

Методы иммуногистохимии и компьютерной морфометрии – перспективные инструменты в изучении патогенетических закономерностей нейродегенеративных процессов

Р.М. Худоевков, В.Н. Сальков, Д.Н. Воронков

ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия

Современные методы иммуногистохимии и компьютерной морфометрии дают богатые возможности для изучения патогенетических закономерностей процесса нейродегенерации, происходящего при физиологическом старении мужчин и женщин, а также при моделировании болезней Паркинсона и Гентингтона у экспериментальных животных. Трехмерная реконструкция компактной части черной субстанции мозга человека и мозга крысы выявила как общие черты в их организации (гетерогенность структур), так и различия в количественных морфохимических показателях, обуславливающих их видоспецифические характеристики. При моделировании болезни Гентингтона с помощью нейротоксина 3-нитропропионовой кислоты (3-НПК) была показана не только гибель нейронов стриатума и снижение его дофаминергической иннервации, но и повреждение астроцитов со снижением в них экспрессии глутаминсинтазы, что может увеличивать содержание внеклеточного глутамата. Последний, наряду с прямым блокирующим действием 3-НПК на сукцинатдегидрогеназу, является одним из факторов формирования нейродегенеративных изменений в стриатуме. При моделировании болезни Паркинсона была показана важная роль нейроглии в нейродегенеративном процессе: выявлено, что активированная астроглия выполняет не только деструктивную, но и нейропротекторную функцию, что может служить основой для разработки соответствующих методов фармакологической коррекции, направленных на регуляцию функций глиальных клеток.

Ключевые слова: мозг человека, мозг крысы, черная субстанция, нейроны, нейроглия, иммуногистохимия, морфометрия, 3D реконструкция.

Адрес для корреспонденции: 105064, Россия, Москва, пер. Обуха, д. 5. Отдел исследований мозга ФГБНУ НЦН. E-mail: golfbrain@yandex.ru. Худоевков Р.М.

Для цитирования: Худоевков Р.М., Сальков В.Н., Воронков Д.Н. Методы иммуногистохимии и компьютерной морфометрии – перспективные инструменты в изучении патогенетических закономерностей нейродегенеративных процессов. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии* 2018; 12 (Специальный выпуск): 55–59.

DOI: 10.25692/ACEN.2018.5.7

Methods of immunohistochemistry and computerized morphometry as promising tools in the study of pathogenic patterns of neurodegenerative processes

Rudolf M. Khudoerkov, Vladimir N. Salkov, Dmitry N. Voronkov

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

Modern methods of immunohistochemistry and computer morphometry provide powerful possibilities for the study of pathogenetic patterns of neurodegeneration process occurring in physiological aging of men and women, as well as in experimental animals on modeling of Parkinson's and Huntington's diseases. Three-dimensional reconstruction of the substantia nigra pars compacta of the human and rat brains revealed both common features in their organization (heterogeneity of structures) and differences in quantitative morphochemical parameters determining their species-specific characteristics. On modeling of the Huntington's disease with the neurotoxin 3-nitropropionic acid (3-NPA), it was shown not only the death of neurons in the striatum and a decrease in its dopaminergic innervation, but also dysfunction of astrocytes with reduced expression of glutamine synthase that can increase the extracellular content of glutamate. The latter, along with direct succinate dehydrogenase-blocking action of 3-NPA, is one of the factors leading to neurodegenerative changes in the striatum. On modeling of Parkinson's disease, the important role of neuroglia in the neurodegenerative process was shown: it was found that activated astroglia had not only destructive, but also neuroprotective functions, which may serve the basis for the development of respective methods of pharmacological correction directed at regulation of the of glial cell functions.

Keywords: human brain, rat brain, substantia nigra, neuron, neuroglia, immunohistochemistry, morphometry, 3D reconstruction.

For correspondence: 105064, Russia, Moscow, per. Obukha, 5, Department for Brain Research, Research Center of Neurology. E-mail: rolfbbrain@yandex.ru. Khudoerko R.M.

For citation: Khudoerko R.M., Salkov V.N., Voronkov D.N. [Methods of immunohistochemistry and computerized morphometry as promising tools in the study of pathogenic patterns of neurodegenerative processes]. *Annals of clinical and experimental neurology* 2018; 12 (Special issue): 55–59 (In Russ.)

DOI: 10.25692/ACEN.2018.5.7

Одной из актуальных задач современной неврологии является раскрытие патогенетических закономерностей, лежащих в основе возникновения и прогрессирования социально значимых нейродегенеративных заболеваний, к числу которых относятся болезни Паркинсона, Альцгеймера, Гентингтона, лобно-височная деменция и др. Этиология и патогенез этих заболеваний, несмотря на значительный объем проводимых исследований [1, 3, 7], до конца не изучены и, следовательно, не выяснены причины повышенной и избирательной уязвимости определенных структур головного мозга. В частности, не выяснены особенности взаимоотношений нейронов и нейроглии, при том что последняя, как известно, создает не только метаболическую среду, поддерживающую функцию нейронов, но и участвует вместе с ними в проведении нервного возбуждения [3, 4]. Недостаточно изучена и пространственная 3D организация поражаемых структур на микроанатомическом и клеточном уровнях, что требует привлечения для исследований современных методов компьютерной морфометрии и иммуногистохимии.

Целью нашей многолетней работы было продемонстрировать возможности иммуногистохимии и компьютерной морфометрии при изучении патогенетических закономерностей таких нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Паркинсона (БП) и болезнь Гентингтона (БГ) на клинко-морфологическом и экспериментальном материале.

С помощью иммуногистохимических методов – иммуноферментного исследования и методов флуоресцентного множественного мечения – количественно и качественно оценивали динамику и характер нейродегенерации, а также выявляли молекулярные маркеры патологических изменений нейронов и нейроглии в аутопсийном головном мозге человека и мозге экспериментальных животных. На материале нигростриатных образований мозга людей среднего, пожилого и старческого возраста (контрольная группа без неврологической симптоматики) изучали взаимосвязь микроанатомической и клеточной организации черной субстанции (ЧС) с процессом нейродегенерации.

Нейродегенерацию у крыс линии Вистар моделировали с использованием классических нейротоксинов: паркинсонизм – с помощью нейротоксина 6-гидроксидофамина (6-OHDA) и пестицидов – ротенона и параквата, а болезнь Гентингтона – с помощью нейротоксина 3-нитропропионовой кислоты (3-НПК).

Нейродегенерацию изучали в структурах ЧС и стриатума, используя широкий набор методов компьютерной морфометрии [2] и количественно оценивая интенсивность иммуноокрашивания; подсчитывалось число нейронов и нейроглии, определились их форма и плотность распределения. Для выявления дофаминергических и норадренергических нейронов использовали кроличьи поликлональ-

ные антитела к тирозингидроксилазе (ТирГд – фермент синтеза дофамина) или транспортеру дофамина (DAT). Для выявления глиальных клеток и оценки их структурно-функциональных изменений использовали антитела к кислому глиофибрилярному белку (GFAP), входящему в состав промежуточных филаментов цитоскелета астроцитов, к глутаминсинтетазе (GS) – ферменту глутамин-глутаматного цикла, локализованному в глиальных клетках, в том числе в астроцитах, а также к аквапорину-4 (AQP4) – астроцитарному белку водных каналов, обеспечивающих транспорт воды. Для выявления дегенерирующих нейронов использовали флуоресцентный краситель FluoroJade B.

Для тонкой оценки пространственной организации ЧС мозга человека и мозга крысы (микроанатомической и клеточной) методами компьютерной морфометрии создавали трехмерную реконструкцию компактной её части, основываясь на оценке иммуногистохимической локализации ТирГд – маркера дофаминовых нейронов. Результаты обрабатывали статистически с помощью программ IBM SPSS или StatSoft Statistica 6.0. Пространственное распределение клеточных элементов оценивали по плотности их расположения и на основании построения диаграмм Вороного (программы Leica Qwin и Ка-Ме).

Проведенное нами морфометрическое исследование компактной части ЧС головного мозга (аутопсийный материал) у лиц среднего, пожилого и старческого возраста показало, что по мере физиологического старения плотность расположения дофаминовых нейронов наиболее выражено (на 24–28%) уменьшалась в сегментах вентральной области, которая, по данным литературы [6, 10], теряет больше всего нейронов при БП. В отличие от БП, при которой основная масса нигральных дофамин-продуцирующих клеток погибает на протяжении первых 3–5 лет заболевания [5], при естественной инволюции их гибель протекает по типу длительной и достаточно «мягкой» по своей интенсивности неспецифической реакции нервной ткани. Об этом свидетельствует и установленная нами стабильность показателя плотности расположения нейроглии, содержащей S100-протеин, что совпадает с данными литературы [9] и может служить подтверждением постепенности развивающихся изменений.

При исследовании гендерных особенностей клеточной организации ЧС у лиц старческого возраста нами обнаружено, что как у мужчин, так и у женщин показатели плотности расположения нейронов, нейроглии и размеры тел нейронов в вентральной области больше, чем в дорсальной; при сопоставлении же одноименных областей ЧС выяснилось, что в дорсальной области у женщин по сравнению с мужчинами нейроны были крупнее на 12%, а глиальный индекс – выше на 11%. Гендерные различия в структурной организации ЧС позволяют предположить, что у женщин дорсальная область ЧС более устойчива к инволюции, чем у мужчин.

Триггеры дегенеративного процесса в дофаминергических нейронах ЧС весьма многообразны, причем одним из важных патогенетических факторов признается накопление Fe^{3+} . Нами были обнаружены железосодержащие соединения в нейронах и олигодентроцитах ЧС у лиц старческого возраста. Принимая во внимание, что соединения Fe^{3+} формируют комплекс с нейромеланином [12], активирующий микроглию и запускающий патохимический каскад БП, выявленные изменения у пожилых помогают уточнить, за счет каких механизмов эта категория лиц формирует группу повышенного риска по БП.

Знание микроанатомической и клеточной организации ЧС важно не только при исследовании мозга человека в норме и при развитии патологии «паркинсонического» типа, но и при работе с мелкими лабораторными животными, являющимися основными объектами экспериментального моделирования. При построении пространственной организации ЧС, основываясь на иммуногистохимической локализации ТирГД, мы использовали методы объемной реконструкции, разработанные на основе компьютерной морфометрии. Было обнаружено, что ЧС мозга человека занимает объем в среднем около $9,85 \text{ мм}^3$ и имеет выраженную морфохимическую гетерогенность. Ее основные области, дорсальная и вентральная, существенно различались между собой по ряду морфометрических показателей (рис. 1). Так, вентральная область по сравнению с дорсальной была больше по объему на 38%, по плотности расположения нейронов – на 85%, по величине нейронов – на 12%. У крыс линии Вистар морфологический объем ЧС был в 10 раз меньше, чем у человека, при этом соотношение структур было совсем иным. У крыс вентральная область ЧС по сравнению с дорсальной была в 7 раз меньше по объему, в 3 раза меньше по плотности расположения нейронов и на 16% меньше по размерам нейронов. Таким образом, трехмерная реконструкция компактной части ЧС мозга человека и мозга крысы выявила как общие черты ее организации (гетерогенность структур), так и различия в количественных морфохимических показателях, обуславливающих их видоспецифические особенности.

На основании проведенных исследований можно заключить, что морфохимические характеристики компактной части ЧС, выявляемые у представителей филогенетически разных видов, в частности, грызунов, необходимо с большой осторожностью интерпретировать при сопоставительном анализе с мозгом человека.

В компактной и ретикулярной частях ЧС и стриатуме мозга интактных крыс методами компьютерной морфометрии изучали форму и размеры астроцитов (рис. 2), выявляемых иммуногистохимически по реакции на GFAP и глиоспецифические белки – глутаминсинтазу и аквапорин-4. Было обнаружено, что астроциты nigrostriatalной системы нейрохимически и морфологически неоднородны: наибольшее их количество выявляется в ретикулярной части ЧС и стриатуме, имеющих мощные ГАМК- и глутаматергические входы. В компактной части ЧС, имеющей высокую плотность расположения нейронов, число GFAP-позитивных астроцитов с небольшим числом отростков невелико; здесь насчитывается и меньше астроцитов, содержащих глутаминсинтазу, и астроцитов со сниженной экспрессией аквапорина, что свидетельствует о меньшей выраженности глиоваскулярных и глионейрональных контактов в компактной части ЧС по сравнению с ретикулярной. На основании анализа разнородности астроцитарной

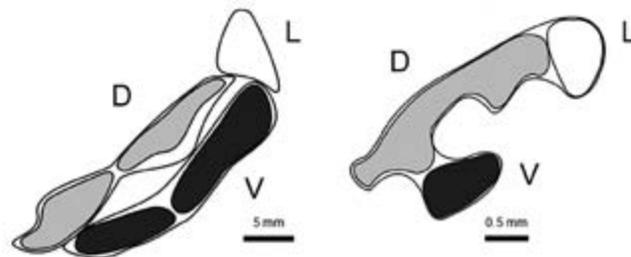


Рис. 1. Схемы пространственной организации ЧС мозга человека (слева) и мозга крысы (справа), составленные по данным трехмерной реконструкции. Обозначения областей ЧС: D – дорсальная, L – латеральная, V – вентральная

Fig. 1. Patterns of spatial organization of the substantia nigra of human (A) and rat (B) brain obtained from the data of 3D reconstruction. Substantia nigra regions: D – dorsal, L – lateral, V – ventral

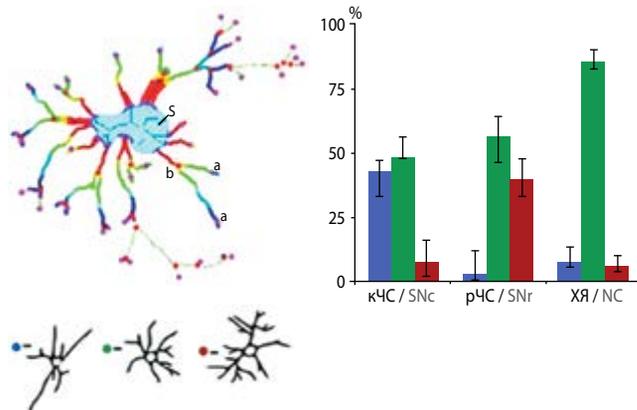


Рис. 2. Оценка морфометрических показателей разных типов астроцитов, отличающихся по форме, в структурах nigrostriatalной системы мозга крысы.

Слева – компьютерный анализ отростков астроцита: а – вершины отростков (позволяют подсчитывать их количество), b – место ветвления отростка (оценка степени его разветвленности), S – площадь тела астроцита. Протяженность сегментов отростков показана разными цветами. Справа – диаграмма процентного соотношения отростков трех типов астроцитов, выявляемых в ЧС и хвостатом ядре мозга крысы. Обозначения: кЧС – компактная часть ЧС, рЧС – ретикулярная часть ЧС, ХЯ – хвостатое ядро

Fig. 2. Assessment of morphometric parameters of various-type astrocytes differing by the form in the nigro-striatal system of the rat brain.

Left – computer analysis of the astrocyte processes; a – tops of the processes (allow to count their quantity), b – site of the process embranchment (assessment of the degree of its embranchment), S – the astrocyte body. The lengths of segments of the processes are shown by different colors. Right – the diagram of percentage of the processes of the three types of astrocytes seen in the substantia nigra and the nucleus caudatus of the rat brain. SNC – pars compacta of the substantia nigra, SNr – pars reticulata of the substantia nigra, NC – nucleus caudatus

популяции в nigrostriatalной системе нами была предложена классификация астроцитов, разделяющая их на три группы, в зависимости от формы отростков.

Глиальную реакцию при моделировании паркинсонизма оценивали у крыс линии Вистар на трех токсических моделях: при интранигральном введении нейротоксина 6-OHDA и при длительном системном введении животного пестицидов – ротенона и параквата. Обнаружили, что характеристики отростков астроцитов, а, следовательно, их взаимодействие с нейронами, изменяются по-разному в зависимости от использованных экспериментальных мо-

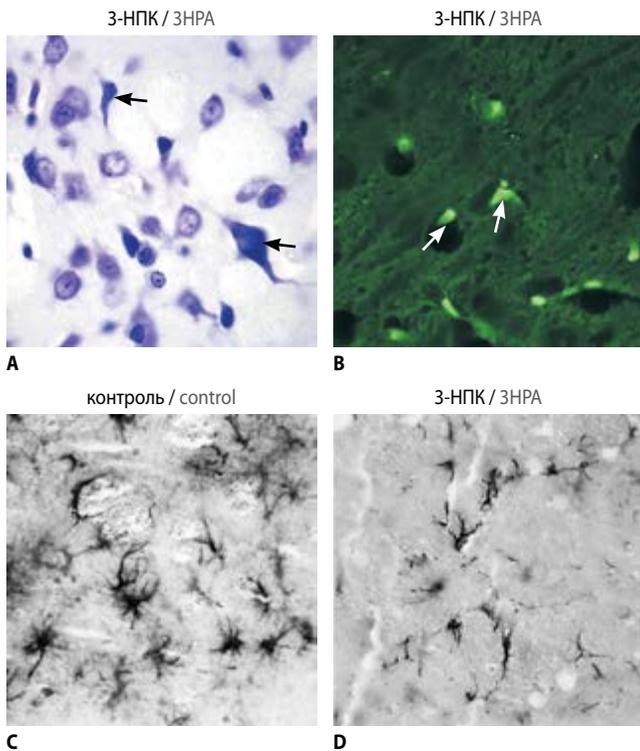


Рис. 3. Дегенеративные изменения нейронов и астроцитов стриатума крыс при моделировании БГ с помощью 3-НПК.

А, В – выявление поврежденных нейронов стриатума (стрелки) под действием 3-НПК при окрашивании методом Ниссля (А) и флуоресцентным красителем FluoroJade В (В). С, D – экспрессия GFAP (С – контроль, D – уменьшение экспрессии GFAP, снижение числа астроцитов стриатума и редукция их отростков под действием 3-НПК)

Fig. 2. Degenerative changes of neurons and astrocytes in the rat striatum upon modeling of Huntington's disease with 3-nitropropionic acid (3-NPA).

A, B – abnormal neurons in the striatum (arrow) after 3-NPC toxic action visualized with the Nissle method (a) and fluorescence marker FluoroJade B (B). C, D – expression of GFAP (C – control, D – reduced expression of GFAP, decrease in the number of the striatal astrocytes and reduction of their processes after 3-NPC use

делей. При этом выявили два типа морфологических изменений астроцитов: 1) ветвление отростков глиальной клетки и их равномерное удлинение во всех направлениях; 2) редукцию мелких отростков и удлинение основных, оставшихся стволов, что проявлялось в поляризации глиальной клетки. Первый тип реакции, по-видимому, связан с компенсаторным усилением взаимодействий астроцита с нейронами, второй, вероятно всего, обусловлен ответом астроцита на повреждение нервной ткани и нарушением глио-нейрональных взаимодействий. Реактивные изменения астроцитов при повреждении нигростриатного пути вызваны не только гибелью нейронов, но и являются компенсаторной реакцией нейроглии на нарушение медиаторного баланса в базальных ядрах.

При моделировании болезни Гентингтона с использованием нейротоксина 3-НПК [7] мы выявили дегенеративные изменения в нейронах хвостатого ядра: в нервных клетках среднего размера, в основном ГАМК-ергических, формирующих основную популяцию клеток стриатума, а также в крупных, редко расположенных холинергических нейронах. Плотность распределения нейронов и нейроглии

у подопытных животных снижалась. Описанные морфохимические изменения были отмечены у всех животных, получавших 3-НПК, но их степень значительно варьировала. При этом наиболее тяжелые нарушения отмечали в группе, получавшей большую дозу нейротоксина. Интенсивность окрашивания структур хвостатого ядра на ТирГд и DAT была не однородной, наблюдалась «пятнистость», вероятно, связанная с различной степенью повреждения дофаминовых окончаний в стриосомальном и матриксном компонентах стриатума, что было сходно с нарушениями экспрессии ТирГд под действием пестицида ротенона. Выявленное в настоящей работе уменьшение экспрессии транспортера дофамина DAT может быть связано не только с повреждением дофаминергических окончаний при моделируемой патологии, но и с компенсаторным подавлением обратного захвата медиатора. Под действием 3-НПК в стриатуме снижалась также экспрессия GFAP и наблюдалась дегенерация астроцитов. В области повреждения выявляли единичные астроциты, с небольшим количеством отростков и сниженной экспрессией GFAP (рис. 3).

Помимо снижения окрашивания на GFAP резко снижалась интенсивность окрашивания на глутаминсинтетазу, что было связано с гибелью астроглии и, как следствие, нарушением утилизации внеклеточного глутамата. При исследовании AQP4 у экспериментальных животных было выявлено снижение интенсивности окрашивания сосудов по сравнению с контролем; это отражает нарушение на модели БГ контактов астроглии с сосудами, указывает на повреждение гематоэнцефалического барьера и нарушение водного обмена и хорошо согласуется с выявленным при гистологическом исследовании отеком сосудов.

Таким образом, комплексный методический подход с использованием иммуногистохимических методов и методов компьютерной морфометрии позволил расширить и углубить базовые знания о морфохимической организации ЧС головного мозга мужчин и женщин в процессе физиологического старения и представить полученные результаты как основу для сопоставления с патологией при БП. Трехмерная реконструкция компактной части ЧС мозга человека и мозга крысы выявила как общие черты в ее организации (гетерогенность структур), так и различия в количественных морфохимических показателях, обуславливающих их видоспецифические особенности.

При моделировании БГ выявлены не только гибель нейронов стриатума и снижение его дофаминергической иннервации, но и повреждение астроцитов, приводящее к снижению экспрессии глутаминсинтетазы. Нарушение функций астроглии, в том числе снижение синтеза глутамина, может увеличивать содержание внеклеточного глутамата. Последний, в свою очередь, способствует нарушению энергетических процессов в нервной ткани и повреждению нейронов, что наряду с прямым действием нейротоксина 3-НПК, блокирующего сукцинатдегидрогеназу, является одним из факторов патологических изменений в стриатуме.

В развитии нейродегенеративного процесса показана важная роль нейроглии, в частности – активированной астроглии, выполняющей не только деструктивную, но и нейропротекторную функции. Это может служить основой для разработки новых методов фармакологической коррекции, направленных на регуляцию функций глиальных клеток.

Список литературы

1. Иллариошкин С.Н. Современные представления об этиологии болезни Паркинсона. *Неврологический журнал* 2015; 4: 4–13.
2. Khudoerkov R.M., Voronkov D.N. Quantitative assessment of neurons and neuroglia with computer morphometry. *Bull Exp Biol Med* 2010; 149: 100–103. PMID: 21113470.
3. Blesa J., Przedborski S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Front Neuroanat* 2014; 8: 1–12. DOI: 10.3389/fnana.2014.00155. PMID: 25565980.
4. Brichta L., Greengard P. Molecular determinants of selective dopaminergic vulnerability in Parkinson's disease: an update. *Front Neuroanat* 2014; 8: 152. DOI: 10.3389/fnana.2014.00152. PMID: 25565977.
5. Damier P., Hirsch E.C., Agid Y., Graybiel A.M. The substantia nigra of the human brain. I. Nigrosomes and nigral matrix, a compartmental organization based on calbindin D28k immunogistochemistry. *Brain* 1999; 122: 1421–1436. DOI: 10.1093/brain/122.8.1421. PMID: 10430829.
6. Bellinger F.P., Bellinger M.T., Seale L.A. et al. Glutathione peroxidase 4 is associated with neuromelanin in substantia nigra and dystrophic axons in putamen of Parkinson's brain. *Mol Neurodegen* 2011; 6: 1–8. DOI: 10.1186/1750-1326-6-8. PMID: 21255396.
7. Brouillet, E., Jacquard, C., Bizat, N., Blum, D., 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J Neurochem* 2005; 95(6): 1521.
8. Jellinger K.A. Neuropathobiology of non-motor symptoms in Parkinson disease. *J Neural Transm* 2015; 122: 1429–1440. DOI: 10.1007/s00702-015-1405-5. PMID: 25976432.
9. Jyothi H.J., Vidyadhara D.J., Mahadevan A. et al. Aging causes morphological alterations in astrocytes and microglia in human substantia nigra pars compacta. *Neurobiol Aging* 2015; 36: 3321–3333. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.08.024. PMID: 26433682.
10. Kordower J.H., Olanow C.W., Dodiya H.B. et al. Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease. *Brain* 2013; 136: 2419–2431. DOI: 10.1093/brain/awt192. PMID: 23884810.
11. Rudow G., O'Brien R., Savonenko A.V. et al. Morphometry of the human substantia nigra in ageing and Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 2008; 115: 461–470. DOI: 10.1007/s00401-008-0352-8. PMID: 18297291.
12. Zucca F.A., Giaveri G., Gallorini M. et al. The neuromelanin of human substantia nigra: physiological and pathogenic aspects. *Pigment Cell Res* 2004; 17: 610–617. DOI: 10.1111/j.1600-0749.2004.00201.x. PMID: 15541018.

References

1. Illarioshkin S.N. [Current view on etiology of Parkinson's disease]. *Neurologicheskiy zhurnal* 2015; 4: 4–13. (In Russ.).
2. Khudoerkov R.M., Voronkov D.N. Quantitative assessment of neurons and neuroglia with computer morphometry. *Bull Exp Biol Med* 2010; 149: 100–103. PMID: 21113470.
3. Blesa J., Przedborski S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Front Neuroanat* 2014; 8: 1–12. DOI: 10.3389/fnana.2014.00155. PMID: 25565980.
4. Brichta L., Greengard P. Molecular determinants of selective dopaminergic vulnerability in Parkinson's disease: an update. *Front Neuroanat* 2014; 8: 152. DOI: 10.3389/fnana.2014.00152. PMID: 25565977.
5. Damier P., Hirsch E.C., Agid Y., Graybiel A.M. The substantia nigra of the human brain. I. Nigrosomes and nigral matrix, a compartmental organization based on calbindin D28k immunogistochemistry. *Brain* 1999; 122: 1421–1436. DOI: 10.1093/brain/122.8.1421. PMID: 10430829.
6. Bellinger F.P., Bellinger M.T., Seale L.A. et al. Glutathione peroxidase 4 is associated with neuromelanin in substantia nigra and dystrophic axons in putamen of Parkinson's brain. *Mol Neurodegen* 2011; 6: 1–8. DOI: 10.1186/1750-1326-6-8. PMID: 21255396.
7. Brouillet, E., Jacquard, C., Bizat, N., Blum, D., 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J Neurochem* 2005; 95(6): 1521.
8. Jellinger K.A. Neuropathobiology of non-motor symptoms in Parkinson disease. *J Neural Transm* 2015; 122: 1429–1440. DOI: 10.1007/s00702-015-1405-5. PMID: 25976432.
9. Jyothi H.J., Vidyadhara D.J., Mahadevan A. et al. Aging causes morphological alterations in astrocytes and microglia in human substantia nigra pars compacta. *Neurobiol Aging* 2015; 36: 3321–3333. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.08.024. PMID: 26433682.
10. Kordower J.H., Olanow C.W., Dodiya H.B. et al. Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease. *Brain* 2013; 136: 2419–2431. DOI: 10.1093/brain/awt192. PMID: 23884810.
11. Rudow G., O'Brien R., Savonenko A.V. et al. Morphometry of the human substantia nigra in ageing and Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 2008; 115: 461–470. DOI: 10.1007/s00401-008-0352-8. PMID: 18297291.
12. Zucca F.A., Giaveri G., Gallorini M. et al. The neuromelanin of human substantia nigra: physiological and pathogenic aspects. *Pigment Cell Res* 2004; 17: 610–617. DOI: 10.1111/j.1600-0749.2004.00201.x. PMID: 15541018.

Информация об авторах: Худоерков Рудольф Михайлович – д.м.н., зав. лаб. функциональной морфохимии Отдела исследований мозга ФГБНУ НЦН, Москва, Россия;
Сальков Владимир Николаевич – д.м.н., в.н.с. лаб. функциональной морфохимии Отдела исследований мозга ФГБНУ НЦН, Москва, Россия;
Воронков Дмитрий Николаевич – к.м.н., с.н.с. лаб. функциональной морфохимии Отдела исследований мозга ФГБНУ НЦН, Москва, Россия.

Information about the authors: Rudolf M. Khudoerkov, D.Sci. (Med.), Head of Laboratory of functional morphochemistry, Department for Brain Research, Research Center of Neurology, Moscow, Russia;
Vladimir N. Salkov, D.Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of functional morphochemistry, Department for Brain Research, Research Center of Neurology Moscow, Russia;
Dmitry N. Voronkov, PhD, senior researcher, Laboratory of functional morphochemistry, Department for Brain Research, Research Center of Neurology Moscow, Russia.