

О.В. Кирик, Е.Г. Сухорукова и Д.Э. Коржевский

КАЛЬЦИЙ-СВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК Iba-1/AIF-1 В КЛЕТКАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ

Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (руков. — д-р мед. наук Д.Э. Коржевский) отдела общей и частной морфологии Научно-исследовательского института экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург

В настоящее время кальций-связывающий белок Iba-1 считают идентичным белку AIF-1 и рассматривают его как один из селективных маркеров микроглии. Однако данные о популяциях клеток, способных экспрессировать Iba-1/AIF-1, противоречивы. Цель настоящей работы состояла в идентификации клеток головного мозга крысы, экспрессирующих белок Iba-1, и в определении их структурных характеристик. В работе были использованы методы иммуноцитохимии и конфокальной лазерной микроскопии. Белок Iba-1 был обнаружен только в микроглиоцитах, макрофагах мозговых оболочек, супрапендимных макрофагах, поверхностных и стромальных клетках сосудистого сплетения — клетках, обладающих фагоцитарной функцией. Сравнение полученных данных с результатами других исследований позволяет предположить, что не все используемые в настоящее время антитела к белку Iba-1/AIF-1 выявляют один и тот же продукт. Не исключено, что это может быть связано с существованием альтернативного сплайсинга мРНК Iba-1.

Ключевые слова: микроглия, белок Iba-1/AIF-1, иммуноцитохимия, головной мозг, сосудистое сплетение.

Впервые белок Iba-1 был охарактеризован Y. Imai и соавт. в 1996 г. [8]. Ген данного белка у крысы располагается в 20-й хромосоме в локусе 20p12, соответствующем области главного комплекса гистосовместимости (класс III) [8]. Iba-1 — кальций-связывающий белок массой 17 килодалтон, который состоит из 147 аминокислот, образующих компактный домен, содержащий два кальций-связывающих участка, богатых гидрофобными аминокислотами (так называемые EF-hand-сайты), и сходный по структуре с тремя другими кальций-связывающими белками: тропонином С, белком S-100 и кальмодулином [15]. Считается, что белок Iba-1 идентичен охарактеризованным другими исследователями белкам — AIF-1 (allograft inflammatory factor-1), MRF-1 (microglia response factor) и даинтаину [7, 10]. Однако существуют ряд противоречий в описании свойств, характера экспрессии и функциональной роли этих белков [9, 11, 12, 14].

В настоящее время белок Iba-1/AIF-1 рассматривают как один из селективных маркеров микроглии [14]. В то же время, остается не вполне ясным, действительно ли белки Iba-1 и AIF-1 идентичны, поскольку последний обнаруживается не только в клетках моноцитарного происхождения, но и в гладких миоцитах, а также в эндотелии кровеносных сосудов и в клетках эпителиальных опухолей молочной железы [6, 11, 13]. В связи с наличием существенных противоречий в работах, посвященных иммуноцитохимическому маркиро-

ванию белка Iba-1/AIF-1, и увеличением числа исследований, в которых белок Iba-1 рассматривается как специфический маркер микроглиоцитов, существует необходимость в уточнении локализации и структурных особенностей всех типов клеток головного мозга, экспрессирующих белок Iba-1.

Цель настоящей работы — идентификация клеток головного мозга крысы, экспрессирующих белок Iba-1, и определение их структурных характеристик.

Материал и методы. Исследовали головной мозг крыс линии Вистар (n=14). При содержании и умерщвлении животных руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР №755 от 12.08.1977 г.).

Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [5]. Обезвоженные объекты заливали в парафин по общепринятой методике. Для идентификации экспрессирующих Iba-1 клеток использовали поликлональные козы антигена к антигену Iba-1 (AbCam, Великобритания, по каталогу — ab5076). В качестве иммуногена для этих антител был использован синтетический пептид TGPPAKKAISELP, соответствующий аминокислотам 81–93 белка AIF-1. После стандартной процедуры депарафинирования, регидратации и блокирования эндогенной пероксидазы срезы инкубировали 10 мин с 5% бычьим сывороточным альбумином для блокирования неспецифических сайтов связывания антигена и далее инкубировали с антителами к Iba-1 в разведении 1:320 в течение 18 ч при 40 °С. Для выявления комплекса антиген—антитело применяли набор реагентов LSAB+ (Dako, Дания). Визуализацию продукта иммуногистохимической реакции проводили при помощи хромогена диаминобензидина

(DAB+, Dako, Дания). После проведения реакций часть срезов подкрашивали квасцовым гематоксилином. Контрольные процедуры при постановке иммуноцитохимических реакций осуществляли с учетом рекомендаций производителей реагентов.

Для проведения трехмерной реконструкции клеток сложной формы часть препаратов обрабатывали флюоресцил-тирамидом из набора CSA II (Dako, Дания) и флюоресцентным красителем Hoechst 33342 (Invitrogen, США) и исследовали с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 510-meta (Zeiss, Германия). Обработку полученных изображений и трехмерную реконструкцию объектов проводили с применением компьютерных программ LSM 510, LSM Image Browser (Zeiss, Германия).

Результаты исследования. После проведения иммуноцитохимической реакции во всех исследованных препаратах были обнаружены Iba-1-позитивные клетки. В оболочках головного мозга крысы выявлялись круглые и овальной формы клетки с интенсивно окрашенной цитоплазмой.

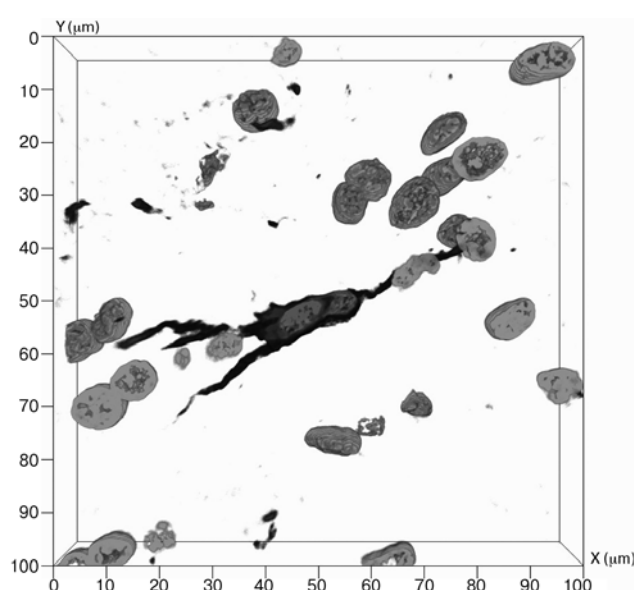
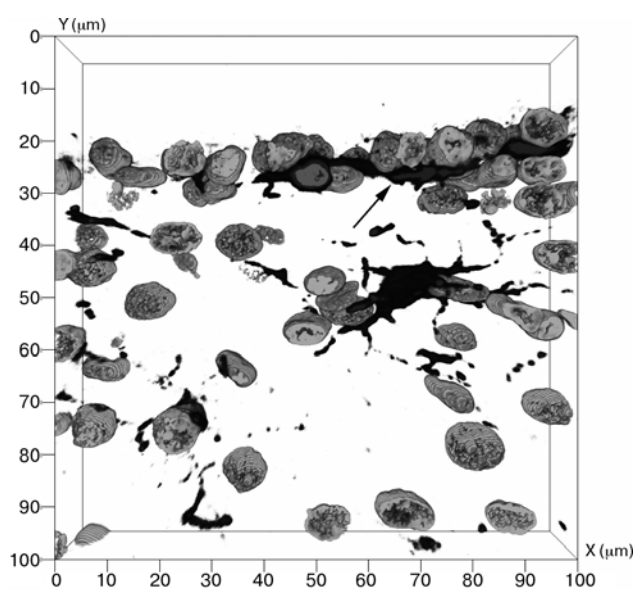
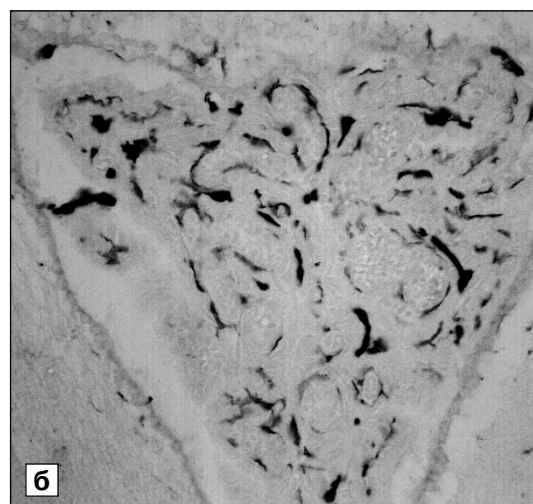
В коре и белом веществе, гиппокампе, стриатуме и других подкорковых структурах конечного мозга крысы иммунопозитивные отростчатые клетки имели характерную для микроглиоцитов структурную организацию (рисунок). В сером веществе мозга преобладали микроглиоциты с большим количеством разветвленных отростков, заканчивающихся шипикоподобными выростами. В области разветвления крупных отростков нередко наблюдались характерные для микроглиоцитов «наетки» цитоплазмы. Иногда наблюдались отростчатые клетки, изогнутые по периметру кровеносного сосуда.

В неокортексе встречались также отдельные клетки веретеновидной формы, ориентированные в радиальном направлении. В мозолистом теле преобладали клетки веретеновидной формы (палочковидные и с уплощенными отростками). Непосредственно под эпендимой желудочка обнаруживались отдельные уплощенные иммунопозитивные клетки веретеновидной формы, образующие небольшое число отростков, направленных как в подлежащую нервную ткань, так и проникающие в пласт эпендимных клеток. В отдельных случаях эти субэпендимные клетки формировали длинные неветвящиеся отростки, проходящие вдоль базальной границы эпендимного пласта (см. рисунок). На поверхности эпендимы желудочков выявлялись отдельные супраэпендимные клетки (как правило, безотростчатые, овальной формы), с интенсивной реакцией цитоплазмы на антиген Iba-1. Похожие клетки наблюдались и на поверхности эпителия сосудистого сплетения. Однако часть поверхностных Iba-1-позитивных клеток сосудистого сплетения формировали короткие

неразветвленные отростки. В соединительнотканной строме сосудистого сплетения вокруг кровеносных сосудов обнаруживались вытянутые иммунопозитивные клетки, интенсивность реакции в цитоплазме которых была меньше, чем в поверхностных клетках сосудистого сплетения.

Обсуждение полученных данных. Структурная организация большинства выявленных Iba-1-иммунопозитивных клеток серого и белого вещества головного мозга крысы позволяет однозначно идентифицировать эти клетки как микроглиоциты. Они имеют характерные расположение и форму, своеобразное ветвление отростков, небольшие вытянутые ядра, с преобладанием гетерохроматина, что соответствует многочисленным описаниям и изображениям, встречающимся в классических и современных работах, выполненных с использованием импрегнационных методов выявления микроглии [1, 2]. В эндотелии кровеносных сосудов, гладких миоцитах артерий, мозговых оболочек и головного мозга положительная реакция на антиген Iba-1 отсутствовала. Супраэпендимные клетки и поверхностные клетки сосудистого сплетения, которые давали положительную реакцию на белок Iba-1, вероятно, следует рассматривать как макрофаги. Действительно, поверхностные клетки сосудистого сплетения (клетки Колмера) являются фагоцитами моноцитарного происхождения [3]. У человека в этих клетках обнаруживается макрофагальный антиген CD68 [4]. Супраэпендимные клетки могут быть макрофагами, образуя общую популяцию с клетками Колмера [4]. Остается неясным, какие клетки стромы сосудистого сплетения экспрессируют антиген Iba-1. Известно [3], что в строме сосудистого сплетения имеются макрофаги, однако, на полученных гистологических препаратах, из-за близкого расположения стромальных клеток и стенки кровеносных сосудов сосудистого сплетения, не удастся определить структурные особенности иммунопозитивных клеток. Вероятно, этот вопрос можно окончательно разрешить лишь с использованием тотальных препаратов сосудистого сплетения.

Таким образом, в ходе настоящего исследования не получено убедительного свидетельства в пользу того, что белок Iba-1 может встречаться в каких-либо клетках головного мозга, помимо клеток, обладающих фагоцитарной функцией (микроглия, супраэпендимные макрофаги, поверхностные клетки и, вероятно, стромальные макрофаги сосудистого сплетения). По-видимому, следует согласиться с авторами [9, 15], считающими Iba-1 селективным маркером микроглии



Iba-1-иммунопозитивные клетки головного мозга крысы.

а — отростчатые клетки в неокортексе; б — клетки сосудистого сплетения; в — клетки под эпэндимой бокового желудочка и в субвентрикулярной зоне. Стрелка — отросток одной из клеток, расположенный непосредственно под слоем эпэндимоцитов; г — клетка в мозолистом теле. а, б — иммуногистохимическая реакция на белок Iba-1/AIF-1 без подкраски; в, г — иммуногистохимическая реакция на Iba-1, конфокальная микроскопия, визуализация с помощью флюоресцил-тирамида (черное окрашивание), эмиссионный светофильтр BP505-550; ядра окрашены красителем Hoechst 33342 (серое окрашивание), эмиссионный светофильтр BP420-480. Объемная реконструкция в «непрозрачном режиме». в — величина Z-серии 9,5 мкм, количество оптических срезов — 20; г — величина Z-серии 8 мкм, количество оптических срезов — 17. Размеры изображений нанесены на оси x, y; одно деление шкалы соответствует 10 мкм. а — об. 20, ок. 10; б — об. 40, ок. 10.

и макрофагов органов ЦНС. Отсутствие перичеселлярного диффузного окрашивания вокруг Iba-1-иммунопозитивных клеток косвенно свидетельствует против мнения J. Mentschel и соавт. [12] о том, что Iba-1/AIF1 — секретируемый гормоноподобный продукт. Сравнение полученных данных с результатами других исследований [6, 11, 13] позволяет предположить, что не все используемые в настоящее время антитела к белку Iba-1/AIF1 выявляют одно и то же вещество. Не исключено, что это может быть связано

с существованием альтернативного сплайсинга мРНК Iba-1.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (10-04-00180а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Артюхина Н.И. и Саркисова К.Ю. Межполушарная асимметрия повреждений гиппокампа после двусторонней перевязки общих сонных артерий. Рос. физиол. журн., 2004, т. 90, № 2, с. 146–156.
2. Белецкий В.К. Неврология, норма и патология. В кн.: Многотомное руководство по патологической анатомии. М., Гос. изд-во мед. лит-ры, 1963, т. II, с. 55–82.

3. Коржевский Д.Э. Тканевая организация и развитие сосудистого сплетения головного мозга человека. *Морфология*, 1998, т. 113, вып. 2, с. 105–114.
4. Коржевский Д.Э. Макрофаги сосудистого сплетения конечного мозга эмбриона человека. *Морфология*, 2001, т. 119, вып. 1, с. 20–23.
5. 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. 85–87.
6. Broglio L., Erne B., Tolnay M. et al. Allograft inflammatory factor-1: a pathogenetic factor for vasculitic neuropathy. *Muscle Nerve*, 2008, v.38, № 4, p. 1272–1279.
7. Deininger M.H., Meyermann R. and Schluesener H.J. The allograft inflammatory factor-1 family of proteins. *FEBS Lett.*, 2002, v. 514, № 2–3, p. 115–121.
8. 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, v. 224, № 3, p. 855–862.
9. Ito D., Imai Y., Ohsawa K., et al. Microglia-specific localization of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 1998, v. 57, № 1, p. 1–9.
10. Kohler C. Allograft inflammatory factor-1/Ionized calcium-binding adapter molecule 1 is specifically expressed by most subpopulations of macrophages and spermatids in testis. *Cell Tissue Res.*, 2007, v. 33, № 2, p. 291–302.
11. Liu S., Tan W.Y., Chen Q.R. et al. Daintain/AIF-1 promotes breast cancer proliferation via activation of the NF-kappa B/cyclin D1 pathway and facilitates tumor growth. *Cancer Sci.*, 2008, v.99, № 5, p. 952–957.
12. Mentschel J., Deininger M.H., Schluesener H.J. and Claus R. Effects of malnutrition on the expression of daintain/AIF-1 in the gut mucosa of pigs. *J. Vet. Med. Physiol. Clin. Med.*, 2002, v. 49, № 4, p. 184–188.
13. Sommerville L.J., Xing C., Kelemen S.E. et al. Inhibition of allograft inflammatory factor-1 expression reduces development of neointimal hyperplasia and p38 kinase activity. *Cardiovasc. Res.*, 2009, v. 81, № 1, p. 206–215.
14. Wu D., Miyamoto O., Shibuya S. et al. Different expression of macrophages and microglia in rat spinal cord contusion injury model at morphological and regional levels. *Acta Med. Okayama.*, 2005, v. 59, № 4, p. 121–127.
15. Yamada M., Ohsawa K., Imai Y. et al. X-ray structures of the microglia/macrophage-specific protein Iba-1 from human and mouse demonstrate novel molecular conformation change induced by calcium binding. *J. Mol. Biol.*, 2006, v. 364, № 3, p. 449–457.

Поступила в редакцию 28.10.09

CALCIUM- BINDING IBA-1/AIF-1 PROTEIN IN RAT BRAIN CELLS

O.V. Kirik, Ye.G. Sukhorukova and D.E. Korzhevskiy

At present, calcium-binding Iba-1 protein is considered to be identical to AIF-1 protein and it is used as one of the selective microglia markers. However, the data on the cell populations capable of expressing Iba-1/AIF-1, are inconsistent. The aims of the present study were to identify rat brain cells expressing Iba-1 and to define their structural characteristics. The methods of immunocytochemistry and confocal laser microscopy were used. Iba-1 protein was detected only in microglial cells, macrophages of brain meninges, supraependymal macrophages, superficial and stromal cells of the choroid plexus — all the cells possessing phagocytotic function. Comparison of the data obtained with the results of other studies allows to suggest that not all of commonly used antibodies against Iba-1/AIF-1 demonstrate the same product. It can not be excluded, that it can be associated with the presence of alternative splicing of Iba-1 mRNA.

Key words: *microglia, Iba-1/AIF-1 protein, immunocytochemistry, brain, choroid plexus.*

Laboratory of the Functional Neuromorphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, RAMS Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg