

МИКРОГЛИЯ И ПРЕДПОЛАГАЕМЫЕ МАКРОФАГИ СУБФОРНИКАЛЬНОГО ОРГАНА: СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ

В. В. Гусельникова^{1,2} ✉, В. А. Разенкова¹, Д. А. Суфиева¹, Д. Э. Коржевский¹

¹ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Субфорникальный орган является важным регулятором водно-солевого обмена и энергетического баланса организма, участвует в контроле работы сердечно-сосудистой системы и иммунной регуляции. В состав субфорникального органа входят разные клеточные популяции, среди которых неохарактеризованными остаются микроглия и макрофаги. Целью работы было изучить структурные, цитохимические и функциональные характеристики микроглии и макрофагов субфорникального органа головного мозга крысы. Исследовали образцы головного мозга половозрелых крыс-самцов породы Вистар ($n = 8$). Для выявления микроглии и макрофагов применяли поли- и моноклональные антитела против кальций-связывающего белка Iba1 и лизосомного белка CD68 и анализировали препараты методами световой и конфокальной лазерной микроскопии. В рамках исследования дана комплексная морфологическая характеристика клеток микроглии и макрофагов субфорникального органа. Показано, что большинство Iba1-содержащих клеток этой области головного мозга являются микроглиями, а не макрофагами. Микроглия субфорникального органа находится в преактивированном состоянии, что может быть обусловлено структурно-функциональными особенностями этого органа и специфическими функциями местной микроглии. Среди Iba1-содержащих клеток в субфорникальном органе выявлена особая популяция субependимных микроглиями, отростки которых проникают в полость третьего желудочка головного мозга. Помимо микроглии в субфорникальном органе обнаружены единичные тканевые макрофаги, для которых характерно высокое содержанием CD68, но незначительное количество или отсутствие Iba1.

Ключевые слова: субфорникальный орган, микроглия, макрофаги, циркумвентрикулярные органы

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, проект № 22-25-00105, <https://rscf.ru/project/22-25-00105/>

Вклад авторов: В. В. Гусельникова — анализ литературы, интерпретация результатов, подготовка рукописи; В. А. Разенкова — отработка протоколов иммунофлуоресцентных реакций, проведение конфокальной лазерной микроскопии; Д. А. Суфиева — гистологическая проводка биологического материала, постановка иммуногистохимических реакций для световой микроскопии; Д. Э. Коржевский — концепция, планирование исследования, редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (протокол № 1/22 от 18 февраля 2022 г.), проведено в полном соответствии с положениями Хельсинкской декларации (2013 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Валерия Владимировна Гусельникова
ул. Акад. Павлова, д. 12, г. Санкт-Петербург, 197376, Россия; guselnicova.valeriia@yandex.ru

Статья получена: 27.03.2022 **Статья принята к печати:** 18.04.2022 **Опубликована онлайн:** 28.04.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.020

MICROGLIA AND PUTATIVE MACROPHAGES OF THE SUBFORNICAL ORGAN: STRUCTURAL AND FUNCTIONAL FEATURES

Guselnikova VV^{1,2} ✉, Razenkova VA¹, Sufieva DA¹, Korzhevskii DE¹

¹ Institute of Experimental Medicine, St Petersburg, Russia

² St Petersburg State University, St Petersburg, Russia

The subforanical organ is an important regulator of water-salt metabolism and energy balance of the body, involved in the control of the cardiovascular system and immune regulation. The organ comprises several cell populations, among which microglia and macrophages remain uncharacterized. The study aimed at structural, cytochemical, and functional characterization of microglia and macrophages of the subforanical organ in rats. Brain specimens were collected from mature male Wistar rats ($n = 8$). Microglia and macrophages were revealed by immunostaining with poly- and monoclonal antibodies against calcium-binding protein Iba1 and lysosomal protein CD68; the slides were examined by light and confocal laser microscopy. The study provides a complex morphological characterization of microglial cells and macrophages of the subforanical organ. We demonstrate that the majority of Iba1-expressing cells in this area of the brain are microglial cells, not macrophages. Microglia of the subforanical organ reveals preactivated state, which may reflect structural and functional features of this organ and specific functions of local microglia. Subependymal microglial cells, the processes of which penetrate into the cavity of the third ventricle of the brain, constitute a distinct subpopulation among the Iba1-expressing cells of the subforanical organ. Apart from microglial elements, the subforanical organ contains sparse tissue macrophages with characteristic strong expression of CD68 accompanied by undetectable or weak expression of Iba1.

Keywords: subforanical organ, microglia, macrophages, circumventricular organs

Funding: the study was supported by Russian Science Foundation, RSF Project № 22-25-00105, <https://rscf.ru/project/22-25-00105/>

Author contribution: Guselnikova VV — literature analysis, interpretation of the results, manuscript preparation; Razenkova VA — fluorescence immunoassay protocols development, confocal laser microscopy; Sufieva DA — histological processing, immunochemical staining, light microscopy; Korzhevskii DE — concept and planning of the study, editing of the manuscript.

Compliance with ethical standards: the study was approved by Ethical Review Board at the Institute of Experimental Medicine (Protocol № 1/22 of 18 February 2022) and carried out in full compliance with the 2013 Declaration of Helsinki.

✉ **Correspondence should be addressed:** Valeria V. Guselnikova
Akad. Pavlova, 12, St Petersburg, 197376, Russia; guselnicova.valeriia@yandex.ru

Received: 27.03.2022 **Accepted:** 18.04.2022 **Published online:** 28.04.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.020

Субфорникальный орган (*organum subfornicum*) локализован вблизи свода конечного мозга (fornix) вдоль передней стенки третьего желудочка, где занимает дорсальный конец терминальной пластинки, немного выступая в просвет третьего желудочка. Важный регулятор водно-солевого обмена и энергетического баланса организма, он участвует в контроле работы сердечно-сосудистой системы и иммунной регуляции [1, 2]. Это обуславливает интерес исследователей к изучению общей структуры и клеточного состава субфорникального органа, который остается на сегодняшний день одной из самых загадочных структур мозга.

Микроглия и макрофаги являются резидентами субфорникального органа. Эти два типа клеток выполняют схожие функции, однако различаются структурно (по профилю экспрессии ряда генов и иммунофенотипу) и онтогенетически (по источнику происхождения). Важность их изучения в контексте исследований субфорникального органа определяется тем, что он относится к циркумвентрикулярным органам, для которых характерно отсутствие гемато-энцефалического барьера. Вследствие этого местные макрофаги и микроглия, в отличие от аналогичных клеток в других отделах головного мозга, находятся в постоянном контакте с циркулирующими в крови молекулами [3], что подразумевает наличие у этих клеток определенных структурно-функциональных особенностей. Еще большую актуальность изучение микроглии и макрофагов субфорникального органа приобретает в связи с его возможной вовлеченностью в течение коронавирусной инфекции. В настоящее время известно, что SARS-CoV-2 обладает сильным нейротропизмом [4]. Как полагают, хроническая активация микроглии, наблюдаемая в циркумвентрикулярных органах в норме, способствует тому, что микроглия в этих областях обладает повышенной чувствительностью и гиперактивируется в ответ на любые патологические воздействия (например, на инфицирование SARS-CoV-2) [5]. Следствие гиперактивации — формирование провоспалительного фенотипа микроглии, что сопровождается активным синтезом провоспалительных медиаторов и усилением фагоцитоза. В результате, при инфицировании SARS-CoV-2 в циркумвентрикулярных органах развивается нейровоспаление, приводящее к нейродегенерации. Кроме того, активацию микроглии сопровождается увеличением ее подвижности, что приводит к миграции амебоидной микроглии в другие области мозга и способствует распространению нейровоспаления [5], что может быть одной из причин развития неврологических симптомов у пациентов с коронавирусной инфекцией.

Цель работы — изучение структурных, цитохимических и функциональных характеристик микроглии и макрофагов субфорникального органа головного мозга крысы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на образцах головного мозга половозрелых (3–5 месяцев) крыс-самцов породы Вистар ($n = 8$). Животные были получены из питомника лабораторных животных «Раполово» (Ленинградская область, Россия) и содержались в виварии при комнатной температуре с 12-часовым циклом свет/темнота и свободным доступом к корму и воде. Образцы головного мозга фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [6] и заливали в парафин (Paraffin Type 6, ThermoScientific Richard-Allan Scientific; США) по стандартной методике. С парафиновых блоков на

ротационном микротоме Microm HM 325 (ThermoScientific; США) изготавливали фронтальные срезы толщиной 5 мкм, содержащие область субфорникального органа, которые наклеивали на предметные стекла с адгезивным покрытием (Menzel; Германия). После стандартной процедуры депарафинирования и регидратации срезы подвергали тепловому демаскированию в 10%-м водном растворе тиосульфата натрия в течение 23 мин [7].

Для светооптического исследования микроглии и/или макрофагов применяли кроличьи поликлональные антитела к Iba1 (Biocare medical; США) в разведении 1 : 1500 и мышиные моноклональные (клон ED1) антитела к CD68 (Abcam; Великобритания) в разведении 1 : 4000. В качестве вторичного реагента использовали набор Reveal Rabbit Specific HRP-DAB Detection System в разведении производителя (Spring Bioscience; США). Для визуализации продукта реакции применяли хромоген 3'3-диаминобензидин из набора DAB+ (Agilent; США). После проведения реакции часть срезов подкрашивали квасцовым гематоксилином.

Для иммунофлуоресцентного выявления Iba1 на срезы наносили кроличьи поликлональные антитела в разведении 1 : 1000 (Biocare medical; США). Для визуализации комплекса антиген-антитело использовали сначала Reveal Rabbit Specific HRP-DAB Detection System в разведении производителя (Spring Bioscience; США), а затем козы антитела против HRP, конъюгированные с флуорохромом Cy3 (Cy3-conjugated AffiniPure Goat antihorseradish Peroxidase, Jackson Immuno Research; США). Для подкраски ядер клеток применяли ядерный флуоресцентный краситель SYTOX Green (InvitroGen; США).

Для постановки двойной иммунофлуоресцентной реакции Iba1/CD68 на срезы наносили смесь кроличьих поликлональных антител к Iba1 в разведении 1 : 500 (Biocare medical; США) и мышиных моноклональных антител к CD68 в разведении 1 : 1000 (Agilent; США) в соотношении 1 : 1. В качестве вторичных реагентов применяли смесь антител против иммуноглобулинов кролика, меченных биотином (из набора R&D Systems; США), и реагента EnVision+HRP-Anti-Mouse (Agilent; США). После инкубации в смеси вторичных антител срезы последовательно обрабатывали раствором конъюгата стрептавидина с флуорохромом Cy2 (Jackson ImmunoResearch; США) и раствором против HRP, конъюгированных с флуорохромом Cy3 (Jackson Immuno Research; США).

Анализ и фотографирование препаратов проводили с использованием светового микроскопа Leica DM750 (Leica; Германия), оснащенного фотокамерой ICC50 (Leica; Германия), и конфокального лазерного микроскопа LSM800 (Zeiss; Германия). Для возбуждения флуоресценции Cy2 и SYTOX Green применяли лазер с длиной волны 488 нм, для Cy3 — 561 нм. Анализ полученных изображений проводили при помощи компьютерных программ ZEN2012 и LSM Image Browser (Zeiss; Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты иммуногистохимического выявления кальций-связывающего белка Iba1

После постановки иммуногистохимической реакции на кальций-связывающий белок Iba1, являющийся маркерным белком микроглии и макрофагов, иммунопозитивные клетки в области субфорникального органа были

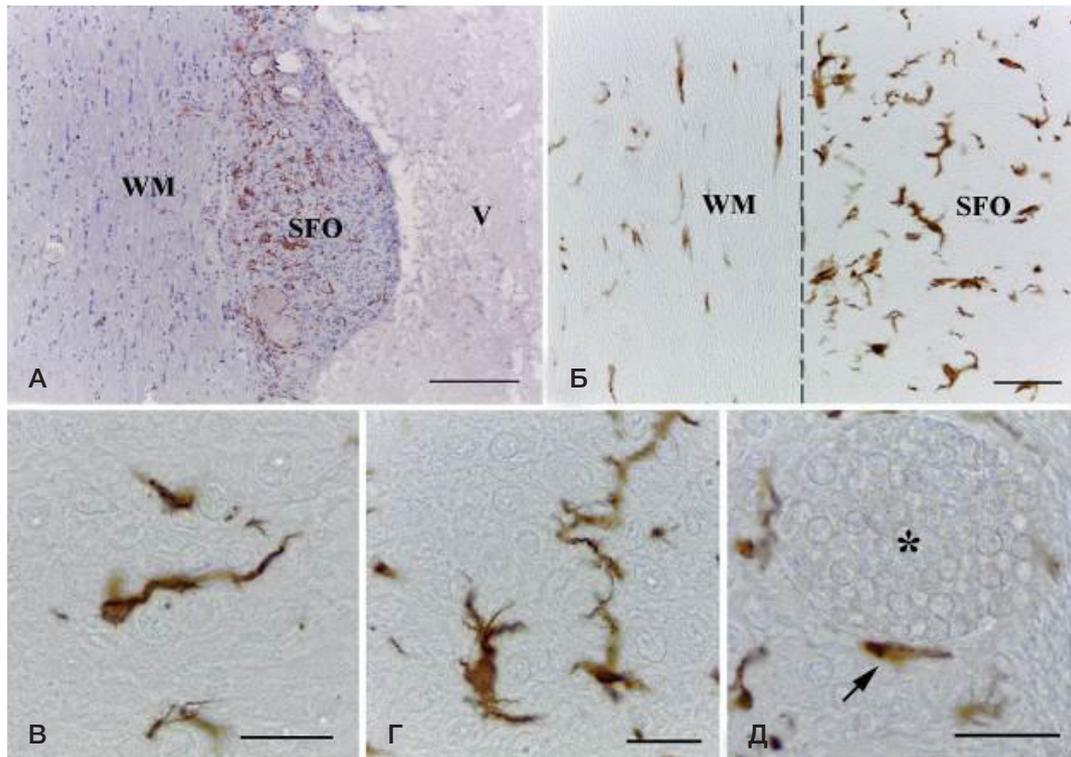


Рис. 1. Iba1-иммунопозитивные клетки в субфорникальном органе и прилегающем белом веществе головного мозга крысы. **А.** Общий вид. **Б.** Граница субфорникального органа и подлежащего белого вещества. **В–Г.** Разные морфотипы Iba1-иммунопозитивных клеток в пределах субфорникального органа. SFO — субфорникальный орган, WM — белое вещество, V — просвет третьего желудочка мозга, пунктирная линия — граница субфорникального органа и белого вещества, звездочка — просвет кровеносного сосуда, стрелка указывает на периваскулярную малоотростчатую клетку, содержащую Iba1. Масштабный отрезок равен 200 мкм (**А**), 50 мкм (**Б**), 20 мкм (**В–Г**)

идентифицированы во всех исследованных образцах головного мозга (рис. 1). При анализе препаратов на малом увеличении микроскопа ($\times 10$) субфорникальный орган хорошо визуализируется и выглядит как компактное клеточное скопление, вдающееся в просвет третьего желудочка (рис. 1А, SFO). Он характеризуется высокой клеточной плотностью, выявляемой за счет подкраски ядер клеток гематоксилином (рис. 1А, SFO, *синий цвет*), а также высокоинтенсивной реакцией на Iba1 (рис. 1А, SFO, *коричневый цвет*). Уже при малом увеличении микроскопа видно, что в субфорникальном органе присутствует большое количество Iba1-иммунопозитивных элементов,

распределенных относительно равномерно в пределах органа.

При анализе области субфорникального органа и его границы с прилегающим белым веществом при большом увеличении микроскопа ($\times 40$, $\times 100$) отмечено, что продукт иммуногистохимической реакции на Iba1 сосредоточен в отростчатых клетках (рис. 1Б–Д, *коричневый цвет*). Морфология выявленных клеток существенно различается. В белом веществе (рис. 1Б, WM) большинство Iba1-иммунопозитивных клеток имеют веретеновидную форму, которая характеризуется присутствием двух длинных неветвящихся или слабоветвящихся отростков, отходящих

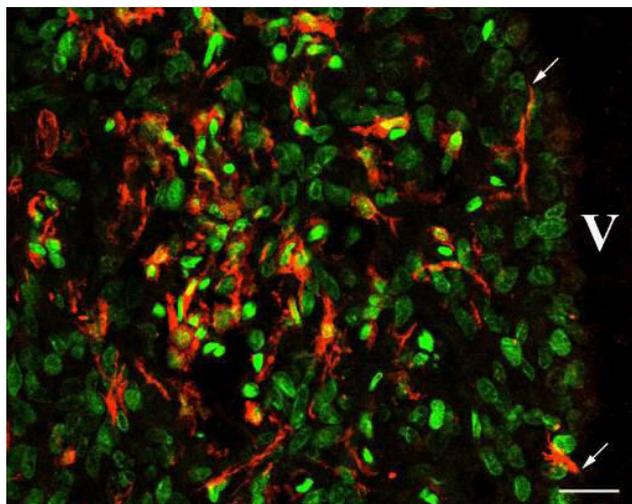


Рис. 2. Иммунофлуоресцентное выявление Iba1-содержащих клеток в субфорникальном органе головного мозга крысы. Иммуногистохимическая реакция на Iba1, визуализация с помощью флуорохрома Су3 (*красный цвет*), ядра подкрасены ядерным флуоресцентным красителем SYTOX Green (*зеленый цвет*). V — просвет третьего желудочка, стрелка указывает на отростки Iba1-содержащих клеток, выходящие в полость желудочка. Масштабный отрезок равен 20 мкм

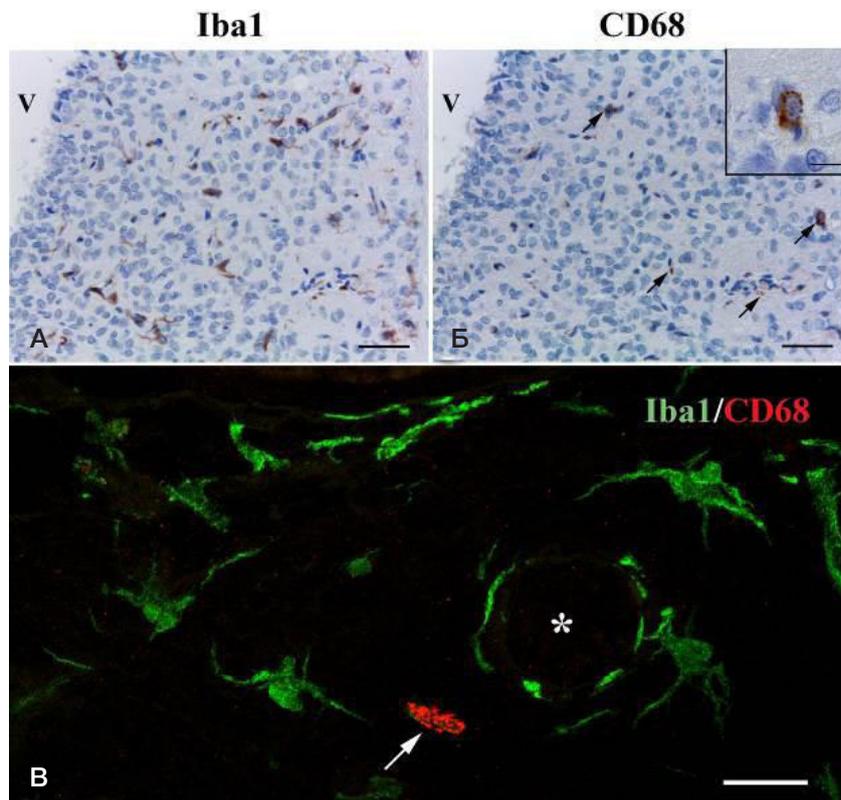


Рис. 3. Распределение Iba1- и CD68-иммуоокрашивания в субфорникальном органе головного мозга крысы. **А.** Иммуногистохимическая реакция на Iba1 с подкраской ядер клеток квасцовым гематоксилином. **Б.** Иммуногистохимическая реакция на CD68 с подкраской ядер клеток квасцовым гематоксилином, стрелка указывает на CD68-иммунопозитивные структуры в пределах субфорникального органа, выноска — увеличенный фрагмент рисунка **Б**, содержащий CD68-иммунопозитивную клетку. На рисунках **А** и **Б** представлен идентичный участок серийных срезов одного и того же случая (световая микроскопия). **В.** Двойная иммунофлуоресцентная реакция Iba1/CD68. Иммуногистохимическая реакция на Iba1, визуализация с помощью флуорохрома Cy2 (зеленый цвет), и иммуногистохимическая реакция на CD68, визуализация с помощью флуорохрома Cy3 (красный цвет). Стрелка указывает на CD68-содержащую клетку, звездочка — просвет кровеносного сосуда (конфокальная лазерная микроскопия). Масштабный отрезок равен 50 мкм (**А**, **Б**), 10 мкм (**Б**, вставка, **В**)

от разных полюсов тела клетки в противоположных направлениях. Тела и отростки этих клеток ориентированы вдоль нервных волокон (рис. 1Б, WM, *коричневый цвет*). В субфорникальном органе (рис. 1Б–Д, SFO) Iba1-содержащие клетки визуальнее более крупные по сравнению с соответствующими клетками в составе белого вещества. Они имеют более сложную архитектуру отростков и обладают высокой морфологической гетерогенностью. Среди Iba1-содержащих клеток субфорникального органа можно выделить клетки веретеновидной формы, которые характеризуются небольшим телом с отходящим от него длинным неветвящимся отростком (рис. 1В, *коричневый цвет*). Другой морфотип Iba1-иммунопозитивных клеток субфорникального органа характеризуется наличием относительно толстых, умеренно ветвящихся в разных направлениях отростков (рис. 1Г, *коричневый цвет*). Наконец, вблизи сосудов субфорникального органа были выявлены периваскулярные Iba1-иммунопозитивные малоотростчатые клетки, распластаные по периметру расширенных тонкостенных сосудов (рис. 1Д, *стрелка*).

Аналогичные результаты были получены при иммунофлуоресцентном выявлении Iba1 (рис. 2). В области субфорникального органа отмечено присутствие большого количества клеточных элементов, выявляемых за счет подкраски ядер клеток флуоресцентным красителем Sytox Green (рис. 2, *зеленая флуоресценция*). Иммунофлуоресцентное выявление Iba1, как и светооптическое исследование, продемонстрировало высокую плотность Iba1-содержащих клеток в пределах субфорникального органа (рис. 2, *красная флуоресценция*). При изучении этих клеток на большом

увеличении микроскопа была отмечена их высокая морфологическая гетерогенность. В случае использования метода иммунофлуоресценции более контрастно (по сравнению со световой микроскопией) визуализировались тонкие отростки Iba1-содержащих клеток, что позволило описать особую субпопуляцию этих клеток, локализованную в области выстилки третьего желудочка на уровне субфорникального органа. Тела этих Iba1-иммунопозитивных клеток непосредственно примыкали к клеткам выстилки и часто были распластаны вдоль нее, а тонкие отростки тянулись сквозь ряды клеток выстилки и доходили до просвета третьего желудочка мозга (рис. 2Б, *стрелка*).

Результаты иммуногистохимического выявления CD68

При сопоставлении результатов Iba1-иммуоокрашивания (рис. 3А) и CD68-иммуоокрашивания (рис. 3Б), выполненных на серийных срезах одного и того же случая, было отмечено, что в области субфорникального органа плотность CD68-иммунопозитивных элементов визуальнее существенно ниже плотности Iba1-иммунопозитивных структур. В пределах субфорникального органа визуализируются лишь единичные CD68-иммунопозитивные элементы, которые локализованы в паренхиме органа или периваскулярно. В большинстве случаев продукт иммуногистохимической реакции обнаружен в виде отдельных мелких CD68-иммунопозитивных гранул, распределенных в нервной ткани (рис. 3Б, *стрелка*). Лишь изредка при проведении CD68-иммуоокрашивания четко визуализируются клеточные границы. В этом случае

иммунопозитивные клетки имеют овальную или вытянутую форму и выраженную гранулярность в цитоплазме (рис. 3Б, *выноска*).

При постановке двойной иммунофлуоресцентной реакции Iba1/CD68 было показано, что большинство присутствующих в субфорникальном органе клеток являются Iba1+/CD68- (рис. 3В, *зеленая флуоресценция*). Эти клетки имеют отростчатую форму и гетерогенную морфологию, как и Iba1-иммунопозитивные клетки, выявляемые при проведении светооптического исследования. Единичные клетки субфорникального органа содержат CD68, но не имеют Iba1, т. е. являются Iba1-/CD68+. Форма таких клеток овальная или вытянутая, отростки не визуализируются, а цитоплазма характеризуется выраженной гранулярностью (рис. 3В; *стрелка, красная флуоресценция*). В некоторых CD68-иммунопозитивных клетках Iba1 присутствует в небольшом количестве, но при этом он никогда не колокализован с CD68.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Субфорникальный орган остается на сегодня одной из самых мало исследованных структур головного мозга. Основные научные результаты, связанные с его изучением, были получены в 1960–80-х гг. Тогда было показано, что субфорникальный орган имеет синаптические входы от ядра одиночного пути [8], латеральной области гипоталамуса и срединного ядра [9], и сам направляет проекции в различные центры мозга, в том числе в паравентрикулярное ядро и латеральную область гипоталамуса [10], аркуатное ядро [11], срединное преоптическое ядро [9]. В те же годы была установлена важная роль субфорникального органа в осморегуляции [12] и работе сердечно-сосудистой системы [13]. Очевидно, что все эти данные, а также сведения о клеточном составе субфорникального органа, нуждаются в проверке и уточнении с применением современных иммуноморфологических методов. В 2021 г. проведено комплексное морфологическое исследование по изучению особенностей структурно-функциональной организации разных субпопуляций нейронов и астроцитов, а также клеток сосудистого русла субфорникального органа у крысы [2], однако полностью незатронутыми остались такие важнейшие клетки, как макрофаги и микроглия.

Микроглия и тканевые макрофаги мозга осуществляют иммунную функцию, формируя первую линию защиты центральной нервной системы от различных возбудителей инфекций, способных преодолевать эндотелиальный барьер. Несмотря на схожие функции, эти клеточные популяции имеют разное происхождение [14]. В эмбриогенезе предшественники микроглии образуются во внезародышевом желточном мешке в ходе первой волны кроветворения, мигрируют в развивающийся мозг до закрытия гематоэнцефалического барьера и дифференцируются в микроглиальные клетки, формируя самоподдерживающуюся популяцию. Другие макрофагальные клетки, присутствующие в мозге (менингеальные макрофаги, периваскулярные макрофаги и макрофаги сосудистого сплетения) происходят от эритро-миелоидных клеток-предшественников и гемопоэтических стволовых клеток, которые образуются в эмбриональной печени и костном мозге в ходе второй и третьей волн кроветворения. Таким образом, в отличие от других макрофагов, дифферон микроглии лишен стадии моноцитов [15–17]. Помимо происхождения, микроглиоциты отличаются от других

макрофагов мозга по ряду структурных характеристик. Так, микроглия демонстрирует низкий уровень экспрессии трансмембранной тирозинфосфатазы CD45 и уникальную экспрессию молекул P2RY12, Sall1 и Tmem119. Другим макрофаги мозга характеризуются высоким (по сравнению с микроглией) уровнем экспрессии CD45 и молекул главного комплекса гистосовместимости класса II, что предполагает важную антиген-презентирующую роль этих клеток. В отличие от микроглии, периваскулярные и менингеальные макрофаги имеют высокий уровень экспрессии молекулы CD206, известной как макрофагальный маннозный рецептор [18].

Считается, что в норме (при отсутствии патологических процессов) микроглиальные клетки характеризуются наличием многочисленных тонких ветвящихся отростков, которые осуществляют постоянный мониторинг микроокружения на наличие потенциальных угроз (так называемая наблюдающая или покоящаяся микроглия). При появлении патологического стимула микроглия переходит в активированное состояние с формированием амебоидной микроглии. При трансформации отростчатой микроглии в амебоидную происходит увеличение размеров тела клетки (за счет возрастания объема перинуклеарной цитоплазмы), укорочение и утолщение отростков. Эти изменения в морфологии микроглии соответствуют увеличению ее фагоцитарной активности и/или усилению продукции цитокинов [19, 20]. Иными словами, морфологические особенности клеток микроглии отражают функциональный статус этих клеток.

В рамках проведенного нами исследования для оценки морфофункционального состояния микроглии субфорникального органа в качестве маркера был выбран кальций-связывающий белок Iba1 (ionized calcium-binding adaptor molecule 1). На сегодня он остается наиболее широко используемым иммуногистохимическим маркером микроглии [21]. Тем не менее, Iba1 не является специфичным маркером только клеток микроглии, а выявляет также в типичных тканевых макрофагах, таких как клетки Купфера [22]. Применение антител против этого белка позволяет выявлять как покоящуюся, так и активированную микроглию, а также все промежуточные состояния [20, 23]. Равномерное распределение Iba1 в цитоплазме микроглиоцитов дает возможность максимально полно охарактеризовать структурные особенности этих клеток [24]. Все это обуславливает широкое использование Iba1 в качестве маркера для изучения этой клеточной популяции. При применении антител против Iba1 в субфорникальном органе крысы нами были выявлены многочисленные отростчатые Iba1-иммунопозитивные клетки, морфологически соответствующие микроглиоцитам. Были отмечены высокая плотность клеток микроглии в субфорникальном органе и их выраженная морфологическая гетерогенность. Кроме того, по сравнению с классической покоящейся микроглией, выявленные клетки имели более толстые и короткие отростки с уменьшенным ветвлением. Классической амебоидной микроглии нами не было обнаружено ни в одном из исследованных случаев. Это позволяет заключить, что все выявленные в субфорникальном органе микроглиальные клетки имеют промежуточный статус между активированной и покоящейся микроглией, который можно охарактеризовать как преактивированное состояние.

Важно отметить, что субфорникальный орган является одним из циркумвентрикулярных органов,

характерной особенностью которых служит отсутствие гематоэнцефалического барьера. Ранее признаки активации микроглии в норме были отмечены для других циркумвентрикулярных органов. Так, продемонстрировано присутствие высоко активированной микроглии в циркумвентрикулярных органах у мыши в физиологических условиях [3]. Активация микроглии в данном случае выражалась в том, что общая длина и число отростков микроглиальных клеток были значительно меньше, чем в других областях мозга, а уровень экспрессии молекулярных маркеров активации, наоборот, повышен. Сильная активация микроглии в норме характерна также для области срединного возвышения головного мозга крысы [25].

Вопрос о том, чем именно обусловлена хроническая активация микроглии в циркумвентрикулярных органах, остается на сегодня открытым. Очевидно, что это связано с особенностями структурно-функциональной организации этих органов. Одной из таких особенностей является присутствие здесь капилляров фенестрированного типа, вследствие чего клетки микроглии в циркумвентрикулярных органах находятся в постоянном контакте с циркулирующими в крови молекулами (в отличие от микроглии других областей мозга, где этому препятствует гематоэнцефалический барьер). Вероятной функцией микроглии в данном случае может быть фагоцитирование нейротоксических молекул, поступающих из кровеносного русла, с целью поддержания нормального микроокружения в циркумвентрикулярных органах [3]. Еще одна возможная функция активированной микроглии — участие в структурной реорганизации этих зон. Ранее было показано, что в циркумвентрикулярных органах осуществляется интенсивный ангиогенез, сопровождающийся постоянной пролиферацией и апоптозом эндотелиальных клеток кровеносных сосудов. В свою очередь, для активированной микроглии показана способность регулировать пролиферативную активность эндотелия, а также участвовать в удалении апоптотических телец, оставшихся от погибших эндотелиальных клеток [26, 27]. Наконец, микроглия может быть вовлечена в процессы нейрогенеза, и приобретает при этом активированный морфотип. Присутствие нейрональных стволовых клеток было недавно продемонстрировано для некоторых циркумвентрикулярных органов, в том числе для субфорникального органа [28, 29]. Это позволяет предполагать возможный вклад активированной микроглии в формирование в этом органе нейрогенных ниш, что ранее было отмечено для субвентрикулярной зоны боковых желудочков и субгранулярной зоны зубчатой извилины гиппокампа [30].

Интересным наблюдением в рамках проведенного нами исследования стало описание в области выстилки субфорникального органа особых клеток микроглии, направляющих свои отростки в полость третьего желудочка. Ранее аналогичные клетки были описаны в субвентрикулярной зоне боковых желудочков и обозначены как субэпендимные микроглиоциты [31]. Тесный контакт субэпендимной микроглии со спинномозговой жидкостью может указывать на контроль этими клетками ее состава.

Одной из проблем, возникающих при исследовании микроглии, является морфологическое и цитохимическое сходство этих клеток с тканевыми макрофагами мозга. Микроглия и макрофаги имеют разное происхождение, но характеризуются наличием целого ряда общих маркерных белков, среди которых и Iba1 [32]. Основываясь исключительно на результатах иммуногистохимического

окрашивания на белок Iba1, однозначно разделить эти две клеточные популяции представляется затруднительным. Чтобы решить вопрос о природе Iba1-иммунопозитивных клеток, присутствующих в составе субфорникального органа, нами была дополнительно поставлена иммуногистохимическая реакция на белок CD68 (трансмембранный гликопротеин с молекулярной массой 110 кДа). Он присутствует в мембране эндосом и лизосом, являясь маркером фагоцитарной активности клетки. CD68 высоко экспрессирован в клетках моноцитарно-макрофагального ряда, и его широко используют для иммуногистохимического выявления клеток Купфера, альвеолярных макрофагов, остеокластов, клеток Лангерганса кожи и др. [33, 34].

При использовании антител против CD68 и сопоставлении полученных результатов с Iba1-иммуноокрашиванием, нами было отмечено, что в субфорникальном органе присутствуют лишь единичные CD68-содержащие клетки, морфологически схожие с макрофагами. Большинство Iba1-иммунопозитивных клеток не содержит CD68, что позволяет считать эти клетки микроглией. Отсутствие у микроглиоцитов субфорникального органа молекулы CD68 указывает на малое число лизосом у этих клеток, несмотря на наличие у них морфологических признаков активации. Вероятно, функции микроглии субфорникального органа не связаны с активным фагоцитозом, а хроническая активация этих клеток обусловлена другими их функциями, которые еще предстоит изучить. Неожиданным наблюдением оказалось то, что выявленные CD68-иммунопозитивные макрофаги характеризуются полным отсутствием (или незначительным содержанием) белка Iba1. Согласно литературным данным, Iba1 присутствует в тканевых макрофагах мозга в большом количестве, что подтверждается в том числе нашими данными, полученными при исследовании других отделов головного мозга лабораторных животных и человека [35, 36]. Вероятно, отсутствие в макрофагах субфорникального органа этого белка является цитохимической особенностью именно этой региональной клеточной популяции.

ВЫВОДЫ

Большинство Iba1-содержащих клеток субфорникального органа являются микроглиоцитами, а не макрофагами. Микроглия субфорникального органа находится в преактивированном состоянии, что может быть обусловлено структурно-функциональными особенностями этого органа и специфическими функциями местной микроглии. Среди клеток субфорникального органа присутствует особая популяция субэпендимных микроглиоцитов, отростки которых проникают в полость третьего желудочка и контактируют со спинномозговой жидкостью. Помимо микроглии в состав субфорникального органа входят единичные тканевые макрофаги, которые характеризуются высоким содержанием CD68, но незначительным количеством или отсутствием Iba1. Важность дальнейшего изучения микроглии и макрофагов определяется участием этих клеток не только в регуляции нормальной работы нервной системы, но и их вовлеченностью в развитие процессов нейровоспаления и нейродегенерации. С этой точки зрения, исследования микроглии и макрофагов представляются перспективными в контексте поиска новых мишеней для направленной фармакотерапии нейродегенеративных заболеваний.

Литература

- McKinley MJ, McAllen RM, Davern P, Giles ME, Penschow J, Sunn N, Uschakov A, Oldfield BJ. The sensory circumventricular organs of the mammalian brain. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2003; 172: III–XII, 1–122. DOI: 10.1007/978-3-642-55532-9.
- Hicks A-I, Kobrinsky S, Zhou S, Yang J, Prager-Khoutorsky M. Anatomical organization of the rat subfornical organ. *Front Cell Neurosci.* 2021; 15: 691711. DOI: 10.3389/fncel.2021.691711.
- Takagi S, Furube E, Nakano Y, Morita M, Miyata S. Microglia are continuously activated in the circumventricular organs of mouse brain. *J Neuroimmunol.* 2019; 331: 74–86. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2017.10.008.
- DosSantos MF, Devalle S, Aran V, Capra D, Roque NR, Coelho-Aguiar JdM, et al. Neuromechanisms of SARS-CoV-2: A Review *Front Neuroanat.* 2020; 14: 37. DOI: 10.3389/fnana.2020.00037.
- Tremblay M-E, Madore C, Bordeleau M, Tian L, Verkhatsky A. Neuropathobiology of COVID-19: The Role for Glia. *Front. Cell. Neurosci.* 2020; 14: 592214. DOI: 10.3389/fncel.2020.592214.
- Korzhevskii DE, Sukhorukova EG, Kirik OV, Grigorev IP. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde. *Eur J Histochem.* 2015; 59 (3): 2530. DOI: 10.4081/ejh.2015.2530.
- Коржевский Д. Э., Кирик О. В., Алексеева О. С. Способ демаскирования антигенов при проведении иммуноцитохимических реакций. Патент РФ №2719163. 17.04.2020.
- Tanaka J, Hayashi Y, Shimamune S, Nomura M. Ascending pathways from the nucleus of the solitary tract to the subfornical organ in the rat. *Brain Res.* 1997; 777: 237–41. DOI: 10.1016/S0006-8993(97)01211-0.
- Lind RW, Swanson LW, Ganten D. Angiotensin II immunoreactivity in the neural afferents and efferents of the subfornical organ of the rat. *Brain Res.* 1984; 321: 209–15. DOI: 10.1016/0006-8993(84)90174-4.
- Miselis RR. The subfornical organ's neural connections and their role in water balance. *Peptides.* 1982; 3: 501–2. DOI: 10.1016/0196-9781(82)90115-2.
- Gruber K, McRae-Degueurce A, Wilkin LD, Mitchell LD, Johnson AK. Forebrain and brainstem afferents to the arcuate nucleus in the rat: potential pathways for the modulation of hypophyseal secretions. *Neurosci Lett.* 1987; 75: 1–5. DOI: 10.1016/0304-3940(87)90065-6.
- Felix D. Peptide and acetylcholine action on neurones of the cat subfornical organ. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1976; 292: 15–20. DOI: 10.1007/BF00506484.
- Mangiapan ML, Simpson JB. Drinking and pressor responses after acetylcholine injection into subfornical organ. *AJP Regul Integr Comp Physiol.* 1983; 244: R508–13. DOI: 10.1152/ajpregu.1983.244.4.
- Li Q, Barres BA. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol.* 2018; 18 (4): 225–42. DOI: 10.1038/nri.2017.125.
- Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythromyeloid progenitors. *Nature.* 2015; 518: 547–51. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature13989>
- Hoeffel G, Chen J, Lavin Y, et al. C-Myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages. *Immunity.* 2015; 42 (4): 665–78. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.03.011.
- Bennett ML, Bennett FC. The influence of environment and origin on brain resident macrophages and implications for therapy. *Nat Neurosci.* 2020; 23: 157–166. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0545-6>
- Prinz M, Erny D, Hagemeyer N. Ontogeny and homeostasis of CNS myeloid cells. *Nature Immunology.* 2017; 18 (4): 385–92. DOI:10.1038/ni.3703
- Hanisch U-K. Functional diversity of microglia — how heterogeneous are they to begin with? *Front Cell Neurosci.* 2013; 7: 65. DOI: 10.3389/fncel.2013.00065.
- Alekseeva OS, Kirik OV, Gilerovich EG, Korzhevskii DE. Microglia of the brain: Origin, structure, functions. *J Evol Biochem Phys.* 2019; 55: 257–68. Available from: <https://doi.org/10.1134/S002209301904001X>.
- Кирик О. В., Сухорукова Е. Г., Коржевский Д. Э. Кальций-связывающий белок Iba-1/AIF-1 в клетках головного мозга крысы. *Морфология.* 2010; 137 (2): 5–8.
- Wijesundera KK, Izawa T, Tennakoon AH, et al. M1- and M2-macrophage polarization in rat liver cirrhosis induced by thioacetamide (TAA), focusing on Iba1 and galectin-3. *Exp Mol Pathol.* 2014; 96 (3): 382–92. DOI: 10.1016/j.yexmp.2014.04.003.
- Kolos E, Korzhevskiy D. Spinal cord microglia in health and disease. *Acta Naturae.* 2020; 12 (1): 4–17. DOI: 10.32607/actanaturae.10934.
- Коржевский Д. Э., Григорьев И. П., Гусельникова В. В., Колос Е. А., Петрова Е. С., Кирик О. В., и др. Иммуногистохимические маркеры для нейробиологии. *Мед Акад Журнал.* 2019; 19 (4): 7–24. DOI: 10.17816/MAJ16548.
- Sufieva DA, Razenkova VA, Antipova MV, Korzhevskii DE. Microglia and tanycytes of the infundibular recess of the brain in early postnatal development and during aging. *Russ J Dev Biol.* 2020; 51: 189–96. Available from: <https://doi.org/10.1134/S106236042003008X>.
- Morita S, Furube E, Mannari T, Okuda H, Tatsumi K, Wanaka A, et al. Heterogeneous vascular permeability and alternative diffusion barrier in sensory circumventricular organs of adult mouse brain. *Cell Tissue Res.* 2016; 363: 497–511. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2207-7>.
- Furube E, Mannari T, Morita S, Nishikawa K, Yoshida A, Itoh M, et al. VEGF-dependent and PDGF-dependent dynamic neurovascular reconstruction in the neurohypophysis of adult mice. *J Endocrinol.* 2014; 222: 161–79. Available from: <https://doi.org/10.1038/mp.2017.246>.
- Hourai A, Miyata S. Neurogenesis in the circumventricular organs of adult mouse brains. *J Neurosci Res.* 2013; 91: 757–70. DOI: 10.1002/jnr.23206.
- Furube E, Morita M, Miyata S. Characterization of neural stem cells and their progeny in the sensory circumventricular organs of adult mouse. *Cell Tissue Res.* 2015; 362 (2): 347–65. DOI: 10.1007/s00441-015-2201-0.
- Matarredona ER, Talaverón R, Pastor AM. Interactions between neural progenitor cells and microglia in the subventricular zone: physiological implications in the neurogenic niche and after implantation in the injured brain. *Front Cell Neurosci.* 2018; 12: 268. DOI: 10.3389/fncel.2018.00268.
- Кирик О. В., Сухорукова Е. Г., Алексеева О. С., Коржевский Д. Э. Субэпендимные микроглиоциты III желудочка головного мозга. *Морфология.* 2014; 145 (2): 67–9.
- Amici SA, Dong J, Guerau-de-Arellano M. Molecular mechanisms modulating the phenotype of macrophages and microglia. *Front Immunol.* 2017; 8: 1520. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01520.
- Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest.* 2017; 97 (1): 4–13. DOI: 10.1038/labinvest.2016.116.
- Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ. Overview of general and discriminating markers of differential microglia phenotypes. *Front Cell Neurosci.* 2020; 14: 198. DOI: 10.3389/fncel.2020.00198.
- Kirik OV, Tsyba DL, Alekseeva OS, Kolpakova ME, Jakovleva AA, Korzhevskii DE. Alterations in Kolmer cells in SHR line rats after brain ischemia. *Russian Journal of Physiology.* 2021; 107 (2): 177–86. DOI: 10.31857/S0869813921010052.
- Korzhevskiy DE, Kirik OV, Gusel'nikova VV, Tsyba DL, Fedorova EA, Grigorev IP. Changes in cytoplasmic and extracellular neuromelanin in human substantia nigra with normal aging. *Eur J Histochem.* 2021; 65 (s1): 3283. DOI: 10.4081/ejh.2021.3283.

References

- McKinley MJ, McAllen RM, Davern P, Giles ME, Penschow J, Sunn N, Uschakov A, Oldfield BJ. The sensory circumventricular organs of the mammalian brain. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2003; 172: III–XII, 1–122. DOI: 10.1007/978-3-642-55532-9.
- Hicks A-I, Kobrinsky S, Zhou S, Yang J, Prager-Khoutorsky M. Anatomical organization of the rat subfornical organ. *Front Cell Neurosci.* 2021; 15: 691711. DOI: 10.3389/fncel.2021.691711.
- Takagi S, Furube E, Nakano Y, Morita M, Miyata S. Microglia are continuously activated in the circumventricular organs of mouse brain. *J Neuroimmunol.* 2019; 331: 74–86. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2017.10.008.
- DosSantos MF, Devalle S, Aran V, Capra D, Roque NR, Coelho-Aguiar JdM, et al. Neuromechanisms of SARS-CoV-2: A Review *Front Neuroanat.* 2020; 14: 37. DOI: 10.3389/fnana.2020.00037.
- Tremblay M-E, Madore C, Bordeleau M, Tian L, Verkhratsky A. Neuropathobiology of COVID-19: The Role for Glia. *Front Cell Neurosci.* 2020; 14: 592214. DOI: 10.3389/fncel.2020.592214.
- Korzhevskii DE, Sukhorukova EG, Kirik OV, Grigorev IP. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde. *Eur J Histochem.* 2015; 59 (3): 2530. DOI: 10.4081/ejh.2015.2530.
- Korzhevsky DEh, Kirik OV, Alekseeva OS. Sposob demaskirovaniya antigenov pri provedenii immunocitoximicheskix reakcij. Patent RF #2719163. 17.04.2020. Russian.
- Tanaka J, Hayashi Y, Shimamune S, Nomura M. Ascending pathways from the nucleus of the solitary tract to the subfornical organ in the rat. *Brain Res.* 1997; 777: 237–41. DOI: 10.1016/S0006-8993(97)01211-0.
- Lind RW, Swanson LW, Ganten D. Angiotensin II immunoreactivity in the neural afferents and efferents of the subfornical organ of the rat. *Brain Res.* 1984; 321: 209–15. DOI: 10.1016/0006-8993(84)90174-4.
- Miselis RR. The subfornical organ's neural connections and their role in water balance. *Peptides.* 1982; 3: 501–2. DOI: 10.1016/0196-9781(82)90115-2.
- Gruber K, McRae-Degueurce A, Wilkin LD, Mitchell LD, Johnson AK. Forebrain and brainstem afferents to the arcuate nucleus in the rat: potential pathways for the modulation of hypophyseal secretions. *Neurosci Lett.* 1987; 75: 1–5. DOI: 10.1016/0304-3940(87)90065-6.
- Felix D. Peptide and acetylcholine action on neurones of the cat subfornical organ. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1976; 292: 15–20. DOI: 10.1007/BF00506484.
- Mangiapane ML, Simpson JB. Drinking and pressor responses after acetylcholine injection into subfornical organ. *AJP Regul Integr Comp Physiol.* 1983; 244: R508–13. DOI: 10.1152/ajpregu.1983.244.4.
- Li Q, Barres BA. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol.* 2018; 18 (4): 225–42. DOI: 10.1038/nri.2017.125.
- Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythromyeloid progenitors. *Nature.* 2015; 518: 547–51. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature13989>
- Hoeffel G, Chen J, Lavin Y, et al. C-Myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages. *Immunity.* 2015; 42 (4): 665–78. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.03.011.
- Bennett ML, Bennett FC. The influence of environment and origin on brain resident macrophages and implications for therapy. *Nat Neurosci.* 2020; 23: 157–166. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0545-6>
- Prinz M, Erny D, Hagemeyer N. Ontogeny and homeostasis of CNS myeloid cells. *Nature Immunology.* 2017; 18 (4): 385–92. DOI: 10.1038/ni.3703
- Hanisch U-K. Functional diversity of microglia — how heterogeneous are they to begin with? *Front Cell Neurosci.* 2013; 7: 65. DOI: 10.3389/fncel.2013.00065.
- Alekseeva OS, Kirik OV, Gilerovich EG, Korzhevskii DE. Microglia of the brain: Origin, structure, functions. *J Evol Biochem Phys.* 2019; 55: 257–68. Available from: <https://doi.org/10.1134/S002209301904001X>.
- Kirik OV, Suhorukova EG, Korzhevsky DEh. Kal'cij-svyazyvayushij belok Iba-1/AIF-1 v kletkax golovnogo mozga krysy. *Morfologiya.* 2010; 137 (2): 5–8. Russian.
- Wijesundera KK, Izawa T, Tennakoon AH, et al. M1- and M2-macrophage polarization in rat liver cirrhosis induced by thioacetamide (TAA), focusing on Iba1 and galectin-3. *Exp Mol Pathol.* 2014; 96 (3): 382–92. DOI: 10.1016/j.yexmp.2014.04.003.
- Kolos E, Korzhevsky D. Spinal cord microglia in health and disease. *Acta Naturae.* 2020; 12 (1): 4–17. DOI: 10.32607/actanaturae.10934.
- Korzhevsky DEh, Grigorev IP, Gusel'nikova VV, Kolos EA, Petrova ES, Kirik OV, i dr. Immunogistoximicheskie markery dlya nevrobiologii. *Med Akad Zhurnal.* 2019; 19 (4): 7–24. DOI: 10.17816/MAJ16548. Russian.
- Sufieva DA, Razenkova VA, Antipova MV, Korzhevskii DE. Microglia and tanyocytes of the infundibular recess of the brain in early postnatal development and during aging. *Russ J Dev Biol.* 2020; 51: 189–96. Available from: <https://doi.org/10.1134/S106236042003008X>.
- Morita S, Furube E, Mannari T, Okuda H, Tatsumi K, Wanaka A, et al. Heterogeneous vascular permeability and alternative diffusion barrier in sensory circumventricular organs of adult mouse brain. *Cell Tissue Res.* 2016; 363: 497–511. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2207-7>.
- Furube E, Mannari T, Morita S, Nishikawa K, Yoshida A, Itoh M, et al. VEGF-dependent and PDGF-dependent dynamic neurovascular reconstruction in the neurohypophysis of adult mice. *J Endocrinol.* 2014; 222: 161–79. Available from: <https://doi.org/10.1038/mp.2017.246>.
- Hourai A, Miyata S. Neurogenesis in the circumventricular organs of adult mouse brains. *J Neurosci Res.* 2013; 91: 757–70. DOI: 10.1002/jnr.23206.
- Furube E, Morita M, Miyata S. Characterization of neural stem cells and their progeny in the sensory circumventricular organs of adult mouse. *Cell Tissue Res.* 2015; 362 (2): 347–65. DOI: 10.1007/s00441-015-2201-0.
- Matarredona ER, Talaverón R, Pastor AM. Interactions between neural progenitor cells and microglia in the subventricular zone: physiological implications in the neurogenic niche and after implantation in the injured brain. *Front Cell Neurosci.* 2018; 12: 268. DOI: 10.3389/fncel.2018.00268.
- Kirik OV, Suhorukova EG, Alekseeva OS, Korzhevsky DEh. Subehpendimnye mikroglia III zheludochka golovnogo mozga. *Morfologiya.* 2014; 145 (2): 67–9. Russian.
- Amici SA, Dong J, Guerau-de-Arellano M. Molecular mechanisms modulating the phenotype of macrophages and microglia. *Front Immunol.* 2017; 8: 1520. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01520.
- Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest.* 2017; 97 (1): 4–13. DOI: 10.1038/labinvest.2016.116.
- Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ. Overview of general and discriminating markers of differential microglia phenotypes. *Front Cell Neurosci.* 2020; 14: 198. DOI: 10.3389/fncel.2020.00198.
- Kirik OV, Tsyba DL, Alekseeva OS, Kolpakova ME, Jakovleva AA, Korzhevskii DE. Alterations in Kolmer cells in SHR line rats after brain ischemia. *Russian Journal of Physiology.* 2021; 107 (2): 177–86. DOI: 10.31857/S0869813921010052.
- Korzhevskii DE, Kirik OV, Gusel'nikova VV, Tsyba DL, Fedorova EA, Grigorev IP. Changes in cytoplasmic and extracellular neuromelanin in human substantia nigra with normal aging. *Eur J Histochem.* 2021; 65 (s1): 3283. DOI: 10.4081/ejh.2021.3283.