

© И. П. Григорьев, В. В. Гусельникова, Е. Г. Сухорукова, Д. Э. Коржевский, 2015
УДК 611.815.41.018

И. П. Григорьев, В. В. Гусельникова, Е. Г. Сухорукова, Д. Э. Коржевский

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕЛЕЦ МАРИНЕСКО В НЕЙРОНАХ ЧЕРНОГО ВЕЩЕСТВА ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

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 СЗО РАМН, Санкт-Петербург

Цель настоящего исследования — изучение встречаемости и внутриядерного расположения телец Маринеско в нейронах черного вещества головного мозга человека. Тельца Маринеско выявляли на срезах черного вещества у 5 мужчин в возрасте от 28 до 58 лет. Использовали окраску по Нисслю и иммуногистохимическую реакцию на убиквитин — характерный белок данных внутриядерных включений. Тельца Маринеско были обнаружены в 1–2% нейронов черного вещества, но не в соседних областях мозга. В одном нейроне выявлялись 1–4 тельца Маринеско размером до 6,7×5,1 мкм, они располагались как вблизи, так и на отдалении от ядрышка. В большинстве телец Маринеско определялся убиквитин. Отмечена тенденция увеличения встречаемости телец Маринеско в нейронах черного вещества у человека с возрастом.

Ключевые слова: чёрное вещество, нейрон, ядро, тельца Маринеско, убиквитин

Парануклеолярные тельца, или тельца Маринеско, были впервые обнаружены в ядрах клеток черного вещества головного мозга человека румынским невропатологом Джордже Маринеско в 1902 г. [5]. В краткой статье без иллюстраций он описал эозинофильные включения в ядрах клеток двух структур мозга человека — черного вещества и голубоватого места, которые, как выяснилось позже, являются главными катехоламинергическими нервными центрами [1]. В течение длительного времени внутриядерные тельца не привлекали внимания исследователей, хотя неоднократно была отмечена зависимость их присутствия в клетках от возраста индивидуума. С началом широкого использования иммуногистохимических методов в нейроморфологических исследованиях в тельцах Маринеско был выявлен убиквитин — важный компонент системы протеасомной деградации белков [3]. В связи с этим тельца Маринеско привлекли внимание как возможный показатель нейродегенерации. Однако доказать безусловную связь появления телец Маринеско в нейронах черного вещества с развитием нейродегенеративного процесса не удалось. Функциональное значение этих внутриядерных структур до настоящего времени остается непонятным. Поэтому изучение распределения этих включений в катехоламинергических нейронах представляется актуальным.

Цель настоящего исследования состояла в изучении встречаемости и внутриядерного расположения телец Маринеско в клетках черного вещества головного мозга человека.

Материал и методы. Исследовано черное вещество головного мозга 5 мужчин в возрасте от 28 до 58 лет, умерших от причин, не связанных с заболеваниями или повреждениями головного мозга. Материал получен из архива отдела общей и частной морфологии Института экспериментальной медицины. Мозг был фиксирован в цинк-этанол-формальдегиде и залит в парафин. Из архивных парафиновых блоков готовили срезы толщиной 5–7 мкм и наклеивали на предметные стекла с адгезивным покрытием. Часть срезов окрашивали толуидиновым синим по Нисслю. На других срезах ставили иммуногистохимическую реакцию на убиквитин с использованием поликлональных кроличьих антител (Dako, Дания) в разведении 1:400 и набора вторичных реагентов Reveal Polyvalent HPR DAB Detection System (Spring Biosciences, США). После постановки реакции часть срезов докрашивали крезоловым фиолетовым либо астровым синим (Merck, Германия). Анализ полученных препаратов и фотосъемку выполняли, используя микроскоп Leica DM750 и цифровую фотокамеру ICC50 (Leica, Германия). Определяли долю клеток компактной части черного вещества, содержащих тельца Маринеско. Внутриядерные включения измеряли с использованием компьютерной программы LAS EZ (Leica, Германия).

Результаты исследования. Во всех исследованных случаях при анализе препаратов, окрашенных по Нисслю, в черном веществе головного мозга была отмечена хорошая сохранность нейронов. Их подавляющее большинство не имели морфологических признаков деструк-

Сведения об авторах:

Григорьев Игорь Павлович (e-mail: ipg-iem@yandex.ru), Гусельникова Валерия Владимировна (e-mail: guselnicova.valeriia@yandex.ru), Сухорукова Елена Геннадьевна (e-mail: len48@inbox.ru), Коржевский Дмитрий Эдуардович (e-mail: dek2@yandex.ru), отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

ции. Нейропил был слабо окрашен. Амилоидные тельца в области скоплений нейронов (нигросом) и в периваскулярных областях не определялись. Не было отмечено также присутствия в нейропиле лейкоцитов. При детальном изучении нейронов с использованием окраски по Нисслию внутриядерные тельца, не обладающие (в отличие от ядрышка) базофилией, были обнаружены в 4 из 5 исследованных случаев. Все выявленные тельца окрашивались слабо и имели светлый серо-зеленый оттенок. Как правило, тельца Маринеско при окраске по Нисслию регистрировались в 1–2% нейронов черного вещества. Вне черного вещества, в соседних структурах мозга, внутриядерные включения не определялись.

При изучении препаратов после реакции на убиквитин оказалось, что иммунопозитивные внутриядерные тельца присутствуют в ядрах нейронов черного вещества в тех же четырех случаях, в которых они были выявлены при окраске по Нисслию. Частота встречаемости телец Маринеско в нейронах черного вещества, определенная при реакции на убиквитин, составила 20% у мужчины в возрасте 51 года, 6% — 58 лет, 5% — 48 лет, 1% — 51 года и 0% — 28 лет.

Препарат, в котором число телец Маринеско было наибольшим, был проанализирован с целью определения размеров отдельных телец и их расположения в ядре. Всего было измерено 67 телец, обнаруженных в 34 нейронах. В 13 нейронах внутриядерных телец, дающих реакцию на убиквитин, было по 1, в 12 — по 2, в 6 — по 3 и в 3 — по 4. Максимальные размеры внутриядерного тельца составили 6,7×5,1 мкм (рисунки, 1, а). Кроме этого крупного тельца овальной формы, в ядре клетки присутствовало еще одно — диаметром 0,8 мкм, которое было наименьшим из всех учтенных телец (см. рисунок, а).

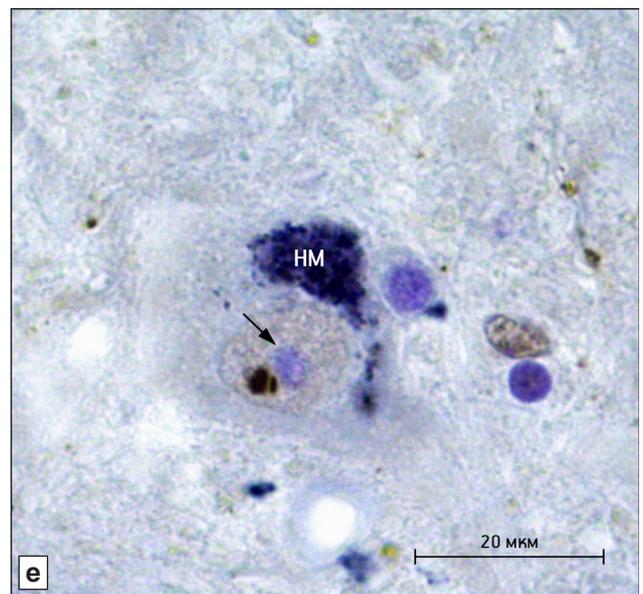
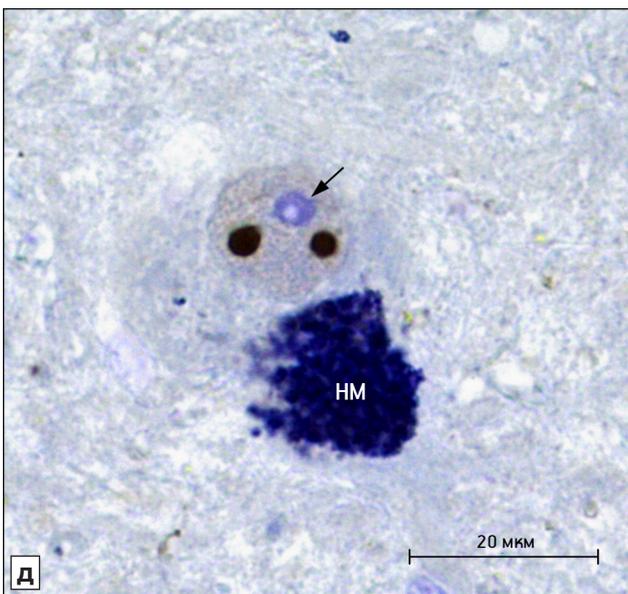
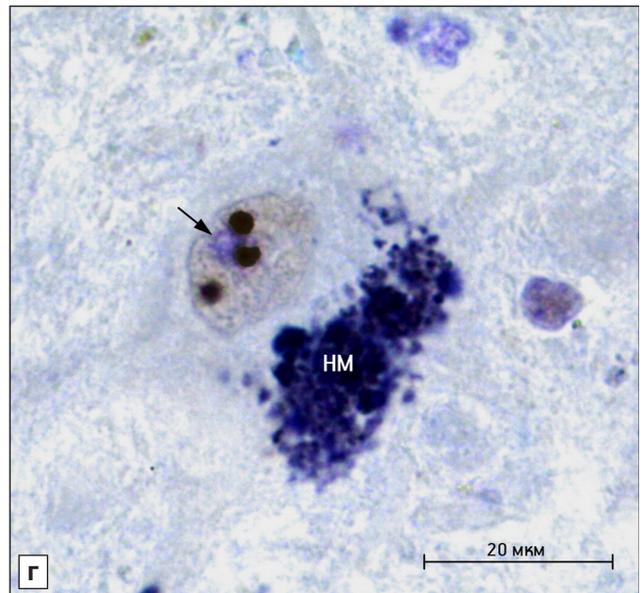
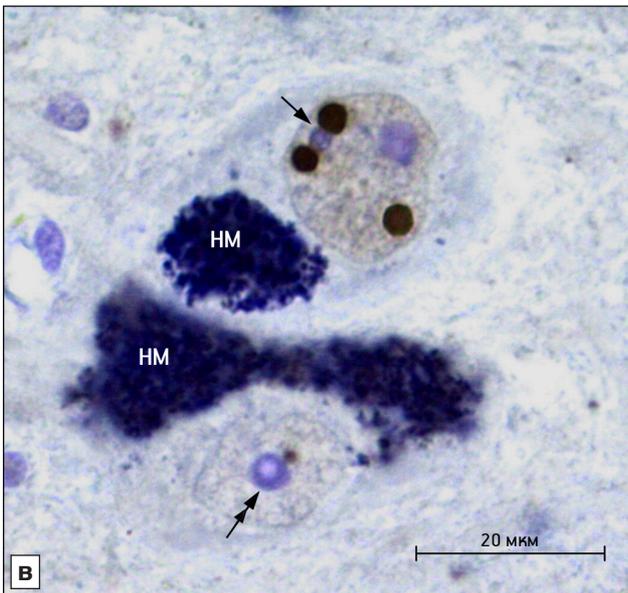
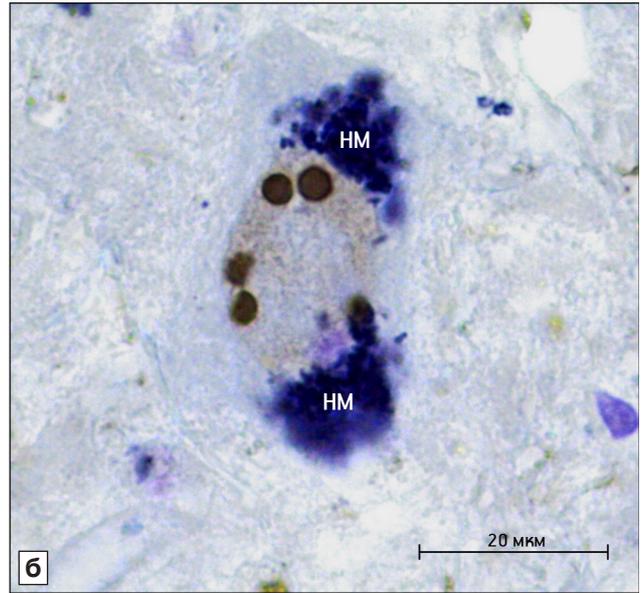
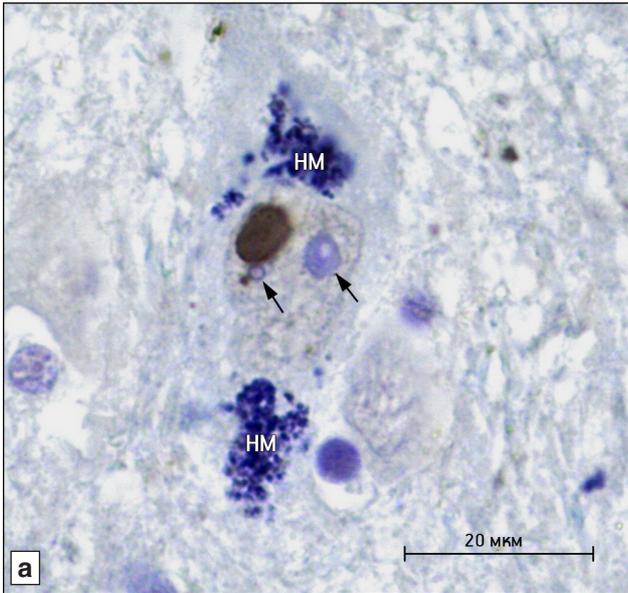
Большинство телец имели правильную круглую (см. рисунок, а–д), реже — овальную форму (см. рисунок, а, б). Однако в нескольких случаях были отмечены тельца Маринеско нетипичной — палочковидной, односторонне уплощенной (полукруг) (см. рисунок, е) или сегментированной неправильной формы.

Локализация телец Маринеско в пределах ядра сильно варьировала. При этом не выявлена какая-либо зависимость расположения телец от других оцениваемых характеристик (количества, формы, размеров). Локализация телец Маринеско возможна в любом участке ядра — от его центральных (см. рисунок, в, г) до периферических областей (в последнем случае тельца могли непосредственно примыкать к оболочке ядра на одном из его полюсов) (см. рисунок, а–в). При наличии

в одном ядре сразу нескольких телец Маринеско прослеживалась тенденция их концентрирования близко друг от друга (см. рисунок, б, г, е), иногда с непосредственным соприкосновением (см. рисунок, б, е). Примерно в 30% случаев одно или несколько из выявленных в ядре телец Маринеско непосредственно примыкали к ядрышку (см. рисунок, в, г, е). В остальных случаях тельца хоть и локализовались вблизи ядрышка (несколько телец могли даже окружать ядрышко с разных сторон), но при этом непосредственно к нему не примыкали, а располагались на расстоянии, сопоставимом с размерами телец и ядрышка (см. рисунок, а, г, д). В ряде случаев тельца были значительно удалены от ядрышка (см. рисунок, б, в). Несколько телец Маринеско в пределах одного ядра могли различаться по локализации относительно ядрышка — часть телец непосредственно примыкали к границе ядрышка, в то время как другие — были удалены от него (см. рисунок, в, г). В одном случае отмечено присутствие в ядре нейрона 2 ядрышек и 3 телец. Тельца Маринеско при этом располагались на некотором расстоянии от крупного ядрышка, но 2 из 3 телец непосредственно примыкали с разных сторон ко второму (мелкому) ядрышку (см. рисунок, в).

Обсуждение полученных данных. Проведенное исследование показало, что иммуноцитохимическая реакция на убиквитин позволяет более полно определять внутриядерные тельца в нейронах черного вещества, чем окраска по Нисслию, при которой они недостаточно четко выделяются на фоне хроматина ядра. Полученные данные в целом согласуются с мнением о преимущественном появлении телец Маринеско в нейронах у немолодых людей [2, 3]. В то же время, прямой зависимости встречаемости телец от возраста в интервале 48–58 лет обнаружено не было.

Интересным представляется вопрос о взаимоотношении убиквитин-иммунопозитивных внутриядерных телец с ядрышком, которое отмечал G. Marinesco [5]. В действительности лишь часть обнаруженных телец (непосредственно связанных с ядрышком) можно определенно считать парануклеолярными. Другая часть обнаруженных телец непосредственно с ядрышком не соприкасаются и даже могут располагаться далеко от него. Для них термин «парануклеолярное тельце» неприменим. В связи с использованным G. Marinesco [5] термином возникает вопрос о возможной идентичности обнаруживаемых телец с тельцами Кахаля (скрученные или парануклеолярные тельца, coiled bodies), которые встречаются в ядрах различных нейронов и других клеток [6]. Судя по тому, что в нейронах соседних с



черным веществом областей и в глиальных клетках телец, подобных тельцам Маринеско, обнаружить не удалось, эти два варианта внутриядерных структур нетождественны. Тем не менее, связь части из них с ядрышком очевидна. Функцию телец Маринеско можно было бы уточнить, изучив их белковый состав. Однако для этого (в связи с малыми их размерами) современные методы протеомики непригодны. Иммуноцитохимические методы позволили выявить определенно в составе телец Маринеско лишь ряд компонентов системы протеасомной деградации белков (включая убиквитин) [4, 7].

Таким образом, представленные данные позволяют сделать заключение о том, что тельца Маринеско не всегда ассоциированы с ядрышком нейрона, и поэтому термин «парануклеолярные тельца» пригоден для обозначения лишь части из них. Для телец Маринеско характерны полиморфизм и различный характер ассоциации друг с другом и ядерными структурами (ядрышком, ядерной оболочкой). Дальнейшему пониманию функционального значения этих внутриядерных структур должно способствовать выяснение их элементного и белкового состава.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 14-15-00014).

ЛИТЕРАТУРА

1. Сухорукова Е.Г., Алексеева О.С., Коржевский Д.Э. Катеxоламинергические нейроны головного мозга млекопитающих и нейромеланин // Журн. эволюц. биохим. 2014. Т. 50, № 5. С. 336–342.
2. Alladi P.A., Mahadevan A., Vijayalakshmi K. et al. Ageing enhances alpha-synuclein, ubiquitin and endoplasmic reticular stress protein expression in the nigral neurons of Asian Indians // Neurochem. Int. 2010. Vol. 57, № 5. P. 530–539.
3. Dickson D.W., Wertkin A., Kress Y. et al. Ubiquitin immunoreactive structures in normal human brains. Distribution and developmental aspects // Lab. Invest. 1990. Vol. 63. P. 87–99.
4. Kumada S., Uchihara T., Hayashi M. et al. Promyelocytic leukemia protein is redistributed during the formation of intranuclear inclusions independent of polyglutamine expansion: an immunohistochemical study on Marinesco bodies // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2002. Vol. 61. P. 984–991.
5. Marinesco G. Sur la presence des corpuscles acidophiles paranucleolaires dans les cellules du locus niger et du locus ceruleus // C.R.Acad. Sci. 1902. Vol. 135. P. 1000–1002.
6. Morris G.E. The Cajal body // Biochim. Biophys. Acta. 2008. Vol. 1783. P. 2108–2115.
7. Odagiri S., Tanji K., Mori F. et al. Immunohistochemical analysis of Marinesco bodies, using antibodies against proteins implicated in the ubiquitin – proteasome system, autophagy and aggresome formation // Neuropathology. 2012. Vol. 32. P. 261–266.

Поступила в редакцию 14.05.2015

DISTRIBUTION OF THE MARINESCO BODIES IN THE NEURONS OF HUMAN BRAIN SUBSTANTIA NIGRA

I.P. Grigoriyev, V.V. Gusel'nikova, Ye. G. Sukhorukova, D.E. Korzhevskiy

The aim of the study was to investigate the occurrence and intranuclear distribution of Marinesco bodies in substantia nigra neurons of the human brain. Marinesco bodies were identified in substantia nigra sections of 5 men aged 28 to 58 years old using Nissl staining and immunohistochemical detection of ubiquitin — the protein characteristic of this intranuclear inclusion. Marinesco bodies were found in 1–2% of the substantia nigra neurons, but not in adjacent brain areas. One neuron contained 1–4 Marinesco bodies sized up to $6.7 \times 5.1 \mu\text{m}$, which were located both near and at a distance from the nucleolus. Most Marinesco bodies exhibited ubiquitin expression. A trend was found for the increased incidence of Marinesco bodies in human substantia nigra neurons with age.

Key words: *substantia nigra, neuron, nucleus, Marinesco bodies, ubiquitin, immunohistochemistry*

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

Убиквитин-иммунопозитивные тельца Маринеско (коричневые гранулы) в ядрах нейронов черного вещества головного мозга человека.

а — крупное овальное и мелкое сферическое тельца, расположенные на периферии ядра и непосредственно примыкающие к одному из двух ядрышек (стрелки); б — 4 тельца удалены от ядрышка и сгруппированы попарно на периферии ядра; в — два близлежащих нейрона с тельцами Маринеско; в ядре одного нейрона 2 тельца, непосредственно примыкающие к одному из ядрышек (стрелка) с разных сторон, третье тельце удалено от обоих ядрышек и расположено на периферии ядра; в ядре соседнего нейрона мелкое тельце непосредственно примыкает к центрально локализованному ядрышку (сдвоенная стрелка); г — 2 тельца непосредственно примыкают к ядрышку (стрелка), третье тельце локализовано на расстоянии от него; д — два тельца равноудалены от ядрышка (стрелка); е — 2 тельца нетипичной формы (мелкое палочковидное и более крупное односторонне уплощенное) расположены близко друг к другу и недалеко от ядрышка (стрелка) (возможно, это части одного тельца, имеющего неокрашенный участок). НМ — нейромеланиновые гранулы в цитоплазме нейрона.

Иммуноцитохимическая реакция на убиквитин с докраской крезиловым фиолетовым.