

ВОЗМОЖНОЕ УЧАСТИЕ МИКРОГЛИИ В УСТАНОВЛЕНИИ СВЯЗИ МЕЖДУ ЦЕНТРАЛЬНОЙ И ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМОЙ

© 2022 г. Е. А. Колос^а, *, Д. Э. Коржевский^а

^аФГБНУ Институт экспериментальной медицины, ул. Академика Павлова, 12, Санкт-Петербург, 197376 Россия

*e-mail: koloselena1984@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.12.2021 г.

После доработки 21.01.2022 г.

Принята к публикации 28.01.2022 г.

В настоящем исследовании изучены локализация и распределение микроглиоцитов в эмбриональном спинном мозге (СМ) крысы в период формирования связей между центральной и периферической нервной системой и становления сенсорных путей спинного мозга. Используя антитела к белку Iba-1 для идентификации клеток микроглии и антитела к периферину для выявления первичных афферентов нейронов спинномозгового ганглия (СМГ), показано, что плотность популяции микроглиоцитов в формирующейся зоне входа дорсального корешка возрастает почти в два раза в период с 14 по 15 сут эмбрионального развития. Показано, что в этот срок сенсорные афференты крысы еще не проникают в формирующееся серое вещество СМ, а остаются в пределах маргинального слоя до 16 суток развития (период ожидания). В более поздние сроки пренатального развития число микроглиоцитов в изучаемой области СМ постепенно уменьшается. К моменту рождения плотность клеток микроглии снижается в 4 раза по сравнению с 15 сут эмбриогенеза. Полученные данные свидетельствуют в пользу гипотезы об участии микроглии во временном блокировании врастания отростков нейронов спинномозгового ганглия в спинной мозг.

Ключевые слова: спинной мозг крысы, эмбриогенез, микроглиоциты, зона входа заднего корешка, дорсальный канатик, белок Iba-1, периферин, иммуногистохимия

DOI: 10.31857/S047514502204005X

ВВЕДЕНИЕ

Нервная система позвоночных состоит из двух частей – центральной нервной системы, и периферической, к которой наряду с многочисленными нервными ганглиями, относятся нервные проводники, поддерживающие связь центрального отдела с различными периферическими структурами. В раннем эмбриональном периоде отсутствует связь между развивающимися элементами ЦНС и ПНС. Их клетки (как нейрональные, так и глиальные) имеют различное происхождение и отделены друг от друга сложной системой барьеров, в составе которых присутствуют базальные мембраны и глиоциты (Verkhatsky, Butt, 2013; Suter, Jaworski, 2019; Kameneva, Adameyko, 2019). Установление межнейронных связей между двумя частями нервной системы во время эмбрионального развития является важным этапом формирования функциональных соматосенсорных и двигательных цепей. Во взрослом организме связь между спинным мозгом (СМ) и периферической нервной системой осуществляют афферентные (сенсорные) и эфферентные (двигательные) нервные волокна, проходящие через специализированные переходные зоны спинного мозга, где происходит

контакт между клетками центральной и периферической нервной системы, которые обозначают как зона входа заднего корешка и зона выхода двигательного нерва. На ранних сроках эмбриогенеза первичные афференты чувствительных нейронов спинномозгового ганглия направляются к своим целевым нейронам спинного и головного мозга, достигая переходной зоны между ЦНС и ПНС, избирательно проницаемой для аксонов в строго определенной области – зоне входа заднего корешка. Механизмы, которые регулируют и облегчают миграцию предшественников глиальных клеток и рост аксонов в направлении переходной зоны, обеспечивают проникновение афферентов в спинной мозг и их ориентацию, не вполне понятны. К настоящему времени показано участие нейральных клеток-предшественников, клеток радиальной глии и астроцитов, клеток пограничной “шапочки” (boundary cap cells) и предшественников шванновских клеток в обеспечении формирования связей между ПНС и ЦНС (Suter, Jaworski, 2019; Rigby et al., 2020). Роль эмбриональных микроглиоцитов, как первых глиальных клеток эмбрионального спинного мозга, в этом процессе не изучалась. Учитывая то, что при

формировании ЦНС микроглиоциты выполняют такие важные функции, как обеспечение трофической поддержки нейробластов, регуляция синаптогенеза и синаптическое ремоделирование, реорганизация нейронных сетей (Schafer et al., 2012, 2013; Tong, Vidyadaran, 2016) изучение их роли в становлении сенсорной системы и формировании связей между чувствительными нейронами спинномозгового ганглия и нейронами спинного мозга является высоко актуальным.

Цель настоящего исследования состояла в изучении изменений популяции микроглиальных клеток зоны входа заднего корешка и дорсального канатика спинного мозга крысы в период формирования связей между центральной и периферической нервной системой в эмбриогенезе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на эмбрионах крыс Вистар 11–20 сут развития (E11–E20) ($n = 40$) и новорожденных крысах (P1) ($n = 4$). Все манипуляции с животными осуществлялись с соблюдением Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (1986 г.) и в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных”. У эмбрионов крыс и новорожденных животных выделяли фрагменты шейного отдела спинного мозга на уровне 3–5 сегмента. Материал фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида в течение 24 ч (Korzhevskii et al., 2015), обезвоживали в спиртах, заливали в парафин и изготавливали серийные срезы толщиной 5 мкм. Для идентификации клеток микроглии использовали поликлональные козы антитела к кальций-связывающему белку Iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1) (разведение 1 : 500, AbCam, Великобритания). Применение антител к Iba-1 позволяет выявлять микроглиоциты и другие фагоцитирующие клетки ЦНС в период пренатального и постнатального развития (Rigato et al., 2011; Ueno et al., 2013; Streit et al., 2014; Marsters et al., 2020; Kolos, Korzhevskii, 2021). Перед проведением иммуногистохимической реакции проводили тепловое демаскирование антигена в течение 25 мин (99.5°C, в пароварке) в предварительно разогретом до 60°C демаскирующем растворе. В качестве вторичных антител применяли реагенты из набора Anti-Goat HRP-DAB Cell & Tissue Staining Kit (кат. № S008, R&D Systems, США). Продукт иммуногистохимической реакции выявляли с применением 3,3'-диаминобензидина (DAB+, K3468, Agilent, США). Часть препаратов окрашивали толуидиновым синим по Нисслю.

С целью идентификации области входа афферентов заднего корешка и динамики развития дорсального канатика применяли антитела к пе-

риферину – белку промежуточных филаментов, экспрессируемому главным образом в нейронах периферической нервной системы (в частности, в чувствительных нейронах спинномозгового ганглия). В ходе исследования использовали поликлональные кроличьи антитела к периферину (AB1530, Merck Millipore, США). В качестве вторичных реагентов применяли набор Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System (SPD-015, Spring Bioscience, США). Продукт иммуногистохимической реакции выявляли с применением 3,3'-диаминобензидина (DAB+, K3468, Agilent, США).

Полученные препараты анализировали с использованием светового микроскопа Leica DM750 (Германия), микрофотографии получали с применением камеры ICC50 (Leica, Германия). Обработку изображений производили с использованием программного обеспечения LAS EZ (Leica, Германия).

Для флуоресцентной микроскопии в качестве вторичного реагента для выявления периферин-содержащих волокон применяли антитела, конъюгированные с тетраметилпродаминизотиоцианатом (TRITC) (Agilent, США). Полученные препараты исследовали с применением флуоресцентного микроскопа Leica DM 2500 (Leica, Германия), фотосъемку выполняли с помощью фотокамеры Leica DFC 420 (Leica, Германия).

При проведении количественной оценки изменений популяции микроглиоцитов в зоне входа заднего корешка и формирующегося дорсального канатика СМ производили подсчет общего числа Iba-1-содержащих клеток в исследуемой области. При подсчете учитывали иммунопозитивные клетки, содержащие ядро в плоскости среза. Иммунопозитивные отростки и фрагменты клеток, не содержащие ядро, не учитывались при количественном анализе. Измеряли площадь исследуемой зоны на разных сроках эмбрионального развития. Поскольку в период эмбриогенеза площадь этой области значительно возрастает, для оценки динамики изменения популяции микроглиоцитов был выбран метод оценки числа клеток на единицу площади изучаемой области спинного мозга эмбрионов и новорожденных крыс (0.01 мм²), то есть плотность клеток.

Измерение площади изучаемой области осуществляли с использованием программы ImageJ (NIH, США). Данные гистограммы приведены как среднее значение в группе со стандартным отклонением. Статистический анализ различий между группами проводили с использованием непараметрического критерия Краскела–Уоллиса (непараметрический дисперсионный анализ) с последующим проведением попарных сравнений с помощью критерия Манна–Уитни при $p < 0.05$.

Для оценки специфичности иммуногистохимических реакций на периферин и Iba-1 были

проведены отрицательный и положительный контроли. При постановке отрицательного контроля была исключена инкубация с первичными антителами, на срезы СМ эмбрионов крыс наносили разбавитель для антител (S0809) (Dako, Дания). Для проведения положительного контроля были использованы архивные срезы спинного мозга взрослых животных, фиксированные и обработанные таким же образом, как и исследуемый эмбриональный материал.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При постановке отрицательного контроля для иммуногистохимической реакции на Iba-1 и периферин на срезах эмбрионального СМ не обнаружено иммунопозитивных клеток и других структур. При проведении иммуногистохимического выявления периферина в СМ взрослых животных избирательно окрашиваются отростки чувствительных нейронов в составе дорсального корешка спинного мозга, зоны входа заднего корешка, а также волокна, образующие тонкий и клиновидный пучки спинного мозга, что позволяет четко определить зону сенсорных афферентов в дорсальной части спинного мозга взрослых животных. Также в области дорсальных рогов спинного мозга идентифицируются тонкие иммунопозитивные отростки, проникающие в серое вещество. На рис. 1 приведена схема поперечного среза СМ взрослой крысы с указанием изучаемых в настоящем исследовании зон.

В ходе настоящего исследования при гистологическом анализе формирующегося спинного мозга крысы на разных этапах эмбриогенеза отмечено несколько зон концентрации Iba-1-иммунопозитивных клеток. В данной работе основное внимание уделено дорсальной части формирующегося СМ, в частности зоне входа заднего корешка и формирующегося дорсального канатика спинного мозга.

В первые сутки после замыкания нервной трубки (E11) Iba-1-иммунопозитивные (Iba1+) клетки отсутствуют в области эмбрионального СМ. На следующие сутки развития (E12) в дорсальной части формирующегося СМ выявляются единичные иммунопозитивные клетки округлой формы, некоторые из них обладают толстым коротким отростком.

На E13 в периферической области слоя нейроэпителия формирующегося спинного мозга идентифицируется тонкий слой округлых дифференцирующихся нейробластов. Периферин-содержащие отростки чувствительных нейронов на данном сроке развития не проникают в формирующийся СМ, зона входа заднего корешка не определяется. В этот срок в области алярных пластинок СМ присутствуют единичные иммунопо-

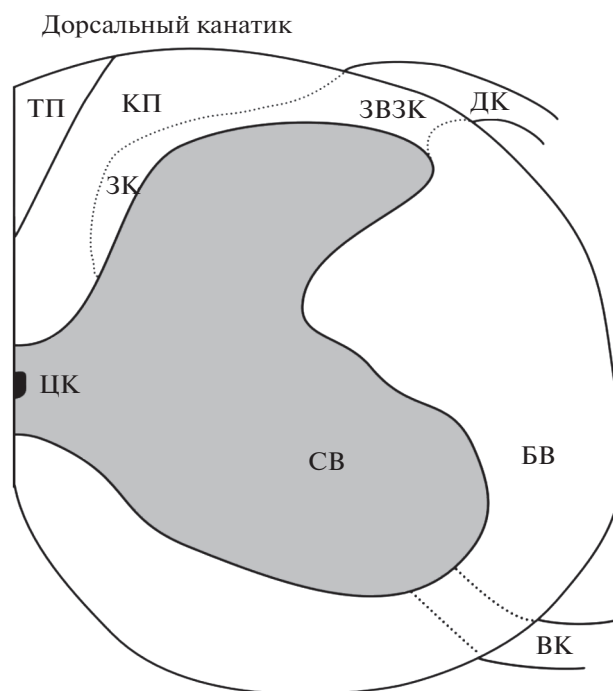


Рис. 1. Схема поперечного среза шейного отдела спинного мозга взрослой крысы. ЦК – центральный канал, СВ – серое вещество спинного мозга, БВ – белое вещество спинного мозга, ДК – дорсальный корешок спинного мозга, ВК – вентральный корешок спинного мозга, ТП – тонкий пучок, КП – клиновидный пучок, ЗВЗК – зона входа заднего корешка, ЗК – зона коллатералей первичных афферентов чувствительных нейронов. Модифицировано с (Altman, Bayer, 2001).

зитивные клетки, преимущественно амебоидного вида.

Начиная с 14-х сут развития, в СМ эмбрионов крыс выделяются три концентрических слоя: эпендимный, мантийный и маргинальный. На данном сроке развития в спинном мозге формируется зона входа заднего корешка. При проведении иммуногистохимической реакции на периферин отростки чувствительных нейронов, формирующие задний корешок, проявляют иммунореактивность. В дорсолатеральной части эмбрионального СМ идентифицируется большое количество поперечносрезанных иммунопозитивных первичных афферентов молодых нейронов СМГ, формирующих овальную структуру – зону бифуркации заднего корешка (овальный пучок Гиса). В этой области аксоны чувствительных нейронов, достигшие спинного мозга Т-образно разделяются на восходящую и нисходящую ветвь, простирающиеся по нескольким сегментам вдоль маргинального слоя. В этот срок Iba1+ клетки спинного мозга образуют небольшие скопления (2–3 клетки) в области овального пучка Гиса, преимущественно в медиальной ее части, на границе с формирую-

щимся серым веществом. Иммунопозитивные клетки этой зоны немногочисленны и имеют неправильную форму с одним, реже двумя толстыми короткими отростками.

На следующие сутки развития (E15) зона бифуркации заднего корешка расширяется дорсомедиально и четко идентифицируется на препаратах при иммуногистохимической окраске на периферин. Эта зона представлена поперечносрезанными периферин-содержащими чувствительными волокнами (рис. 2а, 2в). Начиная с 15 сут эмбрионального развития, число Iba1+ клеток в области входа заднего корешка возрастает и они начинают распределяться по всей зоне бифуркации. Клетки обладают неправильной формой, имеют один или два коротких толстых отростка (рис. 2б, 2г).

На E16 зона бифуркации заднего корешка продолжает увеличиваться в размерах, расширяется медиально, достигая потолочной пластинки. С применением антител к периферину отмечено, что начиная с 16 сут эмбрионального развития первые тонкие периферин-содержащие коллатерали восходящих и нисходящих волокон чувствительных нейронов начинают проникать внутрь формирующегося серого вещества развивающегося спинного мозга в области, прилежащей к зоне бифуркации (рис. 2д). В зоне бифуркации заднего корешка нами отмечено присутствие большого количества Iba-иммунопозитивных клеток округлой или неправильной формы с короткими толстыми отростками (рис. 2е).

Через сутки (E17) зона бифуркации продолжает расширяться, а количество коллатералей чувствительных аксонов, проникающих в серое вещество, увеличивается. В дорсомедиальной области дорсального белого вещества начинает формироваться зона коллатерализации сенсорных афферентов. В этот срок Iba-1-иммунопозитивные клетки данной области имеют неправильную форму с одним, реже двумя толстыми короткими отростками.

На более поздних сроках эмбриогенеза (E18–20) в дорсальной части формирующегося СМ отчетливо выявляется зона бифуркации заднего корешка, образованная периферин-содержащими первичными афферентами чувствительных нейронов. Медиально по отношению к зоне бифуркации располагается зона периферин-иммунопозитивных чувствительных коллатералей и зона афферентов, в дальнейшем формирующая тонкий пучок дорсального канатика спинного мозга (рис. 3в). Iba-1-содержащие клетки на данном этапе развития идентифицируются как в латеральной зоне

формирующегося белого вещества (зона бифуркации) (рис. 3б, 3г), так и в медиальной области (зона коллатералей и формирующихся клиновидного и тонкого пучка) (рис. 3а, 3г). Микроглиоциты этой зоны имеют неправильную или веретеновидную форму, часто ориентированы вдоль волокон формирующегося белого вещества и имеют один или два тонких разветвленных отростка.

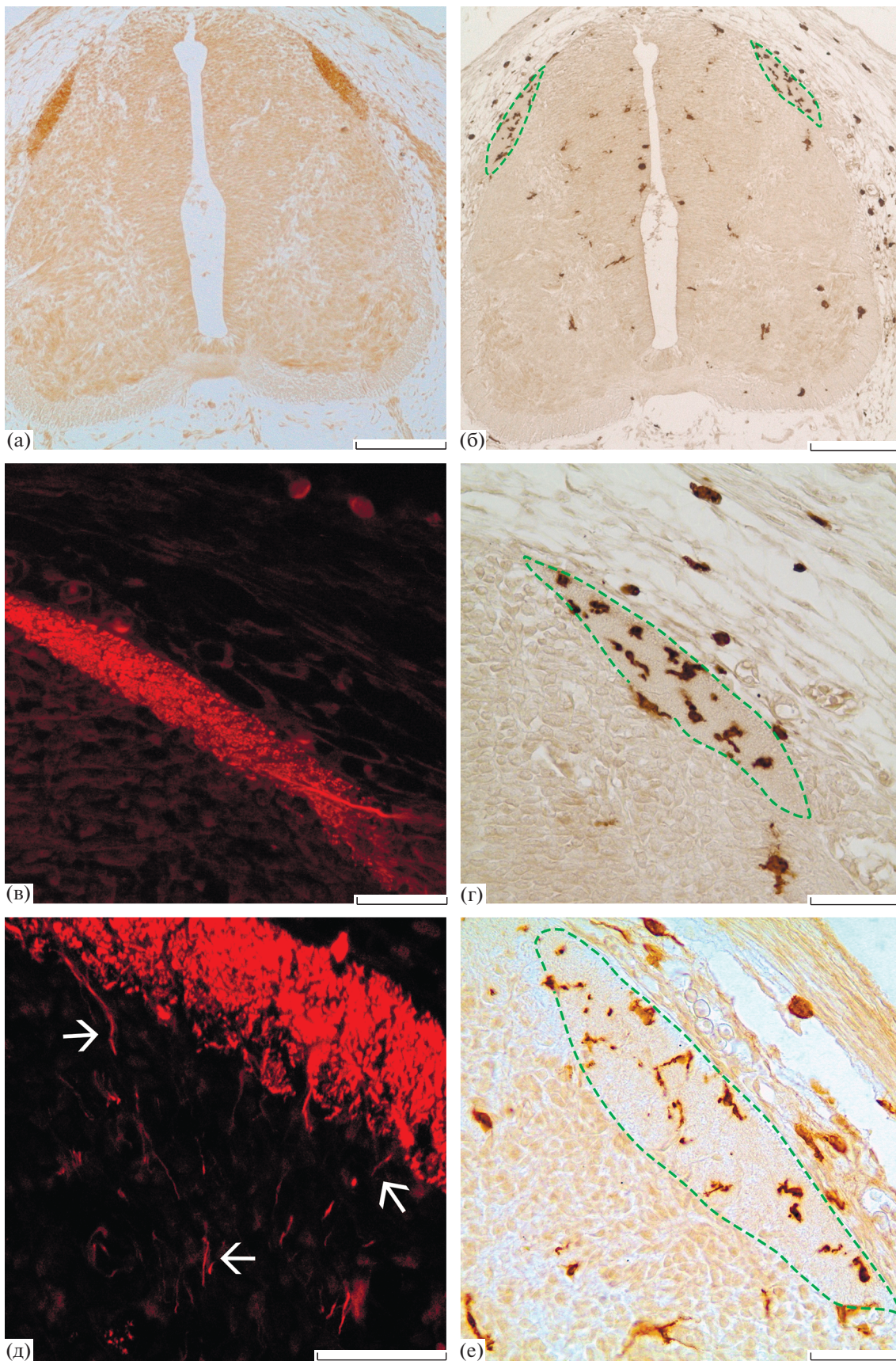
К моменту рождения дорсальное белое вещество спинного мозга крыс приобретает конфигурацию, характерную для взрослых животных. Формируется дорсальная продольная борозда, тонкий и клиновидный пучки (рис. 4а). В первые сутки после рождения многочисленные Iba-1-иммунопозитивные клетки идентифицируются как в зоне входа заднего корешка, так и в дорсальном канатике спинного мозга (рис. 4б). Также в дорсальном белом веществе присутствуют многочисленные иммунопозитивные отростки клеток, тела которых не попали в плоскость среза. Отмечено, что клетки обладают разветвленной структурой, однако имеют признаки реактивной микроглии. Присутствуют гипертрофированные и кустистые микроглиоциты с большим количеством толстых коротких отростков. Микроглиоциты дорсального канатика и зоны коллатералей преимущественно овальной и веретеновидной формы ориентированы вдоль волокон белого вещества (рис. 4в).

Количественный анализ распределения микроглиоцитов показал значительное увеличение плотности популяции клеток в формирующемся дорсальном канатике СМ крыс на E15. Установлено, что наибольшее изменение количества клеток наблюдается в ранний период эмбриогенеза — между E14 и E15. В течении суток с момента входа первых микроглиоцитов в овальный пучок Гиса (E14) плотность распределения клеток микроглии увеличивается почти в два раза ($p < 0.05$) (рис. 5). На более поздних сроках эмбрионального развития плотность популяции микроглиоцитов в формирующемся дорсальном белом веществе СМ снижается и к моменту рождения уменьшается более чем в 4 раза в сравнении с E15 ($p < 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное в настоящей работе исследование клеток микроглии в эмбриональном спинном мозге крысы показало, что они распределяются неоднородно. Было определено несколько зон концентрации микроглиоцитов. На ранних сроках пренатального развития клетки микроглии пре-

Рис. 2. Периферин-иммунопозитивные структуры и микроглиоциты в спинном мозге крыс на 15 (а, б, в, г) и 16 (д, е) сутки эмбрионального развития. На рисунке выделена зона бифуркации заднего корешка формирующегося спинного мозга; стрелки — периферин-иммунопозитивные коллатерали первичных афферентов чувствительных нейронов. Иммуногистохимические реакции на периферин (а) и белок Iba-1 (б, г, е), иммунофлуоресцентная реакция на периферин (TRITC — красное окрашивание) (в, д). Масштаб: (а, б) 200 мкм, (в, г, д, е) 50 мкм.



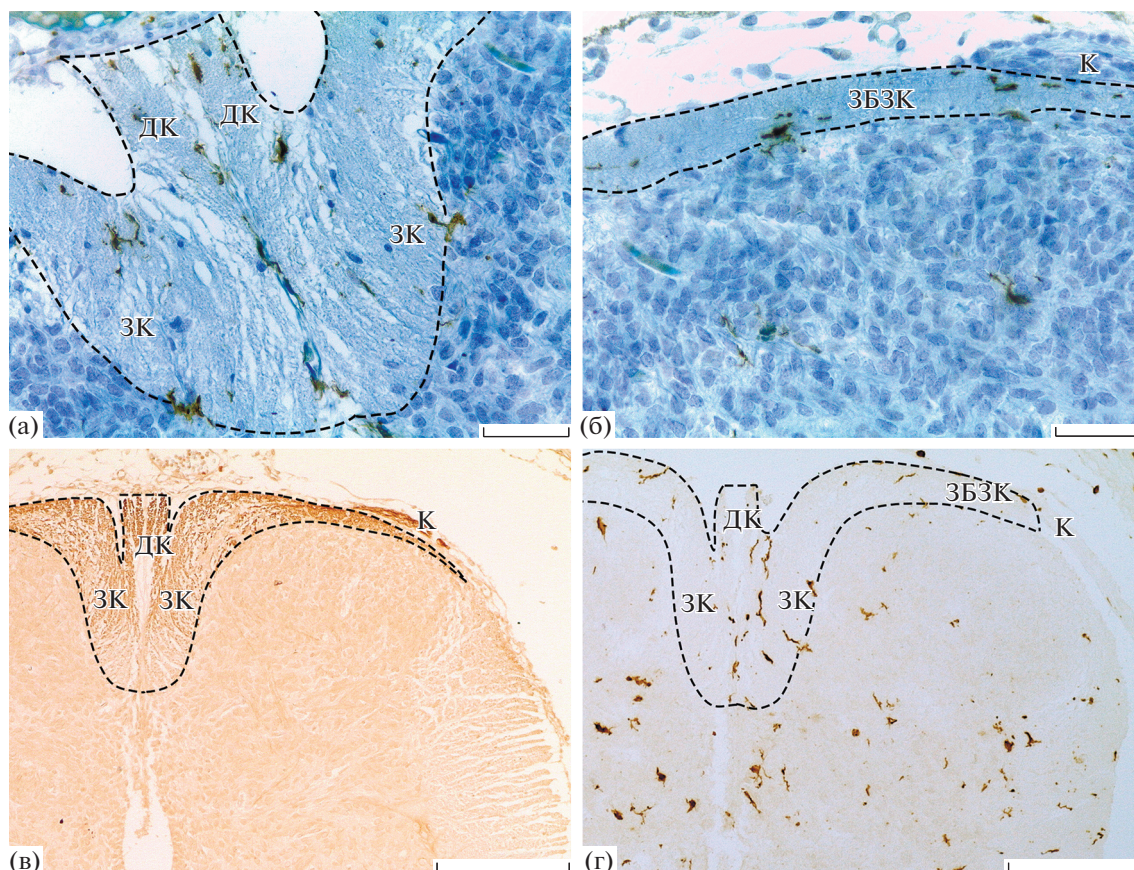


Рис. 3. Микроглиоциты в спинном мозге крыс на 18 (а, б) и 19 (г) сутки эмбрионального развития, а также периферин-иммунопозитивные отростки чувствительных нейронов, формирующие дорсальный канатик спинного мозга эмбриона крысы 19-х сут развития (в). К – дорсальный корешок спинного мозга; ЗБЗК – зона бифуркации заднего корешка; ЗК – зона коллатералей; ДК – формирующийся дорсальный канатик спинного мозга. Иммуногистохимические реакции на белок Iba-1 (а, б, г), докраска толуидиновым синим (а, б). Иммуногистохимические реакции на периферин (в). Масштаб: (а, б) 50 мкм; (в, г) 200 мкм.

имущественно концентрируются в области развивающихся мотонейронов, как было отмечено в нашей предыдущей работе (Kolos, Korzhevskii, 2021), и в области формирующегося белого вещества дорсальной части спинного мозга, чему и посвящено настоящее исследование.

Выявленное в настоящем исследовании увеличение плотности популяции клеток микроглии в дорсолатеральной области развивающегося спинного мозга было отмечено ранее в спинном мозге эмбрионов цыпленка и мыши (Caldero et al., 2009; Rigato et al., 2011). Вопрос о причинах концентрации микроглиоцитов в этой области дискуссионен. Ригато с соавт. (Rigato et al., 2011) связывают этот факт с фагоцитарной активностью микроглии. Авторы предполагают, что появление групп Iba-1+ клеток в зоне бифуркации заднего корешка может происходить в связи с устранением микроглиоцитами проекций чувствительных нейронов, подвергшихся программируемой клеточной гибели (ПКГ). Однако более позднее исследование демонстрирует, что лишь небольшая

часть микроглиоцитов, локализованных в зоне бифуркации заднего корешка имеет фагоцитарный фенотип (Angelim et al., 2018).

Мы предполагаем, что скопление микроглии в области зоны входа заднего корешка может быть связано с проникновением в развивающийся спинной мозг аксонов чувствительных нейронов в процессе установления связей между ЦНС и ПНС. В настоящем исследовании с применением антител к периферину было установлено, что на 13 сут эмбрионального развития первичные афференты СМГ крыс достигают формирующегося спинного мозга, а на E14 прорастают в маргинальный слой. Однако отростки сенсорных нейронов не проникают в формирующееся серое вещество, а остаются в маргинальном слое в течение нескольких дней (период ожидания), образуя зачаток дорсального канатика спинного мозга. В период ожидания рост аксонов остается ограниченным овальным пучком Гиса, и большая часть сенсорных афферентов делится на каудальную и ростральную ветви (Chédotal, 2019). Нами показано,

что первые периферин-иммунопозитивные коллатерали проникают в серое вещество СМ лишь на E16. Таким образом, установлено, что период ожидания у крыс составляет двое суток. Предполагается, что в этот период функционируют репеллентные молекулы (например, нетрин-1, Slit-белки, семафорин 3А (Sema3A)) синтезируемые клетками-предшественниками в алярной и базальной пластинках СМ (Masuda et al., 2009; Chédotal, 2019).

Выявленное в настоящем исследовании значительное увеличение плотности популяции микроглиоцитов в области бифуркации заднего корешка на 15 сут развития, то есть до проникновения коллатералей в мантийный слой, может свидетельствовать об участии микроглии в процессе разветвления афферентов и в поддержании периода ожидания. В пользу этого заключения говорят некоторые функциональные особенности микроглиоцитов, описанные в разных работах. Во-первых, микроглия способна экспрессировать молекулы отталкивания, такие как Slit-белки, нетрин-1, RGMa (Wehrle et al., 2005; Hata et al., 2006), которые играют важную роль в регулировке направления растущих аксонов. Во-вторых, эмбриональная микроглия способна отсекают растущие аксоны и их коллатерали и участвовать в определении направления роста аксонов (Lim, Ruthazer, 2021; Fujita, Yamashita, 2021). В-третьих, она может обеспечивать поддержку растущих аксонов путем синтеза трофических и ростовых факторов (например, инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1), фактора роста нервов (NGF), нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), нейротрофина-3 (NT-3), фактора роста фибробластов (FGF)) (Kitayama et al., 2011; Ueno et al., 2013; Reemst et al., 2016; Fujita, Yamashita, 2021).

При исследовании популяции микроглиальных клеток спинного мозга крысы на более поздних сроках эмбриогенеза было отмечено изменение ее морфологических особенностей. Установлено, что после 18-х сут эмбрионального развития многие микроглиоциты, связанные с чувствительными афферентами формирующегося дорсального канатика, приобретают форму отличную от микроглии, расположенной в сером веществе. Iba-1-иммунопозитивные клетки выстраиваются вдоль аксонов сенсорных нейронов, начиная с 18-х суток развития, и сохраняют такое расположение до раннего постнатального периода. Первые микроглиоциты, обладающие признаками рамифицированных клеток идентифицированы нами в формирующемся белом веществе дорсальных рогов СМ крыс также на 18-е сут пренатального развития. По мере формирования дорсального канатика такие клетки, вероятно, переходят от подвижного состояния в стационарное, необходимое для осуществления постоянного контроля окружающей среды. Учитывая, что дорсальный канатик СМ

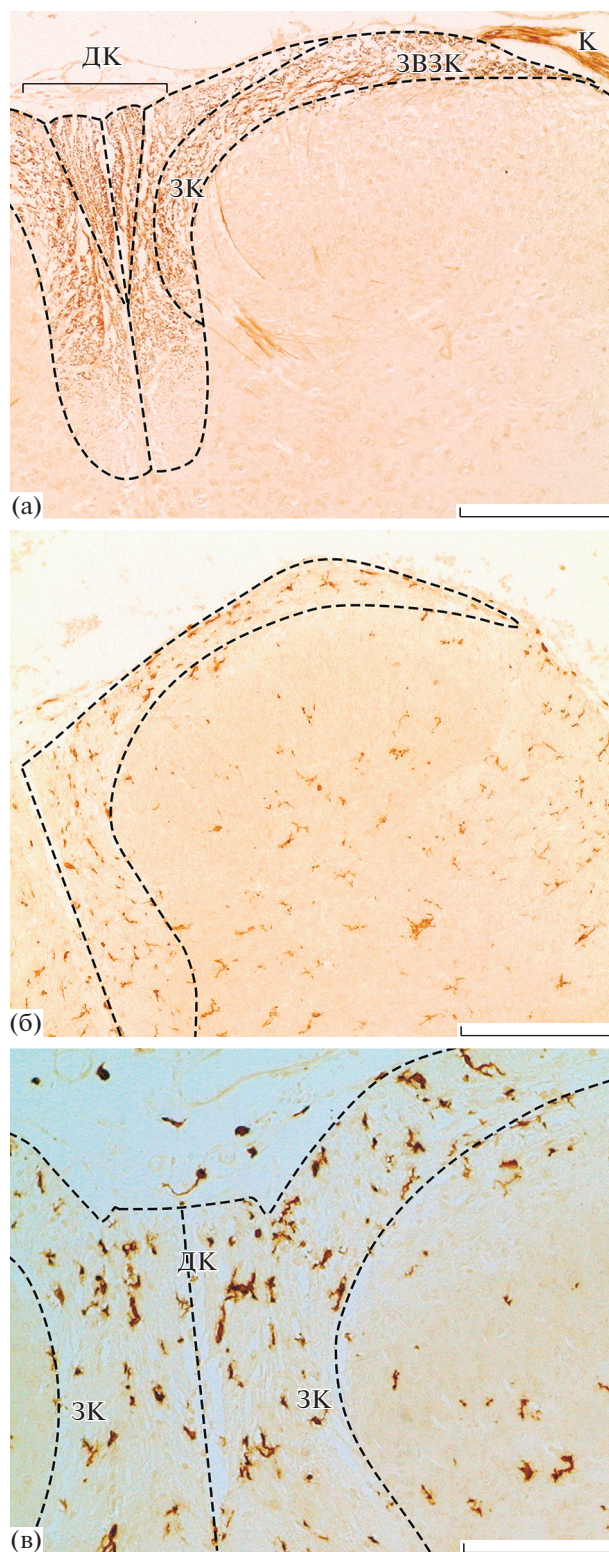


Рис. 4. Периферин-иммунопозитивные структуры (а) и микроглиоциты (б, в) в спинном мозге новорожденных крыс. К – дорсальный корешок спинного мозга; ЗВЗК – зона входа заднего корешка; ЗК – зона коллатералей; ДК – дорсальный канатик спинного мозга, образованный тонким и клиновидным пучком. Иммуногистохимические реакции на периферин (а) и белок Iba-1 (б, в). Масштаб: (а, б) 200 мкм, (в) 50 мкм.

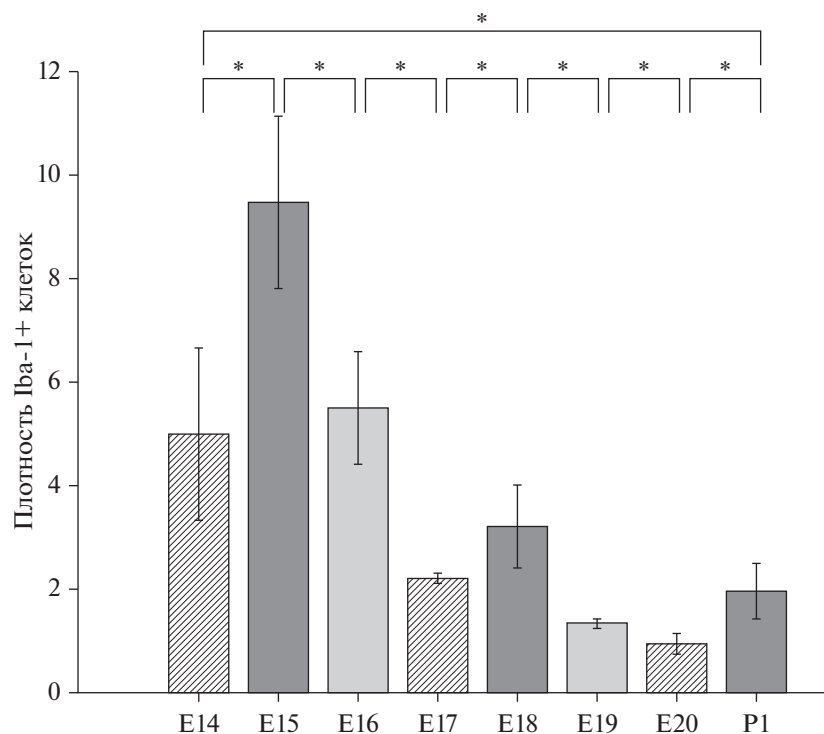


Рис. 5. Динамика изменения плотности распределения Iba1-иммунопозитивных клеток в формирующейся зоне входа заднего корешка и дорсальном канатике спинного мозга крыс на разных сроках развития (клеток/ед. площади). * – $p < 0.05$.

(клиновидный и тонкий пучки) образованы главным образом восходящими толстыми миелинизированными волокнами сенсорных нейронов СМГ, можно предположить, что скопление микроглии в этой области СМ на поздних сроках эмбриогенеза (E18–P1) связано с ее участием в процессах миелинизации. Хьюз и Аппел (Hughes, Appel, 2020) на эмбрионах рыб *Danio rerio* показали, что микроглиоциты могут фагоцитировать миелиновые оболочки, оставляя нетронутыми тела олигодендроцитов и, удаляя избыток миелина, предотвращают эктопическую миелинизацию тел клеток. Возможность протекания подобных процессов в эмбриональном периоде у млекопитающих не изучалась. Однако рост числа реактивных микроглиоцитов в области трактов толстых миелинизированных волокон спинного мозга после рождения, отмеченный в настоящем исследовании, может косвенно свидетельствовать об участии микроглии в реорганизации миелиновых оболочек.

Еще одна возможная роль клеток микроглии исследуемой области в формирующемся спинном мозге связана с участием в поддержании барьеров ЦНС. Известно, что во взрослом организме глиальные клетки (астроциты спинного мозга и шванновские клетки нерва) образуют плотный барьер на границе раздела ЦНС и ПНС. На определенных этапах эмбрионального развития переходные зоны избирательно проницаемы для клеток и

аксонов (Suter, Jaworski, 2019). Считается, что способствуя входу афферентов в СМ, клетки пограничной шапочки разрушают базальную мембрану презумптивной пограничной глиальной мембраны и предотвращают преждевременное вторжение астроцитов в зону входа заднего корешка (Carlstedt et al., 2004). Очевидно, что в исследуемом нами раннем пренатальном периоде (до формирования полноценного глиального барьера) дорсальная переходная зона является уязвимой частью ЦНС. По-видимому, эмбриональные микроглиальные клетки принимают участие в контроле данной зоны и обеспечивают защиту ЦНС в случае аксонального транспорта различных нежелательных веществ и проникающих в организм инфекционных агентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты вносят существенные дополнения в имеющиеся представления о морфофункциональных особенностях микроглиоцитов эмбрионального спинного мозга. В работе описаны морфологические особенности микроглиоцитов зоны входа заднего корешка и области дорсального канатика спинного мозга крысы в период с 14 сут пренатального развития до рождения. Показано, что на ранних сроках эмбриогенеза клетки микроглии имеют вид округлых амeboид-

ных клеток. В последующие сроки они претерпевают изменения. Первые микроглиоциты, обладающие морфологическими признаками рамифицированной микроглии идентифицируются в исследуемой области на 18 сут пренатального развития.

Проведенное в настоящей работе исследование зоны входа заднего корешка и области дорсального канатика спинного мозга крысы на ранних этапах эмбриогенеза с применением иммуногистохимического выявления периферина показало, что при формировании связей между спинным мозгом и ПНС сенсорные афференты остаются в маргинальном слое в течение двух суток (E14–E16, период ожидания) и лишь затем проникают в формирующееся серое вещество. Изучение распределения микроглиоцитов в области формирующегося белого вещества дорсальной части спинного мозга крысы в эти сроки показало, что с момента выявления первых микроглиоцитов в зоне входа заднего корешка, плотность их распределения в исследуемой области достоверно возрастает почти в два раза к 15 сут пренатального развития. Полученные данные могут свидетельствовать в пользу гипотезы об участии микроглии во временном блокировании врастания отростков нейронов спинномозгового ганглия в спинной мозг.

На основании полученных данных можно предположить, что в период формирования связей между СМ и спинномозговым ганглием, микроглия оказывает как отталкивающее влияние на сенсорные аксоны в период ожидания, так и нейропротекторное воздействие на афференты и чувствительные нейроны в более позднем периоде эмбрионального развития. Дальнейшие углубленные исследования в этом направлении могут прояснить вопрос о роли эмбриональных микроглиоцитов в развитии периферической нервной системы и становлении связей между ЦНС и ПНС.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Институт экспериментальной медицины”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования манипуляции с лабораторными животными проводились в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных” и Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (1986 г.). Исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ “ИЭМ” (протокол № 3/19 от 25 апреля 2019).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Авторы Е.А. Колос, Д.Э. Коржевский разработали методику исследования, провели анализ материала, участвовали в обработке данных, обсуждении результатов и написании текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Altman J., Bayer S.A.* An overview of spinal cord organization, 1st edn. N.Y.: Oxford University Press, 2001. 542 p.
- Angelim M., Maia L., Mouffle C. et al.* Embryonic macrophages and microglia ablation alter the development of dorsal root ganglion sensory neurons in mouse embryo // *Glia*. 2018. V. 66. P. 2470–2486. <https://doi.org/10.1002/glia.23499>
- Caldero J., Brunet N., Ciutat D. et al.* Development of microglia in the chick embryo spinal cord: implications in the regulation of motoneuronal survival and death // *J. Neurosci. Res.* 2009. V. 87. P. 2447–2466. <https://doi.org/10.1002/jnr.22084>
- Carlstedt T., Cullheim S., Risling M.* Spinal cord in relation to the peripheral nervous system // In: *The Human Nervous System*, 2nd edition / Eds. Paxinos G., Mai J.K. London: Elsevier Academic Press, 2004. P. 250–263.
- Chedotal A.* Roles of axon guidance molecules in neuronal wiring in the developing spinal cord // *Nat. Rev. Neurosci.* 2019. V. 20. № 7. P. 380–396. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0168-7>
- Fujita Y., Yamashita T.* Mechanisms and significance of microglia–axon interactions in physiological and pathological conditions // *Cell. Mol. Life Sci.* 2021. V. 78. P. 3907–3919. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03758-1>
- Hata K., Fujitani M., Yasuda Y. et al.* RGMA inhibition promotes axonal growth and recovery after spinal cord injury // *J. Cell Biol.* 2006. V. 173. № 1. P. 47–58. <https://doi.org/10.1083/jcb.200508143>
- Hughes A.N., Appel B.* Microglia phagocytose myelin sheaths to modify developmental myelination // *Nat. Neurosci.* 2020. V. 23. P. 1055–1066. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0654-2>
- Kameneva P., Adameyko I.* Recent advances in our understanding of central and peripheral nervous system progenitors // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2019. V. 61. P. 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.ccb.2019.07.003>
- Kitayama M., Ueno M., Itakura T., Yamashita T.* Activated microglia inhibit axonal growth through RGMA // *PLoS One*. 2011. V. 6. P. e25234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025234>
- Kolos E.A., Korzhevskii D.E.* Changes in the microglial population during spinal cord formation indicate an involvement of microglia in the regulation of neuronogenesis and synaptogenesis // *Russian Journal of Developmental Biology*. 2021. V. 52. № 3. P. 176–186. <https://doi.org/10.1134/s1062360421030048>

- Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Kirik O.V., Grigorev I.P.* Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde // *Eur. J. Histochem.* 2015. V. 59. № 3. P. 233–237.
<https://doi.org/10.4081/ejh.2015.2530>
- Lim T.K., Ruthazer E.S.* Microglial trophocytosis and the complement system regulate axonal pruning *in vivo* // *Elife.* 2021. V. 10. P. e62167.
<https://doi.org/10.7554/eLife.62167>
- Masuda T., Yaginuma H., Sakuma C., Ono K.* Netrin-1 signaling for sensory axons: involvement in sensory axonal development and regeneration // *Cell Adh. Migr.* 2009. V. 3. P. 171–173.
<https://doi.org/10.4161/cam.3.2.7837>
- Marsters C.M., Nesan D., Far R. et al.* Embryonic microglia influence developing hypothalamic glial populations // *J. Neuroinflamm.* 2020. V. 17. № 1. P. 146.
<https://doi.org/10.1186/s12974-020-01811-7>
- Reemst K., Noctor S.C., Lucassen P.J., Hol E.M.* The indispensable roles of microglia and astrocytes during brain development // *Front. Hum. Neurosci.* 2016. V. 10. P. 566.
<https://doi.org/10.3389/fnhum.2016.00566>
- Rigato C., Buckinx R., Le-Corronc H. et al.* Pattern of invasion of the embryonic mouse spinal cord by microglial cells at the time of the onset of functional neuronal networks // *Glia.* 2011. V. 59. № 4. P. 675–695.
<https://doi.org/10.1002/glia.21140>
- Rigby M.J., Gomez T.M., Puglielli L.* Glial cell-axonal growth cone interactions in neurodevelopment and regeneration // *Front. Neurosci.* 2020. V. 14. P. 203.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00203>
- Schafer D.P., Lehrman E.K., Kautzman A.G. et al.* Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner // *Neuron.* 2012. V. 74. № 4. P. 691–705.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.026>
- Schafer D.P., Lehrman E.K., Stevens B.* The “quad-partite” synapse: microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS // *Glia.* 2013. V. 61. № 1. P. 24–36.
<https://doi.org/10.1002/glia.22389>
- Streit W.J., Xue Q.S., Tischer J., Bechmann I.* Microglial pathology // *Acta Neuropathol. Commun.* 2014. V. 26. № 2. P. 142.
<https://doi.org/10.1186/s40478-014-0142-6>
- Suter T.A.C.S., Jaworski A.* Cell migration and axon guidance at the border between central and peripheral nervous system // *Science.* 2019. V. 365. № 6456. P. e8231.
<https://doi.org/10.1126/science.aaw8231>
- Tong C.K., Vidyadaran S.* Role of microglia in embryonic neurogenesis // *Exp. Biol. Med.* 2016. V. 241. № 15. P. 1669–1675.
<https://doi.org/10.1177/1535370216664430>
- Ueno M., Fujita Y., Tanaka T. et al.* Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development // *Nat. Neurosci.* 2013. V. 16. № 5. P. 543–551.
<https://doi.org/10.1038/nn.3358>
- Verkhatsky A., Butt A.M.* Glial physiology and pathophysiology. Oxford: Wiley-Blackwell-John Wiley & Sons, 2013. 527 p.
- Wehrle R., Camand E., Chedotal A. et al.* Expression of netrin-1, slit-1 and slit-3 but not of slit-2 after cerebellar and spinal cord lesions // *Eur. J. Neurosci.* 2005. V. 22. P. 2134–2144.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04419.x>

Connection between the Central and Peripheral Nervous System. The Role of Microglia

E. A. Kolos^{1,*} and D. E. Korzhevskii¹

¹*Institute of Experimental Medicine, ul. Acad. Pavlova 12, St. Petersburg, 197367 Russia*

**e-mail: koloselena1984@yandex.ru*

In the present study, we studied the localization and distribution of microglia in the embryonic rat spinal cord (SC) during the establishment of connections between the central and peripheral nervous systems, during the formation of the sensory pathways of the spinal cord. Using anti-Iba-1 antibodies to identify microglial cells and anti-peripherin antibodies to detect primary afferents of neurons of the dorsal root ganglion (DRG), it was shown that in the dorsal root entry zone the microglial cell density nearly doubled in the period from E14 to E15. It was shown that during this period rat sensory afferents do not yet penetrate into the developing gray matter of the SC, but remain within the marginal layer up to 16 days of development (waiting period). At the later stages of prenatal development, the density of microglial cells in the studied area of the SC gradually decreases. By the time of birth, the density of microglial cells decreases by 4 times compared with the 15th day of embryogenesis. Our data support the hypothesis of the participation of microglia in the temporary blocking of the DRG neurons processes ingrowth into the spinal cord.

Keywords: rat spinal cord, embryogenesis, microglia, dorsal root entry zone, dorsal funiculus, Iba-1, peripherin, immunohistochemistry