

УДК 577.25

<https://doi.org/10.17816/MAJ16548>

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ НЕЙРОБИОЛОГИИ

Д.Э. Коржевский¹, И.П. Григорьев¹, В.В. Гусельникова¹, Е.А. Колос¹, Е.С. Петрова¹, О.В. Кирик¹,
Д.А. Суфиева¹, В.А. Разенкова¹, М.В. Антипова^{1,2}, М.В. Черныш^{1,2}

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург;

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург

Для цитирования: Коржевский Д.Э., Григорьев И.П., Гусельникова В.В., и др. Иммуногистохимические маркеры для нейробиологии // Медицинский академический журнал. – 2019. – Т. 19. – № 4. – С. 7–24. <https://doi.org/10.17816/MAJ16548>

Поступила: 25.10.2019

Одобрена: 13.11.2019

Принята: 27.11.2019

При проведении нейробиологических исследований важным представляется подбор наиболее адекватных и информативных методов, одним из которых является иммуногистохимическое исследование. В статье кратко обобщен многолетний опыт работы сотрудников лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы ФГБНУ ИЭМ, связанный с адаптацией современных методов иммуногистохимии для изучения нервной системы. Цель работы состояла в определении наиболее эффективных и надежных иммуномаркеров, которые целесообразно использовать при проведении нейробиологических исследований. Статья содержит теоретические сведения о важнейших цитоспецифичных и функциональных нейробиологических маркерах, применяемых в исследованиях структурно-функциональной организации головного и спинного мозга млекопитающих животных и человека, а также практические рекомендации по их использованию. В частности, представлены результаты постановки иммуногистохимических реакций на нейральные маркеры (NeuN, белки нейрофиламентов, альфа-тубулин, альфа-синуклеин), ферменты синтеза нейромедиаторов (тирозингидроксилаза, глутаматдекарбоксилаза, холинацетилтрансфераза, NO-синтаза), глиальные маркеры (GFAP, глутаминсинтетаза, Iba-1, виментин). Описанная методология перспективна для использования в экспериментальной нейробиологии и клинико-морфологической диагностике.

Ключевые слова: нейробиология; иммуногистохимия; нейральные маркеры; глиальные маркеры; нейромедиаторные системы.

IMMUNOHISTOCHEMICAL MARKERS FOR NEUROBIOLOGY

D.E. Korzhevskii¹, I.P. Grigor'ev¹, V.V. Gusel'nikova¹, E.A. Kolos¹, E.S. Petrova¹, O.V. Kirik¹, D.A. Sufieva¹,
V.A. Razenkova¹, M.V. Antipova^{1,2}, M.V. Chernysh^{1,2}

¹ Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia;

² Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

For citation: Korzhevskii DE, Grigor'ev IP, Gusel'nikova VV, et al. Immunohistochemical markers for neurobiology. *Medical Academic Journal*. 2019;19(4):7-24. <https://doi.org/10.17816/MAJ16548>

Received: October 25, 2019

Revised: November 13, 2019

Accepted: November 27, 2019

In neurobiological studies, crucial is the selection of most appropriate and informative experimental methods, one of which is immunohistochemistry. This review briefly summarizes the experience of adaptation of immunohistochemical methods to nervous system studies accumulated over years the Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System (Institute of Experimental Medicine). The aim of this work was to determine the most effective and reliable immunomarkers for neurobiological studies. The article contains theoretical basis and practical recommendations for use of key cytospecific and functional markers used in studies of structural and functional organization of brain and spinal cord of mammalian animals and human. In particular, the results of immunohistochemical reactions to neural markers (NeuN, neurofilament proteins, alpha-tubulin, alpha-synuclein), neurotransmitter synthesizing enzymes (tyrosine hydroxylase, glutamate decarboxylase, choline acetyltransferase, NO synthase) and glial markers (GFAP, glutamine synthetase, Iba-1, vimentin) are demonstrated. The presented methodology is useful for experimental neurobiology and clinical morphological diagnostics.

Keywords: neurobiology; immunohistochemistry; neural markers; glial markers; neurotransmitter systems.

Список сокращений

ГАМК — гамма-аминомасляная кислота; ГЭБ — гематоэнцефалический барьер; ПФ — промежуточные филаменты; СМ — спинной мозг; ТГ — тирозингидроксилаза; ХАТ — холинацетилтрансфераза; ЦНС — центральная нервная система; GAD — глутаматдекарбоксилаза (glutamate decarboxylase), L-глутамат-1-карбоксилаза; GFAP — глиальный фибриллярный кислый белок (glial fibrillary acidic protein); GS — глутаминсинтетаза (glutamine synthetase); nNOS — нейрональная форма NO-синтазы; NOS — NO-синтаза.

При проведении нейробиологических исследований важной задачей всегда являлись идентификация клеток, реагирующих на экспериментальные воздействия, и определение их функционального статуса. В последние годы в распоряжении ученых для решения этой важной задачи имеется значительный арсенал иммуногистохимических и молекулярно-генетических методик. К сожалению, наиболее доступные нейробиологам методы иммуногистохимии не всегда позволяют получить ожидаемые результаты высокого качества, поскольку антитела, используемые для выявления конкретного структурного или функционального маркера, часто не подходят для решения поставленной задачи или не сочетаются с вторичными реагентами. Другой причиной неудач при иммуногистохимическом маркировании в экспериментальных нейробиологических исследованиях являются попытки применения антител, разработанных для использования на материале человека, для выявления аналогичных маркеров у лабораторных животных. Подобная экстраполяция возможна далеко не всегда, даже с учетом рекомендаций производителей реагентов.

Вследствие большого интереса нейробиологов к методам иммуногистохимии при маркировании различных типов нейронов и глиальных клеток, выявлении прогениторных, активированных и погибающих клеток цель настоящей работы состояла в определении наиболее эффективных и надежных иммуномаркеров, которые позволяют получать результаты высокого качества при проведении нейробиологических исследований.

В работе использован архивный материал — срезы головного мозга, спинного мозга, седалищного нерва крыс линии Вистар ($n = 50$). Материал был фиксирован в цинк-этанол-формальдегиде. Образцы обезживали и заливали в парафин по общепринятой методике. Приготовленные на микротоме срезы наклеивали на предметные стекла с адгезивным покрытием и депарафинировали. Часть препаратов подвергали тепловому демаскированию в модифицированном цитратном буфере S1700 (Agilent, США). Иммуногистохимическое исследование проводили с помощью первичных антител, представленных в таблице.

В качестве вторичных реагентов для световой микроскопии применяли наборы Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System (SPD-015, Spring Bioscience, США) и MACH2 Universal HRP Polymer Kit for mouse or rabbit (M2U522 G, H, L, Biocare Medical, США). Продукт иммуногистохимической реакции проявляли с использованием 3,3'-диаминобензидина

из набора DAB+ (K3468, Agilent, США). Для флуоресцентной микроскопии применяли следующие реагенты: антитела против иммуноглобулинов козы, меченные биотином, из набора R&D Systems (CTS008, R&D Systems, США); ослиные антитела против иммуноглобулинов мыши, меченные биотином (#715-065-150, Jackson ImmunoResearch, США); моновалентный Fab-фрагмент антикроличьего иммуноглобулина осла, конъюгированный с флуорохромом Rhodamine Red-X (RRX) (#711-295-152, Jackson ImmunoResearch, США), а также конъюгат стрептавидина с флуорохромом Cy2 (#016-220-084, Jackson ImmunoResearch, США). Ядра клеток подкрашивали квасцовым гематоксилином для световой микроскопии или ядерным флуоресцентным красителем SYTOX Green (S7020, InvitroGen, США) для флуоресцентной и конфокальной лазерной микроскопии. Полученные препараты анализировали с помощью светового микроскопа Leica DM750 (Германия) и фотографировали с использованием фотокамеры ICC50 (Leica, Германия). Изображения обрабатывали в программе LAS EZ (Leica, Германия). Полученные флуоресцентные препараты исследовали при помощи конфокального лазерного микроскопа LSM 800 (Zeiss, Германия). Для возбуждения флуоресценции Cy2 и SYTOX Green применяли лазер с длиной волны 488 нм, для Rhodamine Red-X — 561 нм. Полученные изображения анализировали при помощи компьютерных программ ZEN2012 и LSM Image Browser (Zeiss, Германия). Более подробная информация о применяемых в данной работе протоколах обработки препаратов содержится в работах, процитированных в последнем столбце таблицы.

Одна из основных задач современной нейроморфологии — это определение типа и химической специфичности клеток нервной системы. Для этой цели наиболее эффективно иммуногистохимическое выявление характерных для данного типа клеток белковых маркеров и нейромедиаторов и/или ферментов их синтеза в структурах нервной системы. Визуализация ферментов синтеза нейромедиаторов предпочтительна перед выявлением самого медиатора, поскольку молекулы моноаминов (серотонин, норадреналин, адреналин) являются не только нейропередатчиками, но и гормонами (продуктами эндокринных и тучных клеток) и потому могут иметь экстрацеребральное происхождение, а аминокислотные нейромедиаторы, такие как глутамат и глицин, участвуют в метаболизме всех клеток независимо от их типа и нейромедиаторной принадлежности и, следовательно, могут быть обнаруже-

Первичные антитела, применяемые в нейробиологических исследованиях
Primary antibodies used in neuroscience research

Исследуемый антиген	Источник первичных антител	Клон	Номер по каталогу, производитель	Работы, в которых приведены детали использования антител
Тирозингидроксилаза	Кролик	Поликлональные	ab112, Abcam, Великобритания	[1]
GAD67	Мышь	Клон К-87	Ab26116, Abcam, Великобритания	[2]
	Кролик	Поликлональные	E10260, Spring Bioscience, США	
Холинацетилтрансфераза	Коза	Поликлональные	AB144, Merck, США	[3–5]
uNOS	Кролик	Поликлональные	E393, Spring Bioscience, США	[6]
Белок нейрофиламентов Smi-32	Мышь	Клон Smi-32	SMI-32P, BioLegend, США	[7]
α-Тубулин	Мышь	Клон DM-1A	MU121-5UC, BioGenex, США	[8]
α-Синуклеин	Кролик	Поликлональные	E2684, Spring Bioscience, США	[9]
NeuN	Мышь	Клон A-60	MAВ377, Merck, США	[10, 11]
GFAP	Кролик	Поликлональные	Z033401-2, Agilent, США	[12, 13]
	Мышь	Клон GA5	CM065 A, B, C, Biocare Medical, США	
	Мышь	Клон spm507	E16510, Spring Bioscience, США	
GS	Мышь	Клон GS-6	MAВ302, Merck, США	[7, 14]
Виментин	Мышь	Клон V-9	M0725, Agilent, США	[15, 16]
Iba-1	Коза	Поликлональные	ab5076, Abcam, Великобритания	[17, 18]

ны в клетках разной природы. Исходя из этого для определения медиаторной принадлежности нейронов оптимально подходит иммуногистохимическая идентификация в них ферментов синтеза нейромедиаторов, таких как тирозингидроксилаза (фермент синтеза катехоламинов), холинацетилтрансфераза (фермент синтеза ацетилхолина), глутаматдекарбоксилаза (фермент синтеза гамма-аминомасляной кислоты — ГАМК) и т. д.

Тирозингидроксилаза (ТГ) — это фермент, который в присутствии кислорода, тетрагидробиоптерина и железа катализирует гидроксилирование аминокислоты тирозина — химическую реакцию, лимитирующую скорость синтеза катехоламинов, к которым относятся дофамин, норадреналин и адреналин. Это хорошо известные нейромедиаторы, участвующие в регуляции различных физиологических и психоэмоциональных функций и реакций организма, таких как стресс, сон и бодрствование, обучение, внимание, память, энергетический обмен и др. Соответственно, нарушение нормального функционирования ТГ является одним из патогенетических факторов в развитии многих неврологических и психических заболеваний, включая болезнь Паркинсона, синдром дефи-

цита внимания и гиперактивности, депрессию, шизофрению, болезнь Альцгеймера, наркозависимость [19].

Катехоламины и фермент их синтеза ТГ содержатся в нервных клетках, которые в центральной нервной системе (ЦНС) распределены неравномерно. Основная масса дофаминергических нейронов и образуемых ими проводящих путей может быть подразделена на три группы: нигростриатные, мезокортикальные (или мезокортиколимбические) и тубероинфундибулярные [20, 21]. Нейроны компактной зоны черного вещества головного мозга дают начало нигростриатному дофаминергическому пути, который заканчивается в хвостатом ядре и скорлупе и играет важнейшую роль в регуляции локомоторной функции позвоночных [22]. Повреждение нигростриатных дофаминергических нейронов у человека ведет к развитию паркинсонизма и болезни Паркинсона [23].

В настоящее время производится широкий спектр моноклональных антител к ТГ, а также поликлональных антител, которые позволяют выявлять этот фермент иммуногистохимически в нервной системе и других отделах организма человека и различных видов животных. В наших предыдущих исследованиях было показано, что

одним из наиболее удачных вариантов антител, которые визуализируют ТГ в катехоламинергических нейронах и их отростках в мозге лабораторных животных (крысы, мыши) и человека, являются поликлональные антитела к ТГ фирмы Abscam (ab112), полученные против очищенного белка из клеток феохромоцитомы крысы. Тела и отростки тирозингидроксилаза-иммунореактивных нейронов хорошо окрашиваются в черной субстанции и гипоталамусе, а катехоламинергические нервные волокна — в полосатом теле (особенно скорлупе), прилежащем ядре, неокортексе, септальных ядрах, обонятельных луковицах (рис. 1).

Оптимальное выявление ТГ в мозге человека и экспериментальных животных, по нашим наблюдениям, достигается при использовании цинк-содержащих фиксаторов, особенно цинк-этанол-формалина, применение которого позволяет получать иммуногистохимические препараты высокого качества как для световой, так и для конфокальной лазерной микроскопии [24, 25].

Глутаматдекарбоксилаза (ГДК, или GAD) — фермент, катализирующий декарбоксилирование глутаминовой кислоты с образованием ГАМК — основного тормозного медиатора нервной системы. В ЦНС обнаружено две

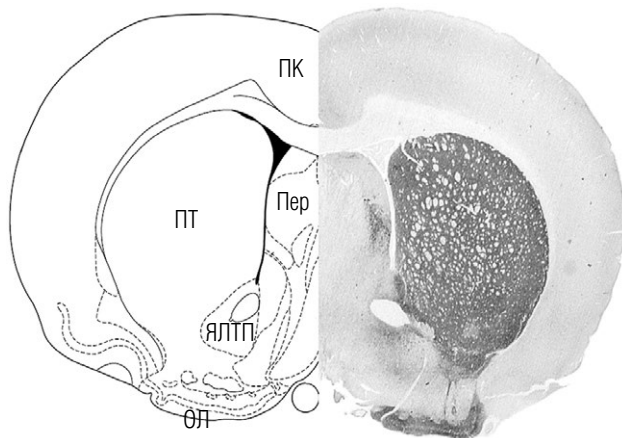


Рис. 1. Срез головного мозга крысы, проходящий через область полосатого тела (*corpus striatum*). Слева — карта областей головного мозга крысы, справа — иммуногистохимическое окрашивание среза головного мозга крысы на тирозингидроксилазу (серая окраска). Продемонстрировано преимущественное распределение катехоламинергических нервных волокон в полосатом теле (ПТ) и обонятельной луковице (ОЛ). ПК — поясная кора, Пер — перегородка, ЯЛТП — ядро ложа терминальной полоски

Fig. 1. The section of the rat brain through the corpus striatum. Left — figure of the rat brain areas, right — tyrosine hydroxylase immunohistochemistry (gray color). Catecholaminergic nerve fibers are predominantly distributed in the striatum (ПТ) and olfactory bulb (ОЛ). ПК — cingulate cortex, Пер — septum, ЯЛТП — bed nucleus of the stria terminalis

основные изоформы GAD, которые различаются своим молекулярным весом (65 и 67 кДа), обозначаются как GAD65 и GAD67 и кодируются генами *Gad1* и *Gad2* соответственно. Если GAD67 была выявлена в телах, отростках и синаптических окончаниях нейронов, то GAD65 — только в синаптических окончаниях [26], поэтому для иммуногистохимической визуализации ГАМК-ергических структур головного мозга чаще используют антитела к GAD67.

В норме экспрессия GAD67 наблюдается в нейронах коры, мозжечка, полосатого тела, обонятельной луковицы, бледного шара, ретикулярной зоны черной субстанции, гиппокампа, нижнего двухолмия [2, 27–29]. Экспрессия фермента может нарушаться при различных неврологических и психических заболеваниях (ишемия мозга, шизофрения, болезнь Паркинсона и т. п.).

Применяемая в настоящем исследовании методика предназначена как для светооптического, так и для иммунофлуоресцентного выявления ГАМК-ергических структур в мозге мыши, крысы и человека. Для обнаружения GAD67 у крысы можно рекомендовать мышинные моноклональные (клон К-87) антитела (Abscam, Великобритания) или кроличьи поликлональные антитела (Spring Bioscience, США). Результаты применения мышинных моноклональных (клон К-87) антител против GAD67 на срезах коры мозжечка крысы приведены на рис. 2, а. GAD67-иммунопозитивные структуры присутствуют во всех слоях коры мозжечка. Интенсивно окрашиваются тела клеток Пуркинью, а также волокна корзинчатых клеток, которые формируют «корзинки» вокруг клеток Пуркинью. В зернистом слое GAD67 содержится в аксонах клеток Гольджи, входящих в состав периферической части клубочков мозжечка. В молекулярном, ганглиозном и зернистом слоях присутствует множество GAD67-иммунопозитивных волокон (см. рис. 2, а).

Таким образом, использование антител к GAD67 позволяет описать распределение ГАМК-ергических структур.

Холинацетилтрансфераза (ХАТ) — широко применяемый маркер холинергических нейронов. Это цитозольный белок, который является ключевым ферментом синтеза нейромедиатора ацетилхолина из ацетил-коэнзима А и холина [30]. Холинацетилтрансфераза синтезируется в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме в теле нейрона, транспортируется аксоплазматическим током в нервное окончание и, концентрируясь там, участвует в синтезе нейротрансмиттера [31]. Холинергические нейроны играют важную роль в регуляции про-

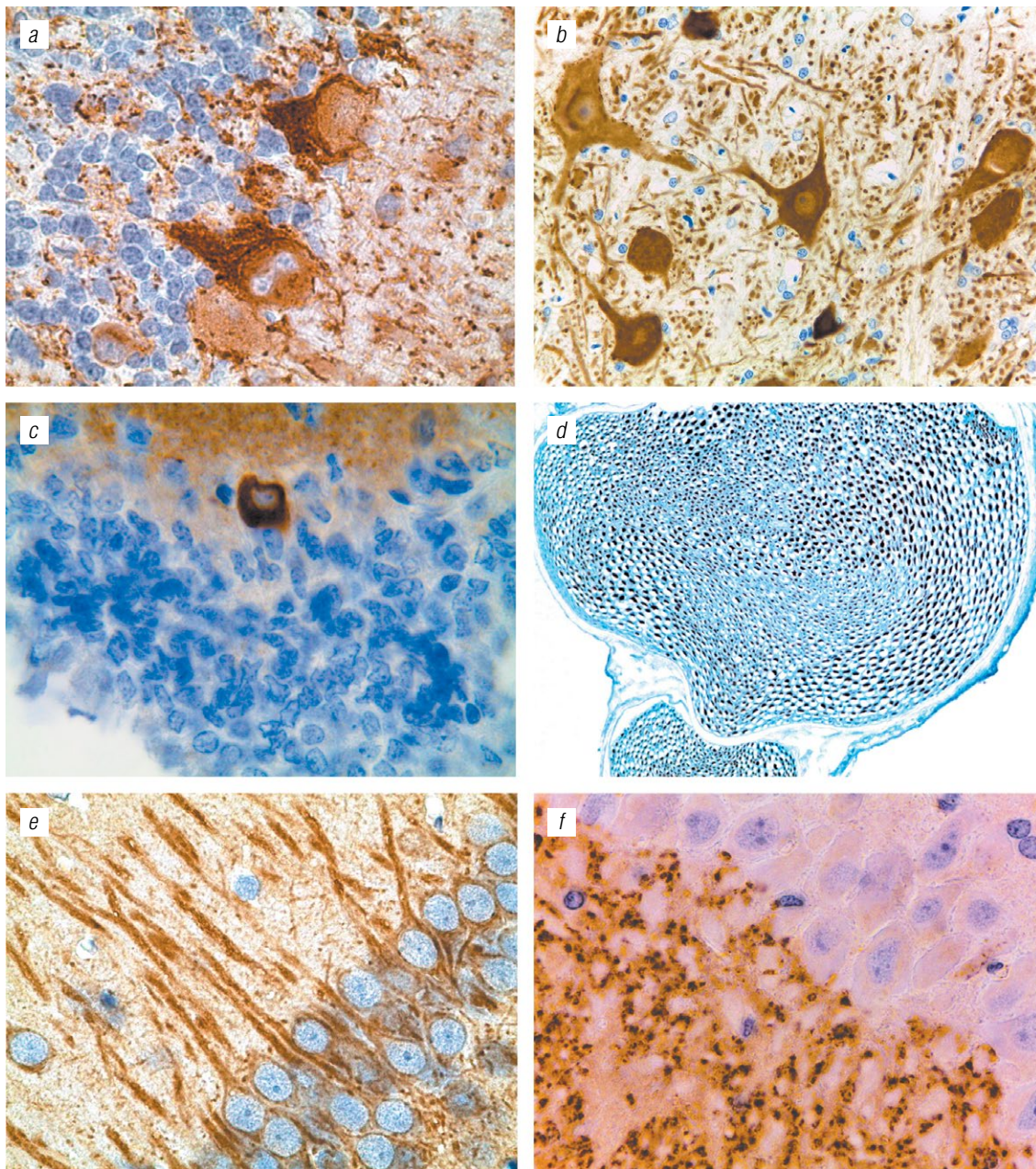


Рис. 2. Иммуногистохимическое выявление различных нейральных маркеров с использованием световой микроскопии: *a* — ГАМК-ергические структуры в мозжке крысы. Иммуногистохимическая реакция на GAD67, об. $\times 100$; *b* — холинергические мотонейроны спинного мозга крысы. Иммуногистохимическая реакция на холин-ацетилтрансферазу, об. $\times 100$; *c* — NOS-иммунопозитивный нейрон в субвентрикулярной зоне бокового желудочка головного мозга крысы. Иммуногистохимическая реакция на NO-синтазу (NOS), об. $\times 100$; *d* — нейрофиламенты в осевых цилиндрах нервных волокон седалищного нерва крысы (поперечный срез). Иммуногистохимическая реакция с применением антител против белков нейрофиламентов (SMI-32), об. $\times 10$; *e* — альфа-тубулин в отростках пирамидных нейронов в зоне CA1 гиппокампа крысы. Иммуногистохимическая реакция на альфа-тубулин, об. $\times 100$; *f* — альфа-синуклеин в гигантских синапсах мшистых волокон зоны CA3 гиппокампа. Иммуногистохимическая реакция на альфа-синуклеин, об. $\times 100$; *a-c, e, f* — подкраска клеточных ядер гематоксилином Джилла, *d* — подкраска тканевых структур астровым синим

Fig. 2. Immunohistochemical visualization of various neural markers in the rat brain using light microscopy. *a* — GABA-ergic structures in the cerebellum, GAD67 immunohistochemistry, ob. $\times 100$; *b* — cholinergic motor neurons of the spinal cord, choline acetyltransferase immunohistochemistry, ob. $\times 100$; *c* — NOS-immunopositive neuron in the subventricular zone of the lateral ventricle, NOS immunohistochemistry, ob. $\times 100$; *d* — neurofilaments in the axial cylinder of the nerve fibers of the rat sciatic nerve (cross section), SMI-32 immunohistochemistry, ob. $\times 10$; *e* — alpha-tubulin in the processes of pyramidal neurons in the CA1 zone of the hippocampus, alpha-tubulin immunohistochemistry, ob. $\times 100$; *f* — alpha-synuclein in giant synapses of mossy fibers of the CA3 zone of the hippocampus, alpha-synuclein immunohistochemistry, ob. $\times 100$; *a-c, e, f* — nuclear counterstaining with alum hematoxylin, *d* — counterstaining of tissue structures with astra blue

цессов обучения, памяти, сна. Они также обеспечивают двигательные функции и участвуют в регулировании моторики желудочно-кишечного тракта [32–36].

В современных морфологических исследованиях холинергические нейроны идентифицируют, как правило, по наличию ХАТ [4, 37]. Антитела к ХАТ применяют для выявления холинергических структур в иммуногистохимических исследованиях, касающихся ЦНС и периферической нервной системы как в норме, так и при патологических состояниях, в частности, при болезни Альцгеймера, патогенез которой связан со значительной потерей холинергических нейронов базальных ядер переднего мозга [38, 39]. У пациентов с когнитивными нарушениями снижена плотность волокон и ХАТ-содержащих нейронов в лобной коре и миндалине [39].

В современных исследованиях применяют как моноклональные, так и поликлональные антитела к ХАТ. Показано, что высокое качество окраски парафиновых срезов тканей можно достичь при использовании протокола окраски, предложенного нами ранее [4]. Допустимы различные виды фиксации гистологического материала, однако оптимальные результаты окрашивания были получены при использовании цинк-этанол-формальдегида [24, 25]. С помощью данного метода было изучено распределение холинергических нервных клеток спинного мозга (СМ) крысы на разных сроках эмбрионального развития, в раннем постнатальном периоде и у взрослых животных [3, 40, 41]. Для выявления фермента ХАТ использовали первичные козы поликлональные антитела (АВ144, Merck Millipore, Chemicon, США) [3, 41].

В центральном сером веществе (Х пластинка Рекседа) экспрессия ХАТ наблюдается в цитоплазме мелких интернейронов и их отростков, некоторые из которых достигают IX пластинки Рекседа. В промежуточной зоне серого вещества СМ на границе между VI и VII пластинками Рекседа ХАТ экспрессируют веретеновидные, ориентированные медиолатерально нейроны. В сером веществе передних рогов СМ в области IX пластинки Рекседа идентифицированы крупные ХАТ-содержащие мотонейроны с большим количеством иммунопозитивных отростков, образующих вентральные корешки СМ (рис. 2, б). В ходе исследования было обнаружено, что в отдельных мотонейронах ХАТ локализуются не только в цитоплазме клеток, но и в ядре. При использовании иммуногистохимической реакции на ХАТ на дендритах и телах крупных и средних нейронов передних рогов выявляются иммунопози-

тивные синаптические бутоны (см. рис. 2, б). Такие же синапсы присутствуют на иммунонегативных нервных клетках, расположенных в области VIII–IX пластинок Рекседа.

При изучении экспрессии ХАТ в шейном отделе СМ взрослой крысы путем микроскопии в проходящем свете были выявлены несколько областей с интенсивной иммуногистохимической реакцией. В области задних рогов СМ иммунопозитивными являются образующие сеть отростки нейронов и единичные клетки II–IV пластинок Рекседа. В центральном сером веществе (Х пластинка Рекседа) экспрессия ХАТ наблюдается в цитоплазме мелких интернейронов и их отростков, некоторые из которых достигают IX пластинки Рекседа. В промежуточной зоне серого вещества СМ на границе между VI и VII пластинками Рекседа ХАТ экспрессируют веретеновидные, ориентированные медиолатерально нейроны. В сером веществе передних рогов СМ в области IX пластинки Рекседа идентифицированы крупные ХАТ-содержащие мотонейроны с большим количеством иммунопозитивных отростков, образующих вентральные корешки СМ (см. рис. 2, б). В ходе исследования было обнаружено, что в отдельных мотонейронах ХАТ локализуются не только в цитоплазме клеток, но и в ядре. При проведении иммуногистохимической реакции на ХАТ на дендритах и телах крупных и средних нейронов передних рогов выявляются иммунопозитивные синаптические бутоны (см. рис. 2, б). Такие же синапсы присутствуют на иммунонегативных нервных клетках, расположенных в области VIII–IX пластинок Рекседа. Таким образом, использованный способ визуализации холинергических нейронов оказался высокоэффективным.

NO-синтаза

В конце 1980-х годов было обнаружено, что молекулы монооксида азота (NO) обладают сосудорасширяющим эффектом и задействованы в межнейронных связях в качестве своеобразного нейромедиатора. Нервные клетки, синтезирующие и использующие NO в качестве нейромедиатора, разбросаны по всему головному и спинному мозгу и образуют нитроксидагическую (нитрергическую) систему мозга, которая играет важную роль в общей регуляции функций всех отделов нервной системы. Доказаны регулирующие роль оксида азота в процессах памяти, нейрогенеза, сна, участие в работе стресс-лимитирующей системы и восприятии слуховых сигналов.

NO — ключевой участник свободнорадикальных процессов и глутаматной эксайтоток-

сичности, в результате чего она оказывается причастной к патогенезу многих нейродегенеративных и психических заболеваний, причем может как способствовать, так и противодействовать клеточной дегенерации [42–44]. Это определяет важность всех аспектов изучения NO в нервной системе для неврологии и психиатрии.

В клетках NO образуется в результате окисления аминокислоты аргинина (с одновременным образованием цитруллина) с помощью фермента NO-синтазы (NOS). Известно три изоформы этого фермента: эндотелиальная, нейрональная и индуцибельная. Первые две изоформы локализованы преимущественно в эндотелиальных и нейрональных клетках соответственно, а индуцибельная форма NOS экспрессируется в клетках разных типов под действием цитокинов и других сигнальных молекул [45].

Мы изучали локализацию различных NO-ергических клеток с использованием универсальных кроличьих поликлональных антител Spring Bioscience (США), при помощи которых возможно выявить преимущественно нейрональную форму NO-синтазы (nNOS) [6]. Так, в субвентрикулярной зоне конечного мозга были обнаружены отдельные округлые nNOS-иммунореактивные клетки. На рис. 2, с представлен участок субвентрикулярной зоны в области дорзального угла бокового желудочка головного мозга крысы. Среди многочисленных иммунонегативных клеток присутствует крупный nNOS-иммунопозитивный нейрон. Продукт реакции равномерно распределяется по всей цитоплазме, отсутствует в ядре (см. рис. 2, с). Других NOS-иммунопозитивных структур в субвентрикулярной зоне не определяется. Глубже в нейропиле стриатума присутствуют многочисленные мелкие иммунореактивные волокна, образующие густое сплетение.

Считают доказанным участие NO в регуляции нейрогенеза как в растущем, так и во взрослом мозге [46]. Молекула NO короткоживущая, и она не может (не успевает) диффундировать на отдаленное расстояние от места синтеза и выброса, поэтому регуляторные свойства по отношению к нейрогенезу в субвентрикулярной зоне, по-видимому, проявляют молекулы оксида азота, выделенные клетками, находящимися непосредственно в данной области. Это указывает на высокую функциональную значимость для нейрогенеза субвентрикулярной зоны взрослого мозга немногочисленных NOS-иммунопозитивных клеток, которые контролируют данный процесс. Проведенная реакция в полной мере удовлетворяет требованиям нейробиологических исследований.

Антитела SMI-32 против белков нейрофиламентов

Существует возможность использования антител к цитоскелетным белкам для маркирования нервных клеток и нервных волокон вне зависимости от их медиаторики. Так, метод визуализации нейрофиламентов, выявляемых при помощи антител SMI-32, широко применяют в нейробиологических и клинических исследованиях для маркирования нейронов и их отростков. С помощью антител SMI-32 визуализируют нефосфорилированный эпитоп тяжелой субъединицы нейрофиламентов. Нейрофиламенты являются одним из основных элементов цитоскелета и играют важную структурную роль в нервных клетках. Кроме того, они участвуют в обеспечении медленного аксонального транспорта, регулируют состояние других белков цитоскелета, осуществляют связи между цитоскелетом и цитоплазматическими структурами.

Маркер SMI-32, содержащийся в перикарионах крупных нервных клеток, позволяет изучать их форму и размеры, а также распределение этих нейронов в разных отделах нервной системы. Так, его широко применяют как маркер ганглиозных [47] и амакринных клеток [48] сетчатки, пирамидных нейронов неокортекса [49], клеток черной субстанции в норме [50] и при болезни Паркинсона [51], мотонейронов спинного мозга [52] и аксонов его белого вещества [53] и др. С использованием антител SMI-32 исследуют мозг человека и лабораторных животных [50, 54]. Есть данные о том, что SMI-32 является удобным маркером для исследования формирующихся нейронов в постнатальном онтогенезе [55, 56].

В наших исследованиях применяли моноклональные мышинные антитела к белку SMI-32 (Bio Legend, США) для исследования нервных волокон седалищного нерва крысы в норме и после травмы. Реакцию проводили на парафиновых срезах после фиксации материала в цинк-этанол-формальдегиде [24, 25].

Исследование гистологических препаратов показало, что на поперечных срезах через интактный седалищный нерв крысы в области верхней трети бедра визуализируются осевые цилиндры нервных волокон разного диаметра (1,5–14,0 мкм). При этом другие структурные элементы нерва (шванновские клетки, миелиновые оболочки, периневрий и др.) не окрашиваются и реакция проходит без фона (рис. 2, d).

По собственным и литературным данным, высокая селективность этого маркера, воспроизводимость реакции на парафиновых

и замороженных срезах, возможность оценивать материал с помощью как световой, так и флуоресцентной и лазерной конфокальной микроскопии позволяют давать морфологическую оценку степени восстановления нервных проводников. Отработанный нами метод мы предполагаем использовать в дальнейших исследованиях для оценки регенерации нерва после травмы и экспериментальной клеточной терапии.

Альфа-тубулин

Не менее важным маркером цитоскелета нервных клеток является альфа-тубулин. Молекула тубулина — основного белка микротрубочек — представляет собой гетеродимер, состоящий из двух субъединиц — альфа- и бета-тубулина. Тубулин локализуется в нервной системе в телах зрелых нейронов, их дендритах и аксонах, а также в синаптической мембране и постсинаптическом уплотнении и как компонент микротрубочек участвует в образовании цитоскелета нейронов и их отростков, а также в росте аксонов, образовании синапсов и аксоплазматическом транспорте. Генетические нарушения синтеза тубулина (тубулинопатии) ведут к тяжелым поражениям головного мозга [57], а многие заболевания нервной системы сопряжены с количественными и качественными нарушениями нейронального тубулина [58]. Широкая распространенность тубулина (в том числе альфа-тубулина) в нервной системе и универсальность его функций определяют высокую значимость изучения этого белка в ЦНС.

В головном мозге крысы при постановке иммуногистохимической реакции на альфа-тубулин наблюдается неравномерное окрашивание. Наиболее интенсивная реакция отмечается в поверхностном (первом) слое неокортекса, особенно в поясной коре, интенсивная окраска — в пириформной коре, обонятельных бугорках, оптической хиазме и передней комиссуре. В неокортексе имеется также полоса повышенной иммунореактивности на альфа-тубулин в средних (III–IV) и нижнем (VI) слоях неокортекса. Значительная иммунная реакция характерна для гиппокампа и медиальной части перегородки. В области латеральных желудочков яркой окраской выделяется бахромчатая полоса эпендимы со стороны желудочка, которая маркирует реснички, в то время как цитоплазма самих эпендимоцитов, а также клетки сосудистого сплетения иммунонегативны на альфа-тубулин.

Альфа-тубулин присутствует в клетках, которые по морфологическим характеристикам

соответствуют нейронам и астроцитам. В микроглиоцитах альфа-тубулин не был обнаружен. Во всех случаях альфа-тубулин-иммуноположительные клетки независимо от размера имеют характерный тип окраски: интенсивное окрашивание периферической зоны цитоплазмы и видимых частей аксонов и дендритов и полное отсутствие окраски в ядре и перинуклеарной зоне (рис. 2, е), то есть иммуногистохимическая реакция на альфа-тубулин как бы обводит контур нервных клеток и дает картину нейрона, похожую на таковую при серебрении по методу Гольджи.

Таким образом, иммуногистохимическое окрашивание на тубулин позволяет эффективно выявлять нервные клетки с отростками во всех областях мозга и перспективно для изучения cito- и миелоархитектоники различных мозговых структур.

Альфа-синуклеин

α -Синуклеин — небольшая молекула массой 19 кДа, наряду с β - и γ -синуклеином входит в семейство белков синуклеинов. Белок кодируется геном *SNCA*, расположенным на длинном плече четвертой хромосомы человека (4q21.3–q22). В процессе альтернативного сплайсинга формируются изоформы α -синуклеина длиной 140, 126, 119 и 98 аминокислот, из которых изоформа 140 является основной [59]. Структура белка включает основной N-терминальный домен (1–60 аминокислот), центральный гидрофобный домен (61–95 аминокислот), также известный как неамилоидный компонент (non-amyloid component, NAC), и кислый C-терминальный домен (96–140 аминокислот). N-терминальный участок характеризуется присутствием 7 высококонсервативных повторяющихся последовательностей, состоящих из 11 аминокислот. Этот участок формирует амфипатическую альфа-спираль и опосредует связь белка с липидами мембраны. Центральный домен является амилоидогенным и может приводить к агрегации белка. C-конец белка состоит из заряженных остатков аминокислот, подвергается посттрансляционным модификациям, опосредует связь альфа-синуклеина с другими белками, лигандами и ионами металлов, а также его шаперонную активность [60, 61]. Альфа-синуклеин присутствует в клетке в двух формах: в нативной, в виде растворимого несвернутого белка, и в мембраносвязанной, что сопровождается конформационным переходом в альфа-спираль [62].

На сегодняшний день функция α -синуклеина не установлена. Предполагают, что α -синуклеин участвует в разнообразных физиологических

процессах, начиная от везикулярного нейронального транспорта до регуляции кальция, митохондриального гомеостаза, экспрессии генов, фосфорилирования белка и связывания жирных кислот [59]. В ряде работ было показано, что α -синуклеин способен влиять на внутриклеточное содержание дофамина, непосредственно воздействуя на белки, участвующие в его синтезе [63].

Сегодня большинство исследований α -синуклеина направлено на установление его роли в развитии болезни Паркинсона, хотя фибриллярная форма этого белка ассоциирована и с другими нейродегенеративными заболеваниями, объединенными под общим названием «синуклеинопатии». К ним, в частности, относятся деменция с тельцами Леви, множественная системная атрофия, синдром Бредбери – Эгглстона и др. [59, 64].

В нашей лаборатории для изучения α -синуклеина в различных структурах мозга применяют поликлональные кроличьи антитела (Spring Bioscience, США). На рис. 2, *f* представлено распределение альфа-синуклеина в зоне СА3 гиппокампа головного мозга крысы. Иммунопозитивные гранулы альфа-синуклеина диффузно распределены в светлом (*stratum lucidum*) и радиальном (*stratum radiatum*) слоях гиппокампа. В пирамидном слое реакция на альфа-синуклеин отсутствует. Иммунопозитивные гранулы имеют преимущественно округлую форму, реже встречаются структуры овальной и палочковидной формы (см. рис. 2, *f*). В светлом и радиальном слоях хорошо контурируются многочисленные округлые структуры различного размера, в которых полностью отсутствует реакция на альфа-синуклеин. Эти структуры, по-видимому, являются участками дендритов пирамидных клеток, попавшими в срез поперечно. Вокруг данных областей формируются неравномерно распределенные внутри слоя иммунопозитивные скопления (агрегаты) гранул альфа-синуклеина, которые, судя по всему, представляют собой конгломераты альфа-синуклеин-иммунопозитивных аксодендритных и аскошипиковых синапсов гигантских терминалей мшистых волокон (см. рис. 2, *f*).

Таким образом, реакцию на альфа-синуклеин можно успешно использовать как для анализа нейродегенерации, так и при изучении синаптического аппарата гиппокампа в эксперименте.

NeuN

В нейробиологических экспериментах важно не только установление медиаторной специфичности нейронов, но и определение типо-

вой специфичности клеток. В настоящее время существует большое число иммуногистохимических маркеров, позволяющих определять тип исследуемых клеток, принадлежность их к нервным клеткам, определенному виду глиальных или других типов клеток. Одним из наиболее распространенных маркеров нейронов является ядерный белок нервных клеток NeuN. Этот белок локализуется в ядрах и перинуклеарной цитоплазме большинства нейронов ЦНС млекопитающих и отсутствует в астроцитах. Белок характеризуется высоким консерватизмом, его можно выявить при помощи одинаковых антител как у млекопитающих и человека [65], так и у птиц [66], земноводных [67], рыб [68]. Этот нейрональный маркер был открыт в 1992 г., когда группе исследователей удалось получить моноклональные антитела (клон А60) к неизвестному ранее ядерному белку [65]. Однако только в 2009 г. была расшифрована нуклеотидная последовательность гена, кодирующего это белок. Тогда было показано, что NeuN — это продукт гена *Fox-3*, одного из генов *Fox*, регулирующих сплайсинг [69], и начинает синтезироваться на поздних этапах дифференцировки постмитотических нейробластов [70]. Важно отметить, что NeuN, который является типичным белком нейронов, не удалось обнаружить в целом ряде нервных клеток, в частности, в мозжечке (корзинчатые, звездчатые, униполярные щетинковые нейроны, клетки Пуркинье, Гольджи, Лугаро, нейроны зубчатого ядра), неокортексе — в клетках Кахалы – Ретциуса [65, 71], нейронах нижних олив, митральных клетках обонятельных луковиц [65], спинномозговых гамма-мотонейронах [72, 73] и нейронах симпатических ганглиев [74]. Нейроны *substantia nigra* в мозге экспериментальных животных и человека дают слабую иммуногистохимическую окраску на NeuN или не окрашиваются вовсе [10].

Наибольшее распространение реакция на NeuN получила при проведении экспериментальных исследований. При развитии патологических состояний наблюдают нарушение выявляемости NeuN в клетках вплоть до полного исчезновения реакции, в частности в случае ишемического повреждения нейронов стриатума [11]. В патоморфологических исследованиях реакция на NeuN может быть использована в качестве чувствительного теста для выявления ранних аутолитических изменений биологических объектов, что связано с достаточно быстрым катаболизмом белка NeuN [75]. Эти данные свидетельствуют, что белок NeuN может не выявляться в нейронах в отдельных случаях, но, если он визуализируется в клетках, это надежно демонстрирует их нейрональную природу.

В нашей лаборатории применяют мышинные моноклональные (клон А60) антитела к белку NeuN фирмы Merck Millipore (бывшая Chemicon), США. Для демонстрации результатов постановки иммуногистохимической реакции на NeuN представлен участок зубчатой фасции гиппокампа крысы (рис. 3, а). Ядра нейронов четко видны за счет высокоинтенсивной реакции на NeuN (см. рис. 3, а, зеленый цвет). В пределах гранулярной зоны гиппокампа нейроны локализованы плотными рядами, в то время как в субгранулярной зоне и зоне хилуса они располагаются на значительном расстоянии друг от друга. В ядрах нейронов белок NeuN распределен в виде мелких дискретных скоплений по всему объему ядра, в цитоплазме он присутствует в околядерной области. В некоторых нейронах хилуса продукт реакции определяется в том числе в начальных сегментах отростков (см. рис. 3, а, зеленый цвет).

Помимо нейронов на микрофотографии присутствуют астроциты, выявляемые за счет иммунофлуоресцентной реакции на глиальный фибриллярный кислый белок GFAP (см. рис. 3, а, красный цвет). В ЦНС нейроны и астроциты функционируют в тесной взаимосвязи, поэтому одновременное обнаружение нервных клеток и астроглии составляет актуальную задачу большинства нейробиологических исследований. Постановка двойной реакции NeuN/GFAP дает возможность одновременно выявлять нейроны и астроциты, позволяя оценить структурные особенности и функциональный статус каждого из этих типов клеток, а также изучить их взаимное расположение друг относительно друга.

Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) — маркер астроцитов

Астроциты являются мультифункциональными клетками глии, которые выполняют в ЦНС целый ряд функций, таких как обеспечение нейронов энергетическим субстратом (лактатом), участие в синаптогенезе, синаптической пластичности и модуляции синаптической передачи, удаление нейротоксичного глутамата из синаптической щели после передачи сигнала между нейронами, участие в формировании ГЭБ и регуляции микроциркуляции, поддержание водно-ионного баланса и многое другое [76]. Помимо многочисленных функций в ЦНС в норме, астроциты реагируют на любое повреждение мозга посредством процесса, называемого реактивным астроглиозом [77]. В связи с этим неудивительно, что изучение астроцитов составляет цель огромного коли-

чества работ нейробиологической тематики. Это в свою очередь определяет необходимость надежного маркера для изучения структурно-функциональных характеристик этой клеточной популяции. В настоящее время известно более 20 белков — маркеров астроцитов, среди которых наиболее широко используют GFAP [78, 79]. GFAP — это белок III класса промежуточных филаментов (ПФ), который является главным белком цитоскелета астроцитов и обеспечивает стабильность морфологии их тел и отростков, участвует в регуляции объема астроцитов и модуляции их движения. Локализация GFAP в телах и отростках астроцитов позволяет не только выявлять эту клеточную популяцию, но и делать качественные 3D-реконструкции астроцитов и изучать особенности их структурной организации и пространственного взаиморасположения [12]. Кроме того, GFAP может выступать в качестве важного функционального маркера астроглии. Увеличение экспрессии этого белка наблюдается при многих патологиях ЦНС, в том числе при ишемии, нейродегенеративных заболеваниях, развитии опухоли, травматическом повреждении мозга и т. д.

В каталогах многих фирм-производителей представлены разные поли- и моноклональные антитела против GFAP. В нашей лаборатории используют три разновидности этих антител: кроличьи поликлональные антитела фирмы Agilent (бывшая Dako), США, и два клона мышинных (моноклональных) антител (клон GA-5 фирмы Monosan, Нидерланды, и клон SPM507 фирмы Spring Bioscience, США). Эти антитела позволяют специфично выявлять астроциты на парафиновых срезах головного мозга лабораторных животных (мышь, крыса, кролик, кошка) и человека. На рис. 3, а (красный цвет) представлены результаты применения кроличьих поликлональных антител против GFAP (Agilent, США) для идентификации астроцитов в гиппокампе крысы. Астроциты имеют вид ветвящихся клеток преимущественно звездчатой формы. В субгранулярной зоне и хилусе четко видны тела и отростки астроцитов, в то время как в гранулярной зоне идентифицируются только астроцитарные отростки, которые пронизывают плотные ряды нейронов (см. рис. 3, а, красный цвет).

Глутаминсинтетаза

При проведении нейробиологических исследований важно не только идентифицировать тип клетки, но и определить ее функциональное состояние. Одним из маркеров, позволяющих это сделать в случае изучения астроглии,

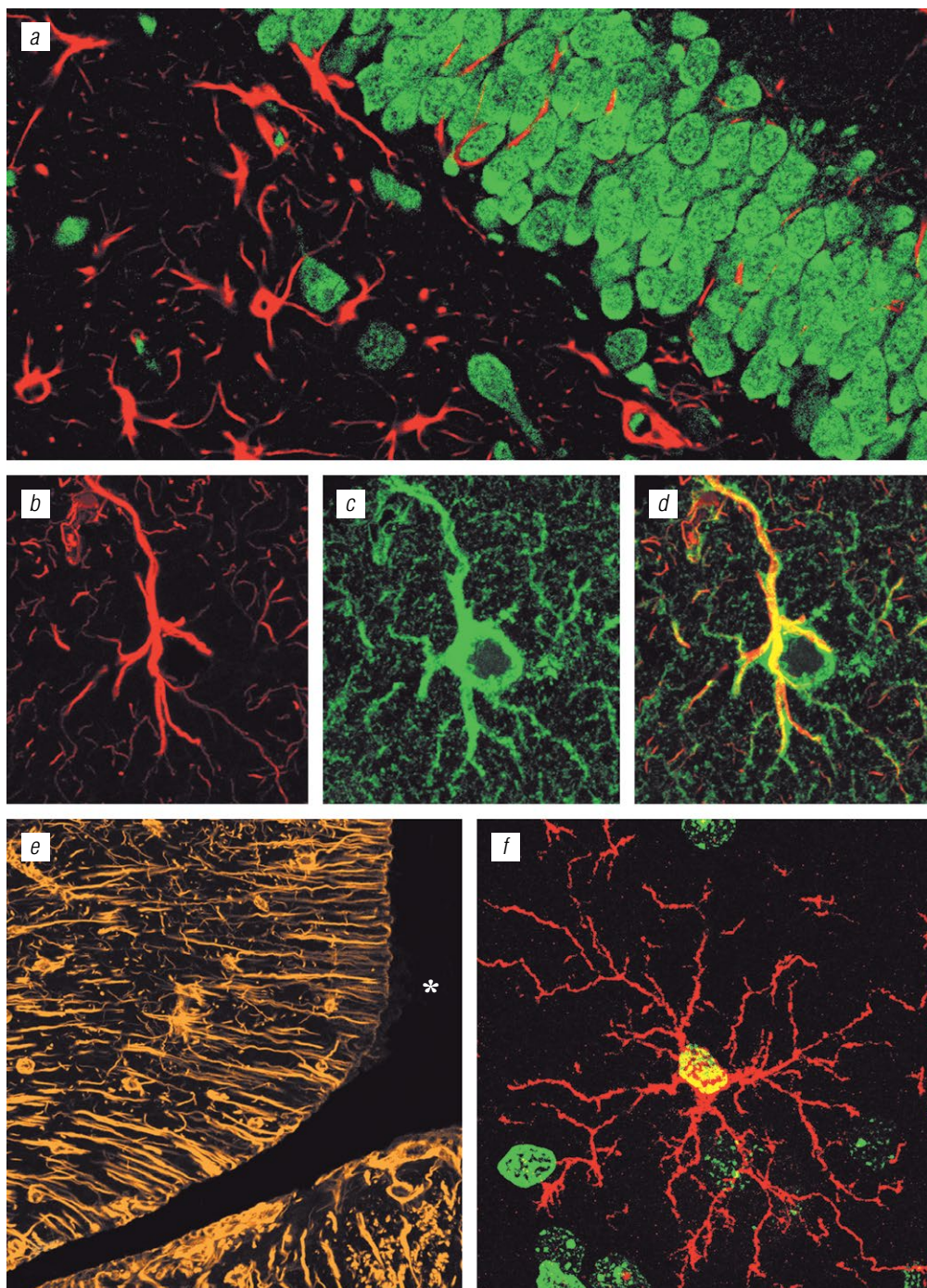


Рис. 3. Флуоресцентная визуализация нейральных и глиальных маркеров (конфокальная микроскопия): *a* — зубчатая фасция гиппокампа крысы. Двойная иммуногистохимическая реакция на NeuN (зеленый цвет) и GFAP (красный цвет), об. $\times 63$; *b-d* — астроцит в стриатуме головного мозга кролика. Двойная иммуногистохимическая реакция на GFAP (красный цвет) и глутаминсинтетазу (зеленый цвет), раздельное (*b*, *c*) и совмещенное (*d*) представление красного и зеленого каналов, об. $\times 63$; *e* — танициты третьего желудочка головного мозга крысы. Иммуногистохимическая реакция на виментин, об. $\times 63$; звездочка — полость желудочка; *f* — микроглиоцит в стриатуме головного мозга крысы. Иммуногистохимическая реакция на Iba-1 (красный цвет) с подкраской ядер клеток красителем SYTOX Green (зеленый цвет), об. $\times 63$

Fig. 3. Fluorescence imaging of neural and glial markers (confocal microscopy): *a* — fascia dentata of the rat hippocampus. Double immunofluorescence staining for NeuN (green) and GFAP (red), ob. $\times 63$; *b-d* — astrocyte in the striatum of the rabbit brain. Double immunofluorescence staining for GFAP (red) and glutamine synthetase (green). Confocal images obtained in single channels are shown in (*b*) and (*c*) while merged images are shown in (*d*), ob. $\times 63$; *e* — tanycytes of the third ventricle of the rat brain. Vimentin immunohistochemistry, ob. $\times 63$, the asterisk marks the ventricular cavity; *f* — microglia cell in the striatum of the rat brain. Iba-1 immunohistochemistry (red color) with nuclear counterstaining with SYTOX Green (green color), ob. $\times 63$

является глутаминсинтетаза. Глутаминсинтетаза (англ. glutamine synthetase, GS) — это фермент класса лигаз, катализирующий реакцию АТФ-зависимого соединения глутамата с аммиаком с образованием глутамина. В мозге GS синтезируют преимущественно астроциты. Это один из ключевых ферментов глутамат-глутаминового цикла, в ходе которого астроциты поглощают внеклеточный глутамат, обладающий нейротоксичными свойствами, и с помощью GS преобразуют его в нетоксичный глутамин [80–82]. В результате этой же реакции инактивируется избыток нейротоксичного аммиака, накапливающегося при патологиях печени и выступающего патогенным фактором печеночной энцефалопатии [83].

В настоящее время GS широко применяют в качестве функционального маркера астроцитов в экспериментальных и клинических нейробиологических исследованиях. В отличие от другого широко используемого маркера астроглии — глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) — GS присутствует во всех подтипах астроцитов, благодаря чему удается наиболее полно выявлять эту клеточную популяцию [84].

Антитела против GS, подходящие для проведения иммуногистохимического исследования, поставляют сегодня многие фирмы-производители (например, Thermo Fisher Scientific, BioLegend, Merck и др.). В нашей лаборатории применяют мышинные моноклональные (клон GS-6) антитела к GS фирмы Merck (бывшая Chemicon), США. Согласно аннотации производителя эти антитела могут быть использованы для работы с тканями овцы, крысы, мыши и человека. Как показывают наши исследования, они применимы также в случае изучения мозга кролика. На рис. 3, *b–d* представлены результаты постановки двойной иммунофлуоресцентной реакции GFAP/GS на препаратах головного мозга кролика. GFAP (красный цвет) преимущественно локализован в теле и крупных отростках астроцита. При этом в околядерной области видны участки, характеризующиеся отсутствием GFAP-иммунореактивности, а интенсивность флуоресценции в тонких отростках низкая (рис. 3, *b*). В отличие от GFAP, GS (зеленый цвет) выявляется во всех участках перинуклеарной цитоплазмы астроцита, а также в крупных и мелких клеточных отростках, количество и интенсивность флуоресценции которых визуально больше по сравнению с GFAP-иммуноокрашиванием (рис. 3, *c*). На рис. 3, *d* с объединенным представлением зеленого и красного каналов видно, что GFAP и GS не полностью колокализированы в преде-

лах астроцита стриатума кролика. Было также отмечено, что GFAP распределен в теле и отростках астроцитов в виде волокнистых структур (рис. 3, *b*), в то время как GS характеризуется дискретным распределением и идентифицируется в виде многочисленных мелких скоплений (рис. 3, *c*).

Таким образом, GS представляет собой удобный маркер, который в комбинации с GFAP позволяет наиболее полно оценить структурные особенности астроглии в норме и при патологии.

Виментин

В ряде исследований бывает необходимо провести селективное маркирование клеток, образующих выстилку желудочков мозга, — эпендимоцитов и таницитов. В этом случае в качестве маркера может быть использован виментин [15]. Он относится к III классу ПФ и образует гомо- и гетеродимеры с другими белками ПФ — нестином и десмином. Виментин является высококонсервативным белком у позвоночных, имеет молекулярную массу 57 кДа и состоит из 466 аминокислот.

Основная функция виментина в клетке заключается в поддержании клеточной целостности, обеспечении ригидности и механической стабильности, поддержании формы клетки. Виментиновые филаменты принимают участие во внутриклеточном распределении органелл и белков в цитоплазме, а также их транспорте, клеточной адгезии, миграции и внутриклеточной передаче сигналов. В ряде исследований была показана роль виментина в клеточной пролиферации, дифференцировке и апоптозе.

В норме виментин является компонентом барьерных структур головного мозга. Промежуточные филаменты виментина в большом количестве экспрессируются в эпендимоцитах, таницитах, астроцитах, менингоцитах и эндотелиоцитах [16]. Кроме того, наряду с нестином, виментин входит в состав цитоскелета нейральных стволовых и прогениторных клеток. В эмбриогенезе его обнаруживают в клетках радиальной глии [15]. При воздействии различного рода повреждающих факторов астроциты переходят в реактивное состояние и характеризуются, помимо гиперэкспрессии GFAP, экспрессией виментина (что в норме нехарактерно для астроцитов взрослого мозга млекопитающих). Считают, что в данном случае такие ПФ необходимы для обеспечения астроцитами нейропротекторной функции [85].

В нашей лаборатории исследования экспрессии виментина ведут с помощью моноклональ-

ных антител (клон V9) фирмы Agilent (бывшая Dako), США. На рис. 3, *e* представлен участок дна третьего желудочка головного мозга крысы. Виментин-иммунопозитивные танициты формируют выстилку этой области мозга и представляют собой биполярные клетки с длинным базальным отростком. Виментиновые филаменты распределены в цитоплазме клеток равномерно и присутствуют как в телах, так и в отростках таницитов. От основания тела таницитов отходит один базальный отросток, который затем ветвится на более мелкие. Отростки длинные, тонкие и отличаются волнообразным ходом. Они оканчиваются на сосудах гипоталамуса, эндотелиоциты которых также являются виментин-иммунопозитивными (окрашиваются эндотелиоциты, гладкие миоциты и клетки адвентиции).

Таким образом, иммуногистохимическая реакция на виментин позволяет охарактеризовать структурную и пространственную организацию циркумвентрикулярной зоны гипоталамуса.

Iba-1

Надежным маркером микроглиальных клеток служит белок Iba-1. В настоящее время не вызывает сомнений, что нервная и иммунная система функционируют в тесной кооперации и взаимно влияют друг на друга [86]. Изучению разных аспектов нейроиммунных взаимодействий посвящено большое количество современных научных исследований. Центральная нервная система характеризуется наличием собственной иммунной системы, которую формируют клетки микроглии, являющиеся тканевыми макрофагами мезенхимного происхождения. Большой интерес исследователей к изучению этой клеточной популяции обусловлен тем, что микроглия — ключевой элемент процесса нейровоспаления, с которым ассоциированы нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, хорей Гентингтона и др. В связи с этим важным представляется наличие в распоряжении исследователей селективных маркеров микроглии, позволяющих оценить количественные изменения и функциональный статус этой клеточной популяции.

В качестве селективного маркера микроглиоцитов в настоящее время широко используют кальций-связывающий белок Iba-1 (англ. ionized calcium-binding adaptor molecule-1), также известный как AIF-1 (allograft inflammatory factor-1) [17, 18, 87, 88]. С помощью антител против белка Iba-1 можно выявить как активированную амебодную микроглию, так и покоящуюся рамифицированную микроглию, а так-

же все промежуточные состояния. Равномерное распределение Iba-1 в цитоплазме микроглиоцитов позволяет максимально полно охарактеризовать структурные особенности этих клеток [89, 90].

В настоящее время исследователям доступны разнообразные коммерческие антитела против Iba-1/AIF-1 (например, фирм Wako Chemicals, Abcam и др.). Козьи поликлональные антитела против Iba-1 фирмы Abcam (ab5076), применяемые в настоящее время для исследований в нашей лаборатории, подходят для электронно-микроскопической иммуногистохимии, иммуногистохимического исследования на парафиновых и свободноплавающих срезах, вестерн-блоттинга и иммунофлуоресценции. Иммуногеном для этих антител служит синтетический пептид, соответствующий C-концевому участку молекулы Iba-1 человека. Эти антитела специфичны для микроглии и макрофагов и не дают перекрестной реакции с нейронами, астроцитами или олигодендроцитами. Они подходят для иммуноокрашивания тканей мозга крысы, кролика, морской свинки, коровы, собаки, приматов и человека. Эти антитела позволяют получать препараты высокого качества как для световой, так и для флуоресцентной и конфокальной лазерной микроскопии. Хорошие результаты дает одновременное использование антител к белку Iba-1 и флуоресцентного ядерного красителя SYTOX Green. Подкраска ядер клеток значительно облегчает ориентировку в структурах препарата и дает возможность оценить функциональное состояние клеток (по размерам ядра и ядрышка, состоянию хроматина). На рис. 3, *f* представлены результаты постановки иммунофлуоресцентной реакции на белок Iba-1 на срезах головного мозга половозрелой крысы с подкраской ядер клеток красителем SytoxGreen (Invitrogen, США). Белок Iba-1 равномерно распределен в цитоплазме микроглиоцита, благодаря чему выявляется как тело клетки, так и ее многочисленные тонкие, сложно ветвящиеся отростки (см. рис. 3, *f*, красный цвет). Подкраска срезов флуоресцентным ядерным красителем SYTOX Green позволяет идентифицировать ядро микроглиоцита и наглядно продемонстрировать внутриядерную локализацию белка Iba-1, а также идентифицировать (по размерам и строению ядер) соседние клетки и оценить их функциональный статус (см. рис. 3, *f*, зеленый цвет).

Таким образом, иммуногистохимическая реакция на белок Iba-1 служит надежным инструментом для оценки популяции клеток микроглии как в норме, так и в экспериментальных исследованиях.

Заключение

В настоящей статье обобщен собственный опыт использования двенадцати наиболее значимых для нейробиологических исследований маркеров, для которых представлены оптимальные сочетания первичных и вторичных антител. Комбинация указанных иммуноцитохимических подходов с фиксацией объектов в цинк-этанол-формальдегиде позволяет добиться высокой селективности маркирования клеток при хорошем сохранении структуры и тинкториальных свойств нервной ткани. Это, в свою очередь, позволяет получать препараты высокого качества с использованием как иммуногистохимических маркеров, так и классической гистологической окраски. Данная методология перспективна для применения в экспериментальной нейробиологии и клинко-морфологической диагностике.

Дополнительная информация

Исследование выполнено в рамках темы государственного задания Института экспериментальной медицины.

Проведение исследования одобрено протоколами № 1/14 от 21.04.2014, № 3/17 от 30.11.2017 и № 3/19 от 25.04.2019 локального этического комитета ФГБНУ ИЭМ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

- Grigoriev IP, Vasilenko MS, Sukhorukova EG, Korzhhevskii DE. Use of Different Antibodies to Tyrosine Hydroxylase to Study Catecholaminergic Systems in the Mammalian Brain. *Neurosci Behav Physiol.* 2011;42(2):210-213. <https://doi.org/10.1007/s11055-011-9555-x>.
- Korzhhevskii DE, Gilerovich EG, Kirik OV, et al. Simultaneous Detection of Glutamate Decarboxylase and Synaptophysin in Paraffin Sections of the Rat Cerebellum. *Neurosci Behav Physiol.* 2015;46(1):106-109. <https://doi.org/10.1007/s11055-015-0205-6>.
- Колос Е.А., Коржевский Д.Э. Неоднородность реакции на холинацетилтрансферазу в холинергических нейронах // Нейрохимия. – 2016. – Т. 33. – № 1. – С. 56–62. [Kolov EA, Korzhhevskii DA. Heterogeneous choline acetyltransferase staining in cholinergic neurons. *Neirokhimiia.* 2016;33(1):56-62. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.1134/S1819712416010104>.
- Коржевский Д.Э., Григорьев И.П., Кирик О.В., и др. Метод иммуноцитохимического определения холинергических нейронов центральной нервной системы лабораторных животных // Морфология. – 2013. – Т. 144. – № 6. – С. 69–72. [Korzhhevskiy DE, Grigoriyev IP, Kirik OV, et al. Method of immunocytochemical demonstration of cholinergic neurons in the central nervous system of laboratory animals. *Morphology.* 2013;144(6):69-72. (In Russ.)]
- Коржевский Д.Э., Григорьев И.П., Новикова А.Д., и др. Холинергические структуры поясной коры головного мозга крысы // Медицинский академический журнал. – 2013. – Т. 13. – № 4. – С. 49–53. [Korzhhevskii DE, Grigorev IP, Novikova AD, et al. Cholinergic structures of the cingulate cortex of the rat brain. *Medical Academic Journal.* 2013;13(4):49-53. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17816/MAJ13449-53>.
- Сырцова М.А. Нитроксидергические клетки легкого у крысы // Морфология. – 2016. – Т. 150. – № 6. – С. 51–54. [Syrtsova MA. Nitroxidergic cells of the rat lung. *Morphology.* 2016;150(6):51-54. (In Russ.)]
- Иммуноцитохимия и конфокальная микроскопия / под ред. Д.Э. Коржевского. – СПб.: СпецЛит, 2018. [Immunotsitokhimiya i konfokal'naya mikroskopiya. Ed. by D.E. Korzhhevskiy. Saint Petersburg: SpetsLit, 2018. (In Russ.)]
- Grigor'ev IP, Shklyaeva MA, Kirik OV, et al. Distribution of alpha-tubulin in rat forebrain structures. *Neurosci Behav Physiol.* 2013;44(1):1-4. <https://doi.org/10.1007/s11055-013-9864-3>.
- Бровко М.А., Суфиева Д.А., Коржевский Д.Э. Иммуногистохимическое выявление альфа-синуклеина в синаптической зоне области СА3 гиппокампа // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2018. – Т. 7. – № 2. – С. 23–28. [Brovko MA, Sufieva DA, Korzhhevskiy DE. Immunohistochemical revealing of alpha-synuclein in synaptic contact area of hippocampal CA3 zone. *Journal of Anatomy and Histopathology.* 2018;7(2):23-28. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2018-7-2-23-28>.
- Сухорукова Е.Г. Ядерный белок NeuN в нейронах черного вещества головного мозга человека // Морфология. – 2013. – Т. 143. – № 2. – С. 78–80. [Sukhorukova YG. NeuN nuclear protein in neurons of human brain substantia nigra. *Morphology.* 2013;143(2):78-80. (In Russ.)]
- Кирик О.В., Сухорукова Е.Г., Власов Т.Д., Коржевский Д.Э. Селективная гибель нейронов стриатума крысы после транзиторной окклюзии средней мозговой артерии // Морфология. – 2009. – Т. 135. – № 2. – С. 80–82. [Kirik OV, Sukhorukova YG, Vlasov TD, Korzhhevskiy DE. Selective death of the striatum neurons in rats after the transient occlusion of the middle cerebral artery. *Morphology.* 2009;135(2):80-82. (In Russ.)].
- Sukhorukova EG, Kirik OV, Sufieva DA, et al. Structural organization of astrocytes in the subgranular zone of the rabbit hippocampal dentate fascia. *J Evol Biochem Physiol.* 2019;55(2):148-154. <https://doi.org/10.1134/s002209301902008x>.
- Калинина Ю.А., Суфиева Д.А. Иммуногистохимический метод одновременного выявления нейронов и астроцитов в головном мозге крысы // Медицинский академический журнал. – 2018. – Т. 18. – № 3. – С. 46–51. [Kalinina YuA, Sufieva DA. Immunohistochemical method of simultaneous detection of neurons and astrocytes in the rat brain. *Medical Academic Journal.* 2018;18(3):46-51. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17816/MAJ18346-51>.
- Sukhorukova EG, Gusel'nikova VV, Korzhhevskii DE. Glutamine synthetase in rat brain cells. *Neurosci Behav Physiol.* 2018;48(7):890-893. <https://doi.org/10.1007/s11055-018-0644-y>.

15. Kirik OV, Korzhevskii DE. Vimentin in ependymal and subventricular proliferative zone cells of rat telencephalon. *Bull Exp Biol Med.* 2013;154(4):553-557. <https://doi.org/10.1007/s10517-013-1998-3>.
16. Kirik OV, Nazarenkova AV, Sufieva DA. Three-dimensional visualization of the ependyma and tanocytes in the brain. *Neurosci Behav Physiol.* 2015;45(2):127-130. <https://doi.org/10.1007/s11055-015-0049-0>.
17. Kolos EA, Korzhevskii DE. Activation of microglia in the anterior horns of rat spinal cord after administration of bacterial lipopolysaccharide. *Bull Exp Biol Med.* 2017;163(4):515-518. <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3841-8>.
18. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Сухорукова Е.Г., Сырцова М.А. Микроглия черного вещества головного мозга человека // Медицинский академический журнал. – 2014. – Т. 14. – № 4. – С. 68–73. [Korzhevskii DE, Kirik OV, Sukhorukova EG, Syrszova MA. Microglia of the human Substantia Nigra. *Medical Academic Journal.* 2014;14(4):68-73. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17816/MAJ14468-72>.
19. Klein MO, Battagello DS, Cardoso AR, et al. Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cell Mol Neurobiol.* 2019;39(1):31-59. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0632-3>.
20. Dunnett SB, Bentivoglio M, Björklund A, Hökfelt T. Handbook of chemical neuroanatomy: dopamine. Amsterdam: Elsevier; 1984.
21. Sukhorukova EG, Alekseeva OS, Korzhevsky DE. Catecholaminergic neurons of mammalian brain and neuromelanin. *J Evol Biochem Physiol.* 2014;50(5):383-391. <https://doi.org/10.1134/s0022093014050020>
22. Отеллин В.А., Арушанян Э.Б. Нигрострионигральная система. – М.: Медицина, 1989. [Otellin VA, Arushanyan EB. Nigrostrionigral'naya sistema. Moscow: Meditsina; 1989. (In Russ.)]
23. Голубев В.Л., Левин Я.И., Вейн А.М. Болезнь Паркинсона и синдром паркинсонизма. М.: МЕДпресс, 2000. [Golubev VL, Levin YI, Vejn AM. Bolezn' Parkinsona i sindrom parkinsonizma. Moscow: MEDpress; 2000. (In Russ.)]
24. Korzhevskii DE, Sukhorukova EG, Gilerovich EG, et al. Advantages and disadvantages of zinc-ethanol-formaldehyde as a fixative for immunocytochemical studies and confocal laser microscopy. *Neurosci Behav Physiol.* 2014;44(5):542-545. <https://doi.org/10.1007/s11055-014-9948-8>.
25. Korzhevskii DE, Sukhorukova EG, Kirik OV, Grigorev IP. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde. *Eur J Histochem.* 2015;59(3). <https://doi.org/10.4081/ejh.2015.2530>.
26. Kaufman DL, Houser CR, Tobin AJ. Two forms of the gamma-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. *J Neurochem.* 1991;56(2):720-723. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb08211.x>.
27. Fong AY, Stornetta RL, Foley CM, Potts JT. Immunohistochemical localization of GAD67-expressing neurons and processes in the rat brainstem: subregional distribution in the nucleus tractus solitarius. *J Comp Neurol.* 2005;493(2):274-290. <https://doi.org/10.1002/cne.20758>.
28. Fukuda T, Heizmann CW, Kosaka T. Quantitative analysis of GAD65 and GAD67 immunoreactivities in somata of GABAergic neurons in the mouse hippocampus proper (CA1 and CA3 regions), with special reference to parvalbumin-containing neurons. *Brain Res.* 1997;764(1-2):237-243. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(97\)00683-5](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)00683-5).
29. Esclapez M, Tillakaratne NJ, Kaufman DL, et al. Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. *J Neurosci.* 1994;14(3):1834-1855. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.14-03-01834.1994>.
30. From molecules to networks. An introduction to cellular and molecular neuroscience. 3rd ed. Ed. by J.H. Byrne, R. Heidelberger, M.N. Waxham, et al. New York: Academic Press; 2014.
31. Acetylcholine in basic neurochemistry. 8th ed. Ed. by S.T. Brady, R.W. Albers, G.J. Siegel, D.L. Price. New York: Academic Press; 2012.
32. Буданцев А.Ю. Диссоциированное обучение и холинергические системы мозга // Успехи современной биологии. – 2000. – Т. 120. – № 6. – С. 587–598. [Budantsev AY. Dissotsiirovannoe obuchenie i kholinergicheskie sistemy mozga. *Advances in modern biology.* 2000;120(6):587-598. (In Russ.)]
33. Zakharova EI, Dudchenko AM, Svinov MM, et al. Cholinergic systems of the rat brain and neuronal reorganization under conditions of acute hypoxia. *Neurochem J.* 2010;4(4):290-303. <https://doi.org/10.1134/s1819712410040082>.
34. Klinkenberg I, Sambeth A, Blokland A. Acetylcholine and attention. *Behav Brain Res.* 2011;221(2):430-442. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.033>.
35. Micheau J, Marighetto A. Acetylcholine and memory: a long, complex and chaotic but still living relationship. *Behav Brain Res.* 2011;221(2):424-429. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.052>.
36. Balentova S, Conwell S, Myers AC. Neurotransmitters in parasympathetic ganglionic neurons and nerves in mouse lower airway smooth muscle. *Respir Physiol Neurobiol.* 2013;189(1):195-202. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2013.07.006>.
37. Matsumoto M, Xie W, Inoue M, Ueda H. Evidence for the tonic inhibition of spinal pain by nicotinic cholinergic transmission through primary afferents. *Mol Pain.* 2007;3:41. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-3-41>.
38. Ikonovic MD, Abrahamson EE, Isanski BA, et al. Superior frontal cortex cholinergic axon density in mild cognitive impairment and early Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2007;64(9):1312-1317. <https://doi.org/10.1001/archneur.64.9.1312>.
39. Benzing WC, Mufson EJ, Armstrong DM. Immunocytochemical distribution of peptidergic and cholinergic fibers in the human amygdala: their depletion in Alzheimer's disease and morphologic alteration in non-demented elderly with numerous senile plaques. *Brain Res.* 1993;625(1):125-138. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90145-d](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90145-d).
40. Колос Е.А., Коржевский Д.Э. Формирование холинергических нейронов спинного мозга крыс в пренатальный и ранний постнатальный период развития // Между-

- народная научная конференция «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии»; Апрель 16–17, 2014; Москва. – М., 2014. [Kolos YA, Korzhevskiy DE. Formirovanie kholinergicheskikh neyronov spinnogo mozga kryis v prenatal'nyy i ranniy postnatal'nyy period razvitiya. In: Proceedings of the International Scientific Conference "Aktual'nye voprosy morfogeneza v norme i patologii"; 2014 Apr 16-17; Moscow. (In Russ.)]
41. Колос Е.А., Коржевский Д.Э. Распределение холинергических и нитроксидергических нейронов в спинном мозгу у новорожденных и взрослых крыс // Морфология. – 2015. – Т. 147. – № 2. – С. 32-37. [Kolos YA, Korzhevskiy DE. The distribution of cholinergic and nitroxi-dergic neurons in the spinal cord of newborn and adult rats. *Morfology*. 2015;147(2):32-37. (In Russ.)]
 42. Akyol O, Zoroglu SS, Armutcu F, et al. Nitric oxide as a physiopathological factor in neuropsychiatric disorders. *In vivo*. 2004;18(3):377-390.
 43. Knott AB, Bossy-Wetzel E. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(3):541-553. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2234>.
 44. Соловьева А.Г., Кузнецова В.Л., Перетягин С.П., и др. Роль оксида азота в процессах свободнорадикального окисления // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2016. – № 1. – С. 228–233. [Solovieva AG, Kuznetsova VL, Peretyagin SP, et al. Role of nitric oxide in processes of free radical oxidation. *Vestnik Rossiiskoi voenno-meditsinskoi akademii*. 2016;(1):228-233. (In Russ.)]
 45. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33(7):829-837, 837a-837d. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>.
 46. Matarredona ER, Murillo-Carretero M, Moreno-Lopez B, Estrada C. Role of nitric oxide in subventricular zone neurogenesis. *Brain Res Brain Res Rev*. 2005;49(2):355-366. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2005.01.001>.
 47. Sexton TJ, Bleckert A, Turner MH, Van Gelder RN. Type I intrinsically photosensitive retinal ganglion cells of early post-natal development correspond to the M4 subtype. *Neural Dev*. 2015;10(1). <https://doi.org/10.1186/s13064-015-0042-x>.
 48. Lim E-J, Kim I-B, Oh S-J, Chun M-H. Identification and characterization of SMI32-immunoreactive amacrine cells in the mouse retina. *Neurosci Lett*. 2007;424(3):199-202. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.07.046>.
 49. Law AJ, Harrison PJ. The distribution and morphology of prefrontal cortex pyramidal neurons identified using anti-neurofilament antibodies SMI32, N200 and FNP7. Normative data and a comparison in subjects with schizophrenia, bipolar disorder or major depression. *J Psychiatr Res*. 2003;37(6):487-499. [https://doi.org/10.1016/s0022-3956\(03\)00075-x](https://doi.org/10.1016/s0022-3956(03)00075-x).
 50. Korzhevskii DE, Grigor'ev IP, Sukhorukova EG, Gusel'nikova VV. Immunohistochemical characteristics of neurons in the substantia nigra of the human brain. *Neurosci Behav Physiol*. 2018;49(1):109-114. <https://doi.org/10.1007/s11055-018-0702-5>.
 51. Gai WP, Vickers JC, Blumbergs PC, Blessing WW. Loss of non-phosphorylated neurofilament immunoreactivity, with preservation of tyrosine hydroxylase, in surviving substantia nigra neurons in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994;57(9):1039-1046. <https://doi.org/10.1136/jnnp.57.9.1039>.
 52. Penas C, Casas C, Robert I, et al. Cytoskeletal and activity-related changes in spinal motoneurons after root avulsion. *J Neurotrauma*. 2009;26(5):763-779. <https://doi.org/10.1089/neu.2008-0661>.
 53. Singh S, Metz I, Amor S, et al. Microglial nodules in early multiple sclerosis white matter are associated with degenerating axons. *Acta Neuropathol*. 2013;125(4):595-608. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1082-0>.
 54. Merkul'eva NS, Mikhalkin AA, Nikitina NI, et al. Changes in the formation of Y neurons in the cat visual system during early postnatal ontogeny on exposure to binocular rhythmic light stimulation. *Neurosci Behav Physiol*. 2014;44(9):1088-1093. <https://doi.org/10.1007/s11055-014-0030-3>.
 55. Ang LC, Munoz DG, Shul D, George DH. SMI-32 immunoreactivity in human striate cortex during postnatal development. *Dev Brain Res*. 1991;61(1):103-109. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(91\)90119-4](https://doi.org/10.1016/0165-3806(91)90119-4).
 56. Kogan CS, Zangenehpour S, Chaudhuri A. Developmental profiles of SMI-32 immunoreactivity in monkey striate cortex. *Dev Brain Res*. 2000;119(1):85-95. [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(99\)00162-5](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(99)00162-5).
 57. Goncalves FG, Freddi TAL, Taranath A, et al. Tubulinopathies. *Top Magn Reson Imaging*. 2018;27(6):395-408. <https://doi.org/10.1097/RMR.000000000000188>.
 58. Millecamps S, Julien JP. Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(3):161-176. <https://doi.org/10.1038/nrn3380>.
 59. Benskey MJ, Perez RG, Manfredsson FP. The contribution of alpha synuclein to neuronal survival and function — Implications for Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2016;137(3):331-359. <https://doi.org/10.1111/jnc.13570>.
 60. Mehra S, Sahay S, Maji SK. alpha-Synuclein misfolding and aggregation: Implications in Parkinson's disease pathogenesis. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2019;1867(10):890-908. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.03.001>.
 61. Das T, Eliezer D. Membrane interactions of intrinsically disordered proteins: The example of alpha-synuclein. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2019;1867(10):879-889. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.05.001>.
 62. Пчелина С.Н. Альфа-синуклеин как биомаркер болезни Паркинсона // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2011. – Т. 5. – № 4. – С. 46–51. [Pchelina SN. Alpha-synuclein as a biomarker of Parkinson's disease. *Annaly klinicheskoy i eksperimental'noy neurologii*. 2011;5(4):46-51. (In Russ.)]
 63. Perez RG, Waymire JC, Lin E, et al. A role for α -synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J Neurosci*. 2002;22(8):3090-3099. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-08-03090.2002>.
 64. Burre J. The synaptic function of alpha-synuclein. *J Parkinsons Dis*. 2015;5(4):699-713. <https://doi.org/10.3233/JPD-150642>.

65. Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*. 1992;116(1):201-211.
66. Scott BB, Lois C. Generation of tissue-specific transgenic birds with lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(45):16443-16447. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508437102>.
67. Tochinali S, Yoshino J. Phylogeny and ontogeny of regeneration in vertebrates. In: Proceedings of International Symposium on "Dawn of a New Natural History — Integration of Geoscience and Biodiversity Studies"; Sapporo, 2004 Mar 5-6. Okada: Graduate School of Science, Hokkaido University; 2004. P. 45-51.
68. King C, Lacey R, Rodger J, et al. Characterisation of tectal ephrin-A2 expression during optic nerve regeneration in goldfish: implications for restoration of topography. *Exp Neurol*. 2004;187(2):380-387. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.02.006>.
69. Kim KK, Adelstein RS, Kawamoto S. Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *J Biol Chem*. 2009;284(45):31052-31061. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.052969>.
70. Korzhevskii DE, Petrova ES, Kirik OV, Otellin VA. Assessment of neuron differentiation during embryogenesis in rats using immunocytochemical detection of doublecortin. *Neurosci Behav Physiol*. 2009;39(6):513-516. <https://doi.org/10.1007/s11055-009-9164-0>.
71. Weyer A, Schilling K. Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum. *J Neurosci Res*. 2003;73(3):400-409. <https://doi.org/10.1002/jnr.10655>.
72. Friese A, Kaltschmidt JA, Ladle DR, et al. Gamma and alpha motor neurons distinguished by expression of transcription factor Err3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(32):13588-13593. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906809106>.
73. Shneider NA, Brown MN, Smith CA, et al. Gamma motor neurons express distinct genetic markers at birth and require muscle spindle-derived GDNF for postnatal survival. *Neural Dev*. 2009;4:42. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-4-42>.
74. Wolf HK, Buslei R, Schmidt-Kastner R, et al. NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J Histochem Cytochem*. 1996;44(10):1167-1171. <https://doi.org/10.1177/44.10.8813082>.
75. Сухорукова Е.Г., Кирик О.В., Зеленкова Н.М., Коржевский Д.Э. Нейрональный ядерный антиген NeuN — показатель сохранности нервной ткани и пригодности ее для иммуноцитохимического исследования // Медицинский академический журнал. — 2015. — Т. 15. — № 1. — С. 63–67. [Sukhorukova EG, Kirik OV, Zelenkova NM, Korzhevskii DE. Neuronal nuclear antigen NeuN as an indicator of the nervous tissue preservation and suitability for immunocytochemical study. *Medical Academic Journal*. 2015;15(1):63-67. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17816/MAJ15163-67>.
76. Santello M, Toni N, Volterra A. Astrocyte function from information processing to cognition and cognitive impairment. *Nat Neurosci*. 2019;22(2):154-166. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0325-8>.
77. Sofroniew MV. Astrogliosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;7(2):a020420. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020420>.
78. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010;119(1):7-35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>.
79. Sukhorukova EG, Korzhevskii DE, Alekseeva OS. Glial fibrillary acidic protein: The component of intermediate filaments in the vertebrate brain astrocytes. *J Evol Biochem Physiol*. 2015;51(1):1-10. <https://doi.org/10.1134/s0022093015010019>.
80. Сухорукова Е.Г., Гусельникова В.В. Ферменты-маркеры астроцитов // Медицинский академический журнал. — 2015. — Т. 15. — № 3. — С. 31–37. [Sukhorukova EG, Gusel'nikova VV. Astrocyte marker enzymes. *Medical Academic Journal*. 2015;15(3):31-37. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17816/MAJ15331-37>.
81. Rose Christopher F, Verkhatsky A, Parpura V. Astrocyte glutamine synthetase: pivotal in health and disease. *Biochem Soc Trans*. 2013;41(6):1518-1524. <https://doi.org/10.1042/bst20130237>.
82. Jayakumar AR, Norenberg MD. Glutamine synthetase: role in neurological disorders. *Adv Neurobiol*. 2016;13:327-350. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45096-4_13.
83. Hepatic encephalopathy. *N Engl J Med*. 2017;376(2):186-186. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1614962>.
84. Anlauf E, Derouiche A. Glutamine synthetase as an astrocytic marker: its cell type and vesicle localization. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4:144. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00144>.
85. Pekny M, Wilhelmsson U, Tatlisumak T, Pekna M. Astrocyte activation and reactive gliosis—A new target in stroke? *Neurosci Lett*. 2019;689:45-55. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.07.021>.
86. Корнева Е.А., Новикова Н.С., Шаинидзе К.З., Перекрест С.В. Взаимодействие нервной и иммунной систем. Молекулярно-клеточные аспекты. — СПб.: Наука, 2012. [Korneva EA, Novikova NS, Shainidze KZ, Perekrest SV. Vzaimodeystvie nervnoy i immunnoy sistem. Molekulyarno-kletochnye aspekty. Saint Petersburg: Nauka; 2012. (In Russ.)]
87. Han F, Perrin RJ, Wang Q, et al. Neuroinflammation and myelin status in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and normal aging brains: a small sample study. *Parkinsons Dis*. 2019;2019:7975407. <https://doi.org/10.1155/2019/7975407>.
88. Rubino SJ, Mayo L, Wimmer I, et al. Acute microglia ablation induces neurodegeneration in the somatosensory system. *Nat Commun*. 2018;9(1):4578. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05929-4>.
89. Korzhevskii DE, Kirik OV. Brain microglia and microglial markers. *Neurosci Behav Physiol*. 2016;46(3):284-290. <https://doi.org/10.1007/s11055-016-0231-z>.
90. Korzhevskii DE, Kirik O, Sukhorukova E. Immunocytochemistry of microglial cells. In: Immunocytochemistry and related techniques. Ed. by A. Adalberto, L. Lossi. New York: Humana Press; 2015. P. 101; 209-224. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2313-7_12.

Сведения об авторах / Information about the authors

Дмитрий Эдуардович Коржевский — д-р мед. наук, профессор РАН, заведующий лабораторией функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы Отдела общей и частной морфологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0002-2456-8165>. SPIN-код: 3252-3029.

Игорь Павлович Григорьев — канд. биол. наук, старший научный сотрудник, лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы Отдела общей и частной морфологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0002-3535-7638>. SPIN-код: 1306-4860.

Валерия Владимировна Гусельникова — канд. биол. наук, старший научный сотрудник, лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы Отдела общей и частной морфологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0002-9499-8275>. SPIN-код: 5115-4320. E-mail: Guselnicova.Valeriia@yandex.ru.

Елена Андреевна Колос — научный сотрудник, лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы Отдела общей и частной морфологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0002-9643-6831>. SPIN-код: 1479-5992.

Елена Сергеевна Петрова — канд. биол. наук, старший научный сотрудник, лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы Отдела общей и частной морфологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0003-0972-8658>. SPIN-код: 3973-1421.

Ольга Викторовна Кирик — канд. биол. наук, старший научный сотрудник, лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы Отдела общей и частной морфологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0001-6113-3948>. SPIN-код: 5725-8742.

Дина Азатовна Суфиева — научный сотрудник, лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы Отдела общей и частной морфологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0002-0048-2981>. SPIN-код: 3034-3137.

Валерия Алексеевна Разенкова — аспирант, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0002-3997-2232>. SPIN-код: 8877-8902.

Мария Вячеславовна Антипова — лаборант-исследователь, лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы Отдела общей и частной морфологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0002-3853-5671>. SPIN-код: 3607-3630.

Мария Валерьевна Черныш — студент, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург. SPIN-код: 3371-0447.

Dmitrii E. Korzhevskii — MD, PhD, Professor of the RAS, Head of the Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-2456-8165>. SPIN-code: 3252-3029.

Igor P. Grigor'ev — PhD, Senior Researcher, Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-3535-7638>. SPIN-code: 1306-4860.

Valeriia V. Gusel'nikova — PhD, Senior Researcher, Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-9499-8275>. SPIN-code: 5115-4320. E-mail: Guselnicova.Valeriia@yandex.ru.

Elena A. Kolos — Researcher, Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-9643-6831>. SPIN-code: 1479-5992.

Elena S. Petrova — PhD, Senior Researcher, Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0003-0972-8658>. SPIN-code: 3973-1421.

Olga V. Kirik — PhD, Senior Researcher, Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0001-6113-3948>. SPIN-code: 5725-8742.

Dina A. Sufieva — Researcher, Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-0048-2981>. SPIN-code: 3034-3137.

Valeriia A. Razenkova — PhD-student, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-3997-2232>. SPIN-code: 8877-8902.

Mariia V. Antipova — Research Assistant, Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-3853-5671>. SPIN-code: 3607-3630.

Mariia V. Chernysh — student of Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. SPIN-code: 3371-0447.

✉ Контактное лицо / Corresponding author

Валерия Владимировна Гусельникова / Valeriia V. Gusel'nikova
E-mail: Guselnicova.Valeriia@yandex.ru