

# ТЕХНОЛОГИЯ КОМБИНИРОВАННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ МАКРОФАГОВ И КОЛЛАГЕНОВЫХ ВОЛОКОН В ПРЕПАРАТАХ ПЕЧЕНИ

DOI: 10.17691/stm2024.16.3.03

УДК 616.36–018:576.3

Поступила 7.12.2023 г.



**И.А. Никитина**, младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной гистологии и конфокальной микроскопии отдела общей и частной морфологии;

**В.А. Разенкова**, младший научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии;

**Е.А. Федорова**, к.б.н., научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии;

**О.В. Кирик**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии;

**Д.Э. Коржевский**, д.м.н., профессор РАН, зав. лабораторией функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы; зав. отделом общей и частной морфологии

Институт экспериментальной медицины, ул. Академика Павлова, 12, Санкт-Петербург, 197376

Значимость оценки развития патологических изменений в печени как при проведении фундаментальных исследований, так и в диагностической практике обуславливает необходимость иметь в арсенале исследователя удобный способ оценки функционального состояния резидентных макрофагов и волокон соединительной ткани.

**Цель исследования** — оценить возможности технологии комбинированного гисто-иммуногистохимического выявления коллагеновых волокон соединительной ткани и резидентных макрофагов печени с использованием гистохимического красителя анилинового синего и доступных антител к микроглиальному маркеру — белку Iba-1.

**Материалы и методы.** Исследование проводили на образцах печени половозрелых крыс (n=6). Для окраски соединительной ткани использовали 2% водный раствор анилинового синего (Unisource Chemicals Pvt. Ltd., Индия). С целью выявления резидентных макрофагов печени применяли моноклональные кроличьи антитела к белку Iba-1 (клон JM36-62; ET1705-78; HuaBio, Китай), при этом использовали цинк-этанол-формальдегид в качестве фиксатора.

**Результаты.** Способ комбинированного окрашивания во всех исследованных образцах печени позволил выявить множество Iba-1-иммунопозитивных структур, морфологически соответствующих клеткам Купфера и макрофагам соединительной ткани, фонового окрашивания не наблюдалось. Окрашивание анилиновым синим в образцах печени было избирательным, равномерным и четким и позволило дифференцировать соединительную ткань во всех исследованных образцах. Исключение этапа теплового демаскирования не оказало негативного влияния на выявляемость макрофагов, позволило снизить вероятность неспецифического окрашивания волокон коллагена анилиновым синим и обеспечило общую сохранность тинкториальных свойств ткани печени.

**Заключение.** Представленный протокол комбинированного гисто-иммуногистохимического выявления клеток Купфера и волокон соединительной ткани, примененный на препаратах печени крысы, позволяет эффективно использовать морфометрический анализ и может быть востребован в патогистологических, клинических и доклинических исследованиях.

**Ключевые слова:** печень; макрофаги; клетки Купфера; Iba-1.

**Как цитировать:** Nikitina I.A., Razenkova V.A., Fedorova E.A., Kirik O.V., Korzhevskii D.E. Technology of combined identification of macrophages and collagen fibers in liver samples. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2024; 16(3): 24, <https://doi.org/10.17691/stm2024.16.3.03>

Для контактов: Никитина Инга Александровна, e-mail: inga06819@gmail.com

## Technology of Combined Identification of Macrophages and Collagen Fibers in Liver Samples

**I.A. Nikitina**, Junior Researcher, Laboratory of Experimental Histology and Confocal Microscopy, Department of General and Special Morphology;

**V.A. Razenkova**, Junior Researcher, Laboratory of Functional Morphology of Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology;

**E.A. Fedorova**, PhD, Researcher, Laboratory of Functional Morphology of Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology;

**O.V. Kirik**, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Functional Morphology of Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology;

**D.E. Korzhevskii**, MD, DSc, Professor of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Functional Morphology of Central and Peripheral Nervous System; Head of the Department of General and Special Morphology

The Institute of Experimental Medicine, 12 Akademika Pavlova St., Saint Petersburg, 197376, Russia

The importance of identifying pathological changes in the liver both in fundamental researches and in diagnostic practice dictates the necessity to have a convenient method of assessing functional condition of resident macrophages and connective tissue fibers.

**The aim of the study** is to assess the technology of combined histo-immunohistochemical detection of collagen fibers of connective tissue and resident liver macrophages using aniline blue histological stain and available antibodies to the microglial marker, the Iba-1 protein.

**Materials and Methods.** Liver samples from adult rats ( $n=6$ ) have been used in the study. The connective tissue was stained with a 2% aqueous solution of aniline blue (Unisource Chemicals Ltd., India). Monoclonal rabbit antibodies to Iba-1 (Clone JM36-62; ET1705-78; HuaBio, China) were used to detect resident liver macrophages, zinc-ethanol-formaldehyde was employed as a fixative.

**Results.** The combined staining method allowed us to detect numerous Iba-1-immunopositive structures corresponding morphologically to Kupffer cells and connective tissue macrophages, background staining was not observed. Staining with aniline blue in the liver samples was selective, uniform, and clear, and allowed for differentiation of the connective tissue in all examined samples. Exclusion of the heat-induced epitope retrieval stage caused no negative effect on identification of macrophages, reduced the probability of non-specific staining of the collagen fibers with aniline blue, and ensured general preservation of tinctorial properties of the liver tissue.

**Conclusion.** The presented protocol of combined histo-immunohistochemical identification of Kupffer cells and connective tissue fibers, applied on the rat liver samples, makes it possible to perform effectively the morphometric analysis and may find its application in pathohistological, clinical, and preclinical investigations.

**Key words:** liver; macrophages; Kupffer cells; Iba-1.

### Введение

Клетки Купфера — резидентные макрофаги печени, которые находятся в тесном контакте с синусоидными капиллярами печени и играют важную роль в мононуклеарной фагоцитарной системе организма. Функции данных клеток многообразны: фагоцитоз клеточного дебриса и токсинов, поступающих в печень по воротной вене; участие в метаболизме липидов (включая холестерин) и белков; обеспечение иммунного надзора; поддержание и регуляция иммунной толерантности организма [1]. Кроме того, одной из важных функций клеток Купфера является их взаимодействие с фибробластами и миофибробластами — клетками, ответственными за синтез и секрецию предшественников коллагена.

Недавние исследования показали, что провоспалительная активация макрофагов в различных тканях и органах индуцирует высвобождение интерлейки-

нов IL-4 и IL-13, а также профибротических факторов (TGF- $\beta$ 1, FGF-2, PDGF), стимулирующих эпителиально-мезенхимальную трансформацию и отложение продукции внеклеточного матрикса. Данный процесс приводит к ремоделированию внеклеточного матрикса соединительной ткани и патологическому ангиогенезу, которые в свою очередь форсируют стойкую гиперактивацию фибробластов и миофибробластов [2]. Таким образом, одной из функций макрофагов в органах и тканях (в частности, клеток Купфера в печени) является профиброгенная регуляция.

Для гистологической практики большое значение имеет разработка новых универсальных подходов, которые объединяют в себе преимущества классических гистологических методов окрасок и иммуногистохимических реакций. Одновременное исследование функционального состояния клеток Купфера и соединительной ткани обеспечивает возможность изучения развития механизмов патологических изменений

в печени. Наиболее часто применяемыми способами для изучения соединительной ткани на препаратах являются гистологические методы окраски по Ван-Гизону и трихромные методы окрашивания по Маллори и Массону с анилиновым синим [3–7]. Все эти методы могут применяться для окрашивания тканей печени как в норме, так и при патологии. Однако при использовании классических гистологических методов окраски клетки Купфера не выявляются. Ранее нами было показано [8], что для обнаружения клеток Купфера удобно использовать иммуногистохимическую реакцию на микроглиальный белок Iba-1. Следовательно, для одновременного определения соединительной ткани и клеток Купфера целесообразно применить сочетание гистологической окраски коллагеновых волокон анилиновым синим и иммуногистохимического выявления данных клеток с использованием реакции на белок Iba-1. Стоит отметить, что возможность изменений свойств тканей вследствие абсорбции красителя при последовательной обработке материала для двух вариантов исследования делает результат подобного подхода неочевидным.

В связи с этим **целью настоящего исследования** стала оценка возможности комбинированного подхода для одновременного выявления клеток Купфера и волокнистого компонента соединительной ткани на препаратах печени.

## Материалы и методы

Исследование проводили на образцах печени половозрелых (4–6 мес) крыс линий Wistar (n=3) и SHR (n=3). Крысы были получены из питомников лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская область, Россия) и «Пушино» (Московская область, Россия), содержались в виварии при комнатной температуре, в стандартных условиях, со свободным доступом к пище и воде. При содержании и умерщвлении животных соблюдали этические принципы, установленные Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006), и Приказ №199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» (Россия, 2016). При проведении исследования были соблюдены все применимые международные принципы использования животных. Исследование было одобрено локальным Этическим комитетом Института экспериментальной медицины (Санкт-Петербург).

Для исследования использовали левую долю печени. Образцы печени фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [9] в течение 18–24 ч при комнатной температуре. Фиксированный материал заливали в парафин по стандартной методике и изготавливали по одному блоку с каждой исследуемой доли печени. С парафиновых блоков на ротационном микротоме Microm HM 325 (Thermo Fisher Scientific, США) выполняли срезы толщиной 5 мкм, которые далее монтиро-

вали на предметные стекла с адгезивным покрытием (HistoBond®+M adhesive microscope slides, Marienfeld, Германия). Затем проводили стандартные процедуры депарафинирования и регидратации.

Для выявления резидентных макрофагов печени применяли моноклональные кроличьи антитела к Iba-1 (клон JM36-62; ET1705-78; HuaBio, Китай). В качестве вторичного реагента для первичных кроличьих антител использовали набор UltraVision Quanto Detection System HRP DAB (Thermo Fisher Scientific, США). Срезы окрашивали раствором 2% водного анилинового синего (Unisource Chemicals Pvt. Ltd., Индия), являющегося компонентом трихромной окраски Маллори и Массона, подкисленного ледяной уксусной кислотой. Для окрашивания срезов сначала наносили протраву (фосфорномолибденовую кислоту), затем — свежеприготовленный раствор анилинового синего.

После дегидратации в изопропанол и просветления в ортоксилале полученные препараты заключали в перманентную среду Cytoseal 60 (Richard-Allan Scientific, США) и анализировали с помощью светового микроскопа Zeiss Axio Scope.A1 (Carl Zeiss, Германия). Фотографирование гистологических препаратов проводили с использованием фотокамеры Zeiss AxioCam 105 color (объективы A-Plan 20×/0.45; 40×/0.65) и программы ZEN 3 (Carl Zeiss, Германия).

Морфометрический анализ полученных изображений выполняли с помощью программы ImageJ2 в расширении FIJI [10]. Для количественной оценки междольковой соединительной ткани и плотности распределения Iba-1-положительных элементов изображения были предварительно сегментированы на основе 4 цветов (красный, желтый, синий, белый) с использованием плагина IJ-Plugins Toolkit [11] и алгоритма k-средних (k-means). В результате сегментации получены бинаризованные изображения, соответствующие исследуемым структурам. Общую площадь Iba-1-иммуноокрашенных структур и коллагеновых волокон оценивали с помощью стандартных функций ImageJ2, таких как «цветовая гистограмма», «анализ частиц» и «измерение» (color histogram, analyze particles, measure). Использована также морфометрическая сетка с заданной плотностью точек (11×11), которую наносили на изображения отдельно с помощью графического редактора GIMP [12].

Для количественной оценки плотности распределения Iba-1-положительных элементов, ассоциированных с междольковой соединительной тканью, на изображениях предварительно выделяли области интереса с помощью стандартной функции ImageJ2 — «область интереса» (region of interest). После этого с помощью плагина IJ-Plugins k-means Clustering [13] выполняли сегментацию изображений на 3 цвета (RGB). Общую площадь Iba-1-иммуноокрашенных структур оценивали с помощью вышеупомянутых функций ImageJ2 для морфоме-

трического анализа. Измеренную площадь объектов на изображении выражали в микрометрах в квадрате и в процентах.

## Результаты

В ходе предварительного исследования оценена возможность окрашивания коллагеновых волокон анилиновым синим после постановки иммуногистохимической реакции на белок Iba-1 с учетом разработанного ранее протокола [8], предполагающего тепловое демаскирование антигена. Результаты проверки показали, что после выполнения этапа теплового демаскирования коллагеновые волокна являются неселективно, в связи с чем была проведена модификация протокола. На основании проверки различных режимов инкубации первичных реагентов был исключен этап теплового демаскирования, сокращен период инкубации первичных реагентов (с 3 до 1 дня) и увеличена температура инкубации (с 27,5 до 35°C). Этот вариант протокола позволил получить оптимальные результаты иммуногистохимической реакции.

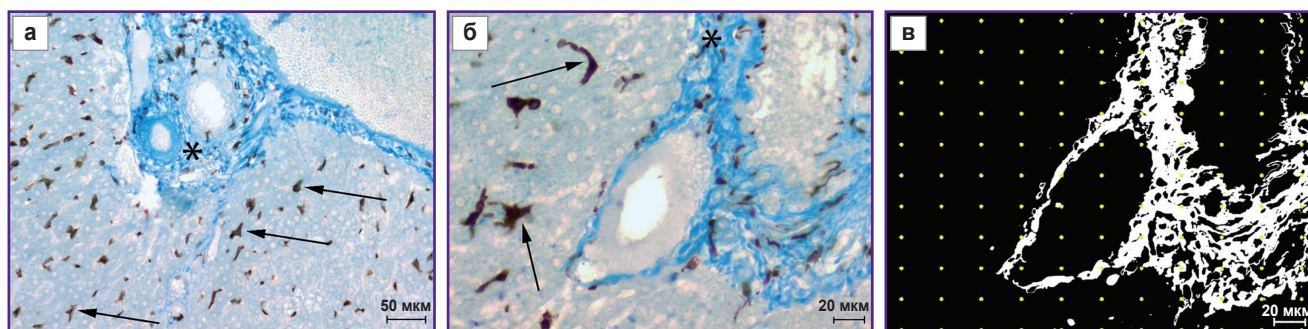
В результате реакции на белок Iba-1 во всех исследованных образцах печени выявлено множество Iba-1-иммунопозитивных структур, морфологически соответствующих клеткам Купфера (рис. 1, а, б). Фонового окрашивания не наблюдалось. Выявленные клетки были морфологически сходны, отмечено четкое и преимущественно равномерное окрашивание цитоплазмы. В некоторых случаях в цитоплазме просматривалось место локализации ядра. Для большинства клеток Купфера было характерно наличие отростков, хорошо визуализирующихся благодаря интенсивной окраске. Во всех исследуемых образцах отростки контактировали с эндотелиальными клетками сосудов, гепатоцитами, а также другими соединительноткан-

ными клетками в области внутренней перипортальной пограничной пластинки. Исключение этапа теплового демаскирования не оказало негативного влияния на выявляемость макрофагов, позволило снизить вероятность неспецифического окрашивания и повысить сохранность образцов ткани печени в процессе обработки срезов. В то же время повышение температуры инкубации позволило сократить пребывание срезов в растворе первичных антител. Визуально иммуногистохимическая реакция на белок Iba-1 во всех исследуемых образцах была высокоинтенсивной и не препятствовала селективному окрашиванию коллагена анилиновым синим.

Окрашивание анилиновым синим во всех образцах печени крыс Wistar и SHR было избирательным, равномерным и четким и позволило дифференцировать соединительную ткань во всех срезах. Обработка срезов фосфорномолибденовой кислотой и окраска анилиновым синим после иммуногистохимической реакции на Iba-1 не оказала негативного влияния на сохранность продукта реакции хромогена DAB. Не отмечено снижения интенсивности окраски продукта иммуногистохимической реакции или вымывания его из срезов.

Использованный комбинированный метод окрашивания в дальнейшем позволил оценить морфометрическими методами площадь иммунопозитивных структур и площадь, занимаемую волокнами коллагена, в поле зрения (рис. 1, в).

В качестве примера для количественного анализа использовано изображение, представленное на рис. 1, б. Так, было проведено вычисление площади, занимаемой волокнами коллагена, с использованием морфометрической сетки. Рассчитанная площадь составила 11617,24 мкм<sup>2</sup> (20,66% от общей площади изображения). Общая площадь Iba-1-иммуноокрашенных структур рассчитывалась на

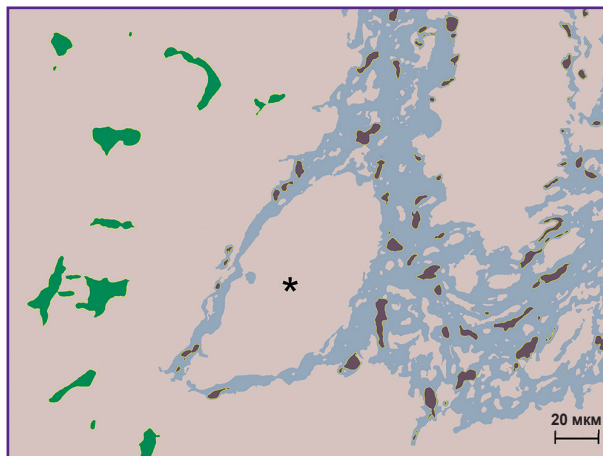


**Рис. 1.** Результат окрашивания соединительной ткани анилиновым синим с выявлением клеток Купфера при помощи иммуногистохимической реакции на белок Iba-1 и количественный анализ окраски коллагеновых волокон с использованием морфометрической сетки:

а, б — Iba-1-иммунопозитивные клетки и коллагеновые волокна с подкраской анилиновым синим в препаратах печени крысы Wistar; в — бинарное преобразование изображения б с применением цветовой сегментации для дифференцировки коллагеновых волокон и с демонстрацией использования точечного варианта морфометрической сетки. Стрелками показаны Iba-1-иммунопозитивные клетки, звездочками — коллагеновые волокна. Объективы A-plan 20×/0,45 (а); A-plan 40×/0,65 (б, в)

**Рис. 2. Результат сегментации изображения на основе разделения цветовых значений по кластерам с использованием плагина k-means Clustering для ImageJ2**

зеленым цветом окрашены клетки Купфера; коричневым цветом — макрофаги, ассоциированные с волокнами междольковой соединительной ткани; звездочкой показана центральная вена



основе бинаризованного изображения с использованием гистограммы цветов и составила 2330,08 мкм<sup>2</sup> (4,15% от общей площади изображения).

С применением плагина для ImageJ2 k-means Clustering проведена автоматическая сегрегация макрофагов, ассоциированных с междольковой соединительной тканью (рис. 2). Данный плагин позволил нам избирательно оценить общую площадь макрофагов междольковой соединительной ткани и клеток Купфера, а также определить число клеток и фрагментов клеток на основе цветного изображения. Общая площадь макрофагов междольковой соединительной ткани составила 1013,61 мкм<sup>2</sup> (1,80%), а количество выявленных фрагментов клеток — 76. Общая площадь клеток Купфера составила 1316,47 мкм<sup>2</sup> (2,34%), общее количество клеток и их фрагментов — 16.

## Обсуждение

Фиброз и активация клеток иммунной системы (в частности, резидентных макрофагов печени — клеток Купфера) сопровождают большинство хронических заболеваний печени. В диагностической практике установить форму фиброза часто возможно только по результатам гистологического исследования [3, 14]. Такое исследование необходимо также при разработке биологических моделей фиброза [15], на доклинической стадии разработки новых лекарственных препаратов [16] и во время клинических испытаний [3, 4]. В настоящем исследовании оптимизированы этапы постановки иммуногистохимической реакции в ранее предложенном протоколе выявления клеток Купфера с помощью антител к микроглиальному маркеру Iba-1 [8], что позволило использовать для подкраски срезов гистологический краситель анилиновый синий. С целью увеличения специфичности окрашивания коллагеновых волокон после проведения иммуногистохимического исследования и сохранения тинкториальных свойств ткани изучена возможность отказа от этапа теплового демаскирования антигенов.

Процедура теплового демаскирования достаточно часто используется в иммуногистохимических исследованиях, поскольку позволяет увеличить чувствительность методики [17], однако тепловая обработка может приводить к нарушению тинкториальных свойств изучаемой ткани, что искажает результаты последующей гистологической окраски. Так, показано, что в процессе термической обработки коллагена происходят денатурация полипептидных цепей и разрыв связей между ними. Денатурация коллагена является многоэтапным процессом, сопровождающимся нарушением специфической конфигурации молекул глицина, пролина, аланина [18, 19].

Исключение этапа теплового демаскирования в представленной в данном исследовании методике иммуногистохимического окрашивания позволило избежать денатурации коллагена на срезах, что дает возможность изучения тканевых макрофагов и выявления волокон соединительной ткани в пределах одного среза. Это предоставляет исследователю способы изучения их взаимного расположения и более полной оценки функционального состояния органа.

При использовании иммуногистохимических методов окрашивания [20] для выявления коллагеновых волокон часто возможно неспецифическое окрашивание клеточных элементов исследуемого образца ткани, а также усложнение процесса постановки реакций, требующих двух хромогенов. Коллаген не является консервативным белком: считается, что разнообразие его структурных вариантов у разных видов животных обусловлено вариабельностью аминокислотной последовательности, а также связано с типом коллагена [21]. В связи с этим подбор первичных антител для каждого вида и исследуемого типа коллагена представляется трудоемким и финансово затратным.

Напротив, классические гистологические методы окрашивания межклеточного вещества соединительной ткани, по сравнению с иммуногистохимическими, имеют свои преимущества и могут оказаться более приемлемыми для исследователя. Благодаря универсальности в выявлении коллагенов различных типов и

высокой аффинности анилиновый синий в сочетании с предварительной обработкой фосфорномолибденовой или фосфорновольфрамовой кислотой является часто применяемым красителем при исследованиях коллагена в различных органах и тканях [3, 5, 22, 23]. Все эти факты обусловили выбор для настоящей методики в качестве гистохимического красителя анилинового синего, который позволил специфично выявлять коллагеновые волокна соединительной ткани. Установлено, что метод с применением данного красителя подходит для комбинированного использования с иммуногистохимическими методами выявления макрофагов и последующего морфометрического анализа.

## Заключение

Оптимизация разработанного протокола выявления клеток Купфера с помощью антител к микроглиальному маркеру Iba-1 позволяет одновременно идентифицировать резидентные макрофаги печени и волокна коллагена без использования этапа теплового демаскирования. Представленная методика окрашивания дает возможность эффективно применять морфометрический анализ, включающий бинаризацию, сегментацию по цветовому каналу, определение площади объектов и их числа, расчет площади структур с использованием морфометрической сетки.

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

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Литература/References

1. Wen Y., Lambrecht J., Ju C., Tacke F. Hepatic macrophages in liver homeostasis and diseases-diversity, plasticity and therapeutic opportunities. *Cell Mol Immunol* 2021; 18(1): 45–56, <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00558-8>.
2. Setten E., Castagna A., Nava-Sedeño J.M., Weber J., Carriero R., Reppas A., Volk V., Schmitz J., Gwinner W., Hatzikirou H., Feuerhake F., Locati M. Understanding fibrosis pathogenesis via modeling macrophage-fibroblast interplay in immune-metabolic context. *Nat Commun* 2022; 13(1): 6499, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34241-5>.
3. Chaim F.D.M., Pascoal L.B., Chaim F.H.M., Palma B.B., Damázio T.A., da Costa L.B.E., Carvalho R., Cazzo E., Gestic M.A., Utrini M.P., Milanski M., Chaim E.A., Leal R.F. Histological grading evaluation of non-alcoholic fatty liver disease after bariatric surgery: a retrospective and longitudinal observational cohort study. *Sci Rep* 2020; 10(1): 8496, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65556-2>.
4. Gole L., Liu F., Ong K.H., Li L., Han H., Young D., Marini G.P.L., Wee A., Zhao J., Rao H., Yu W., Wei L. Quantitative image-based collagen structural features predict the reversibility of hepatitis C virus-induced liver fibrosis post antiviral therapies. *Sci Rep* 2023; 13(1): 6384, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33567-4>.
5. Matsuo M., Murata S., Hasegawa S., Hatada Y., Ohtsuka M., Taniguchi H. Novel liver fibrosis model in *Macaca fascicularis* induced by thioacetamide. *Sci Rep* 2020; 10(1): 2450, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58739-4>.
6. Роскин Г.И., Левинсон Л.Б. *Микроскопическая техника*. М: Советская наука; 1957.  
Roskin G.I., Levinson L.B. *Mikroskopicheskaya tekhnika* [Microscopic technique]. Moscow: Sovetskaya nauka; 1957.
7. Вдовин В.М., Момот А.П., Орехов Д.А., Бобров И.П., Момот Д.А., Шахматов И.И., Красюкова В.О., Чернусь В.Е., Теряев В.В., Лычева Н.А., Москаленко С.В. Влияние экзогенного фибрин-мономера на гемостатический потенциал и образование фибрина в области дозированной травмы печени в эксперименте. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова* 2020; 106(9): 1132–1143.  
Vdovin V.M., Momot A.P., Orekhov D.A., Bobrov I.P., Momot D.A., Shakhmatov I.I., Krasnyukova V.O., Chernus' V.E., Terjaev V.V., Lycheva A., Moskalenko S.V. Influence of exogenous fibrin monomer on hemostatic potential and formation of fibrin in the area of dosed liver injury in experiment. *Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova* 2020; 106(9): 1132–1143.
8. 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; 23(1): 85–94, <https://doi.org/10.17816/MAJ133649>.  
Nikitina I.A., Razenkova V.A., Kirik O.V., Korzhhevskii D.E. Visualisation of Kupffer cells in the rat liver with poly- and monoclonal antibodies against microglial-specific protein Iba-1. *Meditsinskiy akademicheskii zhurnal* 2023; 23(1): 85–94, <https://doi.org/10.17816/MAJ133649>.
9. Grigorev I.P., Korzhhevskii D.E. Current technologies for fixation of biological material for immunohistochemical analysis (review). *Sovremennye tehnologii v medicine* 2018; 10(2): 156, <https://doi.org/10.17691/stm2018.10.2.19>.
10. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.Y., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012; 9(7): 676–682, <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
11. IJ Plugins. *IJ Plugins Toolkit*. URL: <https://ij-plugins.sourceforge.net/plugins/toolkit.html>.
12. GIMP — GNU Image Manipulation Program.
13. IJ Plugins. *IJ Plugins: k-means Clustering*. URL: <https://ij-plugins.sourceforge.net/plugins/segmentation/k-means.html>.
14. Iezzoni J.C. Diagnostic histochemistry in hepatic pathology. *Semin Diagn Pathol* 2018; 35(6): 381–389, <https://doi.org/10.1053/j.semmp.2018.10.003>.
15. Лебедева И.А., Муслимов С.А., Мусина Л.А. Экспериментальное моделирование процесса хронического воспаления и фиброза. *Биомедицина* 2013; 4: 114–123.  
Lebedeva I.A., Muslimov S.A., Musina L.A. Experimental modeling of the process of chronic inflammation and fibrosis. *Biomeditsina* 2013; 4: 114–123.
16. Dirven H., Vist G.E., Bandhakavi S., Mehta J., Fitch S.E., Pound P., Ram R., Kincaid B., Leenaars C.H.C., Chen M., Wright R.A., Tsaion K. Performance of preclinical models in predicting drug-induced liver injury in humans: a systematic review. *Sci Rep* 2021; 11(1): 6403, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85708-2>.

17. Коржевский Д.Э., Григорьев И.П., Сухорукова Е.Г., Гусельникова В.В. Иммуногистохимическая характеристика нейронов черного вещества головного мозга человека. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова* 2017; 117(4): 50–55, <https://doi.org/10.17116/jnevro20171174150-55>.
- Korzhevskii D.E., Grigor'ev I.P., Sukhorukova E.G., Gusel'nikova V.V. Immunohistochemical characteristics of the substantia nigra neurons of the human. *Zhurnal neurologii i psikiatrii im. S.S. Korsak'ova* 2017; 117(4): 50–55, <https://doi.org/10.17116/jnevro20171174150-55>.
18. Shoulders M.D., Raines R.T. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem* 2009; 78: 929–958, <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833>.
19. Игнатъева Н.Ю., Данилов Н.А., Лунин В.В., Обрезкова М.В., Аверкиев С.В., Чайковский Т.И. Изменение термодинамических характеристик денатурации коллагена тканей глаза в результате неферментативной гликации. *Вестник Московского университета* 2007; 48(2): 75–79.
- Ignatieva N.Yu., Danilov N.A., Lunin V.V., Obrezkova M.V., Averkiev S.V., Chaikovskii T.I. The alteration of thermodynamic characteristics of corneal tissue collagen denaturation as the result of the non enzymatic glycation. *Vestnik Moskovskogo universiteta* 2007; 48(2): 75–79.
20. Meier Bürgisser G., Heuberger D.M., Giovanoli P., Calcagni M., Buschmann J. Delineation of the healthy rabbit kidney by immunohistochemistry — a technical note. *Acta Histochem* 2021; 123(4): 151701, <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2021.151701>.
21. Baccetti B. Collagen and animal phylogeny. In: Bairati A., Garrone R. (eds). *Biology of invertebrate and lower vertebrate collagens*. NATO ASI Series. Vol. 93. Springer, Boston, MA; 1985, [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7636-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7636-1_2).
22. Antunes E., Oliveira P., Borrecho G., Oliveira M.J., Brito J., Aguas A., Martins dos S.J. Myocardial fibrosis in rats exposed to low frequency noise. *Acta Cardiol* 2013; 68(3): 241–245, <https://doi.org/10.1080/ac.68.3.2983417>.
23. Wagner J.M., Wallner C., Becerikli M., Reinkemeier F., von Glinski M., Sogorski A., Huber J., Dittfeld S., Becker K., Lehnhardt M., Dadras M., Behr B. Role of autonomous neuropathy in diabetic bone regeneration. *Cells* 2022; 11(4): 612, <https://doi.org/10.3390/cells11040612>.