

Д.Э. Коржевский, О.В. Кирик

МИКРОГЛИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА И МИКРОГЛИАЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ

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 СЗО РАМН, Санкт-Петербург

В последние годы наблюдается неуклонное возрастание интереса к различным аспектам организации и функционирования микроглии. Однако информация о современных иммуноцитохимических методах ее выявления неоднозначна и нуждается в систематизации. В настоящей статье основное внимание сосредоточено на микроглиальных маркерах — белках (Iba-1, CD11b, CD68, HLA-DR и др.), экспрессируемых микроглиями в норме и при активации, вызванной воздействием повреждающих факторов. Характеристика маркеров и методов иммуноцитохимического маркирования микроглии сочетается с анализом сведений о происхождении и структурной организации микроглия.

Ключевые слова: микроглия, головной мозг, иммуноцитохимия, Iba-1, CD11b, CD68, OX-42

Микроглияocytes являются резидентными макрофагами нервной системы и имеют мезенхимное происхождение [21, 36] в отличие от других клеточных элементов нервной ткани, образующихся из нейроэктодермы. В последние несколько лет наблюдается неуклонное возрастание интереса к различным аспектам организации и функционирования микроглии ЦНС. Традиционно микроглию принято рассматривать как ключевой элемент воспалительного процесса, развивающегося в нервной ткани в ответ на многообразные повреждающие воздействия [34, 46]. Однако недавние исследования показали, что функции микроглии охватывают более широкий круг процессов, значительная часть из которых напрямую не связаны с развитием реакции на повреждение и инициацией воспаления. Так, установлено, что микроглия в интактном головном мозгу осуществляет постоянный мониторинг состояния синаптических структур нейропиля и является одним из главных регуляторов синаптической пластичности [68, 70]. Предполагается, что микроглия способна к направленному изменению иммунотипа при регуляции функций различных структур головного мозга, а также в процессе развития возрастной и психической патологии [59, 66]. Механизмы этих регуляторных влияний остаются во многом неясными, что обусловлено, отчасти, техническими сложностями, возникающими при визуализации микроглии *in situ*.

В связи с этим возникает потребность в обобщении накопленных многообразных сведений о микроглии и современных методах изучения ее структурной организации. В настоящей статье основное внимание уделено микроглиальным маркерам, а также современным иммуноцитохимическим подходам, используемым для выявления микроглиями и анализа их структурной организации. Характеристика микроглиальных маркеров предварена информацией о происхождении микроглии и терминологии, применяемой при описании различных ее форм (фенотипов).

Происхождение микроглии

Вопрос о происхождении микроглии долгое время оставался дискуссионным [2, 46]. Большинство исследователей всегда склонялись к мезенхимному происхождению микроглиями, но убедительные доказательства этому первоначально отсутствовали. В конце XX в. и в последующие годы были проведены сложные эксперименты с использованием трансгенных и химерных животных, в которых было показано, что непосредственными предшественниками микроглиями являются макрофаги, образующиеся у млекопитающих на ранних стадиях внутриутробного развития в стенке желточного мешка в процессе эмбрионального кроветворения [33]. При установлении кровотока эмбриональные макрофаги попадают в сосуды примитивной мозговой оболочки

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, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины, 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12

(*meninx primitiva*) [17] и мигрируют в закладки структур нервной системы еще до формирования внутриорганного (внутри мозгового) сосудистого русла [8, 36]. Было отмечено, что при заселении микроглией конечного мозга эмбриона человека макрофаги концентрируются в области закладки сосудистого сплетения [8], что может иметь непосредственное отношение к трансэпителиальной миграции этих клеток в ликвороносные пространства, наблюдаемой в сосудистом сплетении и у взрослых животных в эксперименте [48].

В постэмбриональный период онтогенеза пополнение популяции микроглиоцитов осуществляется в основном за счет пролиферации уже имеющихся клеток микроглии и их внутриорганных предшественников [36, 47]. Миграции моноцитов в нервную ткань и дифференцировки их в микроглиоциты в обычных условиях не происходит. При этом сохраняется возможность заселения мозга, искусственно лишённого микроглии, новыми клетками костномозгового происхождения [22]. При патологических процессах, сопровождающихся повреждением гематоэнцефалического барьера, дифференцировка новых микроглиоцитов из моноцитов более вероятна [32], но увеличение микроглиальной популяции за счет деления резидентных клеток также возможно [9].

Современные данные о происхождении микроглиоцитов свидетельствуют о близком родстве этих клеток с другими тканевыми макрофагами и иными клетками моноцитарного ряда. Это родство подтверждается и общими закономерностями в экспрессии многих маркеров, присущих как микроглиоцитам, так и другим тканевым макрофагам. Однако для типичных микроглиоцитов (условно называемых покоящимися) характерна несвойственная большинству макрофагов сложность структурной организации. Следует заметить, что в интактном головном мозгу, помимо клеток микроглии, имеются и типичные макрофаги, однако эти клетки расположены вне нервной ткани, макрофаги присутствуют в соединительной ткани сосудистого сплетения и мозговых оболочек, а также являются частью супраэпендимных клеток и клеточных элементов жидкости, заполняющей ликвороносные пространства [7, 48].

Классификация микроглиоцитов (формы микроглии)

Микроглиоциты ЦНС представляют собой неоднородную популяцию. Различия между ними были отмечены еще при использовании классических импрегнационных методов их выявления. Первоначально были описаны несколько форм,

которые различали по числу и особенностям строения отростков. Это — униполярная, биполярная, мультиполярная и ламинарная формы, а также «гистиоцитарные перициты» [3]. Однако эта терминология не вполне отражает функциональное состояние клетки и неудачна в связи со сходством с морфологической классификацией нейронов.

В настоящее время для обозначения основного типа микроглиоцитов, встречающихся в зрелом головном мозгу у млекопитающих и человека, используют термин «рамнифицированные» (или ветвящиеся [20]) — это мелкие, как правило, многоотростчатые клетки, имеющие очень малый объем перинуклеарной цитоплазмы (*рис. 1*).

Первичные отростки этих клеток имеют многочисленные разветвления и различное направление, причем изменение направления отростков происходит с формированием углов, а не плавных изгибов (как, например, у астроцитов [10]). Такие клетки характерны для серого вещества интактного головного мозга. Микроглиоциты белого вещества имеют меньше и не столь ветвистых отростков. Находясь между плотно расположенными миелиновыми волокнами, микроглиоциты нередко приобретают уплощенную или веретеновидную форму [6]. Их отростки — менее ветвящиеся (*рис. 2*), чем у типичных рамнифицированных микроглиоцитов серого вещества. Особой формой микроглиоцитов являются субэпендимные клетки, контактирующие своими межэпендимными отростками с цереброспинальной жидкостью [5]. При воздействии повреждающих факторов наблюдается увеличение популяции этих клеток [4].

Реакция нервной ткани на повреждение сопровождается трансформацией фенотипа микроглиоцитов и появлением нескольких новых типичных и переходных форм. К ним относят палочковидные (веретеновидные) и многоядерные, амебодные, гигантские и эпителиоидные микроглиоциты [12, 24]. Для активированной микроглии характерны 3 иммунофенотипа, различающиеся по набору маркеров и, соответственно, роли в воспалительных и регенераторных реакциях [69]. Это — M1 (провоспалительный фенотип), M2a (противовоспалительный фенотип) и M2c (фенотип, характерный для стадии разрешения воспаления и ремоделирования ткани). Изменения в структурной организации микроглии отмечены у человека при старении [11], однако остается неясным, всегда ли они связаны с локальным нейродегенеративным процессом.

К сожалению, в настоящее время у исследователей отсутствует единство во взглядах на терминологию, которую следует применять

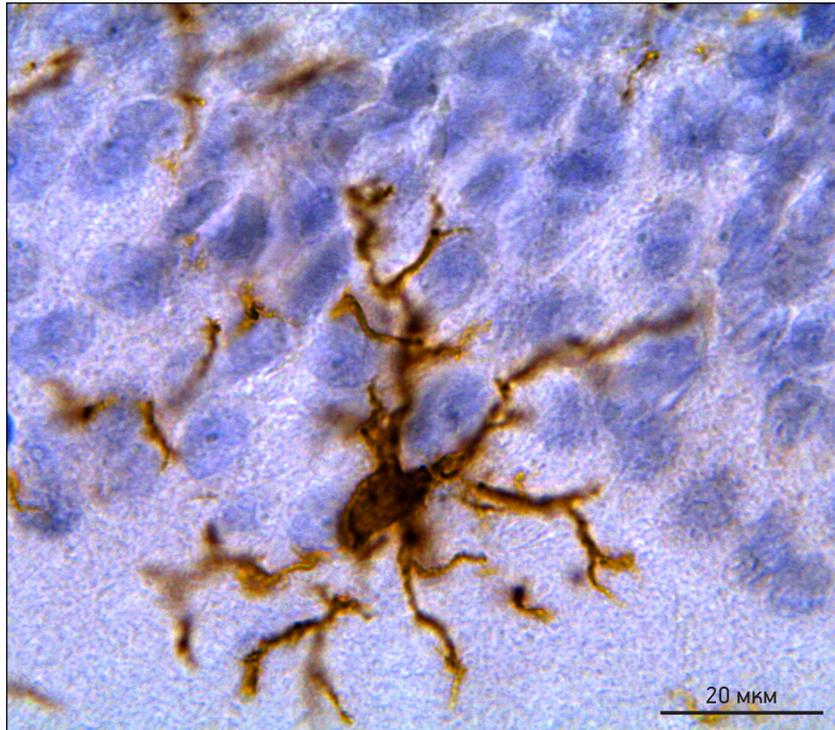


Рис. 1. Микроглиоцит гиппокампа головного мозга крысы.

Иммуноцитохимическая реакция на белок Iba-1. Визуализация при помощи диаминобензидина с докраской гематоксилином

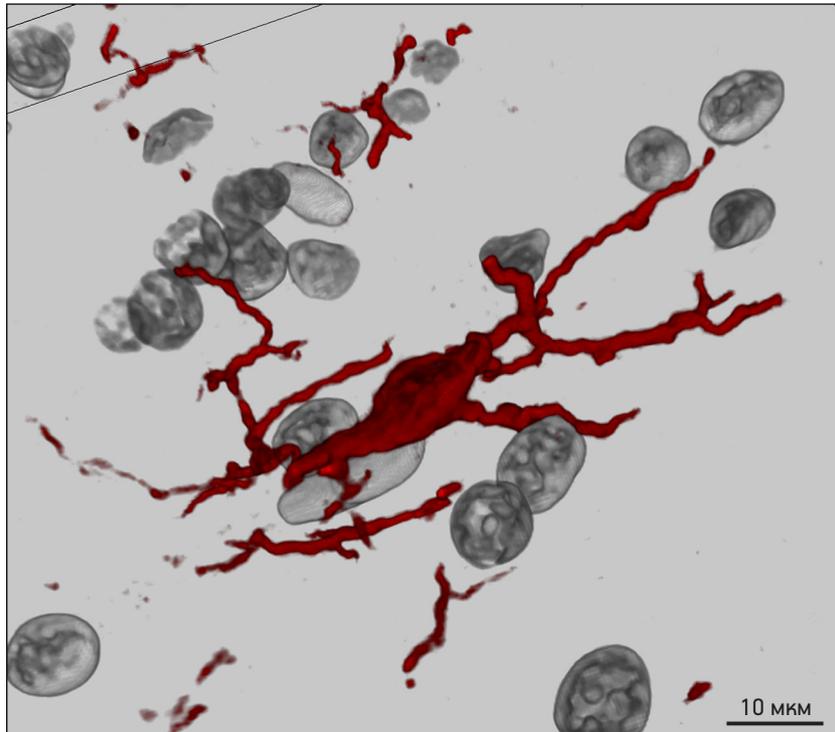


Рис. 2. Трехмерная реконструкция микроглиоцита субкортикального белого вещества головного мозга крысы.

Иммуноцитохимическая реакция на белок Iba-1. Флуоресцентная визуализация иммуноцитохимической реакции с помощью флуорохрома Cy3 (красный цвет, здесь — темно-серый), ядра окрашены красителем SYTOX Green (здесь — серый цвет). Конфокальная лазерная микроскопия. Объектив C-Apochromat 63x/1.20 W Corr M27 (водная иммерсия). Величина Z-серии — 13,20 мкм, количество оптических срезов — 67. Реконструкция осуществлена в программном модуле ZEN 2011 (Zeiss, Германия)

для обозначения различных форм активированных микроглиоцитов. Более четкое разграничение морфологических и функциональных форм микроглиоцитов может быть достигнуто при унификации и комбинировании различных методов иммуноцитохимического маркирования, а также более глубокого понимания роли микроглии в регуляции адаптивных и патологических реакций, происходящих в ЦНС.

Микроглиальные маркеры

Несмотря на то, что со времени открытия микроглии прошло около 100 лет, микроглиоциты до последнего десятилетия XX в. оставались наименее изученными клетками нервной ткани. Недостаточная широта исследований микроглии была обусловлена рядом факторов, немаловажным из которых было отсутствие надежных и селективных методов выявления этой клеточной популяции. Основным способом выявления микроглиоцитов до конца 70-х годов XX в. оставалась импрегнация нитратом серебра в различных ее вариантах. Импрегнационные методы (Рио-Ортега, Пенфильда, Белецкого, Миягавы—Александровской), прописи которых подробно изложены в руководстве В.К.Белецкого [1], относятся к группе классических нейрогистологических методик. Однако все импрегнационные методы имеют общие недостатки, которые заключаются в значительной продолжительности протокола и трудоемкости, нестабильности используемых растворов, невысокой специфичности реакций, а также плохой их воспроизводимости. С развитием иммуноцитохимии появилась возможность использовать антитела, выработанные против различных белков, синтезируемых клетками микроглии, которые получили название микроглиальных маркеров. Методы иммуноцитохимии оказались удобнее классических импрегнационных методик, но требуют адаптации к различному биологическому материалу и разным способам фиксации. Один из существенных недостатков иммуноцитохимических методик состоит в иногда трудно прогнозируемой видовой специфичности выявляемых антигенов. Поэтому до недавнего времени отсутствовал единый иммуноцитохимический подход, позволяющий с высокой четкостью и селективностью визуализировать тела и отростки микроглиоцитов у лабораторных животных и человека с использованием одного и того же высокоспецифичного маркера. Возможность для разработки универсального протокола иммуноцитохимического выявления микроглиоцитов появилась с открытием японскими исследовате-

лями в 1996 г. белка Iba-1 [39] и определением его микроглиальной специфичности [41].

Белок Iba-1 и его применение в качестве маркера микроглиоцитов

Белок Iba-1 (Ionized calcium Binding Adaptor molecule 1) относится к группе кальций-связывающих белков. Он имеет молекулярную массу 17 килодальтон и состоит из 147 аминокислот, образующих компактный домен, содержащий 2 кальций-связывающих участка, богатых гидрофобными аминокислотами [72]. Считается, что белок Iba-1 аналогичен охарактеризованным другими исследователями белкам — AIF-1 (allograft inflammatory factor-1), MRF-1 (microglia response factor) и даинтаину [26, 45]. Однако в отношении идентичности этих белков с Iba-1 имеются сомнения [6].

О функциях Iba-1 известно немного. Установлено, что этот белок участвует в реорганизации цитоскелета и изменении конфигурации плазмолеммы — процессах, происходящих при фагоцитозе [54, 55]. Взаимодействие с элементами цитоскелета обусловлено наличием у Iba-1 способности связываться с молекулами актина [58], образующими соответствующие микрофиламенты.

Достоинством нового маркера является широкая межвидовая стабильность его антигенных эпитопов, что объясняется значительным консерватизмом аминокислотной последовательности Iba-1 у животных и человека. Так, при сравнении аминокислотных последовательностей белков Iba-1 у мыши и человека обнаруживается их 89% идентичность [72]. Аминокислотные последовательности С- и N-концевых фрагментов Iba-1 обладают уникальностью и не встречаются в других белках [40].

С установлением аминокислотной последовательности белка Iba-1 появилась возможность создавать антитела к этому белку, используя для иммунизации животных синтетические полипептиды, соответствующие различным участкам молекулы Iba-1. Имеющиеся сейчас в распоряжении исследователей антитела (например, кроличьи поликлональные антитела 019–19741, Wako Chemicals и козы поликлональные антитела ab5076, Abcam) позволяют успешно выявлять микроглиоциты в ЦНС у различных млекопитающих и человека [18, 20, 24, 63].

Белок Iba-1 довольно равномерно распределен в цитоплазме и отростках рамнифицированных (ветвящихся) микроглиоцитов. Изучение влияния фиксации на сохранность антигенной структуры Iba-1 показало, что его антигенные детерминанты хорошо сохраняются как при использовании

специальных иммуноцитохимических фиксаторов [14], так и в случае применения обычного 10% формалина [18]. В последнем случае обязательным является использование теплового демаскирования антигена, которое при менее «жесткой» фиксации можно исключить путем увеличения продолжительности инкубации срезов в первичных антителах при повышенной температуре либо при использовании высокочувствительных систем детекции [19]. Очевидным достоинством Iba-1, как селективного микроглиального маркера, является возможность проводить с его использованием трехмерные реконструкции клеток [6] и изучать сложную организацию отростков микроглиоцитов [5].

Белок моноцитов и макрофагов CD68

CD68 — трансмембранный белок, имеющий молекулярную массу 110 килодальтон, обнаруживаемый в моноцитах и тканевых макрофагах (в том числе и микроглиоцитах) у человека [30, 37, 60, 62]. У мышей гомологом CD68 является макросиалин [53]. Оба белка характеризуются высоким уровнем гликозилирования и принадлежат к семейству мембранных лизосомальных белков (LAMP — lysosome-associated membrane proteins) [64]. Первоначально CD68 был определен как белок, связываемый одним из видов антител, которые были выработаны против различных эпитопов макрофагальных антигенов, но функция его не была ясна. В настоящее время считается, что CD68 участвует во взаимодействии макрофагов с липопотеидами низкой плотности и выступает в качестве негативного модулятора иммунных реакций [64]. Против белка CD68 получено несколько клонов широко используемых антител — это KP1, EMB11, Ki-M6, Y1/82A, Y2/131 и PG-M1 [8, 13, 29, 31]. Наиболее высокой селективностью среди них по отношению к тканевым макрофагам (и микроглиоцитам) обладает клон PG-M1 [15, 31], однако узнаваемый этим клоном эпитоп антигена видоспецифичен, что не дает возможности использовать его при изучении микроглии у лабораторных животных. У крысы белок, аналогичный CD68, выявляют при помощи антител клона ED1 [25].

Существенным недостатком белка CD68, как микроглиального маркера, является «пунктирный» характер распределения иммунопозитивного материала в отростках активированных и покоящихся микроглиоцитов, тогда как амебоидные микроглиоциты выявляются достаточно четко. Такие особенности иммуногистохимической реакции не дают возможности изучать структуру отростков и проводить реконструкцию клеток

сложной формы. По-видимому, это связано с лизосомальной локализацией данного белка. Тем не менее, CD68 и антиген ED1 нередко применяются в нейрогистологических исследованиях как дополнительные маркеры активированной микроглии.

Белок CD11b

Белок CD11b — это часть рецептора комплемента третьего типа (CR3), который нередко обозначают как CD11b/CD18, MO1 или Mac-1 [49, 56], хотя это один и тот же белковый комплекс. CR3 относится к интегринам, а молекула CD11b — альфа-субъединица этого интегрина, которая связана с бета-субъединицей — CD18 [57, 67]. Рецептор комплемента, частью которого является CD11b, локализован на плазмолемме нейтрофильных гранулоцитов, большинства мононуклеарных фагоцитов и NK-клеток [23, 44, 67]. Хотя CD11b не является высокоспецифическим микроглиальным маркером, иммуноцитохимическая реакция на этот белок часто используется в качестве основного или дополнительного метода выявления активированной микроглии. У крысы для выявления CD11b в микроглиоцитах чаще всего применяют моноклональные антитела OX-42 [16, 42, 50, 52]. Несмотря на то, что OX-42 — это название клона, который реагирует с эпитопом белка CD11b, нередко название «OX-42» присваивают и самому маркеру, что создает некоторые неудобства для понимания функциональной роли исследуемых микроглиальных белков. Существенным недостатком антител OX-42 является неустойчивость выявляемого эпитопа при заливке объектов в парафин, поэтому для маркирования микроглиоцитов с использованием CD11b (OX-42) необходимо использовать вибротомные [50] либо криостатные [16] срезы.

Другие маркеры микроглии

Среди других микроглиальных маркеров, в первую очередь, следует отметить белки главного комплекса гистосовместимости II класса (MHC II). Микроглиоциты, как и другие тканевые макрофаги, экспрессируют эти белки, причем уровень экспрессии увеличивается при провоспалительной активации клеток и нейродегенерации [71]. При исследовании мозга человека активированную микроглию можно выявить с использованием антител к антигену HLA-DR [65], который относится к подгруппе MHC II. У крысы аналогичный антиген называется RT1B и выявляется (чаще всего) при помощи мышиных антител клона OX-6. В связи с этим в зарубежной литературе иногда можно встретить указание на использо-

вание микроглиального маркера ОХ-6 без разъяснения, какой белок при иммуноцитохимической реакции выявляется.

В отдельных исследованиях микроглии [38, 51, 61], наряду с другими маркерами, используют антиген ED2, названный так в соответствии с обозначением клона антител, которые применяются для его выявления [27, 28]. Из других белков, экспрессируемых микроглиоцитами, полезную информацию об их функциональном статусе могут дать ферритин, CD115, CD200, индуцибельная NO-синтаза, F4/80 и Сх3Cr1 [35, 43, 71, 73].

Заключение

Таким образом, в настоящее время для выявления микроглии и анализа функционального состояния микроглиоцитов могут применяться разнообразные иммуногистохимические подходы. Однако степень полноты выявляемой популяции микроглиоцитов и качество результатов при использовании различных иммуногистохимических маркеров неодинаковы. Часть маркеров (такие как HLA-DR, ED2, CD68) не вполне подходят для анализа структурной организации микроглиоцитов интактного головного мозга, другие — такие как CD200, ферритин и NO-синтаза недостаточно специфичны. Кроме того, подавляющее большинство антител, доступных исследователям в настоящее время, выявляют только видоспецифические эпитопы микроглиальных маркеров, что ограничивает возможности проведения сравнительных межвидовых исследований.

Многообразие и функциональная неоднородность микроглиальных маркеров порождают резонные вопросы об их адекватности, специфичности и пригодности для проведения морфологического исследования. Представленный анализ литературных источников и собственный опыт авторов позволяют заключить, что из всего множества известных на сегодня маркеров только 2 наилучшим образом подходят для проведения структурного анализа микроглиоцитов как в нормальной, так и в патологически измененной нервной ткани — это Iba-1 и CD11b (ОХ-42).

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 14-04-00049а).

ЛИТЕРАТУРА

- Белецкий В.К. Методика микроскопического исследования нервной системы. М.: Крестьянская газета, 1939.
- Белецкий В.К. Невроглия, норма и патология // Многоотное руководство по патологической анатомии. М.: Гос. изд-во мед. лит-ры, 1963. Т. II. С. 55–82.
- Ермохин П.Н. Гистопатология центральной нервной системы: атлас микрофотографий. М.: Медицина, 1969.
- Кирик О.В., Алексеева О.С., Москвин А.Н., Коржевский Д.Э. Влияние гипербарической оксигенации на состояние субэпендимной микроглии головного мозга крысы // Журн. эволюц. биохим. 2014. Т. 50, № 4. С. 312–314.
- Кирик О.В., Сухорукова Е.Г., Алексеева О.С., Коржевский Д.Э. Субэпендимные микроглиоциты III желудочка головного мозга // Морфология. 2014. Т. 145, вып.3. С. 67–69.
- Кирик О.В., Сухорукова Е.Г., Коржевский Д.Э. Кальций-связывающий белок Iba-1/AIF-1 в клетках головного мозга крысы // Морфология. 2010. Т. 137, вып.2. С. 5–8.
- Коржевский Д.Э. Тканевая организация и развитие сосудистого сплетения головного мозга человека // Морфология. 1998. Т. 113, вып.2. С. 105–114.
- Коржевский Д.Э. Макрофаги сосудистого сплетения конечного мозга эмбриона человека // Морфология. 2001. Т. 119, вып.1. С. 20–23.
- Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Сухорукова Е.Г., Власов Т.Д. Структурная организация микроглиоцитов стриатума после транзиторной фокальной ишемии // Морфология. 2012. Т. 141, вып.2. С. 19–24.
- Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Сухорукова Е.Г. и др. Изучение пространственной организации астроцитов головного мозга при помощи конфокальной лазерной микроскопии // Морфология. 2009. Т. 135, вып.3. С. 76–79.
- Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Сухорукова Е.Г., Сырцова М.А. Микроглия черного вещества головного мозга человека // Мед. академ. журн. 2014. Т. 14, № 4. С. 68–72
- Коржевский Д.Э., Ленцман М.В., Кирик О.В., Отеллин В.А. Морфологические типы активированной микроглии гиппокамп, наблюдаемые после транзиторной общей ишемии головного мозга // Морфология. 2012. Т. 142, вып.5. С. 30–33.
- Коржевский Д.Э., Отеллин В.А., Неокесарийский А.А., Павлова Н.Г. Структурная организация макрофагов формирующейся плаценты человека // Морфология. 2005. Т. 128, вып.6. С. 60–62.
- Коржевский Д.Э., Сухорукова Е.Г., Гилерович Е.Г. и др. Преимущества и недостатки цинк-этанол-формальдегида как фиксатора для иммуноцитохимических исследований и конфокальной лазерной микроскопии // Морфология. 2013. Т. 143, вып.2. С. 81–85.
- Коржевский Д.Э., Сухорукова Е.Г., Кирик О.В. Применение иммуноцитохимических маркеров для выявления активированной микроглии и макрофагов головного мозга // Актуальные вопросы функциональной межполушарной асимметрии и нейропластичности (материалы Всероссийской конференции с международным участием). М.: Научный мир, 2008. С. 588–590.
- Манжуло И.В. Нейроглиальные взаимодействия в механизмах развития боли и лекарственного обезболивания у крыс: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток, 2013.
- Отеллин В.А., Коржевский Д.Э. Формирование и структурная организация барьера на наружной поверхности головного мозга // Морфология. 2002. Т. 122, вып.6. С. 14–18.
- Сухорукова Е.Г., Захряпин М.С., Аничков Н.Н., Коржевский Д.Э. Выявление микроглии в препаратах головного мозга, длительное время хранившихся в растворе формалина // Морфология. 2012. Т. 142, вып.5. С. 32–35.

19. Сухорукова Е.Г., Кирик О.В., Коржевский Д.Э. Применение иммуногистохимического метода для выявления микроглии головного мозга в парафиновых срезах // Бюл. экспер. биол. 2010. Т. 149, № 6. С. 709–712.
20. Хожай Л.И., Отеллин В.А. Реактивные изменения микроглии в неокортексе и гиппокампе у крыс после воздействия острой перинатальной гипоксии // Морфология. 2013. Т. 143, вып. 1. С. 23–27.
21. Alliot F., Godin I., Pessac B. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain // Brain Res. Dev. Brain Res. 1999. Vol. 117, № 2. P. 145–152.
22. Beers D.R., Henkel J.S., Xiao Q. et al. Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. Vol. 103. P. 16021–16026.
23. Benimetskaya L., Loike J.D., Khaled Z. et al. Mac-1 (CD11b/CD18) is an oligodeoxynucleotide-binding protein // Nat. Med. 1997. Vol. 3, № 4. P. 414–420.
24. Boche D., Perry V.H., Nicoll J.A. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain // Neuropathol. Appl. Neurobiol. 2013. Vol. 39. P. 3–18.
25. Damoiseaux J.G., Dopp E.A., Calame W. et al. Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1 // Immunology. 1994. Vol. 83. P. 140–147.
26. Deininger M.H., Meyermann R., Schluesener H.J. The allograft inflammatory factor-1 family of proteins // FEBS Lett. 2002. Vol. 514. P. 115–121.
27. Dijkstra C.D., Dopp E.A., Joling P., Kraal G. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3 // Immunology. 1985. Vol. 54. P. 589–599.
28. Dijkstra C.D., Dopp E.A., Van der Berg T.K., Damoiseaux J.G. Monoclonal antibodies against rat macrophages // J. Immunol. Methods. 1994. Vol. 174. P. 21–23.
29. Elnér S.G., Elnér V.M., Nielsen J.C. et al. CD68 antigen expression by human retinal pigment epithelial cells // Exp. Eye Res. 1992. Vol. 55, № 1. P. 21–28.
30. Fadini G.P., Cappellari R., Mazzucato M. et al. Monocyte-macrophage polarization balance in pre-diabetic individuals // Acta Diabetol. 2013. Vol. 50, № 6. P. 977–982.
31. Falini B., Flenghi L., Pileri S. et al. PG-M1: a new monoclonal antibody directed against a fixative-resistant epitope on the macrophage-restricted form of the CD68 molecule // Am. J. Pathol. 1993. Vol. 142, № 5. P. 1359–1372.
32. Flugel A., Bradi M., Kreutzberg G.W., Graeber M.B. Transformation of donor-derived bone marrow precursors into host microglia during autoimmune CNS inflammation and during the retrograde response to axotomy // J. Neurosci. Res. 2001. Vol. 66, № 1. P. 74–82.
33. Ginhoux F., Greter M., Leboeuf M. et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages // Science. 2010. Vol. 330. P. 841–845.
34. Graeber M.B., Streit W.J. Microglia: biology and pathology // Acta Neuropathol. 2010. Vol. 119. P. 89–105.
35. Greter M., Merad M. Regulation of microglia development and homeostasis // Glia. 2013. Vol. 61. P. 121–127.
36. Harry G.J., Kraft A.D. Microglia in the developing brain: a potential target with lifetime effects // Neurotoxicology. 2012. Vol. 33. P. 191–206.
37. Holness C.L., Simmons D.L. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins // Blood. 1993. Vol. 81. P. 1607–1613.
38. Horvath R.J., Romero-Sandoval E.A., De Leo J.A. Inhibition of microglial P2X4 receptor attenuates morphine tolerance, Iba1, GFAP and mu opioid receptor protein expression while enhancing perivascular microglial ED2 // Pain. 2010. Vol. 150, № 3. P. 401–413.
39. Imai Y., Iбата I., Ito D. et al. A novel gene Iba1 in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996. Vol. 224. P. 855–862.
40. Imai Y., Kohsaka S. Intracellular signaling in M-CSF-induced microglia activation: role of Iba1 // Glia. 2002. Vol. 40. P. 164–174.
41. Ito D., Imai Y., Ohsawa K. et al. Microglia-specific localization of a novel calcium binding protein, Iba1 // Brain Res. Mol. Brain Res. 1998. Vol. 57. P. 1–9.
42. Kaur C., Ling E.-A. Increased expression of transferrin receptors and iron in amoeboid microglial cells in postnatal rats following an exposure to hypoxia // Neurosci. Lett. 1999. Vol. 262. P. 183–186.
43. Kaur C., Rathnasamy G., Ling E.-A. Roles of activated microglia in hypoxia induced neuroinflammation in the developing brain and the retina // J. Neuroimmune Pharmacol. 2013. Vol. 8. P. 66–78.
44. Kawai K., Tsuno N.H., Matsushashi M. et al. CD11b-mediated migratory property of peripheral blood B cell // J. Allergy Clin. Immunol. 2005. Vol. 116, № 1. P. 192–197.
45. Kohler C. Allograft inflammatory factor-1/Ionized calcium-binding adapter molecule 1 is specifically expressed by most subpopulations of macrophages and spermatids in testis // Cell Tissue Res. 2007. Vol. 33. P. 291–302.
46. Kreutzberg G.W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS // Trends Neurosci. 1996. Vol. 19, № 8. P. 312–318.
47. 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. Vol. 48, № 2. P. 196–206.
48. Ling E.-A., Kaur C., Lu J. Origin, nature and some functional considerations of intraventricular macrophages, with special reference to the epileptus cells // Microsc. Res. Tech. 1998. Vol. 41, № 1. P. 235–242.
49. MacPherson M., Lek H.S., Prescott A., Fagerholm S.C. A systemic lupus erythematosus-associated R77H substitution in the CD11b chain of the Mac-1 integrin compromises leukocyte adhesion and phagocytosis // J. Biol. Chem. 2011. Vol. 286. P. 17303–17310.
50. Marshall S.A., McClain J.A., Kelso M.L. et al. Microglial activation is not equivalent to neuroinflammation in alcohol-induced neurodegeneration: The importance of microglia phenotype // Neurobiol. Dis. 2013. Vol. 54. P. 239–251.
51. McKay S.M., Brooks D.J., Hu P., McLachlan E.M. Distinct types of microglial activation in white and grey matter of rat lumbosacral cord after mid-thoracic spinal transection // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2007. Vol. 66. P. 698–710.
52. Morioka T., Kalehua A.N., Streit W.J. Progressive expression of immunomolecules on microglial cells in rat dorsal hippocampus

- following transient forebrain ischemia // *Acta. Neurophathol.* 1992. Vol. 83, № 2. P. 149–157.
53. Ng H.P., Chiang S.C., Chi Y., Lee S.T. Identification of macrofialin (CD68) on the surface of host macrophages as the receptor for the intercellular adhesive molecule (ICAM-L) of *Leishmania amazonensis* // *Int. J. Parasitol.* 2009. Vol. 39. P. 1539–1550.
54. Ohsawa K., Imai Y., Kanazawa H. et al. Involment of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia // *J. Cell Sci.* 2000. Vol. 133. P. 3073–3084.
55. Ohsawa K., Imai Y., Sasaki Y., Kohsaka S. Microglia/macrophages-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity // *J. Neurochem.* 2004. Vol. 88. P. 844–856.
56. Ross G.D. Role of the lectin domain of Mac-1/CR3 (CD11b/CD18) in regulating intercellular adhesion // *Immunol. Res.* 2002. Vol. 25, № 3. P. 219–227.
57. Ross G.D., Vetvicka V. CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions // *Clin. Exp. Immunol.* 1993. Vol. 92. P. 181–184.
58. Sasaki Y., Ohsawa K., Kanazawa H. et al. Iba1 is an actin-cross-linking protein in macrophage/microglia // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001. Vol. 286. P. 292–297.
59. Schuitemaker A., Van der Doef T.F., Boellaard R. et al., Microglia activation in healthy aging // *Neurobiol. Aging.* 2012. Vol. 33. P. 1067–1072.
60. Shikuma C.M., Gangcuangco L.M., Killebrew D.A. et al. The role of HIV and monocytes/macrophages in adipose tissue biology // *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 2014. Vol. 65, № 2. P. 151–159.
61. Shin Y.J., Park J.M., Cho J.M. et al. Induction of vascular endothelial growth factor receptor-3 expression in perivascular cells of the ischemic core following focal cerebral ischemia in rats // *Acta Histochem.* 2013. Vol. 115, № 2. P. 170–177.
62. Smith C., Gentleman S.M., Leclercq P.D. et al. The inflammatory response in humans after traumatic brain injury // *Neurophathol. Appl. Neurobiol.* 2013. Vol. 39. P. 654–666.
63. Sobin C., Montoya M.G., Parisi N. et al. Microglial disruption in young mice with early chronic lead exposure // *Toxicol. Lett.* 2013. Vol. 220. P. 44–52.
64. Song L., Lee C., Schindler C. Deletion of the murine scavenger receptor CD68 // *J. Lipid. Res.* 2011. Vol. 52. P. 1542–1550.
65. Streit W.J., Sammons N.W., Kuhns A.J., Sparks D.L. Dystrophic microglia in the aging human brain // *Glia.* 2004. Vol. 45. P. 208–212.
66. Suzuki K., Sugihara G., Ouchi Y. et al. Microglial activation in young adults with autism spectrum disorder // *JAMA Psychiatry.* 2013. Vol. 70. P. 49–58.
67. Todd R. The continuing saga of complement receptor type 3 (CR3) // *J. Clin. Invest.* 1996. Vol. 98, № 1. P. 1–2.
68. Tremblay M., Stevens B., Sierra A. et al. The role of microglia in the healthy brain // *J. Neurosci.* 2011. Vol. 31. P. 16064–16069.
69. Varnum M.M., Ikezu T. The classification of microglial activation phenotypes on neurodegeneration and regeneration in Alzheimer's disease brain // *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2012. Vol. 60. P. 251–266.
70. 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.
71. Wojtera M., Sobow T., Ktoszewska I. et al. Expression of immunohistochemical markers on microglia in Creutzfeldt-Jakob disease and Alzheimer's disease: morphometric study and review of the literature // *Folia Neuropathol.* 2012. Vol. 50, № 1. P. 74–84.
72. Yamada M., Ohsawa K., Imai Y. et al. X-ray structure of the microglia/macrophage-specific protein Iba1 from human and mouse demonstrate novel molecular conformation change induced by calcium binding // *J. Mol. Biol.* 2006. Vol. 364. P. 449–457.
73. Yi M.-H., Zhang E., Kang J.W. et al. Expression of CD200 in alternative activation of microglia following an excitotoxic lesion in the mouse hippocampus // *Brain Res.* 2012. Vol. 1481. P. 90–96.

Поступила в редакцию 14.04.2014

Получена после доработки 17.02.2015

CEREBRAL MICROGLIA AND MICROGLIAL MARKERS

D.E.Korzhevskiy, O.V.Kirik

In recent years, there has been a steady increase of interest in various aspects of the organization and functioning of microglia. However, the information on modern immunocytochemical methods of its identification is ambiguous and requires systematization. In the present paper, the main attention is focused on microglial markers – the proteins (Iba-1, CD11b, CD68, HLA-DR, and some others) expressed by normal microglia-cytes and those activated by the effects of damaging factors. Characterization of markers and methods of microglia immunocytochemical labeling is combined with an analysis of the data concerning the origin and structural organization of microglia-cytes.

Key words: *microglia, brain, immunocytochemistry, Iba-1, CD11b, CD68, OX-42*

Laboratory of the Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, RAS North-Western Branch Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg