $10 \pm 6\%$, что статистически значимо отличается от контроля ($P < 0,05$), но незначимо

отличается от предыдущей экспериментальной группы ($P=0,07$).

Обсуждение полученных данных. Полученные данные свидетельствуют о том, что в стриатуме и субэпендимной зоне конечного мозга у крыс после ишемии встречаются различные формы микроглиоцитов, что связано с их функциональным состоянием [11]. Активация микроглиоцитов приводит к исчезновению отростков и приобретению ими округлой или амебоидной формы, которая, вероятно, необходима для облегчения их миграции к месту повреждения, выполнению функции фагоцитоза, митотическому делению. Палочковидные микроглиоциты встречаются как в интактном мозгу, так и в контралатеральном полушарии ишемизированного мозга и не являются, по-видимому, переходной формой к амебоидным микроглиоцитам, а выполняют функции контроля состояния гематоэнцефалического барьера, наряду с клетками макроглии.

На границе с полостью желудочка под эпендимой микроглиоциты также изменяют свою форму: размеры перинуклеарной области клеток увеличиваются, отростки утолщаются, и их количество уменьшается. Это может быть связано с особенностями структурной организации субвентрикулярной зоны и с тем, что именно в ней происходит нейрогенез, который стимулируется после ишемического повреждения [5, 10].

Через 48 ч после ишемии были обнаружены митотически делящиеся Iba-1⁺-клетки округлой формы, не имеющие отростков. В этих клетках белок Iba-1 сосредоточен в кортикальном слое цитоплазмы, что соответствует характерной цитоплазматической локализации этого микроглиального маркера [8] и указывает на то, что микроглиоциты при активации могут делиться. Делящиеся микроглиоциты через 10 сут после ишемии не обнаружены, что свидетельствует о завершении роста локальной популяции этих клеток и окончании активной фазы ликвидации последствий постишемической деструкции. Полученные данные указывают на возможность увеличения популяции клеток макроглии за счет пролиферации *in situ*, а не только за счет миграции их предшественников (моноцитов) из сосудистого русла [9].

Ишемическое повреждение ведет к активации макроглии, преимущественно, в стриатуме, поскольку именно там происходит массовая гибель нейронов [4]. Большинство микроглиоцитов сосредоточены именно в сером веществе, тогда как в белом веществе наблюдаются только

отдельные клетки. Это может объясняться тем, что в белом веществе стриатума расположены в основном афферентные волокна (структуры, которые не повреждаются при использованной модели ишемии), происходящие из других отделов мозга [6]. Длительная постишемическая активация микроглиоцитов серого вещества стриатума может быть связана с их миграционной активностью, а также с участием в реорганизации синаптического аппарата сохранившихся нейронов [12].

Таким образом, непродолжительное нарушение кровообращения в бассейне средней мозговой артерии, не приводящее к развитию ишемического инфаркта мозга, способствует реорганизации нейропиля стриатума, в которой активное участие принимают клетки макроглии. Активация микроглиоцитов в зоне повреждения сопровождается изменением их формы: клетки утрачивают отростки и приобретают неправильную овальную либо круглую форму с цитоплазматическими выростами, что соответствует классическим описаниям амебоидной макроглии [1]. Способность к пролиферации у микроглиоцитов не связана с цитохимической дедифференцировкой (они не утрачивают свой специфический маркерный белок Iba-1).

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проекты 10-04-00180а, 11-04-01693а).

ЛИТЕРАТУРА

- Белецкий В. К. Неврология. Норма и патология. В кн.: Патологическая анатомия нервной системы. М., МедГиз, с. 55–78.
- Кирик О. В., Сухорукова Е. Г., Власов Т. Д. и Коржевский Д. Э. Селективная гибель нейронов стриатума крысы после транзиторной окклюзии средней мозговой артерии. Морфология, 2009, т. 135 вып. 2, с. 80–82.
- Коржевский Д. Э., Григорьев И. П. и Отеллин В. А. Применение обезживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейробиологических исследованиях. Морфология, 2006, т. 129, вып. 1, с. 85–87.
- Коржевский Д. Э., Кирик О. В., Байса А. Е. и Власов Т. Д. Моделирование одностороннего ишемического повреждения нейронов стриатума с помощью непродолжительной окклюзии средней мозговой артерии. Бюл. exper. биол., 2009, т. 147, № 2, с. 217–219.
- Коржевский Д. Э., Кирик О. В. и Власов Т. Д. Постишемическая пролиферация клеток конечного мозга и проблема постнатального нейрогенеза. В кн.: Современные направления исследований функциональной межполушарной асимметрии и пластичности мозга. М., Научный мир, 2010, с. 388–390.
- Отеллин В. А. и Григорьев И. П. Синаптические и несинаптические межнейронные связи как структурно-медиаторная основа функций неостриатума. В кн.: Стриарная система и поведение в норме и при патологии. Л., Изд-во АН СССР, 1984, с. 138–146.

7. Graeber M. B. and Streit W. J. Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol.*, 2010, v. 119, p. 89–105.
8. Kirik O. V., Sukhorukova E. G. and Korzhevskii D. E. Calcium-binding protein Iba-1/ALF-1 in rat brain cells. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 2011, v. 41, № 2, p. 149–152.
9. Ladeby R., Wirenfeldt M., Garcia-Ovejero D. et al. Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 2005, v. 48, № 2, p. 196–206.
10. Okano H. and Sawamoto K. Neural stem cells: involvement in adult neurogenesis and CNS repair. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 2008, v. 363, p. 2111–2122.
11. Thored P., Heldmann U., Gomes-Leal W. et al. Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. *Glia*, 2009, v. 57, № 8, p. 835–849.
12. 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, v. 29, № 13, p. 3974–3980.

Поступила в редакцию 29.11.2011

STRUCTURAL ORGANIZATION OF STRIATAL MICROGLIOCYTES FOLLOWING FOCAL ISCHEMIA

D. E. Korzhevskiy, O. V. Kirik, Ye. G. Sukhorukova and T. D. Vlasov

Microgliaocytes are currently known as structurally labile cells, that, by changing the length of their processes, control the synaptic organization of the brain. The aim of this study was to investigate structural organization of microglia of the striatum and of the forebrain periventricular area in rat following transitory focal ischemia. In the absence of brain infarction, ischemic lesion was found to activate microglia, which contributed to rearrangement of striatal neuropil. As microgliaocytes became activated, they changed their shape from characteristic dendritic one to oval and rounded, which are typical to amoeboid microglia. Microgliaocytes were shown to be capable of proliferation.

Key words: *brain, ischemia, microglia, Iba1 protein*

Laboratory of the Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, RAMS North-Western Branch Institute of Experimental Medicine; Department of Pathological Physiology, I. P. Pavlov State Medical University, St. Petersburg

© Коллектив авторов, 2012
УДК 611.16:611.36:616.718.5/-6-001

Р. Ю. Очеретина¹, О. З. Мкртчян² и М. В. Стогов¹

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ СОСУДОВ ДОЛЬКИ ПЕЧЕНИ У МЫШЕЙ В ВОССТАНОВИТЕЛЬНОМ ПЕРИОДЕ ПОСЛЕ ТРАВМЫ ГОЛЕНИ

¹ Клинико-экспериментальный лабораторный отдел (руков. — проф. С. Н. Лунева), Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г. А. Илизарова, г. Барнаул; ² кафедра цитологии, генетики и ботаники (зав. — проф. О. З. Мкртчян), Омский государственный педагогический университет, e-mail: office@ilizarov.ru

Изучен диаметр сосудов печеночной долики междольковых вен, центральных вен, междольковых артерий, синусоидных капилляров, междольковых желчных протоков через 3, 7, 28 сут после перелома костей голени у мышей линии СВА (n=30). Установлено, что на 3-и сутки после травмы наблюдались наиболее выраженные изменения морфометрических показателей, свидетельствующие о нарушении гемодинамики. Происходило увеличение диаметра центральных, междольковых вен и синусоидных капилляров, а также уменьшение диаметра междольковых артерий, что, вероятно, способствовало сокращению артериального притока крови. Через 28 сут от начала эксперимента выявлена тенденция к нормализации диаметра междольковых вен, артерий и желчных протоков. Однако диаметр центральных вен и синусоидных капилляров оставался значимо выше, чем в контроле. Таким образом, выявлено, что перелом костей голени сопровождается изменением морфометрических показателей сосудов печеночной долики.

Ключевые слова: *перелом костей, печеночная доляка, сосуды, морфометрия*

Восстановление после травмы органов опорно-двигательного аппарата во многом зависит не только от характера и тяжести повреждений, но и от функционального состояния печени [4, 6]. Уникальная морфологическая организация функционального элемента печени — долики со специфической структурой микроциркуляторно-

го русла [9], предполагает, что морфометрические изменения ее сосудов взаимосвязаны с функциональной активностью органа [1, 7]. Вопросы о механизмах расстройства микроциркуляции и метаболизма гепатоцитов до настоящего времени остаются дискуссионными [2, 3, 5, 11].