

© Коллектив авторов, 2012
УДК 611.813.3018:616.831-005.4:599.323.4

Д. Э. Коржевский¹, М. В. Ленцман², О. В. Кирик¹ и В. А. Отеллин³

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ТИПЫ АКТИВИРОВАННОЙ МИКРОГЛИИ ГИППОКАМПА, НАБЛЮДАЕМЫЕ ПОСЛЕ ТРАНЗИТОРНОЙ ОБЩЕЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

¹ Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (руков. — д-р мед. наук Д. Э. Коржевский), отдел общей и частной морфологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН»; ² лаборатория физиологии пищеварения (зав. — канд. биол. наук В. А. Золотарёв) и ³ лаборатория онтогенеза нервной системы (зав. — чл.-кор. РАМН В. А. Отеллин), ФГБУН «Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН», Санкт-Петербург

Цель исследования — изучение с использованием методов иммуноцитохимии (выявление белка Iba-1) морфологических характеристик микроглиоцитов гиппокампа крыс (n=15) и описание их клеточных типов в условиях реакции на однократную общую ишемию головного мозга продолжительностью 12 мин. Полученные результаты свидетельствуют о существовании нескольких морфологических типов микроглиоцитов в интактном гиппокампе и о появлении их новых форм при реакции на повреждение нейронов, вызванное ишемией. Такое изменение в общей популяции микроглиоцитов гиппокампа связано с активацией их функции. В постишемическом периоде (спустя 3, 7 и 14 сут) для отростков микроглиоцитов характерно появление множества микровыростов, указывающих на усиление их взаимодействия с окружающими клеточными элементами, что может быть проявлением процесса элиминации поврежденных синаптических структур нейрона.

Ключевые слова: гиппокамп, микроглия, белок Iba-1, ишемия мозга

Микроглия представляет собой особую популяцию клеток костномозгового происхождения, которые выполняют в нервной ткани функции резидентных макрофагов и являются ключевым звеном в развитии местного воспалительного процесса [6]. В классических исследованиях описано множество морфологических типов микроглиоцитов, обнаруживаемых в различных областях мозга как в норме, так и при патологии [1]. Однако несовершенство использовавшихся ранее импрегнационных методов оставляет сомнения в том, что все выявляемые разнообразные клеточные типы действительно являются микроглиоцитами. В настоящее время разработан высокоспецифичный метод селективной окраски микроглиоцитов, который хорошо воспроизводится на обычных парафиновых срезах [5] и лишен недостатков, свойственных классическим импрегнационным методикам, что открывает новые перспективы для изучения микроглиальной популяции клеток головного мозга.

Цель настоящего исследования состояла в изучении морфологических характеристик микроглиоцитов гиппокампа крысы и описании их кле-

точных типов, которые появляются при реакции на однократную общую ишемию головного мозга.

Материал и методы. Исследован головной мозг 15 половозрелых крыс-самцов (Стрейг — Доули). Содержание животных и все экспериментальные манипуляции осуществляли с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Крысам (n=12), в соответствии с ранее применявшимся вариантом общепринятой модели [4, 8], под наркозом создавали ишемию головного мозга 12-минутным пережатием обеих общих сонных артерий, за которым следовала реперфузия головного мозга. 3 животных служили контролем. Через 3 (n=4), 7 (n=4) и 14 (n=4) сут, прошедших после операции, крыс под наркозом декапитировали. Головной мозг фиксировали в этанол-формальдегиде и цинк-этанол-формальдегиде [2] и заливали в парафин по общепринятой методике. Серийные срезы окрашивали толуидиновым синим по Нисслю. Иммуноцитохимически выявляли микроглиоциты с использованием поликлональных козьих антител к антигену Iba-1 (AbCam, Великобритания, по каталогу — ab5076) [5]. После стандартной процедуры депарафинирования и регидратации проводили тепловое демаскирование антигена в модифицированном цитратном буфере (S1700, Dako, Дания). Инкубацию с первичными антителами к Iba-1 в разведении 1:200 проводили в течение 80 мин при 40 °С. Комплекс антиген — антитело выявляли набором реагентов LSAB+ (Dako, Дания), продукт иммуноцитохимической реакции — хромоген DAB+ (Dako, Дания). Часть срезов докрашивали квасцовым гематоксилином. Контрольные про-

Сведения об авторах:

Коржевский Дмитрий Эдуардович, Кирик Ольга Викторовна (e-mail: iemmorphol@yandex.ru), лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, отдел общей и частной морфологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, 197376 Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12
Ленцман Михаил Валерьевич, Отеллин Владимир Александрович (e-mail:), лаборатория физиологии пищеварения, лаборатория онтогенеза нервной системы, ФГБУН «Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН», 199034 Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

цедуры при постановке иммуноцитохимических реакций проводили с учетом рекомендаций производителей реагентов.

Результаты исследования. У контрольных животных при реакции на белок Iba-1 селективно окрашивались клетки микроглии как в гиппокампе, так и в других отделах головного мозга. Все клетки микроглии интактного гиппокампа имели небольшие круглые или овальные ядра и чрезвычайно малый объем перинуклеарной цитоплазмы. При этом для большинства клеток были характерны многочисленные тонкие ветвящиеся отростки (рис. 1, а), которые пронизывали весь нейропил гиппокампа и проникали в группы компактного расположения нейронов (пирамидный слой собственно гиппокампа, зернистый слой зубчатой извилины). Единичные микроглиоциты были расположены в пирамидном слое гиппокампа. При этом их тела проникали между контактирующими с ними нейронами и имели неправильную форму. По визуальной оценке не более 20% микроглиоцитов были расположены рядом с капиллярами. Несмотря на то, что большинство клеток микроглии интактного гиппокампа можно отнести к единому морфологическому типу звездчатых тонкоотростчатых микроглиоцитов, около кровеносных сосудов встречались и единичные вытянутые клетки, у которых имелись более крупные отростки, подчеркивающие их веретеновидную форму.

После ишемии наблюдалась дегенерация части нейронов пирамидного слоя гиппокампа. При этом через 3 сут реперфузии в поле СА1 присутствовали сморщенные пирамидные нейроны. Через

7 сут часть нейронов погибали, но сохранялись и группы поврежденных нейронов, а через 2 нед на отдельных участках поля СА1 нейроны не определялись. При этом происходили постепенная активация микроглиоцитов, изменение их формы в зонах нейрональной деструкции и существенное увеличение их популяции (см. рис. 1, 2).

При появлении сморщенных пирамидных нейронов наблюдались две тенденции в изменении расположения и формы микроглиоцитов. Первая — состояла в появлении многочисленных Iba-1-иммунопозитивных клеток в составе пирамидного слоя (см. рис. 1, б), часть из которых имели укороченные отростки. Вторая — заключалась в организации микроглиоцитов в пределах радиального слоя в линейные структуры, состоящие из одной или нескольких клеток, лишенных боковых отростков, располагающихся вдоль главных дендритов пирамидных нейронов гиппокампа (см. рис. 2). Часть микроглиоцитов краевого и лакунарно-молекулярного слоев сохраняли звездчатую многоотростчатую форму, типичную для интактного гиппокампа, однако у них наблюдалось увеличение размеров ядра и перинуклеарной цитоплазмы, а сами отростки из-за большого числа микровыростов переставали казаться гладкими, как это было у интактных животных. Появлялись единичные «гигантские» микроглиоциты с крупными протяженными отростками. Иногда встречались микроглиоциты с характерной изогнутой окооядерной частью, лишенной отростков в области изгиба. При этом в большинстве случаев оставалось неясным, какую структуру в нейро-

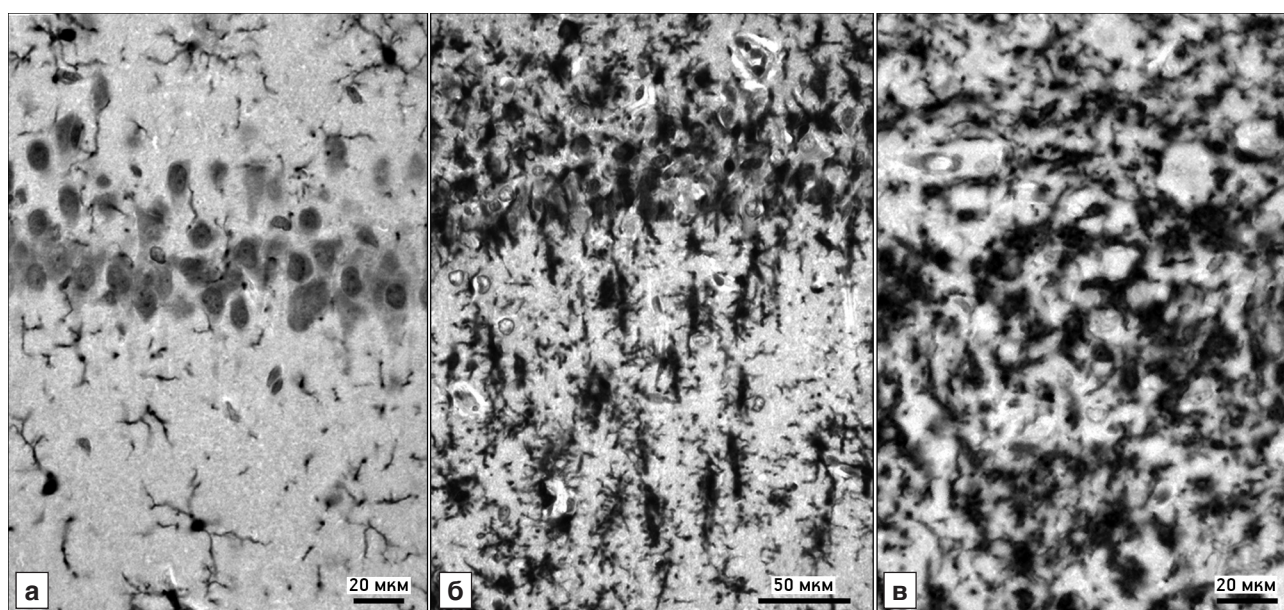


Рис. 1. Общий вид поля СА1 гиппокампа крысы.

а — контроль; б — через 7 сут после ишемии; в — через 14 сут после ишемии. Иммуноцитохимическая реакция на микроглиальный маркер — белок Iba-1, докраска гематоксилином.

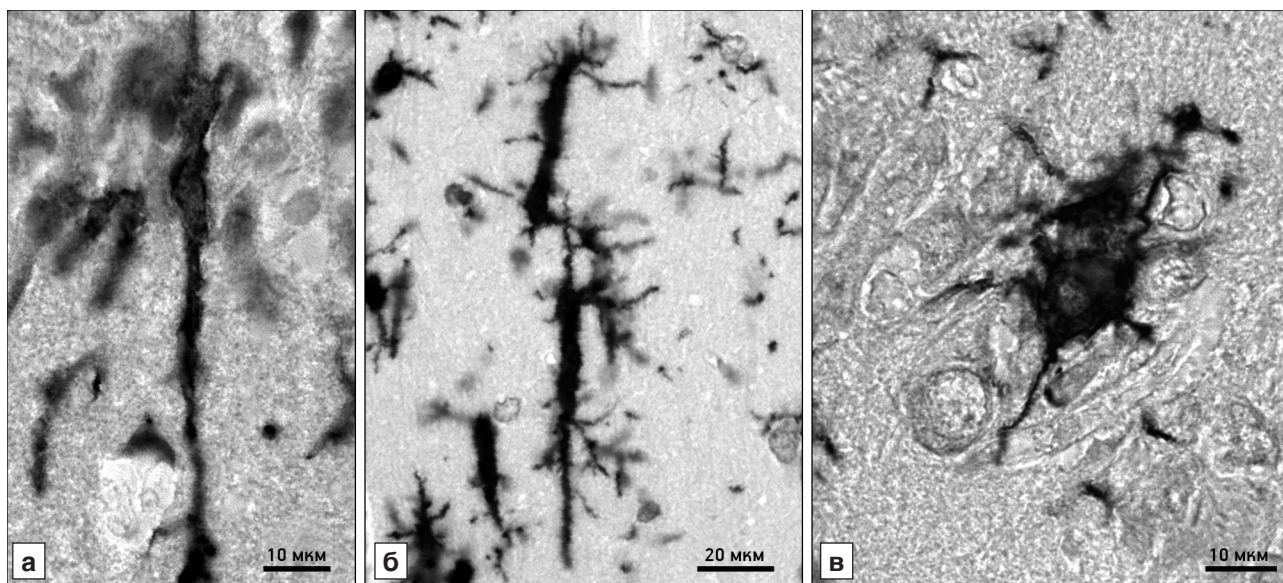


Рис. 2. Различные клеточные формы микроглиоцитов гиппокампа крысы, обнаруживаемые через 3 (а) и 7 (б, в) сут после ишемии.

Иммуноцитохимическая реакция на микроглиальный маркер — белок Iba-1. а, б — докраска гематоксилином, в — без докраски.

пале огибают эти клетки (рядом отсутствовали и кровеносные сосуды, и нейроны). Нередко встречались микроглиоциты, расположенные попарно. При этом взаимоотношение их отростков указывало либо на их тесный контакт, либо на то, что это не до конца разделившиеся клетки.

По мере распространения постишемической дегенерации нейронов и усиления микроглиальной реакции (7 сут) увеличивалось число веретеновидных микроглиоцитов в радиальном слое, которые приобретали многочисленные короткие микровыросты, отходящие от перинуклеарной области и основных отростков, преимущественно под прямым углом. Увеличивалось число типичных амeboидных микроглиоцитов. Вне зоны нейродегенерации микроглиоциты сохраняли характерную для интактного гиппокампа форму.

На завершающей стадии реакции на постишемическую нейродегенерацию (14 сут) типичные биполярные микроглиоциты исчезали (см. рис. 1). Для всех слоев поврежденной области гиппокампа было характерно чрезвычайно плотное расположение близких по размерам микроглиоцитов, имеющих неправильную форму, довольно короткие и утолщенные (в сравнении с контролем) отростки. В неповрежденных частях гиппокампа микроглиоциты сохраняли звездчатую форму и имели тонкие ветвящиеся отростки.

Обсуждение полученных данных. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о существовании нескольких морфологических типов микроглиоцитов в интактном гиппокампе и о появлении новых их форм при

реакции на повреждение нейронов, вызванное транзиторной общей ишемией головного мозга. Несомненно, такое изменение в общей популяции микроглиоцитов гиппокампа связано с изменением их функционального состояния [7, 9]. То, что активация микроглиоцитов приводит к исчезновению отростков и приобретению ими округлой, амeboидной, формы, общеизвестно [1], однако типичные амeboидные микроглиоциты составляют небольшую часть активированной ишемией микроглии гиппокампа, что отличает реактивные изменения микроглии гиппокампа от постишемических изменений микроглии стриатума [3]. Хотя митотически делящихся микроглиоцитов в исследованных препаратах обнаружено не было, попарное расположение части клеток микроглии через 3 сут реперфузии может указывать на предшествовавшее деление. Для постишемических изменений структуры отростков микроглиоцитов характерно появление множества микровыростов, указывающих на усиление их взаимодействия с окружающими клеточными элементами, что может быть проявлением процесса элиминации поврежденных синаптических структур нейропиля [10].

Таким образом, в популяции активированных ишемией клеток микроглии гиппокампа можно выделить, наряду с многоотростчатыми клетками, гигантские микроглиоциты, веретеновидные микроглиоциты радиального слоя гиппокампа, короткоотростчатые микроглиоциты неправильной формы и типичные амeboидные микроглиоциты. Эти формы не являются постоянными и отра-

жают как функциональное состояние клеток, так и особенности организации нейропиля различных слоев гиппокампа.

Работа выполнена при поддержке Программы президентства РАН «Фундаментальные науки – медицине» и ОФФМ РАН «Интегративная физиология» и гранта РФФИ (проект 10-04-00234).

ЛИТЕРАТУРА

- Белецкий В. К. Невроглия. Норма и патология. В кн.: Патологическая анатомия нервной системы. М., МедГиз, 1963, т. 2, с. 55–82.
- Коржевский Д. Э., Григорьев И. П. и Отеллин В. А. Применение обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейрогистологических исследованиях. Морфология, 2006, т. 129 вып. 1, с. 85–87.
- Коржевский Д. Э., Кирик О. В., Сухорукова Е. Г. и Влазов Т. Д. Структурная организация микроглиоцитов стриатума после транзиторной фокальной ишемии. Морфология, 2012, т. 141, вып. 2, с. 28–32.
- Коржевский Д. Э., Отеллин В. А., Григорьев И. П. и др. Структурная организация астроцитов гиппокампа в постишемический период. Морфология, 2004, т. 125, вып. 2, с. 19–21.
- Сухорукова Е. Г., Кирик О. В. и Коржевский Д. Э. Применение иммуногистохимического метода для выявления микроглии головного мозга в парафиновых срезах. Бюл. экспер. биол., 2010, т. 149, № 6, с. 709–712.
- Graeber M. B. and Streit W. J. Microglia: biology and pathology. Acta Neuropathol., 2010, v. 119, p. 89–105.
- 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.
- Otellin V. A., Korzhevskii D. E., Kostkin V. B. et al. The neuroprotective effect of creatine in rats with cerebral ischemia. Dokl. Biol. Sci., 2003, v. 390, p. 197–199.
- Thored P., Heldmann U., Gomes-Leal W. et al. Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype cominant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. Glia, 2009, v. 57, № 8, p. 835–849.
- 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 23.03.2012

MORPHOLOGICAL TYPES OF ACTIVATED MICROGLIA IN THE HIPPOCAMPUS OBSERVED FOLLOWING TRANSIENT TOTAL BRAIN ISCHEMIA

D. E. Korzhevskiy, M. V. Lentsman, O. V. Kirik and V. A. Otellin

The aim of the study was to evaluate, by using immunohistochemistry (demonstration of Iba-1 protein), the morphological features of the rat hippocampal microglia and to describe its cellular types during the response to a single total brain ischemia of 12 min duration. The results obtained suggest the existence of several morphologic types of microgliaocytes in the intact hippocampus, while some more types appear in response to ischemic lesion of neurons. These changes in general population of the hippocampal microgliaocytes is related to their functional activation. During the post-ischemic period (3, 7 and 14 days following the challenge), there appeared multiple micro-outgrowths of the microglial cell processes, which suggests the enhancement of their interaction with surrounding cellular elements and may be the manifestation of the process of the elimination of neuropil lesioned synaptic structures.

Key words: *hippocampus, microglia, Iba-1 protein, brain ischemia*

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; Laboratory of the Nervous System Ontogenesis, RAS I. P. Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg