

ВЫЯВЛЕНИЕ МИКРОГЛИИ И МАКРОФАГОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНТИТЕЛ К РАЗЛИЧНЫМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМ БЕЛКА IBA-1

В. А. Разенкова[✉], О. В. Кирик, В. С. Павлова, Д. Э. Коржевский

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Белок Iba-1 традиционно считают высокоселективным маркером микроглии благодаря специфической экспрессии гена именно в этой популяции клеток ЦНС. В результате альтернативного сплайсинга формируется несколько изоформ белка Iba-1, что может служить причиной расхождений результатов иммуногистохимических реакций в зависимости от того, к каким эпитопам иммуногена выработаны выбранные для исследования антитела. В связи с этим, а также с необходимостью определения надежных вариантов антител к Iba-1, доступных для исследователей в Российской Федерации, целью работы было оценить результаты выявления микроглии и макрофагов с использованием антител к различным последовательностям белка, выпускаемых разными производителями. Материалом для исследования служили образцы головного мозга и семенника половозрелых (3–5 месяцев) крыс-самцов Wistar ($n = 8$). В качестве первичных реагентов использовали поликлональные и моноклональные (клон JM36-62) антитела к Iba-1. Установлено, что моноклональные антитела клона JM36-62 позволяют добиться более высокой селективности выявления антигена при лучшем соотношении сигнал/фон и пригодны для замены реагентов, не доступных в настоящее время к приобретению. Использование поликлональных антител привело не только к иммуноспецифичной визуализации микроглии и макрофагов, но и к выявлению клеток эпителио-сперматогенного слоя семенника. Предполагается, что в клетках эпителио-сперматогенного слоя присутствует изоформа Iba-1, лишенная эпитопа, соответствующего последовательности иммуногена для антител клона JM36-62 фрагмента нативного белка. Функциональное значение различных изоформ Iba-1 на настоящий момент остается неясным и требует дальнейших исследований.

Ключевые слова: Iba-1, AIF-1, микроглия, макрофаги, иммуногистохимия

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, проект № 24-15-00032, <https://rscf.ru/project/24-15-00032/>

Вклад авторов: В. А. Разенкова — анализ литературы, интерпретация результатов, подготовка рукописи; О. В. Кирик — анализ результатов, редактирование текста, работа с иллюстрациями; В. С. Павлова — гистологическая проводка биологического материала, постановка иммуногистохимических реакций; Д. Э. Коржевский — концепция, планирование исследования, редактирование текста.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (протокол № 2/24 от 25 апреля 2024 г.), проведено в полном соответствии с положениями Хельсинкской декларации (2013 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Валерия Алексеевна Разенкова
ул. Акад. Павлова, д. 12, г. Санкт-Петербург, 197376, Россия; valeriya.raz@yandex.ru

Статья получена: 17.05.2024 **Статья принята к печати:** 05.06.2024 **Опубликована онлайн:** 29.06.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.026

IDENTIFICATION OF MICROGLIA AND MACROPHAGES USING ANTIBODIES TO VARIOUS SEQUENCES OF THE IBA-1 PROTEIN

Razenkova VA[✉], Kirik OV, Pavlova VS, Korzhevskii DE

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

The Iba-1 protein is traditionally considered a highly selective marker of microglia because of the specific expression of the gene in this particular population of the CNS cells. Alternative splicing creates several isoforms of the Iba-1 protein, which may cause discrepancies in the results of immunohistochemical reactions depending on which epitopes of the immunogen the antibodies selected for the study were developed. In this connection, and with the aim at identifying reliable variants of antibodies to Iba-1 available to researchers in the Russian Federation, we organized with study, seeking to evaluate the results of detecting microglia and macrophages using antibodies to different protein sequences produced by different manufacturers. As material, we used samples of the brain and testis of mature (3–5 months) male Wistar rats ($n = 8$). Polyclonal and monoclonal (clone JM36-62) antibodies to Iba-1 were used as primary reagents. We found that monoclonal antibodies of the JM36-62 clone enable more selective antigen detection with a better signal-to-background ratio; they can be used as replacements for reagents that are currently not available commercially. Polyclonal antibodies enabled not only immunospecific imaging of microglia and macrophages, but also the identification of cells of the epithelial-spermatogenic layer of the testis. It is assumed that germinal epithelium contains the Iba-1 isoform devoid of an epitope that corresponds to the sequence of the immunogenic antibody clone JM36-62 fragment of the native protein. Functionally, various isoforms of Iba-1 should be investigated further.

Keywords: Iba-1, AIF-1, microglia, macrophages, immunohistochemistry

Funding: the study received financial support from the Russian Science Foundation, project No. 24-15-00032, <https://rscf.ru/en/project/24-15-00032/>

Author contribution: Razenkova VA — literature analysis, interpretation of the results, manuscript authoring; Kirik OV — analysis of the results, text editing, preparation of figures; Pavlova VS — histology of biological material, immunohistochemical reactions setup; Korzhevskii DE — study conceptualization, planning, text editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Institute of Experimental Medicine (Protocol № 2/24 of April 25, 2024), and conducted in full compliance with the provisions of the Declaration of Helsinki (2013).

✉ **Correspondence should be addressed:** Valeria A. Razenkova
Akademika Pavlova, 12, Saint Petersburg, 197376, Russia; valeriya.raz@yandex.ru

Received: 17.05.2024 **Accepted:** 05.06.2024 **Published online:** 29.06.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.026

Нейроглия центральной нервной системы включает в себя совокупность ненейронных клеток, необходимых для обеспечения нормальной жизнедеятельности нейронов: транспорта к ним питательных веществ, удаления продуктов распада, образования миелина, участия в передаче сигнала и т. д. [1]. К клеткам нейроглии исторически относят и популяцию микроглиальных клеток (микроглии или микроглиоцитов), которые, однако, происхождением отличаются от других глиальных клеток ЦНС [2]. Ведущая функция микроглии состоит в формировании собственной иммунной системы мозга [3]. Клетки микроглии способны к быстрой активации в ответ даже на незначительные патологические изменения в ЦНС, в связи с чем определение функциональной активности микроглии широко используют для оценки защитного ответа нервной системы на инфекцию, травму, ишемическое повреждение мозга или нейродегенерацию [4, 5].

Изначально в качестве иммуногистохимических маркеров микроглии использовали антитела к белкам главного комплекса гистосовместимости II класса. Впоследствии в 1996 г. был выделен белок Iba-1 (от англ. ionized calcium-binding adapter molecule 1) [6], который считают высокоселективным маркером микроглии благодаря тому, что в головном мозге ген *Iba1* специфично экспрессируется именно в этой популяции клеток. Ряд авторов считает данный белок идентичным белку AIF-1 [7–10]. Белок Iba-1 в настоящее время наиболее широко используют для изучения микроглии. Однако существует проблема адекватной интерпретации результатов иммуногистохимической реакции. Она обусловлена тем, что ген *Iba1* может подвергаться альтернативному сплайсингу, в результате которого формируется несколько изоформ белка [11]. Поскольку характер распределения этих изоформ не является полностью идентичным [12], результаты иммуногистохимических реакций от исследования к исследованию могут также различаться в зависимости от эпитопов иммуногена, к которому выработаны использованные антитела. Существование альтернативного сплайсинга и различных изоформ белка может быть причиной того, что антитела к Iba-1 иногда выявляют не только микроглию и клетки моноцитарно-макрофагального ряда, но и ряд клеток иного происхождения. Так, положительная реакция на белок Iba-1 была выявлена в гладких миоцитах [13], клетках эпителиальных опухолей молочной железы [14] и печени [15], а также в клетках эпителио-сперматогенного слоя семенников [6, 16]. Эти данные ставят под вопрос утверждение о предполагаемой высокой специфичности конкретных антител к белку Iba-1 как маркеру микроглии.

Одними из наиболее широко используемых антител для маркирования микроглии являются козы антитела к Iba-1 (Abcam, Великобритания; по каталогу: ab5076), которые упоминаются в 1145 публикациях (по данным сайта производителя). Они выработаны против синтетического пептида, соответствующего C-концевым аминокислотам белка Iba-1. Однако в настоящее время более доступны для исследователей в Российской Федерации антитела к Iba-1 (Huabio, Китай; по каталогу: ET-1705-78). Иммуногеном для этих первичных реагентов выступает пептид с последовательностью, соответствующей N-концевым аминокислотам белка. Данные первичные антитела хорошо зарекомендовали себя в работе с образцами ткани различных лабораторных животных [17–19].

В связи с необходимостью определения более надежных вариантов антител к Iba-1, которые можно

использовать для маркирования микроглии, и выяснения возможности их взаимозамены, целью настоящего исследования стала оценка результатов выявления микроглии и макрофагов с использованием антител к различным производственным белкам Iba-1, выпускаемых разными производителями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала для исследования были использованы образцы тканей головного мозга и семенника половозрелых (3–5 месяцев) крыс-самцов Wistar массой 350–400 г ($n = 8$). Животные были получены из питомника лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская область, Россия), содержались в виварии при комнатной температуре в стандартных условиях со свободным доступом к пище и воде. Перед отбором материала животным проводили эвтаназию путем передозировки парами этилового эфира. Материал фиксировали в цинк-этанол-формалине и заливали в парафин по стандартной методике. Из парафиновых блоков на ротационном микротоме Leica RM 2125RT изготавливали срезы толщиной 5 мкм и монтировали на стекла с адгезивным покрытием HistoBond®+ (Paul Marienfeld; Германия). Срезы головного мозга изготавливали на уровне –2,12 мм от Брегмы.

После депарафинирования препаратов по стандартной методике проводили ингибирование эндогенной пероксидазы путем инкубации срезов в 3%-м водном растворе перекиси водорода в течение 10 мин. Перед нанесением первичных антител срезы обрабатывали нормальной лошадиной сывороткой (008-000-121; Jackson ImmunoResearch, США) или блокировочным раствором (ab64226; Abcam, Великобритания) при комнатной температуре в течение 10 мин. Выявление микроглии и макрофагов проводили с помощью антител к кальций-связывающему белку Iba-1. Использовали козы поликлональные антитела в разведении 1 : 1000 (ab5076; Abcam, Великобритания) и рекомбинантные кроличьи моноклональные (клон JM36-62) антитела в разведении 1 : 1200 (ET-1705-78; Huabio, Китай). Инкубацию с первичными антителами проводили во влажной камере трое суток при температуре 27 °C.

В качестве вторичных реагентов применяли полимерную систему детекции UltraVision Quanto Detection System HRP (TL-060-QHL; Fisher Scientific, США), которая обладает двойной активностью к мышьяным и кроличьим первичным реагентам, и авидин-биотиновый набор VECTASTAIN Universal Quick HRP kit (PK-8800; Vector Laboratories, США), который обладает способностью детектировать первичные реагенты мыши, крысы и козы. Кроме того, использовали вторичные реагенты из наборов Cell & Tissue Staining Kit (CTS005 и CTS008; R&D Systems, США), обладающие монореактивностью по отношению к кроличьим и козым антителам соответственно. Режимы инкубации вторичных реагентов соответствовали рекомендациям производителя. Для обоих вариантов антител был проведен отрицательный контроль с использованием соответствующих наборов вторичных реагентов и системы проявления HRP. Для постановки негативного контроля вместо раствора первичных антител срезы обрабатывали раствором использованного разбавителя антител. Блокировку неспецифического связывания антимишьяными вторичными антителами с близкородственными иммуноглобулинами крысы проводили с помощью нормальной крысиной сыворотки.

Для визуализации продукта реакции использовали хромоген 3'-3-диаминобензидин из набора DAB+ (K3468, Agilent, США). После постановки иммуногистохимической реакции часть срезов подкрашивали квасцовым гематоксилином либо альциановым синим. После обезвоживания и просветления в орто-ксилоле (Вектон; Россия) препараты заключали в среду Cytoseal 60 (23-244257; Richard-Allan Scientific, США). Полученные препараты анализировали с помощью микроскопа Leica DM750 (Leica; Германия), оснащенного цифровой фотокамерой ICC50 (Leica; Германия). Применяли программу захвата изображений LAS EZ (Leica; Германия).

Проводили цифровую оценку оптической плотности окрашенного продукта иммуногистохимической реакции с применением различных антител к Iba-1. Измерения осуществляли в области стриатума с применением программы для морфометрического анализа Fiji (ImageJ). На изображениях предварительно выделяли области интереса фиксированного размера 10×10 мкм с помощью опции «Region of Interest». Измеряли среднюю яркость на единицу площади исследуемых структур (микроглиоцитов, просветов кровеносных сосудов и нейропиля стриатума). Результаты исследования представляли в единицах оптической плотности. Полученные данные обрабатывали в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software; США) и представляли в виде $\text{mean} \pm \text{SD}$ (число значений, использованных для подсчета среднего, было равно 7).

Проверку соответствия аминокислотных последовательностей изоформ Iba-1 (или, по другой номенклатуре, AIF1) проводили с использованием сервиса UniProt [20]. Сравнивали сиквенсы под номерами P55008-1, P55008-2 и P55008-3.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Предварительный анализ препаратов показал хорошую сохранность срезов и структуры исследуемых образцов тканей. На препаратах головного мозга и семенника крысы наблюдается высокоинтенсивная иммуногистохимическая реакция на Iba-1 при минимальном уровне фонового окрашивания, которое отсутствовало при использовании кроличьих первичных реагентов, а в случае применения козых первичных антител было незначительно.

Iba-1-позитивные клетки были обнаружены во всех исследованных препаратах тканей крысы. На препаратах головного мозга они представляли собой типичные микроглиоциты, имеющие большое количество тонких разветвленных отростков (рис. 1А–Г). Вблизи кровеносных сосудов серого вещества коры головного мозга встречаются веретеновидные клетки с уплощенными крупными отростками. При использовании моноклональных кроличьих антител отростки Iba-1-содержащих клеток демонстрировали многочисленные шпикоподобные выросты. Кроме того, моноклональные антитела были выявлены в оболочках головного мозга безотростчатые клетки овальной формы с интенсивно окрашенной цитоплазмой.

Применение козых поликлональных антител к Iba-1, несмотря на высокую интенсивность специфической реакции, привело к появлению на препаратах незначительного уровня фона. Он проявлялся в слабом окрашивании нейропиля, а также более явным неспецифическим фоновым окрашиванием сыворотки крупных кровеносных сосудов (рис. 1А). Интенсивность окрашивания нейропиля и сыворотки крупных кровеносных

сосудов составляла $0,61 \pm 0,03$ и $0,75 \pm 0,03$ соответственно. Использование моноклональных кроличьих антител не приводило к развитию заметного фонового окрашивания (значения оптической плотности окрашенного хромогена в нейропиле и просвете кровеносных сосудов были равны $0,57 \pm 0,02$ и $0,59 \pm 0,01$ соответственно). При этом среднее значение интенсивности окрашивания микроглиоцитов для обоих вариантов антител оказалось схожим: $0,87 \pm 0,09$ для поликлональных антител и $0,87 \pm 0,08$ для антител клона JM36-62.

Использование обоих вариантов первичных антител при работе с образцами ткани семенника крысы позволило выявить два типа иммунопозитивных клеток стромы извитых семенных канальцев (рис. 1Д–Е). В первом случае это клетки, расположенные в непосредственной близости к сосудам. Они обладают небольшой околядерной областью округлого профиля и тонкими неветвящимися отростками. Второй тип — это крупные малоотростчатые или безотростчатые клетки овальной формы. Последние могут располагаться как поодиночке, так и формировать небольшие группы по 3–4 клетки.

Третий тип клеток выявлялся только при использовании для иммуногистохимической реакции поликлональных козых антител к Iba-1. В этом случае скопление продукта иммуногистохимической реакции обнаруживалось в цитоплазме клеток эпителио-сперматогенного слоя извитых семенных канальцев. Морфологически они соответствуют ранним (округлым) и поздним (удлиненным) сперматидам (рис. 1Д, двойная стрелка). Ни на одном из изученных препаратов, обработанных кроличьими первичными реагентами, Iba-1-иммунопозитивных клеток в составе эпителио-сперматогенного слоя обнаружено не было.

Результаты иммуногистохимической реакции, полученные с помощью моноспецифических систем детекции Cell & Tissue Staining Kit, основанных на авидин-биотиновой амплификации, соответствовали результатам, полученным при использовании систем VECTASTAIN Universal Quick HRP kit и UltraVision Quanto Detection System HRP.

Сравнение аминокислотных последовательностей трех изоформ Iba-1/AIF1 (а именно сиквенсов P55008-1, P55008-2 и P55008-3 из библиотеки UniProt) показало, что аминокислотные последовательности иммуногенных фрагментов различных антител могут отсутствовать у той или иной изоформы. Так, последовательность N-концевого иммуногенного фрагмента для моноклональных кроличьих антител клона JM36-62 присутствует только у изоформы P55008-1 (с последовательностью в 147 аминокислот), а более короткие изоформы P55008-2 и P55008-3 (с последовательностями в 93 и 132 аминокислоты соответственно) этого фрагмента не содержат. В противоположность этому, участок C-концевого иммуногенного фрагмента для поликлональных козых антител Abscam присутствует в сиквенсах двух изоформ из трех исследованных: P55008-1 и P55008-2.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Оба использованных в настоящей работе первичных антитела показали хорошие результаты иммуногистохимической реакции и высокое соотношение уровня интенсивности иммуноспецифического сигнала к неспецифическому фоновому окрашиванию. Несмотря на это протокол, основанный на использовании козых первичных реагентов, способствовал проявлению более высокого уровня фонового окрашивания нейропиля головного мозга

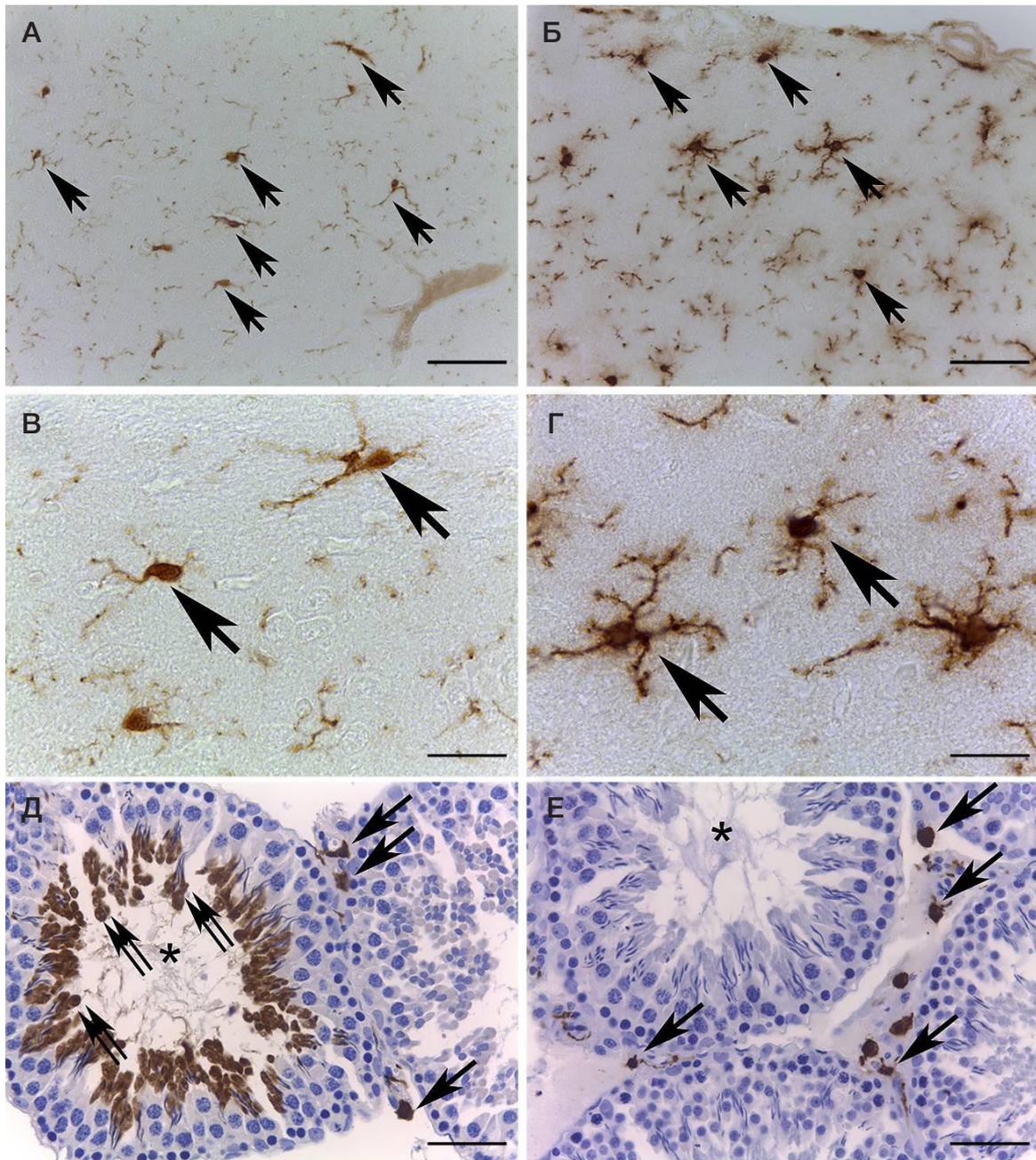


Рис. 1. Iba-1 в клетках ткани крысы, выявляемые с помощью поликлональных козьих (А, В, Д), моноклональных кроличьих (Б, Г, Е) антител. А–Г. Препараты головного мозга (стрелки указывают на микроглиоциты). Д–Е. Извитые семенные канальцы. Стрелки указывают на Iba-1-содержащие клетки в интерстиции, двойные стрелки — в эпителио-сперматогенном слое, звездочка — просвет канальца. Масштаб: 50 мкм (А, Б, Д, Е), 20 мкм (В, Г)

и паренхимы семенников по сравнению с аналогичным, основанным на применении антител клона JM36-62. На представленных фотографиях (рис. 1) соотношение специфического сигнала к фоновому кажется ниже у поликлональных антител. Дополнительное количественное исследование цифровых изображений показало, что интенсивности специфической иммуногистохимической реакции для обоих вариантов антител оказались близки. Однако интенсивность окрашивания нейропиля и сыворотки крупных кровеносных сосудов действительно были выше на препаратах, окрашенных с помощью поликлональных козьих первичных реагентов. Как известно, работа с первичными козьими реагентами накладывает определенные ограничения при проведении иммуногистохимических исследований с использованием непрямого метода Кунса или его модификаций. Во-первых,

наиболее распространенные вторичные реагенты являются моно- или бивалентными, т. е. направлены против иммуноглобулинов одного или двух видов животных (чаще всего кролика и мыши), что значительно усложняет подбор вторичных антител и удорожает проводимое исследование. Вторая проблема состоит в том, что козы антитела создают больше неспецифического фона при незначительном усилении интенсивности реакции, поскольку реагируют и с иммуноглобулинами быка, которые могут в следовом количестве присутствовать в реагентах, содержащих бычий сывороточный альбумин [6]. Результаты настоящего иммуногистохимического исследования это тоже подтверждают.

Белок Iba-1, состоящий из 147 аминокислотных остатков и имеющий молекулярную массу 17 кДа [21], всегда присутствует как в теле, так и в отростках

микроглиальных клеток, благодаря чему его повсеместно используют для проведения исследований, связанных с оценкой морфофункционального статуса микроглии. При взаимодействии с фимбрином Iba-1 участвует в сшивании актиновых филаментов и регуляции конфигурации плазматической мембраны [22], поэтому повышение уровня Iba-1 в клетках отмечается при переходе микроглии из покоящегося состояния в активированное [23]. Однако это свойство Iba-1 подразумевает присутствие данного белка и в других фагоцитирующих клетках организма. Действительно, часто антитела к Iba-1 используют для выявления клеток моноцитарно-макрофагального ряда, что отражено в многочисленных публикациях. Так, иммунопозитивными по Iba-1 оказываются резидентные макрофаги различных органов лабораторных животных и человека: клетки Купфера [18, 24], альвеолярные макрофаги легких и макрофаги селезенки [25, 26], клетки Лангерганса [6, 16]. Поэтому полученные в настоящем исследовании данные, указывающие на присутствие Iba-1 в интерстициальных макрофагах семенника и лептоменингальных клетках головного мозга, были ожидаемы. Гораздо более интересен результат, продемонстрированный для клеток эпителио-сперматогенного слоя семенных канальцев при постановке иммуногистохимической реакции с использованием различных антител к Iba-1 на препаратах семенника крысы. Использование в работе козых поликлональных антител приводило к образованию окрашенного продукта иммуногистохимической реакции в клетках, морфологически соответствующих сперматидам. Антитела клона JM36-62 не связывали антигены в эпителио-сперматогенном слое.

Утверждение о присутствии белка Iba-1 в сперматиде семенных канальцев было выдвинуто в ряде публикаций [7, 16, 27–29]. Вопреки этим данным, наши результаты по данной группе клеток отличались при использовании различных первичных антител. Это может быть следствием как свойств первичных антител, выявляющих эпитопы разной специфичности, так и особенностями вторичных реагентов. Поэтому для исключения возможности ложноположительной реакции со стороны сперматид семенника был поставлен дополнительный контроль с использованием идентичных вторичных систем визуализации козых и кроличьих антител, основанных на авидин-биотиновой технологии, а также дополнительной блокировке эндогенного биотина — Cell & Tissue Staining Kit. Результаты иммуногистохимической реакции в этом случае соответствовали результатам, полученным при использовании полимерной системы детекции UltraVision Quanto Detection System HRP для выявления кроличьих, и набора VECTASTAIN Universal Quick HRP kit для выявления козых антител. Это дополнительно подчеркивает, что реакция со стороны сперматид не является следствием неспецифического связывания вторичных реагентов (а именно стрептавидина).

Такой результат иммуногистохимической реакции может быть обусловлен различиями антигенных детерминант: присутствующие в сперматиде эпитопы Iba-1 могли более точно соответствовать партопам

поликлональных, но не моноклональных антител. Так, в соответствии с информацией, предоставленной на сайте производителя, для поликлональных козых антител в качестве антигена был использован синтетический пептид последовательностью TGPPAKKAISELP, локализованной на С-конце белка Iba-1. На сайте производителя также отмечено, что антитела ab5076 способны выявлять как минимум две изоформы Iba-1/AIF1. В противоположность этому, иммуногенный пептид для моноклональных кроличьих антител имел последовательность SQTRDLQGGKAFGL и соответствует N-концу белка. Сравнение сиквенсов разных изоформ человеческого Iba-1/AIF1 показало, что последовательность иммуногена для кроличьих антител соответствует изоформе белка с последовательностью в 147 аминокислот, которая принята в качестве канонической [6]. При этом козы поликлональные антитела, согласно сопоставлению аминокислотной последовательности фрагментов белка, соответствующих иммуногенному пептиду, должны выявлять как каноническую изоформу, так и более короткие формы белка. Таким образом, наши данные косвенно свидетельствуют о том, что альтернативный сплайсинг матричных РНК *iba1* может исключать из конечного транскрипта N-концевой фрагмент, выявляемый моноклональными антителами клона JM36-62, но оставлять С-концевой фрагмент, присутствующий у изоформ, выявляемых поликлональными антителами производства Abscam. Обращение к изначальным публикациям, в которых была представлена характеристика белка Iba-1, показало, что авторы исследовали экспрессию гена в различных органах [13–16]. Это позволило им продемонстрировать высокую экспрессию *iba1* в семенниках и селезенке, а также слабую — в легких, почках и головном мозге (благодаря специфической экспрессии гена исключительно в макрофагах и/или микроглии). Большое количество других работ, посвященных экспрессии *iba1* в различных тканях [16–18, 24, 25], также дают основания предполагать, что она не ограничена микроглией, моноцитами и макрофагами. Поэтому нельзя исключать, что козы поликлональные антитела действительно выявляют белок Iba-1, причем и ту его изоформу, которая не содержится в клетках моноцитарно-макрофагального ряда.

ВЫВОДЫ

Моноклональные антитела клона JM36-62 позволяют добиться более высокой селективности выявления антигена при лучшем соотношении сигнал/фон и пригодны для замены более часто используемого реагента. Более высокая селективность антител клона JM36-62, по-видимому, обусловлена более правильным выбором иммуногена производителем антител. Выявление сперматид при использовании поликлональных антител Abscam может быть обусловлено присутствием в этих клетках изоформы Iba-1, лишенной эпитопа, соответствующего последовательности N-концевого фрагмента нативного белка. Для оценки функционального значения различных изоформ Iba-1 требуются дальнейшие исследования.

Литература

- Fields RD, Araque A, Johansen-Berg H, Lim SS, Lynch G, Nave KA, et al. Glial biology in learning and cognition. *Neuroscientist*. 2014; 20 (5): 426–31. DOI: 10.1177/1073858413504465.
- Li Q, Barres BA. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol*. 2018; 18 (4): 225–242. DOI: 10.1038/nri.2017.125.
- Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 1996; 19 (8): 312–8. DOI: 10.1016/0166-2236(96)10049-7.
- Jin X, Yamashita T. Microglia in central nervous system repair after injury. *J Biochem*. 2016; 159 (5): 491–96. DOI: 10.1093/JB/MVV009.
- Гусельникова В. В., Разенкова В. А., Суфиева Д. А., Коржевский Д. Э. Активация микроглии в головном мозге спонтанно гипертензивных крыс. *Вестник РГМУ*. 2023; (3): 53–60. DOI: 10.24075/vrgmu.2023.024.
- 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): 855–62. DOI: 10.1006/BBRC.1996.1112.
- Utans U, Arceci RJ, Yamashita Y, Russell ME. Cloning and characterization of allograft inflammatory factor-1: a novel macrophage factor identified in rat cardiac allografts with chronic rejection. *J Clin Invest*. 1995; 95 (6): 2954–62. DOI: 10.1172/JCI118003.
- Lituma PJ, Woo E, O'Hara BF, Castillo PE, Sibinga NES, Nandi S. Altered synaptic connectivity and brain function in mice lacking microglial adapter protein *Iba1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021; 118 (46): e2115539118 [Internet] 2021 Nov 16 [cited 2024 May 13]. Available from: https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.2115539118?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori:rid:crossref.org&rft_dat=cr_pub%20%20pubmed.
- Deininger MH, Meyermann R, Schluesener HJ. The allograft inflammatory factor-1 family of proteins. *FEBS Lett*. 2002; 514 (2–3): 115–21. DOI:10.1016/S0014-5793(02)02430-4
- Vizioli J, Verri T, Pagliara P. Allograft Inflammatory Factor-1 in Metazoans: Focus on Invertebrates. *Biology (Basel)*. 2020; 9 (11): 1–14. DOI: 10.3390/BIOLOGY9110355.
- Del Galdo F, Maul GG, Jiménez SA, Artlett CM. Expression of allograft inflammatory factor 1 in tissues from patients with systemic sclerosis and in vitro differential expression of its isoforms in response to transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum*. 2006; 54 (8): 2616–25. DOI: 10.1002/ART.22010.
- Slim FA, Ouellette G, Ennour-Idrissi K, Jacob S, Diorio C, Durocher F. An isoform of AIF1 involved in breast cancer. *Cancer Cell Int*. 2018; 18 (1): 167 [Internet] 2018 Oct 22 [cited 2024 May 13]. Available from: <https://cancerjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12935-018-0663-3>.
- Broglio L, Erne B, Tolnay M, Schaeren-Wiemers N, Fuhr P, Steck AJ, et al. Allograft inflammatory factor-1: a pathogenetic factor for vasculitic neuropathy. *Muscle Nerve*. 2008; 38 (4): 1272–9. DOI: 10.1002/MUS.21033.
- Liu S, Tan WY, Chen QR, Chen XP, Fu K, Zhao YY, et al. Daintain/AIF-1 promotes breast cancer proliferation via activation of the NF- κ B/cyclin D1 pathway and facilitates tumor growth. *Cancer Sci*. 2008; 99 (5): 952–7. DOI: 10.1111/J.1349-7006.2008.00787.X.
- Jia S, Du Z, Jiang H, Huang X, Chen Z, Chen N. Daintain/AIF-1 accelerates the activation of insulin-like growth factor-1 receptor signaling pathway in HepG2 cells. *Oncol Rep*. 2015; 34 (1): 511–7. DOI: 10.3892/OR.2015.4002.
- Köhler 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; 330 (2): 291–302. DOI: 10.1007/S00441-007-0474-7.
- Zhang S, Gong P, Zhang J, Mao X, Zhao Y, Wang H, et al. Specific frequency electroacupuncture stimulation transiently enhances the permeability of the blood-brain barrier and induces tight junction changes. *Front Neurosci*. 2020; 14: 582324 [Internet] 2020 Oct 6 [cited 2024 May 13]. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/neuroscience/articles/10.3389/fnins.2020.582324/full>.
- Никитина И. А., Разенкова В. А., Кирик О. В., Коржевский Д. Э. Выявление популяции клеток Купфера в печени крысы с использованием моноклональных и поликлональных антител к микроглиальному маркеру *Iba-1*. *Медицинский академический журнал*. 2023; 23 (1): 85–94. DOI: 10.17816/MAJ133649.
- Liu C, Zhao X-M, Wang Q, Du TT, Zhang MX, Wang HZ, et al. Astrocyte-derived SerpinA3N promotes neuroinflammation and epileptic seizures by activating the NF- κ B signaling pathway in mice with temporal lobe epilepsy. *J Neuroinflammation*. 2023; 20 (1): 161 [Internet] 2023 Jul 8 [cited 2024 May 13]. Available from: <https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-023-02840-8>.
- Buchwalow I, SamoiloVA V, Boecker W, Tiemann M. Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: fallacies and facts. *Sci Rep*. 2011; 1: 28 [Internet] 2011 Jul 1 [cited 2024 May 13]. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep00028>.
- Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S. Microglia/macrophage-specific protein *Iba1* binds to fimbria and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem*. 2004; 88 (4): 844–56. DOI: 10.1046/J.1471-4159.2003.02213.X.
- Gheorghie RO, Grosu AV, Magercu M, Ghenghea MS, Zbarcea CE, Tanase A, et al. Switching rat resident macrophages from M1 to M2 phenotype by *Iba1* silencing has analgesic effects in SNL-induced neuropathic pain. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (21): 15831 [Internet] 2023 Oct 31 [cited 2024 May 13]. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/21/15831>.
- Yoshii D, Nakagawa T, Komohara Y, Kawaguchi H, Yamada S, Tanimoto A. Phenotypic changes in macrophage activation in a model of nonalcoholic fatty liver disease using microminipigs. *J Atheroscler Thromb*. 2021; 28 (8): 844–51. DOI: 10.5551/JAT.57703.
- Donovan KM, Leidinger MR, McQuillen LP, Goeken JA, Hogan CM, Harwani SC, et al. Allograft inflammatory factor 1 as an immunohistochemical marker for macrophages in multiple tissues and laboratory animal species. *Comp Med*. 2018; 68 (5): 341–48. DOI: 10.30802/AALAS-CM-18-000017.
- Hu X, Buhl CS, Sjogaard MB, Schousboe K, Mizrak HI, Kufaishi H, et al. Structural changes of cutaneous immune cells in patients with type 1 diabetes and their relationship with diabetic polyneuropathy. *Neurol Neuroimmunol neuroinflammation*. 2023; 10 (5): e200144 [Internet] 2023 Aug 1 [cited 2024 May 13]. Available from: https://www.neurology.org/doi/10.1212/NXI.000000000200144?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori:rid:crossref.org&rft_dat=cr_pub%20%20pubmed.
- Son NV, Chambers JK, Dung LT, Kishimoto TE, Nishimura M, Kita C, Takada Y, et al. Histological and immunohistochemical features of normal histiocytes and Langerhans cells, and histiocytic sarcomas in four-toed hedgehogs (*Atelerix albiventris*). *J Comp Pathol*. 2020; 178: 32–40. DOI: 10.1016/J.JCPA.2020.06.009.
- Özbek M, Beyaz F, Ergün E, Ergün L, Karaca H, Cabir A, et al. Identification of some calcium binding proteins and neural cell markers in rat testis and epididymis during postnatal development. *Andrologia*. 2022; 54 (11): e14633 [Internet] 2022 Nov 14 [cited 2024 May 13]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/and.14633>.
- Iida H, Doiguchi M, Yamashita H, et al. Spermatid-specific expression of *Iba1*, an ionized calcium binding adapter molecule-1, in rat testis. *Biol Reprod*. 2001; 64 (4): 1138–46. DOI: 10.1095/BIOLREPROD64.4.1138.
- Saleh H, Nassar AMK, Noreldin AE, Samak D, Elshony N, Wasef L, et al. Chemo-protective potential of cerium oxide nanoparticles against Fipronil-induced oxidative stress, apoptosis, inflammation and reproductive dysfunction in male white albino rats. 2020; 25 (15): 3479 [Internet] 2020 Jul 31 [cited 2024 May 13]. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/15/3479>.

References

- Fields RD, Araque A, Johansen-Berg H, Lim SS, Lynch G, Nave KA, et al. Glial biology in learning and cognition. *Neuroscientist*. 2014; 20 (5): 426–31. DOI: 10.1177/1073858413504465.
- Li Q, Barres BA. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol*. 2018; 18 (4): 225–242. DOI: 10.1038/nri.2017.125.
- Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 1996; 19 (8): 312–8. DOI: 10.1016/0166-2236(96)10049-7.
- Jin X, Yamashita T. Microglia in central nervous system repair after injury. *J Biochem*. 2016; 159 (5): 491–96. DOI: 10.1093/JB/MW009.
- Guselnikova VV, Razenkova VA, Sufieva DA, Korzhevskii DE. Activation of microglia in the brain of spontaneously hypertensive rats. *Bulletin of RSMU*. 2023; (3): 49–55. DOI: 10.24075/brsmu.2023.024.
- 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): 855–62. DOI: 10.1006/BBRC.1996.1112.
- Utans U, Arceci RJ, Yamashita Y, Russell ME. Cloning and characterization of allograft inflammatory factor-1: a novel macrophage factor identified in rat cardiac allografts with chronic rejection. *J Clin Invest*. 1995; 95 (6): 2954–62. DOI: 10.1172/JCI118003.
- Lituma PJ, Woo E, O'Hara BF, Castillo PE, Sibinga NES, Nandi S. Altered synaptic connectivity and brain function in mice lacking microglial adapter protein *Iba1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021; 118 (46): e2115539118 [Internet] 2021 Nov 16 [cited 2024 May 13]. Available from: https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.2115539118?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pubmed.
- Deininger MH, Meyer mann R, Schluesener HJ. The allograft inflammatory factor-1 family of proteins. *FEBS Lett*. 2002; 514 (2–3): 115–21. DOI:10.1016/S0014-5793(02)02430-4
- Vizioli J, Verri T, Pagliara P. Allograft Inflammatory Factor-1 in Metazoans: Focus on Invertebrates. *Biology (Basel)*. 2020; 9 (11): 1–14. DOI: 10.3390/BIOLOGY9110355.
- Del Galdo F, Maul GG, Jiménez SA, Artlett CM. Expression of allograft inflammatory factor 1 in tissues from patients with systemic sclerosis and in vitro differential expression of its isoforms in response to transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum*. 2006; 54 (8): 2616–25. DOI: 10.1002/ART.22010.
- Slim FA, Ouellette G, Ennou-Idrissi K, Jacob S, Diorio C, Durocher F. An isoform of AIF1 involved in breast cancer. *Cancer Cell Int*. 2018; 18 (1): 167 [Internet] 2018 Oct 22 [cited 2024 May 13]. Available from: <https://cancer-ci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12935-018-0663-3>.
- Broglio L, Erne B, Tolnay M, Schaeren-Wiemers N, Fuhr P, Steck AJ, et al. Allograft inflammatory factor-1: a pathogenetic factor for vasculitic neuropathy. *Muscle Nerve*. 2008; 38 (4): 1272–9. DOI: 10.1002/MUS.21033.
- Liu S, Tan WY, Chen QR, Chen XP, Fu K, Zhao YY, et al. Daintain/AIF-1 promotes breast cancer proliferation via activation of the NF- κ B/cyclin D1 pathway and facilitates tumor growth. *Cancer Sci*. 2008; 99 (5): 952–7. DOI: 10.1111/J.1349-7006.2008.00787.X.
- Jia S, Du Z, Jiang H, Huang X, Chen Z, Chen N. Daintain/AIF-1 accelerates the activation of insulin-like growth factor-1 receptor signaling pathway in HepG2 cells. *Oncol Rep*. 2015; 34 (1): 511–7. DOI: 10.3892/OR.2015.4002.
- Köhler 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; 330 (2): 291–302. DOI: 10.1007/S00441-007-0474-7.
- Zhang S, Gong P, Zhang J, Mao X, Zhao Y, Wang H, et al. Specific frequency electroacupuncture stimulation transiently enhances the permeability of the blood-brain barrier and induces tight junction changes. *Front Neurosci*. 2020; 14: 582324 [Internet] 2020 Oct 6 [cited 2024 May 13]. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/neuroscience/articles/10.3389/fnins.2020.582324/full>.
- Nikitina IA, Razenkova VA, Kirik OV, Korzhevskij DJe. Vyjavlenie populjacji kletok Kupfera v pecheni krysy s ispol'zovaniem monoklonal'nyh i poliklonal'nyh antitel k mikroglial'nomu markeru *Iba-1*. *Medicinskij akademicheskij zhurnal*. 2023; 23 (1): 85–94. DOI: 10.17816/MAJ133649. Russian.
- Liu C, Zhao X-M, Wang Q, Du TT, Zhang MX, Wang HZ, et al. Astrocyte-derived SerpinA3N promotes neuroinflammation and epileptic seizures by activating the NF- κ B signaling pathway and mice with temporal lobe epilepsy. *J Neuroinflammation*. 2023; 20 (1): 161 [Internet] 2023 Jul 8 [cited 2024 May 13]. Available from: <https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-023-02840-8>.
- Buchwalow I, SamoiloVA V, Boecker W, Tiemann M. Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: fallacies and facts. *Sci Rep*. 2011; 1: 28 [Internet] 2011 Jul 1 [cited 2024 May 13]. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep00028>.
- Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S. Microglia/macrophage-specific protein *Iba1* binds to fimbria and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem*. 2004; 88 (4): 844–56. DOI: 10.1046/J.1471-4159.2003.02213.X.
- Gheorghie RO, Grosu AV, Magercu M, Ghenghea MS, Zbarcea CE, Tanase A, et al. Switching rat resident macrophages from M1 to M2 phenotype by *Iba1* silencing has analgesic effects in SNL-induced neuropathic pain. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (21): 15831 [Internet] 2023 Oct 31 [cited 2024 May 13]. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/21/15831>.
- Yoshii D, Nakagawa T, Komohara Y, Kawaguchi H, Yamada S, Tanimoto A. Phenotypic changes in macrophage activation in a model of nonalcoholic fatty liver disease using microminipigs. *J Atheroscler Thromb*. 2021; 28 (8): 844–51. DOI: 10.5551/JAT.57703.
- Donovan KM, Leidinger MR, McQuillen LP, Goeken JA, Hogan CM, Harwani SC, et al. Allograft inflammatory factor 1 as an immunohistochemical marker for macrophages in multiple tissues and laboratory animal species. *Comp Med*. 2018; 68 (5): 341–48. DOI: 10.30802/AALAS-CM-18-000017.
- Hu X, Buhl CS, Sjogaard MB, Schousboe K, Mizrak HI, Kufaishi H, et al. Structural changes of cutaneous immune cells in patients with type 1 diabetes and their relationship with diabetic polyneuropathy. *Neurol Neuroimmunol neuroinflammation*. 2023; 10 (5): e200144 [Internet] 2023 Aug 1 [cited 2024 May 13]. Available from: https://www.neurology.org/doi/10.1212/NXI.0000000000200144?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pubmed.
- Son NV, Chambers JK, Dung LT, Kishimoto TE, Nishimura M, Kita C, Takada Y, et al. Histological and immunohistochemical features of normal histiocytes and Langerhans cells, and histiocytic sarcomas in four-toed hedgehogs (*Atelerix albiventris*). *J Comp Pathol*. 2020; 178: 32–40. DOI: 10.1016/J.JCPA.2020.06.009.
- Özbek M, Beyaz F, Ergün E, Ergün L, Karaca H, Cabir A, et al. Identification of some calcium binding proteins and neural cell markers in rat testis and epididymis during postnatal development. *Andrologia*. 2022; 54 (11): e14633 [Internet] 2022 Nov 14 [cited 2024 May 13]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/and.14633>.
- Iida H, Doiguchi M, Yamashita H, et al. Spermatid-specific expression of *Iba1*, an ionized calcium binding adapter molecule-1, in rat testis. *Biol Reprod*. 2001; 64 (4): 1138–46. DOI: 10.1095/BIOLREPROD64.4.1138.
- Saleh H, Nassar AMK, Noreldin AE, Samak D, Elshony N, Wasef L, et al. Chemo-protective potential of cerium oxide nanoparticles against Fipronil-induced oxidative stress, apoptosis, inflammation and reproductive dysfunction in male white albino rats. 2020; 25 (15): 3479 [Internet] 2020 Jul 31 [cited 2024 May 13]. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/15/3479>.