

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ МИКРОГЛИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАРКЕРА Iba-1 В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

DOI: 10.17691/stm2026.18.1.03

УДК 611.018.82:611.822.5

Поступила 17.07.2025 г.



В.В. Гусельникова, к.б.н., зав. лабораторией экспериментальной гистологии и конфокальной микроскопии Физиологического отдела им. И.П. Павлова¹; доцент кафедры фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий Медицинского института²;

О.В. Кирик, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы Физиологического отдела им. И.П. Павлова¹;

Д.А. Суфиева, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной гистологии и конфокальной микроскопии Физиологического отдела им. И.П. Павлова¹;

В.А. Разенкова, к.б.н., научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы Физиологического отдела им. И.П. Павлова¹;

А.А. Бекетова, лаборант-исследователь лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы Физиологического отдела им. И.П. Павлова¹;

Д.Э. Коржевский, д.м.н., профессор РАН, зав. лабораторией функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы Физиологического отдела им. И.П. Павлова¹

¹Институт экспериментальной медицины, ул. Академика Павлова, 12, Санкт-Петербург, 197022;

²Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская набережная, 7–9, Санкт-Петербург, 199034

Цель исследования — оценить возможности и ограничения использования метода иммуногистохимического выявления белка Iba-1 для морфофункционального анализа микроглии в разных условиях.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили образцы головного мозга крыс линии Wistar разных возрастных групп: 7-е сутки постнатального онтогенеза (n=18), 14-е сутки постнатального онтогенеза (n=18), половозрелые животные в возрасте 4–6 мес (n=22); а также образцы головного мозга крыс-самцов линии SHR (spontaneously hypertensive rats) в возрасте 3–6 мес (n=4); образцы коры больших полушарий головного мозга человека (n=10). Для иммуногистохимического выявления микроглии использовали кроличьи поликлональные антитела против кальций-связывающего белка Iba-1 (Bioss, США) с последующей идентификацией методами световой и конфокальной лазерной микроскопии. Для одновременного выявления клеток микроглии и амилоидных бляшек применяли оригинальную методику, разработанную ранее.

Результаты. В рамках проведенных исследований показано, что белок Iba-1 присутствует в клетках микроглии в сером и белом веществе во всех изученных областях головного мозга. Отмечено, что в разных областях для клеток микроглии характерны выраженные структурно-функциональные особенности при реакции на Iba-1. Помимо клеток микроглии в головном мозге крысы обнаружены другие Iba-1-иммунопозитивные клетки, которые являются тканевыми макрофагами мозга и отличаются от клеток микроглии по морфологии и локализации. Продемонстрировано, что белок Iba-1 присутствует в микроглиоцитах на всех изученных стадиях постнатального онтогенеза, что делает его удобным маркером для сравнительно-онтогенетических исследований этих клеток. Локализация Iba-1 в телах и отростках микроглиоцитов позволяет наиболее полно выявлять сложную отростчатую морфологию клеток и строить трехмерные реконструкции. Показано, что в головном мозге у спонтанно гипертензивных крыс линии SHR микроглия имеет ряд структурно-функциональных особенностей при реакции на Iba-1, указывающих на умеренную активацию микроглии. В головном мозге у крыс через 48 ч после ишемического воздействия в сером веществе стриатума ипсилатерального полушария рядом с областью повреждения выявлено аномально большое число крупных Iba-1-иммунопозитивных клеток с амебоидной морфологией. Отмечено, что в коре головного мозга человека клетки микроглии присутствуют в составе большинства выявленных амилоидных бляшек и имеют амебоидную морфологию, что указывает на их сильную активацию.

Заключение. Представленные результаты свидетельствуют о том, что белок Iba-1 является надежным и универсальным маркером микроглии. Иммуногистохимическое выявление этого белка позволяет идентифицировать, а также качественно и количественно анализировать микроглию в разных отделах головного мозга у человека и лабораторных животных в норме и при патологии. К ограничениям использования Iba-1 в качестве маркера микроглии можно отнести невозможность определения вектора активации микроглии и сложность различения микроглии и инфильтрирующих макрофагов мозга при патологии. В этих

Для контактов: Гусельникова Валерия Владимировна, e-mail: Guselnicova.Valeriia@yandex.ru

случаях необходимо совершенствовать технологию выявления микроглии, что может быть основано на использовании много-маркерного анализа.

Ключевые слова: микроглия; Iba-1; ишемия; SHR; амилоидные бляшки; онтогенез; иммуногистохимия.

Как цитировать: Gusel'nikova V.V., Kirik O.V., Sufieva D.A., Razenkova V.A., Beketova A.A., Korzhevskii D.E. Immunohistochemical detection of microglia using Iba-1 as a marker in health and disease. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2026; 18(1): 34, <https://doi.org/10.17691/stm2026.18.1.03>

Это статья с открытым доступом, распространяемая по лицензии CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

English

Immunohistochemical Detection of Microglia Using Iba-1 as a Marker in Health and Disease

V.V. Gusel'nikova, PhD, Head of Laboratory of Experimental Histology and Confocal Microscopy, I.P. Pavlov Department of Physiology¹; Associate Professor, Department of Fundamental Problems of Medicine and Medical Technologies, Medical Institute²;

O.V. Kirik, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, I.P. Pavlov Department of Physiology¹;

D.A. Sufieva, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Experimental Histology and Confocal Microscopy, I.P. Pavlov Department of Physiology¹;

V.A. Razenkova, PhD, Researcher, Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, I.P. Pavlov Department of Physiology¹;

A.A. Beketova, Laboratory Assistant Researcher, Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, I.P. Pavlov Department of Physiology¹;

D.E. Korzhevskii, MD, DSc, Professor of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, I.P. Pavlov Department of Physiology¹

¹Institute of Experimental Medicine, 12 Academician Pavlov St., Saint Petersburg, 197022, Russia;

²Saint Petersburg State University, 7–9 Universitetskaya Embankment, Saint Petersburg, 199034, Russia

The aim of the study was to evaluate the possibilities and limitations of using the immunohistochemical detection of Iba-1 protein for morphofunctional analysis of microglia under different conditions.

Materials and Methods. In the study we used brain samples from Wistar rats at different ages: 7 days of postnatal development (n=18), 14 days of postnatal development (n=18), 4–6 months (n=22); the brain samples from 3–6-month-old SHR (spontaneously hypertensive rats) male rats (n=4); human cerebral cortex samples (n=10). Rabbit polyclonal antibodies against calcium-binding protein Iba-1 (Biocare Medical, USA) were used to detect microglia immunohistochemically followed by light and confocal laser microscopy. A previously developed original technique was applied to simultaneously detect microglial cells and amyloid plaques.

Results. Iba-1 protein in microglial cells was shown to be present in grey and white matter in all cerebral regions under study. Microglial cells in different regions were noted to be characterized by pronounced structural and functional features when stained for Iba-1. In addition to microglial cells, in the rat brain there were found other Iba-1-immunopositive macrophages, which were tissue cerebral macrophages differing from microgliaocytes by specific morphology and localization. Iba-1 protein was demonstrated to be present in microglial cells in all investigated stages of postnatal development that makes Iba-1 an appropriate marker for comparative ontogenetical studies of microglial cells. The localization of Iba-1 in the bodies and processes of microgliaocytes enables to more clearly identify the complex ramified cell morphology and make three-dimensional reconstructions. In the brain of spontaneously hypertensive rats (SHR line rats) the Iba-1-immunopositive microglia were shown to have a number of structural and functional features indicating the moderate activation of microglia. 48 h after ischemic injury, an anomalously great number of large Iba-1-immunopositive cells with amoeboid morphology were detected in the gray matter of the striatum in an ipsilateral hemisphere near the injured area in the rat brain. Microglial cells in human cerebral cortex were noted to be localized in the majority of the detected amyloid plaques and characterized by amoeboid morphology indicating their severe activation.

Conclusion. The presented findings suggest Iba-1 protein to be a reliable and universal microglial marker. The immunohistochemical detection of the protein enables to identify and analyze qualitatively and quantitatively microglial cells in different brain regions in human and laboratory animals under normal and pathological conditions. The limitations of using Iba-1 as a marker of microglia include the inability to determine the microglial activation vector and the difficulty in distinguishing between microglia and infiltrating macrophages of the brain in pathology. In such cases, it is necessary to improve the technology for detecting microglia that can be based on using a multi-marker analysis.

Key words: microglia; Iba-1; ischemia; SHR; amyloid plaques; ontogenesis; immunohistochemistry.

Введение

В современной нейробиологии особый интерес исследователей сосредоточен на изучении микроглии, что связано с полифункциональностью этих клеток и пониманием их ведущей роли в развитии нейровоспаления — ключевого фактора нейродегенерации [1, 2]. Активное изучение микроглии делает особенно актуальным наличие в арсенале исследователей надежной технологии для идентификации этих клеток в физиологических и патологических условиях. Сложность в данном случае состоит в том, что микроглия является высокогетерогенной популяцией [3–6]. Отмечена межвидовая гетерогенность микроглии [7, 8], а также половая и региональная неоднородность этой клеточной популяции [5, 8, 9]. Кроме того, микроглия высокодинамична и легко изменяет профиль экспрессии генов в течение онтогенеза и в условиях развития патологии [7, 8, 10, 11]. Показано, что клетки микроглии экспрессируют более 1000 рецепторных систем, что делает их исключительно чувствительными к факторам локального микроокружения [3, 7, 12]. Вследствие столь высокой чувствительности клетки микроглии способны быстро менять свое структурно-функциональное состояние [13].

Среди современных технологий выявления микроглии наиболее широко используется методика иммуногистохимической идентификации этих клеток с помощью антител против кальций-связывающего белка Iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1) [5, 14, 15]. Однако, учитывая выраженную гетерогенность и динамичность микроглии, актуальным остается вопрос о границах применения Iba-1 в качестве маркера.

Цель исследования — оценить возможности и ограничения использования метода иммуногистохимического выявления белка Iba-1 для морфофункционального анализа микроглии в разных условиях.

Материалы и методы

Все исследования проведены в соответствии с положениями Хельсинкской декларации (2024) и одобрены локальным этическим комитетом Института экспериментальной медицины (протокол №3/17 от 30.11.2017 г., протокол №3/18 от 22.11.2018 г., протокол №1/22 от 18.02.2022 г.).

Материалом для исследования служили образцы головного мозга крыс линии Wistar разных возрастных групп: 7-е сутки постнатального онтогенеза (n=18), 14-е сутки постнатального онтогенеза (n=18), половозрелые животные возрастом 4–6 мес (n=22); а также образцы головного мозга крыс-самцов линии SHR (spontaneously hypertensive rats) в возрасте 3–6 мес (n=4); образцы коры больших полушарий головного мозга человека (n=10).

Крысят с датированным сроком рождения получали согласно рекомендациям А.П.Дыбана «Объекты биологии развития» [16]. Моделирование транзиторной фокальной ишемии проводили по методике, описанной ранее [17]. В случае изучения образцов головного мозга человека использовали архивный материал, полученный ранее в результате аутопсии [18], — 10 образцов коры больших полушарий головного мозга людей (мужчин, n=2 и женщин, n=8) в возрасте от 65 до 94 лет с наличием амилоидных бляшек. Сохранность материала и его пригодность для иммуногистохимического исследования определяли с использованием стандартной тестовой иммуногистохимической реакции на глиальный фибриллярный кислый белок.

Образцы головного мозга человека были фиксированы в 10% забуференном формалине, образцы головного мозга крыс — в цинк-этанол-формальдегиде [19]. После фиксации материал обезжизивали и заливали в парафин, изготавливали срезы толщиной 5 мкм и монтировали на предметные стекла с адгезивным покрытием (Menzel, Германия).

Для иммуногистохимической идентификации микроглии использовали кроличьи поликлональные антитела против Iba-1 в разведении 1:1000 (Biocare Medical, США). В качестве вторичных реагентов применяли компоненты из набора Reveal Rabbit Specific HRP-DAB Detection System (Spring Bioscience, США). Для визуализации продукта реакции применяли хромоген 3,3'-диаминобензидин из набора DAB+ (Agilent, США). После проведения реакции часть срезов подкрашивали квасцовым гематоксилином.

Для одновременного выявления амилоидных бляшек и клеток микроглии на срезах коры больших полушарий головного мозга человека применяли оригинальную методику, основанную на иммуногистохимическом выявлении микроглии с использованием антител против Iba-1 и на гистохимическом окрашивании амилоидных бляшек красителем альциановым синим [20].

Полученные препараты анализировали на световом микроскопе Leica DM750 (Leica Microsystems, Германия) и фотографировали с помощью фотокамеры ICC50 (Leica Microsystems, Германия); применяли компьютерную программу LAS EZ (Leica Microsystems, Германия).

Для иммунофлуоресцентного анализа микроглии использовали кроличьи поликлональные антитела против Iba-1 в разведении 1:500 (Biocare Medical, США). Выявление первичных антител осуществляли с применением моновалетного Fab-фрагмента антикроличьего иммуноглобулина осла, конъюгированного с флуорохромом Rhodamine Red™-X (RRX) (Jackson ImmunoResearch, США). Ядра подкрашивали флуоресцентным ядерным красителем Sytox Green (Invitrogen, США). Полученные препараты анализировали на конфокальном лазерном микроскопе Zeiss LSM 800 (Zeiss, Германия). Для возбуждения флуоресценции RRX использовали лазер с длиной

волны 561 нм, для Sytox Green — 488 нм. Применяли объективы Plan-Apochromat 20×/0.8 M27 и Plan-Apochromat 63×/1.40 Oil DICM27 (масляная иммерсия). Анализ полученных изображений проводили при помощи компьютерной программы ZEN 2.6 blue edition (Zeiss, Германия).

Результаты

Использование маркера Iba-1 для изучения структурно-функционального состояния и региональных особенностей микроглии. При анализе препаратов головного мозга половозрелых крыс отмечено, что во всех проанализированных случаях Iba-1-иммунопозитивные клетки присутствуют во всех отделах головного мозга, попавших в плоскость среза. Иммуногистохимическая реакция характеризуется высокой интенсивностью и отсутствием фонового окрашивания. В коре больших полушарий, субкортикальном белом веществе, стриатуме, гиппокампе и других подкорковых структурах конечного мозга Iba-1-иммунопозитивные клетки имеют преимущественно отростчатую форму, свойственную микроглии

без признаков активации (рис. 1). Iba-1 присутствует в теле и отростках микроглиоцитов.

Было отмечено морфологическое разнообразие Iba-1-иммунопозитивных клеток в зависимости от их локализации в разных отделах головного мозга. В коре больших полушарий наблюдаются микроглиоциты некрупной сомы (круглой или овальной формы) с длинными тонкими отростками, сильно ветвящимися в разных направлениях (рис. 1, а).

В субкортикальном белом веществе клетки микроглии имеют веретеновидную форму (рис. 1, б). Они характеризуются наличием одного или двух (редко трех) длинных неветвящихся или слабоветвящихся отростков, которые отходят от разных полюсов тела клетки в противоположных направлениях. Тела и отростки клеток микроглии ориентированы вдоль нервных волокон (см. рис. 1, б).

В гиппокампе клетки микроглии имеют морфологию, сходную с микроглией в коре больших полушарий, и характеризуются наличием небольшой сомы с малым объемом перинуклеарной цитоплазмы и многочисленных тонких ветвящихся отростков (рис. 1, в). Отростки микроглии пронизывают весь нейропил

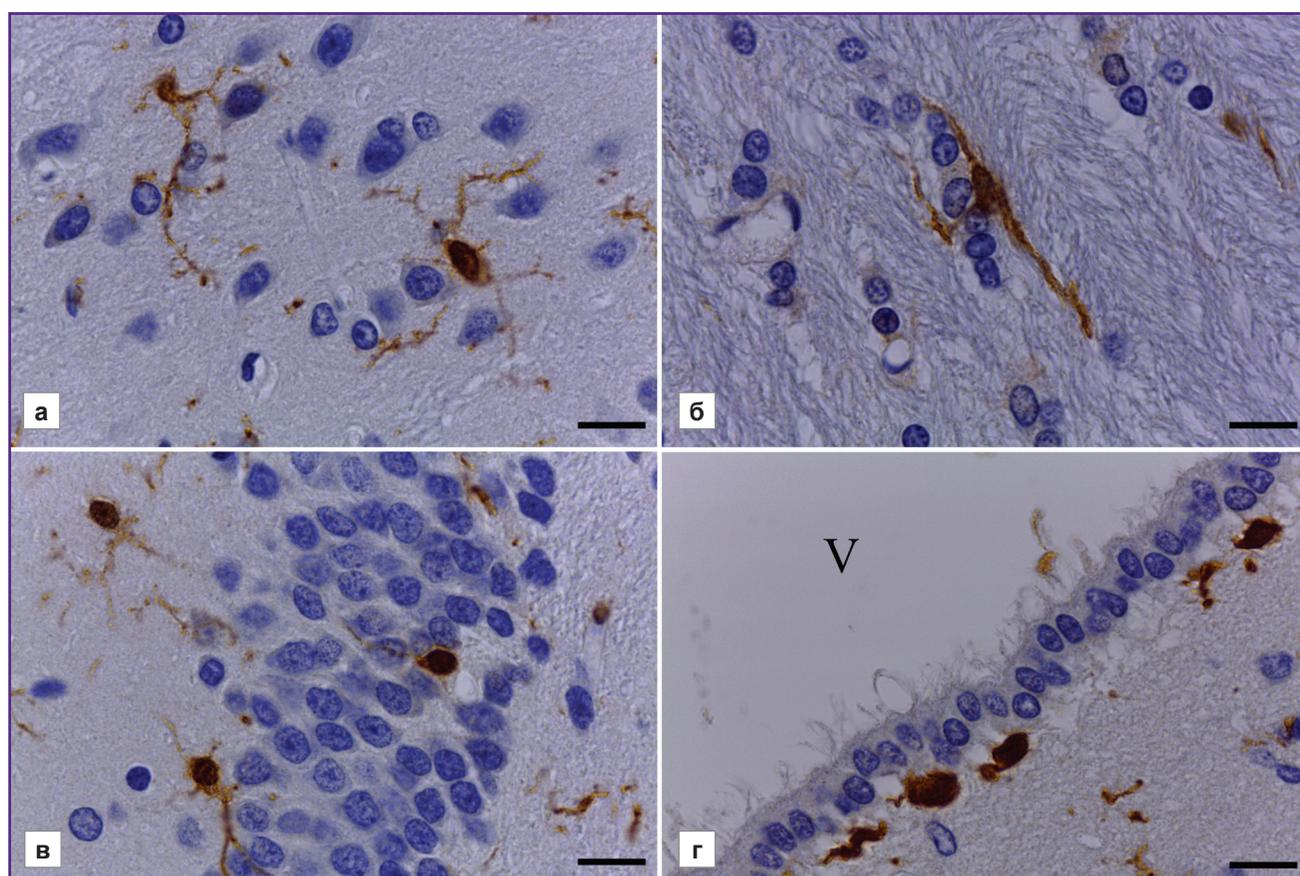


Рис. 1. Морфологические особенности микроглии в разных отделах головного мозга крысы: а — кора больших полушарий головного мозга; б — субкортикальное белое вещество; в — зубчатая фасция гиппокампа; г — субэпендимная зона III желудочка. Иммуногистохимическая реакция на Iba-1 с докраской квасцовым гематоксилином. V — полость III желудочка. Бар — 20 мкм

гиппокампа и проникают в слои нейронов гиппокампа. Тела микроглиоцитов, как правило, выявляются за пределами слоев нейронов, часто — непосредственно примыкают к ним. Изредка тела микроглиоцитов обнаруживаются непосредственно в составе пирамидного слоя или зернистого слоя зубчатой извилины, они локализованы между телами нейронов (см. рис. 1 в).

В субэпендимной зоне желудочков головного мозга (боковых, III) микроглиоциты имеют амебонидную морфологию — это клетки с округлой/вытянутой сомой и короткими неветвящимися отростками либо без отростков (рис. 1, а). Некоторые клетки веретеновидной формы образуют небольшое число отростков, которые направлены в подлежащую нервную ткань или в пласт эпендимных клеток.

Помимо клеток микроглии в головном мозге крысы отмечено наличие других Iba-1-иммунопозитивных клеток, которые являются тканевыми макрофагами мозга (рис. 2). В оболочках головного мозга

выявлены менингеальные макрофаги — безотростчатые клетки круглой и овальной, реже — веретеновидной формы с интенсивно окрашенной цитоплазмой (рис. 2, а). Вблизи кровеносных сосудов в разных отделах головного мозга обнаружены периваскулярные Iba-1-иммунопозитивные малоотростчатые клетки, распластанные вдоль оси капилляра, которые являются периваскулярными макрофагами (рис. 2, б). В сосудистом сплетении головного мозга присутствуют клетки Колмера, которые имеют овальную форму сомы и либо не формируют отростков, либо имеют короткие неразветвленные отростки. В соединительнотканной строме сосудистого сплетения вокруг кровеносных сосудов располагаются вытянутые Iba-1-иммунопозитивные клетки (рис. 2, в). На поверхности эпендимы желудочков наблюдаются отдельные супраэпендимные макрофаги — безотростчатые, овальной формы, с интенсивной реакцией цитоплазмы на антиген Iba-1 (рис. 2, г).

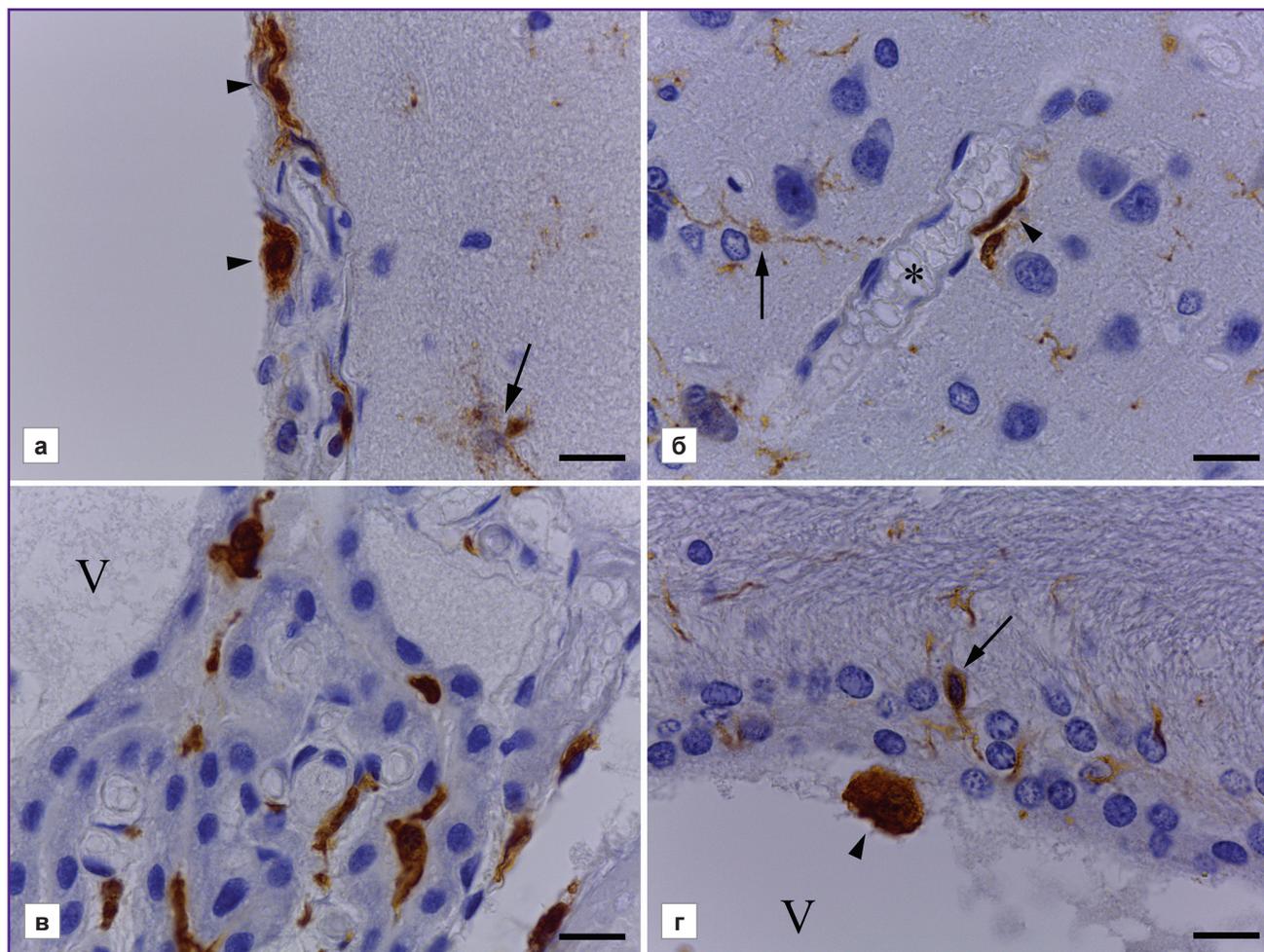


Рис. 2. Резидентные макрофаги головного мозга у крысы:

а — менингеальные макрофаги; б — периваскулярные макрофаги; в — клетки Колмера и клетки стромы сосудистого сплетения; г — супраэпендимный макрофаг в боковом желудочке. Иммуногистохимическая реакция на Iba-1 с докраской квасцовым гематоксилином. V — полость желудочка. Просвет кровеносного сосуда обозначен звездочкой, микроглиоциты — стрелками, макрофаги — головками стрелок. Бар — 20 мкм

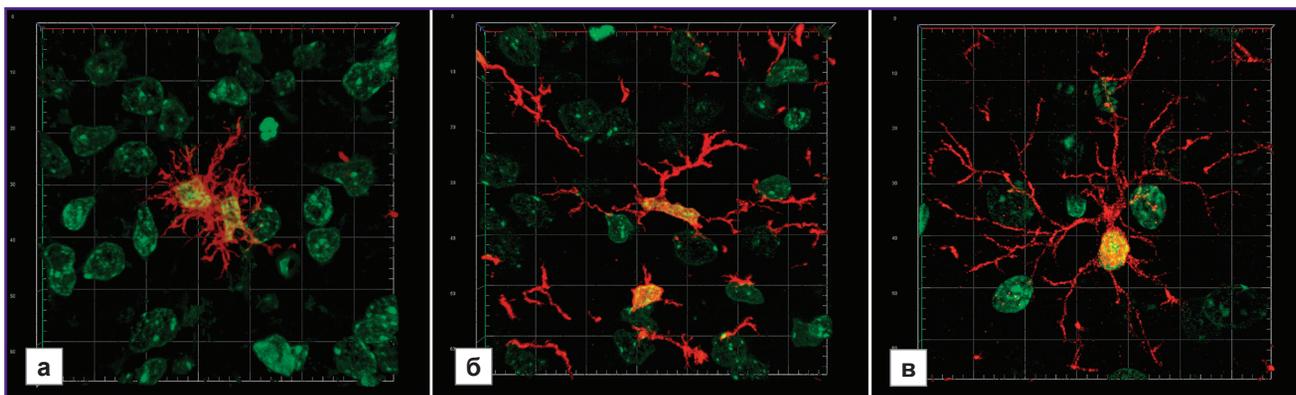


Рис. 3. Морфологические особенности микроглии стриатума крысы на разных стадиях постнатального онтогенеза:

а — 7-е сутки постнатального онтогенеза; *б* — 14-е сутки постнатального онтогенеза; *в* — половозрелое животное. Иммунофлуоресцентная реакция на Iba-1 (красный цвет), ядра клеток окрашены ядерным красителем Sytox Green (зеленый цвет). Конфокальная лазерная микроскопия, трехмерная реконструкция. Размер ячейки масштабной сетки — 10×10 мкм

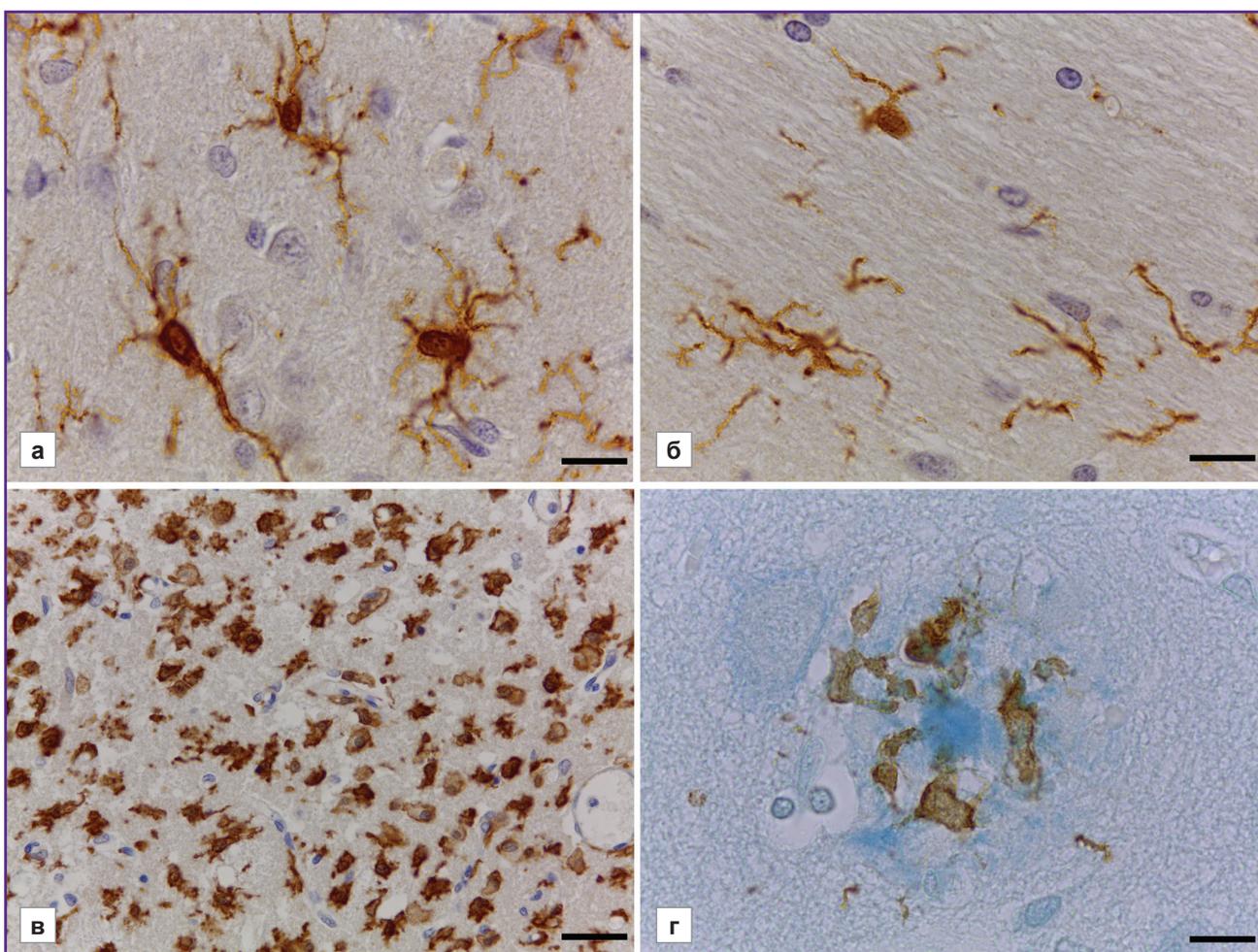


Рис. 4. Активированные формы микроглии при патологии:

а, б — умеренная активация микроглии в коре больших полушарий (*а*) и в белом веществе (*б*) головного мозга у крыс линии SHR; *в* — сильная активация микроглии в зоне ишемического повреждения в головном мозге крысы; *г* — амёбовидная микроглия в составе амилоидной бляшки в коре головного мозга человека. Иммуногистохимическая реакция на Iba-1; *а-в* — подкраска квасцовым гематоксилином; *г* — подкраска альциановым синим. Бар — 20 мкм (*а, б, в*) и 50 мкм (*г*)

Использование маркера Iba-1 для сравнительно-онтогенетических исследований микроглии. С помощью метода конфокальной лазерной микроскопии изучены микроглиоциты стриатума крысы на разных стадиях постнатального онтогенеза (P7, P14, половозрелые животные). Белок Iba-1 присутствовал в телах и отростках микроглиоцитов на всех изученных стадиях онтогенеза.

На 7-е сутки постнатального развития микроглия характеризовалась разнообразием морфотипов: одни микроглиоциты имели широкие лопастные цитоплазматические выросты, другие — 2–3 крупных неветвящихся отростка; присутствовали также микроглиоциты с большим числом коротких тонких ветвящихся отростков (рис. 3, а). Все выявленные микроглиоциты на этой стадии постнатального развития характеризовались небольшим размером.

На 14-е сутки постнатального развития большинство выявленных Iba-1-иммунопозитивных клеток имели небольшое, часто вытянутое тело и несколько длинных относительно тонких умеренно ветвящихся отростков (рис. 3, б).

У половозрелых животных микроглия в стриатуме отличается морфологическим единообразием: все выявленные микроглиоциты имели небольшое тело и многочисленные тонкие сильно ветвящиеся отростки, отходящие от тела клетки в разных направлениях (рис. 3, в).

Использование маркера Iba-1 для изучения микроглии при патологии нервной системы. В головном мозге у спонтанно гипертензивных крыс линии SHR (рис. 4, а, б) микроглия имеет ряд структурно-функциональных особенностей при реакции на белок Iba-1: наблюдается увеличение размеров тел микроглиальных клеток, а также утолщение их отростков, которые обладают интенсивным ветвлением как в сером (см. рис. 4, а), так и в белом веществе (см. рис. 4, б).

В головном мозге у крыс через 48 ч после ишемического воздействия в сером веществе стриатума ипсилатерального полушария рядом с областью повреждения присутствует аномально большое число крупных Iba-1-иммунопозитивных клеток (см. рис. 4, в). Они характеризуются округлой или амебоидной формой, отсутствием отростков. Некоторые клетки имеют лишь небольшие цитоплазматические выросты (см. рис. 4, в). Однозначно определить принадлежность этих клеток к микроглии или к макрофагам не представляется возможным. Микроглия с нормальной разветвленной морфологией в области ишемического повреждения отсутствует.

В коре головного мозга человека клетки микроглии присутствуют в составе большинства амилоидных бляшек, выявленных с использованием альцианового синего (рис. 4, г). Микроглиальные клетки имеют амебоидную морфологию: тела их крупные, неправильной формы, иногда наблюдаются короткие цитоплазматические выросты с бульбообразными утолщениями. Микроглия локализована в пределах волокнистого ореола бляшки. Отростки микроглии могут тянуться

и плотно примыкать к центральному кору, при этом внутри центральной части Iba-1-иммунопозитивные структуры отсутствуют (см. рис. 4, г). Интенсивность иммуноокрашивания микроглии в данном случае значительно ниже по сравнению с интенсивностью иммуногистохимической реакции на Iba-1 у крысы.

Обсуждение

В рамках представленного исследования мы оценили возможности и границы применения метода иммуногистохимического выявления белка Iba-1 для морфофункционального анализа микроглии в разных условиях. Продемонстрировано, что в головном мозге у половозрелых крыс линии Wistar белок Iba-1 присутствует в клетках микроглии во всех изученных областях головного мозга, в сером и в белом веществе. При этом в разных областях для клеток микроглии характерны морфологические особенности, что хорошо согласуется с имеющимися представлениями о высокой региональной гетерогенности этой клеточной популяции [9]. Нами не отмечено различий в интенсивности иммуногистохимической реакции на Iba-1 в разных отделах головного мозга. С этой точки зрения Iba-1 может рассматриваться в качестве универсального маркера для изучения микроглии разных областей мозга, независимо от высокой региональной специфичности, характерной для этих клеток. Достоинством Iba-1 как маркера микроглии является также высокая консервативность этого белка, что позволяет использовать антитела против Iba-1 для выявления микроглии у разных видов лабораторных животных и человека [21].

Iba-1 — это цитоплазматический белок, который присутствует как в теле, так и в отростках микроглиоцитов [7, 15]. Благодаря цитоплазматической локализации и равномерному распределению Iba-1 внутри клетки иммуногистохимическое определение данного белка позволяет наиболее полно выявлять сложную структуру отростков микроглиоцитов, а также строить пространственные реконструкции этих клеток, что позволяет применять иммуногистохимическую реакцию на Iba-1 в качестве инструмента для наиболее полного изучения морфологии микроглии. Другие широко используемые белки-маркеры микроглии (CD68, P2Y12R, TMEM119) [5, 7, 22, 23] менее пригодны для этой цели, так как являются трансмембранными молекулами и часто имеют «пунктирный» характер распределения. Их применение в качестве иммуногистохимических маркеров не позволяет в полной мере оценить особенности сложной морфологии микроглиальных клеток.

При исследовании микроглии в стриатуме крысы на разных стадиях постнатального онтогенеза нами было показано, что Iba-1 является удобным маркером для изучения динамики изменения морфологии клеток микроглии. Из данных литературы

известно, что Iba-1 начинает экспрессироваться в клетках-предшественниках микроглии на ранних этапах эмбриогенеза [24] и сохраняется на протяжении всего последующего онтогенеза, что делает возможным проведение сравнительно-онтогенетических исследований микроглии с использованием Iba-1 в качестве маркера. Это отличает Iba-1 от многих других маркерных белков микроглии. Так, например, TMEM119 отсутствует в незрелой микроглии в пренатальном и раннем (до P14) постнатальном периоде [15].

Полученные нами результаты вместе с многочисленными данными литературы [23] свидетельствуют о том, что белок Iba-1 присутствует в клетках микроглии разной степени активации. Микроглию обычно подразделяют на два основных морфофункциональных типа: разветвленную (отростчатую) и амебоидную. Отростчатая микроглия является «покоящейся» формой микроглии (по старой терминологии), которую в настоящее время чаще называют «наблюдающей». Эти клетки характеризуются небольшим телом и наличием тонких длинных ветвящихся отростков, которые находятся в постоянном движении: они способны быстро удлиняться, укорачиваться, формировать небольшие временные выросты (филоподии). Считается, что отростчатая микроглия не способна к фагоцитозу, а основной функцией этих клеток является непрерывное сканирование локального микроокружения на наличие патологических стимулов и взаимодействие с другими клетками и внеклеточными компонентами нервной ткани [5]. В ответ на повреждение микроглия быстро меняет молекулярные и структурные свойства, что отражается на ее морфологии — размер тела клеток увеличивается, отростки укорачиваются и утолщаются [5, 23]. Терминальной стадией активации микроглии является амебоидная форма — высокоподвижные фагоцитирующие клетки, участвующие в презентации антигена [5, 15]. Данные, полученные нами при изучении разных видов патологии, свидетельствуют о том, что Iba-1 присутствует как в разветвленной, так и в амебоидной микроглии, а также во всех промежуточных формах. Это делает данный белок удобным инструментом для изучения микроглии в норме и при патологии, а также позволяет оценить и дифференцировать различные патологические состояния. Так, при проведении Iba-1-иммуоокрашивания на препаратах головного мозга крыс линии Wistar после транзиторной окклюзии средней мозговой артерии нами была получена характерная картина изменений микроглии при ишемическом повреждении, описанная ранее [25–27]: интенсивность окрашивания и плотность Iba-1-иммуопозитивных элементов была значительно увеличена в ядре ишемии и зоне «ишемической полутени» по сравнению с неповрежденным полушарием, а для Iba-1-позитивных клеток была характерна амебоидная или округлая

форма. Данные литературы также свидетельствуют об увеличении экспрессии белка Iba-1 в ишемическом ядре и прилежащей зоне [28].

Типичную морфологическую картину мы наблюдали при изучении препаратов коры головного мозга человека с амилоидными бляшками. Выявлено, что в данном случае активированные клетки микроглии плотно окружают амилоидные скопления. Активация микроглии и ее кластеризация вокруг амилоидных бляшек — хорошо известный феномен, однако точная роль микроглии в данном случае остается неясной. С одной стороны, показано, что микроглия сдерживает токсическое действие бета-амиоида, образуя отграничивающий барьер вокруг амилоидных скоплений [29]. Кроме того, микроглия способна фагоцитировать амилоидные фибриллы [30]. С другой стороны, длительная активация микроглии вызывает хроническое нейровоспаление, приводящее к повреждению нейронов [31]. Исследования, выполненные S. Vibova и соавт. [32] на посмертных образцах головного мозга людей с болезнью Альцгеймера, продемонстрировали увеличение экспрессии белка Iba-1, выраженное в разной степени в зависимости от стадии заболевания. Интересно, что нами была отмечена пониженная интенсивность Iba-1-иммуоокрашивания микроглии, ассоциированной с амилоидными бляшками в коре головного мозга человека. Это может быть результатом изменения фенотипа микроглии на амебоидный. Однако нельзя исключать и того, что у микроглии, ассоциированной с амилоидными скоплениями, уровень экспрессии Iba-1 уменьшается на определенных стадиях развития заболевания, что приводит к снижению содержания белка Iba-1 в этих клетках.

Помимо многочисленных преимуществ иммуногистохимического выявления Iba-1 для изучения микроглии, этот метод имеет ряд ограничений, которые следует учитывать при планировании исследований. Так, в мировой научной литературе имеются данные об утрате экспрессии Iba-1 клетками микроглии в некоторых отделах головного мозга при развитии таких заболеваний, как шизофрения, болезнь Гентингтона, ожирение [9, 23, 33]. В указанных случаях использование только Iba-1 в качестве маркера не позволяет полностью выявлять популяцию микроглии.

Кроме того, применение Iba-1 не позволяет определить вектор активации микроглии (M1/провоспалительный или M2/противовоспалительный), что делает невозможным точное определение функционального вклада микроглии в конкретную патологию.

Еще одним существенным ограничением использования Iba-1 является присутствие этого белка не только в клетках микроглии, но также в тканевых макрофагах мозга и в периферических макрофагах [5, 23, 34]. Проведенные нами исследования продемонстрировали, что в норме отличить микроглию от тканевых макрофагов при реакции на Iba-1 воз-

можно по особенностям локализации и морфологии. Однако в условиях патологии отличить активированную амeboидную микроглию от рекрутируемых макрофагов (потомков моноцитов крови) может быть затруднительно. Так, нами отмечено, что после временной окклюзии средней мозговой артерии у крыс плотность и интенсивность окрашивания Iba-1 были значительно увеличены в ишемическом ядре и ишемической пограничной зоне по сравнению с непораженным полушарием. В зоне ишемического повреждения присутствовало большое количество Iba-1-иммунопозитивных клеток амeboидной формы. В данном случае определить, являются эти клетки активированной микроглией или рекрутированными макрофагами, не представляется возможным. Очевидно, что в подобных случаях использования только Iba-1 в качестве маркера для анализа микроглии недостаточно. Возможность совершенствования технологии является одновременное применение нескольких маркерных белков. Наиболее перспективными для этих целей в настоящее время представляются описанные сравнительно недавно белки TMEM119 и P2RY12. TMEM119 — это трансмембранный белок, состоящий из 283 аминокислот, который присутствует исключительно на поверхности микроглиальных клеток и не экспрессируется в других клетках моноцитарно-макрофагального ряда [22]. Связанный с G-белком пуриnergический рецептор P2RY12 также высокоспецифичен для микроглии [6, 11, 35, 36]. Оба белка были охарактеризованы как гомеостатические маркеры микроглии, демонстрирующие снижение экспрессии при активации микроглиальных клеток [11, 22, 37, 38]. С такой точки зрения использование комбинаций этих маркеров с Iba-1, экспрессия которого, наоборот, увеличивается при активации [5, 23], должно позволить наиболее полно и высокоспецифично выявлять популяцию микроглии в норме и при патологии. Разработка соответствующих протоколов двойного и/или тройного маркирования представляется важной методической задачей современной нейробиологии.

Заключение

Iba-1 может считаться надежным и универсальным маркером микроглии. Его иммуногистохимическое выявление позволяет идентифицировать и анализировать (качественно и количественно) микроглию в разных отделах головного мозга у человека и лабораторных животных в норме и при патологии. Ограничения использования Iba-1 в качестве маркера микроглии связаны прежде всего с невозможностью определить вектор активации микроглии, а также со сложностью различения микроглии и инфильтрирующих макрофагов мозга при патологии. В этих случаях необходимо совершенствовать технологию выявления микроглии, что может быть основано на применении многомаркерного анализа.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект №24-15-00032, <https://rscf.ru/project/24-15-00032/>.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Adamu A., Li S., Gao F., Xue G. The role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases: current understanding and future therapeutic targets. *Front Aging Neurosci* 2024; 16: 1347987, <https://doi.org/10.3389/fnagi.2024.1347987>.
2. Muzio L., Viotti A., Martino G. Microglia in neuroinflammation and neurodegeneration: from understanding to therapy. *Front Neurosci* 2021; 15: 742065, <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.742065>.
3. Healy L.M., Zia S., Plemel J.R. Towards a definition of microglia heterogeneity. *Commun Biol* 2022; 5(1): 1114, <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04081-6>.
4. Malinovskaya N.A., Frolova O.V., Shishelova K.O., Panina Yu.A. Current methods for the isolation and cultivation of microglia (review). *Sovremennyye tehnologii v medicine* 2021; 13(6): 89, <https://doi.org/10.17691/stm2021.13.6.10>.
5. Jurga A.M., Paleczna M., Kuter K.Z. Overview of general and discriminating markers of differential microglia phenotypes. *Front Cell Neurosci* 2020; 14: 198, <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00198>.
6. Cserép C., Pósfai B., Dénes Á. Shaping neuronal fate: functional heterogeneity of direct microglia-neuron interactions. *Neuron* 2021; 109(2): 222–240, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.11.007>.
7. Masuda T., Sankowski R., Staszewski O., Prinz M. Microglia heterogeneity in the single-cell era. *Cell Rep* 2020; 30(5): 1271–1281, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.010>.
8. Galatro T.F., Holtman I.R., Lerario A.M., Vainchtein I.D., Brouwer N., Sola P.R., Veras M.M., Pereira T.F., Leite R.E.P., Möller T., Wes P.D., Sogayar M.C., Laman J.D., den Dunnen W., Pasqualucci C.A., Obashinjo S.M., Boddeke E.W.G.M., Marie S.K.N., Eggen B.J.L. Transcriptomic analysis of purified human cortical microglia reveals age-associated changes. *Nat Neurosci* 2017; 20(8): 1162–1171, <https://doi.org/10.1038/nn.4597>.
9. Tan Y.L., Yuan Y., Tian L. Microglial regional heterogeneity and its role in the brain. *Mol Psychiatry* 2020; 25(2): 351–367, <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0609-8>.
10. Hickman S.E., Kingery N.D., Ohsumi T.K., Borowsky M.L., Wang L.C., Means T.K., El Khoury J. The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nat Neurosci* 2013; 16(12): 1896–1905, <https://doi.org/10.1038/nn.3554>.
11. Mildner A., Huang H., Radke J., Stenzel W., Priller J. P2Y12 receptor is expressed on human microglia under physiological conditions throughout development and is sensitive to neuroinflammatory diseases. *Glia* 2017; 65(2): 375–387, <https://doi.org/10.1002/glia.23097>.
12. Zia S., Rawji K.S., Michaels N.J., Burr M., Kerr B.J., Healy L.M., Plemel J.R. Microglia diversity in health and

multiple sclerosis. *Front Immunol* 2020; 11: 588021, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.588021>.

13. Fumagalli L., Nazlie Mohebaniy A., Premereur J., Polanco Miquel P., Bijmens B., Van de Walle P., Fattorelli N., Mancuso R. Microglia heterogeneity, modeling and cell-state annotation in development and neurodegeneration. *Nat Neurosci* 2025; 28(7): 1381–1392, <https://doi.org/10.1038/s41593-025-01931-4>.

14. Kanazawa H., Ohsawa K., Sasaki Y., Kohsaka S., Imai Y. Macrophage/microglia-specific protein Iba1 enhances membrane ruffling and Rac activation via phospholipase C-gamma-dependent pathway. *J Biol Chem* 2002; 277(22): 20026–20032, <https://doi.org/10.1074/jbc.M109218200>.

15. Kolos E.A., Korzhevskii D.E. Spinal cord microglia in health and disease. *Acta Naturae* 2020; 12(1): 4–17, <https://doi.org/10.32607/actanaturae.10934>.

16. Дыбан А.П., Пучков В.Ф., Баранов В.С., Самошкина Н.А., Чеботарь Н.А. Лабораторные млекопитающие: мышь *Mus musculus*, крыса *Rattus norvegicus*, кролик *Oryctolagus cuniculus*, хомячок *Cricetus griseus*. В кн.: *Объекты биологии развития*. М: Наука; 1975; с. 505–566.

Dyban A.P., Puchkov V.F., Baranov V.S., Samoshkina N.A., Chebotar N.A. *Laboratornye mlekopitayushchie: mysh' Mus musculus, krysa Rattus norvegicus, krolik Oryctolagus cuniculus, khomyachok Cricetus griseus*. V kn.: *Ob"ekty biologii razvitiya* [Laboratory mammals: mouse *Mus musculus*, rat *Rattus norvegicus*, rabbit *Oryctolagus cuniculus*, hamster *Cricetus griseus*. In: Objects of developmental biology]. Moscow: Nauka; 1975; p. 505–566.

17. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Власов Т.Д. Появление звездчатых гладких миоцитов в головном мозгу крысы после транзиторной фокальной ишемии. *Морфология* 2013; 143(1): 073–075.

Korzhevskii D.E., Kirik O.V., Vlasov T.D. Appearance of stellate smooth muscle cells in the rat brain after transitory focal ischemia. *Morphology* 2013; 143(1): 073–075.

18. Гусельникова В.В., Антипова М.В., Федорова Е.А., Сафрай А.Е., Рукавишникова А.А., Михайлова Е.В., Коржевский Д.Э. Особенности применения методов гистохимии и иммуногистохимии для выявления амилоидных бляшек в коре головного мозга человека. *Журнал анатомии и гистопатологии* 2019; 8(2): 91–99, <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2019-8-2-91-99>.

Gusel'nikova V.V., Antipova M.V., Fedorova E.A., Safray A.E., Rukavishnikova A.A., Mikhailova E.V., Korzhevskii D.E. Distinctive features of histochemical and immunohistochemical techniques for amyloid plaque detection in the human cerebral cortex. *Journal of Anatomy and Histopathology* 2019; 8(2): 91–99, <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2019-8-2-91-99>.

19. Коржевский Д.Э., Сухорукова Е.Г., Гилерович Е.Г., Петрова Е.С., Кирик О.В., Григорьев И.П. Преимущества и недостатки цинк-этанол-формальдегида как фиксатора для иммуногистохимических исследований и конфокальной лазерной микроскопии. *Morphology* 2013; 143(2): 081–085.

Korzhevskii D.E., Sukhorukova Y.G., Gilerovich Y.G., Petrova Y.S., Kirik O.V., Grigoriev I.P. Advantages and disadvantages of zinc-ethanol-formaldehyde as a fixative for immunocytochemical studies and confocal laser microscopy. *Morphology* 2013; 143(2): 081–085.

20. Носова О.И., Гусельникова В.В., Коржевский Д.Э. Метод одновременного выявления глиальных клеток и скоплений амилоида на светоптическом уровне. *Цитология* 2021; 63(6): 557–567, <https://doi.org/10.31857/S0041377121060092>.

Nosova O.I., Gusel'nikova V.V., Korzhevskii D.E. Light microscopy approach for simultaneously identification of glial cells and amyloid plaques. *Tsitologiya* 2021; 63(6): 557–567, <https://doi.org/10.31857/S0041377121060092>.

21. Korzhevskii D.E., Kirik O., Sukhorukova E. Immunocytochemistry of microglial cells. In: Merigh A., Lossi L. (editors). *Immunocytochemistry and related techniques. Neuromethods*. Vol. 101. Humana Press, New York; 2015, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2313-7_12.

22. Bennett M.L., Bennett F.C., Liddelov S.A., Ajami B., Zamanian J.L., Fernhoff N.B., Mulinyawe S.B., Bohlen C.J., Adil A., Tucker A., Weissman I.L., Chang E.F., Li G., Grant G.A., Hayden Gephart M.G., Barres B.A. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113(12): E1738–E1746, <https://doi.org/10.1073/pnas.1525528113>.

23. Lier J., Streit W.J., Bechmann I. Beyond activation: characterizing microglial functional phenotypes. *Cells* 2021; 10(9): 2236, <https://doi.org/10.3390/cells10092236>.

24. Hirasawa T., Ohsawa K., Imai Y., Ondo Y., Akazawa C., Uchino S., Kohsaka S. Visualization of microglia in living tissues using Iba1-EGFP transgenic mice. *J Neurosci Res* 2005; 81(3): 357–362, <https://doi.org/10.1002/jnr.20480>.

25. Shui X., Chen J., Fu Z., Zhu H., Tao H., Li Z. Microglia in ischemic stroke: pathogenesis insights and therapeutic challenges. *J Inflamm Res* 2024; 17: 3335–3352, <https://doi.org/10.2147/JIR.S461795>.

26. Taylor R.A., Sansing L.H. Microglial responses after ischemic stroke and intracerebral hemorrhage. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013: 746068, <https://doi.org/10.1155/2013/746068>.

27. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Сухорукова Е.Г., Власов Т.Д. Структурная организация микроглиоцитов стриатума после транзиторной фокальной ишемии. *Морфология* 2012; 141(2): 28–32.

Korzhevskii D.E., Kirik O.V., Sukhorukova Ye.G., Vlasov T.D. Structural organization of striatal microglia following focal ischemia. *Morphology* 2012; 141(2): 28–32.

28. Murata Y., Sugimoto K., Yang C., Harada K., Gono R., Harada T., Miyashita Y., Higashisaka K., Katada R., Tanaka J., Matsumoto H. Activated microglia-derived macrophage-like cells exacerbate brain edema after ischemic stroke correlate with astrocytic expression of aquaporin-4 and interleukin-1 alpha release. *Neurochem Int* 2020; 140: 104848, <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104848>.

29. Hansen D.V., Hanson J.E., Sheng M. Microglia in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 2018; 217(2): 459–472, <https://doi.org/10.1083/jcb.201709069>.

30. Grubman A., Choo X.Y., Chew G., Ouyang J.F., Sun G., Croft N.P., Rossello F.J., Simmons R., Buckberry S., Landin D.V., Pflueger J., Vandekolk T.H., Abay Z., Zhou Y., Liu X., Chen J., Larcombe M., Haynes J.M., McLean C., Williams S., Chai S.Y., Wilson T., Lister R., Pouton C.W., Purcell A.W., Rackham O.J.L., Petretto E., Polo J.M. Transcriptional signature in microglia associated with A β plaque phagocytosis. *Nat Commun* 2021; 12(1): 3015, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23111-1>.
31. Miao J., Ma H., Yang Y., Liao Y., Lin C., Zheng J., Yu M., Lan J. Microglia in Alzheimer's disease: pathogenesis, mechanisms, and therapeutic potentials. *Front Aging Neurosci* 2023; 15: 1201982, <https://doi.org/10.3389/fnagi.2023.1201982>.
32. Bubnova S., Guryanov A., Konkina D., Karapetian V., Kaldybaev I., Pavlova D., Shorina V., Sigalov M., Chen C. Evaluation of the levels of inflammatory proteins, such as Iba1 and GFAP, in brain tissues of patients with Alzheimer's disease by western blot analysis. *Arzneimitteltherapie* 2025; 1385–1397. URL: <https://arzneimitteltherapie.com/archives/1520>.
33. Lier J., Winter K., Bleher J., Grammig J., Mueller W.C., Streit W., Bechmann I. Loss of Iba1-expression in brains from individuals with obesity and hepatic dysfunction. *Brain Res* 2019; 1710: 220–229, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.01.006>.
34. Imai Y., Ibata I., Ito D., Ohsawa K., Kohsaka S. 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; 224(3): 855–862, <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1112>.
35. Hollopeter G., Jantzen H.M., Vincent D., Li G., England L., Ramakrishnan V., Yang R.B., Nurden P., Nurden A., Julius D., Conley P.B. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 2001; 409(6817): 202–207, <https://doi.org/10.1038/35051599>.
36. Butovsky O., Jedrychowski M.P., Moore C.S., Cialic R., Lanser A.J., Gabriely G., Koeglsperger T., Dake B., Wu P.M., Doykan C.E., Fanek Z., Liu L., Chen Z., Rothstein J.D., Ransohoff R.M., Gygi S.P., Antel J.P., Weiner H.L. Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci* 2014; 17(1): 131–143, <https://doi.org/10.1038/nn.3599>.
37. Maeda J., Minamihisamatsu T., Shimojo M., Zhou X., Ono M., Matsuba Y., Ji B., Ishii H., Ogawa M., Akatsu H., Kaneda D., Hashizume Y., Robinson J.L., Lee V.M., Saito T., Saido T.C., Trojanowski J.Q., Zhang M.R., Sahara T., Higuchi M., Sahara N. Distinct microglial response against Alzheimer's amyloid and tau pathologies characterized by P2Y12 receptor. *Brain Commun* 2021; 3(1): fcab011, <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcab011>.
38. Amadio S., Parisi C., Montilli C., Carrubba A.S., Apolloni S., Volonté C. P2Y(12) receptor on the verge of a neuroinflammatory breakdown. *Mediators Inflamm* 2014; 2014: 975849, <https://doi.org/10.1155/2014/975849>.