

*Е.Г.Гилерович¹, И.П.Григорьев¹, О.В.Кирик¹, О.С.Алексеева^{1,2}, Е.Г.Сухорукова¹
и Д.Э.Коржевский^{1,3}*

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ НЕЙРОГЛОБИНА В КОРЕ МОЗЖЕЧКА ЧЕЛОВЕКА (ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

¹ Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (руков. — д-р мед. наук Д.Э.Коржевский), отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН; ² лаборатория сравнительной физиологии дыхания (руков. — чл.-кор. РАН А.И.Кривченко), Институт эволюционной физиологии и биохимии им.И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург; ³ кафедра фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий (зав. — проф. А.Н.Суворов), Санкт-Петербургский государственный университет

Нейроглобин — это недавно обнаруженный гем-содержащий белок, который локализуется преимущественно в головном мозгу млекопитающих. В работе впервые представлены данные о распределении нейроглобина в мозжечке человека, полученные с помощью иммуногистохимии. Реакция на нейроглобин в мозжечке была обнаружена во всех исследованных случаях (n=7), хотя степень её интенсивности варьировала. Отчётливая реакция отмечена в клетках Пуркинье и области клубочков мозжечка.

Ключевые слова: *мозжечок, клетки Пуркинье, нейроглобин, иммуногистохимия*

Нейроглобин — гем-содержащий белок, способный присоединять к себе молекулу кислорода, локализуется преимущественно в клетках головного мозга [4]. Функция нейроглобина пока не установлена, но предполагается его возможная нейропротективная роль при ишемии и гипоксии мозга [6]. Нейроглобин выявлен у многих видов млекопитающих, включая человека. У лабораторных животных интенсивная экспрессия нейроглобина наблюдается в коре большого мозга, таламусе, гипоталамусе, уздечке, голубоватом месте, стволовых ядрах черепных нервов и коре мозжечка [1, 7].

Данные о распределении нейроглобина в головном мозгу человека очень ограничены и противоречивы. С помощью иммуноблоттинга было установлено, что экспрессия нейроглобина максимальна в субталамическом ядре, несколько меньшая — в коре большого мозга, в таламусе и продолговатом мозгу, она примерно вполонину меньше в коре мозжечка и чёрном веществе,

ещё меньше — в хвостатом ядре, скорлупе и гиппокампе и минимальная — в спинном мозгу [4]. При иммуногистохимическом исследовании было обнаружено, что нейроглобин интенсивно экспрессируется в гипоталамусе, миндалевидном теле и ядрах покрышки моста, слабая экспрессия была зафиксирована в гиппокампе и коре большого мозга, а в мозжечке она не была обнаружена [5]. Таким образом, имеющиеся данные однозначно указывают на наличие нейроглобина в клетках коры мозжечка лабораторных грызунов, однако сведения о его экспрессии в мозжечке у человека противоречивы. Возможно, это связано с маскировкой антигенных детерминант нейроглобина при фиксации.

Цель настоящего исследования — изучение распределения нейроглобина в мозжечке у человека.

Материал и методы. Исследована кора мозжечка людей (n=7) обоего пола в возрасте 20–46 лет, причина смерти которых не связана с заболеваниями и повреждениями

Сведения об авторах:

Гилерович Елена Георгиевна (e-mail: iemmorphol@yandex.ru), *Григорьев Игорь Павлович*, *Кирик Ольга Викторовна*, *Сухорукова Елена Геннадьевна*, лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН;

Алексеева Ольга Сергеевна, лаборатория сравнительной физиологии дыхания, Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова, 194223, Санкт-Петербург, пр. М.Тореза, 44;

Коржевский Дмитрий Эдуардович (e-mail: dek2@yandex.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. Акад.Павлова, 12

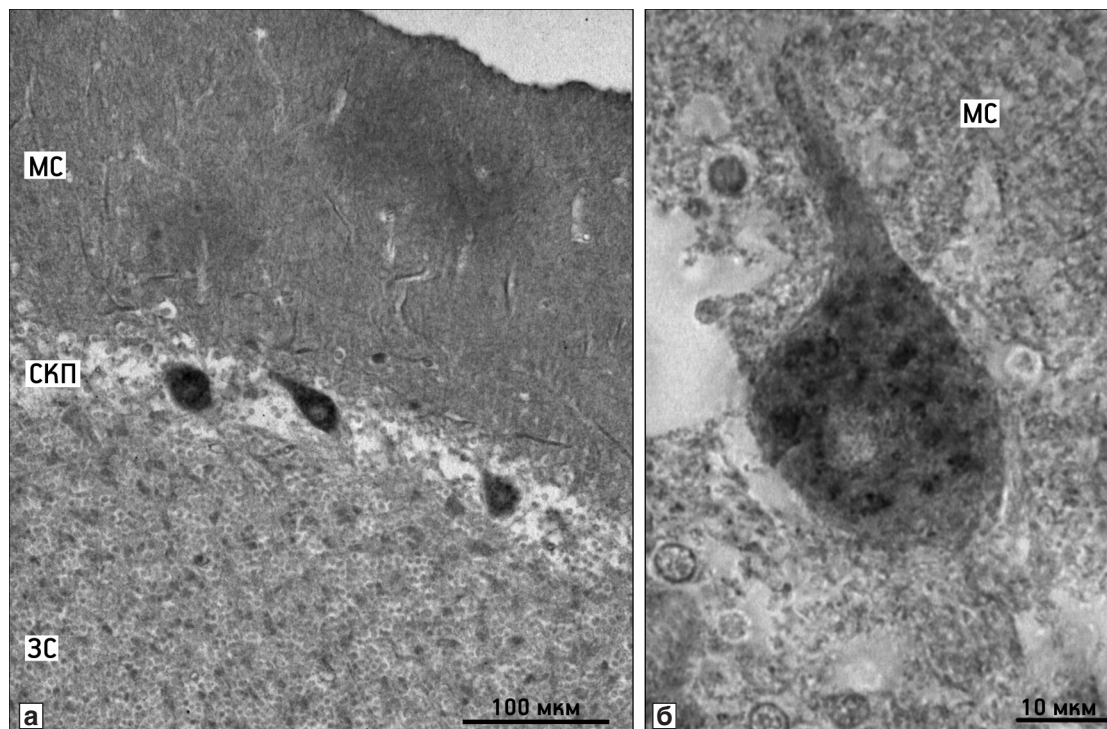
головного мозга. Материал получен из архива лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы Института экспериментальной медицины. Он был фиксирован в цинк-этанол-формальдегиде, обезвожен и залит в парафин по общепринятой методике. Из полученных блоков готовили срезы толщиной 7 мкм. Для выявления нейроглобина применяли кроличьи поликлональные антитела к нейроглобину (Sigma, США) в разведении 1:600. Перед постановкой реакции проводили тепловое демаскирование антигена. В качестве вторичных антител применяли реагент «HRP Conjugate» из набора Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System (Spring Bioscience, США). Пероксидазную метку выявляли, используя рабочий раствор 3,3'-диаминобензидина, приготовленный из набора DAB+ (Dako, Дания). После постановки реакции часть срезов докрашивали квасцовым гематоксилином.

Результаты исследования. Иммуногистохимическая реакция на нейроглобин не одинакова по интенсивности в разных слоях коры мозжечка у человека. Молекулярный слой имел слабую диффузную окраску. У 4 человек из 7 исследованных случаев в клетках Пуркинье были обнаружены отчетливые скопления нейроглобина в виде сгруппированных мелких гранул, которые располагались как в перикарионе, так и в крупных дендритах (*рисунок*). Концентрация продукта реакции в клетках Пуркинье варьировала, но они всегда отчетливо выделялись на общем фоне препарата. В зернистом слое наблюдалась слабая неравномерная реакция. Продукт реакции был в основном сконцентрирован в безъядер-

ных областях, занимаемых клубочками мозжечка. Перинуклеарная цитоплазма клеток-зерен казалась свободной от продукта иммуногистохимической реакции.

В остальных трех исследованных случаях реакция коры мозжечка на нейроглобин была заметно слабее. Гранулярные структуры в цитоплазме клеток Пуркинье отчетливо не определялись, однако эти клетки всегда выделялись на общем фоне слабо окрашенного препарата своей более интенсивной реакцией.

Обсуждение полученных данных. Имеются всего 2 работы, касающиеся присутствия нейроглобина в мозжечке человека, и результаты их противоположны. Если данные иммуноблоттинга свидетельствуют о наличии довольно сильной экспрессии нейроглобина в коре мозжечка человека [4], то в единственном иммуногистохимическом исследовании данный белок в мозжечке человека не был выявлен [5]. Полученные нами результаты согласуются с данными Т. Burmester и соавт. [4], полученными при открытии нейроглобина, и свидетельствуют о том, что в мозжечке человека присутствует нейроглобин, который в наибольшей степени экспрессируется в клетках Пуркинье и в меньшей — в зернистом и молекулярном слоях коры мозжечка. Расхождение наших данных с результатами иммуногистохимического исследования С.А. Hundahl и соавт.



Кора мозжечка человека.

а — общий вид, б — клетка Пуркинье. МС — молекулярный слой; СКП — слой клеток Пуркинье; ЗС — зернистый слой. Иммуногистохимическая реакция на нейроглобин без докраски

[5], по-видимому, связано с различиями в способе и продолжительности фиксации мозжечка, а также малым числом изученных объектов. Так, в исследовании С.А. Hundahl и соавт. [5] изучены большой мозг и мозжечок всего двух человек, фиксацию осуществляли 10 % формалином путём посмертной перфузии, тогда как исследованные нами фрагменты коры мозжечка были фиксированы погружением в цинк-этанол-формальдегид [2]. Можно предположить, что нам, в отличие от С.А. Hundahl и соавт. [5], удалось обнаружить нейроглобин в мозжечке человека благодаря лучшей сохранности эпитопов этого белка при фиксации в цинк-этанол-формальдегиде, который имеет определенные преимущества перед другими фиксаторами [3]. В нашем исследовании отчётливая иммуногистохимическая реакция на нейроглобин выявлялась не во всех случаях. Это можно объяснить неодинаковым функциональным состоянием коры мозжечка и индивидуальными различиями в экспрессии нейроглобина.

Таким образом, в результате проведенного исследования впервые удалось на клеточном уровне определить локализацию нейроглобина в коре мозжечка человека. Полученные данные могут иметь значение не только для фундаментальной нейробиологии, но, в перспективе, и для практической медицины с учетом предполагаемой нейропротекторной роли нейроглобина.

Работа выполнена частично при поддержке гранта РНФ 14-15-00014 (Д.Э. Коржевский) и РФФИ 11-04-01693-а (Е.Г. Гилерович).

ЛИТЕРАТУРА

1. Григорьев И.П., Гилерович Е.Г., Кирик О.В. и др. Распределение нейроглобина в структурах переднего мозга крыс после транзиторной ишемии. *Асимметрия*, 2013, т. 7, № 1, с. 15–21.
2. Коржевский Д.Э., Григорьев И.П. и Отеллин В.А. Применение обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейрогистологических исследованиях. *Морфология*, 2006, т. 129, вып. 1, с. 85–86.
3. Коржевский Д.Э., Сухорукова Е.Г., Гилерович Е.Г. и др. Преимущества и недостатки цинк-этанол-формальдегида как фиксатора для иммуноцитохимических исследований и конфокальной лазерной микроскопии. *Морфология*, 2013, т. 143, вып. 2, с. 81–85.
4. Burmester T., Weich B., Reinhardt S. и Hankeln T. A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature*, 2000, v. 407, p. 520–523.
5. Hundahl C.A., Kelsen J. and Hay-Schmidt A. Neuroglobin and cytoglobin expression in the human brain. *Brain Struct. Funct.*, 2013, v. 218, № 2. p. 603–609.
6. Watanabe S., Takahashi N., Uchida H. and Wakasugi K. Human neuroglobin functions as an oxidative stress-responsive sensor for neuroprotection. *J. Biol. Chem.*, 2012, v. 287, № 36, p. 30128–30138.
7. Wystub S., Laufs T., Schmidt M. et al. Localisation of neuroglobin protein in the mouse brain. *Neurosci. Lett.*, 2003, v. 346, p. 114–116.

Поступила в редакцию 31.01.2014

NEUROGLOBIN DISTRIBUTION IN THE HUMAN CEREBELLAR CORTEX (AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY)

*Ye. G. Gilerovich¹, I. P. Grigoriyev¹, O. V. Kirik¹,
O. S. Alekseyeva^{1, 2}, Ye. G. Sukhorukova¹
and D. E. Korzhevskiy^{1, 3}*

Neuroglobin is a recently discovered heme-containing protein located predominantly in the mammalian brain. This paper for the first time presents the data on neuroglobin distribution in human cerebellum using immunohistochemistry. Neuroglobin immunoreactivity in the cerebellum was found in all the cases studied (n=7), although its intensity varied. Distinct reaction was found in Purkinje cells and the areas of cerebellar glomeruli.

Key words: *cerebellum, Purkinje cells, neuroglobin, immunohistochemistry*

¹ Laboratory of the Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, RAMS North-Western Branch Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg; ² Laboratory of Comparative Physiology of Respiration, RAS I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, St. Petersburg; ³ Department of Fundamental Problems of Medicine and Medical Technologies, St. Petersburg State University