

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.628591>

Вторичные реагенты для иммуногистохимического исследования головного мозга крысы

В.А. Разенкова, В.С. Павлова

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Одним из ключевых факторов получения наглядных и верифицируемых результатов иммуногистохимического окрашивания при работе с тканями лабораторных животных является подбор надёжных вторичных реагентов, позволяющих чётко визуализировать изучаемые антигены в тканях и клетках. Многие зарекомендовавшие себя наборы вторичных антител в настоящее время недоступны к приобретению, что определяет актуальность поиска новых систем детекции для их замены.

Цель исследования — проверка эффективности использования доступных вторичных реагентов для иммуногистохимического исследования головного мозга крысы.

Материалы и методы. Использовали образцы головного мозга крыс линий Вистар ($n=2$) и SHR ($n=2$). Иммуногистохимическое выявление белков Iba-1, GFAP и виментина проводили с применением различных систем детекции на основе биополимеров (UltraVision Quanto Detection System HRP, N-Histofine Simple Stain MAX PO и UnoVue Rabbit HRP).

Результаты. Все три исследуемых набора продемонстрировали выявление белков-мишеней в тканях и клетках головного мозга, соответствующих общим представлениям о структурах, которые должны содержать Iba-1, GFAP и виментин. Наборы вторичных реагентов UnoVue Rabbit HRP и UltraVision Quanto Detection System HRP показали удовлетворительные результаты при иммуногистохимической реакции и оказались сходными по степени специфичности. При этом набор UnoVue Rabbit HRP отличался меньшей чувствительностью по сравнению с UltraVision Quanto Detection System HRP. Специфичность реакции с применением N-Histofine Simple Stain MAX PO не является оптимальной в связи с наличием фона, отсутствующего при использовании других реагентов. По-видимому, это связано с направленностью набора на иммуногистохимическое окрашивание срезов тканей человека и вероятным отсутствием этапа очистки антител с применением крысиной сыворотки.

Заключение. Два набора вторичных реагентов из трёх исследуемых отличаются оптимальной эффективностью при минимальном уровне фона. Реагент N-Histofine Simple Stain MAX PO для иммуногистохимического исследования срезов мозга крысы непригоден.

Ключевые слова: специфичность антител; иммуногистохимия; крысы.

Как цитировать:

Разенкова В.А., Павлова В.С. Вторичные реагенты для иммуногистохимического исследования головного мозга крысы // Морфология. 2023. Т. 161, № 3. С. 89–96. DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.628591>

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.628591>

Secondary reagents for immunohistochemical research of rat brain

Valeria A. Razenkova, Valeria S. Pavlova

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: The critical factor when working with immunohistochemistry in laboratory animals is to select appropriate secondary antibodies, that allow clear and specific visualization of tissue antigens. Many reliable secondary reagents are currently not available for purchase, which determines the high relevance of replacing them with other detection systems.

AIM: To verify the effectiveness of available secondary reagents for immunohistochemical research of the rat brain.

MATERIALS AND METHODS: Brain samples from Wistar ($n=2$) and SHR ($n=2$) were used for the study. Iba-1, GFAP and vimentin immunohistochemistry was carried out using various polymer-based detection systems, namely UltraVision Quanto Detection System HR, N-Histofine Simple Stain MAX PO and UnoVue Rabbit HRP.

RESULTS: All three studied polymer systems demonstrated visualisation of target proteins in brain tissues and cells corresponding to the general understanding of structures containing Iba-1, GFAP and vimentin. The UnoVue Rabbit HRP and UltraVision Quanto Detection System HRP kits showed good and similarly specific immunohistochemical reaction. However, the UnoVue Rabbit HRP kit was less sensitive compared to the UltraVision Quanto Detection System HRP. The reaction with N-Histofine Simple Stain MAX PO was not optimal due to the presence of non-specific background staining that was not present with other reagents. Apparently, this is due to the focus of the kit on immunohistochemical staining of human tissue and the likely absence of an antibody purification with rat serum.

CONCLUSIONS: Two secondary antibody kits from the three studied showed optimal efficiency of immunohistochemical reaction and minimal background staining. N-Histofine Simple Stain MAX PO is not suitable for immunohistochemical research of rat brain tissue.

Keywords: antibody specificity; immunohistochemistry; laboratory rats.

To cite this article:

Razenkova VA, Pavlova VS. Secondary reagents for immunohistochemical research of rat brain. *Morphology*. 2023;161(3):89–96. DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.628591>

Received: 04.03.2024

Accepted: 09.04.2024

Published: 15.04.2024

ОБОСНОВАНИЕ

Специфика иммуногистохимического окрашивания заключается в наглядности получаемых результатов, что делает его одним из незаменимых инструментов исследователя при проведении диагностических и фундаментальных работ. Для получения достоверных и сопоставимых результатов иммуногистохимических исследований критически важны тщательный подбор первичных и вторичных реагентов, а также проведение предварительных тестов, направленных на отработку надёжных протоколов окрашивания [1, 2]. Особое внимание следует уделять выбору вторичных реагентов, которые, как правило, являются основной причиной появления неспецифических ложноположительных результатов [3].

Самыми широко используемыми животными моделями в биомедицинских исследованиях являются грызуны, в частности мыши и крысы [4]. Большинство вторичных реагентов, которые имеются в каталоге производителей, предназначены для работы на материале человека и, как правило, не адаптированы для исследований образцов тканей лабораторных животных, что создаёт дополнительную сложность. Всё это влияет на подбор зачастую дорогостоящих реактивов, а следовательно, значительно удорожает и усложняет проводимые исследования. Особые затруднения для специалистов в этом отношении, ввиду обилия изучаемых маркёров, представляют сложные гетерогенные структуры, такие как головной мозг.

Вместе с тем необходимо отметить, что в связи с реструктуризацией многих фирм по производству антител [5], а также из-за санкций большинство хорошо зарекомендовавших себя реагентов оказались сняты с производства или недоступны для российского исследователя. К примеру, такие высокочувствительные полимерные системы детекции, как EnVision Detection Systems (поставляемые компанией Dako, Дания) и Reveal Polyvalent HRP-DAB Detection System (производимые Spring Bioscience, США), исключены из каталогов компаний Agilent Technologies (США) и Abcam (Великобритания) и в настоящий момент недоступны к приобретению.

Цель настоящей работы — проверка эффективности использования доступных вторичных реагентов, таких как UltraVision Quanto Detection System HRP, N-Histofine Simple Stain MAX PO и UnoVue Rabbit HRP, для иммуногистохимического исследования головного мозга крысы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили образцы головного мозга крыс линий Вистар ($n=2$) и SHR ($n=2$). При работе с животными соблюдали основные принципы Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986 г.) и руководствовались Приказом Минздрава России № 199н «Об утверждении Правил надлежащей

лабораторной практики» 2016 г. Материал фиксировали с помощью комбинированного фиксатора — цинк-этанол-формальдегида, заливку в парафин осуществляли по стандартной методике. Срезы толщиной 5 мкм изготавливали с парафиновых блоков на ротационном микротоме Rotary 3003 (PFM Medical GmbH, Германия) и наклеивали на стёкла с адгезивным покрытием HistoBond+ (Paul Mariefeld, Германия). Препараты депарафинировали по стандартной методике. Для блокировки активности эндогенной пероксидазы использовали 3% раствор перекиси водорода.

Для постановки иммуногистохимических реакций применяли следующие первичные реагенты:

- кроличьи моноклональные антитела к белку промежуточных филаментов виментину (Vim) (HUABIO, Китай) в разведении 1:500 для выявления эпендимных клеток;
- кроличьи поликлональные антитела к глиальному кислому фибриллярному белку (glial fibrillary acidic protein, GFAP) (Agilent Technologies, США) в разведении 1:500 для выявления астроцитов;
- кроличьи моноклональные антитела к кальций-связывающему белку Iba-1 (ionized calcium-binding adaptor molecule 1) (HUABIO, Китай) в разведении 1:900 для выявления микроглии.

Перечисленные белки являются общеизвестными высокоселективными маркёрами различных популяций глиальных клеток, которые широко применяются в нейробиологических исследованиях [6–8].

Для инкубации первичных антител препараты оставляли на ночь в термостате при температуре 35° С. Разведение первичных реагентов и режим инкубации были выбраны на основании рекомендаций производителя по интервалам разведения и инкубации, а также по аналогии с ранее апробированными протоколами [9–11].

В качестве вторичных антител применяли реагенты из наборов UnoVue Rabbit HRP (Diagnostic BioSystems, США), N-Histofine Simple Stain MAX PO Universal Immunoperoxidase Polymer anti-rabbit (Nichere Biosciences Inc., Япония) и набор UltraVision Quanto Detection System HRP (Thermo Fisher Scientific, США). Для блокировки неспецифического связывания вторичных антител в реагент primary antibody amplifier из набора UltraVision Quanto Detection System HRP добавляли нормальную крысиную сыворотку до конечной концентрации раствора 0,5%. Инкубацию вторичных антител проводили при температуре 27,5° С, время соответствует рекомендациям производителей. Визуализацию продуктов реакции осуществляли с помощью хромогена 3,3'-диаминобензидина (DAB+; Agilent Technologies, США), приготовленного в соответствии с рекомендациями производителя. В качестве заключающей среды использовали CytoSeal 60 (Richard-Allan Scientific, США). Полученные микропрепараты анализировали с помощью светового микроскопа Leica DM750 с объективами HI PLAN 40×/0,65 и 100×/1,25 (Leica Microsystems, Германия). Для съёмки изображений

использовали цифровую камеру Leica ICC50 и компьютерную программу LAS EZ (Leica Microsystems, Германия). Подготовку коллажа проводили в программе Adobe Photoshop CC 2018 (Adobe, США).

Исследование одобрено локальным этическим комитетом Института экспериментальной медицины (протокол № 2/22 от 06.04.2022).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате иммуногистохимической реакции с использованием всех трёх первичных антител

и последующим применением системы визуализации UltraVision Quanto Detection System HRP на препаратах головного мозга крысы чётко выявлялись тела и отростки иммунопозитивных клеток (рис. 1, *a–c*, стрелки). Фоновое окрашивание отсутствовало. Микроглиальные клетки располагались на срезах головного мозга повсеместно, преобладали клетки с типичной отростчатой формой. Ядро клеток микроглии часто сложно просматривалось вследствие интенсивной реакции на белок в перинуклеарной цитоплазме. Многочисленные тонкие отростки клеток, содержащих Iba-1, были хорошо различимы благодаря интенсивной окраске. Положительную реакцию на GFAP

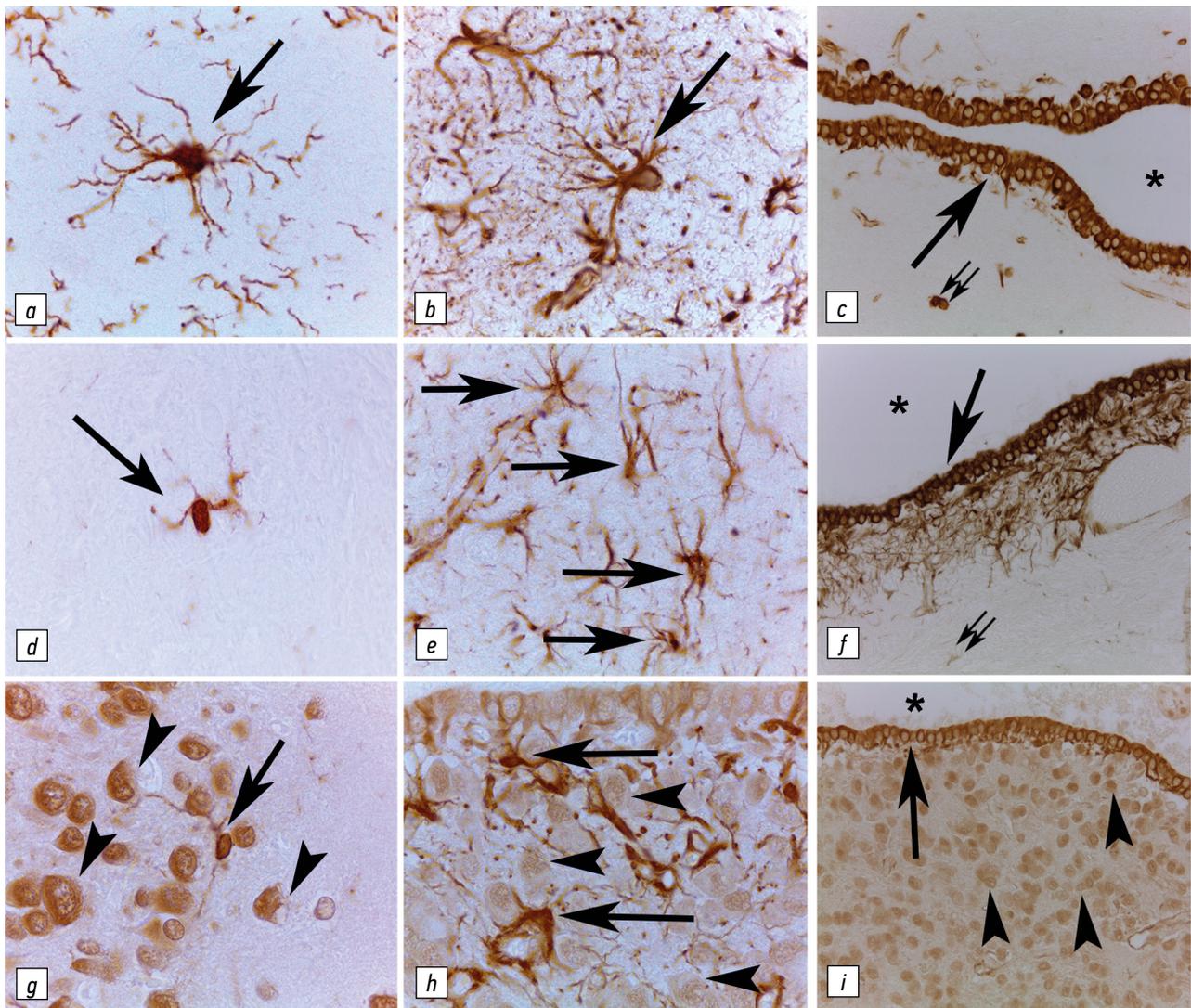


Рис. 1. Выявление глиальных клеток головного мозга крысы с применением разных вариантов вторичных реагентов. Иммуногистохимическая реакция на Iba-1 (*a, d, g*), GFAP (*b, e, h*) и виментин (*c, f, i*); *a–c* — выявление клеток с использованием реагентов из набора UltraVision Quanto Detection System HRP; *d–f* — с применением набора UnoVue Rabbit HRP; *g–i* — с применением набора N-Histofine Simple Stain MAX PO. Стрелки указывают на глиоциты, двойные стрелки — на внеэпендимные эпендимоциты, головки стрелок — неспецифическая реакция, звёздочки — полость желудочка. Объективы: HI PLAN 100x/1.25 OIL (масляная иммерсия) (*a, b, d, e, g, h*) и HI PLAN 40x/0.65 (*c, f, i*) (Leica Microsystems, Германия).

Fig. 1. Detection of glial cells in rat brain using various secondary antibodies. Iba-1 (*a, d, g*), GFAP (*b, e, h*) and vimentin (*c, f, i*) immunohistochemistry; *a–c* — visualisation with UltraVision Quanto Detection System HRP; *d–f* — visualisation with UnoVue Rabbit HRP; *g–i* — visualisation with N-Histofine Simple stain MAX PO. Arrows mark glial cells, double arrows show extraependymal ependymocytes, arrowheads — non-specific binding, asterisk — brain ventricle. HI PLAN 100x/1.25 OIL (oil immersion) (*a, b, d, e, g, h*) and HI PLAN 40x/0.65 (*c, f, i*) lens (Leica Microsystems, Germany).

в головном мозге давали астроциты, локализованные в белом и сером веществе. На препаратах видны многочисленные GFAP-позитивные отростки, попавшие в плоскость среза. Место локализации ядра хорошо просматривалось. Виментин-содержащие элементы головного мозга крысы наблюдались в клетках выстилки желудочков, менингоцитах мягкой мозговой оболочки, в эндотелиоцитах и других клетках кровеносных сосудов (гладкие миоциты и клетки адвентиции). Отмечено наличие виментин-иммунопозитивных внеэпендимных клеток (рис. 1, с, двойная стрелка). Они располагались в нейропиле вблизи поверхности желудочков.

Использование вторичных реагентов UnoVue Rabbit HRP также позволило иммуноспецифично, с минимальным фоновым окрашиванием, выявить глиальные элементы головного мозга крысы. Их распределение, как и в предыдущем исследованном случае, соответствовало общим представлениям о локализации структур головного мозга, содержащих Iba-1, GFAP и виментин. Недостатком данных вторичных антител является более слабая по сравнению с UltraVision Quanto Detection System HRP интенсивность иммуногистохимической реакции при одинаковых условиях инкубации и разведения первичных антител. В частности, тонкие отростки микроглиоцитов почти не проявляются в этом варианте методики (рис. 1, d). Хорошо различимы только крупные или недалеко отстоящие от сомы отростки. Меньше различимы и GFAP-позитивные поперечно-перерезанные отростки. Достаточно высокой интенсивностью иммунореакции отличались срезы, окрашенные на виментин (рис. 1, f). Тем не менее внеэпендимные клетки, содержащие виментин, с помощью системы детекции UnoVue Rabbit HRP выявлялись слабо и были малоконтрастными.

Неудовлетворительные результаты получены при использовании системы N-Histofine Simple Stain MAX PO. Несмотря на высокую интенсивность реакции, вторичные антитела характеризовались высоким уровнем неспецифического связывания, который мог экранировать структуры, содержащие искомые антигены (рис. 1, g–i, головки стрелок). Неспецифическая реакция маркировала цитоплазму и ядерный гетерохроматин клеток и придавала слабую окраску нейропиллю.

ОБСУЖДЕНИЕ

Использование меченых вторичных антител, соответствующих первичным, справедливо считается более чувствительным методом визуализации по сравнению с прямым методом Кунса благодаря возможности связи нескольких антител антиглобулиновой сыворотки с разными сайтами первичного антитела. Таким образом, этот подход, с одной стороны, увеличивает амплификацию сигнала, а с другой — обеспечивает универсальность иммуногистохимического подхода, поскольку одну и ту же антисыворотку можно использовать с различными

первичными антителами, полученными от одного и того же вида животных. В ходе развития методологии непрямой метод претерпел множество модификаций, к которым относятся широко применяемые авидин-биотиновые, пероксидаза-антипероксидазные и полимерные системы амплификации сигнала [12, 13].

Исследуемые в данной работе методические подходы основаны на использовании первичных кроличьих (поли- и моноклональных) антител и полимерных систем визуализации антигена. Эта технология предполагает применение полимерной макромолекулярной основы (например, декстрана), конъюгированной с несколькими молекулами вторичных антител и фермента (в настоящей работе — пероксидазой хрена) [12]. Выбор таких первичных реагентов обусловлен в первую очередь тем, что дальнейшее применение антикроличьих вторичных антител для визуализации белка интереса не предполагает возникновения перекрёстных неспецифических реакций. Хорошо известно, что мыши и крысы филогенетически близки, а их иммуноглобулины иммунологически родственны [14]. Поэтому выявление мышинных первичных антител в образцах тканей крысы было бы дополнительно осложнено необходимостью блокирования перекрёстной активности. Чтобы избежать такого неспецифического окрашивания, было решено применить первичные антитела, позволяющие использовать вторичные реагенты, не направленные против иммуноглобулинов мыши или крысы.

При этом необходимо отдельно упомянуть, что используемая в настоящей работе система UltraVision Quanto Detection System HRP является поливалентной, т.е. имеет двойную иммунную активность. Поэтому с учётом конъюгации в указанном наборе вторичных антимышинных и антикроличьих антител нами была предпринята модификация вторичных реагентов, заключающаяся в добавлении в раствор антител нормальной крысиной сыворотки. Как показал анализ препаратов, процедура модификации вторичных реагентов не только не привела к потере чувствительности иммуногистохимической реакции, но и обеспечила наилучшее среди исследуемых реагентов соотношение интенсивности сигнала к уровню фона.

Оптимальное соотношение уровней сигнал/фон также отмечено при анализе препаратов, обработанных с помощью системы UnoVue Rabbit HRP. Однако данный вариант исследуемых вторичных реагентов показал меньшую амплификацию сигнала по сравнению с UltraVision Quanto Detection System HRP. В первую очередь это связано с тем, что в настоящей работе применяли единый протокол обработки препаратов для удобства стандартизации полученных результатов. Поэтому предполагается, что изменение условий инкубации, демаскирования антигена или разведения первичных антител может позволить повысить чувствительность реакции и добиться сходных результатов. В частности, отмечено, что на препаратах, обрабатываемых UnoVue Rabbit HRP, после инкубации с антисывороткой к виментину, как и при обработке

UltraVision Quanto Detection System HRP, присутствуют иммунопозитивные клетки, имеющие структурное сходство с типичными клетками эпендимы, но располагающиеся вне эпендимного слоя. Наличие этих клеток на препаратах не является артефактом и показано для нескольких близлежащих к третьему и боковым желудочкам зон головного мозга [15]. На препаратах головного мозга, полученных при применении UnoVue Rabbit HRP, эти клетки имели более слабую иммунореактивность на виментин по сравнению с клетками эпендимы, что косвенно указывает на сниженную концентрацию антигена. В таких случаях добиться хороших результатов позволяет увеличение продолжительности инкубации срезов с первичными антителами до нескольких суток [16]. Поэтому стоит подчеркнуть, что обе обозначенные выше системы вторичных реагентов характеризуются высокой эффективностью для проведения исследований с использованием крыс.

Неспецифическая реакция, отмеченная при использовании вторичных реагентов N-Histofine Simple Stain MAX PO, может дать ложное впечатление о характере распределения белка в условиях отсутствия чёткого понимания, где именно экспрессирован антиген. Например, в новаторских исследованиях экспрессии [17] или при моделировании экспериментальной патологии [18] использование реагентов типа N-Histofine Simple Stain MAX PO будет сопряжено с высоким риском получения ложноположительных результатов. Это должно учитываться при проведении экспериментальных исследований и разработке методологии исследования.

Однако проявление фонового окрашивания при применении этого реактива не стало неожиданным результатом. Как утверждается в аннотации производителя (<https://clck.ru/3A2G7w>), N-Histofine Simple Stain MAX PO разработан специально для иммуногистохимического окрашивания срезов тканей человека. Поэтому аффинная абсорбция вторичных антител, направленная на исключение фонового окрашивания, проводилась, по-видимому, только с помощью человеческой, а не крысиной или мышьиной сыворотки. Отсутствие этапа очистки с применением крысиной сыворотки и стало причиной неспецифического окрашивания клеток и нейропиля. Вероятно, аналогичная модификация, которая выполнялась для набора UltraVision Quanto Detection System HRP, может и в этом случае привести к снижению уровня фона. Известно также, что вторичные реагенты, которые предназначены для работы с тканями человека, могут оказаться подходящими и для иммуногистохимического исследования тканей лабораторных животных. Так, научная группа под руководством М. Pervin [19] (исследование выполнено с помощью реагентов из набора N-Histofine Simple Stain MAX PO) продемонстрировала удовлетворительные результаты иммуногистохимического выявления резидентных макрофагов печени крыс (клеток Купфера). Нами было решено проверить работу этого набора на тканях головного мозга крыс. Однако представленные препараты оказались примером

того, как нецелесообразное использование набора приводит к неудовлетворительному результату, что является одной из возможных ошибок при планировании и проведении иммуногистохимического исследования [20]. Поэтому важно, чтобы специалисты понимали состав и этапы производства предоставляемого реактива. Это часто оказывается невозможным для продуктов, защищённых патентным правом или коммерческой тайной.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Опробованные в настоящем исследовании наборы вторичных реагентов UnoVue Rabbit HRP и UltraVision Quanto Detection System HRP оказались сходными по степени специфичности результатов. Однако полимерная система UnoVue Rabbit HRP обладает более слабой интенсивностью реакции, что необходимо учитывать при разведении первичных антител и разработке режимов инкубации. Окрашивающий реактив N-Histofine Simple Stain MAX PO, предназначенный для работ с образцами ткани человека, является непригодным для исследования срезов мозга лабораторных животных.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины».

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Наибольший вклад распределён следующим образом: В.А. Разенкова — концепция исследования, сбор и анализ литературных данных, написание и редактирование текста статьи; В.С. Павлова — изготовление препаратов, проведение иммуногистохимических реакций, анализ материала, написание текста статьи.

ADDITIONAL INFORMATION

Funding source. The work was carried out within the framework of the state assignment of the Institute of Experimental Medicine.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work. V.A. Razenkova — idea of the study, collection and analysis of literary sources, writing the text and editing the article; V.S. Pavlova — preparation of histological slides, carrying out immunohistochemical reactions, analysis of material, writing the article.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bordeaux J, Welsh A, Agarwal S, et al. Antibody validation // *Biotechniques*. 2010. Vol. 48, N 3. P. 197–209. Corrected and republished from: *Biotechniques*. 2010. Vol. 48. P. 351. doi: 10.2144/000113382
2. Gown A.M. Diagnostic immunohistochemistry: what can go wrong and how to prevent it // *Arch Pathol Lab Med*. 2016. Vol. 140, N 9. P. 893–898. doi: 10.5858/arpa.2016-0119-RA
3. Mao S, Xiong G, Johnson B.N., et al. Blocking cross-species secondary binding when performing double immunostaining with mouse and rat primary antibodies // *Front Neurosci*. 2021. Vol. 15. P. 579859. doi: 10.3389/fnins.2021.579859
4. Keifer J., Summers C.H. Putting the “biology” back into “neurobiology”: the strength of diversity in animal model systems for neuroscience research // *Front Syst Neurosci*. 2016. Vol. 10. P. 69. doi: 10.3389/fnsys.2016.00069
5. Aldridge S. Agilent buys Her2 test firm // *Nat Biotechnol*. 2012. Vol. 30, N 8. P. 730. doi: 10.1038/nbt0812-730b
6. Hopperton K.E., Mohammad D., Trépanier M.O., et al. Markers of microglia in post-mortem brain samples from patients with Alzheimer’s disease: a systematic review // *Mol Psychiatry*. 2018. Vol. 23. N 2. P. 177–198. doi: 10.1038/mp.2017.246
7. Ren Y., Ao Y., O’Shea T.M., et al. Ependymal cell contribution to scar formation after spinal cord injury is minimal, local and dependent on direct ependymal injury // *Sci Rep*. 2017. Vol. 7. P. 41122. doi: 10.1038/srep41122
8. Taft J.R., Vertes R.P., Perry G.W. Distribution of GFAP+ astrocytes in adult and neonatal rat brain // *Int J Neurosci*. 2005. Vol. 115, N 9. P. 1333–1343. doi: 10.1080/00207450590934570
9. Hu J., Cai D., Zhao Z., et al. Suppression of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein c inhibit hepatocellular carcinoma proliferation, migration, and invasion via Ras/MAPK signaling pathway // *Front Oncol*. 2021. Vol. 11. P. 659676. doi: 10.3389/fonc.2021.659676
10. Суфиева Д.А., Кирик О.В., Алексеева О.С., Коржевский Д.Э. Белки промежуточных филаментов в таницитах третьего желудочка головного мозга крысы в постнатальном онтогенезе // *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2016. Т. 52, № 6. С. 436–443. EDN: XWQZJE
11. Никитина И.А., Разенкова В.А., Кирик О.В., Коржевский Д.Э. Выявление популяции клеток Купфера в печени крысы с использованием моноклональных и поликлональных антител к микроглиальному маркеру Iba-1 // *Медицинский академический журнал*. 2023. Т. 23, № 1. С. 85–94. EDN: UIWLVL doi: 10.17816/MAJ133649
12. Shojaeian S., Lay N.M., Zarnani A.H., et al. Detection systems in immunohistochemistry. In: Streckfus C.F., editor. *Immunohistochemistry — the ageless biotechnology*. London: IntechOpen, 2020. 140 p. doi: 10.5772/intechopen.82072
13. Butler J.L., Barham B.J., Heidenreich B.A. Comparison of indirect peroxidase and avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) immunohistochemical staining procedures for C-FOS in rat brain // *J Anat*. 2019. Vol. 234, N 6. P. 936–942. doi: 10.1111/joa.12967
14. Nahm M., Der-Balian G.P., Venturini D., et al. Antigenic similarities of rat and mouse IgG subclasses associated with anti-carbohydrate specificities // *Immunogenetics*. 1980. Vol. 11. N 2. P. 199–203. doi: 10.1007/BF01567785
15. Кирик О.В., Коржевский Д.Э. Внеэпендимные эпендимоциты головного мозга крысы // *Морфология*. 2013. Т. 143, № 3. С. 071–073. EDN: QIAGYF
16. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Петрова Е.С., и др. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии. 2-е издание, исправленное и дополненное. Санкт-Петербург: СпецЛит, 2014. EDN: SINOMT
17. Kalinina D.S., Ptukha M.A., Goriainova A.V., et al. Role of the trace amine associated receptor 5 (TAAR5) in the sensorimotor functions // *Sci Rep*. 2021. Vol. 11, N 1. P. 23092. doi: 10.1038/s41598-021-02289-w
18. Munguía-Martínez M.F., Nava-Ruiz C., Ruiz-Díaz A., et al. Immunohistochemical study of antioxidant enzymes regulated by Nrf2 in the models of epileptic seizures (KA and PTZ) // *Oxid Med Cell Longev*. 2019. Vol. 2019. P. 1327986. doi: 10.1155/2019/1327986
19. Pervin M., Hasan I., Kobir M.A., et al. Immunophenotypic analysis of the distribution of hepatic macrophages, lymphocytes and hepatic stellate cells in the adult rat liver // *Anat Histol Embryol*. 2021. Vol. 50, N 4. P. 736–745. doi: 10.1111/ahc.12718
20. Suvarna S.K., Layton C., Bancroft J.D. *Bancroft’s theory and practice of histological techniques*. 8th ed. Elsevier, 2019.

REFERENCES

1. Bordeaux J, Welsh A, Agarwal S, et al. Antibody validation. *Biotechniques*. 2010;48(3):197–209. Corrected and republished from: *Biotechniques*. 2010;48(5):351. doi: 10.2144/000113382
2. 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
3. Mao S, Xiong G, Johnson BN, et al. Blocking cross-species secondary binding when performing double immunostaining with mouse and rat primary antibodies. *Front Neurosci*. 2021;15:579859. doi: 10.3389/fnins.2021.579859
4. Keifer J, Summers CH. Putting the “biology” back into “neurobiology”: the strength of diversity in animal model systems for neuroscience research. *Front Syst Neurosci*. 2016;10:69. doi: 10.3389/fnsys.2016.00069
5. Aldridge S. Agilent buys Her2 test firm. *Nat Biotechnol*. 2012;30(8):730. doi: 10.1038/nbt0812-730b
6. Hopperton KE, Mohammad D, Trépanier MO, et al. Markers of microglia in post-mortem brain samples from patients with Alzheimer’s disease: a systematic review. *Mol Psychiatry*. 2018;23(2):177–198. doi: 10.1038/mp.2017.246
7. Ren Y, Ao Y, O’Shea TM, et al. Ependymal cell contribution to scar formation after spinal cord injury is minimal, local and dependent on direct ependymal injury. *Sci Rep*. 2017;7:41122. doi: 10.1038/srep41122
8. Taft JR, Vertes RP, Perry GW. Distribution of GFAP+ astrocytes in adult and neonatal rat brain. *Int J Neurosci*. 2005;115(9):1333–1343. doi: 10.1080/00207450590934570
9. Hu J, Cai D, Zhao Z, et al. Suppression of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein c inhibit hepatocellular carcinoma proliferation, migration, and invasion via Ras/MAPK signaling pathway. *Front Oncol*. 2021;11:659676. doi: 10.3389/fonc.2021.659676
10. Sufieva DA, Kirik OV, Alekseeva OS, Korzhevskii DE. Intermediate filament proteins in tanocytes of the third cerebral ventricle

in rats during postnatal ontogenesis. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2016;52(6):490–498. EDN: WINOVY doi: 10.1134/S1234567816060082

11. Nikitina IA, Razenkova VA, Kirik OV, Korzhevskii DE. Visualisation of Kupffer cells in the rat liver with poly- and monoclonal antibodies against microglial-specific protein Iba-1. *Medical Academic Journal*. 2023;23(1):85–94. EDN: UIWLVL doi: 10.17816/MAJ133649

12. Shojaeian S, Lay NM, Zarnani AH, et al. Detection systems in immunohistochemistry. In: Streckfus CF, editor. *Immunohistochemistry — the ageless biotechnology*. London: IntechOpen; 2020. 140 p. doi: 10.5772/intechopen.82072

13. Butler JL, Barham BJ, Heidenreich BA. Comparison of indirect peroxidase and avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) immunohistochemical staining procedures for C-FOS in rat brain. *J Anat*. 2019;234(6):936–942. doi: 10.1111/joa.12967

14. Nahm M, Der-Balian GP, Venturini D, et al. Antigenic similarities of rat and mouse IgG subclasses associated with anti-carbohydrate specificities. *Immunogenetics*. 1980;11(2):199–203. doi: 10.1007/BF01567785

15. Kirik OV, Korzhevskiy DE. Extraependymal ependymocytes in the rat brain. *Morphology*. 2013;143(3):071–073. EDN: QIAGYF

16. Korzhevsky DE, Kirik OV, Petrova ES, et al. *Theoretical bases and practical application of immunohistochemistry methods. 2nd edition, corrected and supplemented*. Saint Petersburg: SpeczLit; 2014. (In Rus). EDN: SINOMT

17. Kalinina DS, Ptukha MA, Goriainova AV, et al. Role of the trace amine associated receptor 5 (TAAR5) in the sensorimotor functions. *Sci Rep*. 2021;11(1):23092. doi: 10.1038/s41598-021-02289-w

18. Munguía-Martínez MF, Nava-Ruiz C, Ruíz-Díaz A, et al. Immunohistochemical study of antioxidant enzymes regulated by Nrf2 in the models of epileptic seizures (KA and PTZ). *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:1327986. doi: 10.1155/2019/1327986

19. Pervin M, Hasan I, Kobir MA, et al. Immunophenotypic analysis of the distribution of hepatic macrophages, lymphocytes and hepatic stellate cells in the adult rat liver. *Anat Histol Embryol*. 2021;50(4):736–745. doi: 10.1111/ahe.12718

20. Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD. *Bancroft's theory and practice of histological techniques. 8th ed*. Elsevier; 2019.

ОБ АВТОРАХ

* Разенкова Валерия Алексеевна;

адрес: Россия, 197022, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр-т, д. 71;

ORCID: 0000-0002-3997-2232;

eLibrary SPIN: 8877-8902;

e-mail: valeriya.raz@yandex.ru

Павлова Валерия Сергеевна;

ORCID: 0009-0004-8434-0498;

e-mail: herondale.valery@gmail.com

AUTHORS' INFO

* Valeria A. Razenkova;

address: 71 Kamennooostrovsky avenue, 197022 Saint Petersburg, Russia;

ORCID: 0000-0002-3997-2232;

eLibrary SPIN: 8877-8902;

e-mail: valeriya.raz@yandex.ru

Valeria S. Pavlova;

ORCID: 0009-0004-8434-0498;

e-mail: herondale.valery@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author