

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.200003>

Выявление макрофагов в сердце у человека и крысы с использованием одного варианта антител

В.В. Гусельникова, В.С. Павлова, В.А. Разенкова, О.В. Кирик, Д.Э. Коржевский

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Резидентные макрофаги миокарда необходимы для нормального развития и функционирования сердечно-сосудистой системы, но при этом играют важную роль в патогенезе ряда сердечно-сосудистых заболеваний.

Цель исследования — разработка универсального методического подхода для иммуногистохимической идентификации макрофагов в миокарде у человека и крысы.

Материалы и методы. Для исследования использовали образцы миокарда людей обоих полов в возрасте от 28 до 52 лет ($n=7$) и крыс-самок линии Wistar в возрасте 15 мес ($n=5$). Работа выполнена с применением метода иммуногистохимии.

Результаты. Показана возможность применения поликлональных антител к кальций-связывающему белку Iba1, являющемуся известным маркером микроглии, для выявления макрофагов в миокарде. Разработан оптимальный протокол обработки препаратов, который позволяет одинаково эффективно выявлять макрофаги в миокарде у человека и крысы с использованием только одного варианта антител.

Заключение. Предложен универсальный методический подход для идентификации макрофагов в миокарде у человека и крысы, который может быть успешно использован при проведении научных и клинико-диагностических исследований.

Ключевые слова: макрофаги; миокард; Iba1; иммуногистохимия; человек; крыса.

Как цитировать:

Гусельникова В.В., Павлова В.С., Разенкова В.А., Кирик О.В., Коржевский Д.Э. Выявление макрофагов в сердце у человека и крысы с использованием одного варианта антител // Морфология. 2022. Т. 160, № 2. С. 93–100. DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.200003>

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.200003>

Detection of macrophages in human and rat heart using a single antibody variant

Valeria V. Guselnikova, Valeria S. Pavlova, Valeria A. Razenkova, Olga V. Kirik, Dmitrii E. Korzhevskii

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russian Federation

ABSTRACT

BACKGROUND: Resident macrophages of the myocardium are necessary for the normal development and functioning of the cardiovascular system and play an important role in the pathogenesis of a number of cardiovascular diseases.

AIM: To develop a universal methodological approach for the immunohistochemical identification of macrophages in the human and rat myocardium.

MATERIAL AND METHODS: For the study, samples of the myocardium of people of both sexes aged from 28 to 52 years ($n=7$) and Wistar female rats (at the age of 15 months, ($n=5$)) were used. The work was performed using immunohistochemical staining method.

RESULTS: The possibility of using polyclonal antibodies against the calcium-binding protein Iba1, which is a well-known microglial marker marker, for the detection of macrophages in the myocardium was shown. An optimal drug processing protocol was developed, the use of which makes it possible to equally effectively detect macrophages in the human and rat myocardium using only one antibody variant.

CONCLUSION: A universal methodological approach has been proposed for the identification of macrophages in the human and rat myocardium, which can be successfully used in scientific and clinical diagnostic studies.

Keywords: macrophages; cardiac muscle; Iba1; immunohistochemistry; human; rat.

To cite this article:

Guselnikova VV, Pavlova VS, Razenkova VA, Kirik OV, Korzhevskii DE. Detection of macrophages in human and rat heart using a single antibody variant. *Morphology*. 2022;160(2):93–100. DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.200003>

Received: 08.02.2023

Accepted: 20.03.2023

Published: 17.04.2023

ОБОСНОВАНИЕ

Макрофаги сердца привлекают сегодня повышенное внимание исследователей, что обусловлено пониманием ключевой роли этих клеток в регуляции работы сердца в норме. Известно также, что они вносят существенный вклад в патогенез заболеваний сердечно-сосудистой системы [1]. Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), среди которых инфаркт миокарда, ишемическая болезнь сердца, кардиомиопатия, миокардит, сердечная недостаточность, атеросклероз и т.д., остаются в настоящее время основной причиной смертности в мире. В ближайшем будущем можно ожидать роста заболеваемости ССЗ, что является следствием пандемии новой коронавирусной инфекции. Как показывают последние исследования, SARS-CoV-2 способен инфицировать ткани сердца и вызывать развитие широкого спектра поражений сердечно-сосудистой системы [2]. Отмечено, что повреждение сердца является распространённым осложнением среди госпитализированных пациентов с COVID-19 и ассоциировано с более высоким риском внутрибольничной смертности [3]. В условиях развития патологического процесса количество, локализация и морфологические характеристики макрофагов в миокарде могут изменяться [4], что делает выявление этих клеток одним из важных инструментов оценки функционального состояния сердца. Это в свою очередь актуализирует проблему поиска адекватных и надёжных методов визуализации макрофагов в миокарде у человека и животных, используемых для моделирования сердечно-сосудистой патологии.

Широко известный маркер макрофагов — молекула CD68 [5]. Фирмы-производители антител, такие как Invitrogen, Abcam, Bio-Rad Laboratories и т.д., предлагают разные варианты моноклональных антител против различных эпитопов этой молекулы. Причём для исследований образцов тканей человека и лабораторных животных рекомендуется использовать разные клоны антител: например PG-M1, KP1, SP251 для человека и FA-11, ED1 — для лабораторных грызунов. Для специалистов, занимающихся сравнительными исследованиями и работающих с разными объектами, это означает необходимость подбора различных наборов реагентов, а также отработку нескольких протоколов окрашивания, что значительно удорожает и усложняет проводимые исследования. Важен также вопрос о сопоставимости результатов, полученных с применением антител, к разным эпитопам изучаемого антигена. Более удобным в данном случае представляется наличие в арсенале исследователей универсального метода, применимого при работе с тканями и человека, и лабораторных животных, прежде всего крыс, которые наиболее часто используются в биомедицинских исследованиях.

Цель исследования — разработка универсального методического подхода для иммуногистохимической идентификации макрофагов в миокарде у человека и крысы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено в соответствии с этическими нормами (заключение локального этического комитета ФГБНУ «ИЭМ» № 3/21 от 27.10.2021 г. и № 2/22 от 06.04.2022 г.). Материалом для работы служили образцы миокарда людей обоих полов в возрасте от 28 до 52 лет ($n=7$) и крыс-самок линии Wistar в возрасте 15 мес ($n=5$). Образцы миокарда человека, полученные из архива Отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ», фиксировали в 10% формалине и заливали в парафин по стандартной методике. Образцы миокарда крыс, также полученные из архива Отдела общей и частной морфологии, фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде и заливали в парафин. Все исследования проведены с учётом Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12 августа 1977 года N 755) и в полном соответствии с положениями Хельсинкской декларации 1975 года и её пересмотренного варианта 2013 года.

С парафиновых блоков на ротационном микротоме Rotary 3003 PFM Medical (PFM Medical, Германия) были изготовлены срезы толщиной 5 мкм, которые наклеивали на стёкла со специальным адгезивным покрытием HistoBond (Marienfeld, Германия). Для иммуногистохимической идентификации макрофагов применяли мышиные моноклональные (клон PG-M1) антитела к трансмембранному лизосомальному белку CD68 (Agilent, США) и кроличьи поликлональные антитела к кальций-связывающему белку Iba1 (ionized calcium-binding adaptor molecule 1) (HuaBio, КНР). В качестве вторичных реагентов использовали набор UltraVision Quanto Detection System HRP DAB (Thermo Fisher Scientific, США). Визуализацию продукта реакции проводили с помощью 3,3-диаминобензидина (DAB), приготовленного в соответствии с рекомендациями производителя. Часть срезов подкрашивали водным раствором альцианового синего (конечная концентрация красителя — 10 г/л) или водными растворами альцианового синего и ядерного прочного красного (конечная концентрация красителя — 5 г/л) (Sigma-Aldrich, США). Полученные препараты фотографировали, снимки анализировали с помощью светового микроскопа Leica DM750 (Leica Microsystems, Германия), используя объектив HI PLAN 40x/0.65 (Leica Microsystems, Германия). Для анализа изображений применяли компьютерную программу LAS EZ (Leica Microsystems, Швейцария).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Предлагаемый авторами методический подход для выявления макрофагов в миокарде человека и крысы основан на применении кроличьих поликлональных антител к кальций-связывающему белку Iba1. На основании подбора различных условий инкубации нами разработан оптимальный протокол обработки препаратов, который представлен в табл. 1.

Таблица 1. Поэтапный протокол обработки препаратов**Table 1.** Step-by-step slide preparation protocol

Этап обработки	Время инкубации	Температура, °C
1. Депарафинирование по схеме: ксилол I ксилол II этанол 96% I этанол 96% II этанол 70%	По 5 мин в каждом	Комнатная
2. Дистиллированная вода	5 мин	Комнатная
3. Тепловое демаскирование антигена в 10% водном растворе тиосульфата натрия, предварительно нагретом до 60°C*	23 мин	В пароварке при 100 °C
4. Дистиллированная вода	5 мин	Комнатная
5. 3% водный раствор перекиси водорода	5 мин	Комнатная
6. Дистиллированная вода	5 мин	Комнатная
7. Забуференный фосфатами 0,14 М водный раствор NaCl (фосфатно-солевой буфер, PBS), pH=7,4 («Биолот», Россия)	5 мин	Комнатная
8. Блокаторочный раствор Protein Block (Spring Bioscience, США)	10 мин	Комнатная
9. Раствор первичных антител против белка Iba1 (HuaBio, КНР), разведённый коммерческим разбавителем Primary Antibody Diluent (Diagnostic BioSystems, США) в соотношении 1:900	96 ч	27 °C (во влажной камере)
10. PBS	5 мин	Комнатная
11. Primary antibody amplifier**	15 мин	27 °C (во влажной камере)
12. PBS	5 мин	Комнатная
13. HRP-polymer**	15 мин	27 °C (во влажной камере)
14. PBS	5 мин	Комнатная
15. Дистиллированная вода	5 мин	Комнатная
16. Рабочий раствор хромогена 3,3-диаминобензидина (DAB)**	1–2 мин с контролем развития реакции под микроскопом	Комнатная
17. Дистиллированная вода	5 мин	Комнатная
18. Обезвоживание и просветление срезов по схеме: изопропиловый спирт I изопропиловый спирт II смесь изопропилового спирта и ксилола (1:1) ксилол I ксилол I	По 5 мин в каждом	Комнатная
19. Заключение препаратов под покровное стекло в перманентную среду Cytoseal (Richard-Allan Scientific, США)		

* Для теплового демаскирования свежеприготовленный 10% водный раствор тиосульфата натрия рекомендуется налить в сосуд Хеллендахела и нагреть в термостате до 60 °C. После этого в сосуд необходимо поместить предметные стёкла, проверив, чтобы срезы были полностью покрыты раствором. Далее сосуд Хеллендахела с предметными стёклами следует поместить в бытовую пароварку, выставив таймер на 23 мин. После окончания времени работы прибора и автоматического отключения нагревателя необходимо достать сосуд Хеллендахела из пароварки и оставить при комнатной температуре с закрытой крышкой на 10 мин, дав раствору остыть. После этого можно переходить к следующему этапу обработки препаратов. ** Компоненты набора UltraVision Quanto Detection System HRP DAB (Thermo Fisher Scientific, США).

* For heat-induced antigen demasking, a freshly prepared 10% aqueous solution of sodium thiosulfate is recommended to be poured into a staining vessel (Hellendahl type) and heated in a thermostat to 60 °C. After that, slides should be placed in the vessel, checking that the slices are completely covered with the solution. Next, the Hellendahl vessel with slides should be placed in a household steamer, setting the timer for 23 minutes. After the end of the operating time of the device and the automatic shutdown of the heater, it is necessary to remove the Hellendahl vessel from the steamer and leave it at room temperature with the lid closed for 10 minutes, allowing the solution to cool down. After that, you can proceed to the next stage of slide staining.

** Components of the UltraVision Quanto Detection System HRP DAB kit (Thermo Fisher Scientific, USA).

После проведения иммуногистохимической реакции (ИГХ-реакции) и промывки препаратов в дистиллированной воде (см. табл. 1, пп. 16, 17) может быть рекомендована подкраска срезов альциановым синим или альциановым синим в комбинации с ядерным прочным красным. Для этого на срезы необходимо нанести водный раствор красителя альцианового синего 8GX (Sigma-Aldrich, США) и оставить на 20 мин во влажной камере в термостате при температуре 40 °С, затем удалить краситель со срезов и промыть препараты в дистиллированной воде в течение 5 мин. После этого можно дополнительно нанести на срезы водный раствор красителя ядерного прочного красного (Sigma-Aldrich, США) и инкубировать 2 мин при комнатной температуре, затем промыть препараты в дистиллированной воде в течение 5 мин и заключить их в перманентную среду стандартным способом (см. табл. 1, пп. 18, 19).

Результаты применения разработанного протокола представлены на рис. 1.

После постановки ИГХ-реакции с использованием антител к белку Iba1 в миокарде человека чётко выявлялись иммунопозитивные клетки (рис. 1, *a*, стрелки). Реакция характеризуется высокой интенсивностью и отсутствием фонового окрашивания, благодаря чему эти клетки легко идентифицировались. Они были локализованы в пределах соединительнотканых прослоек миокарда и располагались поодиночке или в виде небольших скоплений, иногда формируя цепочки. Выявляемые клетки имели преимущественно овальную или вытянутую форму. Цитоплазма клеток Iba1+ была окрашена в коричневый или коричнево-чёрный цвет, иногда в ней просматривалось (в виде более светлой области) место локализации ядра. Некоторые клетки имели тонкие длинные отростки, которые были хорошо различимы благодаря интенсивной окраске (см. рис. 1, *a*, стрелки).

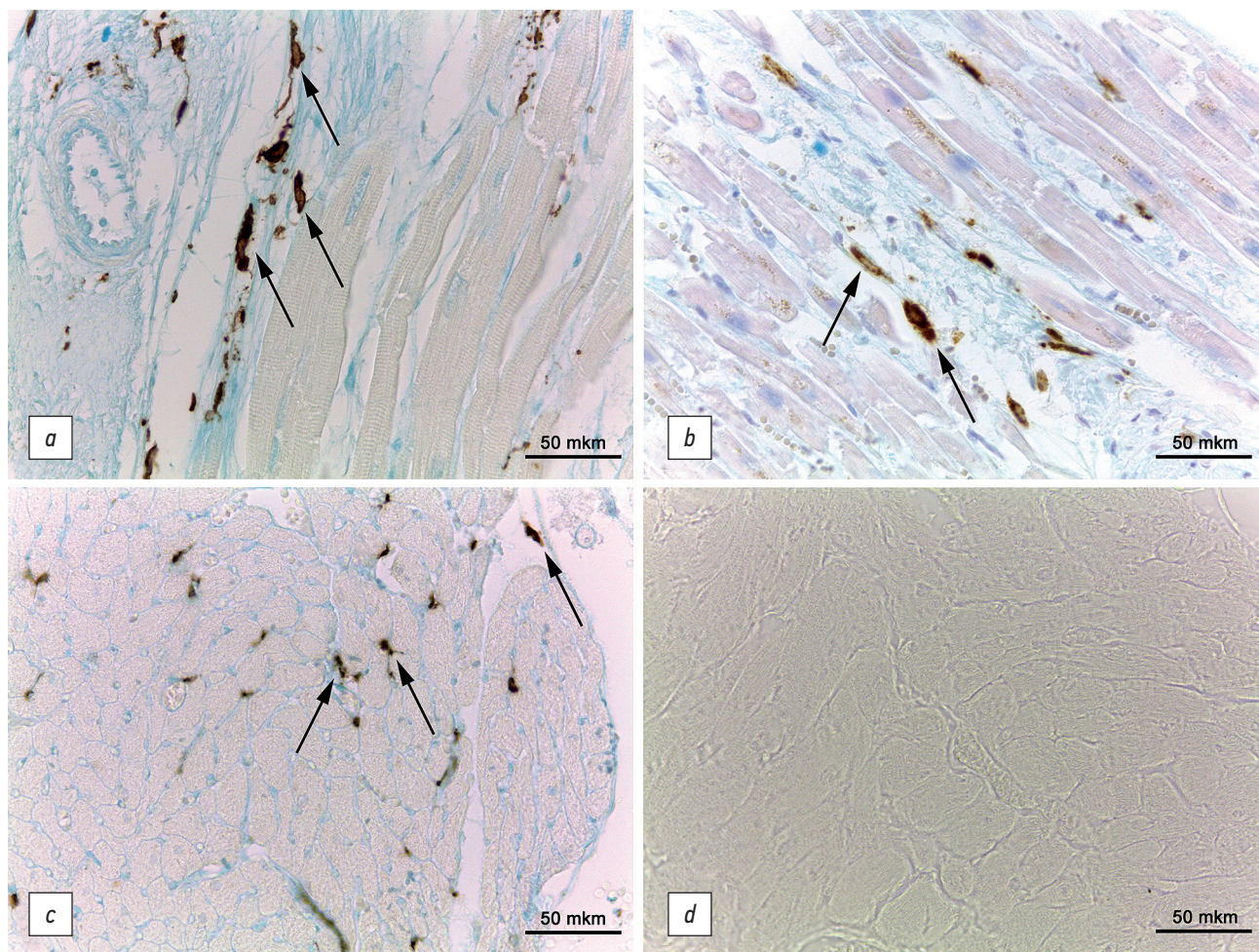


Рис. 1. Макрофаги в миокарде у человека и крысы: *a, b* — миокард человека, *c, d* — миокард крысы. Иммуногистохимическая реакция с использованием анти-Iba1-антител (*a, c*) и анти-CD68-антител (клон PG-M1) (*b, d*). Подкраска альциановым синим (*a*) и альциановым синим + ядерным прочным красным (*b, c*). Стрелки указывают на макрофаги. Объектив HI PLAN 40x/0.65 (Leica Microsystems, Германия).

Fig. 1. Macrophages in the myocardium of human and rat: *a, b* — human myocardium, *c, d* — rat myocardium. Immunohistochemical analysis using anti-Iba1 antibodies (*a, c*) and anti-CD68 antibodies (PG-M1 clone) (*b, d*). Counterstain with alcian blue (*a*) or alcian blue + nuclear fast red (*b, c*). The arrows represent the macrophage. HI PLAN 40x/0.65 lens (Leica Microsystems, Germany).

Аналогичные клетки идентифицировались в миокарде человека после постановки ИГХ-реакции на панмакрофагальный маркер CD68 (рис. 1, *b*, стрелки). Выявляемые макрофаги имели ту же локализацию и особенности строения (форму, размер), что и Iba1-иммунопозитивные клетки.

В миокарде крысы после постановки ИГХ-реакции на Iba1 также были выявлены многочисленные иммунопозитивные клетки (рис. 1, *c*, стрелки). Как и в случае миокарда человека, эти клетки были локализованы в пределах соединительнотканых прослоек, где располагались поодиночке или небольшими группами. Они были меньшего размера по сравнению с клетками Iba1+ в миокарде у человека, но, как и последние, характеризовались преимущественно овальной или вытянутой формой и иногда имели тонкие отростки. Интенсивность окраски продукта ИГХ-реакции в данном случае была сопоставима с таковой, наблюдаемой на срезах миокарда человека (см. рис. 1, *c*, стрелки). При использовании антител к молекуле CD68 (клон PG-M1) на срезах миокарда крысы продукт ИГХ-реакции полностью отсутствовал (рис. 1, *d*).

После подкраски срезов альциановым синим наблюдалось окрашивание соединительной ткани миокарда в голубой цвет (см. рис. 1, *a*). Ядерный прочный красный окрашивал ядра клеток (в разные оттенки от розового до фиолетового), а также мышечную ткань (в светло-розовый цвет) (см. рис. 1, *b*).

ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из наиболее часто используемых методов визуализации макрофагов на гистологических срезах является ИГХ-реакция с применением антител против молекулы CD68. Это сильно гликозилированный трансмембранный белок, который локализован преимущественно в мембране поздних эндосом и лизосом и вовлечён в процесс фагоцитоза, осуществляемый макрофагами [6]. Показано, что применение антител против CD68 позволяет выявлять макрофаги в разных тканях, в том числе альвеолярные макрофаги, макрофаги миндалин, красной пульпы селезёнки, дермы, клетки Купфера печени [5, 7]. В соответствии с этими данными нами была продемонстрирована эффективность использования мышиных моноклональных (клон PG-M1) антител к CD68 для идентификации макрофагов в миокарде у человека. Однако при использовании этих же антител на препаратах миокарда крысы продукт ИГХ-реакции полностью отсутствовал. Согласно данным литературы, гомолог CD68 у грызунов — макросиалин — обладает 80,6% сходством аминокислотной последовательности с молекулой CD68 человека [5, 7]. Вероятно, имеющиеся у CD68 и макросиалина структурные различия затрагивают участки антигенных детерминант, с которыми взаимодействуют антитела клона PG-M1, вследствие чего антитела этого клона оказываются видоспецифичными и могут быть использованы для идентификации макрофагов в тканях у человека, но не у крысы.

Проведя предварительный скрининг литературы, а также анализ собственных накопленных экспериментальных данных, мы предположили, что антитела против кальций-связывающего белка Iba1 могут оказаться эффективными для выявления макрофагов в миокарде у человека и крысы. Iba1 — широко используемый иммуногистохимический маркер микроглии (особой разновидности тканевых макрофагов центральной нервной системы). Основной функцией Iba1 считается участие в реорганизации цитоскелета и изменении конфигурации плазматической мембраны при фагоцитозе [8]. Важная особенность данного маркера — высокая межвидовая консервативность антигенных эпитопов. Это позволяет использовать антитела к белку Iba1 для выявления микроглии у разных лабораторных животных и человека [9]. Кроме того, в работе [10] отмечено, что Iba1 обнаруживается в типичных тканевых макрофагах за пределами нервной системы, например в клетках Купфера.

В представленной работе доказана возможность использования антител к белку Iba1 для идентификации макрофагов в миокарде у человека и у крысы. В рамках отработки протокола окраски нами была проверена необходимость процедуры теплового демаскирования антигена, протестированы различные варианты растворов для теплового демаскирования, разные разведения первичных антител, несколько вариантов вторичных реагентов, разные режимы инкубации в первичных антителах и вторичных реагентах, а также несколько вариантов подкраски срезов после постановки ИГХ-реакции. В результате разработан оптимальный протокол обработки препаратов, который позволяет одинаково эффективно выявлять макрофаги в миокарде у человека и у крысы. В обоих случаях клетки интенсивно окрашены, а фоновое окрашивание ткани полностью отсутствует. Это делает возможным автоматизированный подсчёт числа макрофагов на единицу площади ткани сердца. Разработанный протокол предполагает использование только одного варианта антител для работы с миокардом человека и крысы, что делает его универсальным методом, пригодным как для клинических исследований, так и для экспериментальных работ.

Одной из особенностей разработанного протокола является использование для теплового демаскирования антигена тиосульфата натрия. Ранее нами было показано [11], что его применение даёт возможность эффективно демаскировать антигены при ИГХ-окрашивании, позволяя добиться столь же хороших результатов, что и при использовании дорогостоящих импортных растворов. Применение для демаскирования тиосульфата натрия позволяет осуществлять исследование архивного материала, хранящегося в парафиновых блоках, и хорошо подходит для обработки тонких срезов.

Ещё одна особенность предложенного протокола — использование для подкраски срезов после постановки ИГХ-реакции двух гистохимических красителей:

альцианового синего и ядерного прочного красного. Мы считаем, что такая комбинированная методика подкраски препаратов имеет ряд преимуществ перед окраской гематоксилином, которая является традиционным способом подкраски препаратов после постановки ИГХ-реакции для световой микроскопии. По сравнению с гематоксилином, который позволяет визуализировать только ядра клеток, подкраска срезов альциановым синим и ядерным прочным красным значительно более информативна, даёт возможность выявлять несколько разных структур на срезе. Альциановый синий окрашивает соединительную ткань в голубой цвет, усиливая контрастность выявления макрофагов, которые локализируются именно в соединительнотканых прослойках миокарда. Кроме того, альциановый синий окрашивает тучные клетки [12] и скопления амилоида [13], делая возможным изучение взаимного расположения макрофагов с этими структурами, а также выявление корреляционных зависимостей. Применение ядерного прочного красного для подкраски срезов позволяет идентифицировать ядра всех клеток в ткани, а также тяжи кардиомиоцитов, что помогает лучше ориентироваться в структурах препарата. Предложенный метод комбинированной подкраски срезов альциановым синим/ядерным прочным красным характеризуется простотой, так как не предполагает дифференцировки окрасок в воде или спирте с контролем процесса под микроскопом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках представленной работы предложен новый подход для иммуногистохимической идентификации макрофагов в миокарде. Разработанный метод состоит в использовании антител к кальций-связывающему белку Iba1, который доступен в современных условиях и позволяет эффективно выявлять макрофаги в миокарде у человека и у крысы. Это свидетельствует о перспективности использования предложенного метода для научных и клинико-диагностических исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zaman R., Epelman S. Resident cardiac macrophages: heterogeneity and function in health and disease // *Immunity*. 2022. Vol. 55, N 9. P. 1549–1563. doi: 10.1016/j.immuni.2022.08.009
2. Almamlouk R., Kashour T., Obeidat S., et al. COVID-19-associated cardiac pathology at the postmortem evaluation: a collaborative systematic review // *Clin Microbiol Infect*. 2022. Vol. 28, N 8. P. 1066–1075. doi: 10.1016/j.cmi.2022.03.021
3. Shi S., Qin M., Shen B., et al. Association of cardiac injury with mortality in hospitalized patients with COVID-19 in Wuhan, China // *JAMA Cardiol*. 2020. Vol. 5, N 7. P. 802–810. doi: 10.1001/jamacardio.2020.0950
4. Гомбожапова А.Э., Роговская Ю.В., Ребенкова М.С., и др. Cd68 и стабиллин-1 позитивные макрофаги в постинфарктной регенерации миокарда // *Российский кардиологический журнал*. 2017. Т. 22, № 11. С. 56–61. doi: 10.15829/1560-4071-2017-11-56-61

ДОПОЛНИТЕЛЬНО

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины», № документа 122020300199-5.

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

Вклад авторов. Авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Наибольший вклад распределён следующим образом: В.В. Гусельникова — анализ литературы, интерпретация результатов, написание статьи; В.С. Павлова — сбор и обработка биологического материала, постановка гистохимических реакций; В.А. Разенкова — постановка иммуногистохимических реакций, работа с иллюстрациями; О.В. Кирик — постановка иммуногистохимических реакций, фотографирование и анализ препаратов; Д.Э. Коржевский — концепция и дизайн исследования, редактирование текста.

ADDITIONAL INFORMATION

Funding source. The work was carried out within the framework of the state assignment of the Institute of Experimental Medicine, Document No. 122020300199-5.

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.V. Gusel'nikova — literature analysis, interpretation of the results, writing the text; V.S. Pavlova — collection and processing of biological material, setting up histochemical reactions; V.A. Razenkova — setting up immunohistochemical reactions, working with illustrations; O.V. Kirik — staging of immunohistochemical reactions, photography and analysis of preparations; D.E. Korzhevsky — concept and design of the study, text editing.

5. 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. Vol. 63, N 7. P. 774–784. doi: 10.1136/ard.2003.013029
6. Chistiakov D.A., Killingsworth M.C., Myasoedova V.A., et al. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker // *Lab Invest*. 2017. Vol. 97, N 1. P. 4–13. doi: 10.1038/labinvest.2016.116
7. Holness C.L., Simmons D.L. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins // *Blood*. 1993. Vol. 81, N 6. P. 1607–1613.
8. Кирик О.В., Сухорукова Е.Г., Коржевский Д.Э. Кальций-связывающий белок Iba-1/AIF-1 в клетках головного мозга крысы // *Морфология*. 2010. Т. 137, № 2. С. 5–8.

9. Алексеева О.С., Кирик О.В., Гилерович Е.Г., Коржевский Д.Э. Микроглия головного мозга: происхождение, структура и функции // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2019. Т. 55, № 4. С. 231–241. doi: 10.1134/S0044452919040028
10. Wijesundera K.K., Izawa T., Tennakoon A.H., et al. M1- and M2-macrophage polarization in rat liver cirrhosis induced by thioacetamide (TAA), focusing on Iba1 and galectin-3 // *Exp Mol Pathol*. 2014. Vol. 96, N 3. P. 382–392. doi: 10.1016/j.yexmp.2014.04.003
11. Патент РФ на изобретение № 2719163 С1/17.04.2020. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Алексеева О.С. Способ демаскирования антигенов при проведении иммуноцитохимических реакций. Ре-

- жим доступа: <https://iemspb.ru/patents/коржевский-д-э-кирик-о-в-алексеева-о-с-с/>
12. Григорьев И.П., Коржевский Д.Э. Современные технологии визуализации тучных клеток для биологии и медицины (обзор) // Современные технологии в медицине. 2021. Т. 13, № 4. С. 93–109. doi: 10.17691/stm2021.13.4.10
13. Гусельникова В.В., Федорова Е.А., Гудкова А.Я., и др. Транстиретиновая амилоидная кардиомиопатия. Особенности гистологической диагностики: дизайн исследования // Терапевтический архив. 2022. Т. 94, № 4. С. 473–478. doi: 10.26442/00403660.2022.04.201464

REFERENCES

1. Zaman R, Epelman S. Resident cardiac macrophages: heterogeneity and function in health and disease. *Immunity*. 2022;55(9):1549–1563. doi: 10.1016/j.immuni.2022.08.009
2. Almamlouk R, Kashour T, Obeidat S, et al. COVID-19-associated cardiac pathology at the postmortem evaluation: a collaborative systematic review. *Clin Microbiol Infect*. 2022;28(8):1066–1075. doi: 10.1016/j.cmi.2022.03.021
3. Shi S, Qin M, Shen B, et al. Association of cardiac injury with mortality in hospitalized patients with COVID-19 in Wuhan, China. *JAMA Cardiol*. 2020;5(7):802–810. doi: 10.1001/jamacardio.2020.0950
4. Gombozhapova AE, Rogovskaya YuV, Rebenkova MS. CD68 and stabilin-1 positive macrophages in postinfarction myocardial regeneration. *Russian Journal of Cardiology*. 2017;22(11):56–61. (In Russ). doi: 10.15829/1560-4071-2017-11-56-61
5. 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
6. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, et al. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest*. 2017;97(1):4–13. doi: 10.1038/labinvest.2016.116
7. Holness CL, Simmons DL. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood*. 1993;81(6):1607–1613.
8. Kirik OV, Sukhorukova YeG, Korzhevskiy DE. Calcium-binding Iba-1/AIF-1 protein in rat brain cells. *Morphology*. 2010;137(2):5–8. (In Russ).
9. Alekseeva OS, Kirik OV, Gilerovich EG, Korzhevskii DE. Microglia of the brain: origin, structure and functions. *Zhurnal evolyutsionnoi biokhimii i fiziologii*. 2019;55(4):231–241. (In Russ). doi: 10.1134/S0044452919040028
10. Wijesundera KK, Izawa T, Tennakoon AH, et al. M1- and M2-macrophage polarization in rat liver cirrhosis induced by thioacetamide (TAA), focusing on Iba1 and galectin-3. *Exp Mol Pathol*. 2014;96(3):382–392. doi: 10.1016/j.yexmp.2014.04.003
11. Патент RUS N 2719163 C1/17.04.2020. Korzhevskij DJe, Kirik OV, Alekseeva OS. Sposob demaskirovaniya antigenov pri provedenii immunocitohimicheskikh reakcij. Available from: <https://iemspb.ru/patents/коржевский-д-э-кирик-о-в-алексеева-о-с-с-с/> (In Russ).
12. Grigorev IP, Korzhevskii DE. Modern imaging technologies of mast cells for biology and medicine (review). *Sovrem Tekhnol Med*. 2021;13(4):93–107. (In Russ). doi: 10.17691/stm2021.13.4.10
13. Gusel'nikova VV, Fedorova EA, Gudkova AJ, et al. Transthyretin amyloid cardiomyopathy. Features of histological diagnosis: study design. *Ter Arkh*. 2022;94(4):473–478. (In Russ). doi: 10.26442/00403660.2022.04.201464

ОБ АВТОРАХ

- * **Кирик Ольга Викторовна**, к.б.н.;
адрес: Российская Федерация, 197022, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр-т, д. 71;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6113-3948>;
eLibrary SPIN: 5725-8742; e-mail: olga_kirik@mail.ru
- Гусельникова Валерия Владимировна**, к.б.н.;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9499-8275>;
eLibrary SPIN: 5115-4320; e-mail: guselnicova.valeriia@yandex.ru
- Павлова Валерия Сергеевна**;
ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-8434-0498>;
e-mail: herondale.valery@gmail.com
- Разенкова Валерия Алексеевна**;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3997-2232>;
eLibrary SPIN: 8877-8902; e-mail: valeriya.raz@yandex.ru
- Коржевский Дмитрий Эдуардович**, д.м.н., профессор;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2456-8165>;
eLibrary SPIN: 3252-3029; e-mail: DEK2@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

AUTHORS' INFO

- * **Olga V. Kirik**, Cand. Sci. (Biol.);
address: 71 Kamennooostrovsky avenue, 197022 Saint Petersburg, Russian Federation;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6113-3948>;
eLibrary SPIN: 5725-8742; e-mail: olga_kirik@mail.ru
- Valeria V. Guselnikova**, Cand. Sci. (Biol.);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9499-8275>;
eLibrary SPIN: 5115-4320; e-mail: guselnicova.valeriia@yandex.ru
- Valeria S. Pavlova**;
ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-8434-0498>;
e-mail: herondale.valery@gmail.com
- Valeria A. Razenkova**;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3997-2232>;
eLibrary SPIN: 8877-8902; e-mail: valeriya.raz@yandex.ru
- Dmitrii E. Korzhevskii**, Dr. Sci. (Med.), Professor;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2456-8165>;
eLibrary SPIN: 3252-3029; e-mail: DEK2@yandex.ru