

УДК 611.813

DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ70770>

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГАМК-ЭРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ И СИНАПТИЧЕСКИХ ТЕРМИНАЛЕЙ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫСЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ К ДВУМ ИЗОФОРМАМ ГЛУТАМАТДЕКАРБОКСИЛАЗЫ

В.А. Разенкова, Д.Э. Коржевский

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Как цитировать: Разенкова В.А., Коржевский Д.Э. Определение ГАМК-эргических нейронов и синаптических терминалей в головном мозге крысы с использованием иммуногистохимической реакции к двум изоформам глутаматдекарбоксилазы // Медицинский академический журнал. 2021. Т. 21. № 2. С. 63–73. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ70770>

Поступила: 18.05.2021

Одобрена: 28.05.2021

Принята: 14.06.2021

Обоснование. Принимая во внимание высокую актуальность изучения ГАМК-эргической системы головного мозга, а также информативность иммуногистохимических подходов в лабораторных исследованиях, представляется важным иметь в распоряжении метод, позволяющий выявлять клетки, синтезирующие ГАМК, их проекции и синапсы, для проведения морфофункционального анализа ГАМК-эргической системы как в норме, так и при моделировании экспериментальной патологии.

Цель — выявление ГАМК-эргических нейронов и синаптических терминалей в головном мозге крысы с использованием трех различных антител к глутаматдекарбоксилазе, а также определение оптимальных условий для постановки иммуногистохимической реакции.

Материалы и методы. Исследование выполняли на парафиновых срезах головного мозга пяти половозрелых крыс породы Вистар. Проводили иммуногистохимическую реакцию с помощью трех видов антител против глутаматдекарбоксилазы изоформ 67 (GAD67) и 65 (GAD65). Были также осуществлены дополнительные контрольные реакции на препаратах головного мозга мыши линии C57/Bl6 и кролика породы Шиншилла.

Результаты. Антитела позволили добиться высокого качества окраски ГАМК-эргических структур при малом уровне фона. Вместе с этим разные типы антител отличаются по эффективности при постановке иммуногистохимической реакции на срезах головного мозга лабораторных животных. При проведении дополнительных контрольных реакций выявлена необходимость адсорбции иммуноглобулинов вторичных реагентов с целью устранения неспецифической реакции при работе с головным мозгом крысы. Наблюдались различия в распределении GAD65 и GAD67 в структурах конечного мозга крысы. Отмечено, что по сравнению с иммуногистохимической реакцией на GAD65 окраска на GAD67 позволяет наиболее полно выявить ГАМК-эргические структуры. Продемонстрирована возможность определения морфологических характеристик ГАМК-эргических нейронов и синаптических терминалей, а также выполнения количественного анализа.

Выводы. Предложенный методический подход позволяет иммуноселективно выявлять ГАМК-эргические структуры центральной нервной системы различных лабораторных животных, что может оказаться полезным как для проведения фундаментальных исследований, так и для изучения заболеваний.

Ключевые слова: гамма-аминомасляная кислота; глутаматдекарбоксилаза; иммуногистохимия; головной мозг.

VISUALISATION OF GABAergic NEURONS AND SYNAPSES IN THE RAT BRAIN USING IMMUNOHISTOCHEMISTRY FOR TWO FORMS OF GLUTAMATE DECARBOXYLASE

Valeria A. Razenkova, Dmitrii E. Korzhevskii

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

To cite this article: Razenkova VA, Korzhevskii DE. Visualisation of GABAergic neurons and synapses in the rat brain using immunohistochemistry for two forms of glutamate decarboxylase. *Medical Academic Journal*. 2021;21(2):63–73. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ70770>

Received: 18.05.2021

Revised: 28.05.2021

Accepted: 14.06.2021

BACKGROUND: Taking into account the importance of GABAergic brain system research and also the opportunity to achieve specific and accurate results in laboratory studies using immunohistochemical approaches, it seems important to have a reliable method of visualization GABA-synthesizing cells, their projections and synapses, for the morphofunctional analysis of GABAergic system both in normal conditions and in the experimental pathology.

AIM: The aim of the study was to visualize GABAergic neurons and synapses within rat's brain using three different antibody types against glutamate decarboxylase and to identify the optimal conditions for reaction performing.

Список сокращений:

ГАМК — гамма-аминомасляная кислота; ЦНС — центральная нервная система; GAD — глутаматдекарбоксилаза (glutamate decarboxylase).

MATERIALS AND METHODS: The study was performed on paraffin brain tissue sections of 5 adult Wistar rats. Immunohistochemical reactions using three antibody types against glutamate decarboxylase isoform 67 (GAD67) and glutamate decarboxylase isoform 65 (GAD65) were performed. Additional controls on C57/Bl6 mice and Chinchilla rabbits brain samples were also carried out.

RESULTS: Antibodies used in the research made it possible to achieve high quality of GABAergic structures visualizing without increasing background staining. At the same time different antibody types are distinct in their efficacy to perform immunohistochemistry reaction on laboratory animal brain tissue samples. By performing additional controls, we discovered that there is necessary to adsorb secondary reagent's immunoglobulins in order to eliminate nonspecific staining. It was found that GAD67 and GAD65 distribution in rat forebrain structures is different. It was stated that GAD67 immunohistochemistry most completely reveals GABAergic brain structures compared to GAD65 immunohistochemistry. The possibility of determining morphological features of GABAergic neurons and synaptic terminals, as well as performing quantitative analysis, was demonstrated.

CONCLUSIONS: The approach proposed makes it possible to specifically visualize GABAergic structures of the central nervous system of different laboratory animals. This could be useful both in fundamental studies and in pathology research.

Keywords: gamma-aminobutyric acid; glutamate decarboxylase; immunohistochemistry; brain.

Обоснование

Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) — один из главных тормозных медиаторов центральной нервной системы (ЦНС), который контролирует практически все ее функции. В частности, ГАМК играет важную роль в регуляции сложных нейронных сетей коры больших полушарий головного мозга. При этом происходит регуляция работы пирамидных глутаматергических нейронов тормозными интернейронами, формирующими ГАМК-эргические синапсы на телах и отростках этих клеток [1–3]. Известно, что ГАМК участвует в патогенезе ряда неврологических расстройств [4–7]. Все больше внимания уделяют изучению роли ГАМК-эргической системы в патогенезе депрессивного расстройства и эпилепсии [8, 9]. В связи с высокой актуальностью изучения ГАМК-эргической системы головного мозга, а также принимая во внимание, что в лабораторных исследованиях иммуногистохимические методы являются важными доказательными элементами, необходимо иметь в распоряжении надежный и легковоспроизводимый метод, позволяющий выявлять клетки, синтезирующие ГАМК, их проекции и синапсы, для морфофункционального анализа ГАМК-эргической системы как в норме, так и при моделировании экспериментальной патологии.

Основным способом иммуногистохимической визуализации медиаторных структур ЦНС считается выявление нейромедиаторов, их везикулярных транспортеров и ферментов синтеза. Поскольку ГАМК может синтезироваться и за пределами нервной системы, применение антител против самого нейромедиатора нельзя считать адекватным методом визуализации ГАМК-эргических структур мозга. В связи с этим предпочтительно иммуногистохимическое выявление транспортеров или ферментов синтеза ГАМК [10].

Ферментом синтеза ГАМК в ЦНС является глутаматдекарбоксилаза (GAD), которая существует в виде двух изоформ — с молекулярной массой 65 кД (GAD65) и 67 кД (GAD67) [11, 12]. Большинство ГАМК-эргических нейронов экспрессирует обе изоформы, при этом GAD67 обнаруживают и в телах, и в отростках нейронов, тогда как GAD65 в основном связана с синаптическими терминалями [13, 14]. Проанализировав публикации последних 10 лет, мы обнаружили, что для выявления ГАМК-эргических структур головного мозга антитела против GAD65 использовали в 24 случаях, против GAD67 — в 53, а против транспортеров — в 13. Таким образом, наибольшее распространение в последнее время получили методы анализа ГАМК-эргической системы с применением антител к ферментам, с помощью которых синтезируется ГАМК в нейронах. В настоящее время существует большой выбор коммерческих антител для выявления GAD, но данных, представленных в аннотации производителя, не всегда достаточно для получения оптимального результата иммуногистохимической реакции [15–18]. Частным случаем является отсутствие реакции в тканях, содержащих исходный антиген [18, 19]. Кроме того, использование моноклональных антител при изучении мозга лабораторных животных подразумевает применение особых приемов, исключающих связывание вторичных реагентов. К примеру, использование мышинных моноклональных антител для работы с мышами и крысами может привести к перекрестным реакциям, вызванным связыванием антимишинных иммуноглобулинов вторичных антител с неспецифическими эпитопами, присутствующими в тканях [20, 21]. Именно поэтому необходимо учитывать, что протоколы работы с тканями разных лабораторных животных могут значительно различаться.

Оптимальная визуализация антигена зависит не только от специфичности антител, но

и от типа ткани, метода фиксации и способа демаскирования. Фиксация может влиять на аффинность антител, поскольку изменяет химические свойства компонентов ткани и трехмерную конформацию белков, что приводит к маскировке эпитопа [20]. Однако процедура демаскирования антигена также не является элементарной задачей. Показано, что не существует универсального способа демаскирования [22], поэтому кажется целесообразным применять разные виды демаскирующих растворов для разных типов антител. В связи с этим при выявлении ГАМК-эргических структур может возникнуть необходимость в модификации методического подхода для минимизации риска возникновения как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов.

Цель исследования состояла в выявлении ГАМК-эргических нейронов и синаптических терминалей в головном мозге крысы с использованием трех различных антител к GAD, а также в определении оптимальных условий для постановки иммуногистохимической реакции.

Материалы и методы

В качестве материала для исследования были использованы срезы головного мозга половозрелых интактных крыс породы Вистар ($n = 5$) из архива лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы Института экспериментальной медицины (Санкт-Петербург). В качестве объекта сравнения применяли срезы головного мозга крыс Вистар на ранних сроках постнатального развития (5-е, 7-е постнатальные сутки), головного мозга мышей линии C57/Bl6 и головного мозга кроликов породы Шиншилла. При содержании и умерщвлении животных руководствовались принципами Базельской декларации о гуманном обращении с животными и правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ № 755 от 12.08.1977 МЗ СССР). Материал фиксирован в цинк-этанол-формальдегиде [23] и залит в парафин по общепринятой методике. Срезы толщиной 5 мкм наклеивали на предметные стекла с адгезивным покрытием Superfrost Ultra Plus (Menzel Gläser, Германия).

Для проверки эффективности иммуногистохимического выявления GAD были использованы моноклональные мышинные антитела к GAD67 (клон К-87, ab26116, Abcam, Великобритания); поликлональные кроличьи антитела к GAD67 (E10260, Spring Bioscience, США) и поликлональные кроличьи антитела

к GAD65 (E3310, Spring Bioscience, США). После депарафинирования препаратов по стандартной методике проводили тепловое демаскирование в модифицированном цитратном буфере (S1700, Agilent, США) и в оригинальном буферном растворе $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (патент № RU 2719163 С1) в течение 22 мин. Для ингибирования эндогенной пероксидазы срезы обрабатывали 3 % водным раствором перекиси водорода в течение 10 мин. Перед нанесением первичных антител срезы обрабатывали блокировочным раствором (ab64226, Abcam, Великобритания) в течение 10 мин. Срезы инкубировали с первичными антителами во влажной камере различное время — от 12 ч до трех суток при температуре 27 °С. При подборе вторичных антител проверяли эффективность реагентов из наборов MACH 2 Mouse HRP Polymer Detection Kit (MHRP520 G, H, L, Biocare Medical, США), MACH 2 Universal HRP Polymer Kit for mouse or rabbit (M2U522 G, H, L, Biocare Medical, США) и Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection Kit (ab236466, Abcam, Великобритания). Продукт реакции выявляли с помощью раствора 3'-диаминобензидина (Thermo Scientific, США). После проведения иммуногистохимических реакций часть срезов докрашивали гематоксилином. После обезвоживания и просветления в ортоксилале («Вектон», Россия) препараты заключали в среду Cytoseal 60 (Richard-Allan Scientific, США). В качестве положительного контроля антигена использовали срезы мозжечка крысы, поскольку известно, что GAD содержится в клетках Пуркинье, корзинках нервных волокон и клубочках мозжечка [24]. При постановке отрицательного контроля на препараты вместо раствора первичных антител наносили раствор для разведения антител Antibody Diluent (Abcam, Великобритания).

Отрицательный контроль показал, что применение наборов MACH 2 Universal HRP, MACH 2 Mouse HRP и Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection Kit (в соответствии с рекомендациями производителя) для исследования срезов мозга крысы неадекватно вследствие перекрестного взаимодействия вторичных антител с иммуноглобулинами крысы. Именно поэтому для устранения неспецифического связывания в растворы добавляли разные виды нормальной крысиной сыворотки [сыворотку крыс породы Вистар, содержащихся в виварии Института экспериментальной медицины, и сыворотки, полученные от Jackson Immunoresearch (012-000-001, Jackson Immunoresearch, США) либо Abcam (ab7488, Abcam, Великобритания)] до конечной концентрации раствора 0,5 %.

При постановке реакции с использованием моноклональных мышинных антител к GAD67 была выбрана инкубация в течение 12 ч (разведение 1 : 1500). Инкубацию во вторичных антителах MACH 2 Mouse HRP Polymer Detection Kit проводили в течение 40 мин при температуре 27 °С. В случае использования поликлональных кроличьих антител к GAD67 (разведение 1 : 600) или GAD65 (разведение 1 : 1000) продолжительность инкубации в первичных антителах составляла трое суток. В качестве вторичных антител возможно применение MACH 2 Universal HRP Polymer Kit с добавлением нормальной крысиной сыворотки (40 мин при температуре 27 °С) или реагента Goat anti-rabbit HRP Conjugate из набора Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection Kit (25 мин при температуре 27 °С).

Анализировали и фотографировали гистологические препараты с помощью микроскопа Leica DM750 и фотокамеры ICC50 (Leica, Германия). Статистический анализ полученных изображений проводили в программах ImageJ [Wayne Rasband (NIH), США] и GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Определяли площадь (area) и количество GAD67-положительных клеток. Для количественной оценки GAD67-положительных клеток во всей изучаемой области производили подсчет по четырем полям зрения при увеличении $\times 40$ для каждого

случая и затем определяли количество на единицу площади (1 мм^2). Данные представляли в виде среднего \pm ошибка среднего. На основании проверки соответствия распределения нормальному по критерию Шапиро – Уилка межгрупповое сравнение значений проводили при помощи непараметрического критерия Манна – Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

На основании проверки различных режимов инкубации, демаскирования и подбора вариантов разведения реагентов были отработаны оптимальные варианты протоколов, которые обеспечили удовлетворительную сохранность структуры нервной ткани и хорошее качество иммуногистохимической реакции. Было выявлено, что при использовании вторичных реагентов, в которые добавляли сыворотку Jackson Immunoresearch, в сочетании с моноклональными мышинными антителами к GAD67 специфическая иммунореактивность снижается. В противоположность этому при применении сыворотки Abscam и сыворотки, полученной от крыс Вистар, наблюдались удовлетворительные результаты иммуногистохимической реакции.

При обработке на препаратах отчетливо выявляются GAD-положительные синаптические терминалы (рис. 1, *a*). При окраске на

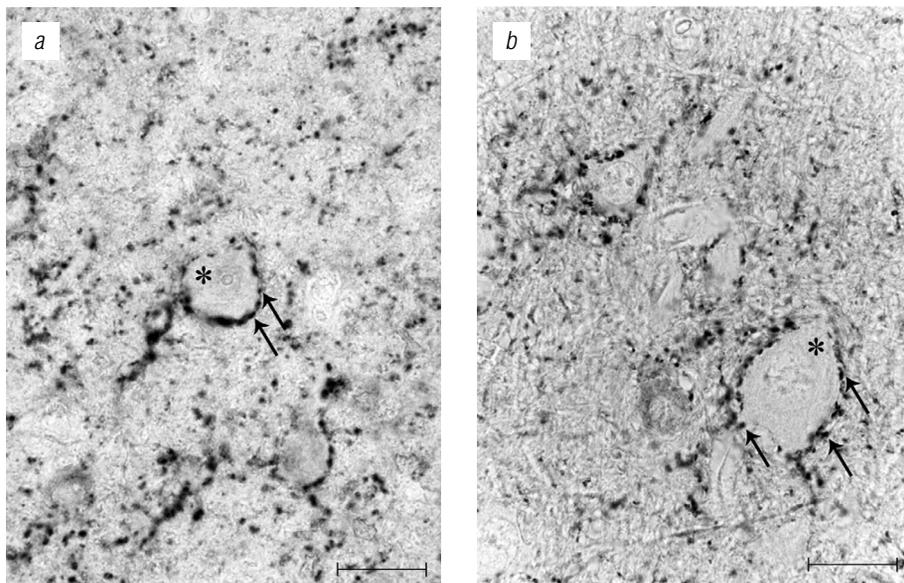


Рис. 1. ГАМК-эргические окончания на пирамидном нейроне коры большого мозга: *a* — головной мозг крысы; иммуногистохимическая реакция на GAD67 с использованием поликлональных кроличьих антител; *b* — головной мозг кролика; иммуногистохимическая реакция на GAD67 с использованием моноклональных мышинных антител. Об. $\times 100$. Стрелки указывают на синаптические терминалы ГАМК-эргических нейронов, звездочка — на пирамидные нейроны

Fig. 1. GABAergic terminals on cortical pyramidal neurons: *a* — Rat forebrain, GAD67 immunocytochemistry with rabbit polyclonal antibodies; *b* — Rabbit forebrain. GAD67 immunocytochemistry with mouse monoclonal antibodies. Ob. $\times 100$. Arrows indicate GABAergic synapses, asterisk shows pyramidal neuron

GAD67 также визуализируются тела клеток. Наименьшая фоновая реакция отмечена при использовании мышиных моноклональных антител к GAD67. На окрашенных с помощью этого вида антител препаратах мозга кролика четко определяются как тела нейронов, так и синаптические терминалы (рис. 1, *b*). Неспецифическое фоновое окрашивание минимально. На препаратах головного мозга мышей, окрашенных с помощью поликлональных кроличьих антител к GAD67 и GAD65, также отчетливо видны ГАМК-эргические структуры. При отработке различных режимов инкубации и разведения антител к GAD65 было установлено, что при разведении ниже 1 : 1000 повышается уровень фона. В этом случае иммуногистохимическая реакция, помимо синаптических терминалов, наблюдается в ядрах клеток подкорковых структур мозга. Однако неспецифическая ядерная реакция может сохраняться и в случае оптимального разведения при работе с лабораторными животными других возрастов. На препаратах головного мозга крыс в возрасте 5 и 7 сут, обработанных по описанному протоколу, также отмечено связывание антител к GAD65 с неспецифическими ядерными эпитопами, приводящее к фоновому окрашиванию. Что касается выбора способа демаскирования, то оба раствора, использованных в настоящем исследовании, оказались пригодны для теплового демаскирования антигена и обеспечивают сопоставимые результаты иммуногистохимического окрашивания.

Распределение GAD65 и GAD67 в коре и подкорковых структурах головного мозга различно (рис. 2). При малом увеличении можно увидеть, что GAD65 распределена равномерно по всем зонам серого вещества коры и в caudate-putamen. Усиленная реакция наблюдается в I слое коры, на вентральной поверхности мозга в области гипоталамуса и в *globus pallidus*. Неравномерное окрашивание характерно для септалной зоны головного мозга, причем наибольшая интенсивность отмечена в прилегающих к боковым желудочкам областях латерального септалного ядра.

Изучение препаратов при малом увеличении показало, что реакция на GAD67 позволяет хорошо выявить II–III и V слои соматосенсорной коры, а также II–V слои цингулярной. В двигательной коре обнаруживается относительно равномерное распределение GAD-положительных структур. Сравнительно низкая интенсивность иммуногистохимической реакции наблюдается в инсулярной и пириформной коре. В обонятельном бугорке интенсивность окрашивания выше за счет скоплений крупных ГАМК-эргических терминалов. Значительной

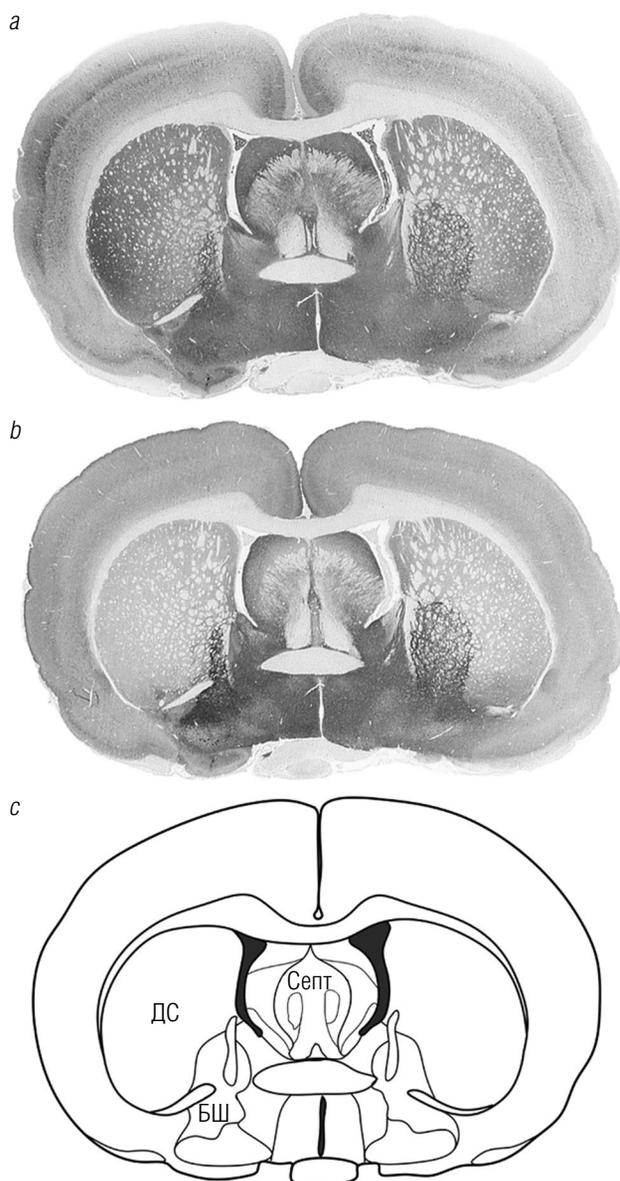


Рис. 2. Глутаматдекарбоксилаза в структурах конечного мозга крысы. Фронтальные срезы на уровне $-0,4$ мм от Брегмы: *a* — распределение GAD67; *b* — распределение GAD65; *c* — схема структур конечного мозга. ДС — дорсальный стриатум (хвостатое ядро и скорлупа); БШ — бледный шар; Септ — септалная зона

Fig. 2. GAD distribution in rat forebrain structures. Frontal slices at -0.4 mm from Bregma: *a* — GAD67 distribution; *b* — GAD65 distribution; *c* — Scheme of forebrain structures. ДС — dorsal striatum (caudate nucleus and putamen), БШ — globus pallidus, Септ — septum

разницы в распределении GAD67 в структурах базальных ганглиев не выявлено. Интенсивная окраска ГАМК-эргических структур латерального септалного ядра при применении антител против GAD65 характерна и для GAD67. Было также замечено, что при использовании поликлональных антител апикальная часть эпителиоцитов сосудистого сплетения дает интенсивную реакцию на GAD67. Постановка

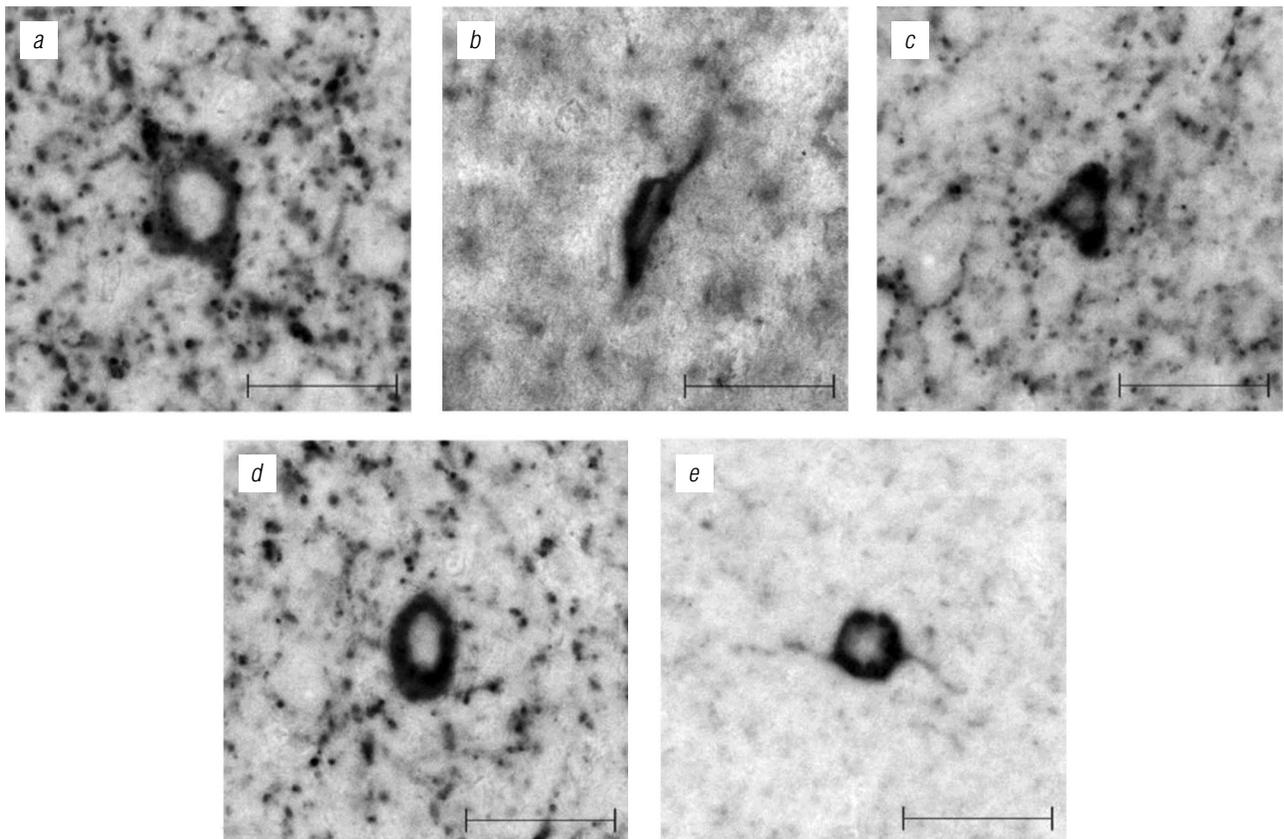


Рис. 3. ГАМК-эргические нейроны в коре головного мозга крыс: *a* — звездчатый нейрон; *b* — веретеновидный нейрон; *c* — треугольный нейрон; *d* — овальный нейрон; *e* — круглый нейрон. Об. $\times 100$

Fig. 3. GABAergic neurons in rat cortex: *a* — stellate cell; *b* — fusiform cell; *c* — triangle cell; *d* — oval cell; *e* — round cell. Ob. $\times 100$

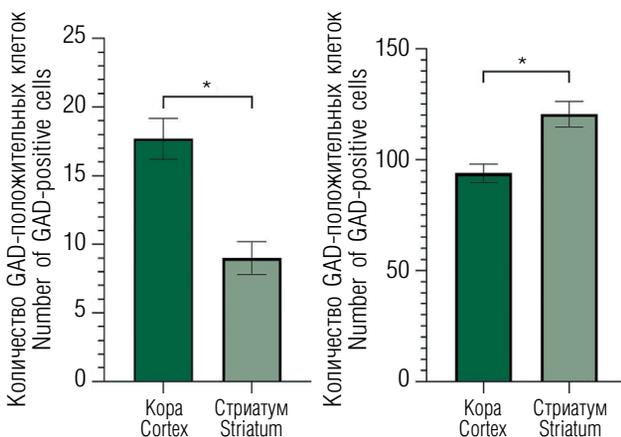


Рис. 4. Количественная оценка ГАМК-эргических интернейронов в стриатуме и коре головного мозга крыс: *a* — число ГАМК-эргических нейронов разных областей мозга; *b* — площадь ГАМК-эргических нейронов разных областей мозга. *статистически значимые различия показателей ($p < 0,001$)

Fig. 4. Quantitative analysis of GABAergic interneurons in rat cortex and striatum: *a* — Number of GABAergic neurons in different forebrain areas; *b* — GABAergic neurons area in diverse forebrain structures. *significant difference in parameters ($p < 0.001$)

отрицательного контроля показала, что реакция не является следствием неспецифического фоновое связывания вторичных реагентов. Однако при применении мышиных моноклональных антител к GAD67 иммуногистохимическая реакция в этой области не развивалась.

При большом увеличении можно увидеть, что как GAD65-, так и GAD67-положительные терминалы в коре в основном сконцентрированы на пирамидных нейронах (см. рис. 1). При иммуногистохимической реакции на GAD67 окрашиваются тела, но не ядра клеток. Тела GAD-иммунопозитивных нейронов коры разнообразны по форме и размеру. В различных слоях коры выявляют веретеновидные, звездчатые, треугольные, овальные и круглые нейроны (рис. 3). Примечательно, что для I слоя коры наиболее характерны некрупные круглые клетки (представлен на рис. 3, *d*). Площадь тел GAD-положительных нейронов коры варьирует от 40,1 до 195,6 μm^2 и в среднем равняется $93,86 \pm 4,19 \mu\text{m}^2$. В среднем количество тел ГАМК-эргических нейронов в коре насчитывает $17,7 \pm 1,5$ клетки на 1 мм^2 . Для ГАМК-эргических нейронов стриатума эти значения составляют 41,7; 228,2; $120,6 \pm 5,7 \mu\text{m}^2$

и $9,0 \pm 1,2$ клетки на 1 мм^2 соответственно (рис. 4). Статистический анализ позволил выявить различия количественных показателей ГАМК-эргических нейронов коры по сравнению со стриатумом (U -test, $p \leq 0,001$).

Обсуждение

При исследовании препаратов было отмечено, что GAD65 выявляют только в синаптических терминалах. Подобное распределение GAD этой изоформы ранее описано в литературе при использовании других антител к GAD65 [13]. Сравнение результатов исследований позволяет заключить, что антитела действительно помогают выявить GAD65. Обнаруженная с помощью антител к GAD65 при разведении ниже 1 : 1000 (что в 20 раз превышает разведение, заявленное производителем) ядерная локализация антигена нехарактерна для фермента, которым является GAD65, а также не упоминается ни в литературе [13, 25], ни в аннотации производителя. По этой причине, поскольку антитела к GAD67 не менее эффективно, чем антитела к GAD65, маркируют ГАМК-эргические терминалы, необходимость использования в исследованиях антител к обоим изоформам отсутствует. Вследствие этого для изучения ГАМК-эргических структур ЦНС рекомендовано применять антитела против GAD67, так как, в отличие от GAD65, эта изоформа фермента также присутствует в телах ГАМК-эргических клеток.

Различная морфология в коре интернейронов объясняется высоким разнообразием типов ГАМК-эргических интернейронов, классификация которых является одним из актуальных вопросов современной нейробиологии [26, 27]. Наблюдаемые в коре формы тел клеток соответствуют классической морфологической классификации ГАМК-эргических нейронов [28]. Разнообразные типы интернейронов, по всей видимости, обеспечивают четкую регуляцию активности глутаматергических пирамидных нейронов, которые служат основными эфферентами коры головного мозга [3, 29]. Представлениям о регуляции функций этих клеток разными классами корковых тормозных интернейронов соответствует наличие большого числа ГАМК-эргических синапсов на пирамидных нейронах коры. Это достигается, во-первых, за счет того, что разные типы интернейронов иннервируют не только различные клетки, но и части тел и отростки этих клеток [3, 30]. Во-вторых, электрофизиологические особенности отдельных типов ГАМК-эргических нейронов обеспечивают разную частоту потенциалов действия [31, 32].

Не последнюю роль в регуляции корковых сетей играет избирательная регуляция активности самих интернейронов [33–35]. Таким образом, ГАМК-эргические интернейроны в различных слоях и зонах коры благодаря обработке и передаче входящей информации оказываются важным компонентом, обеспечивающим нормальное функционирование головного мозга.

В нашей предыдущей работе было показано, что использование сходной методики в морфометрических исследованиях позволяет получить детальную информацию о достаточно мелких тормозных структурах головного мозга [36]. В настоящем исследовании также продемонстрировано, что применяемая методика позволяет выявлять нейроны малого размера, которые невозможно идентифицировать с помощью других методов окраски, в том числе окраски по Нисслию. В связи с тем что нарушение баланса возбуждения и торможения приводит к дезорганизации работы сетей ЦНС, что способствует развитию многих заболеваний, предполагается, что предложенный методический подход можно использовать при исследовании патологий, связанных с дисфункцией ГАМК-эргической системы. При этом, поскольку при малом увеличении наблюдается неодинаковая интенсивность окрашивания областей мозга, применение антител против GAD позволяет изучать анатомические особенности распределения ГАМК-эргических структур конечного мозга. Однако необходимо учитывать, что распределение разных изоформ GAD в головном мозге несколько различно.

Поскольку при проведении иммуногистохимической реакции и на GAD65, и на GAD67 не выявляются отростки клеток на всем их протяжении, морфологическая оценка ГАМК-эргических нейронов затруднена. Это отличает GAD от других широко используемых ферментативных маркеров нейронов: тирозингидроксилазы и холинацетилтрансферазы, которые распределены равномерно по цитоплазме клетки [37].

Дискуссионным остается вопрос о локализации GAD67 в сосудистом сплетении. Вследствие того что, в отличие от поликлональных антител, моноклональные антитела не позволяют выявить фермент в апикальной части эпителиоцитов, можно сделать противоположные предположения. С одной стороны, возможно, что в сосудистом сплетении действительно присутствует GAD67, эпителиоцит которого не соответствует паратопу антител клона К-87. При этом поликлональные антитела связываются с антигеном вследствие специфичности такого реагента не к одной, а к нескольким антигенным детерминантам. Это предположение косвенно

подтверждается, поскольку локализация антигена в области сосудистого сплетения при окрашивании антисывороткой была сравнима с экспрессией мРНК GAD67 в этой области при гибридизации *in situ* (как можно заметить в работе Эндрюса и соавт. [38]). Несколько менее вероятным может быть отсутствие GAD67 в сосудистом сплетении. Известно, что неспецифические взаимодействия между первичными антителами и другими антигенами могут возникать из-за наличия общих эпитопов. Возможно, что в апикальной части эпителиоцитов есть антигенные детерминанты, на которые реагируют часть паратопов, присутствующих у поликлональных антител и отсутствующих у моноклональных.

Показано, что данная методика позволяет проводить количественный анализ. Применение количественного анализа в совокупности с оценкой интенсивности реакции может дать представление о функциональном состоянии ЦНС. При проведении подобного исследования очень важным представляется использование иммуногистохимических подходов, характеризующихся отсутствием или минимальным фоновым окрашиванием сыворотки, что могло бы повлиять на результаты эксперимента. Именно поэтому с учетом проделанной работы можно заключить, что: 1) для исследований на мышцах подходят кроличьи антитела; 2) при использовании кроликов приоритетными являются мышечные антитела; 3) несмотря на то что для крыс возможно использование как мышечных, так и кроличьих антител, при применении мышечных первичных антител необходима адсорбция иммунореактивности близкородственных иммуноглобулинов мышечной и крысы в исходных вторичных реагентах.

Выводы

Таким образом, все использованные антитела позволяют добиться высокого качества окраски ГАМК-эргических структур при малом уровне фона.

1. Антитела против GAD67 являются наиболее удобным маркером ГАМК-эргических структур головного мозга (в сравнении с GAD65).
2. Описанная методика позволяет определять морфологические характеристики ГАМК-эргических нейронов и их синаптических терминалей и может быть использована для исследования заболеваний.
3. Продемонстрирована возможность количественного анализа.
4. Использование антител против GAD удобно для проведения нейроанатомических

исследований, поскольку в результате иммуногистохимической реакции структуры головного мозга дифференциально окрашиваются.

5. Несмотря на то что моноклональные мышечные антитела к GAD67 характеризуются меньшим фоновым окрашиванием по сравнению с поликлональными кроличьими антителами, их использование представляется менее удобным в связи с необходимостью адсорбции иммуноглобулинов вторичных реагентов для устранения неспецифической реакции при работе с головным мозгом крысы.
6. Результаты контрольных реакций указывают на то, что кроличьи антитела против GAD67 удобны для исследования ГАМК-эргических структур головного мозга как крысы, так и мышцы. В противоположность этому мышечные антитела против GAD67 дают хорошие результаты при постановке иммуногистохимической реакции на парафиновых срезах мозга кролика.

Дополнительная информация

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины».

Соблюдение этических норм. При проведении исследования были соблюдены все международные принципы использования животных. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (заключение № 1/20 от 27.02.2020).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов. В.А. Разенкова — сбор и обработка материалов, анализ полученных данных, статистическая обработка, написание текста. Д.Э. Коржевский — концепция и дизайн исследования, анализ полученных данных, написание текста.

Список литературы

1. Gerfen C.R., Economo M.N., Chandrashekar J. Long distance projections of cortical pyramidal neurons // J. Neurosci. Res. 2018. Vol. 96, No. 9. P. 1467–1475. DOI: 10.1002/jnr.23978
2. Xu Q., Cobos I., De La Cruz E. et al. Origins of cortical interneuron subtypes // J. Neurosci. 2004. Vol. 24, No. 11. P. 2612–2622. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5667-03.2004
3. Kubota Y. Untangling GABAergic wiring in the cortical microcircuit // Curr. Opin. Neurobiol. 2014. No. 26. P. 7–14. DOI: 10.1016/j.conb.2013.10.003
4. Kimoto S., Bazmi H.H., Lewis D.A. Lower expression of glutamic acid decarboxylase 67 in the prefrontal cor-

- tex in schizophrenia: contribution of altered regulation by Zif268 // *Am. J. Psychiatry*. 2014. Vol. 171, No. 9. P. 969–978. DOI: 10.1176/appi.ajp.2014.14010004
5. LeWitt P.A., Rezaei A.R., Leehey M.A. et al. AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial // *Lancet Neurol*. 2011. Vol. 10, No. 4. P. 309–319. DOI: 10.1016/S1474-4422(11)70039-4
 6. McQuail J.A., Frazier C.J., Bizon J.L. Molecular aspects of age-related cognitive decline: the role of GABA signaling // *Trends Mol. Med*. 2015. Vol. 21, No. 7. P. 450–460. DOI: 10.1016/j.molmed.2015.05.002
 7. Seney M.L., Tripp A., McCune S. et al. Laminar and cellular analyses of reduced somatostatin gene expression in the subgenual anterior cingulate cortex in major depression // *Neurobiol. Dis*. 2015. No. 73. P. 213–219. DOI: 10.1016/j.nbd.2014.10.005
 8. Duman R.S., Sanacora G., Krystal J.H. Altered connectivity in depression: GABA and glutamate neurotransmitter deficits and reversal by novel treatments // *Neuron*. 2019. Vol. 102, No. 1. P. 75–90. DOI: 10.1016/j.neuron.2019.03.013
 9. Силькис И.Г. Роль ацетилхолина и ГАМК-торможения в генерации судорожной активности в нейронных сетях, объединяющих новую кору, гиппокамп, базальные ганглии и таламус // *Нейрохимия*. 2020. Т. 37, № 2. С. 106–124. DOI: 10.31857/S1027813320020120
 10. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии / под ред. Д.Э. Коржевского. 2-е изд. Санкт-Петербург, 2014.
 11. Martin D.L., Liu H., Martin S.B., Wu S.J. Structural features and regulatory properties of the brain glutamate decarboxylases // *Neurochem. Int*. 2000. Vol. 37, No. 2–3. P. 111–119. DOI: 10.1016/s0197-0186(00)00014-0
 12. Petroff O.A. GABA and glutamate in the human brain // *Neuroscientist*. 2002. Vol. 8, No. 6. P. 562–573. DOI: 10.1177/1073858402238515
 13. Kaufman D.L., Houser C.R., Tobin A.J. Two forms of the gamma-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions // *J. Neurochem*. 1991. Vol. 56, No. 2. P. 720–723. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1991.tb08211.x
 14. Pinal C.S., Tobin A.J. Uniqueness and redundancy in GABA production // *Perspect. Dev. Neurobiol*. 1998. Vol. 5, No. 2–3. P. 109–118.
 15. Saper C.B. A guide to the perplexed on the specificity of antibodies // *J. Histochem. Cytochem*. 2009. Vol. 57, No. 1. P. 1–5. DOI: 10.1369/jhc.2008.952770
 16. Коржевский Д.Э., Отеллин В.А., Григорьев И.П. и др. Иммуноцитохимическое выявление нейрональной NO-синтазы в клетках головного мозга крысы // *Морфология*. 2007. Т. 2, № 4. С. 77–80.
 17. Weller M.G. Quality Issues of Research Antibodies // *Anal. Chem. Insights*. 2016. No. 11. P. 21–27. DOI: 10.4137/ACI.S31614
 18. Bordeaux J., Welsh A., Agarwal S. et al. Antibody validation // *Biotechniques*. 2010. Vol. 48, No. 3. P. 197–209. DOI: 10.2144/000113382
 19. Кирик О.В., Григорьев И.П., Сухорукова Е.Г. и др. Использование методов иммуногистохимии для определения границы между субвентрикулярной зоной и стриатумом // *Морфология*. 2012. Т. 141, № 1. P. 81–84.
 20. Fritschy J.M. Is my antibody-staining specific? How to deal with pitfalls of immunohistochemistry // *Eur. J. Neurosci*. 2008. Vol. 28, No. 12. P. 2365–2370. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2008.06552.x
 21. Ward J.M., Rehg J.E. Rodent immunohistochemistry: pitfalls and troubleshooting // *Vet. Pathol*. 2014. Vol. 51, No. 1. P. 88–101. DOI: 10.1177/0300985813503571
 22. Gown A.M. Diagnostic immunohistochemistry: What can go wrong and how to prevent it // *Arch. Pathol. Lab. Med*. 2016. Vol. 140, No. 9. P. 893–898. DOI: 10.5858/arpa.2016-0119-RA
 23. Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Kirik O.V., Grigorev I.P. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde // *Eur. J. Histochem*. 2015. Vol. 59, No. 3. P. 5–9. DOI: 10.4081/ejh.2015.2530
 24. Greif K.F., Erlander M.G., Tillakaratne N.J., Tobin A.J. Postnatal expression of glutamate decarboxylases in developing rat cerebellum // *Neurochem. Res*. 1991. Vol. 16, No. 3. P. 235–242. DOI: 10.1007/BF00966086
 25. Martin D.L., Rimvall K. Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain // *J. Neurochem*. 1993. Vol. 60, No. 2. P. 395–407. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1993.tb03165.x
 26. Mucoz-Manchado A.B., Bengtsson Gonzales C., Zeisel A. et al. Diversity of interneurons in the dorsal striatum revealed by single-cell RNA sequencing and Patch-Seq // *Cell. Rep*. 2018. Vol. 24, No. 8. P. 2179–2190.e7. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.07.053
 27. Lim L., Mi D., Llorca A., Marín O. Development and functional diversification of cortical interneurons // *Neuron*. 2018. Vol. 100, No. 2. P. 294–313. DOI: 10.1016/j.neuron.2018.10.009
 28. Petilla Interneuron Nomenclature Group; Ascoli G.A., Alonso-Nanclares L., Anderson S.A. et al. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex // *Nat. Rev. Neurosci*. 2008. Vol. 9, No. 7. P. 557–568. DOI: 10.1038/nrn2402
 29. Feldmeyer D., Qi G., Emmenegger V., Staiger J.F. Inhibitory interneurons and their circuit motifs in the many layers of the barrel cortex // *Neuroscience*. 2018. Vol. 368. P. 132–151. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2017.05.027
 30. Tremblay R., Lee S., Rudy B. GABAergic interneurons in the neocortex: From cellular properties to circuits // *Neuron*. 2016. Vol. 91, No. 2. P. 260–292. DOI: 10.1016/j.neuron.2016.06.033
 31. Зайцев А.В. Классификация и функции ГАМК-эргических интернейронов новой коры млекопитающих // *Биологические мембраны*. 2013. Т. 30, № 4. С. 253–270. DOI: 10.7868/S0233475513040099
 32. Markram H., Toledo-Rodriguez M., Wang Y. et al. Interneurons of the neocortical inhibitory system // *Nat. Rev. Neurosci*. 2004. Vol. 5, No. 10. P. 793–807. DOI: 10.1038/nrn1519
 33. Wang J., Tian Y., Zeng L.H., Xu H. Prefrontal disinhibition in social fear: A vital action of somatostatin interneurons // *Front. Cell. Neurosci*. 2020. Vol. 14. P. 611732. DOI: 10.3389/fncel.2020.611732

34. Guet-McCreight A., Skinner F.K., Topolnik L. Common principles in functional organization of VIP/calretinin cell-driven disinhibitory circuits across cortical areas // *Front. Neural. Circuits*. 2020. Vol. 14. P. 32. DOI: 10.3389/fncir.2020.00032
35. Bereshpolova Y., Hei X., Alonso J.M., Swadlow H.A. Three rules govern thalamocortical connectivity of fast-spike inhibitory interneurons in the visual cortex // *Elife*. 2020. Vol. 9. P. e60102. DOI: 10.7554/eLife.60102
36. Разенкова В.А., Коржевский Д.Э. ГАМК-эргические аксосоматические синапсы нейронов коры головного мозга крысы // *Цитология*. 2020. Т. 62, № 11. С. 815–821. DOI: 10.31857/S0041377120110097
37. Колос Е.А., Коржевский Д.Э. Неоднородность реакции на холинацетилтрансферазу в холинергических нейронах // *Нейрохимия*. – 2016. – Т. 33. – № 1. – С. 56–62.
38. Andrews W.D., Barber M., Nemitz M. et al. Semaphorin3A-neuropilin1 signalling is involved in the generation of cortical interneurons // *Brain. Struct. Funct.* 2017. Vol. 222, No. 5. P. 2217–2233. DOI: 10.1007/s00429-016-1337-3
10. Theoretical bases and practical applications of methods of immunohistochemistry. 2nd ed. Ed. by D.E. Korzhevskiy. Saint Petersburg; 2014. (In Russ.)
11. Martin DL, Liu H, Martin SB, Wu SJ. Structural features and regulatory properties of the brain glutamate decarboxylases. *Neurochem Int.* 2000;37(2–3):111–119. DOI: 10.1016/s0197-0186(00)00014-0
12. Petroff OA. GABA and glutamate in the human brain. *Neuroscientist*. 2002;8(6):562–573. DOI: 10.1177/1073858402238515
13. 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. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1991.tb08211.x
14. Pinal CS, Tobin AJ. Uniqueness and redundancy in GABA production. *Perspect Dev Neurobiol.* 1998;5(2–3):109–118.
15. Saper CB. A guide to the perplexed on the specificity of antibodies. *J Histochem Cytochem.* 2009;57(1):1–5. DOI: 10.1369/jhc.2008.952770
16. Korzhevskii DE, Otellin VA, Grigor'ev IP, et al. Immunocytochemical detection of neuronal NO synthase in rat brain cells. *Neurosci Behav Physiol.* 2008;38(8):835–838. DOI: 10.1007/s11055-008-9063-9
17. Weller MG. Quality Issues of Research Antibodies. *Anal Chem Insights.* 2016;11:21–27. DOI: 10.4137/ACI.S31614
18. Bordeaux J, Welsh A, Agarwal S, et al. Antibody validation. *Bio-techniques.* 2010;48(3):197–209. DOI: 10.2144/000113382
19. Kirik OV, Grigoriev IP, Sukhorukova EG, et al. Use of immunocytochemical methods to identify the boundaries between the subventricular zone of the telencephalon and the striatum. *Neurosci Behav Physiol.* 2013;43(2):157–159. DOI: 10.1007/s11055-013-9708-1
20. Fritschy JM. Is my antibody-staining specific? How to deal with pitfalls of immunohistochemistry. *Eur J Neurosci.* 2008;28(12):2365–2370. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2008.06552.x
21. Ward JM, Rehg JE. Rodent immunohistochemistry: pitfalls and troubleshooting. *Vet Pathol.* 2014;51(1):88–101. DOI: 10.1177/0300985813503571
22. Gown AM. Diagnostic immunohistochemistry: What can go wrong and how to prevent it. *Arch Pathol Lab Med.* 2016;140(9):893–898. DOI: 10.5858/arpa.2016-0119-RA
23. Korzhevskii DE, Sukhorukova EG, Kirik OV, Grigoriev IP. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde. *Eur J Histochem.* 2015;59(3):5–9. DOI: 10.4081/ejh.2015.2530
24. Greif KF, Erlander MG, Tillakaratne NJ, Tobin AJ. Postnatal expression of glutamate decarboxylases in developing rat cerebellum. *Neurochem Res.* 1991;16(3):235–242. DOI: 10.1007/BF00966086
25. Martin DL, Rimvall K. Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain. *J Neurochem.* 1993;60(2):395–407. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1993.tb03165.x
26. Mucoz-Manchado AB, Bengtsson Gonzales C, Zeisel A, et al. Diversity of interneurons in the dorsal striatum revealed by single-cell RNA sequencing and PatchSeq. *Cell Rep.* 2018;24(8):2179–2190.e7. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.07.053
27. Lim L, Mi D, Llorca A, Marín O. Development and functional diversification of cortical interneurons. *Neuron.* 2018;100(2):294–313. DOI: 10.1016/j.neuron.2018.10.009

References

1. Gerfen CR, Economo MN, Chandrashekar J. Long distance projections of cortical pyramidal neurons. *J Neurosci Res.* 2018;96(9):1467–1475. DOI: 10.1002/jnr.23978
2. Xu Q, Cobos I, De La Cruz E, et al. Origins of cortical interneuron subtypes. *J Neurosci.* 2004;24(11):2612–2622. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5667-03.2004
3. Kubota Y. Untangling GABAergic wiring in the cortical microcircuit. *Curr Opin Neurobiol.* 2014;26:7–14. DOI: 10.1016/j.conb.2013.10.003
4. Kimoto S, Bazmi HH, Lewis DA. Lower expression of glutamic acid decarboxylase 67 in the prefrontal cortex in schizophrenia: contribution of altered regulation by Zif268. *Am J Psychiatry.* 2014;171(9):969–978. DOI: 10.1176/appi.ajp.2014.14010004
5. LeWitt PA, Rezai AR, Leehey MA, et al. AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *Lancet Neurol.* 2011;10(4):309–319. DOI: 10.1016/S1474-4422(11)70039-4
6. McQuail JA, Frazier CJ, Bizon JL. Molecular aspects of age-related cognitive decline: the role of GABA signaling. *Trends Mol Med.* 2015;21(7):450–460. DOI: 10.1016/j.molmed.2015.05.002
7. Seney ML, Tripp A, McCune S, et al. Laminar and cellular analyses of reduced somatostatin gene expression in the subgenual anterior cingulate cortex in major depression. *Neurobiol Dis.* 2015;73:213–219. DOI: 10.1016/j.nbd.2014.10.005
8. Duman RS, Sanacora G, Krystal JH. Altered connectivity in depression: GABA and glutamate neurotransmitter deficits and reversal by novel treatments. *Neuron.* 2019;102(1):75–90. DOI: 10.1016/j.neuron.2019.03.013
9. Silkis IG. Role of acetylcholine and GABAergic inhibitory transmission in seizure pattern generation in neural networks integrating the neocortex, hippocampus, basal ganglia, and thalamus. *Neurokhimiya.* 2020;37(2):106–124. (In Russ.). DOI: 10.31857/s1027813320020120

28. Petilla Interneuron Nomenclature Group; Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, et al. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9(7):557–568. DOI: 10.1038/nrn2402
29. Feldmeyer D, Qi G, Emmenegger V, Staiger JF. Inhibitory interneurons and their circuit motifs in the many layers of the barrel cortex. *Neuroscience.* 2018;368:132–151. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2017.05.027
30. Tremblay R, Lee S, Rudy B. GABAergic interneurons in the neocortex: From cellular properties to circuits. *Neuron.* 2016;91(2):260–292. DOI: 10.1016/j.neuron.2016.06.033
31. Zaitsev AV. Classification and functions of GABAergic interneurons of the mammalian new cortex. *Biologicheskie membrany.* 2013;30(4):253–270. (In Russ.). DOI: 10.7868/S0233475513040099
32. Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, et al. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci.* 2004;5(10):793–807. DOI: 10.1038/nrn1519
33. Wang J, Tian Y, Zeng LH, Xu H. Prefrontal disinhibition in social fear: A vital action of somatostatin interneurons. *Front Cell Neurosci.* 2020;14:611732. DOI: 10.3389/fncel.2020.611732
34. Guet-McCreight A, Skinner FK, Topolnik L. Common principles in functional organization of VIP/calretinin cell-driven disinhibitory circuits across cortical areas. *Front Neural Circuits.* 2020;14:32. DOI: 10.3389/fncir.2020.00032
35. Bereshpolova Y, Hei X, Alonso JM, Swadlow HA. Three rules govern thalamocortical connectivity of fast-spike inhibitory interneurons in the visual cortex. *Elife.* 2020;9:e60102. DOI: 10.7554/eLife.60102
36. Razenkova VA, Korzhevskii DE. GABAergic axosomatic synapses of rat cortical neurons. *Tsitologiya.* 2020;62(11):815–821. (In Russ.). DOI: 10.31857/s0041377120110097
37. Kolos EA, Korzhevskii DA. Heterogeneous choline acetyltransferase staining in cholinergic neurons. *Neurochem J.* 2016;10(1):47–52. DOI: 10.1134/S1819712416010104
38. Andrews WD, Barber M, Nemitz M, et al. Semaphorin3A-neuropilin1 signalling is involved in the generation of cortical interneurons. *Brain Struct Funct.* 2017;222(5):2217–2233. DOI: 10.1007/s00429-016-1337-3

Информация об авторах / Information about the authors

Валерия Алексеевна Разенкова — аспирант, младший научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы Отдела общей и частной морфологии. ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3997-2232>; eLibrary SPIN: 8877-8902; Scopus Author ID: 57219609984; ResearcherId: AAH-1333-2021; e-mail: valeriya.raz@yandex.ru.

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, Россия. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2456-8165>; eLibrary SPIN: 3252-3029; Scopus Author ID: 12770589000; e-mail: DEK2@yandex.ru.

Valeria A. Razenkova — Postgraduate student, Junior 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. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3997-2232>; eLibrary SPIN: 8877-8902; Scopus Author ID: 57219609984; ResearcherId: AAH-1333-2021; e-mail: valeriya.raz@yandex.ru.

Dmitrii E. Korzhevskii — MD, PhD, DSc (Medicine), 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. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2456-8165>; eLibrary SPIN: 3252-3029; Scopus Author ID: 12770589000; e-mail: DEK2@yandex.ru.

✉ Контактное лицо / Corresponding author

Валерия Алексеевна Разенкова / Valeria A. Razenkova
E-mail: valeriya.raz@yandex.ru