

DOI: <https://doi.org/10.17816/medjrf634587>

Микроглия и макрофаги в шишковидной железе человека

Д.А. Суфиева, Е.А. Федорова, В.С. Яковлев, И.П. Григорьев, Д.Э. Коржевский

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. В последние два десятилетия было показано, что воспалительные реакции в центральной нервной системе (ЦНС) вовлечены в этиологию большинства неврологических и психиатрических заболеваний, а также старения. Наиболее важными иммунными клетками в ЦНС являются клетки микроглии и макрофаги. На сегодняшний день микроглия и макрофаги изучены в различных частях ЦНС, но не в шишковидной железе человека.

Цель исследования — изучить морфологические особенности, типы и локализацию клеток микроглии эпифиза человека с помощью метода иммуногистохимии.

Материалы и методы. Работа проведена на образцах эпифиза человеческого мозга, взятых от лиц в возрасте от 16 лет до 61 года ($n=7$). На срезах эпифиза проводили иммуногистохимическую реакцию с использованием антител к Iba1 и TMEM119, избирательным маркерам микроглиоцитов. Частоту встречаемости иммуноокрашенных клеток анализировали статистическими методами.

Результаты. Установлено, что большинство выявленных с помощью иммуногистохимической реакции фагоцитирующих клеток относятся к микроглии, а не к макрофагам. Микроглия при этом представлена как покоящимися формами, так и активированными. Микроглия в шишковидной железе человека, как правило, локализуется в соединительнотканых трабекулах, как у кровеносных сосудов, так и вдали от них. Микроглиоциты также встречаются в паренхиме эпифиза среди гормон-синтезирующих клеток пинеалоцитов. Отмечено статистически значимое уменьшение числа Iba1- и особенно — TMEM119-иммунореактивных клеток при старении.

Заключение. Настоящее исследование представляет собой первую работу, в которой изучали клетки микроглии и макрофаги в шишковидной железе человека. Установлено превалирование микроглиальных клеток над макрофагами. Морфологические особенности и локализация выявленных типов клеток микроглии свидетельствуют об их участии преимущественно в иммунной защите, а также, вероятно, в регуляции функций пинеалоцитов. Кроме того, получены данные, свидетельствующие об участии микроглиальных клеток в развитии воспаления в эпифизе человека в ходе старения.

Ключевые слова: эпифиз мозга; человек; микроглия; Iba1; TMEM119; старение; нейровоспаление; иммуногистохимия.

Как цитировать:

Суфиева Д.А., Федорова Е.А., Яковлев В.С., Григорьев И.П., Коржевский Д.Э. Микроглия и макрофаги в шишковидной железе человека // Российский медицинский журнал. 2024. Т. 30, № 5. С. 455–463. DOI: <https://doi.org/10.17816/medjrf634587>

DOI: <https://doi.org/10.17816/medjrf634587>

Microglia and macrophages in the human pineal gland

Dina A. Sufieva, Elena A. Fedorova, Vladislav S. Yakovlev, Igor P. Grigorev, Dmitrii E. Korzhevskii

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: Over the past two decades, inflammatory responses in the central nervous system (CNS) have been shown to play a role in the etiology of most neurological and psychiatric diseases, as well as in the aging process. Microglia and macrophages are the most important immune cells in the CNS. In contrast to the role of microglia and macrophages in various parts of the CNS, the human pineal gland has not been studied.

AIM: To evaluate the morphological characteristics, types and localization of microglial cells in the human pineal gland by immunohistochemistry.

MATERIALS AND METHODS: The study was performed using samples of a pineal gland of the human brain obtained in individuals between the ages of 16 and 61 years ($n=7$). Immunohistochemistry was performed on pineal gland sections using antibodies against Iba1 and TMEM119, selective markers for microglia. Statistical methods were used to evaluate the frequency of immunostained cells.

RESULTS: The majority of phagocytic cells identified by immunohistochemistry were found to be microglia and not macrophages. Microglia are represented by both inactive and activated forms. Microglia in the human pineal gland are typically localized in connective tissue trabeculae, both near and far from blood vessels. Microglia are also found in the pineal parenchyma in the hormone-synthesizing cells of the pinealocytes. The number of Iba1 and especially TMEM119 immunoreactive cells decreased significantly with age.

CONCLUSION: This study is the first to evaluate microglia and macrophages in the human pineal gland. The prevalence of microglial cells over macrophages was found. The morphological characteristics and localization of the identified microglial cell types suggest their involvement primarily in immune defense and probably also in the regulation of pinealocyte functions. In addition, there are data suggesting the involvement of microglial cells in the development of inflammation in the human pineal gland during aging.

Keywords: pineal gland; human; microglia; Iba1; TMEM119; aging; neuroinflammation; immunohistochemistry.

To cite this article:

Sufieva DA, Fedorova EA, Yakovlev VS, Grigorev IP, Korzhevskii DE. Microglia and macrophages in the human pineal gland. *Russian Medicine*. 2024;30(5):455–463. DOI: <https://doi.org/10.17816/medjrf634587>

ОБОСНОВАНИЕ

Эпифиз мозга (шишковидное тело, или пинеальная железа) представляет собой небольшой непарный нейродокринный орган, расположенный в задней части III желудочка мозга между задней спайкой и дорсальной хабенулярной спайкой. Это одна из самых крупных структур эпиталамуса [1]. Основным гормоном шишковидной железы является мелатонин, синтез которого подвержен циклическим колебаниям (максимум — ночью). Это обуславливает роль эпифиза в регуляции различных систем организма и процессов в нём (в частности, цикла бодрствование–сон), в осуществлении нейропротекторной и антиоксидантной функций, а также влияние его на репродуктивную и иммунную системы [2]. Шишковидная железа человека имеет дольчатое строение: паренхима, разграниченная соединительнотканнвыми трабекулами, преимущественно представлена фолликулярным или, реже, островковым типом. Основными клетками шишковидной железы являются пинеалциты (нейросекреторные клетки, вырабатывающие мелатонин). В эпифизе присутствует локальная популяция глиальных клеток, представленная астроцитоподобными клетками и микроглиальными клетками. Встречаются также тучные клетки [1, 3].

В настоящее время одним из ключевых направлений нейробиологии является изучение клеток иммунной системы головного мозга, известных как микроглия. Эти клетки играют ключевую роль в осуществлении защитных механизмов в центральной нервной системе (ЦНС): синтез про- и противовоспалительных цитокинов, фагоцитоз патогенов и погибших клеток, поддержание гомеостаза окружающей ткани, а также регулирование физиологических и патофизиологических процессов в головном мозге [4]. Кроме того, микроглия является одним из ключевых игроков в развитии нейровоспаления при старении («инфламэйджинг»), что делает её объектом пристального внимания исследователей при изучении возрастных изменений в ЦНС [5].

Кальций-связывающий белок Iba1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1, ионизированная кальций-связывающая адаптерная молекула 1) является одним из наиболее часто используемых маркеров при исследовании микроглии. Тем не менее Iba1 также встречается в тканевых макрофагах мозга, к числу которых в ЦНС относятся менингеальные макрофаги, периваскулярные макрофаги и макрофаги сосудистого сплетения. Эти клетки отличаются от микроглии как по своему происхождению, так и по функциям [6]. Относительно недавно (в 2016 году) был предложен высокоселективный маркер микроглии — трансмембранный белок 119 (transmembrane protein 119, TMEM119). Использование обоих этих маркеров микроглии/макрофагов даёт возможность получить более полную картину клеточного состава исследуемой структуры головного мозга [6, 7].

Несмотря на большой интерес научного сообщества к микроглии, исследования этой популяции клеток в эпифизе животных немногочисленны и проводились только на крысах [8], в то время как вопрос морфофункциональной организации микроглии эпифиза мозга человека остаётся на сегодня неосвещённым.

Цель исследования — изучение клеток эпифиза мозга человека, проявляющих реакцию на микроглиальные маркеры Iba1 и TMEM119.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили образцы шишковидной железы человека ($n=7$) от лиц в возрасте от 16 до 61 года, полученные из архива Отдела общей и частной морфологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» (заключение локального этического комитета № 58-9/1-684 от 11.12.2009 г.).

Образцы шишковидной железы человека фиксировали в этанол-формалине и цинк-этанол-формалине и заливали в парафин по общепринятой методике. С помощью ротационного микротома Microm HM 325 (Thermo Scientific, США) были изготовлены срезы толщиной 7 мкм, которые наклеивали на стёкла с адгезивным покрытием HistoBond+M (Paul Marienfeld GmbH & Co, Германия).

Для иммуногистохимического исследования препаратов эпифиза человека использовали рекомбинантные кроличьи моноклональные антитела против белка Iba1 (клон JM36-62; HUABIO, Китай) в разведении 1:900 и кроличьи поликлональные антитела против белка TMEM119 (Abcam, Великобритания) в разведении 1:1000. В качестве вторичных реагентов выступали козы антикроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена из набора Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC kit — набор для иммуногистохимической детекции мышиных и кроличьих первичных антител, содержащий хромоген 3,3-диаминобензидин (DAB) и вторичные антитела, меченные пероксидазой хрена (HRP) (Abcam, Великобритания). Продукт иммуногистохимической реакции визуализировали с использованием хромогена DAB из набора реагентов DAB+ (Dako, Дания). Ядра подкрашивали квасцовым гематоксилином. Препараты анализировали с помощью микроскопа Leica DM750 с цифровой фотокамерой ICC50 (Leica Microsystems, Германия).

При количественном анализе препаратов анализировали последовательные срезы, окрашенные на Iba1 и TMEM119: всего 4 случая, возраст — 16, 20, 35 и 61 год. Подсчёт иммунопозитивных клеток производили по 5 полям зрения для каждого случая.

Статистическая обработка данных. Данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего. Сравнительный анализ количества Iba1- и TMEM119-иммунопозитивных клеток производили с помощью критерия Стьюдента для парных выборок. Для сравнения

возрастных особенностей в количестве Iba1- и TMEM119-иммунореактивных клеток использовали однофакторный дисперсионный анализ и критерий Тьюки (post-hoc анализ). Значимыми различия считали при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование препаратов шишковидной железы человека, окрашенных к кальций-связывающему белку Iba1, показало: данный маркер распределён в телах и отростках клеток микроглии однородно, что позволяет охарактеризовать морфологию этих клеток. Выявлено, что Iba1-иммунореактивные клетки в эпифизе локализуются неравномерно и преимущественно наблюдаются в соединительнотканых трабекулах (рис. 1, *a*). Как правило, Iba1-иммунопозитивные клетки визуализируются в области кровеносных сосудов. Эти клетки имеют морфологию типичной периваскулярной микроглии: веретеновидную форму и два полярных длинных неветвящихся отростка (рис. 1, *c*; рис. 1, *d*, *одиночная стрелка*). Такую

же морфологию имеют микроглиоциты, локализующиеся по обе стороны от границы соединительнотканых трабекул и паренхимы эпифиза (рис. 2, *f*). В паренхиме шишковидной железы человека Iba1-иммуноположительные клетки наблюдаются редко. Здесь они чаще всего представлены клетками овальной формы, с разнонаправленными отростками, их можно отнести к типу отростчатой, или рамифицированной, микроглии (см. рис. 1, *c*, *двойная стрелка*). Встречаются округлые Iba1-иммунореактивные клетки либо без отростков, либо с короткими и толстыми отростками, их можно отнести к активированному, или амёбоидному, типу микроглии (см. рис. 1, *d*, *головки стрелок*).

В результате иммуногистохимической реакции к трансмембранному белку TMEM119 установлено, что этот маркер характеризуется равномерным распределением в телах и отростках микроглии. TMEM119-иммунопозитивные клетки характеризуются наличием округлого или овального тела и, как правило, толстых разветвлённых отростков (рис. 2, *a*, *b*). Продемонстрировано,

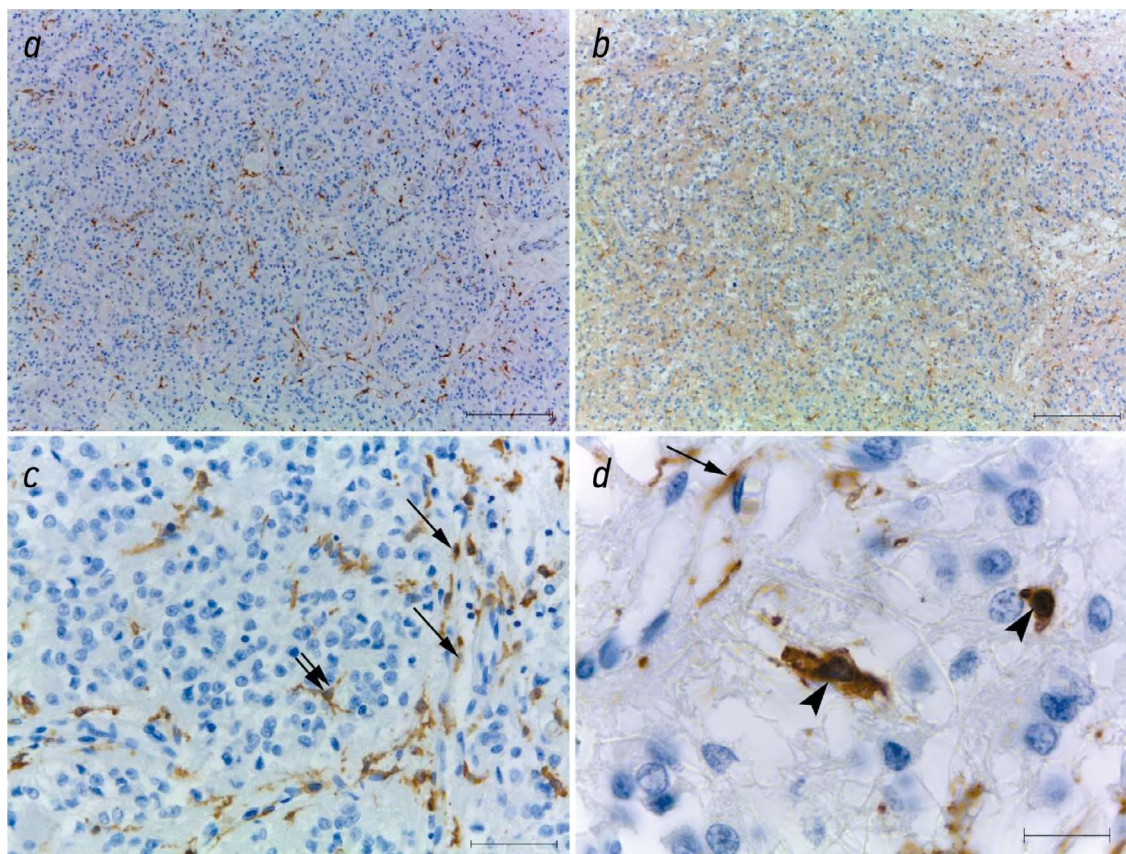


Рис. 1. Преимущественная локализация микроглии/макрофагов в трабекулах эпифиза мозга человека. Иммуногистохимическая реакция на Iba1 (*a*, *c*, *d*) и TMEM119 (*b*); ядра окрашены квасцовым гематоксилином; *a*, *b* — разница в количестве Iba1- и TMEM119-иммунопозитивных клеток на последовательных срезах эпифиза; *c*, *d* — разные морфотипы микроглии: одиночной стрелкой (*d*) указана периваскулярная микроглия, двойной стрелкой — отростчатая микроглия, головки стрелок — амёбоидная микроглия. Масштабный отрезок равен 200 мкм (*a*, *b*); 50 мкм (*c*) и 20 мкм (*d*).

Fig. 1. Preferential localization of microglia/macrophages in the trabeculae of the pineal gland of the human brain. Immunohistochemical reaction for Iba1 (*a*, *c*, *d*) and TMEM119 (*b*); nuclei stained with alum hematoxylin; *a*, *b* — difference in the number of Iba1- and TMEM119-immunopositive cells on consecutive sections of the pineal gland; *c*, *d* — different morphotypes of microglia: single arrow (*d*) indicates perivascular microglia, double arrow — ramified microglia, arrow heads — amoeboid microglia. The scale bar is 200 μ m (*a*, *b*); 50 μ m (*c*), and 20 μ m (*d*).

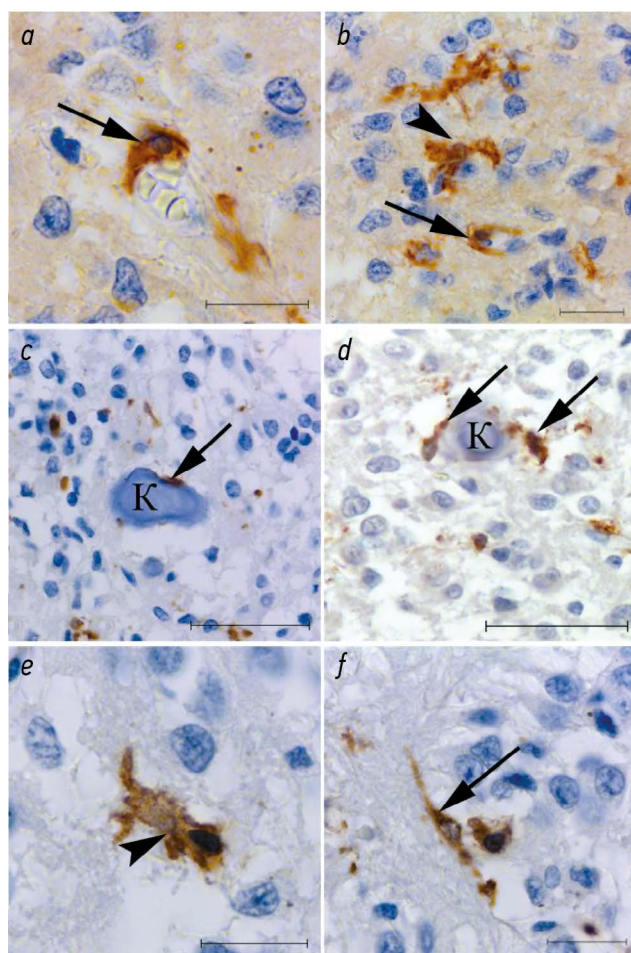


Рис. 2. Микроглия эпифиза человека. Иммуногистохимическая реакция на TMEM119 (*a, b, d*) и Iba-1 (*c, e, f*). Ядра окрашены квасцовым гематоксилином. Стрелки указывают на периваскулярную микроглию (*a, b*); микроглию, примыкающую к кальцификатам — К (*c, d*); микроглию, локализованную на границе трабекулы и паренхимы (*f*); головки стрелок указывают на фагоцитирующую микроглию (*b, e*). Масштабный отрезок равен 20 мкм.

Fig. 2. Microglia of the human pineal gland. Immunohistochemical reaction to TMEM119 (*a, b, d*) and Iba-1 (*b, e, f*). Nuclei are stained with alum hematoxylin. Arrows indicate perivascular microglia (*a, b*); microglia adjacent to calcifications — К (*c, d*); microglia localized at the border of trabecula and parenchyma (*f*); arrow heads indicate phagocytic microglia (*b, e*). The scale bar is 20 μm.

что TMEM119-иммуноположительные микроглиоциты также преимущественно выявляются в трабекулах, а у кровеносных сосудов они имеют морфологию периваскулярной микроглии (см. рис. 2, *a, b*).

Во всех образцах эпифиза человека с разной частотой наблюдались плотные включения — кальциевые конкреции (кальцификаты, мозговой песок), которые располагались в паренхиме. Анализ Iba1- и TMEM119-иммунореактивных клеток в шишковидной железе человека показал, что лишь небольшое число отдельных анализируемых клеток наблюдаются рядом с кальцификатами и могут примыкать к ним (рис. 2, *c, d*). Встречались также фагоцитирующие микроглиоциты, которые

оказывали своими отростками соседние клетки с пикнотическими ядрами (рис. 2, *b, e*).

При изучении образцов от лиц старшего возраста (свыше 60 лет) отмечено значительное уменьшение числа Iba1- и TMEM119-иммунопозитивных клеток. При этом TMEM119-иммунореактивные микроглиоциты формируют очаги (кластеры), как правило, по периферии органа. Iba1-иммунопозитивные клетки преимущественно имеют округлое тело и не имеют отростков. В образце эпифиза от человека пожилого возраста наблюдается большое число гранул нейромеланина.

При визуальной оценке последовательных срезов, окрашенных на Iba1 и TMEM119, можно наблюдать, что число Iba1-иммунореактивных клеток больше по сравнению с TMEM119-иммунопозитивными клетками (см. рис. 1, *a*; рис. 1, *b*). Однако статистически значимые различия (при проведении статистического анализа с помощью *t*-критерия для парных выборок) удалось обнаружить только для образца от человека, возраст которого составлял 61 год. При сравнении зависящего от возраста количества Iba1- и TMEM119-иммунопозитивных клеток с применением дисперсионного анализа ANOVA (с последующим применением *post-hoc* критерия Тьюки) установлены статистически значимые индивидуальные различия в количестве Iba1-иммунореактивных клеток между образцами от лиц в возрасте 16 и 20 лет и в количестве TMEM119-иммунореактивных клеток между образцами от лиц в возрасте 20 лет и 61 год ($p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование клеток иммунной системы ЦНС является одним из магистральных направлений современной нейробиологии, в связи с чем актуальной проблемой, стоящей перед учёными, служит подбор адекватных подходов и маркеров для анализа клеток иммунной системы изучаемой области. Используемые в работе иммуногистохимические маркеры микроглии/макрофагов Iba1 и маркер микроглии TMEM119 обладают следующими преимуществами: Iba1 позволяет выявлять и клетки микроглии, и макрофаги ЦНС, в то время как TMEM119 является высокоселективным маркером микроглии; оба этих маркера выявляют как клеточные тела, так и отростки исследуемых клеток, что даёт возможность косвенно оценить степень активности клеток по морфологическим характеристикам. Известно, что клетки микроглии, характеризующиеся небольшой сомой и длинными, тонкими, ветвящимися отростками, относятся к типу рамифицированной или покоящейся микроглии. А микроглиоциты, характеризующиеся увеличенными размерами тела, короткими, толстыми, слабоветвящимися отростками, представляет собой амёбодный, или активированный, тип микроглии.

Вместе с тем эти маркеры обладают и рядом недостатков. Так, использование только маркера Iba1 не позволяет разделить между собой популяции микроглии

и макрофагов, которые, как известно, различаются происхождением, рядом физиологических и функциональных характеристик, а также экспрессируемыми маркерными белками [9]. При воспалительных процессах экспрессия белка TMEM119 в клетках микроглии провоспалительного типа (M1) подавляется, что сильно затрудняет использование данного маркера в исследованиях, связанных с нейровоспалением [7, 10, 11]. Такие особенности маркеров следует учитывать при постановке иммуногистохимических реакций, а также интерпретации полученных данных.

В настоящем исследовании установлено, что подавляющее большинство фагоцитирующих клеток структурно нормального эпифиза мозга человека — это не макрофаги, а микроглиоциты, которые представлены как покоящимися (рамыфицированная микроглия), так и активированными формами (малоотростчатая микроглия). При морфологической оценке и количественном сравнении Iba1- и TMEM119-иммунопозитивных клеток обнаружено, что Iba1-иммунопозитивные клетки выявляются стабильно в большем числе, чем TMEM119-иммунопозитивные клетки, хотя статистически значимые различия наблюдались только у лиц пожилого возраста. Это может указывать, что либо небольшая часть общего пула иммунных клеток эпифиза человека представлена макрофагами, либо во всех исследованных образцах эпифиза часть клеток микроглии представлена провоспалительным типом M1 [12].

Продemonстрировано, что микроглия в шишковидной железе располагается, как правило, в соединительнотканых трабекулах, где локализуется подавляющее большинство кровеносных сосудов органа. Клетки здесь имели морфологию периваскулярной микроглии: веретеновидную форму и два полярных длинных неветвящихся отростка, распластанных вдоль сосуда. Шишковидная железа относится к структурам секреторного типа, в связи с чем имеет густую сеть кровеносных сосудов, являясь одним из самых васкуляризованных органов человека [3]. Предполагается, что периваскулярная микроглия задействована в контроле поступающих из кровотока веществ, а также обеспечивает защитные механизмы от проникновения возможных патогенов в эпифиз мозга, что объясняет её преимущественную локализацию в области кровеносных капилляров. В работе [13] показана роль микроглии и в регуляции локального мозгового кровообращения за счёт синтеза цитокинов, которые могут влиять на ширину просвета капилляров. В работе M.P. Ibañez Rodriguez и соавт. [14] установлено, что микроглия может участвовать в фагоцитозе фрагментов кровеносных сосудов не только в эмбриогенезе и у молодых животных, но и у взрослых особей.

Микроглиальные клетки в соединительнотканых трабекулах также располагались вдали от кровеносных сосудов внутри трабекулы или на границе с паренхимой — по всей вероятности, вдоль коллагеновых волокон, которые, как нами ранее было показано, образуют

сеть внутри трабекулы и имеют разную плотность распределения [15]. В исследованиях последних лет показано, что микроглия участвует в направленной деградации внеклеточного матрикса за счёт секреции металлопротеиназ и других ферментов, что необходимо для регуляции пластичности синаптических связей [16, 17]. Внеклеточный матрикс представляет собой динамичную сеть белков (в частности, коллагенов) и протеогликанов, которая важна для поддержания структурной целостности ткани и может ремоделироваться при заболеваниях и травмах [16]. Несколько исследований показывают, что внеклеточный матрикс существенно различается в разных областях мозга по количеству, составу и степени ремоделирования в процессе старения [17]. Роль микроглии в ремоделировании внеклеточного матрикса была показана при инсульте, болезни Альцгеймера и хоре Гентингтона [16]. Продemonстрировано, что физиологическое старение снижает высвобождение микроглиальными клетками металлопротеиназ и других ферментов, разрушающих внеклеточный матрикс, и это приводит к избыточному его отложению в окосинаптической области, снижению структурной пластичности нейронных сетей и ухудшению когнитивных функций [17]. Наблюдаемое нами уменьшение числа микроглиоцитов (рис. 3) и снижение их функциональной активности может служить одним из факторов избыточного формирования коллагеновых волокон в эпифизе человека при физиологическом старении [15].

Результаты данной работы свидетельствуют, что в паренхиме шишковидной железы микроглия представлена преимущественно рамыфицированным типом (покоящаяся), хотя встречаются и малоотростчатые (активированные) формы микроглиальных клеток. Локализация клеток микроглии среди пинеалоцитов позволяет предполагать их участие в регуляции функциональной активности мелатонин-синтезирующих клеток-пинеалоцитов.

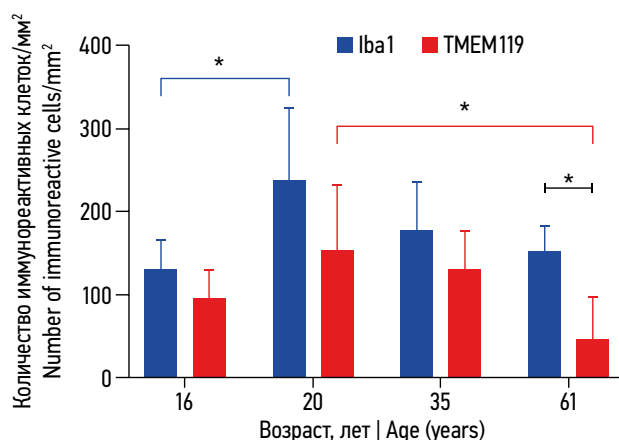


Рис. 3. Возрастная динамика изменения количества Iba1- и TMEM119-иммунореактивных клеток в эпифизе человека. Данные представлены в виде среднего $\pm$ ошибки среднего; * $p < 0,05$.

Fig. 3. Age-related changes in the number of Iba1⁺ and TMEM119⁺ immunoreactive cells in the human pineal gland. Data are expressed as mean $\pm$ standard error, * $p < 0.05$.

Это подтверждается и литературными данными. Так, в культуре клеток однодневных крысят Sprague Dawley (Спрег-Доули) было показано, что микроглия взаимодействует с пинеалоцитами и влияет как на структуру, так и на функцию этих клеток [18]. Авторы показали, что совместное культивирование микроглии и пинеалоцитов вызывает уменьшение длины отростков пинеалоцитов и увеличение содержания серотонина — предшественника мелатонина — в культуральной среде через 7 дней [18]. В другой работе установлено, что микроглия посредством синтеза ряда цитокинов влияет на функциональный статус пинеалоцитов, таким образом модулируя работу шишковидной железы [19]. В уже упоминавшемся исследовании M.P. Ibañez Rodriguez и соавт. [14] показано, что клетки микроглии могут фагоцитировать серотонин-содержащие нервные волокна эпифиза.

Если в структурно-интактном эпифизе у лиц молодого и среднего возраста пул фагоцитирующих клеток представлен в основном микроглиями, то при старении можно наблюдать, что число TMEM119-иммунореактивных клеток уменьшается ($p < 0,05$ при индивидуальном сравнении), а число Iba1-иммунопозитивных клеток становится статистически значимо больше ($p < 0,05$) по сравнению с числом TMEM119-иммунопозитивных клеток. Наблюдаемое нами меньшее число TMEM119-иммунопозитивных клеток при старении может быть связано с увеличением провоспалительного типа микроглии, для которого характерно подавление синтеза белка TMEM119 [11, 14]. Второе объяснение уменьшения числа TMEM119-иммунореактивных клеток может быть связано с тем фактом, что при старении в эпифиз рекрутируются макрофаги, дифференцирующиеся из моноцитов периферической крови, также вследствие возрастного нейровоспаления [14].

В настоящем исследовании показано, что небольшой пул микроглиями контактирует с кальцификатами и примыкает к ним. Взаимодействие микроглии и кальцификатов в шишковидной железе ранее не изучали. Тем не менее образование кальцификатов и микроглии анализировали в других областях ЦНС (сосудистое сплетение, хабенула, базальные ганглии, гиппокамп, мозговые оболочки) [20]. При этом результаты исследования U. Maheshwari и соавт. [20] показали, что, как правило, кальцификаты ассоциированы со стенками кровеносных сосудов в этих областях головного мозга. Отмечено также, что как для животных, так и для человека с мутациями в генах, участвующих в развитии и функционировании микроглии, характерно присутствие внутримозговых кальцификатов [20]. Предполагается, что микроглия имеет важное значение в контроле образования кальцификатов за счёт регуляции формирования отложений нерастворимых солей кальция (которые, как считается, могут служить очагами отложения кальцификатов) путём либо удаления апоптотических клеток, либо протеостаза внеклеточного матрикса [20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использованные нами маркеры микроглии/макрофагов Iba-1 и TMEM119 позволили впервые в мире охарактеризовать иммунные клетки эпифиза человека и установить гетерогенность популяции пинеальных микроглиями человека. Установлено, что большинство выявленных фагоцитирующих клеток являются микроглиями, а не макрофагами. Микроглия при этом представлена как покоящимися формами, так и активированными. Микроглия в шишковидной железе человека, как правило, выявляется в соединительнотканых трабекулах, как у кровеносных сосудов, так и вдали от них. Микроглия встречается и в паренхиме эпифиза, а также могут примыкать к кальцификатам. Предполагается, что микроглия имеет важное значение в контроле образования кальцификатов в ЦНС, в том числе и в эпифизе. Различная локализация микроглии, а также разнородность морфотипов, представленных в шишковидной железе, свидетельствуют о функциональной гетерогенности клеток микроглии. Присутствие активированных и фагоцитирующих форм микроглии предполагает их активную роль в поддержании гомеостаза окружающей ткани и активности пинеалоцитов, что свидетельствует о многофункциональности микроглиями и подтверждает гипотезу об их важной роли в регуляции нейроэндокринной функции эпифиза. Дальнейшие исследования микроглии и макрофагов эпифиза (как с использованием экспериментальных животных, так и на человеческом материале), анализ морфологических, цитохимических, функциональных особенностей этих клеток помогут установить роль каждого из типов микроглии и макрофагов в поддержании тканевой и функциональной целостности шишковидной железы и оценить вклад этих клеток в развитие патологического нейровоспаления, которое может привести к дисфункции эпифиза.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» (№ FGWG-2024-0015).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE. Наибольший вклад распределён следующим образом: Д.А. Суфиева — анализ данных, написание рукописи; Е.А. Федорова — сбор и обработка материала, анализ данных; В.С. Яковлев — сбор и обработка материала; И.П. Григорьев — концепция и дизайн исследования, написание и редактирование рукописи; Д.Э. Коржевский — концепция и дизайн исследования, редактирование рукописи.

Этическое утверждение. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом Института экспериментальной медицины (№ 3/24 от 20.06.2024).

ADDITIONAL INFORMATION

Funding source. The research was performed within the framework of the state assignment FGBSI "Institute of Experimental Medicine" (No. FGWG-2024-0015).

Competing interests. The authors claim that there is no conflict of interest in the article.

Authors' contribution. All authors confirm compliance of their authorship with the international ICMJE criteria. The largest

contribution is distributed as follows: D.A. Sufieva — data analysis, manuscript writing; E.A. Fedorova — material collecting and processing, data analysis; V.S. Yakovlev — material collecting and processing; I.P. Grigorev — study conception and design, manuscript writing and editing; D.E. Korzhevskii — study conception and design, manuscript editing.

Ethics approval. The present study protocol was approved by the local Ethics Committee of the Institute of Experimental Medicine (No. 3/24 by 20.06.2024).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Norman A.W., Henry H.L. The pineal gland // *Hormones*. 3rd ed. London, England: Academic Press, 2015. P. 351–361. doi: 10.1016/B978-0-08-091906-5.00016-1
2. Markus R.P., Fernandes P.A., Kinker G.S., et al. Immune-pineal axis — acute inflammatory responses coordinate melatonin synthesis by pinealocytes and phagocytes // *Br J Pharmacol*. 2018. Vol. 175, N 16. P. 3239–3250. doi: 10.1111/bph.14083
3. Duvernoy H.M., Parratte B., Tatu L., Vuillier F. The human pineal gland: relationships with surrounding structures and blood supply // *Neurol Res*. 2000. Vol. 22, N 8. P. 747–790. doi: 10.1080/01616412.2000.11740753
4. Wolf S.A., Boddeke H.W., Kettenmann H. Microglia in physiology and disease // *Annu Rev Physiol*. 2017. Vol. 79. P. 619–643. doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034406
5. Gao C., Jiang J., Tan Y., Chen S. Microglia in neurodegenerative diseases: mechanism and potential therapeutic targets // *Signal Transduct Target Ther*. 2023. Vol. 8, N 1. P. 359. doi: 10.1038/s41392-023-01588-0
6. Jurga A.M., Paleczna M., Kuter K.Z. Overview of general and discriminating markers of differential microglia phenotypes // *Front Cell Neurosci*. 2020. Vol. 14. P. 198. doi: 10.3389/fncel.2020.00198
7. Гусельникова В.В., Федорова Е.А., Сафрай А.Е., и др. Особенности распределения трансмембранного белка TMEM-119 в микроглиоцитах коры головного мозга человека при формировании амилоидных бляшек // *Биологические мембраны*. 2021. Т. 38, № 5. С. 340–350. EDN: IVUNUM doi: 10.31857/S0233475521040058
8. Muñoz E.M. Microglia in circumventricular organs: the pineal gland example // *ASN Neuro*. 2022. Vol. 14. P. 17590914221135697. doi: 10.1177/17590914221135697
9. DePaula-Silva A., Gorbea C., Doty D.J., et al. Differential transcriptional profiles identify microglial- and macrophage-specific gene markers expressed during virus-induced neuroinflammation // *J Neuroinflammation*. 2016. Vol. 16, N 1. P. 152. doi: 10.1186/s12974-019-1545-x
10. González Ibanez F., Picard K., Bordeleau M., et al. Immunofluorescence staining using IBA1 and TMEM119 for microglial density, morphology and peripheral myeloid cell infiltration analysis in mouse brain // *J Vis Exp*. 2019. N 152. doi: 10.3791/6449 Erratum in: *J Vis Exp*. 2019. N 152. doi: 10.3791/60510
11. Kenkhuis B., Somarakis A., Kleindouwel L.R.T., et al. Co-expression patterns of microglia markers Iba1, TMEM119 and P2RY12 in Alzheimer's disease // *Neurobiol Dis*. 2022. Vol. 167. P. 105684. doi: 10.1016/j.nbd.2022.105684
12. Satoh J., Kino Y., Asahina N., et al. TMEM119 marks a subset of microglia in the human brain // *Neuropathology*. 2016. Vol. 36, N 1. P. 39–49. doi: 10.1111/neup.12235
13. Bisht K., Okojie K.A., Sharma K., et al. Capillary-associated microglia regulate vascular structure and function through PANX1-P2RY12 coupling in mice // *Nat Commun*. 2021. Vol. 12, N 1. P. 5289. doi: 10.1038/s41467-021-25590-8
14. Ibañez Rodríguez M.P., Noctor S.C., Muñoz E.M. Cellular basis of pineal gland development: Emerging role of microglia as phenotype regulator // *PLoS One*. 2016. Vol. 11, N 11. P. e0167063. doi: 10.1371/journal.pone.0167063
15. Суфиева Д.А., Федорова Е.А., Яковлев В.С., Григорьев И.П. Иммуногистохимическое исследование сосудов эпифиза человека // *Медицинский академический журнал*. 2023. Т. 23, № 2. С. 109–118. EDN: RETHOC doi: 10.17816/MAJ352563
16. Crapser J.D., Arreola M.A., Tsourmas K.I., Green K.N. Microglia as hackers of the matrix: sculpting synapses and the extracellular space // *Cell Mol Immunol*. 2021. Vol. 18, N 11. P. 2472–2488. doi: 10.1038/s41423-021-00751-3
17. Nguyen P.T., Dorman L.C., Pan S., et al. Microglial remodeling of the extracellular matrix promotes synapse plasticity // *Cell*. 2020. Vol. 182, N 2. P. 388–403. doi: 10.1016/j.cell.2020.05.050
18. Tsai S.Y., McNulty J.A. Microglia in the pineal gland of the neonatal rat: characterization and effects on pinealocyte neurite length and serotonin content // *Glia*. 1997. Vol. 20, N 3. P. 243–253. doi: 10.1002/(sici)1098-1136(199707)20:3<243::aid-glia8>3.0.co;2-8
19. Tsai S.Y., O'Brien T., McNulty J. Microglia play a role in mediating the effects of cytokines on the structure and function of the rat pineal gland // *Cell Tissue Res*. 2001. Vol. 303, N 3. P. 423–431. doi: 10.1007/s004410000330
20. Maheshwari U., Huang S.F., Sridhar S., Keller A. The interplay between brain vascular calcification and microglia // *Front Aging Neurosci*. 2022. Vol. 14. P. 848495. doi: 10.3389/fnagi.2022.848495

REFERENCES

1. Norman AW, Henry HL. The pineal gland // *Hormones*. 3rd ed. London, England: Academic Press; 2015. P. 351–361. doi: 10.1016/B978-0-08-091906-5.00016-1
2. Markus RP, Fernandes PA, Kinker GS, et al. Immune-pineal axis — acute inflammatory responses coordinate melatonin synthesis by pinealocytes and phagocytes. *Br J Pharmacol*. 2018;175(16):3239–3250. doi: 10.1111/bph.14083
3. Duvernoy HM, Parratte B, Tatu L, Vuillier F. The human pineal gland: relationships with surrounding structures and blood supply. *Neurol Res*. 2000;22(8):747–790. doi: 10.1080/01616412.2000.11740753
4. Wolf SA, Boddeke HW, Kettenmann H. Microglia in physiology and disease. *Annu Rev Physiol*. 2017;79:619–643. doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034406

5. Gao C, Jiang J, Tan Y, Chen S. Microglia in neurodegenerative diseases: mechanism and potential therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther.* 2023;8(1):359. doi: 10.1038/s41392-023-01588-0
6. Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ. Overview of general and discriminating markers of differential microglia phenotypes. *Front Cell Neurosci.* 2020;14:198. doi: 10.3389/fncel.2020.00198
7. Guselnikova VV, Fedorova EA, Safray AE, et al. Distribution of transmembrane protein 119 (TMEM-119) in microglia of human cerebral cortex with amyloid plaques. *Biologicheskie Membrany.* 2021;38(5):340–350. EDN: IVUNUM doi: 10.31857/S0233475521040058
8. Muñoz EM. Microglia in circumventricular organs: the pineal gland example. *ASN Neuro.* 2022;14:17590914221135697. doi: 10.1177/17590914221135697
9. DePaula-Silva AB, Gorbea C, Doty DJ, et al. Differential transcriptional profiles identify microglial- and macrophage-specific gene markers expressed during virus-induced neuroinflammation. *J Neuroinflammation.* 2019;16(1):152. doi: 10.1186/s12974-019-1545-x
10. González Ibanez F, Picard K, Bordeleau M, et al. Immunofluorescence staining using IBA1 and TMEM119 for microglial density, morphology and peripheral myeloid cell infiltration analysis in mouse brain. *J Vis Exp.* 2019;(152). doi: 10.3791/6449 Erratum in: *J Vis Exp.* 2019;(152). doi: 10.3791/60510
11. Kenkhuis B, Somarakis A, Kleindouwel LRT, et al. Co-expression patterns of microglia markers Iba1, TMEM119 and P2RY12 in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 2022;167:105684. doi: 10.1016/j.nbd.2022.105684
12. Satoh J, Kino Y, Asahina N, et al. TMEM119 marks a subset of microglia in the human brain. *Neuropathology.* 2016;36(1):39–49. doi: 10.1111/neup.12235
13. Bisht K, Okojie KA, Sharma K, et al. Capillary-associated microglia regulate vascular structure and function through PAX1-P2RY12 coupling in mice. *Nat Commun.* 2021;12(1):5289. doi: 10.1038/s41467-021-25590-8
14. Ibañez Rodríguez MP, Noctor SC, Muñoz EM. Cellular basis of pineal gland development: emerging role of microglia as phenotype regulator. *PLoS One.* 2016;11(11):e0167063. doi: 10.1371/journal.pone.0167063
15. Sufieva DA, Fedorova EA, Yakovlev VS, Grigorev IP. Immunohistochemical study of human pineal vessels. *Medical Academic Journal.* 2023;23(2):109–118. EDN: RETHOC doi: 10.17816/MAJ352563
16. Crapser JD, Arreola MA, Tsourmas KI, Green KN. Microglia as hackers of the matrix: sculpting synapses and the extracellular space. *Cell Mol Immunol.* 2021;18(11):2472–2488. doi: 10.1038/s41423-021-00751-3
17. Nguyen PT, Dorman LC, Pan S, et al. Microglial remodeling of the extracellular matrix promotes synapse plasticity. *Cell.* 2020;182(2):388–403.e15. doi: 10.1016/j.cell.2020.05.050
18. Tsai SY, McNulty JA. Microglia in the pineal gland of the neonatal rat: characterization and effects on pinealocyte neurite length and serotonin content. *Glia.* 1997;20(3):243–253. doi: 10.1002/(sici)1098-1136(199707)20:3<243::aid-glia8>3.0.co;2-8
19. Tsai SY, O'Brien TE, McNulty JA. Microglia play a role in mediating the effects of cytokines on the structure and function of the rat pineal gland. *Cell Tissue Res.* 2001;303(3):423–431. doi: 10.1007/s004410000330
20. Maheshwari U, Huang SF, Sridhar S, Keller A. The interplay between brain vascular calcification and microglia. *Front Aging Neurosci.* 2022;14:848495. doi: 10.3389/fnagi.2022.848495

ОБ АВТОРАХ

* **Суфиева Дина Азатовна**, канд. биол. наук;
адрес: Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12;
ORCID: 0000-0002-0048-2981;
eLibrary SPIN: 3034-3137;
e-mail: dinobrione@gmail.com

Федорова Елена Анатольевна, канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0002-0190-885X;
eLibrary SPIN: 5414-4122;
e-mail: el-fedorova2014@yandex.ru

Яковлев Владислав Станиславович;
ORCID: 0000-0003-2136-6717;
eLibrary SPIN: 7524-9870;
e-mail: 1547053@mail.ru

Григорьев Игорь Павлович, канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0002-3535-7638;
eLibrary SPIN: 1306-4860;
e-mail: ipg-iem@yandex.ru

Коржевский Дмитрий Эдуардович, д-р мед. наук, профессор РАН;
ORCID: 0000-0002-2456-8165;
eLibrary SPIN: 3252-3029;
e-mail: dek2@yandex.ru

AUTHORS' INFO

* **Dina A. Sufieva**, Cand. Sci. (Biology);
address: 12 Akademika Pavlova street, 197022
Saint Petersburg, Russia;
ORCID: 0000-0002-0048-2981;
eLibrary SPIN: 3034-3137;
e-mail: dinobrione@gmail.com

Elena A. Fedorova, Cand. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0002-0190-885X;
eLibrary SPIN: 5414-4122;
e-mail: el-fedorova2014@yandex.ru

Vladislav S. Yakovlev;
ORCID: 0000-0003-2136-6717;
eLibrary SPIN: 7524-9870;
e-mail: 1547053@mail.ru

Igor P. Grigorev, Cand. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0002-3535-7638;
eLibrary SPIN: 1306-4860;
e-mail: ipg-iem@yandex.ru

Dmitrii E. Korzhevskii, MD, Dr. Sci. (Medicine),
Professor of Russian Academy of Sciences;
ORCID: 0000-0002-2456-8165;
eLibrary SPIN: 3252-3029;
e-mail: dek2@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author