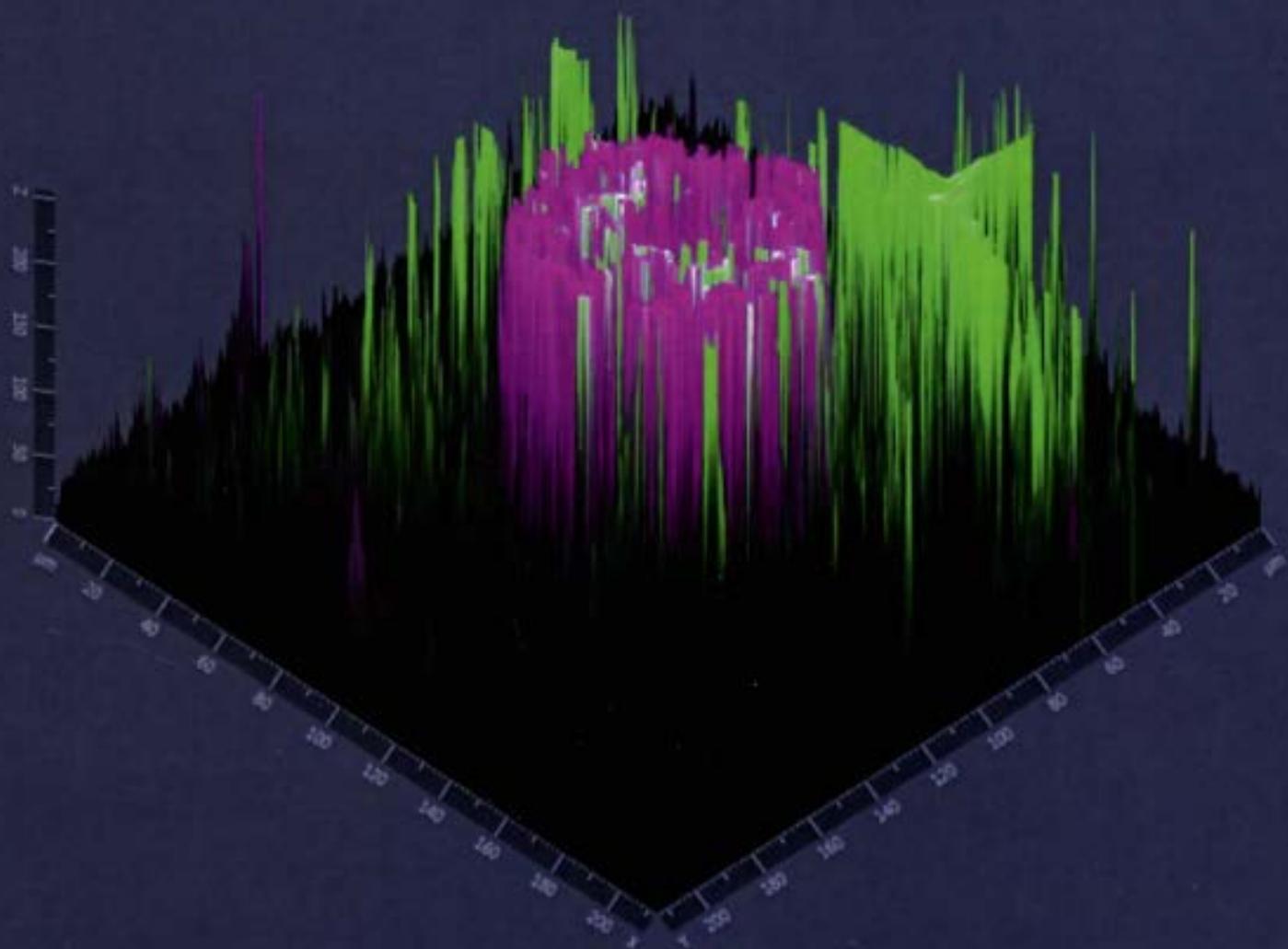


НЕЙРОГЛИЯ

и ее участие в патогенезе
заболеваний нервной системы

Д.Э. Коржевский



2019 г.

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Институт экспериментальной медицины»**

Д.Э.Коржевский

НЕЙРОГЛИЯ
и ее участие в патогенезе заболеваний нервной
системы

Актовая речь на заседании Ученого совета ФГБНУ «ИЭМ»

12 декабря 2019 года

Санкт-Петербург

2019

Глубокоуважаемые коллеги!

Среди заболеваний нервной системы особую социальную значимость имеют болезни, относящиеся к группе нейродегенеративных. Проблема нейродегенеративных заболеваний выступает на первый план в связи с прогрессирующим старением населения. Это явление в большей мере характерно для стран Западной Европы, Японии и США. Однако, с учетом прогнозируемого увеличения средней продолжительности жизни, в России эта проблема может стать серьезным вызовом для всей системы здравоохранения уже в ближайшем будущем. Данная проблема усугубляется и тем, что в большинстве случаев ранние стадии развития нейродегенеративных заболеваний остаются вне внимания и детального анализа специалистов. Во многом это обусловлено нашими недостаточными знаниями о молекулярных и клеточных механизмах развития медленно прогрессирующих патологических процессов и отсутствием адекватных представлений о клеточной и тканевой организации нервных центров у человека. В настоящее время накоплен огромный массив знаний о структурных и функциональных характеристиках клеток нервной системы, организации медиаторных систем, генетике и эпигенетике ряда патологий, но всех этих знаний оказывается пока недостаточно для разработки эффективных методов профилактики, ранней диагностики и лечения общеизвестных нейродегенеративных заболеваний.

Правильное представление о клеточной организации органов нервной системы человека и о механизмах межклеточных взаимодействий в ЦНС – ключ к пониманию патогенеза нейродегенеративных заболеваний.

В последние годы наблюдается существенный рост числа исследований, в которых обращается внимание на ведущую роль нейроглии в поддержании условий микроокружения в нервной

ткани и в сохранении баланса между нейропротекторными и нейротоксическими факторами.

Нейроглия составляет основу барьерной системы мозга, которая нарушается при травмах, заболеваниях и системных воспалительных процессах. Недавно выяснилось, что для правильного понимания клеточных механизмов, обеспечивающих нейро-иммунные взаимодействия, требуется объяснить, каким образом в условиях существования гематоэнцефалического барьера осуществляется миграция иммунокомпетентных клеток. Это привело к пересмотру господствовавших ранее представлений об отсутствии мозговой лимфатической системы. Роль этой системы теперь отдают как лимфатической системе твердой мозговой оболочки, которая взаимосвязана с системой периваскулярных (Робин-Вирховских) пространств, так и «глимфатической» мозговой системе, выделение которой в особую дренажную систему не кажется столь очевидным. Тем не менее, в организации дренажных систем мозга глиальные клетки принимают непосредственное участие.

В связи с этим не кажется удивительным, что роль нейроглии в патогенезе нейродегенеративных процессов, отводимая ей исследователями, кардинально изменилась. Не исключено, что именно изучение организации, состава и свойств нейроглии поможет нам установить причины как ранней нейродегенерации, так и избирательной устойчивости организма к факторам, провоцирующим повреждение нервных клеток.

Первым вопросом на пути анализа роли нейроглии в развитии нейродегенерации можно поставить вопрос о том, что следует понимать под термином «нейроглия»? Несмотря на странность постановки данного вопроса, можно констатировать, что ответ на него не так прост, как кажется при первом рассмотрении. Чтобы подобное утверждение не было голословным, можно предложить в качестве примера нейральные стволовые клетки, которые, безусловно не являются нейронами, но могут ли они рассматриваться как компонент нейроглии?

Историю научной концепции нейроглии принято начинать с работ выдающегося немецкого патолога Рудольфа Вирхова (1821-1902), который в своей «Целлюлярной патологии»

обобщил имевшиеся представления об организации межнейронного вещества головного и спинного мозга (Вирхов Р. «Целлулярная патологія какъ ученіе основанное на физиологической и патологической гистологіи» М. 1865). Р.Вирхов ввел термин «*neuroglia*», который в русском издании перевели как «нервный цемент». Он считал, что нейроглия в мозге образует подобие промежуточного вещества (волокнистой соединительной ткани) или стромы, характерных для тканевой организации таких паренхиматозных органов, как печень, почки и др. Позже предполагалось, что клетки нейроглии образуют особые волокна межклеточного вещества - глиофибриллы (за них принимали отростки астроцитов). Только на рубеже XIX и XX веков стало ясно, что все эти представления ошибочны, а нейроглия является составным элементом нервной ткани. Из этого следует, что строение мозга не может рассматриваться с использованием понятий «строма» и «паренхима», поскольку стромы, как таковой, в головном мозге не существует.

Новый импульс изучению нейроглии придали методические разработки ученых испанской неврологической школы – Сантьяго Рамон-и-Кахаля (1852-1934) и Пио дель Рио-Ортеги (1882-1945). С.Рамон-и-Кахаль создал золото-сублиматный метод импрегнации, с помощью которого можно было четко визуализировать звездчатые глиальные клетки (астроциты) и обнаружил «адендритические корпускулы» или, так называемый «третий элемент» нервной ткани (первый – нейроны, второй – астроциты). П. дель Рио-Ортега предложил усовершенствованный серебряно-карбонатный метод, который позволил ему доказать, что «третий элемент» Кахаля состоит на самом деле из двух типов глиальных клеток – олигодендроцитов и микроглиоцитов. В текущем году этому открытию исполнилось 100 лет. Таким образом, современная концепция нейроглии базируется на фундаменте заложенном около ста лет назад. Что же изменилось с тех пор?

За прошедшие годы роль различных глиальных элементов неоднократно пересматривалась и уточнялась. Пересмотру подверглись даже количественные данные, характеризующие соотношение нейронов и клеток нейроглии. Стало понятно, что эпендима, выстилающая мозговые желудочки не является

простым эпителием, но разнообразностью глиальных клеток, родственной астроцитам. Среди эпендимоцитов была выделена особая форма глиальных клеток – танициты. Хотя сам этот термин был предложен в 1954 году, о некоторых особенностях организации биполярных клеток инфундибулярной выстилки было известно и раньше. Впервые они привлекли внимание шведского невролога и антрополога Магнуса Густава Ретциуса (1842-1919) – иностранного члена-корреспондента Санкт-Петербургской Академии наук.

В России систематические исследования нейроглии начались с докторской диссертации Владимира Яковлевича Рубашкина (1875-1932) – талантливого нейрогистолога, выпускника Императорской Военно-Медицинской Академии (1900). Эта диссертация на тему «К учению о строении нейроглии и эпендимы» была им защищена в стенах Академии в 1903 году. В фундаментальной экспериментальной работе В.Я.Рубашкина было предвосхищено открытие микроглиоцитов, описаны клетки, получившие в последствии название «танициты» (рис.1), а астроциты были повергнуты детальному анализу.

Танициты

Следует пояснить, что же представляет собой этот малоизвестный элемент нейроглии.

Термин «танициты» (от греческого *τανύς* – удлинённый, вытянутый) для этих клеток был предложен в 1954 году Эрнстом Хорстманом (профессором в Кильского университета имени Кристиана Альбрехта). Название дано с учетом наиболее яркой особенности строения этих клеток (тела таницитов имеют удлиненную форму). Танициты представляют собой высокоспециализированные биполярные глиальные клетки, сома которых формирует выстилку инфундибулярного углубления и контактирует с цереброспинальной жидкостью (ЦСЖ) а длинный базальный отросток углубляется в нервную ткань и оплетает своими окончаниями кровеносные сосуды. Такое строение определяется функциями этих клеток. Уникальной особенностью таницитов является то, что они формируют одновременно и ликвороэнцефалический, и гематоликворный барьеры. Кроме

того, они обеспечивают мониторинг и двунаправленный транспорт многих веществ (гормонов, метаболитов, ростовых факторов, ионов металлов) между ЦСЖ и кровью, а также нейронами ядер медиабазального гипоталамуса. Именно они регулируют высвобождение рилизинг-факторов в портальную систему гипофиза, таким образом являясь важным звеном в регуляторной цепи нейроэндокринной системы головного мозга. Известно и об участии таницитов в патогенезе эндокринопатий – их дисфункция может способствовать развитию ожирения и диабета 2-го типа.

На основании структурных и функциональных особенностей таницитов их принято подразделять на 4 субпопуляции – $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$ танициты (рис.2). Данная классификация была предложена академиком И.Г.Акмаевым в 1973 году (Акмаев I.G. et al. // Z Zellforsch Mikrosk Anat. 1973. 137(4): 493-512) и является признанной на общемировом уровне.

На сегодняшний день установлено, что танициты совмещают в себе ряд характеристик радиальной глии и астроцитов. В частности, танициты, дифференцируясь из клеток радиальной глии, сохраняют ее основную морфологическую особенность - биполярность. Было показано, что танициты характеризуются присутствием ряда астроцитарных маркеров – GFAP, глутаминсинтетазы, коннексина 43, S100 β , GLAST, GLT-1. Наиболее интересным из них представляется коннексин 43 (Cx43) – белок щелевых контактов.

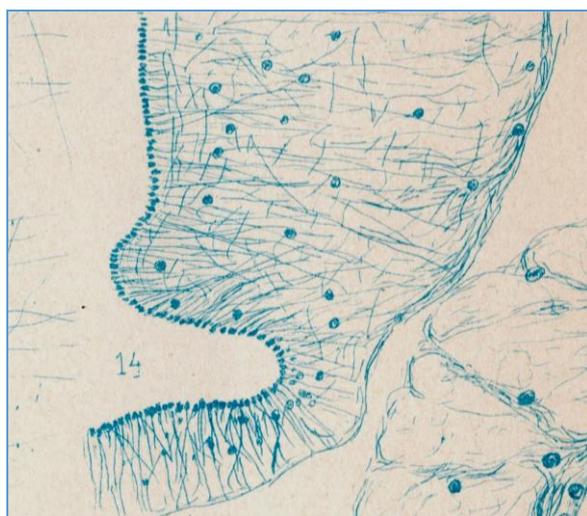


Рис.1 Изображение таницитов из диссертации В.Я.Рубашкина.

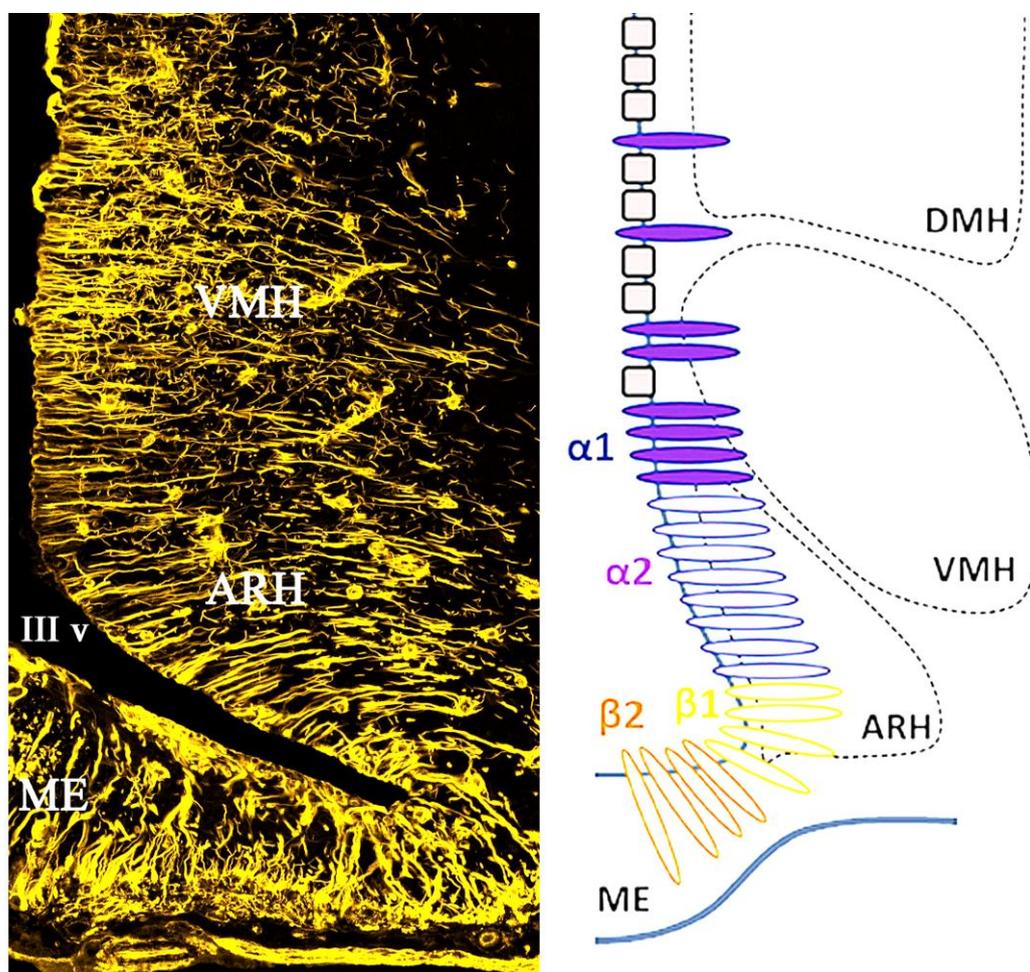


Рис.2. Схема расположения различных популяций таницитов в инфундибулярной части III желудочка головного мозга.

ME-срединное возвышение, IIIv-полость III желудочка, ARH, VMH, DMH – области расположения аркуатного, вентромедиального и дорсомедиального ядер гипоталамуса.

Известно не менее 20 членов семейства белков щелевых контактов, которые разделяются по их молекулярной массе, среди которых Sx43 (белок с молекулярной массой 43 kDa) является основным белком щелевых контактов астроцитов. Также этот белок характерен для эпендимоцитов и таницитов. Щелевые контакты опосредуют межклеточный транспорт ионов и небольших молекул: аминокислот, нуклеотидов, метаболитов и вторичных посредников (например, Ca^{2+} , глюкозы, cAMP, АТФ). Так в обычных (ресничных) эпендимоцитах щелевые контакты располагаются вдоль латеральных стенок этих клеток и необходимы для синхронизации биения ресничек. В таницитах (α танициты) Sx43, главным образом, локализован на апикальной поверхности, где клетки не могут образовывать щелевых контактов. Считается, что в данном случае формируются гемиканалы, которые могут служить для транспортировки малых молекул из ЦСЖ в цитоплазму таницитов и обратно, осуществляя мониторинг состава жидкости, заполняющей ликвороносные пространства. Также Sx43 был обнаружен в ножках таницитов, которыми они оплетают кровеносные сосуды. Предполагается, что это позволяет таницитам осуществлять мониторинг состава плазмы крови. Кроме того, наличие гемиканалов на апикальной и базальной частях клетки указывает на возможность двунаправленного регулируемого транспорта веществ между СМЖ и кровью. Интересным фактом является наличие таницитов не только в области нижней части III желудочка головного мозга. Отдельные клетки, имеющие характерные особенности таницитов были обнаружены и в составе эпендимной выстилки боковых желудочков.

Помимо Sx43, танициты могут синтезировать нестин, виментин, DARPP-32 (32-kD dopamine and cAMP regulated phosphoprotein), бета IV тубулин, BLBP (brain fatty acid binding protein), транскрипционные факторы SOXB1, Sox2, РНК-связывающий белок Musashi1 (Msi-1), различные ферменты и ряд других маркеров. Специфическими маркерами таницитов считаются виментин и DARPP-32, поскольку эти белки синтезируются во всех субпопуляциях таницитов как в телах, так и в отростках этих клеток, в то время как для остальных показана региональная специфичность. Танициты в настоящее время

считаются резервной популяцией нейтральных стволовых клеток (НСК). Они способны к пролиферации и экспрессии таких общепризнанных маркеров НСК как нестин и Msi-1. Интересным фактом является то, что в области расположения таницитов нередко обнаруживаются тучные клетки – один из важнейших эффекторных элементов нейро-иммунных взаимодействий.

Астроциты

Астроциты всегда привлекали внимание исследователей и в последние годы интерес к их изучению постоянно увеличивался. Только за 2018 год в мире было опубликовано около трех с половиной тысяч научных статей с упоминанием астроцитов. Среди этих работ 955 были непосредственно посвящены изучению астроцитов (поле «MeSH Major Topic» библиографической базы данных MEDLINE). Прогресс в наших знаниях об этих глиальных клетках привел к уточнению и пересмотру их функций. Классические представления об астроцитах как о клетках, выполняющих только трофическую и опорную функции, принципиально изменился и в настоящее время признается, что астроциты способны формировать гематоэнцефалический барьер и регулировать его проницаемость, участвовать в иммунных реакциях и даже модулировать электрическую активность нейронов. В настоящее время астроциты рассматриваются в качестве одного из кандидатов на роль мультипотентных нейтральных стволовых клеток (нейрогенные астроциты). Выяснилось, что астроциты способны генерировать распространяющиеся кальциевые сигналы и высвобождать глиотрансмиттеры, обладают функциональной и морфологической пластичностью. Действительно, астроциты, не являясь электрически активными клетками, обладают при этом способностью генерировать кальциевые импульсы и осцилляции, распространяющиеся от клетки к клетке благодаря наличию щелевых межастроцитарных контактов. Кальциевые сигналы в астроцитах могут инициироваться как за счет нейрональной активности, так и спонтанно.

В связи с этим изучение структурно-функциональных особенностей астроглии как в норме, так и при развитии патологического процесса в нервной системе, представляется весьма важной задачей. Одна из существенных трудностей на

пути ее решения состоит в ненадежности (не универсальности) способов маркирования клеток астроглии, представляющих собой гетерогенную популяцию. Наиболее важными маркерами астроцитов являются – глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), ферменты - глутаминсинтетаза (GS) и дейодиназа второго типа (DIO2), мембранно-ассоциированные белки-транспортеры глутамата (GLAST, GLT-1), белок аквапорин-4 (Aqp4) и белок щелевых контактов – коннексин 43 (Cx43).

GFAP

GFAP является белком промежуточных филаментов (ПФ) клеток астроглии. Исходя из особенностей молекулярной организации все известные в настоящее время белки ПФ подразделяют на шесть основных типов. GFAP относится к III типу белков ПФ. Он участвует в образовании промежуточных филаментов как у зрелых, так и у дифференцирующихся астроцитов. Наряду с GFAP в составе ПФ астроцитов могут присутствовать и другие белки – нестин и виментин. Однако, эти белки не являются глиоспецифичными и не экспрессируются в астроцитах постоянно (в отличие от GFAP).

Основной функцией ПФ считается поддержание структурной целостности клетки, что обеспечивается связыванием ПФ с другими компонентами цитоскелета – микротрубочками и микрофиламентами, а также плазматической и ядерной мембранами. Кроме этого, они играют важную роль во внутриклеточном распределении органелл цитоплазмы.

Важную информацию о функциях GFAP предполагалось получить, используя экспериментальные модели с выключением генов, кодирующих отдельные белки ПФ. Результаты этих экспериментов оказались неожиданными и труднообъяснимыми. Так, «нокаутные» мыши, не имеющие GFAP, не проявляют признаков какого-либо существенного нарушения в функционировании органов и систем (Pekny M., et al. EMBO J. 1995. 14(8): 1590-1598). Парадоксальным оказался и тот факт, что в то время как без большинства белков ПФ животные не выживают, даже двойной нокаут GFAP и виментина (Pekny M. Prog. Brain Res. 2001. 132(1): 23-30) не приводит к летальному исходу. Полученные без этих генов мыши не только нормально развиваются, доживают до половой зрелости, но и дают

потомство, причем в астроцитах у этих животных ПФ вообще отсутствуют. Резко контрастируют с этим общеизвестные данные о том, что мутации в гене кодирующем GFAP у человека вызывают фатальную нейродегенеративную патологию (болезнь Александра / лейкодистрофию Розенталя). Таким образом, можно констатировать, что в настоящее время вопрос о функциях GFAP в составе промежуточных филаментов остается в значительной мере неясным. Тем не менее, именно GFAP остается наиболее распространенным маркером астроцитов.

Традиционно считается, что иммуноцитохимическая реакция на GFAP является удобным и надежным методом выявления астроцитов, который пригоден и для изучения их реакций на повреждающие факторы. В последние годы в научных исследованиях иммуноцитохимическая реакция на GFAP все чаще используется в сочетании с различными общегистологическими окрасками для изучения взаимоотношений астроцитов с нейронами, проведения количественной оценки нейронов и астроцитов в различных областях мозга, проведения трехмерных реконструкций астроцитов с целью изучения структурных особенностей этих клеток, а также пространственного взаиморасположения друг с другом и с другими клетками и структурами мозга. Удачным сочетанием можно считать двойную реакцию на GFAP и нейрональный белок NeuN, позволяющую одновременно выявлять как астроциты, так и нейроны.

В результате использования иммуноцитохимической реакции на GFAP удалось существенно расширить фундаментальные знания об астроглии. В частности, была внесена ясность в классификацию астроцитов, обнаруживаемых в коре головного мозга различных животных и человека (Коржевский Д.Э. и соавт. // Морфология. 2004. 126(5):7-10; Colombo J.A., Reisin H.D. // Brain Res. 2004. 1006(1): 126-131; Oberheim N.A. et al., // Trends. Neurosci. 2006. 29(10): 547-553), получены важные данные о наличии существенных межвидовых различий в структурной и цитохимической организации астроцитов первого слоя коры и поверхностной глиальной пограничной мембраны у человека и лабораторных животных, изучены астроциты субвентрикулярной зоны головного мозга,

которые, как показала их трехмерная реконструкция, по размерам, форме и характеру ветвления отростков не укладываются в классические представления о типичных астроцитах (Коржевский Д.Э. и соавт. Морфология. 2011. 139(3): 77-79). У человека была охарактеризована новая форма астроцитов коры головного мозга, имеющих длинные отростки проходящие через несколько слоев неокортекса (трансламинарные астроциты). Подобные астроциты обнаружены и в гиппокампе (рис. 3). Изучен феномен постишемической активации астроцитов (Коржевский Д.Э. и соавт. // Журн. эвол. биохимии и физиол. 2007. 43(5): 423-426). Высокая устойчивость белков ПФ к аутолитическим процессам позволила с помощью иммуноцитохимической реакции на GFAP успешно выявлять астроциты головного мозга человека на аутопсийном материале и изучать их структурную реорганизацию при реакции на механическую травму (Сухорукова Е.Г. и соавт. // Судебно-медицинская экспертиза. 2010. 1:14-16).

Вместе с тем следует отметить, что применение двойного маркирования астроцитов (GFAP/GS, GFAP/S100) показало, что GFAP экспрессируется не во всех клетках, которые имеют характерные морфологические признаки астроцитов.

GFAP – не только главный белок цитоскелета астроцитов и ключевой участник выполняемых ими функций, но еще и специфический функциональный маркер, изменение экспрессии которого свидетельствует о повреждении структур нервной системы и развитии патологического процесса в нервной ткани. Показано, что увеличение экспрессии GFAP обнаруживается при большинстве патологических состояний ЦНС, включая ишемию, травматическое повреждение мозга, воспаление, эпилепсию, нейродегенеративные заболевания. При этом наблюдается пролиферация и гипертрофия астроцитов. Такое состояние получило название «реактивный астроглиоз». Считается, что ответ астроцитов на действие патологических факторов является неспецифическим и интенсивность экспрессии GFAP зависит от силы и длительности воздействия повреждающих факторов, а не от их природы. Увеличение экспрессии GFAP происходит также и с возрастом (возрастной глиоз), при этом увеличивается как количество, так и размер астроцитов.

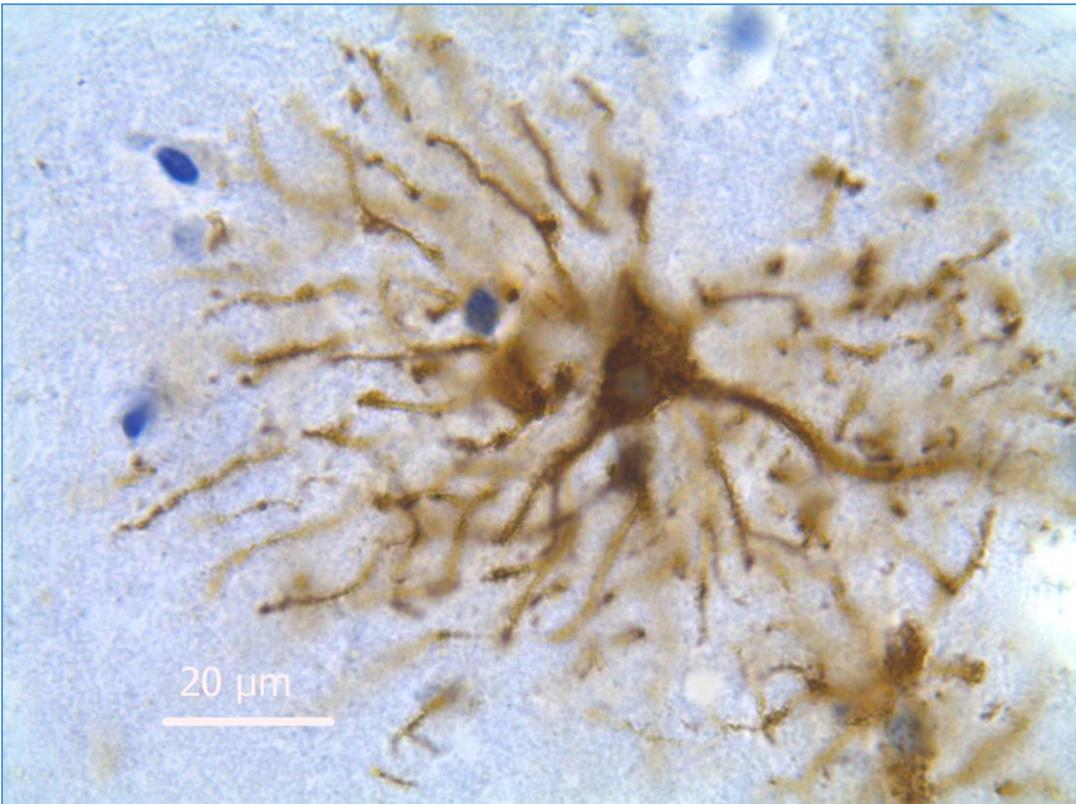
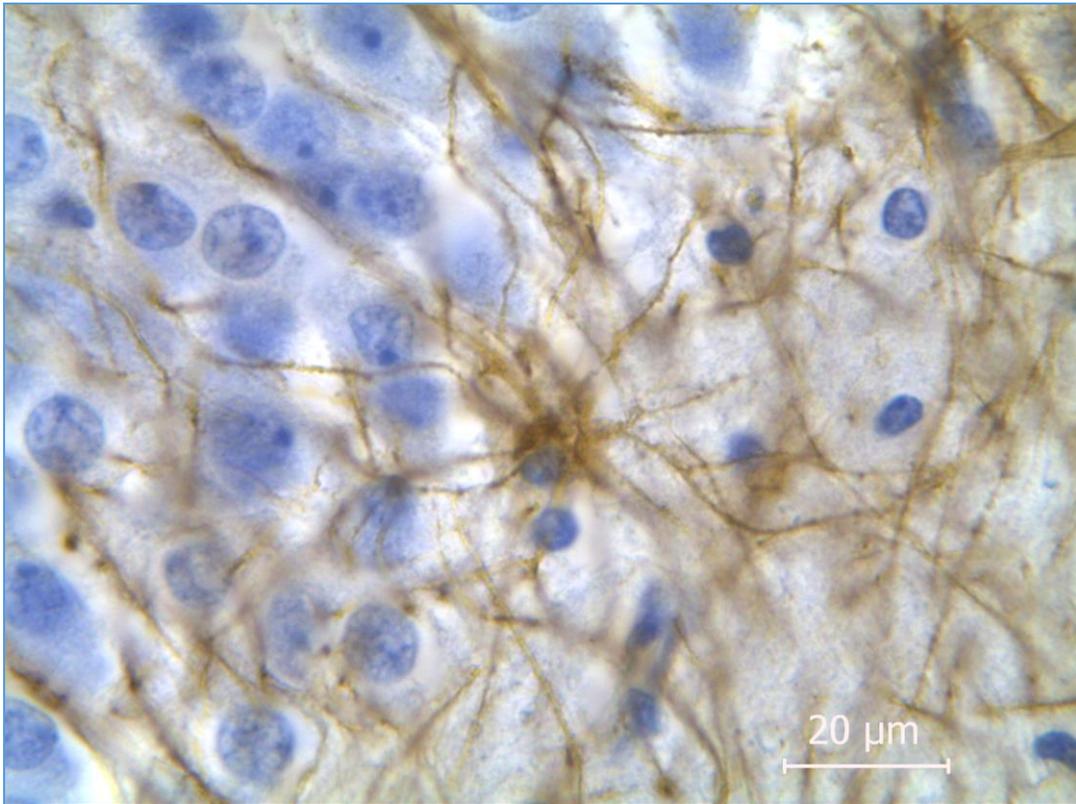


Рис. 3. Различные формы астроцитов гиппокампа человека.

Роль астроглиоза противоречива. С одной стороны, активированные астроциты, образуя подобие защитного вала и формируя глиальный рубец, отграничивают жизнеспособную мозговую ткань от зоны повреждения и препятствуют распространению патологического процесса. При этом формирование астроцитарного рубца может происходить не только за счет клеток, мигрирующих к очагу поражения из пролиферативных зон, но и *in situ* за счет митотического деления существующих астроцитов. С другой стороны, активированные астроциты продуцируют провоспалительные цитокины, в частности IL-1, IL-6, TNF- α , оказывая токсическое действие на олигодендроциты и способствуя процессам посттравматической демиелинизации. Поэтому, в случае диффузной аксональной травмы (ДАТ) и при демиелинизирующих заболеваниях астроциты выступают как антагонисты олигодендроцитов, препятствуя восстановлению нервных проводников и их ремиелинизации.

Глутаминсинтетаза

Одной из главных функций астроцитов является удаление из внеклеточной среды нервной ткани глутаминовой кислоты (глутамата). Глутамат является одним из ключевых возбуждающих нейромедиаторов в ЦНС млекопитающих. Все пирамидные нейроны в коре большого мозга – глутаматергические. Соответственно, все кортикофугальные (эфферентные) и кортико-кортикальные пути являются глутаматергическими, включая кортико-стриатные, кортико-нигральные, кортико-рубральные, кортико-таламические, кортико-спинальные (пирамидный тракт), а также комиссуральные пути. Пирамидные и гранулярные клетки гиппокампа – глутаматергические. Они, в частности, образуют эфферентные глутаматергические гиппокампальные пути (проекции на энторинальную и префронтальную кору, септум). В свою очередь, глутаматергические нейроны медиального септума проецируются на гиппокамп. Глутаматергические нейроны центромедианного и парафасцикулярного ядер таламуса образуют глутаматергический таламо-стриатный путь. В мозжечке гранулярные клетки, дающие начало параллельным волокнам – глутаматергические. Таков неполный список глутаматергических нейронов и проводящих путей.

Являясь возбуждающим нейромедиатором, глутаминовая кислота в повышенной концентрации обладает эксайтотоксичностью (высокотоксична для нейронов, имеющих рецепторы к глутамату) и может привести к так называемому глутаматному повреждению нервных клеток. Защиту от эксайтотоксического повреждения нейронам обеспечивают астроциты. Они захватывают около 80% всего глутамата, высвобождаемого в процессе синаптической передачи, и играют ключевую роль в регуляции его уровня в мозге. В астроцитах глутамат под воздействием глутаминсинтетазы (glutamine synthetase, GS) превращается в глутамин. Глутаминсинтетаза астроцитов катализирует реакцию соединения глутамата и аммиака (с участием АТФ), в результате которой образуется аминокислота глутамин и АДФ:

Глутамат + NH₃ + АТФ → Глутамин + АДФ + Pi (фосфат неорганический).

Физиологическая значимость реакции заключается в следующем. 1) Реакция происходит в астроцитах, а синтезируемый при этом безопасный для нервной ткани глутамин транспортируется в прилежащие глутаматергические и ГАМКергические нейроны, где глутамин (с помощью фермента глутаминазы) превращается, соответственно, в глутаминовую кислоту для использования в глутаматной синаптической передаче, либо – так же в глутаминовую кислоту, а затем в гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК) с помощью глутаматдекарбоксилазы. Т.е., образующийся в астроцитах глутамин идёт на синтез нейромедиаторной глутаминовой кислоты в глутаматергических нейронах или нейромедиаторной ГАМК - в гамкергических нейронах. 2) Поскольку данная реакция для синтеза глутамина использует аммиак, то она также способствует удалению (инактивации) в мозге избытка ионов аммония, который возникает, в частности, при недостаточности функций печени, способствующей развитию тяжелой энцефалопатии.

Фермент глутаминсинтетаза является специфическим биохимическим маркером астроцитов. Результаты большинства (но не всех) иммуногистохимических исследований свидетельствуют о присутствии GS исключительно в астроцитах

и отсутствии данного фермента в других клетках мозга – олигодендроцитах, нейронах, клетках микроглии, перицитах, эндотелиальных клетках. Данные о высокой активности GS в астроцитах нашли подтверждение и в исследованиях, выполненных *in vitro*. В отношении же возможности присутствия GS в олигодендроцитах до последнего времени сохранялась неопределенность. Использование нового метода фиксации (Korzhevskii D., et al., *Eur J Histochem.* 2015 59(3): 233-237), позволяющего хорошо сохранять антигенные свойства белков, и применение наиболее надежных моноклональных антител убедило нас в том, что GS действительно может синтезироваться олигодендроцитами. Это убедительно демонстрируется при использовании двойной реакции GFAP/GS (рис. 4).

В отличие от GFAP, GS равномерно распределяется по всей цитоплазме астроцитов. Считается, что интенсивность иммуноцитохимической реакции на GS сопоставима у волокнистых и протоплазматических астроцитов (первые преимущественно локализованы в белом веществе, вторые - в сером веществе головного мозга), хотя по нашим данным подобное мнение не вполне соответствует действительности (по крайней мере у кролика отростки астроцитов белого вещества могут быть лишены GS).

Гомозиготная мутация в гене глутаминсинтетазы *GLUL* у человека приводит к значительному снижению активности фермента, что сопровождается развитием ряда патологий мозга, появлением судорожных припадков, полиорганной недостаточности и, в конечном счете ведет к ранней смерти (Haberle J., et al., *J. Inherit. Metab. Dis.* 2006 29: 352-358). Ряд неврологических заболеваний ассоциирован с нарушением работы GS. У пациентов с эпилепсией отмечено значительное снижение экспрессии и активности GS в гиппокампе, несмотря на пролиферацию и активацию астроцитов в данной области (Eid T., et al., *Lancet.* 2004. 363:28–37). Снижение активности GS выявлено также в образцах ткани мозга, полученных посмертно от людей с болезнью Альцгеймера (Hensley K., et al., *J. Neurochem.* 1995. 65: 2146-2156; Smith C.D., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991. 88: 10540-10543).

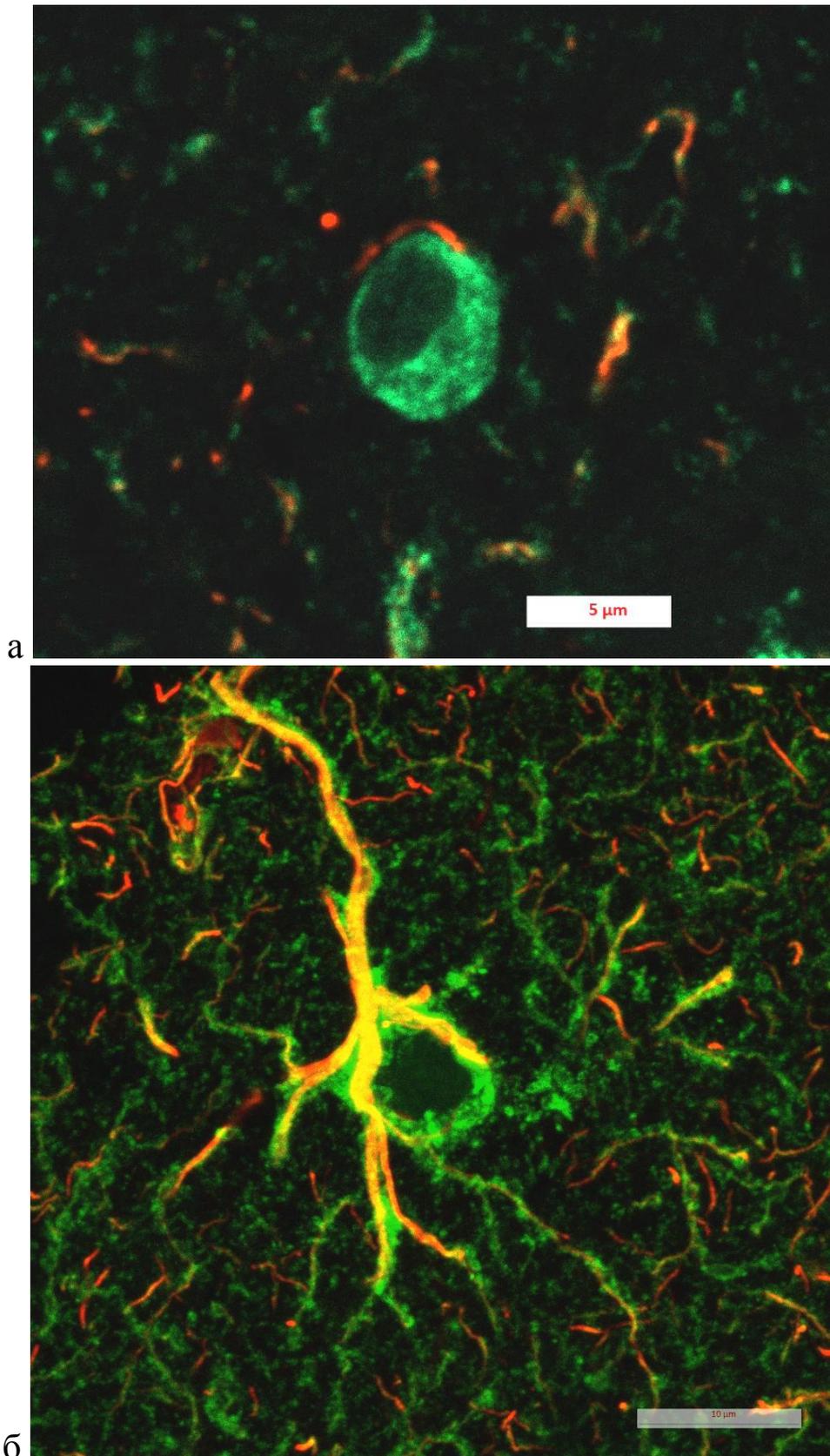


Рис.4. Олигодендроцит (а) и астроцит (б).

Двойная иммуноцитохимическая реакция на GFAP (красный) и GS (зеленый). Область совпадения локализации маркеров – желтый цвет. Головной мозг кролика, конфокальная микроскопия.

Астроциты, несомненно, являются активным участником нейродегенеративного процесса. Это со всей очевидностью было показано еще в начале XX века с использованием классических нейрогистологических методов. Хорошо известно, что астроциты являются главным клеточным компонентом амилоидных бляшек (рис. 5), появляющихся в неокортексе человека при болезни Альцгеймера и сенильной деменции, однако роль астроцитов на ранних стадиях нейродегенеративного процесса остается предметом дискуссий. С одной стороны, показано, что активированные астроциты могут участвовать в деградации и удалении β -амилоида (A β). С другой стороны, многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что при определенных условиях (под влиянием TGF- β 1, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β) астроциты сами способны продуцировать A β , внося тем самым существенный вклад в общее количество амилоида, накапливающегося в мозге. Наконец, имеются свидетельства того, что реактивные астроциты, окружающие амилоидные бляшки, утрачивают свои нейротрофические функции и приобретают нейротоксические свойства за счет синтеза ряда цитокинов (IL-1, IL-6, TNF- α и др.), продукция которых усиливает нейродегенеративные процессы при болезни Альцгеймера (Perez-Nievas G.B., Serrano-Pozo A. // *Front Aging Neurosci.* 2018; 10: 114). Способствовать правильному пониманию роли астроцитов при развитии нейродегенерации должны помочь исследования ранних стадий развития амилоидных бляшек, которые присутствуют в коре большого мозга у лиц пожилого возраста, не имеющих клинических признаков патологии альцгеймеровского типа. Кроме того, нельзя забывать, что наряду с астроцитами значительным нейротоксическим потенциалом обладает и активированная микроглия, которая может участвовать в формировании амилоидных бляшек.

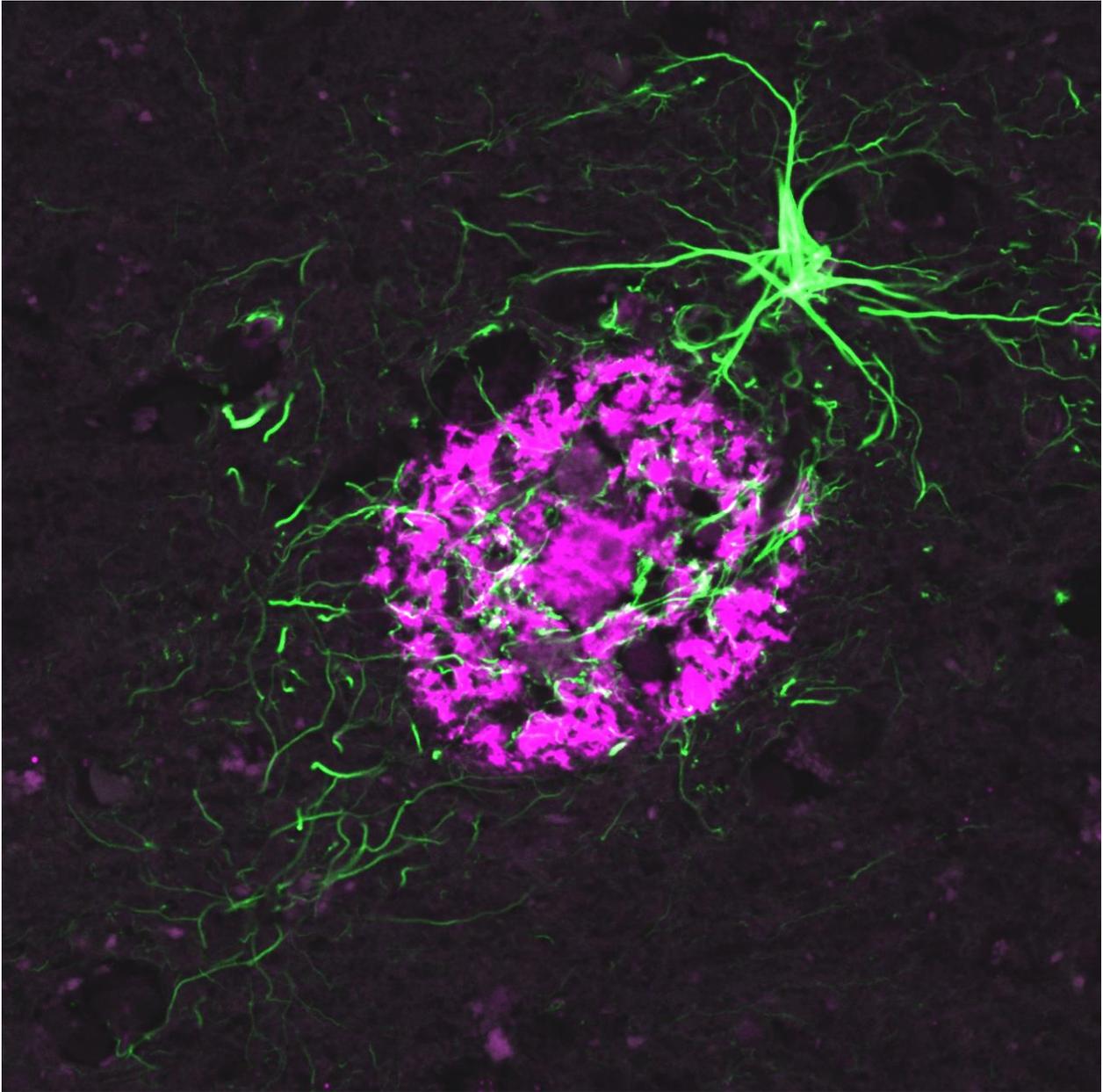


Рис. 5. Амилоидная бляшка в коре головного мозга человека.
Двойная иммуноцитохимическая реакция на астроцитарный белок GFAP (зеленый) и β -амилоид (фиолетовый).
Конфокальная лазерная микроскопия.

Микроглия

Микроглия является основным регуляторным компонентом барьерной системы головного мозга, в составе которой принято выделять гематоэнцефалический, ликвороэнцефалический и гематоликворный барьеры (ГЭБ, ЛЭБ и ГЛБ соответственно). Благодаря существованию этих барьеров, головной мозг в значительной степени изолирован от клеток иммунной системы, циркулирующих в крови. Функцию иммунной защиты в мозге осуществляют микроглиальные клетки. Их совокупность составляет внутреннюю (собственную) иммунную систему мозга. Они образуют первую линию защиты ЦНС от различных возбудителей инфекций, способных преодолеть эндотелиальный барьер. Микроглиоциты присутствуют во всех областях головного мозга животных и человека, однако, распределение их в структурах мозга различно.

Микроглия, благодаря лабильности формы отростков, является одним из основных морфологических маркеров состояния мозговых формаций при различных патологиях и экспериментальных воздействиях. Для изучения состояния микроглии при развитии таких распространенных нейропатологий человека, как рассеянный склероз, эпилептиформная активность, ишемия и др., в современной экспериментальной биологии и медицине часто используются зооморфные экспериментальные модели, существенно удаленные от человека. И речь идет, прежде всего, о различных видах лабораторных животных. Экстраполяции результатов модельных исследований на человека можно проводить только при наличии выраженного параллелизма в организации и цитохимических свойствах микроглии гомологичных областей мозга лабораторных животных и человека, в отношении чего имеются определенные сомнения. Существование противоречивых данных, полученных с использованием различных морфологических методов и экспериментальных подходов, обуславливает необходимость тщательного анализа и систематизации полученных ранее данных о происхождении, структуре и функциях микроглии отдельных регионов головного мозга и, в частности, нейрогенных зон, составляющих основу собственного восстановительного потенциала ЦНС.

Уже в ранних исследованиях было высказано обоснованное предположение о том, что микроглия (в противоположность другим клеткам нервной ткани) имеет мезодермальное происхождение. Вскоре после открытия микроглиоцитов П. дель Рио-Ортегой эти клетки стали обозначать как «мезоглию» и клетки Ортега (Гортега). Такие названия нередко использовали и отечественные нейробиологи и патологи. В настоящее время эти дополнительные термины не используются. В России открытие микроглии стимулировало интерес к изучению этой новой разновидности глиальных клеток у ряда ученых, среди которых следует отметить имена В.К. Белецкого, М.М. Александровской и П.Е. Снесарева, внесших весомый вклад в развитие отечественной неврологии и нейроморфологии.

До появления современных иммуноцитохимических маркеров микроглии существовали только методы импрегнации, которые не обладали хорошей воспроизводимостью, были достаточно трудоемки и требовали исключительно высокого профессионализма при их применении в лаборатории. И лишь с 80-х годов XX века в гистологическую практику прочно вошли относительно специфические реагенты для выявления клеток микроглии – антитела к ферритину, к белкам главного комплекса гистосовместимости, лектины. В 1996 г. был охарактеризован новый высокоселективный маркер микроглии – белок Iba-1 (Imai Y., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. 224(3): 855–862). Достоинством этого маркера является широкая межвидовая консервативность антигенных эпитопов, что позволяет использовать антитела к этому белку для выявления микроглии у различных лабораторных животных и человека (Korzhevskii D.E., Kirik O., Sukhorukova E. *Immunocytochemistry of microglial cells // Neuromethods.* 2015. 101: 209-224). Преимуществом Iba-1 как селективного микроглиального маркера, является возможность проводить с его использованием трехмерные реконструкции клеток и изучать сложную организацию отростков микроглиоцитов на участках большой площади (рис. 6).

Микроглиоциты – это клетки, имеющие малые размеры перинуклеарной области (около 6 мкм в длину и 3-4 мкм в ширину). Ядра этих клеток также вытянутые (овальные), изредка встречаются клетки с ядрами округлой или треугольной формы.

Гетерохроматин в ядрах преимущественно локализуется вблизи ядерной оболочки, иногда его скопления наблюдаются и в центре ядра. Нередко в ядрах микроглиоцитов определяются очаговые скопления белка Iba-1. Ядро окружает тонкий слой перинуклеарной цитоплазмы. В этой зоне располагаются немногочисленные органеллы: митохондрии, эндоплазматический ретикулум, комплекс Гольджи, центриоли, лизосомы и липидные капли. От перинуклеарной зоны отходят немногочисленные тонкие отростки, которые начинают ветвиться обычно на расстоянии около 5 мкм от тела клетки. Такая микроглия называется отростчатой (многоотростчатой) или разветвленной.

Благодаря форме клетки и пространственной ориентации отростков формируется круглая, овальная или веретенообразная уплощенная микротерритория, которая контролируется каждой индивидуальной клеткой. В здоровом зрелом мозге микроглиальные клетки неподвижны, только небольшая их часть (5%) может совершать микроперемещения, изменяя свое местоположение на 1-2 мкм. В противоположность этому, отростки микроглиоцитов находятся в постоянном движении, регулярно проходя циклы элонгации и сокращения. Сокращение и удлинение отростков происходят со скоростью около 1.5 мкм/мин. Помимо этого, на отростках постоянно формируются временные филоподиеподобные образования.

Большая подвижность отростков позволяет микроглии осуществлять мониторинг окружающей микросреды и очищать ее от накопленных продуктов метаболизма и поврежденных тканевых элементов.

При трансформации отростчатой микроглии в амебоидную происходит увеличение размеров тела клетки (за счет возрастания объема перинуклеарной цитоплазмы). При этом отростки укорачиваются и утолщаются. В цитоплазме появляется большое количество лизосом, гипертрофируется комплекс Гольджи. У фагоцитирующей микроглии в цитоплазме регистрируются множественные фагосомы.

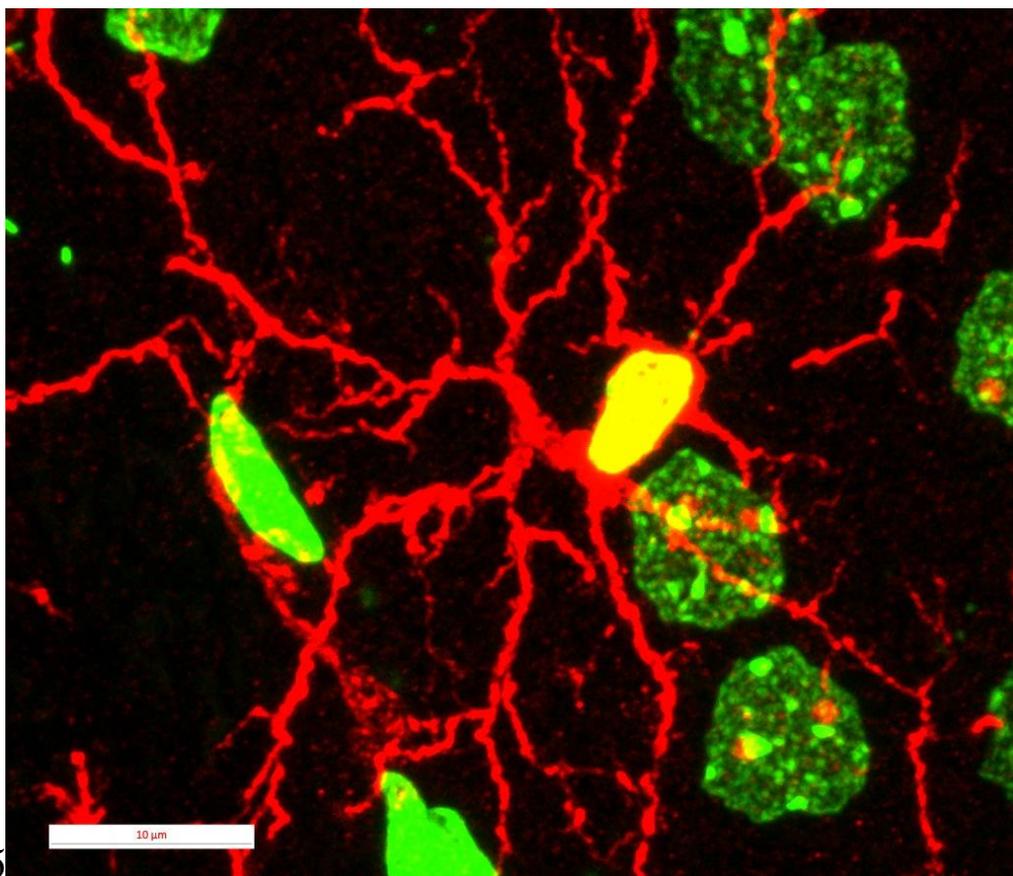
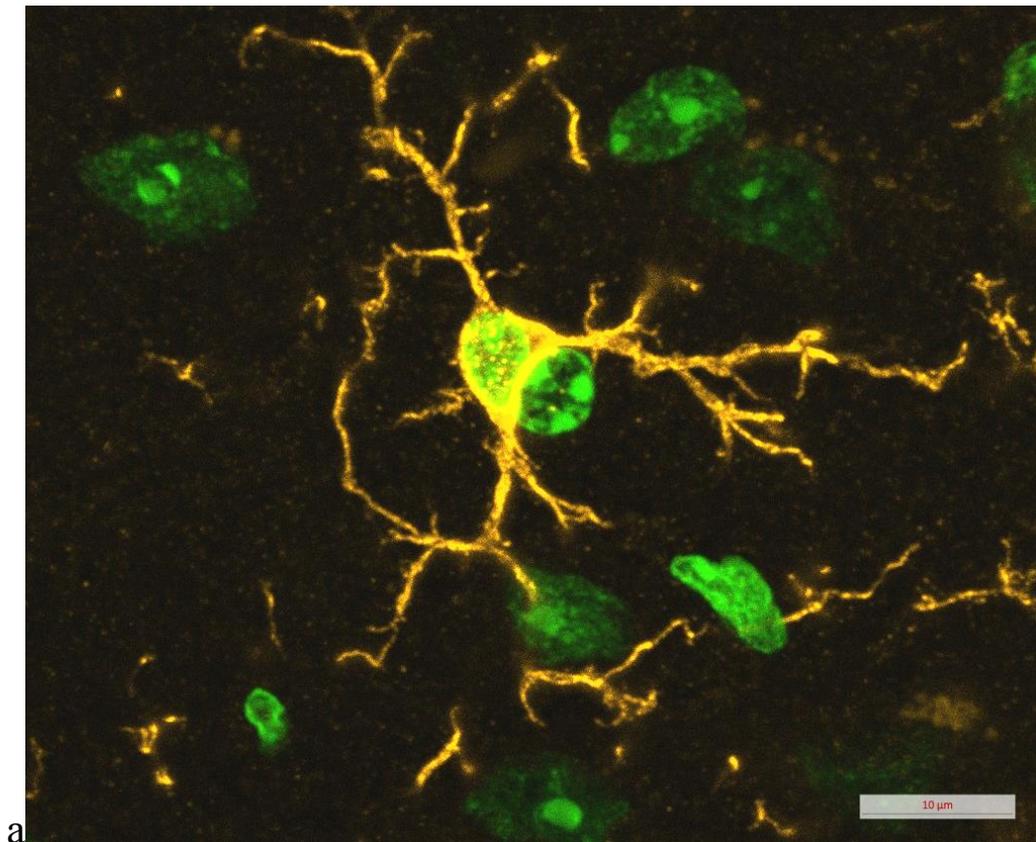


Рис. 6. Микроглиоциты головного мозга мыши (а) и крысы (б).

Иммуноцитохимическая реакция на белок Iba-1. Ядра клеток подкрашены флуоресцентным красителем SYTOX-Green. Конфокальная микроскопия.

Отростчатая микроглия является неактивной или «покоящейся» (по старой терминологии) формой микроглии. Такое неактивное состояние находится под контролем ряда нейрональных факторов, включающих CD200 и фракталкин (CX3CL1). CD200 – гликопротеин, экспрессирующийся на мембранах нейронов. Его рецептор (CD200R) находится на мембранах микроглиальных клеток. Взаимодействие рецептора и лиганда (CD200) поддерживает микроглию в неактивном состоянии. Кроме CD200, в неактивном состоянии микроглию поддерживает и другой нейрональный фактор – фракталкин, синтезируемый не только нейронами, но и эндотелиоцитами капилляров мозга. Связывание фракталкина с его рецепторами, локализованными на мембране микроглиоцитов поддерживает эти клетки в многоотростчатом (неактивном) состоянии. Фракталкин-сигналинг задействован в нейрон-микроглиальных взаимодействиях в нейрогенных нишах. Деплеция рецептора фракталкина или применение фармакологических антагонистов этого рецептора у молодых крыс приводит к снижению скорости нейрогенеза (Bachstetter A.D., et al. *Neurobiol. Aging*. 2011. 32(11): 2030-2044). Уровень фракталкина падает с возрастом и у старых животных это может приводить к усилению эндогенной внутримозговой воспалительной реакции (нейровоспаления) и подавлению нейрогенеза. Инъекция фракталкина старым животным восстанавливает нейрогенез и возвращает микроглию в неактивное состояние. Утрата фракталкин/CX3CR1-сигналинга способствует нарушению моторной памяти, когнитивных функций и синаптической пластичности путем активации микроглии и усиления нейровоспаления (Rogers J.T., et al., *J. Neurosci*. 2011. 31(45): 16241–16250). Потеря связей между нейронами и микроглией способствует активации последней, что усиливает нейровоспаление, вызванное высвобождением провоспалительных цитокинов. Эти процессы могут иметь важное значение при старении.

Подобно тканевым макрофагам, микроглию подразделяют на две функциональные категории: классически активированный провоспалительный фенотип M1, характеризующийся продуцированием провоспалительных и нейротоксических медиаторов; и альтернативно активированный фенотип M2,

участвующий в репарации ткани и ремоделировании, характеризующийся секрецией противовоспалительных медиаторов. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что дисрегуляция микроглии и дисбаланс этих фенотипов могут приводить к возникновению многих аутоиммунных проявлений.

В физиологических условиях в зрелом мозге микроглия может продуцировать различные нейротрофические факторы, такие как BDNF (нейротрофический фактор мозга), GDNF (нейротрофический фактор глиальных клеток). Эта функция контролируется цитокинами, хемокинами, трофическими факторами и другими молекулами. Имеющиеся данные указывают на то, что микроглия имеет рецепторы для нейромедиаторов, нейропептидов и нейромодуляторов, что определяет связь между реакцией микроглии и нейрональной активностью.

Ультраструктурными и иммуноцитохимическими исследованиями в цитоплазме микроглиоцитов были обнаружены поглощенные фрагменты синаптических контактов. Разветвленная микроглия может поглощать синаптические структуры благодаря специальным механизмам, включающих фагоцитоз аксонных терминалей и дендритных шипиков, тем самым участвуя в реорганизации межнейронных связей.

Таким образом, в здоровом взрослом мозге с нормально функционирующими ГЭБ и ЛЭБ, микроглиальные клетки принимают участие в регуляции процессов образования новых нейронов, изменения их физиологической активности, синаптической пластичности и апоптоза. При патологии, проявлением которой служит развитие особой формы воспалительной реакции - нейровоспаления, формируется амeboидный фенотип микроглии, для которого характерно преобладание фагоцитарной функции и секреции цитокинов. Проявления локальной активации микроглии обнаружены при таких нейродегенеративных заболеваниях как болезни Паркинсона и Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз (БАС), рассеянный склероз.

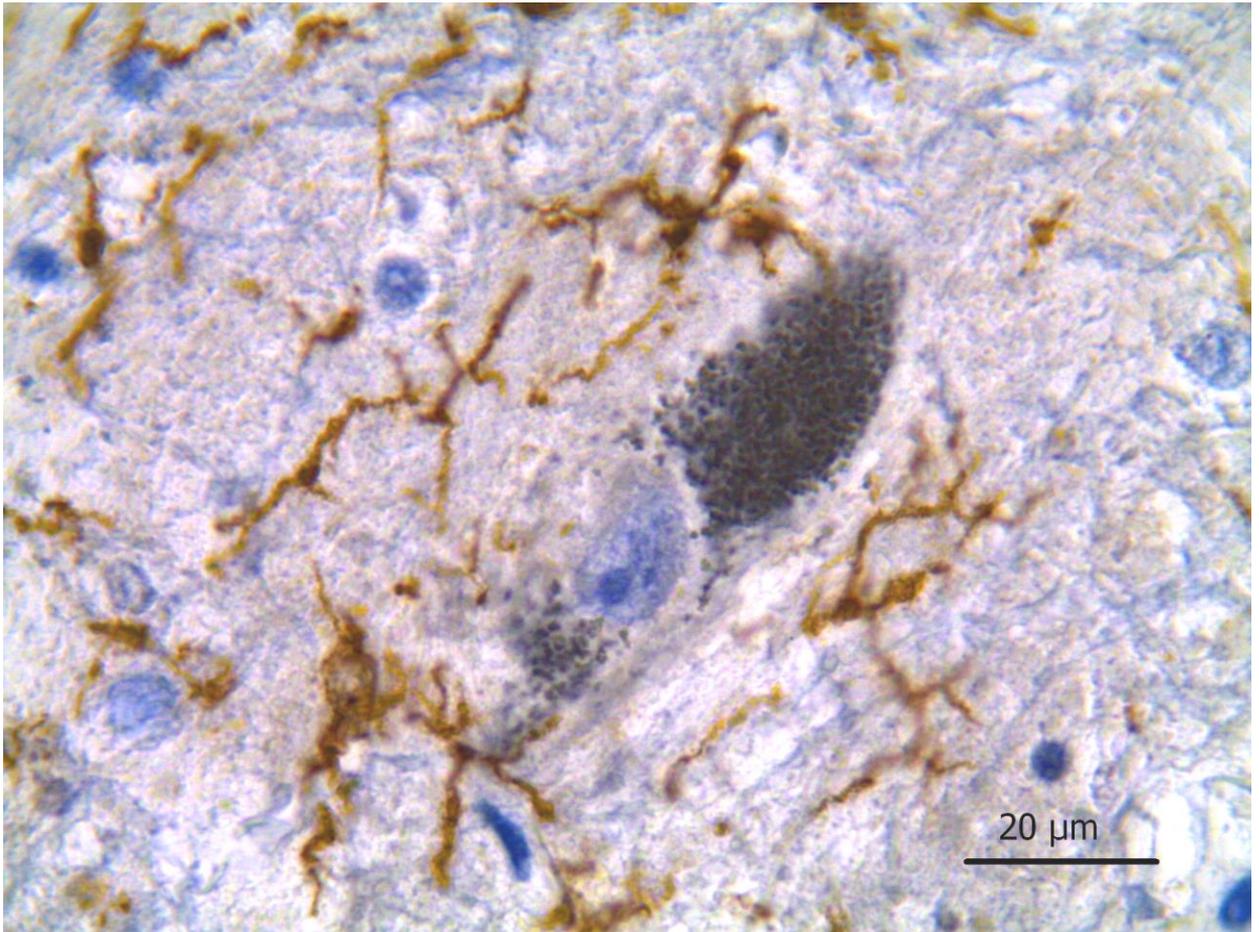


Рис.7. Активированная микроглия черного вещества головного мозга человека при отсутствии признаков болезни Паркинсона (гибнущих нейронов, клеток-теней, телец Леви). В центре препарата – нейромеланин-содержащий дофаминергический нейрон. Гранулы нейромеланина – черные, ядра клеток – синие, микроглия – коричневые.

Иммуногистохимическая реакция на белок Iba-1 с подкраской гематоксилином.

Появляется все больше свидетельств того, что нейровоспаление, опосредованное микроглией играет важную роль в патогенезе болезни Паркинсона. При этом важную роль отводят балансу M1/M2 состояний этих клеток. Однако о том, какой фенотип микроглии преобладает при болезни Паркинсона известно мало. Для достижения нового уровня знаний о роли микроглии в патогенезе болезни Паркинсона необходимы исследования ранних стадий развития заболевания в сочетании с

определением статуса микроглии черного вещества головного мозга вне данной патологии (рис. 7). Для выявления признаков нейровоспаления наиболее информативным было бы сочетание методов, позволяющих выявлять двух главных участников этой реакции – астроцитов и микроглиоцитов. С этой целью удобно использовать двойную реакцию GFAP/Iba-1.

Развитие БАС характеризуется поражением преимущественно двигательных нейронов спинного мозга и является как спорадическим, так и генетически обусловленным нейродегенеративным заболеванием. Развитие нейродегенеративного процесса сопровождается появлением патологических белковых агрегатов в цитоплазме нервных клеток, наиболее характерными из которых являются тельца Буниной и скопления белка TDP-43. Несмотря на то, что причина патологии по всей видимости кроется в первичном поражении нейронов, на экспериментальной модели mSOD была выявлена активация микроглии спинного мозга по провоспалительному типу, что указывает на ее нейротоксическую роль в патогенезе заболевания. Против этого свидетельствуют исследования выполненные на модели TDP-43-протеинопатии (Spiller K., et al. *Nature Neurosci* 2018, 21(3):329-340), которые указывают на защитный характер активации микроглии в этой модели БАС. Не исключено, что роль микроглии в патогенезе БАС может быть двойной и различается на разных стадиях развития заболевания.

Известно, что морфологические характеристики и функциональная активность микроглии меняются при старении. Особый интерес в этом контексте представляет участие микроглии в патогенезе хронического болевого синдрома (нейропатической боли). Ряд исследований указывает на развитие аномального болевого поведения у грызунов при старении. При изучении популяции микроглиоцитов спинного мозга было показано, что у стареющих животных существенно увеличивается количество как Iba1-иммунопозитивных клеток, так и доля гипертрофированных микроглиоцитов. Кроме того наблюдается заполнение клеток микроглии липофусцином и ретракция их отростков (Lee S., et al., *Immun.Ageing*. 2015. doi: 10.1186/s12979-015-0049-5). Накопление липофусцина свидетельствует как о дистрофических изменениях, так и о провоспалительной активации клеток

микроглии. Многие исследования демонстрируют, что микроглиоциты спинного мозга стареющих животных проявляют преимущественно провоспалительный фенотип, а локализованы активированные микроглиоциты у старых животных в основном в области сенсорных ядер спинного мозга, нейроны которых участвуют в обработке ноцицептивных сигналов. Эти факты указывают на существенную роль активированной микроглии в развитии нейропатической боли при старении.

Таким образом, на основании изложенных фактов можно сделать вывод о том, что роль астроцитов и микроглии в развитии нейродегенеративных процессов недооценивается. Она может оказаться не вспомогательной, а определяющей. Однако для окончательного обоснования этого положения не хватает данных о ранних стадиях развития патологии у человека. В связи с тем, что в экспериментальных моделях нейродегенеративных заболеваний роль глиальных клеток представляется противоречивой, необходимо всестороннее изучение региональных особенностей глиальных компонентов нервных центров у человека. Эта фундаментальная задача до настоящего времени не решена. Решение этой задачи, несомненно, откроет широкие перспективы для разработки новых средств персонализированной терапии и профилактики наиболее тяжелых хронических заболеваний нервной системы.

В заключение хочу поблагодарить:

Дирекцию Института экспериментальной медицины за возможность представить Вашему вниманию доклад в этот торжественный день;

Петра Валерьевича Пигаревского, заведующего Отделом общей и частной морфологии, за помощь и поддержку;

Всех сотрудников Лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, целеустремленность и профессионализм которых позволяют получать научные результаты высокого качества.

12.12.2019