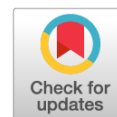


DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.687507>

EDN: IJECVC



# Выявление макрофагов головного мозга у крыс с использованием различных антител к CD68/макросиалину

А.А. Бекетова, В.А. Разенкова, О.В. Кирик, Д.Э. Коржевский

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

## АННОТАЦИЯ

**Обоснование.** Макрофаги — это разнородная по происхождению, фенотипическим и функциональным особенностям популяция клеток. В головном мозге резидентные макрофаги ассоциированы с барьерными органами: мозговыми оболочками, сосудами и сосудистым сплетением. Для выявления макрофагов обычно используют антитела к CD68/макросиалину. Данные литературы и опыт исследователей свидетельствуют о низкой степени консервативности этого белка, что обуславливает необходимость использования видоспецифических антител и тщательного подбора первичных реагентов для выявления макрофагов в тканях лабораторных грызунов.

**Цель исследования** — провести сравнительный анализ результатов выявления макрофагов у крыс при использовании кроличьих поликлональных антител к CD68 и мышиных моноклональных антител клона ED1.

**Методы.** Объектом исследования служили срезы головного мозга крыс линии Вистар ( $n=6$ ), а в качестве контроля использовали срезы сердца и печени крыс той же линии. Макрофаги, положительные по CD68/макросиалину, выявляли с помощью мышиных моноклональных антител клона ED1 и кроличьих поликлональных антител в различных протоколах иммуногистохимической реакции.

**Результаты.** Оба типа антител позволяют специфично выявлять макрофаги головного мозга трёх локализаций: в мягкой мозговой оболочке, стенках сосудов и сосудистом сплетении. При использовании кроличьих поликлональных антител интенсивность специфической реакции выше по сравнению с мышиными моноклональными антителами, а неспецифическое связывание отсутствует. Установлена необходимость теплового демаскирования антигена и применения блокирующих реагентов в протоколах с использованием мышиных моноклональных антител.

**Заключение.** Анализ результатов выявления макрофагов на срезах головного мозга крыс при использовании антител разного происхождения и клональности показал, что кроличьи поликлональные антитела хорошо выявляют макрофаги при более простом протоколе иммуногистохимической реакции по сравнению с мышиными моноклональными антителами, а потому могут быть рекомендованы в качестве полезной альтернативы для окрашивания CD68/макросиалина на срезах тканей крысы.

**Ключевые слова:** CD68; макрофаги; моноклональные антитела; поликлональные антитела; иммуногистохимия; крыса.

## Как цитировать:

Бекетова А.А., Разенкова В.А., Кирик О.В., Коржевский Д.Э. Выявление макрофагов головного мозга у крыс с использованием различных антител к CD68/макросиалину // Морфология. 2026. Т. 164, № 2. С. 235–244. DOI: 10.17816/morph.687507 EDN: IJECVC

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.687507>

EDN: IJECVC

# Detection of Brain Macrophages in Rats Using Different Anti-CD68/Macrosialin Antibodies

Anastasiia A. Beketova, Valeria A. Razenkova, Olga V. Kirik, Dmitrii E. Korzhevskii

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Macrophages represent a heterogeneous cell population with diverse origins, phenotypic characteristics, and functional properties. In the brain, resident macrophages are associated with barrier structures, including the meninges, blood vessels, and choroid plexus. Anti-CD68/macrosialin antibodies are commonly used to identify macrophages. Published data and experimental experience indicate a low degree of conservation of this protein, necessitating the use of species-specific antibodies and careful selection of primary reagents for macrophage detection in laboratory rodent tissues.

**AIM:** To perform a comparative analysis of macrophage detection in rats using rabbit polyclonal anti-CD68 antibodies and mouse monoclonal antibodies of the ED1 clone.

**METHODS:** Brain sections obtained from Wistar rats ( $n = 6$ ) were examined; heart and liver sections from the same strain served as controls. CD68/macrosialin-positive macrophages were identified using mouse monoclonal antibodies (clone ED1) and rabbit polyclonal antibodies in various immunohistochemical staining protocols.

**RESULTS:** Both antibody types specifically detected brain macrophages in three locations: the pia mater, vascular walls, and the choroid plexus. Rabbit polyclonal antibodies demonstrated higher intensity of specific staining compared with mouse monoclonal antibodies, with no nonspecific binding observed. The use of mouse monoclonal antibodies required heat-induced antigen retrieval and blocking reagents within the staining protocol.

**CONCLUSION:** Comparative analysis of macrophage detection in rat brain sections using antibodies of different origins and clonality demonstrated that rabbit polyclonal antibodies provide reliable macrophage labeling using a simpler immunohistochemical protocol compared with mouse monoclonal antibodies. Therefore, rabbit polyclonal antibodies may be recommended as a useful alternative for CD68/macrosialin staining in rat tissue sections.

**Keywords:** CD68; macrophages; monoclonal antibodies; polyclonal antibodies; immunohistochemistry; rat.

## To cite this article:

Beketova AA, Razenkova VA, Kirik OV, Korzhevskii DE. Detection of Brain Macrophages in Rats Using Different Anti-CD68/Macrosialin Antibodies. *Morphology*. 2026;164(2):235–244. DOI: 10.17816/morph.687507 EDN: IJECVC

Submitted: 14.07.2025

Accepted: 29.07.2025

Published online: 24.11.2025

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.687507>

EDN: IJECVC

# 利用多种抗CD68/巨噬细胞唾液酸蛋白抗体检测大鼠脑巨噬细胞

Anastasiia A. Beketova, Valeria A. Razenkova, Olga V. Kirik, Dmitrii E. Korzhevskii

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

## 摘要

**论证。**巨噬细胞是一类在起源、表型及功能特征上均具有异质性的细胞群体。在脑内，常驻巨噬细胞与屏障器官：脑膜、血管和脉络丛密切相关。抗CD68/巨噬细胞唾液酸蛋白抗体常用于检测巨噬细胞。文献资料及研究经验表明，该蛋白保守性较低，因此，在实验室啮齿动物组织中检测巨噬细胞时，需使用物种特异性抗体并审慎选择一抗。

**目的。**本研究旨在比较使用兔抗CD68多克隆抗体和小鼠单克隆抗体ED1检测大鼠脑巨噬细胞的结果。

**方法。**以Wistar大鼠（n = 6）的脑组织切片为研究对象，并以同品系大鼠的心、肝组织切片作为对照。采用小鼠单克隆抗体ED1及兔多克隆抗体，在不同的免疫组织化学染色方案中检测CD68/巨噬细胞唾液酸蛋白阳性的巨噬细胞。

**结果。**两种抗体均可特异性显示巨噬细胞在三个部位的分布：软脑膜、血管壁及脉络丛。与小鼠单克隆抗体相比，使用兔多克隆抗体时特异性反应强度更高，且无非特异性结合。研究表明，使用小鼠单克隆抗体时，必须进行抗原热修复并应用封闭试剂。

**结论。**通过对比分析不同来源及克隆型抗体在大鼠脑组织切片中检测巨噬细胞的效果，发现相较于小鼠单克隆抗体，兔多克隆抗体能够以更简捷的免疫组织化学反应方案有效显示巨噬细胞，因此可作为大鼠组织切片CD68/巨噬细胞唾液酸蛋白染色的优质替代方案。

**关键词：**CD68；巨噬细胞；单克隆抗体；多克隆抗体；免疫组织化学；大鼠。

## To cite this article:

Beketova AA, Razenkova VA, Kirik OV, Korzhevskii DE. 利用多种抗CD68/巨噬细胞唾液酸蛋白抗体检测大鼠脑巨噬细胞. *Morphology*. 2026;164(2):235–244. DOI: 10.17816/morph.687507 EDN: IJECVC

收到: 14.07.2025

接受: 29.07.2025

发布日期: 24.11.2025

## ОБОСНОВАНИЕ

Макрофаги — разнородная по происхождению, фенотипическим и функциональным особенностям популяция клеток, способных к фагоцитозу и представлению антигенов. Современные исследования расширили понимание роли макрофагов: это не только клетки иммунной системы, но и важные регуляторы ремоделирования и функциональной модуляции тканей. Такие способности макрофагов обеспечены совокупностью экспрессируемых ими рецепторов, секретируемых ферментов, факторов роста и иных цитокинов [1]. Локализация клеток в том или ином органе и их функциональный статус влияют на спектр экспрессируемых ими молекул, поэтому он может значительно отличаться от органа к органу. В частности, в головном мозге, наряду с микроглией, существует несколько популяций типичных макрофагов, которые локализуются преимущественно в барьерных областях мозга: в мозговых оболочках, вблизи кровеносных сосудов, в строме и на поверхности сосудистого сплетения [2–4]. Однако, несмотря на разнообразие, у макрофагов существуют общие маркеры, применяемые для их выявления в различных органах и тканях [5, 6]. Например, классическим маркером макрофагов считается CD68 (Cluster of differentiation 68, кластер дифференцировки 68) [7, 8].

Кластер дифференцировки 68 у человека и его гомолог у мышей — макросиалин, относятся к семейству белков, ассоциированных с мембранами лизосом (Lysosome-Associated Membrane Protein, LAMP), и имеют высокую степень гликозилирования [9, 10]. Для данных белков характерно 80,6% совпадения аминокислотных последовательностей [10]. Однако высокая степень гомологии аминокислотной последовательности белков в целом не всегда свидетельствует о гомологии аминокислотных последовательностей их антигенных детерминант, что подтверждается при использовании антител к человеческому CD68 на образцах тканей крысы [11]. Таким образом, низкая степень консервативности макросиалина обуславливает необходимость использования видоспецифических антител.

Для выявления CD68-иммунопозитивных макрофагов у крыс обычно используют давно известный клон ED1 [5, 12]. Мышиная природа этого клона антител обуславливает ряд сложностей в иммуногистохимическом протоколе, таких как подбор способа демаскирования антигена, блокирующих и вторичных реагентов, особенно при работе с материалом лабораторных грызунов. Возможным решением возникающих затруднений могут стать недавно вышедшие на рынок кроличьи поликлональные антитела к CD68/макросиалину крыс [13]. Однако в современных условиях первичные антитела относятся к довольно дорогостоящим реагентам, что ограничивает возможности их широкого скрининга.

При этом проблема тщательного подбора первичных реагентов для выявления макрофагов у лабораторных грызунов является актуальной, поскольку одним из наиболее активно развивающихся направлений современной биологии и медицины является нейроиммунология [3, 14].

**Цель исследования** — провести сравнительный анализ результатов выявления макрофагов у крыс при использовании кроличьих поликлональных антител к CD68 и мышиных моноклональных антител клона ED1.

## МЕТОДЫ

### Дизайн исследования

Проведено сравнительное исследование применения двух типов антител к CD68/макросиалину. В качестве объекта исследования использовали образцы головного мозга крыс линии Вистар ( $n=6$ ), контролем служили образцы сердца и печени крыс той же линии.

Животные были получены из питомника лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская область, Россия). Крыс содержали в виварии при комнатной температуре и естественном освещении, со свободным доступом к пище и воде. Перед отбором материала проводили эвтаназию путём передозировки парами этилового эфира.

### Условия проведения исследования

Образцы тканей фиксировали в спиртовом растворе хлорида цинка и формальдегида и заливали в парафин по общепринятой методике. Срезы толщиной 5 мкм изготавливали на ротационном микротоме Microm HM 325 (Thermo Fisher Scientific, США) и монтировали на стёкла с адгезивным покрытием PCL (CITOTEST Labware Manufacturing Co., Ltd, Китай).

Для сравнительной оценки эффективности кроличьих поликлональных и мышиных моноклональных антител использовано пять протоколов (№№ 1–5). Общими для всех протоколов этапами было: удаление парафина со срезов ксилолом, регидратация срезов в растворах этанола нисходящей концентрации, блокирование эндогенной пероксидазы 3% водным раствором перекиси водорода. На части срезов выполняли тепловое демаскирование антигена в буфере S1700 (Agilent, США) согласно общепринятой методике [15]. В протоколах №№ 1–3 использовали первичные мышиные моноклональные антитела к CD68 (клон ED1; ab31630, Abcam, Великобритания) в разведении 1:1000; в протоколах №№ 4 и 5 — первичные поликлональные кроличьи антитела к CD68 (GB113109, Wuhan Servicebio Technology Co., Ltd, Китай) в разведении 1:300 и 1:800 соответственно. Инкубацию проводили в течение 18–20 часов во влажной камере при температуре 27,5°C.

Особенности использованных протоколов окрашивания:

- протокол № 1: после блокирования эндогенной пероксидазы использовали блокирующие реаген-

ты из набора N-Histofine MOUSESTAIN KIT (Nichirei, Япония) согласно рекомендациям производителя. После инкубации срезов с первичными антителами использовали вторичные антитела из того же набора.

- протокол № 2: в качестве вторичных реагентов использовали набор UltraVision Quanto Detection System HRP (TL-060-QHL, Fisher Scientific, США). Для блокировки перекрёстного неспецифического связывания иммуноглобулинов крысы антимышиными антителами в реагент Primary Antibody Amplifier, входящий в состав набора, добавляли нормальную крысиную сыворотку до конечной концентрации 0,5%.
- протоколы №№ 3–5: в качестве вторичных реагентов применяли набор Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection Kit — Micro-polymer (ab236466, Abcam, Великобритания); в протоколе № 3 в реагент Mouse Specifying Reagent (Complement) добавляли нормальную крысиную сыворотку до конечной концентрации 0,5%.

В качестве детектирующего хромогена использовали 3,3'-диаминобензидин (DAB; Nischerei, Япония). После выявления комплекса антиген-антитело срезы подкрашивали альциановым синим, дегидратировали в изопропиловом спирте, просветляли в ксилоле и заключали в перманентную среду Cytoseal 60 (Richard-Allan Scientific, США).

### Анализ в подгруппах

В ходе исследования сформированы две основные группы препаратов: окрашенные с помощью мышиных моноклональных антител и окрашенные с помощью кроличьих поликлональных антител. В каждой из групп выделены по две подгруппы: препараты, подвергшиеся тепловому демаскированию антигена, и препараты, не подвергавшиеся данной процедуре.

### Методы регистрации исходов

Окрашенные микропрепараты фотографировали с помощью микроскопа Leica DM750 (Leica Microsystems, Германия), оснащённого цифровой камерой ICC50 (Leica Microsystems, Германия). Анализ изображений проводили в программах Leica LAS EZ (Leica Microsystems, Германия) и ImageJ2 в расширении FIJI [16].

Измерения проводили следующим образом:

- площадь сосудистого сплетения третьего желудочка головного мозга крыс оценивали при увеличении объектива  $\times 10$  в программе ImageJ с помощью встроенного инструмента «выделение от руки» (Freehand selections) и функции «измерить» (Measure);
- граница выделения сосудистого сплетения соответствовала, с одной стороны, поверхности его эпителия, обращённой в полость желудочка,

а с другой — поверхности эпителия, обращённой к кровеносному сосуду;

- на выделенной площади оценивали количество иммунопозитивных структур, соответствующих по морфологическим признакам клеткам, при увеличении объектива  $\times 40$ .

### Статистические процедуры

Статистический анализ результатов исследования проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel (Microsoft, США). Данные представлены в виде Me [Q1; Q3], где Me — медиана, Q1 и Q3 — первый и третий квартили. Для проверки соответствия значений исследуемой случайной величины нормальному распределению использовали критерий Шапиро–Уилка, а для определения различий между группами — непараметрический критерий Манна–Уитни. Критический уровень значимости принимали равным  $p = 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Все использованные протоколы иммуногистохимического окрашивания позволяют выявить CD68-позитивные структуры в головном мозге крыс. Предварительный анализ на малом увеличении (объектив Plan 10 $\times$ /0.22) показал, что эти структуры локализуются в мягкой мозговой оболочке, в строме сосудистого сплетения, а также периваскулярно. В контрольных образцах сердца и печени крыс при использовании кроличьих поликлональных антител также были выявлены CD68-иммунопозитивные клетки.

Продукт реакции на CD68 избирательно накапливается в цитоплазме клеток, морфологически и топографически соответствующих макрофагам (рис. 1). В других клетках исследуемых органов специфической реакции не наблюдали. В цитоплазме окрашенный продукт реакции визуализирует гранулы, как отдельные, так и сливающиеся. Выявление таких гранул характерно при использовании обоих видов антител. Кроме того, как мышиные, так и кроличьи антитела позволяют выявить два типа клеток, различающихся по интенсивности иммуногистохимической реакции — слабоокрашенные и интенсивно окрашенные.

Для кроличьих поликлональных антител характерно выявление гранул не только в перинуклеарной цитоплазме, но и в отростках клеток. Отростки макрофагов, окрашенных с помощью антител к CD68, малочисленны, характеризуются значительной толщиной и отсутствием ветвления. Мышиные моноклональные антитела выявляют отростки только тех клеток, которые расположены периваскулярно и в сосудистом сплетении (см. рис. 1).

Сравнение препаратов, прошедших процедуру теплового демаскирования антигена, с препаратами, которые этой процедуре не подвергались, позволило установить следующее.

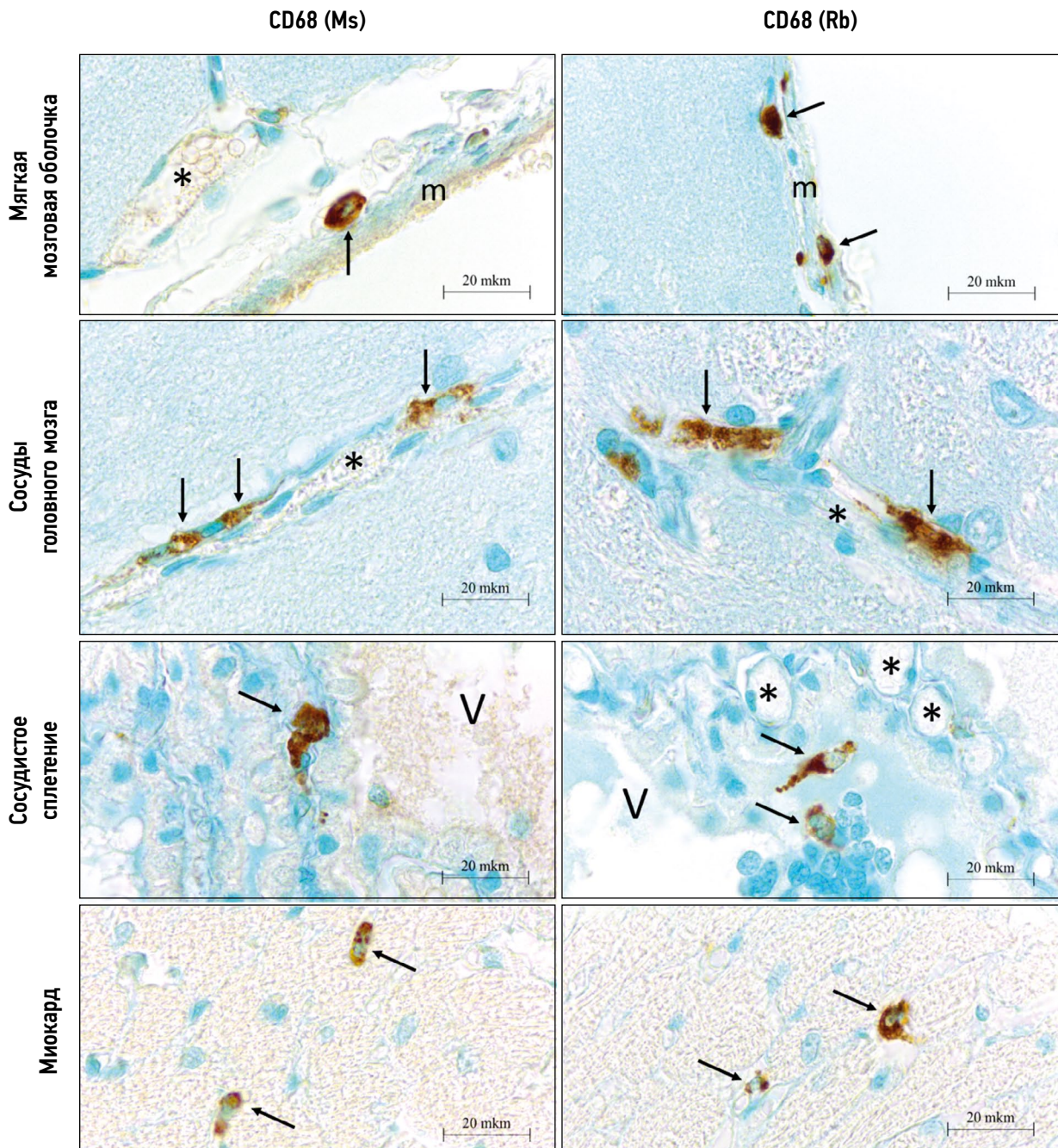


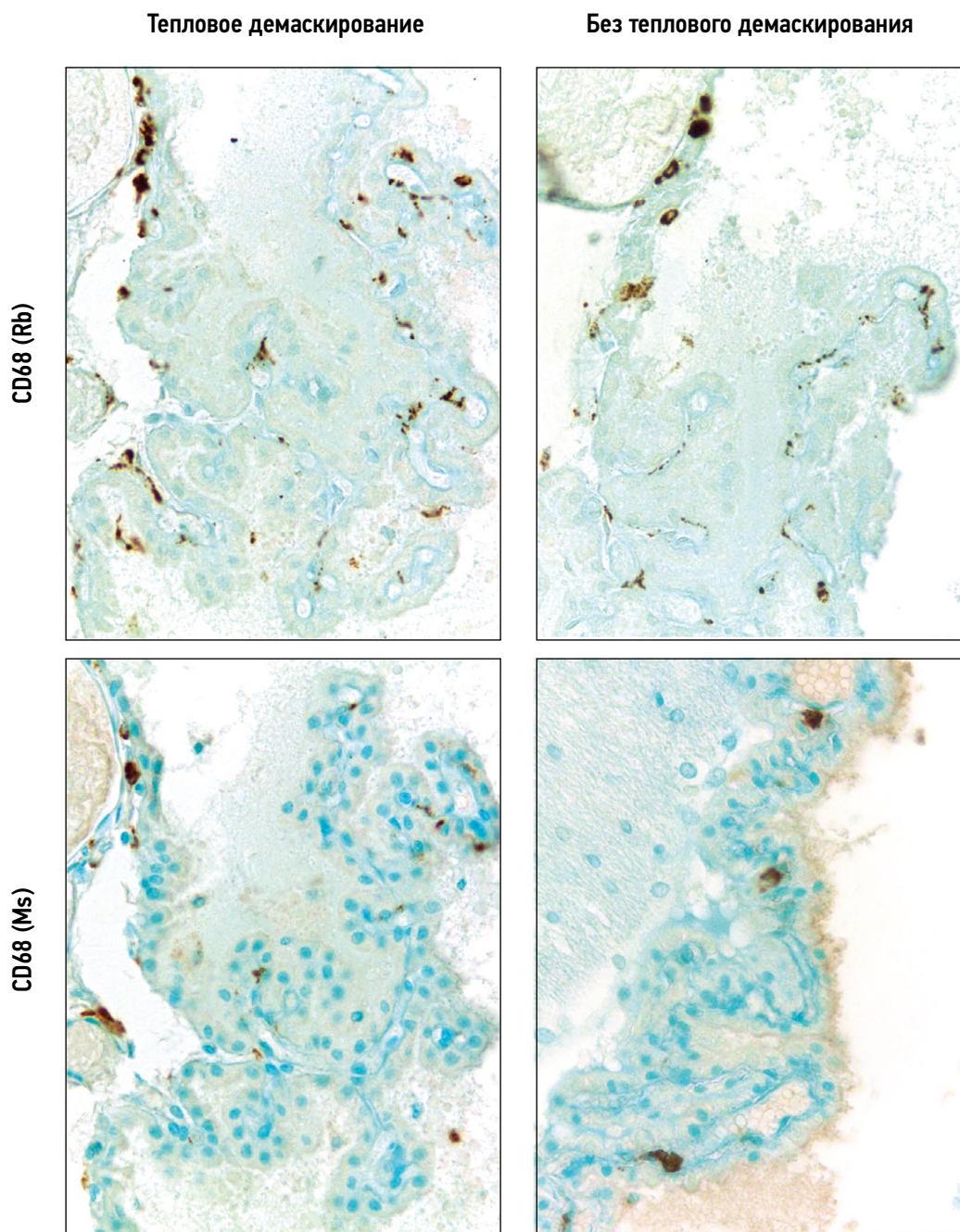
Рис. 1. Результаты применения антител к CD68/макросиалину у крысы: Anti-CD68 ED1 (Ms) — мышиные моноклональные антитела, протокол № 3, без теплового демаскирования; Anti-CD68 (Rb) — кроличьи поликлональные антитела, протокол № 5, без теплового демаскирования; стрелками указаны макрофаги, \* просветы кровеносных сосудов, m — мягкая мозговая оболочка, V — полость желудочка головного мозга. Увеличение объектива  $\times 100$ , масштабный отрезок — 20 мкм.

Fig. 1. Results of CD68/macrosialin immunostaining in rat tissue: Anti-CD68 ED1 (Ms), mouse monoclonal antibodies, protocol No. 3, without heat-induced antigen retrieval; Anti-CD68 (Rb), rabbit polyclonal antibodies, protocol No. 5, without heat-induced antigen retrieval. Arrows indicate macrophages; \*, vascular lumina; m, pia mater; V, cerebral ventricle cavity. Objective magnification:  $\times 100$ ; scale bar: 20  $\mu\text{m}$ .

Во-первых, интенсивность специфической реакции с мышиными моноклональными антителами выше после теплового демаскирования. И наоборот, существенного улучшения результата реакции с кроличьими поликлональными антителами при проведении теплового демаскирования не наблюдали.

Во-вторых, интересным эффектом этапа теплового демаскирования антигена является значительное

подавление неспецифического связывания мышиных антител при использовании блокирующих реагентов (рис. 2). Без теплового демаскирования просветы сосудов и спинномозговая жидкость окрашиваются в светло-коричневый цвет, тогда как при его проведении интенсивность такой неспецифической реакции заметно уменьшается. В случае применения кроличьих антител возникновение неспецифического связывания



**Рис. 2.** Сосудистое сплетение третьего желудочка головного мозга крысы — влияние этапа теплового демаскирования антигена на неспецифическое связывание антител: Anti-CD68 ED1 (Ms) — мышинные моноклональные антитела; Anti-CD68 (Rb) — кроличьи поликлональные антитела. Увеличение объектива  $\times 40$ .

**Fig. 2.** Choroid plexus of the third ventricle of the rat brain. Effect of heat-induced antigen retrieval on nonspecific antibody binding: Anti-CD68 ED1 (Ms), mouse monoclonal antibodies; Anti-CD68 (Rb), rabbit polyclonal antibodies. Objective magnification:  $\times 40$ .

нехарактерно и от этапа теплового демаскирования не зависит (см. рис. 2).

При анализе макрофагов различной локализации обнаружено, что периваскулярные и менингеальные макрофаги, выявленные при помощи кроличьих поликлональных антител, хорошо визуализируются даже при малом увеличении объектива (Plan  $10\times/0.22$ ). Макрофаги в оболочках и возле сосудов, окрашенные с использованием мышинных моноклональных антител, обнаруживаются преимущественно при большом

увеличении (объектив HI Plan  $100\times/1.25$ , масляная иммерсия; см. рис. 1), тогда как при малом увеличении они практически незаметны. Макрофаги сосудистого сплетения немногочисленны и выявляются с помощью обоих видов антител с одинаковой эффективностью.

Статистический анализ числа CD68-иммунопозитивных структур в сосудистом сплетении третьего желудочка головного мозга крыс показал, что при использовании мышинных моноклональных антител выявляется  $139,67 [73,00; 786,85]$  клеток/ $\text{мм}^2$ , в то время

как при использовании кроличьих поликлональных антител — 510,24 [354,81; 701,54] клеток/мм<sup>2</sup>. Статистически значимых различий между группами не обнаружено.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Клон ED1 мышинных антител традиционно используется для выявления макрофагов в образцах тканей крысы [5, 12]. Как известно, иммуноглобулины крыс и мышей являются родственными белками, поэтому использование мышинных антител для непрямой реакции на тканях крысы сопровождается неспецифическим окрашиванием и снижением качества препаратов. Следовательно, во избежание нежелательного фонового окрашивания требуется использование дополнительных модификаций протокола. Нельзя не отметить, что для выявления первичных мышинных антител на сегодняшний день доступен широкий спектр вторичных реагентов, что расширяет возможности их использования. Одним из подходов, улучшающих качество реакции и уменьшающих фоновое окрашивание, является проведение прямой реакции с мышинными антителами. Недостатком такого подхода является низкая амплификация иммуногистохимической реакции. В нашем исследовании низкая интенсивность непрямой реакции указывает на то, что при использовании антител клона ED1 применение прямого метода нецелесообразно. Другим вектором развития технологии селективного выявления макрофагов в тканях крысы с помощью клона ED1 является применение первичных антител, конъюгированных с биотином (авидин-биотин-новая система) или полимерной системой [17, 18].

Методический подход, использованный в настоящей работе, состоит в добавлении нормальной крысиной сыворотки к компоненту Mouse Specifying Reagent (Complement) из набора вторичных реагентов детектирующей системы Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection Kit — Micro-polymer и к компоненту Primary Antibody Amplifier из набора UltraVision Quanto Detection System HRP. Такая модификация существенно уменьшает неспецифическое связывание первичных мышинных моноклональных антител и позволяет выявлять макрофаги с высокой эффективностью, сопоставимой с зарубежными данными [19–21].

Следует подчеркнуть, что, несмотря на широту использования мышинных антител в качестве первичных реагентов, их применение на срезах тканей крысы сопряжено с усложнением методических подходов, увеличением трудозатрат и трудностями стандартизации полученных результатов.

Большую популярность в последние десятилетия получили первичные антитела, полученные в организме других животных, например, кролика. Более того, в условиях санкций значительно усложнились способы получения и транспортировки зарубежных реагентов, поэтому особую актуальность приобретают более доступные

аналоги. Одним из производителей таких аналогов является компания Wuhan Servicebio Technology. Новые кроличьи поликлональные антитела к CD68 хорошо зарекомендовали себя в морфологических исследованиях, в том числе на образцах тканей крысы [13, 22, 23]. Эти антитела позволили нам высокоселективно выявить макрофаги на срезах головного мозга крыс. Использование кроличьих антител обеспечивает высокую интенсивность реакции, что значительно упрощает поиск клеток при малом увеличении объектива. Главным преимуществом кроличьих поликлональных антител является отсутствие перекрёстного связывания вторичных реагентов с иммуноглобулинами, которые содержатся в тканях крысы. Отсутствие необходимости использования специальных блокирующих реагентов сокращает временные затраты и уменьшает вероятность ложноположительных результатов. Кроме того, при работе с данными антителами этап теплового демаскирования антигена является факультативным; и его исключение улучшает сохранность срезов без потери качества реакции (например, при использовании свежеприготовленных срезов). Поскольку кроличьи первичные антитела становятся всё более популярными среди исследователей, увеличивается разнообразие вторичных реагентов для их выявления, что, в свою очередь, расширяет возможности их использования.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя изложенные факты, можно заключить, что при использовании мышинных моноклональных антител к CD68 на образцах тканей крысы необходимо проведение теплового демаскирования антигена, повышающего интенсивность специфической реакции, а также применение реагентов, блокирующих неспецифическое связывание иммуноглобулинов. В этих процедурах нет необходимости при использовании кроличьих антител, поскольку реакция и так достаточно интенсивная и специфичная. Кроличьи поликлональные антитела позволяют корректно выявлять макрофаги на срезах тканей мыши, что невозможно при использовании мышинных моноклональных антител. На сегодняшний день вторичные реагенты для выявления мышинных антител на рынке представлены шире, чем для кроличьих, однако наблюдается тенденция к увеличению ассортимента последних.

Таким образом, анализ результатов выявления макрофагов на срезах головного мозга крыс при использовании антител разного происхождения и клональности показал, что кроличьи поликлональные антитела хорошо выявляют макрофаги при более простом протоколе иммуногистохимической реакции по сравнению с мышинными моноклональными антителами, а потому могут быть рекомендованы в качестве полезной альтернативы для окрашивания CD68/макросиалина на срезах тканей крысы.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Вклад авторов.** А.А. Бекетова — проведение исследования, визуализация, написание черновика рукописи, пересмотр и редактирование рукописи; В.А. Разенкова — проведение исследования, работа с данными, написание черновика рукописи, пересмотр и редактирование рукописи; О.В. Кирик — проведение исследования, работа с данными, пересмотр и редактирование рукописи; Д.Э. Коржевский — определение концепции, работа с данными, написание черновика рукописи, пересмотр и редактирование рукописи. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

**Этическая экспертиза.** Исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (протокол № 2/24 от 25 апреля 2024 г.). Исследование проведено в полном соответствии с положениями Хельсинкской декларации (2013 г.).

**Источники финансирования.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, проект № 24-15-00032, <https://rscf.ru/project/24-15-00032/>.

**Раскрытие интересов.** Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими организациями), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

**Оригинальность.** При проведении исследования и создании настоящей статьи авторы не использовали ранее полученные и опубликованные сведения (данные, текст, иллюстрации).

**Доступ к данным.** Авторы предоставляют *ограниченный доступ к данным* (по запросу).

**Генеративный искусственный интеллект.** В ходе подготовки рукописи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовались.

**Рассмотрение и рецензирование.** Рукопись подана в журнал в инициативном порядке и рассмотрена по обычной процедуре.

В рецензировании участвовали два внешних рецензента, член редакционной коллегии и научный редактор издания.

## ADDITIONAL INFORMATION

**Author contributions:** A.A. Beketova: investigation, visualization, writing—original draft, writing—review & editing; V.A. Razenkova: investigation, data curation, writing—original draft, writing—review & editing; O.V. Kirik: investigation, data curation, writing—review & editing; D.E. Korzhevskii: conceptualization, data curation, writing—original draft, writing—review & editing. All the authors approved the version of the manuscript to be published and agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

**Ethics approval:** The study was approved by the Ethics Committee of the Institute of Experimental Medicine (Minutes No. 2/24 dated April 25, 2024). The study was conducted in full accordance with the principles of the Declaration of Helsinki (2013).

**Funding sources:** The study was supported by the Russian Science Foundation, Project No. 24-15-00032, <https://rscf.ru/project/24-15-00032/>.

**Disclosure of interests:** The authors have no relationships, activities, or interests for the last three years related to for-profit or not-for-profit third parties whose interests may be affected by the content of the article.

**Statement of originality:** The authors declare that all data obtained or generated during the preparation of this manuscript are original and have not been previously published.

**Data availability statement:** *Limited data will be available* upon reasonable request.

**Generative AI:** No generative artificial intelligence technologies were used to prepare this article.

**Provenance and peer-review:** This article was submitted unsolicited and reviewed following the standard procedure. The peer-review process involved two external reviewers, a member of the Editorial Board, and the in-house science editor.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Lazarov T, Juarez-Carreño S, Cox N, Geissmann F. Physiology and diseases of tissue-resident macrophages. *Nature*. 2023;618(7966):698–707. doi: 10.1038/s41586-023-06002-x EDN: GMQOPH
- Mildenberger W, Stifter SA, Greter M. Diversity and function of brain-associated macrophages. *Curr Opin Immunol*. 2022;76:102181. doi: 10.1016/j.coi.2022.102181 EDN: PWECFC
- Süß P, Diebold M, Sankowski R. Advances in understanding the immunity of the brain and its borders: Focus on brain macrophages. *Clin Transl Med*. 2024;14(9):e70014. doi: 10.1002/ctm2.70014 EDN: LVCOMH
- Kirik OV, Alekseeva OS, Tsyba DL, Korzhevskii DE. Reaction of the hippocampal microglia to hyperbaric oxygen. *Bull Exp Biol Med*. 2022;173(5):655–659. doi: 10.1007/s10517-022-05607-y EDN: KVPGBR
- Yamate J, Izawa T, Kuwamura M. Histopathological analysis of rat hepatotoxicity based on macrophage functions: in particular, an analysis for thioacetamide-induced hepatic lesions. *Food Saf (Tokyo)*. 2016;4(3):61–73. doi: 10.14252/foodsafetyfscj.2016012
- Martinez-Pomares L, Platt N, McKnight AJ, et al. Macrophage membrane molecules: markers of tissue differentiation and heterogeneity. *Immunobiology*. 1996;195(4–5):407–416. doi: 10.1016/S0171-2985(96)80012-X
- Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(11):723–737. doi: 10.1038/nri3073
- Kunisch E, Fuhrmann R, Roth A, et al. Macrophage specificity of three anti-CD68 monoclonal antibodies (KP1, EBM11, and PGM1) widely used for immunohistochemistry and flow cytometry. *Ann Rheum Dis*. 2004;63(7):774–784. doi: 10.1136/ard.2003.013029
- Holness CL, Simmons DL. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood*. 1993;81(6):1607–1613.
- Holness CL, da Silva RP, Fawcett J, et al. Macrosialin, a mouse macrophage-restricted glycoprotein, is a member of the lamp/lgp family. *J Biol Chem*. 1993;268(13):9661–9666.
- Guselnikova VV, Pavlova VS, Razenkova VA, et al. Detection of macrophages in human and rat heart using a single antibody variant. *Morphology*. 2022;160(2):93–100. doi: 10.17816/morph.200003 EDN: YAXSKZ
- Dijkstra CD, Döpp EA, Joling P, Kraal G. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology*. 1985;54(3):589–599.
- Jin C, Wang K, Ren Y, et al. Role of durotomy on function outcome, tissue sparing, inflammation, and tissue stiffness after spinal cord injury in rats. *MedComm (2020)*. 2024;5(4):e530. doi: 10.1002/mco2.530 EDN: YFHQBQ

14. Rustenhoven J, Kipnis J. Brain borders at the central stage of neuroimmunology. *Nature*. 2022;612(7940):417–429. doi: 10.1038/s41586-022-05474-7 EDN: QPNMWT
15. Jessup E. Antigen retrieval techniques for the demonstration of immunoglobulin light chains in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. *UK NEQAS Newsletter*. 1994;4:12–16.
16. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):671–675. doi: 10.1038/nmeth.2089
17. Martin NA, Nawrocki A, Molnar V, et al. Orthologous proteins of experimental de- and remyelination are differentially regulated in the CSF proteome of multiple sclerosis subtypes. *PLoS One*. 2018;13(8):e0202530. doi: 10.1371/journal.pone.0202530 EDN: VIYQKM
18. Molina-Lopez C, Hurtado-Navarro L, O'Neill LAJ, Pelegrin P. 4-octyl itaconate reduces human NLRP3 inflammasome constitutive activation with the cryopyrin-associated periodic syndrome p.R262W, p.D305N and p.T350M variants. *Cell Mol Life Sci*. 2025;82(1):209. doi: 10.1007/s00018-025-05699-5 EDN: NNMFUS
19. Wu KC, Huang HC, Chang T, et al. Effect of sirolimus on liver cirrhosis and hepatic encephalopathy of common bile duct-ligated rats. *Eur J Pharmacol*. 2018;824:133–139. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.02.016
20. Takeuchi Y, Ueno K, Mizoguchi T, et al. Development of Novel Mouse Model of Ulcers Induced by Implantation of Magnets. *Sci Rep*. 2017;7(1):4843. doi: 10.1038/s41598-017-05250-y EDN: ZWSLMN
21. Chang CC, Lee WS, Hsieh HG, et al. Selective cyclooxygenase inhibition by SC-560 improves hepatopulmonary syndrome in cirrhotic rats. *PLoS One*. 2017;12(6):e0179809. doi: 10.1371/journal.pone.0179809
22. Zeng W, Gao Y, Wang Q, et al. Preliminary clinical analysis and pathway study of S100A8 as a biomarker for the diagnosis of acute deep vein thrombosis. *Sci Rep*. 2024;14(1):13298. doi: 10.1038/s41598-024-61728-6 EDN: QNHADL
23. Li P, Wang K, Yin J, et al. lncRNA LOC100911717-targeting GAP43-mediated sympathetic remodeling after myocardial infarction in rats. *Front Cardiovasc Med*. 2023;9:1019435. doi: 10.3389/fcvm.2022.1019435 EDN: JCXJCK

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

### \*Бекетова Анастасия Алексеевна;

адрес: Россия, 197022, Санкт-Петербург,  
ул. Академика Павлова, д. 12;  
ORCID: 0009-0002-8659-733X;  
eLibrary SPIN: 6780-2677;  
e-mail: beketova.anastasiya@yandex.ru

### Разенкова Валерия Алексеевна, канд. биол. наук;

ORCID: 0000-0002-3997-2232;  
eLibrary SPIN: 8877-8902;  
e-mail: valeriya.raz@yandex.ru

### Кирик Ольга Викторовна, канд. биол. наук;

ORCID: 0000-0001-6113-3948;  
eLibrary SPIN: 5725-8742;  
e-mail: olga\_kirik@mail.ru

### Коржевский Дмитрий Эдуардович, д-р мед. наук,

ORCID: 0000-0002-2456-8165;  
eLibrary SPIN: 3252-3029;  
e-mail: dek2@yandex.ru

## AUTHORS' INFO

### \*Anastasiia A. Beketova;

address: 12 Akademika Pavlova st, Saint Petersburg,  
Russia, 197022;  
ORCID: 0009-0002-8659-733X;  
eLibrary SPIN: 6780-2677;  
e-mail: beketova.anastasiya@yandex.ru

### Valeria A. Razenkova, Cand. Sci. (Biology);

ORCID: 0000-0002-3997-2232;  
eLibrary SPIN: 8877-8902;  
e-mail: valeriya.raz@yandex.ru

### Olga V. Kirik, Cand. Sci. (Biology);

ORCID: 0000-0001-6113-3948;  
eLibrary SPIN: 5725-8742;  
e-mail: olga\_kirik@mail.ru

### Dmitrii E. Korzhevskii, Dr. Sci. (Medicine);

ORCID: 0000-0002-2456-8165;  
eLibrary SPIN: 3252-3029;  
e-mail: dek2@yandex.ru

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author