

*Д.Э.Коржевский<sup>1,2</sup>, О.В.Кирик<sup>1</sup>, О.С.Алексеева<sup>1</sup>, Е.Г.Сухорукова<sup>1</sup>, М.А.Сырцова<sup>1</sup>*

## ВНУТРИЯДЕРНОЕ НАКОПЛЕНИЕ БЕЛКА Iba-1 В МИКРОГЛИОЦИТАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

<sup>1</sup> Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (зав. — д-р мед. наук Д.Э.Коржевский), отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург; <sup>2</sup> кафедры фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий (зав. — А.Н.Суворов), Санкт-Петербургский государственный университет

Белок Iba-1, являющийся общепризнанным маркером клеток микроглии, ранее был обнаружен авторами в ядре микроглиоцитов. Цель настоящего исследования состояла в уточнении этих данных с использованием методов иммуоцитохимии и конфокальной лазерной микроскопии. Работа выполнена на фрагментах головного мозга (кора, стриатум, черное вещество, красное ядро) человека (n=18, возраст 25–78 лет). Показано, что в ядре микроглиоцитов белок Iba-1 накапливается в одном или нескольких его участках, нетождественных ядрышку или глыбкам гетерохроматина. Причины отмеченного факта неясны. Возможно, белок Iba-1, помимо осуществления своей основной функции (участие в процессе фагоцитоза), может выполнять и роль транскрипционного фактора.

**Ключевые слова:** *головной мозг, микроглия, ядро клетки, белок Iba-1*

Микроглия — одна из наименее изученных популяций глиальных клеток головного мозга. Несмотря на общепризнанную роль этих клеток в развитии воспалительного процесса, репарации и регенерации нервной ткани, механизмы их активации, их нейротоксического и нейропротекторного действия остаются во многом неизученными. Мало понятна и роль белка Iba-1 — одного из микроглиальных маркеров [1] в регуляции и осуществлении многообразных функций микроглиоцитов. Хотя этот белок был выявлен и охарактеризован еще в 1996 г. [4], до настоящего времени существуют противоречия в представлениях о его идентичности ряду других макрофагальных белков [1], что вносит неопределенность в трактовку результатов многочисленных исследований, выполненных с использованием антител к этому белку. Недавно было обращено внимание на присутствие белка Iba-1 в ядре микроглиоцитов черного вещества головного мозга человека [3], однако представленные данные не могут считаться в полной мере доказательными, поскольку использованные методы световой микроскопии не позволяют четко разграничить ядерный и цитоплазматический компартменты изучавшихся клеток.

Цель настоящего исследования состояла в уточнении факта присутствия белка Iba-1 в ядрах микроглиоцитов с использованием методов иммуоцитохимии и конфокальной лазерной микроскопии.

**Материал и методы.** Исследованы кора большого мозга, стриатум, черное вещество, красное ядро у людей 25–78 лет (n=18). Использован материал из архива лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы Института экспериментальной медицины. Программа исследований имеет положительное заключение локального этического комитета ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН. Материал, хранившийся в виде парафиновых блоков, был фиксирован в цинк-этанол-формальдегиде, обезвожен и залит по общепринятой методике. Срезы толщиной 5–10 мкм готовили с помощью санного микротомы Leica SM2000R (Leica, Германия) и наклеивали их на предметные стекла с фабричным адгезивным покрытием — HistoBond (Marienfeld, Германия). После стандартной процедуры депарафинирования и регидратации проводили тепловое демаскирование антигена. Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы инкубировали в 3% растворе перекиси водорода, а для блокирования неспецифических участков связывания антигена — в блокировочном растворе (Protein Block, Spring Bioscience, США). Клетки микроглии выявляли при помощи поликлональных козьих антител к белку Iba-1 (разведение 1:200, Abcam, Великобритания). Для выявления комплекса антиген—антитело применяли вторичные антикозьи био-

### Сведения об авторах:

*Коржевский Дмитрий Эдуардович* (e-mail: [dek2@yandex.ru](mailto:dek2@yandex.ru)), *Кирик Ольга Викторовна* (e-mail: [olga\\_kirik@mail.ru](mailto:olga_kirik@mail.ru)),

*Алексеева Ольга Сергеевна* (e-mail: [osa72@inbox.ru](mailto:osa72@inbox.ru)), *Сухорукова Елена Геннадьевна* (e-mail: [len48@inbox.ru](mailto:len48@inbox.ru)),

*Сырцова Марина Александровна* (e-mail: [marina.syrczova@mail.ru](mailto:marina.syrczova@mail.ru)), лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

тинирированные антитела (разведение 1:200, Dako, Дания). Для визуализации продукта иммуноцитохимической реакции при световой микроскопии использовали стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой (Spring Bioscience, США), и хромоген DAB+ (Dako, Дания). Ядра докрашивали гематоксилином. Препараты исследовали под микроскопом Leica DM750, фотосъемку выполняли с помощью фотокамеры ICC50 (Leica, Германия). Для флюоресцентной визуализации продукта иммуноцитохимической реакции использовали стрептавидин, конъюгированный с флюорохромом Cy2 (Jackson ImmunoResearch, США). Ядра клеток докрашивали флюоресцентным красителем йодистым пропидием (PI). Полученные препараты исследовали при помощи конфокального лазерного микроскопа LSM 710 (Zeiss, Германия), укомплектованного аргоновым и твердотельным лазерами. Обработку полученных изображений и трехмерную реконструкцию проводили с помощью компьютерных программ Zen-2011 (Zeiss, Германия). Был использован объектив Plan-Apochromat 100x/1.40 Oil-DIC M27 (масляная иммерсия). Для возбуждения флюоресценции Cy2 и PI использовали лазеры с длиной волны 488 и 561 нм соответственно. Для обеспечения независимого возбуждения флюоресценции красителей и исключения возможности перекрытия их спектров эмиссии использовали рекомендованный производителем оборудования режим «Best Signal». В работе использовалось оборудование, предоставленное в соответствии с программой «Протеом человека» РАН.

**Результаты исследования.** При использовании иммунопероксидазной реакции на белок Iba-1 было обнаружено, что во всех исследованных областях мозга селективно выявились отростчатые клетки, имеющие морфологические признаки микроглиоцитов. Кроме типичных микроглиоцитов, в препаратах присутствовали единичные удлинённые и овальные иммунопозитивные клетки, которые располагались периваскулярно (периваскулярные макрофаги).

Исследование препаратов с использованием иммерсионного объектива 100 позволило выявить неравномерность в распределении продукта иммуногистохимической реакции в ядрах микроглиоцитов (*рисунок*).

Приблизительно в половине наблюдаемых клеток обнаруживалась ярко окрашенная крупная гранула (реже — более мелкие 2–3 гранулы) на фоне сравнительно слабо окрашенной нуклеоплазмы. В ядрах других микроглиоцитов продукт иммуногистохимической реакции был мелкогранулярным, и его локальной концентрации не наблюдалось. Встречались единичные микроглиоциты как с высокоинтенсивной реакцией

перинуклеарной области, не позволяющей точно оценить состояние ядра, так и с почти неокрашенным (иммунонегативным) ядром. Подобные особенности распределения продукта иммуногистохимической реакции были характерны для всех изученных областей мозга, но больший полиморфизм был характерен для стриатума и черного вещества.

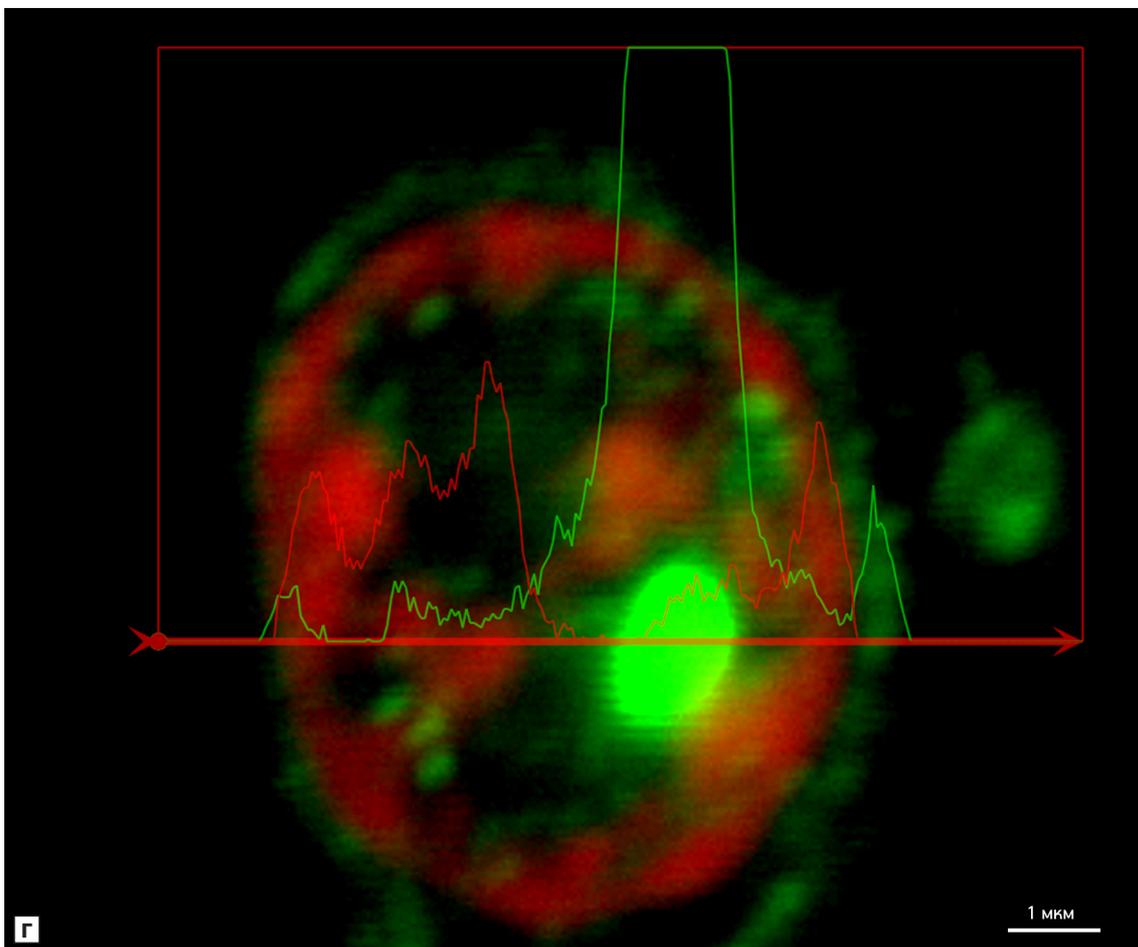
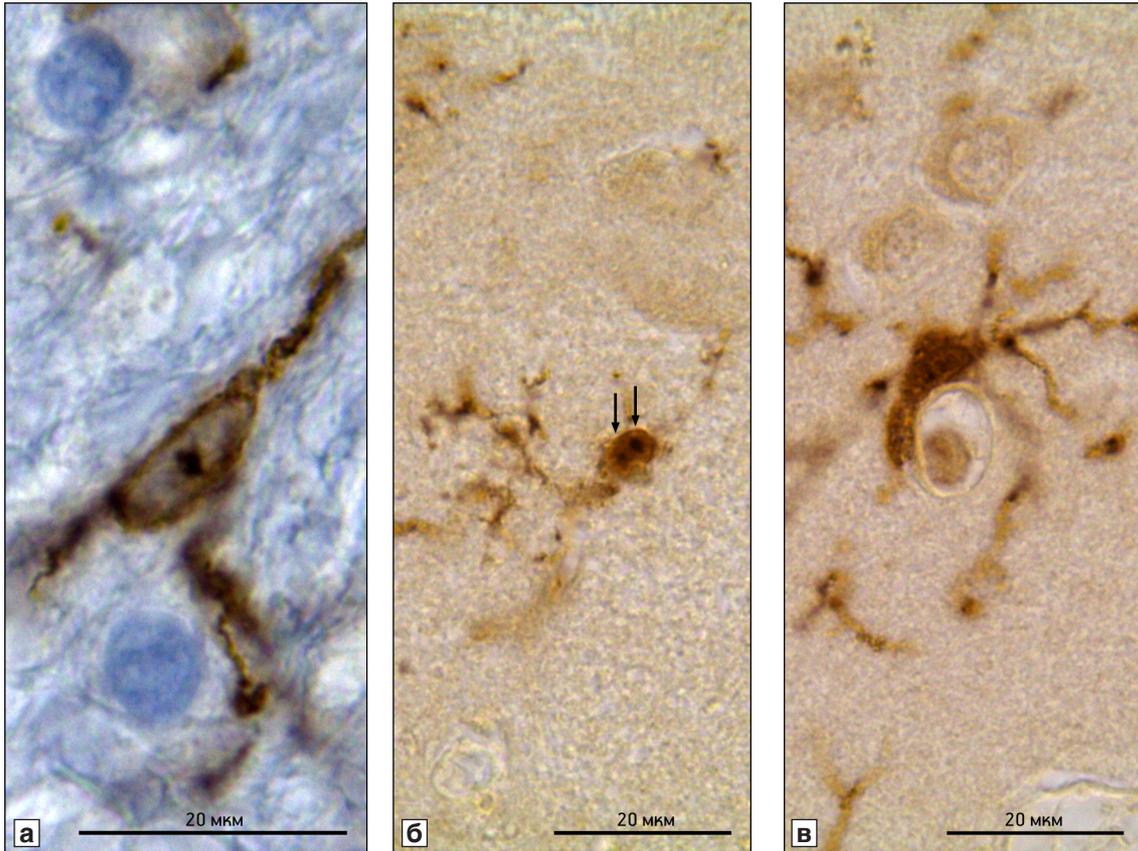
Изучение препаратов с использованием конфокального лазерного микроскопа показало, что в ядрах части микроглиоцитов действительно наблюдается накопление белка Iba-1 (см. рисунок, г), причем это было характерно для клеток с достаточно крупными для микроглиоцитов ядрами (около 5 мкм в диаметре). Сравнительный анализ графиков интенсивности флюоресценции красителей, использованных для маркирования Iba-1 (Cy2) и ДНК/РНК (PI), показал следующее:

1. Яркая гранула (диаметром до 1,5 мкм), соответствующая внутриядерному скоплению Iba-1, не ассоциирована с глыбками гетерохроматина.
2. Часть внутриядерного Iba-1, распределенного в ядре вне ярко окрашенной гранулы, обнаруживается как в зонах эухроматина, так и гетерохроматина.
3. В ядре микроглиоцитов встречаются участки, в которых Iba-1 отсутствует.

**Обсуждение полученных данных.** В ходе проведенного исследования удалось доказать, что в ядрах микроглиоцитов головного мозга действительно содержится белок Iba-1. При этом накопление белка в одном из ядерных компартментов не соответствует ни ядрышку, ни особому скоплению гетерохроматина. Такое заключение можно сделать, исходя из незначительного уровня флюоресценции йодистого пропидия (неселективно связывающего ДНК/РНК красителя [2]) в области максимальной флюоресценции Cy2, связанного с Iba-1. Причины локализации белка Iba-1 в ядре микроглиоцитов неясны. Не исключено, что этот белок, помимо своей основной функции — принятия участия в фагоцитозе [1], может выступить и в роли транскрипционного фактора. Необычным является и то, что локальные внутриядерные скопления белка Iba-1, по-видимому, не характерны для микроглиоцитов головного мозга лабораторных животных [5].

Кора большого мозга (а) и стриатум (б–г) человека.

а–в — микроглиоциты; стрелки — Iba-1-иммунопозитивные гранулы; г — графики интенсивности флюоресценции Cy2 (Iba-1, зеленый цвет) и йодистого пропидия (ДНК/РНК, красный цвет). По оси абсцисс — расстояние, соответствующее проведенному отрезку; по оси ординат — интенсивность флюоресценции. а–в — микроскопия в проходящем свете; г — конфокальная лазерная микроскопия. а — иммуноцитохимическая реакция на белок Iba-1 с докраской гематоксилином; б, в — то же без докраски; г — флюоресцентная визуализация Cy2 с дополнительной окраской ДНК и РНК йодистым пропидием



Таким образом, установлено, что белок Iba-1 действительно присутствует в ядрах микроглиоцитов головного мозга человека. При этом обнаружена локальная концентрация внутриядерного Iba-1 с формированием белковых агрегатов вне отчетливой ассоциации с гетерохроматином ядра. Данный факт нуждается в дальнейшем изучении с целью прояснения его функциональной значимости.

*Исследование выполнено при поддержке РФФИ (проект 14-04-00049а).*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Коржевский Д.Э., Кирик О.В. Микроглия головного мозга и микроглиальные маркеры // Морфология. 2015. Т. 147, вып.3. С. 37–44.
2. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Сухорукова Е.Г. и др. Молекулярная морфология. Методы флуоресцентной и конфокальной лазерной микроскопии. СПб.: СпецЛит, 2014.
3. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Сухорукова Е.Г., Сырцова М.А. Микроглия черного вещества головного мозга человека // Мед. акад. журн. 2014. Т. 14, № 4. С. 68–72.
4. Imai Y., Ibata I., Ito D. et al. A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996. Vol. 224. P. 855–862.
5. Shapiro L.A., Perez Z.D., Foresti M.L. et al. Morphological and ultrastructural features of Iba1-immunolabeled microglial cells in

the hippocampal dentate gyrus // Brain Res. 2009. Vol. 1266. P. 29–36.

Поступила в редакцию 27.04.2015

### INTRANUCLEAR ACCUMULATION OF Iba-1 PROTEIN IN MICROGLIOCYTES OF THE HUMAN BRAIN

*D.E.Korzhevskiy<sup>1,2</sup>, O.V.Kirik<sup>1</sup>, O.S.Alekseyeva<sup>1</sup>, Ye.G.Sukhorukova<sup>1</sup>, M.A.Syrtsova<sup>1</sup>*

Iba-1 protein which is a recognized marker of the microglial cells, was previously detected by the authors in the nucleus of microgliaocytes. The present study was aimed to define more exactly these data using the methods of immunohistochemistry and confocal laser microscopy. The study was performed on the fragments of the human brain (n=18, age 25–78 years). The areas examined included cortex, striatum, substantia nigra, and nucleus rubrum. The Iba-1 protein was shown to accumulate in one or several parts of microgliaocyte nucleus not identical to the nucleolus or the heterochromatin granules. The reasons for this fact are unclear. It may be speculated that Iba-1 protein besides its major function (involvement in phagocytosis) can perform the role of a transcriptional factor.

**Key words:** *brain, microglia, cell nucleus, Iba-1 protein*

<sup>1</sup> Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, RAS Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg; <sup>2</sup> Department of Fundamental Problems of Medicine and Medical Technology, St. Petersburg State University