

© Л. И. Хожай, В. А. Отеллин, 2013
УДК 611.813.1+611.813.3]:611.018.8:612.273.2:599.323.4

Л. И. Хожай и В. А. Отеллин

РЕАКТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОГЛИИ В НЕОКОРТЕКСЕ И ГИППОКАМПЕ У КРЫС ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ОСТРОЙ ПЕРИНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ

Лаборатория онтогенеза нервной системы (зав. — чл.-кор. РАН проф. В. А. Отеллин), Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

Изучены динамика реактивного изменения плотности популяции микроглиоцитов и обратимость их фенотипических форм в мозгу новорожденных крыс в разные сроки после воздействия острой нормобарической гипоксии в барокамере в течение 1 ч на 2-е постнатальные сутки. Исследовали разные области неокортекса (фронтальную, моторную, соматосенсорную и зрительную) и отделы гиппокампа (поля CA1, CA3, CA4 и зубчатую извилину) через 1 и 3 ч, 1 и 5 сут после воздействия гипоксии. Микроглиоциты выявляли иммуноцитохимически с использованием поликлональных антител к антигену Iba-1. Результаты показали, что реакция микроглии на воздействие острой гипоксии в неокортексе и гиппокампе у новорожденных развивается одновременно и синхронно с увеличением клеточной гибели. Повышение плотности популяции микроглиоцитов амебоидной формы в исследованных отделах мозга происходит уже через 1 ч в результате их миграции из субвентрикулярной зоны и областей, прилежащих к крупным сосудам, где они практически исчезают. Довольно быстро (через 3 ч) численность амебоидных микроглиоцитов здесь восстанавливается. Плотность популяции микроглиоцитов, особенно амебоидной формы, резко повышается с увеличением гибели клеток и сохраняется до 5 сут.

Ключевые слова: неокортекс, микроглия, гиппокамп, острая перинатальная гипоксия

В пренатальный период развития микроглиоциты, в отличие от других типов клеток глии, довольно рано появляются в головном мозгу человека и животных. Известно, что микроглия, в зависимости от функционального состояния, может иметь разный фенотип и в соответствии с ним обладать различными свойствами. В развивающейся ЦНС отмечена неодинаковая плотность популяции микроглиоцитов в отдельных формациях мозга, которая может меняться на разных стадиях развития. Показано, что микроглия участвует в структурной организации мозга, в регуляции ангиогенеза [4, 9, 10], стимуляции аксонального роста, при этом она обладает фагоцитарными и иммунологическими свойствами [2, 5, 11]. Существует предположение, что микроглия принадлежит особая роль при развитии пренатальной патологии, в частности, значительное увеличение численности активированных микроглиоцитов в областях головного мозга может приводить к продолжительному высвобождению реактивных ионов кислорода и азота, вызывающих оксидативный стресс в развивающихся отделах мозга и способствующих усугублению повреждения [3, 12].

Несмотря на имеющиеся факты о разнообразных свойствах микроглии, относительно немного известно о роли, появлении, миграции и трансформации микроглиоцитов в мозгу новорожден-

ных млекопитающих и человека при воздействии неблагоприятных факторов в период, когда возможно формирование перинатальной нейропатологии.

Поэтому цель данной работы — изучить динамику реактивного изменения плотности популяции микроглиоцитов, обратимости их фенотипических форм в мозгу новорожденных крыс в разные сроки после воздействия острой нормобарической гипоксии.

Материал и методы. Воздействие гипоксии на головной мозг новорожденных крысят осуществляли в барокамере СВК-150 (собрана в ИЭФБ, Санкт-Петербург, Россия), оснащенной устройством для автоматически управляемого обогрева, смены газовой смеси и определения скорости потока газа. Азотно-кислородную газовую смесь готовили с помощью газосмесительной установки (Laorg, Франция). Подопытных животных помещали в барокамеру на 1 ч. Во время экспериментов содержание кислорода в барокамере составляло 7,6–7,8%; углекислого газа — 0,15–0,21%; температура — 21,3–23 °С при нормальном атмосферном давлении. Были использованы 3 группы животных: 1-ю группу составили крысята, подвергавшиеся в барокамере воздействию гипоксии (экспериментальная группа); 2-ю группу — животные, содержавшиеся в барокамере при нормальных условиях (содержание кислорода в воздухе 21–22%, температуре — 21–23 °С и нормальное давление) (контрольная группа) и 3-ю группу — интактные животные, того же возраста (2-я контрольная группа). В каждой группе на одну временную точку приходилось по 8–10 крысят.

Сведения об авторах:

Хожай Людмила Ивановна (astarta0505@mail.ru), Отеллин Владимир Александрович, лаборатория онтогенеза нервной системы, Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

Воздействие гипоксии осуществляли на 2-е постнатальные сутки. Все экспериментальные процедуры проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Гистологическое исследование разных областей неокортекса (фронтальной, моторной, соматосенсорной и зрительной областей) и отделов гиппокампа (CA1, CA3, CA4) проводили через 1 и 3 ч, 1 и 5 сут после воздействия гипоксии. Головной мозг фиксировали в смеси 96° этилового спирта, формалина и хлорида цинка [1]. Материал по общепринятой методике заливали в парафин, готовили серийные фронтальные срезы толщиной 5 мкм, которые после депарафинирования окрашивали толуидиновым синим по методу Ниссля. Микроглиоциты выявляли иммуноцитохимически с помощью поликлональных козых антител к антигену Iba-1 (AbCam, Великобритания) в разведении 1:320. Для выявления комплекса антиген—антитело применяли набор реагентов LSAB+ (Dako, Дания). Визуализацию продукта реакции проводили при помощи хромогена DAB+ (Dako, Дания). После проведения реакции часть срезов докрашивали гематоксилином Джалоли.

Для компьютерной морфометрии использовали гистологические фронтальные срезы головного мозга. С помощью цифровой камеры, встроенной в микроскоп, получали изображения, на которых при помощи программы ImageJ (США) на 10 серийных гистологических срезах (на каждом 3-м срезе) у животных экспериментальной и контрольных групп подсчитывали число клеток на единице площади, которая была равна 0,105 мм². Определяли среднее арифметическое значение и его стандартную ошибку. Статистическую обработку полученных морфометрических показателей осуществляли при помощи компьютерных программ ImageScore Color и ORIGIN50. Для оценки значимости цифровых данных применяли t-критерий Стьюдента. Различия считали значимыми при $P < 0,05$.

Морфологические исследования проводили при помощи светового микроскопа DME (Leica, Германия), изображения были получены при помощи цифровой видеокамеры EC3 (Leica, Германия).

Результаты исследования. У животных двух контрольных групп различий обнаружено не было. В ранний перинатальный период (2-е сутки после рождения) в их головном мозгу микроглиоциты представлены тремя общеизвестными морфологически различимыми формами: амeboидной (с округлой или овальной формой клеточного тела), ветвящейся (с небольшим ободком цитоплазмы вокруг ядра и длинными ветвящимися отростками; клетки могут быть полигональными с несколькими отростками, веретеновидными с двумя отростками или с одним ветвящимся отростком) и переходной, или промежуточной (с большим объемом цитоплазмы и короткими отростками).

У контрольных крыс на 2-е постнатальные сутки микроглиоциты амeboидной формы выявляются преимущественно в субвентрикулярной зоне и вдоль крупных сосудов. Одиночные микроглиоциты ветвящейся формы встречаются между

пирамидными нейронами в слоях разных полей гиппокампа и неокортекса.

Исследование показало, что после воздействия острой гипоксии как в гиппокампе, так и в неокортексе, происходит одновременное появление апоптотически погибших клеток и синхронное увеличение плотности популяции микроглиоцитов.

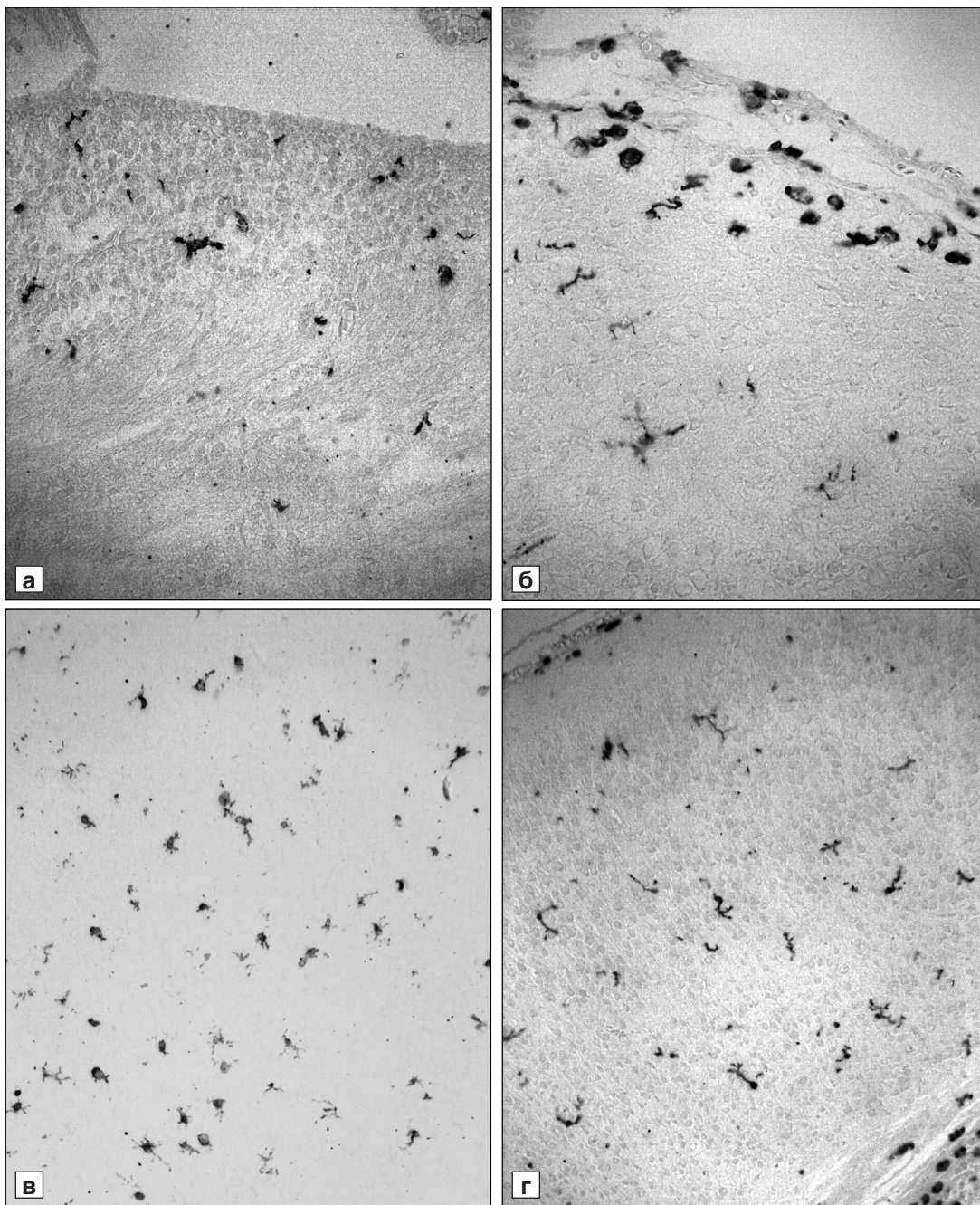
Через 1 ч после воздействия гипоксии в неокортексе (фронтальной, моторной, соматосенсорной и зрительной областях) отмечены единичные погибшие клетки. В гиппокампе, в полях CA1, CA3, CA4, так же как и в неокортексе, обнаруживаются единичные апоптотические тельца. В это же время имеет место увеличение плотности популяции микроглиоцитов амeboидной и переходной форм по сравнению с таковой в контроле в гиппокампе в молекулярном слое и лакунарном подслое ($29,3 \pm 2,8$ и 12 ± 4) и неокортексе ($10,8 \pm 2,4$ и $1,50 \pm 0,21$). При этом микроглиоциты практически исчезают в субвентрикулярной зоне (рисунк, а), сохраняются лишь единичные клетки, в основном веретеновидной формы с двумя ветвящимися отростками.

Через 3 ч после воздействия гипоксии в исследованных областях неокортекса апоптотические тельца встречаются в верхних слоях (II и III), однако, как и в предыдущий срок исследования гибель клеток небольшая (3–4 клетки в поле зрения при об. 20). В гиппокампе в поле CA3 наблюдается увеличение количества погибших клеток (до 11–12 клеток в поле зрения при об. 20), в то время как в полях CA1 и CA4 погибшие клетки остаются единичными.

В вентрикулярной и субвентрикулярной зонах, вокруг крупных сосудов и вдоль проводящих путей плотность популяции микроглиоцитов вновь увеличивается (см. рисунок, б), их большая часть представлена амeboидной формой.

Через 1 сут после воздействия гипоксии в верхних слоях (II и III) исследованных областей неокортекса и в полях CA1 и CA3 гиппокампа имеет место увеличение числа клеток, погибающих путем апоптоза (в 2–3 раза по сравнению с таковым в предыдущий срок исследования). В поле CA3, наряду с апоптотическими тельцами, присутствуют нейроны с признаками отчетливо выраженного гиперхроматоза.

В это же время практически во всех отделах головного мозга отмечено повышение численности микроглиоцитов. В гиппокампе в полях CA1, CA3, в молекулярном слое и лакунарном подслое, а также в слоях неокортекса количество микроглиоцитов значительно превышает таковое в контроле ($19,8 \pm 2,8$ и $2,0 \pm 0,1$; 22 ± 3 и $4,8 \pm 1,8$; 32 ± 3 и 12 ± 4 ; $20,1 \pm 1,2$ и $2,8 \pm 0,3$ соответственно), при



Различные отделы мозга крыс, подвергнутых гипоксии на 2-е сутки постнатального развития.

а, б — субвентрикулярная зона бокового желудочка. а — незначительное количество микроглиоцитов через 1 ч после воздействия гипоксии; б — 3 ч после воздействия гипоксии — большее количество микроглиоцитов, чем в предыдущий срок опыта; в, г — моторная область неокортекса; в — высокая плотность расположения микроглиоцитов на 5-е сутки после воздействия гипоксии; г — тот же срок в контроле; д — слои II и III неокортекса; апоптотически гибнущие клетки (стрелки) на 5-е сутки после воздействия гипоксии. а-г — иммуногистохимическая реакция на белок Iba-1 (маркер микроглиоцитов); д — окраска толуидиновым синим по Нисслю. а, б — об. 40, ок. 10; в, г — об. 20, ок. 10; д — об. 100, ок. 10

этом большинство из них — переходной формы. В вентрикулярной и субвентрикулярной зонах присутствуют как амeboидные, так и ветвящиеся микроглиоциты (веретеновидные с одним или двумя ветвящимися отростками).

Через 5 сут после воздействия гипоксии в исследованных структурах мозга также присутствуют апоптотические тельца, свидетельствующие о продолжающейся гибели клеток, при этом в неокортексе, особенно во II и III слоях, их количество было значительным (см. рисунок, д). Наряду с этим, сохраняется довольно высокая плотность диффузно рассеянных микроглиоцитов во всех изученных областях головного мозга: в полях CA1, CA3, в молекулярном слое и лакунарном подслое, а также в неокортексе по сравнению с контролем ($14,0 \pm 1,8$ и $7,0 \pm 1,3$; $30,4 \pm 2,4$ и $2,2 \pm 0,3$; $45,0 \pm 2,9$ и $18,3 \pm 2,1$; 34 ± 4 и $12,0 \pm 1,8$ соответственно), как правило, преобладает переходная и ветвящаяся их форма (см. рисунок, в, г). Амeboидные микроглиоциты обнаруживаются в субвентрикулярной зоне рядом с крупными сосудами и вдоль проводящих путей. У контрольных животных в этот срок постнатального развития микроглиоцитов значительно меньше. Небольшие скопления амeboидных микроглиоцитов отмечены в субвентрикулярной зоне, рядом с крупными сосудами и вдоль проводящих путей, а немногочисленные ветвящиеся микроглиоциты диффузно рассеяны в гиппокампе в слоях пирамидном, молекулярном и лакунарном подслое и иногда в субвентрикулярной зоне.

Обсуждение полученных данных. В настоящее время установлено, что амeboидные микроглиоциты являются активированной формой, в цитоплазме которых содержится значительное количество гидролитических ферментов. Эти микроглиоциты мобильны, быстро реагируют на разного рода повреждения и инфекцию, а также являются предшественниками ветвящейся формы, которая, в свою очередь, представляет микроглиоциты, находящиеся в состоянии покоя. Процессы трансформации амeboидных микроглиоцитов в ветвящиеся являются обратимыми, включая переходную ее форму [6–8, 11]. Результаты проведенного исследования показали, что реакция микроглии на воздействие острой гипоксии в неокортексе и гиппокампе у новорожденных развивается постепенно и синхронно с увеличением клеточной гибели. Уже через 1 ч после гипоксии отмечена апоптотическая гибель клеток в неокортексе и гиппокампе, которая усиливается к концу 1-х суток после воздействия гипоксии. Одновременно в этих формациях происходит увеличение плотности популяции микроглиоцитов,

в основном амeboидной формы. Вероятно, это происходит в результате их миграции из субвентрикулярной зоны и областей, прилежащих к крупным сосудам, откуда они (через 1 ч) практически исчезают, и там остаются единичные ветвящиеся микроглиоциты. Однако довольно быстро (через 3 ч) популяция амeboидных микроглиоцитов восстанавливается. Через 1 сут после воздействия гипоксии с увеличением клеточной гибели активность микроглии повышается, о чем может свидетельствовать увеличение плотности активной амeboидной формы микроглиоцитов практически во всех отделах головного мозга. Повышенная численность популяции микроглиоцитов (всех форм) сохраняется и через 5 сут после воздействия гипоксии, так как в это время имеет место отсроченная клеточная гибель, особенно в неокортексе. Здесь микроглия представлена преимущественно переходной и ветвящейся формами микроглиоцитов.

Несмотря на то, что продолжают накапливаться данные о роли и функциях микроглиоцитов, механизм, с помощью которого они появляются в ЦНС, до сих пор до конца не ясен. Существует предположение, что микроглиоциты могут проникать в мозг через стенки кровеносных сосудов в герминативном слое, мигрируя из него в вентрикулярную, субвентрикулярную зоны, в гиппокамп, мозолистое тело и затем в неокортекс, передвигаясь по трактам белого вещества, вдоль радиальных глиоцитов и сосудистой сети [2]. Наши данные подтверждают это предположение, так как пополнение популяции микроглиоцитов регистрируется именно в этих зонах. Показано, что в пренатальный период у плодов человека и грызунов микроглия в активированной форме первоначально выявляется в герминативном слое, затем вентрикулярной и субвентрикулярной зонах [11, 13]. Учитывая перечисленные выше факты, можно предположить, что как в пре-, так и в постнатальный период развития существует один механизм появления микроглии в ЦНС.

Работа поддержана грантами РФФИ № 10-04-00234, № 12-04-00658.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коржевский Д. Э., Григорьев И. П. и Отеллин В. А. Применение обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейростологических исследованиях. Морфология, 2006, т. 129, вып. 1, с. 85–87.
2. Billiards S. S., Haynes R. L., Folkerth R. D. et al. Development of microglia in the cerebral white matter of the human fetus and infant. J. Comp. Neurol., 2006, v. 497, p. 199–208.
3. Colton C. A. and Gilbert D. L. Microglia, an in vivo source of reactive oxygen species in the brain. Adv. Neurol., 1993, v. 59, p. 321–326.

4. Eliceiri B. P. and Cherech D. A. The role of alpha integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J. Clin. Invest.*, 1999, v. 103, p. 1227–1230.
5. Graeber M. B., Blakemore W. F. and Kreutzberg G. W. Cellular pathology of the central nervous system. In: *Green fields Neuropathology*, 7th ed. London, Arnold., 2002, p. 158–167.
6. Lawson L. J., Perry V. H., Dri P. and Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 1990, v. 39, p. 151–170.
7. Link E. A. Some aspects of amoeboid microglia in the corpus callosum and neighbouring regions of neonatal rats. *J. Anat.*, 1976, v. 121, p. 29–45.
8. Link E. A. and Wong W. C. The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia*, 1993, v. 7, p. 9–18.
9. Milner R. and Campbell I. L. Cytokines regulate microglial adhesion to laminin and astrocyte extracellular matrix via protein kinase C-dependent activation of the alpha6beta-1 integrin. *J. Neurosci.*, 2002, v. 22, p. 1562–1572.
10. Milner R. and Campbell I. L. Developmental regulation of beta-1 integrins during angiogenesis in the central nervous system. *Mol. Cell Neurosci.*, 2002, v. 20, p. 616–626.
11. Rezaie P. and Male D. Differentiation, ramification and distribution of microglia within the central nervous system examined. *Neuroembryology*, 2002, v. 1, p. 29–43.
12. Takahashi J. L., Giuliani F., Power C. et al. Interleukin 1beta promotes oligodendrocyte death through glutamate excitotoxicity. *Ann. Neurol.*, 2003, v. 53, p. 588–595.
13. Wang C. C., Wu C. H., Shieh J. Y. et al. Immunohistochemical study of amoeboid microglial cells in fetal rat brain. *J. Anat.*, 1996, v. 189, p. 567–574.

Поступила в редакцию 15.05.2012
Получена после доработки 27.08.2012

REACTIVE MICROGLIAL CHANGES IN RAT NEOCORTEX AND HIPPOCAMPUS AFTER EXPOSURE TO ACUTE PERINATAL HYPOXIA

L. I. Khozhai and V. A. Otellin

The dynamics of reactive changes of a population density of microglial cells and the reversibility of their phenotypic forms were studied in the brain of neonatal rats at different time intervals after 1 hr-long exposure to acute normobaric hypoxia in the pressure chamber at the second postnatal day. Different areas of the neocortex (frontal, motor, somatosensory and visual) and of the hippocampus (CA1, CA3, CA4 and fascia dentata) were examined 1 hr, 3 hrs, 1 and 5 days after exposure to hypoxia. Microglial cells were demonstrated using an immunocytochemical staining with the monoclonal antibodies against Iba-1 antigen. The results have shown that the reaction of microglia to acute hypoxia in both the neocortex and the hippocampus of the newborns developed simultaneously and synchronously with the augmentation of cell death. The increase of a population density of amoeboid form of microglial cells in the brain areas studied was recorded already after 1 hour as a result of their migration from the subventricular region and the areas adjacent to large vessels from where they practically disappeared. The number of amoeboid microglial cells in this area has recovered rather quickly (in 3 hrs). The population density of microglial cells, especially of amoeboid forms, sharply increased with the augmentation of cell death and remained unchanged for about 5 days.

Key words: *neocortex, hippocampus, microglia, acute perinatal hypoxia*

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