

Иммуноцитохимические и морфометрические изменения астроглии в перифокальной зоне моделируемого инфаркта мозга

Д.Н. Воронков, О.В. Сальникова, Р.М. Худоерков

ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия

Введение. Перифокальная зона (ПЗ) инфаркта головного мозга содержит гибнущие и реактивно измененные нейроны, судьба которых зависит от характера межклеточных взаимодействий и, в частности, от реакции астроцитов, участвующих как в повреждении нейронов, так и в нейропротекции. Особенности реакции астроцитов на ишемическое повреждение и значение их активации при глиозе изучены недостаточно.

Цель исследования. Методами иммуноморфологии и компьютерной морфометрии оценить изменения астроглии в перифокальной зоне инфаркта мозга в зависимости от сроков его воспроизведения.

Материалы и методы. Инфаркт моделировали в левом полушарии коры головного мозга крыс ($n=10$) окклюзией средней мозговой артерии. Оценивали распределение и форму астроцитов на 3-й и 21-й дни после операции, исследовали локализацию кислого глиофибрилярного белка (GFAP), аквапорина-4 (AQP4) и глутаминсинтетазы (GlnS) в перифокальной зоне.

Результаты. Параметры формы, распределение астроцитов и экспрессия GFAP значимо менялись в зависимости от срока и расстояния до очага повреждения. На 3-й день площадь, занимаемая отростками астроцитов, снижалась на 15% от контроля, а на 21-й день – возрастала на 35%. Экспрессия GlnS и AQP4 на 3-й день вблизи очага инфаркта снижалась, а на 21-й день наблюдали противоположные изменения. Также выявили перераспределение исследованных белков в отростках реактивных астроцитов. Выделили два морфологических типа астроцитов: рубец-формирующие поляризованные астроциты, характеризующиеся перераспределением маркерных белков в отростках, и транзитрно-активированные, отличающиеся умеренными изменениями.

Заключение. Выявлена гетерогенность астроцитов в ПЗ инфаркта и зависимость их структурно-функциональных изменений от расстояния до очага повреждения и сроков после инфаркта. При помощи иммуногистохимического и морфометрического анализа охарактеризованы рубец-формирующие и транзитрно-активированные астроциты, имеющие разное значение для ремоделирования и репарации ишемизированной нервной ткани в перифокальной зоне инфаркта.

Ключевые слова: инфаркт мозга, глиальный рубец, астроциты, морфометрия, кислый глиофибрилярный белок, глутаминсинтетаза, аквапорин-4.

Immunocytochemical and morphometric changes in astroglial cells in the perifocal zone of the cerebral infarction model

Dmitriy N. Voronkov, Olga V. Sal'nikova, Rudolf M. Khudoerkov

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

Introduction. The perifocal zone of cerebral infarction contains dying and reactively altered neurons whose fate depends on the type of intracellular interactions and, in particular, on the response of astrocytes partaking both in neuronal damage and neuroprotection. The features of the response of astrocytes to ischemic injury and the role of their activation in gliosis have been studied insufficiently.

Objective. To evaluate the changes in astroglia in the perifocal zone of cerebral infarction depending on its reproduction time by immunomorphology and computer-assisted morphometry.

Materials and methods. Infarction was induced in the left hemisphere of rat brain cortex ($n=10$) by middle cerebral artery occlusion. Astrocyte distribution and shape were assessed on day 3 and 21 after surgery; localization of gliofibrillar acidic protein (GFAP), aquaporin 4 (AQP4), and glutamine synthetase (GlnS) in the perifocal zone was measured.

Results. Astrocyte shape and distribution, as well as GFAP expression, significantly altered depending on time that has passed since the infarction and distance to the injury focus. On day 3, the area occupied by astrocyte processes decreased by 15% of the control value, while increasing by 35% on day 21. Expression of GlnS and AQP4 near the infarction focus decreased on day 3, while opposite changes were observed on day 21. Redistribution of the studied proteins in processes of reactive astrocytes was also detected. Two morphological types of astrocytes were differentiated: the scarring polarized astrocytes, which were characterized by redistribution of marker proteins in processes, and the moderately altered transiently activated ones.

Conclusions. Astrocytes were found to be heterogeneous in the perifocal zone of cerebral infarction; a dependence between changes in their structure and function and the distance to the injury focus and time that passed after the infarction was revealed. The scarring and transiently activated astrocytes, which play different roles in remodeling and repair of ischemic neural tissue in the perifocal zone of cerebral infarction, were characterized by immunohistochemical and morphometric analysis.

Keywords: cerebral infarction, glial scar, astrocytes, morphometry, gliofibrillar acidic protein, glutamine synthetase, aquaporin-4.

Введение

При остром нарушении кровоснабжения мозга в силу высокого уровня метаболизма нервной ткани возникающая гипоксия ведет к быстрому изменению микросреды и активации «ишемического каскада» реакций [1]. Перифокальная зона (ПЗ) инфаркта, возникающая вокруг первичного очага некроза, отличается снижением энергетического метаболизма и содержит поврежденные, гибнущие и реактивно измененные клетки, дальнейшая судьба которых определяется возможностью реперфузии и характером межклеточных взаимодействий [1, 2]. Глиальные клетки при повреждении нервной ткани мозга могут выполнять как нейтропротекторную функцию, так и служить источником медиаторов воспаления, тормозить процессы регенерации и участвовать в отсроченной гибели нейронов [2–4].

Ведущую роль в репарации и ремоделировании нервной ткани после ишемии играют астроциты, выделяя трофические факторы, обеспечивая энергетическую поддержку нейронов, регуляцию ионного и водного обмена, перестройку внеклеточного матрикса, а также участвуя в синаптогенезе [2, 4]. Эти взаимодействия обеспечиваются на структурном уровне многочисленными связями астроцитов друг с другом, с другими типами клеток и с сосудами, что позволяет говорить о существовании астроцитарной сети [4–6]. Показано, что в интактном мозге большинство клеток астроглии своими отростками «контролируют» определенный участок ткани – домен, не перекрывающийся с доменами соседних астроцитов [4–6], но при активации астроцитов и при формировании глиоза астроцитарная организация ткани меняется [2, 6]. Выявлена морфологическая и нейрохимическая гетерогенность астроцитов в норме [4, 5] и неоднородность их изменений при глиозе [3, 7]. Обнаружено, что реактивные астроциты в зависимости от молекулярных путей, приводящих к их активации, имеют разное происхождение, морфологические признаки и профиль экспрессии специфических белков [2, 8–10]. В то же время функциональное значение глиоза до конца не выяснено. В связи с этим изучение особенностей реакций нейроглии в ПЗ очага привлекает значительное внимание исследователей [7, 8]; оно также важно для понимания механизмов повреждения и репарации ткани мозга при ишемическом повреждении и поиска возможностей терапевтического воздействия на эти процессы.

Цель работы – методами иммуноморфологии и компьютерной морфометрии оценить морфохимические изменения астроглии в разных областях перифокальной зоны моделируемого инфаркта мозга в зависимости от сроков его воспроизведения.

Материалы и методы

Эксперимент проводили на белых беспородных крысах (самцы весом 250–300 г, n=15). Манипуляции с животными проводили с соблюдением рекомендаций Европейской конвенции по защите животных. Животные были

разделены на три группы: интактную (n=5) и две экспериментальные (n=5 в каждой группе) на 3-й и 21-й дни после ишемического инфаркта мозга. Для моделирования фокальной ишемии в левом полушарии головного мозга животным под общей анестезией (хлоралгидрат, 400 мг/кг, внутривенно) после трепанации черепа проводили окклюзию левой ветви средней мозговой артерии (ОСМА) и подходящей к ней вены, с одновременной перевязкой ипсилатеральной сонной артерии. Место ОСМА было выбрано так, чтобы ишемическое поражение локализовалось преимущественно в сенсомоторной области коры [11–13]. Операцию выполняли сотрудники кафедры физиологии и общей патологии факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова. Мозг извлекали и фиксировали в нейтральном 4% формалине, заключали в парафиновые блоки, которые раскладывали на срезы толщиной 7 мкм. Для морфологического контроля срезы окрашивали крезильным фиолетовым, а для выявления дегенерирующих нейронов использовали 0,001% раствор красителя FluoroJade C (Merck Millipore, Германия), предварительно выдерживая 5 мин срезы в 0,06% растворе $KMnO_4$.

Иммуногистохимические реакции проводили с помощью кроличьих антител (Sigma-Aldrich, США), выявляя кислый глиофибрилярный белок (GFAP), глутаминсинтазу (GlnS) и аквапорин-4 (AQP4). Растворы антител готовили на 0,1 М фосфатно-солевом буфере (pH=7,2), содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина и 0,1% Тритона X100. Перед окрашиванием срезы последовательно обрабатывали, промывая после каждого этапа: в 0,3% растворе H_2O_2 (10 мин); в цитратном буфере pH=6,0 (10 мин, 80–90°C); первичными кроличьими антителами – 18 час, вторичными антителами (мышинные против кролика, 1:40) – 4 час и для развития окрашивания обрабатывали авидинпероксидазой (1:40, 2 час). Пероксидазную метку выявляли 0,05% раствором 3,3 диаминобензидина с усилением $CoCl_2$ (набор SigmaFast, Sigma-Aldrich, США). Микроглию и макрофаги окрашивали конъюгированными с биотином лектинами WGA (Лектинотест, Украина) и IB4 (Sigma-Aldrich, США) [14]. Срезы инкубировали 18 час при 4°C в растворе лектина (0,25 мг/мл) на 0,1М Трис-HCl буфере (pH=7,4–7,6) с 0,1% Твин-80. Продукт реакции выявляли авидинпероксидазным методом, как описано выше.

Изучение и морфометрия срезов проводились с помощью микроскопов Leica DMLB или Nikon Eclipse NiU, оснащенных цифровыми камерами и системами анализа изображений. Плотность распределения клеток определяли, используя объектив x40 в поле зрения микроскопа (0,087 мм²), выводимого на экран монитора, и исследовали не менее 50 полей зрения на 10 срезах на одно животное. Интенсивность иммуномечения оценивали на изображении, получаемом на экране монитора, по значению яркости (8 бит) с коррекцией фона. Форму астроцитов определяли в программе Leica QWin с помощью созданной нами процедуры, которая позволяла после ручной сегментации объектов на изображении оценивать число, длину и площадь, занимаемую отростками астроцитов (“convex hull” –

наименьший выпуклый многоугольник, описывающий фигуру), а также форму дерева отростков – кругообразность (“roundness”), согласно формуле: $C=4\pi S/P^2$, где S – площадь объекта, P – его периметр. Подробно методы, использованные нами, описаны ранее [15].

Если учесть, что отростки астроцитов образуют непрерывающиеся домены, то организация глиальной сети в интактном мозге должна близко соответствовать разбиению, получаемому на диаграммах Вороного, которое создается на основе локализации ядер клеток, что ранее было применено при анализе реактивных астроцитов на модели болезни Альцгеймера [16]. В нашей работе для оценки пространственного распределения астроцитов и построения диаграммы Вороного изучали 20–25 полей зрения на одно животное, используя программы Leica Qwin и Ка-Ме [17]. Последнюю также применяли для вычисления коэффициента Кларка-Эванса, используемого для сравнения распределений точек на плоскости [18].

Статистический анализ проводили в программе StatSoft Statistica 6.0. Полученные результаты даны в форме $M \pm SE$, где M – среднее значение, SE – стандартная ошибка среднего. Для сравнения групп использовали дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным тестом Fisher LSD, значимыми считали изменения при $p < 0,05$.

Результаты

В коре головного мозга оперированных животных на стороне ОСМА получали очаг некроза и расположенную вокруг него ПЗ (рис. 1А, В). В очаге некроза сохранные нейроны и астроциты на 3-й день после ОСМА не определялись, но выявлялись лишь редкие сморщенные и гиперхромные нервные клетки, а также стаз и отек сосудов. На 21-й день очаг очищался от некротических масс и вокруг него появлялся плотный глиальный рубец. В ПЗ инфаркта степень повреждения нервных клеток и реактивных изменений астроцитов зависела от удаленности их от очага некроза и сроков, прошедших с момента ОСМА. По степени морфологических превращений астроглии в ПЗ выделяли «краевую область» или область рубец-формирующих астроцитов, прилежащую к очагу инфаркта, и «область реактивных изменений», в которой по мере удаления от очага интенсивность реактивных изменений снижалась. В краевой области – ее ширина на 3-й день после ОСМА составила 404 ± 13 мкм, а на 21-й день – 135 ± 7 мкм – происходила поляризация астроцитов, отростки которых формировали перекрывающиеся сети. В этой области на 3-й день после ОСМА наблюдали разную степень изменений астроцитов: гипертрофированные клетки, реактивные (рис. 2А, В, С) и дегенерирующие глиоциты с признаками клеточного отека, низкой экспрессией GFAP и вакуолизированными отростками. При окрашивании лектином IB4 обнаруживали микроглиоциты на разных стадиях трансформации – от клеток, теряющих отростки, до микроглии, приобретающей амeboидную форму (рис. 2D, E, F). Красителем FluoroJade определяли многочисленные дегенерирующие нервные клетки (рис. 1С). Краевая область постепенно переходила в область реактивных изменений, где преобладали сохранные нейроны, а сморщенные, гиперхромные или вакуолизированные нервные клетки встречались редко, но экспрессия GFAP в астроцитах была повышена. На 21-й день после ОСМА краевая область рубца и область реактивных изменений были четко разграничены. В первой нейроны отсутствовали, а во второй выраженные патоло-

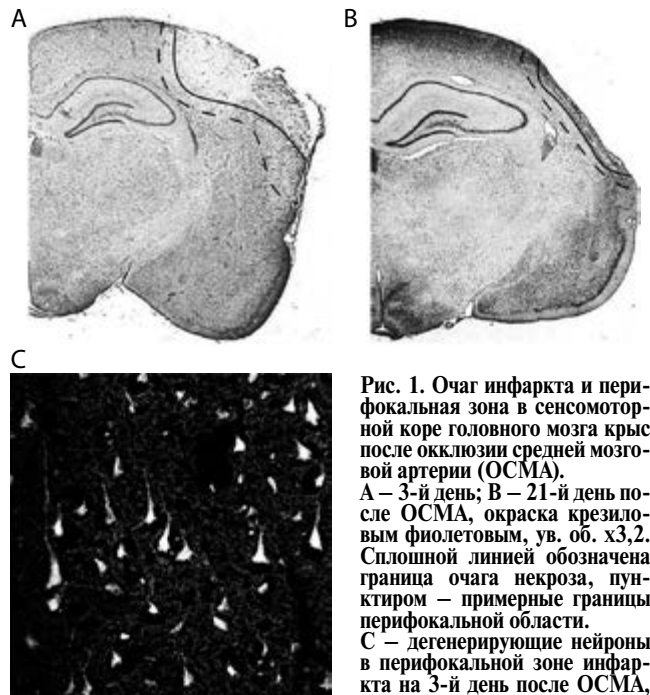


Рис. 1. Очаг инфаркта и перифокальная зона в сенсомоторной коре головного мозга крыс после окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА). А – 3-й день; В – 21-й день после ОСМА, окраска крезилловым фиолетовым, ув. об. $\times 3,2$. Сплошной линией обозначена граница очага некроза, пунктиром – примерные границы перифокальной области. С – дегенерирующие нейроны в перифокальной зоне инфаркта на 3-й день после ОСМА, окраска FluoroJade, ув. об. $\times 40$

Fig. 1. Infarction focus and the perifocal zone in the sensorimotor cortex of rat brain after middle cerebral artery occlusion (MCAO) A – day 3; B – day 21 after MCAO; cresyl violet staining, $\times 3,2$ magnification. The solid line shows the border of necrotic focus; the dashed line shows the approximate borders of the perifocal zone; C – degenerating neurons in the perifocal zone of infarction on day 3 after MCAO; Fluoro-Jade staining, $\times 40$ magnification

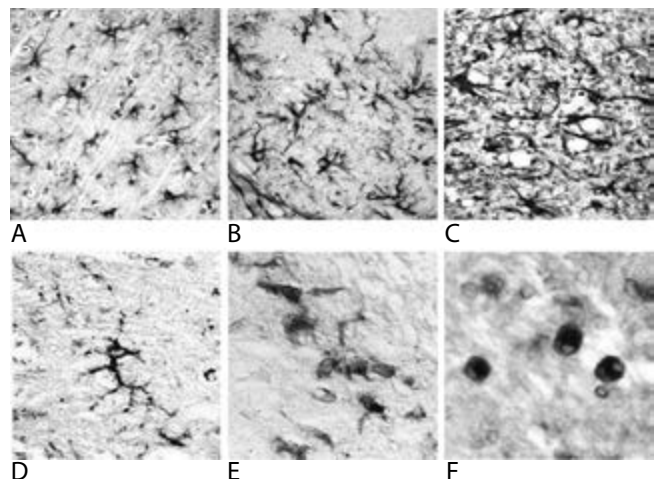


Рис. 2. Изменения морфологии астроцитов (А, В, С) и микроглии (D, E, F) в краевой области перифокальной зоны после ОСМА. А – интактный контроль, сенсомоторная область коры; В – 3-й день после ОСМА; С – 21-й день после ОСМА, иммуногистохимическая реакция на GFAP, ув. об. $\times 40$; D – разветвленная микроглия, интактный контроль; E – трансформация микроглии в амeboидную форму, окраска лектином IB4, ув. об. $\times 100$; F – фагоцитирующие клетки в краевой области, окраска лектином WGA, ув. об. $\times 100$

Fig. 2. Changes in the morphology of astrocytes (A, B, C) and microglial cells (D, E, F) at the periphery of the perifocal zone after middle cerebral artery occlusion. A – intact control, the sensorimotor cortex; B – day 3 after MCAO; C – day 21 after MCAO, immunohistochemical response to GFAP, $\times 40$ magnification; D – branched microglia, intact control; E – transformation of microglia into the amoeboid form, lectin IB4 staining, 100 magnification; and F – phagocytosing cells in the periphery, lectin WGA staining, $\times 100$ magnification

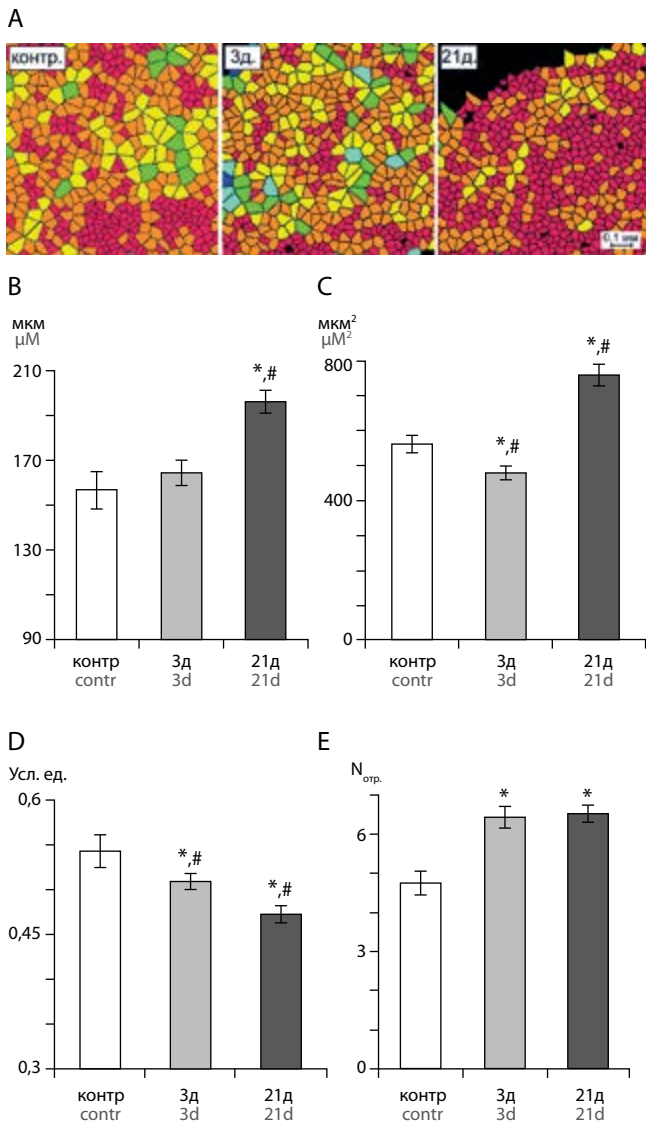


Рис. 3. Изменения доменной организации астроцитов (А) и параметров их отростков (В, С, D, E) в перифокальной зоне инфаркта после ОСМА.

А – примеры диаграмм Вороного для перифокальной зоны инфаркта в контроле, на 3-й и 7-й дни после ОСМА. Восьмицветной шкалой закодированы размеры доменов от синего к красному (по мере уменьшения размеров); В – длина отростков астроцитов; С – площадь, занимаемая отростками; D – фактор формы (roundness); E – число отростков астроцитов.

Обозначения: «контр.» – интактные животные, белые столбцы; «3 д» – 3-й день после ОСМА, серые столбцы; «21 д» – 21-й день после ОСМА, черные столбцы. Данные представлены в виде средних значений и стандартной ошибки. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # – $p < 0,05$ по сравнению с днем 3 после ОСМА; ANOVA Post Hoc Fisher LSD test

Fig. 3. Changes in the domain organization of astrocytes (A) and parameters of their processes (B, C, D, E) in the perifocal zone of cerebral infarction after middle cerebral artery occlusion.

A – examples of Voronoi diagrams for the perifocal zone of the infarction for the control on day 3 and 7 after MCAO. The eight-point color scale, from blue to red, codes for domain size (in decreasing order); B – length of astrocyte processes; C – the area occupied by the processes; D – form factor (roughness); E – the number of astrocyte processes.

Notation: “contr.” – intact animals, white columns; “d3” – day 3 after MCAO, gray columns; “d21” – day 21 after MCAO, black columns. The data are reported as the mean and the standard deviation. * – $p < 0.05$ compared to the control; # – $p < 0.05$ compared to day 3 after MCAO; ANOVA Post Hoc Fisher LSD test

гические изменения нейронов не определялись, астроциты имели нормальную морфологию и экспрессия GFAP в них была повышена незначительно.

Морфометрические измерения в ПЗ инфаркта показали, что на 3-й день после ОСМА плотность распределения GFAP-позитивных астроцитов по сравнению с интактным контролем увеличивалась на 41% в слое V, однако эти изменения не были статистически значимыми, а на 21-й день после ОСМА она увеличивалась почти втрое в основном за счет увеличения числа астроцитов в глиальном рубце. При помощи диаграмм Вороного выявили, что в норме астроциты распределялись неравномерно (рис. 3А), но неравномерность распределения и вариабельность размеров астроцитарных доменов еще больше возрастали на 3-й день после ОСМА, а на 21-й день они снижались. Среднее значение индекса дисперсии (variance to mean ratio, VMR), означающее вариабельность площади астроцитарных доменов, в контроле равнялось 1,71, через 3 дня после ОСМА – 4,51, через 21 день – 2,68. Среднее значение коэффициента Кларка-Эванса в ПЗ между экспериментальными группами значимо различалось, и на 3-й день после ОСМА оно составляло $R=0,79 \pm 0,04$, а на 21-й день $R=0,95 \pm 0,04$. Полученные результаты соответствуют разным типам распределения астроцитарных доменов ($R < 1$ – разрезанное, $R=1$ – случайное) [18].

Суммарная длина отростков астроцитов в ПЗ инфаркта на 3-й день после ОСМА по сравнению с контролем не менялась, а на 21-й день она достоверно увеличивалась на 28% (рис. 3В). Число отростков астроцитов, выявляемых в ПЗ, было достоверно выше контрольных значений как на 3-й, так и на 21-й дни после ОСМА (рис. 3Е). По сравнению с контролем площадь, занимаемая отростками астроцитов в ПЗ, достоверно менялась: она снижалась на 15% на 3-й день и увеличивалась на 35% на 21-й день (рис. 3С). Увеличение площади отростков наряду с уменьшением размеров доменов и увеличением плотности астроцитов свидетельствует о значительном перекрытии отростков астроцитов и нарушении доменной организации при формировании глиального рубца. Образование рубца также сопровождалось поляризацией (вытягиванием) астроцитов к области некроза, что подтверждает значимое снижение фактора формы «округлость» в обеих экспериментальных группах (рис. 3D).

Как показали наши исследования, GlnS локализовалась в телах и отростках астроцитов и округлых клетках без отростков, которые обнаруживались в контроле лишь в белом веществе, а на 3-й и 21-й дни после ОСМА выявлялись в «потоке» глиальных клеток, мигрирующих из структур белого вещества к области инфаркта (рис. 4С). GlnS лучше всего выявлялась в астроцитах начальных сегментов отростков. На 3-й день после ОСМА экспрессия фермента снижалась в краевой области ПЗ, слабо выявлялась в отростках астроглии и, наоборот, была повышена на удалении от очага инфаркта. На 21-й день наблюдали противоположные изменения – окрашивание на GlnS было увеличено в краевой области, а на удалении от нее – нормализовалось (рис. 4А, В).

В зоне реактивных изменений на 3-й день после ОСМА окрашивание AQP4 было выражено слабо, что говорит о снижении экспрессии AQP4 астроцитами и его перераспределении в ПЗ инфаркта (рис. 4D, E, F, рис. 5). Это наблюдали как в краевой области, примыкающей к некрозу, так и на удалении от нее (рис. 4D). Кроме того, значимо

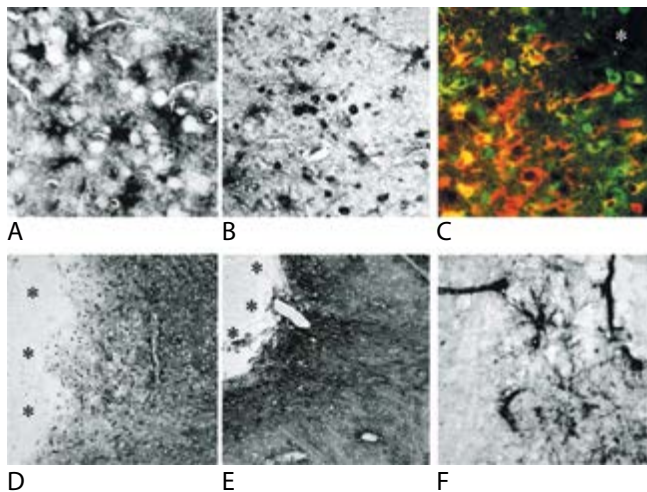


Рис. 4. Изменения распределения глутаминсинтетазы (А, В, С) и аквапорина-4 (D, E, F) в перифокальной зоне инфаркта после ОСМА. А – увеличение экспрессии GlnS в зоне реактивных изменений на 3-й день ОСМА; В – снижение экспрессии GlnS в краевой зоне на 3 день после ОСМА; С – совместное выявление GlnS (зеленым) и GFAP (красным) в области рубца на 21 день. Локализация аквапорина-4 в перифокальной зоне инфаркта на 3-й (D) и 21-й дни (E) после ОСМА. F – локализация аквапорина-4 на отростках активированного астроцита (ув. об. $\times 40$); * – область очага инфаркта. (А, В, С, D) – ув. об. $\times 40$; (Г, Д) – ув. об. $\times 10$

Fig. 4. Changes in distribution of glutamine synthetase (A, B, C) and aquaporin 4 (D, E, F) in the perifocal zone of infarction after middle cerebral artery occlusion.

A – increased GlnS expression in the zone of reactive changes on day 3 after MCAO; B – decreased GlnS expression in the periphery on day 3 after MCAO; C – joint detection of GlnS (shown with green) and GFAP (shown with red) in a region of scar on day 21. Aquaporin 4 is located in the perifocal zone of infarction on day 3 (D) and 21 (E) after MCAO; F – aquaporin 4 resides on processes of an activated astrocyte ($\times 40$ magnification). * – the infarction focus area. (A, B, C, F) – $\times 40$ magnification; (D, E) – $\times 10$ magnification

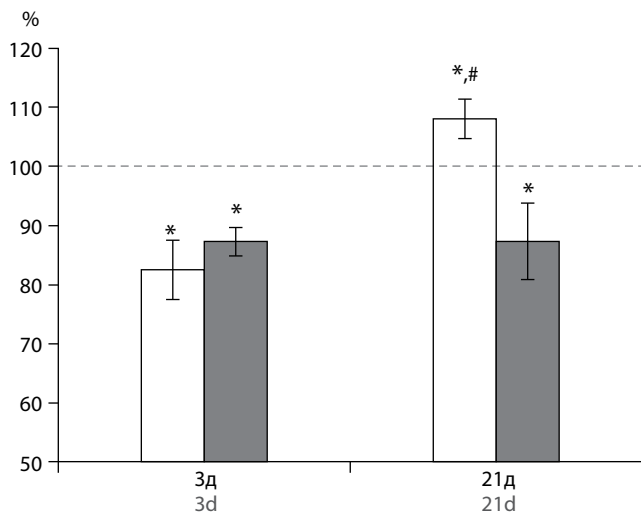


Рис. 5. Изменения интенсивности иммуногистохимического окрашивания на аквапорин-4 (интактный контроль – 100%) в перифокальной зоне инфаркта на 3-й и 21-й дни после ОСМА. Обозначения: «3 д» – 3-й день после ОСМА, «21 д» – 21-й день после ОСМА. Белые столбики – краевая зона, черные столбики – зона реактивных изменений

Fig. 5. Changes in intensity of immunohistochemical staining of aquaporin 4 (intact control – 100%) in the perifocal zone of infarction on day 3 and 21 after MCAO. Notation: “d3” – day 3 after MCAO; “d21” – day 21 after MCAO. White columns show the periphery; black columns, the area of reactive changes

уменьшалась объемная фракция сосудов, выявляемых при окрашивании на AQP4 (на 83% – в краевой области и на 24% – в области реактивных изменений). Наряду с этим выявляли отдельные астроциты с локализацией AQP4 по всей поверхности отростков (рис.4F). На 21-й день после ОСМА экспрессия AQP4 в краевой зоне рубца достоверно возрастала, что сопровождалось интенсивным окрашиванием глиальных отростков (рис. 4E).

Обсуждение

Астроглиоз – типичный ответ нервной ткани на ее повреждение, но в зависимости от механизма и природы повреждения дифференцируют и характер глиоза [4]. Так, при постепенно развивающемся нейродегенеративном процессе глиоз протекает по изоморфному типу, без нарушения структуры глиальной сети, а при острой травме – по анизоморфному типу, с образованием рубца [2, 8, 9]. Как показало наше исследование, при повреждении, вызываемом ОСМА, наблюдаются как изоморфный, так и анизоморфный типы глиоза, что зависит от их удаленности от очага поражения. Параметры астроцитарных доменов и распределение астроглии в ПЗ инфаркта меняются в зависимости от сроков после возникновения ишемического очага, что, по видимому, связано как с гибелью части глиальных клеток в острую фазу очага, так и с активацией глиальных клеток – гипертрофией отростков астроцитов, их делением *in situ* и миграцией [2, 3, 10]. Выявленные нами изменения формы астроцитов отражают перестройку глио-вазкулярных и глио-нейрональных контактов, формируемых дистальными отделами их отростков [4, 19]. Так, уменьшение площади, занимаемой отростками в остром периоде инфаркта, указывает на нарушение контактов астроцитов с сосудами и другими клетками, а увеличение площади отростков и их перекрытие говорит о формировании плотного защитного барьера, отграничивающего очаг повреждения.

По данным литературы, GFAP-позитивные астроциты, окружающие ишемическую зону, начинают активироваться через 4–6 час после ее возникновения [1] и со временем формируют компактный рубец [1, 4]. Различают умеренный и интенсивный глиоз, последний может быть компактным или диффузным [4, 9]. При умеренном глиозе в области реактивных изменений в ПЗ отростки отдельных астроцитов на 3-й и 21-й дни эксперимента не перекрываются, а экспрессия структурных белков повышена пропорционально степени реактивности клеток, что соответствует данным литературы [7]. В краевой области ПЗ изменения астроцитов на 3-й день эксперимента переходят в стадию диффузного глиоза, при котором экспрессия GFAP астроцитами резко усиливается, идет их активная пролиферация с гипертрофией отростков и частичным перекрытием астроцитарных доменов. Изменения астроцитов краевой области на 21-й день характеризовались как компактный глиоз, направленный на формирование глиального рубца, отделяющего поврежденную ткань от жизнеспособной, что подавляет аксональную регенерацию и образование синапсов и ограничивает терапевтические возможности [2, 9]. Следовательно, изменения астроцитов в ПЗ зависят от их удаленности от ишемического очага и от срока, прошедшего после его появления.

Помимо структурных изменений, связанных с активацией астроцитов, мы обнаружили и нейрохимическую неоднородность ПЗ. Важнейшие функции метаболизма астроцитов, такие как обмен нейротрансмиттеров (глутамата

и ГАМК) и синтез лактата, служащего энергетическим субстратом для нейронов, связаны с ферментом GlnS [19, 20]. Выявленные особенности экспрессии GlnS в перифокальной зоне инфаркта согласуются с данными литературы, свидетельствующими о перераспределении фермента в астроцитах в зависимости от их функционального состояния [7]. Перераспределение GlnS в отростках отражает изменения медиаторного и энергетического обмена в нервной ткани, а снижение ее экспрессии на ранних сроках после инфаркта может быть важным фактором вторичной гибели нейронов, так как увеличивает содержание внеклеточного глутамата и проницаемость воды в астроцитах, что способствует развитию отека [19, 21]. Кроме того, в ПЗ инфаркта по сравнению с контролем значительно снижалась экспрессия белка водных каналов AQP4, который локализуется в концевых ножках астроцитов, контактирующих с сосудами [21, 22]. Можно предположить, что изменения экспрессии AQP4 и перераспределение локализации водных каналов у астроцитов на 3-й день после ОСМА, формирующих глиальный рубец, связаны с развитием отека, нарушением контактов астроцитов с сосудами и нарушением транспорта воды, что находит подтверждение в литературе [1, 19, 21]. При этом экспрессия аквапорина в зоне рубца на 21-й день, наоборот, была повышена относительно контроля, что свидетельствует о функциональной роли рубец-формирующих астроцитов в поддержании водного и ионного баланса.

При умеренном глиозе структурно-функциональные изменения астроцитов носят обратимый характер, а при компактном глиозе они необратимы [2, 4]. Вместе с тем, по-видимому, разные типы глиоза не являются последовательными стадиями активации астроцитов [2, 4], а имеют разное функциональное значение и различаются запусковыми их молекулярными факторами [8, 9]. Популяции реактивных астроцитов различны не только фенотипиче-

ски, но и происходят из разных клеточных предшественников [8, 10, 20]. Следовательно, выявленные в проведенном исследовании морфологические и нейрохимические изменения подчеркивают функциональные различия между транзиторно-активированной астроглией (на удалении от очага инфаркта) и рубцовыми астроцитами, теряющими доменную организацию и отличающимися значительными перестройками цитоскелета, изменениями локализации и экспрессии глиальных белков.

Таким образом, характер структурных и функциональных изменений астроцитов в ПЗ инфаркта зависит от расстояния до очага поражения и от сроков, прошедших после ишемического повреждения. В зависимости от тяжести нарушения глио-нейрональных и глио-васкулярных взаимодействий реактивные астроциты по-разному проявляют свои морфохимические свойства. Рубец-формирующие астроциты приобретают поляризованную форму, не сохраняют доменную организацию и перераспределяют глутаминсинтетазу и аквапорин-4 в отростках. Транзиторно-активированные астроциты отличаются менее выраженными изменениями отростков и сохраняют доменную организацию; вместе с тем они увеличивают экспрессию белков, участвующих в обменных процессах, что указывает на усиление их гомеостатических функций.

Благодарность. Авторы статьи выражают искреннюю благодарность за консультативную и методическую помощь в работе сотрудникам Кафедры физиологии и общей патологии факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова: зав. кафедрой, д.б.н., профессору В.Б. Кошелеву и доценту, к.б.н. С.А. Гавриловой.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare that there is no conflict of interest.

Список литературы

1. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. М.: Медицина; 2001. 328 с.
2. Fernaud-Espinosa I., Nieto-Sampedro M., Bovolenta P. Differential activation of microglia and astrocytes in aniso- and isomorphic gliotic tissue. *Glia*. 1993; 8: 277–291. DOI:10.1002/glia.440080408. PMID: 8406684.
3. Rusnakova V., Honsa P., Dzamba D. et al. Heterogeneity of astrocytes: from development to injury – single cell gene expression. *PLoS ONE*. 2013; 8: e69734. DOI: 10.1371/journal.pone.0069734. PMID: 23940528.
4. Sofroniew M.V., Vinters H.V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010; 119: 7–35. DOI: 10.1007/s00401-009-0619-8. PMID: 20012068.
5. Sosunov A.A., Wu X., Tsankova N.M. et al. Phenotypic heterogeneity and plasticity of isocortical and hippocampal astrocytes in the human brain. *J. Neurosci*. 2014; 34: 2285–2298. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4037-13.2014. PMID: 24501367.
6. Wilhelmsson U., Bushong E.A., Price D.L. et al. Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2006; 103: 17513–17518. DOI: 10.1073/pnas.0602841103. PMID: 17090684.
7. Wagner D.C., Scheibe J., Glocke I. et al. Object-based analysis of astroglial reaction and astrocyte subtype morphology after ischemic brain injury. *Acta Neuropathol. Exp*. 2013; 73: 79–87. PMID: 23595285.
8. Моргун А.В., Малиновская Н.А., Комлева Ю.К. и др. Структурная и функциональная гетерогенность астроцитов головного мозга: роль в нейродегенерации и нейровоспалении. *Бюллетень сибирской медицины*. 2014; 5: 138–148. DOI: http://dx.doi.org/10.20538/1682-0363-2014-5-138-148.
9. Anderson M.A., Ao Y., Sofroniew M.V. Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci. Lett*. 2014; 565: 23–29. DOI:10.1016/j.neulet.2013.12.030. PMID: 24361547.
10. Villarreal A., Rosciszewski G., Murta V. et al. Isolation and characterization of ischemia-derived astrocytes (IDAs) with ability to transactivate quiescent astrocytes. *Front Cell Neurosci*. 2016; 10: 139. DOI: 10.3389/fncel.2016.00139. PMID: 27313509.

References

1. Gusev E.I., Skvortsova V.I. Ishemiya golovnogogo mozga. [Brain Ishaemia]. Moscow, Meditsina., 2001. 328 p. (In Russ.)
2. Fernaud-Espinosa I., Nieto-Sampedro M., Bovolenta P. Differential activation of microglia and astrocytes in aniso- and isomorphic gliotic tissue. *Glia*. 1993; 8: 277–291. DOI:10.1002/glia.440080408. PMID: 8406684.
3. Rusnakova V., Honsa P., Dzamba D. et al. Heterogeneity of astrocytes: from development to injury – single cell gene expression. *PLoS ONE*. 2013; 8: e69734. DOI: 10.1371/journal.pone.0069734. PMID: 23940528.
4. Sofroniew M.V., Vinters H.V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010; 119: 7–35. DOI: 10.1007/s00401-009-0619-8. PMID: 20012068.
5. Sosunov A.A., Wu X., Tsankova N.M. et al. Phenotypic heterogeneity and plasticity of isocortical and hippocampal astrocytes in the human brain. *J. Neurosci*. 2014; 34: 2285–2298. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4037-13.2014. PMID: 24501367.
6. Wilhelmsson U., Bushong E.A., Price D.L. et al. Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2006; 103: 17513–17518. DOI: 10.1073/pnas.0602841103. PMID: 17090684.
7. Wagner D.C., Scheibe J., Glocke I. et al. Object-based analysis of astroglial reaction and astrocyte subtype morphology after ischemic brain injury. *Acta Neuropathol. Exp*. 2013; 73: 79–87. PMID: 23595285.
8. Morgun A.V., Malinovskaya N.A., Komleva Y.K. et al. [Structural and functional heterogeneity of astrocytes in the brain: Role in neurodegeneration and neuroinflammation]. *Byulleten' sibirskoy meditsiny*. 2014; 5: 138–148. DOI: http://dx.doi.org/10.20538/1682-0363-2014-5-138-148. (In Russ.)
9. Anderson M.A., Ao Y., Sofroniew M.V. Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci. Lett*. 2014; 565: 23–29. DOI:10.1016/j.neulet.2013.12.030. PMID: 24361547.
10. Villarreal A., Rosciszewski G., Murta V. et al. Isolation and characterization of ischemia-derived astrocytes (IDAs) with ability to transactivate quiescent astrocytes. *Front Cell Neurosci*. 2016; 10: 139. DOI: 10.3389/fncel.2016.00139. PMID: 27313509.

11. Самойленкова Н.С., Гаврилова С.А., Кошелев В.Б. Защитный эффект гипоксического и ишемического preconditioning при локальной ишемии мозга крыс. Доклады Академии наук. 2007. 414 (2): 283–285.
12. Худоевков Р.М., Самойленкова Н.С., Гаврилова С.А. и др. Preconditioning как метод нейропротекции при моделировании инфаркта мозга. Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2009; 2: 26–30.
13. Худоевков Р. М., Савинкова И. Г., Струкова С. М. и др. Влияние активированного протеина С на размеры моделируемого ишемического очага и морфометрические показатели нейронов и нейроглии в его перифокальной зоне. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014; 4: 534–538.
14. Луцик Б.Д., Яценко А.М., Луцик А.Д. Лектинопероксидазные маркеры микроглии в парафиновых срезах. Архив патологии. 1991; 10: 60–63.
15. Худоевков Р.М., Воронков Д.Н. Современные возможности компьютерной морфометрии в иммуногистохимических исследованиях мозга. В кн.: Пирадов М.А., Иллариошкин С.Н., Танашиян М.М. (ред.) Неврология XXI века: диагностические, лечебные и исследовательские технологии. М.: «АТМО», 2015. Т.3: 198–248.
16. Galea E., Morrison W., Hudry E. et al. Topological analyses in APP/PS1 mice reveal that astrocytes do not migrate to amyloid- β plaques. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015; 112: 15556–15561. DOI: 10.1073/pnas.1516779112. PMID: 26644572.
17. Khiripet N., Khantuwan W., Jungck J.R. Ka-me: a Voronoi image analyzer. Bioinformatics. 2012; 28: 1802–1804. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts253. PMID: 22556369
18. Харитонов С.П. Метод «ближайшего соседа» для математической оценки распределения биологических объектов на плоскости и на линии. Вестник нижегородского ун-та. Серия: Биология. 2005; 1: 213–221.
19. Gunnarson E., Zelenina M., Axehult G. et al. Identification of a molecular target for glutamate regulation of astrocyte water permeability. Glia. 2008; 56: 587–596. DOI: 10.1002/glia.20627. PMID: 18286643.
20. Anlauf E., Derouiche A. Glutamine synthetase as an astrocytic marker: its cell type and vesicle localization. Front Endocrinol. 2013; 4: 144. DOI: 10.3389/fendo.2013.00144. PMID: 24137157.
21. Zelenina M. Regulation of brain aquaporins. Neurochem. Int. 2010; 57: 468–488. DOI: 10.1016/j.neuint.2010.03.022. PMID: 20380861.
22. Hubbard J.A., Hsu M.S., Seldin M.M., Binder D.K. Expression of the astrocyte water channel aquaporin-4 in the mouse brain. ASN Neuro. 2015; 7: PII: 1759091415605486. DOI: 10.1177/1759091415605486. PMID: 26489685.
11. Samoilenkova N.S., Gavrilova S.A., Koshelev V.B. [Protective effect of hypoxic and ischemic preconditioning in rat brain local ischemia]. Dokl Biol Sci. 2007; 414: 183–184. DOI: 10.1134/S0012496607030039. PMID: 17668615. (In Russ.)
12. Khudoerkov R.M., Samoilenkova N.S., Gavrilova S.A. et al. [Preconditioning as a method of neuroprotection in a model of brain infarct]. Annals of clinical and experimental neurology. 2009; 2: 26–30. (In Russ.)
13. Khudoerkov R.M., Savinkova I.G., Strukova S.M. et al. [Effects of activated protein C on the size of modeled ischemic focus and morphometric parameters of neurons and neuroglia in its perifocal zone]. Bull Exp Biol Med. 2014; 157: 530–534. DOI: 10.1007/s10517-014-2607-9. PMID: 25110099 (In Russ.)
14. Lutsik B.D., Iashchewko A.M., Lutsik A.D. [Lectin-peroxidase markers of the microglia in paraffin sections]. Arkh Patol. 1991; 10: 60–3. PMID: 1793382 (In Russ.)
15. Khudoerkov R.M., Voronkov D.N. [Modern possibilities of computer-assisted morphometry in immunohistochemical studies of brain]. In: XXI Century Neurology: diagnostic, treatment and research technologies. Eds. Piradov M.A., Illarionov S.N., Tanashyan M.M.. Moscow. ATMO, 2015. 3: 198–248. (In Russ.)
16. Galea E., Morrison W., Hudry E. et al. Topological analyses in APP/PS1 mice reveal that astrocytes do not migrate to amyloid- β plaques. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015; 112: 15556–15561. DOI: 10.1073/pnas.1516779112. PMID: 26644572.
17. Khiripet N., Khantuwan W., Jungck J.R. Ka-me: a Voronoi image analyzer. Bioinformatics. 2012; 28: 1802–1804. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts253. PMID: 22556369
18. Kharitonov S.P. [Nearest-neighbor distance method for the evaluation of distribution of different biological objects in a plane or in a line]. Vestnik nizhegorodskogo universiteta. Seriya biologiya. 2005; 1: 213–221. (In Russ.)
19. Gunnarson E., Zelenina M., Axehult G. et al. Identification of a molecular target for glutamate regulation of astrocyte water permeability. Glia. 2008; 56: 587–596. DOI: 10.1002/glia.20627. PMID: 18286643.
20. Anlauf E., Derouiche A. Glutamine synthetase as an astrocytic marker: its cell type and vesicle localization. Front Endocrinol. 2013; 4: 144. DOI: 10.3389/fendo.2013.00144. PMID: 24137157.
21. Zelenina M. Regulation of brain aquaporins. Neurochem. Int. 2010; 57: 468–488. DOI: 10.1016/j.neuint.2010.03.022. PMID: 20380861.
22. Hubbard J.A., Hsu M.S., Seldin M.M., Binder D.K. Expression of the astrocyte water channel aquaporin-4 in the mouse brain. ASN Neuro. 2015; 7: PII: 1759091415605486. DOI: 10.1177/1759091415605486. PMID: 26489685.

Информация об авторах: Воронков Дмитрий Николаевич – ст. науч. сотр. лаб. функциональной морфохимии ФГБНУ НЦН. 125367 Москва, Волоколамское ш., д. 80. Тел.: +7 (495) 916-34-72; e-mail: voronkovdm@gmail.com; Сальникова О.В. – мл. науч. сотр. лаб. функциональной морфохимии ФГБНУ НЦН; Худоевков Р.М. – зав. лаб. функциональной морфохимии ФГБНУ НЦН.

Information about the authors: Dmitriy N. Voronkov, Senior Fellow, Research Center of Neurology, Russia, 125367, Moscow, Volokolamskoe sh., 80. Tel. +7-916-2169396. E-mail: voronkovdm@gmail.com; Olga V. Sal'nikova, Junior Fellow, Research Center of Neurology, Moscow, Russia; Rudolf M. Khudoerkov, Head of Laboratory, Research Center of Neurology, Moscow, Russia.

Для цитирования: Воронков Д.Н., Сальникова О.В., Худоевков Р.М. Иммуноцитохимические и морфометрические изменения астроглии в перифокальной зоне моделируемого инфаркта мозга. Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2017; 11(1): 40–46.

For citation: Voronkov D.N., Sal'nikova O.V., Khudoerkov R.M. [Immunocytochemical and morphometric changes in astroglial cells in the perifocal zone of the cerebral infarction model]. Annals of Clinical and Experimental Neurology. 2017; 11(1): 40–46. (In Russ.)