

*Д. Э. Коржевский, Е. Г. Сухорукова, Е. Г. Гилерович, Е. С. Петрова, О. В. Кирик
и И. П. Григорьев*

ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ ЦИНК-ЭТАНОЛ-ФОРМАЛЬДЕГИДА КАК ФИКСАТОРА ДЛЯ ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ И КОНФОКАЛЬНОЙ ЛАЗЕРНОЙ МИКРОСКОПИИ

Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы
(зав. — д-р мед. наук Д. Э. Коржевский), отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт
экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург

Представлен анализ результатов собственных данных, полученных при использовании фиксации различных тканей в цинк-этанол-формальдегиде (ЦЭФ). Показано, что фиксация в ЦЭФ в сравнении с другими методами фиксации позволяет добиться более высокой чувствительности иммуноцитохимической реакции для большого числа исследованных антигенов, во многих случаях — отказаться от теплового демаскирования антигенов, обеспечивает высокое качество изображений при использовании флюоресцентной и конфокальной лазерной микроскопии. Однако при исследовании антигенов малой молекулярной массы отмечена диффузия антигена из области его первичной локализации. Полученные данные позволяют заключить, что фиксация материала в ЦЭФ перспективна для применения как в иммуноцитохимических исследованиях, в том числе с использованием флюоресцентной и конфокальной лазерной микроскопии, так и в общегистологической практике.

Ключевые слова: иммуноцитохимия, методы фиксации, конфокальная лазерная микроскопия

Вопрос адекватной фиксации материала при проведении иммуноцитохимических исследований, выполняемых как с научными, так и с диагностическими целями, приобретает первостепенное значение в связи с необходимостью обеспечения сохранности выявляемых антигенов и сохранения их доступности для применяемых первичных антител. Несмотря на то, что в патогистологических исследованиях наиболее часто применяется фиксация материала водными растворами формалина, во многих случаях она представляется неоптимальной, поскольку при этом часть антигенных детерминант оказывается недоступной для взаимодействия с первичными антителами. В связи с этим были предприняты попытки разработать специальные методы фиксации, при помощи которых удавалось бы лучше сохранить маскируемые (либо разрушаемые) при обычной фиксации антигены [31, 32]. Один из таких фиксаторов — цинк-этанол-формальдегид (ЦЭФ) был разработан в 2006 г. в Научно-исследовательском институте экспериментальной медицины РАМН

[11] и успешно применяется при исследовании не только органов нервной системы, но и других органов и тканей как человека, так и лабораторных животных.

Цель настоящего исследования — анализ результатов проведения иммуногистохимических реакций и гистологических окрасок на материале, фиксированном в ЦЭФ, что необходимо для определения позитивного (либо негативного) влияния этого способа фиксации на сохранность различных тканевых антигенов при использовании как обычной световой микроскопии, так и флюоресцентной, а также конфокальной лазерной микроскопии.

Для исследования были использованы различные объекты — головной мозг крысы, фрагменты головного мозга человека, плацента человека, сердце, поджелудочная железа, надпочечник, почка, легкое крысы и человека. Сведения об использованном материале, экспериментальных воздействиях и способах эвтаназии животных содержатся в

Сведения об авторах:

Коржевский Дмитрий Эдуардович (e-mail: DEK2@yandex.ru), *Сухорукова Елена Геннадьевна* (e-mail: len48@inbox.ru),
Гилерович Елена Георгиевна (e-mail: iemmorphol@yandex.ru), *Петрова Елена Сергеевна* (e-mail: iemmorphol@yandex.ru),

Кирик Ольга Викторовна (e-mail: olga_kirik@mail.ru), *Григорьев Игорь Павлович* (e-mail: ipg-iem@yandex.ru),

Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАН, 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

**Сведения об антигенах, которые хорошо выявлялись в тканях животных и человека
после фиксации в цинк-этанол-формальдегиде при помощи указанных первичных антител**

Антиген	Антитела	Публикации
Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP)	Кроличьи поликлональные; Dako, Дания	[16, 23, 24, 26, 27]
	Мышинные моноклональные (клон SPM507); Spring Bioscience, США	[27]
Виментин	Мышинные моноклональные (клон V9); Dako, Дания	[8, 18, 23, 24, 26, 27]
	Мышинные моноклональные (клон Vim3b4); Dako, Дания	[27]
Белок Iba-1 (AIF1)	Козьи поликлональные; Abcam, Великобритания	[9, 17, 28]
Нестин	Кроличьи поликлональные; Chemicon, США	[27]
	Мышинные моноклональные (клон Rat-401); BD Pharmingen, США	[6, 24, 27]
Белок Msi-1 (Musashi-1)	Кроличьи поликлональные; Abcam, Великобритания	[6, 26]
Белки теплового шока HSP70	Кроличьи поликлональные; Leica-Novocastra, Великобритания	[1]
Нейрональная NO-синтаза (nNOS)	Мышинные моноклональные (клон 16); BD Transduction Laboratories, США	[19]
Белок NeuN	Мышинные моноклональные (клон A60); Chemicon, США	[10]
Белки нейрофиламентов	Мышинные моноклональные (клон 2F11); Dako, Дания	[22]
Периферин	Кроличьи поликлональные; Chemicon, США	[7, 22]
α -тубулин	Мышинные моноклональные (клон DM-1A); BioGenex, США	[4]
β -III-тубулин	Мышинные моноклональные (клон TU-20); Chemicon, США	[10]
Нейрон-специфическая енолаза (NSE)	Кроличьи поликлональные (AB951); Chemicon, США	[7]
Глутаматдекарбоксилаза (GAD67)	Кроличьи поликлональные; Spring Bioscience, США	[25]
Синаптофизин	Кроличьи поликлональные; Monosan, Нидерланды	[29]
	Кроличьи поликлональные; Dako, Дания	[7, 22, 29, 30]
	Мышинные моноклональные (клон SY38); Dako, Дания	[10]
Тирозингидроксилаза	Кроличьи поликлональные; Abcam, Великобритания	[3, 22]
	Мышинные моноклональные (клон 1B5); Leica-Novocastra, Великобритания	[2]
	Мышинные моноклональные (клон ТОН-A1); BD Pharmingen, США	[2]
Даблкортин (DCX)	Кроличьи поликлональные (ab18723); Abcam, Великобритания	[10, 20]
Ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA)	Мышинные моноклональные (клон PC10); Abcam, Великобритания	[15]
Пролиферативный маркер, циклин D1	Кроличьи моноклональные (клон SP4); Spring Bioscience, США	[15]
Пролиферативный маркер, циклин B1	Мышинные моноклональные (клон V152); Dako, Дания	[15]
Фосфорилированный гистон H3	Кроличьи поликлональные; Abcam, Великобритания	[13, 15]
Пролиферативный маркер Ki67	Мышинные моноклональные (клон MIB5); Dako, Дания	[15]
Гладкомышечный α -актин-1	Мышинные моноклональные (клон 1A4); Dako, Дания	[5]
Эзрин (цитовиллин)	Мышинные моноклональные (клон 3C12); Diagnostic BioSystems, США	[14]

соответствующих опубликованных ранее материалах (ссылки представлены в *таблице*).

Все исследования, выполненные на лабораторных животных, были проведены с учетом «Правил проведения работ с использованием экс-

периментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Для фиксации материала был использован ЦЭФ, который готовили по ранее опубликованной прописи: 1 г хлорида цинка на 90 мл 96% этанола и 10 мл концентриро-

ванного (35–40%) раствора формальдегида [11], а также ЦЭФ, разведенный 96% этанолом 1:1. Для сравнения результатов окраски был использован аналогичный материал, фиксированный в 10% формалине, 96% этаноле и жидкости Буэна. Информация об изученных антигенах и использованных первичных антителах представлена в *таблице*.

В результате анализа многочисленных препаратов, полученных после применения фиксации ЦЭФ, для большинства исследованных антигенов было установлено, что использованный способ фиксации позволяет добиться более высокой чувствительности иммуноцитохимической реакции по сравнению с другими методами фиксации и, прежде всего, после фиксации 10% формалином. Фиксация в ЦЭФ позволила в ряде случаев отказаться от обычно рекомендуемой процедуры теплового демаскирования антигенов, что обеспечило сокращение времени, необходимого для проведения исследования и дало возможность лучше сохранить структуру ткани (в связи с устранением высокотемпературного воздействия). Применение методов флуоресцентной и конфокальной лазерной микроскопии после ЦЭФ обеспечивает высокое качество получаемых изображений [9, 16, 27]. При этом не происходит существенного повышения фоновой автофлуоресценции (в сравнении со спиртовой и формалиновой фиксацией). После фиксации в ЦЭФ хорошо удается не только окраска по Нисслию [11], но и обычные обзорные окраски (гематоксилином — эозином, трихромный метод Массона и другие способы окраски соединительной ткани). После фиксации в ЦЭФ эритроциты приобретают способность ярче окрашиваться эозином, что сближает данный фиксатор с фиксаторами, содержащими соли ртути.

Тем не менее, ЦЭФ, помимо отмеченных достоинств, имеет и отдельные недостатки, которые в большинстве случаев могут быть устранены либо предупреждены. Так, при использовании материала, содержащего значительное количество крови (застойное полнокровие сосудов легкого, кровоизлияние в мозг, полнокровие лакун плаценты), на препаратах в области скопления эритроцитов иногда обнаруживаются отложения черно-коричневого пигмента, который представляет собой формалиновый пигмент [21]. При использовании такого материала фиксатор можно развести 96% этанолом 1:1. Это позволит снизить концентрацию формальдегида в растворе и, таким образом, уменьшить вероятность формирования формалинового осадка в тканях. Можно прибегнуть и к традиционным способам устранения формалинового осадка в срезах [21].

Другим относительным недостатком предложенного способа фиксации является более значительное уплотнение тканей, чем при обычной формалиновой фиксации и фиксации в жидкости Буэна. Данный недостаток никак не проявляется при изучении головного мозга и ряда паренхиматозных органов, но оказывается существенным при изготовлении срезов плотных тканей (ткани кожи, мышечная ткань). В этом случае при изготовлении срезов рекомендуется использовать ротационный микротом и специальные одноразовые лезвия, предназначенные для изготовления срезов плотных тканей.

При проведении иммуноцитохимических исследований в редких случаях фиксация в ЦЭФ не оказывается оптимальной. Нами было обнаружено, что при выявлении инсулина и серотонина, несмотря на высокую чувствительность реакции, наблюдается значительная диффузия антигена из области его первичной локализации. При этом более жесткая формалиновая фиксация позволила получить лучший результат — отсутствие диффузии антигена из структур, где он первично был локализован (В-клеток поджелудочной железы для инсулина и нейронов ядер шва среднего мозга, а также энтерохромаффинных клеток и клеток карциноидной опухоли — для серотонина [12]). Учитывая то, что диффузия антигена характерна для растворимых и низкомолекулярных соединений, к которым относятся как серотонин, так и пептидный гормон — инсулин, можно полагать, что ЦЭФ не будет оптимальным фиксатором и для других антигенов, имеющих малую молекулярную массу (аминокислот, отдельных гормонов и низкомолекулярных пептидов) в связи с их частичной растворимостью и способностью к диффузии при фиксации.

Представленный анализ результатов собственных данных, полученных при фиксации материала в ЦЭФ, позволяет заключить, что использованный метод перспективен для применения как в иммуноцитохимических исследованиях, так и в общегистологической практике. Кроме того, данный фиксатор обладает достоинствами, позволяющими его рекомендовать для фиксации объектов, предназначенных для последующего проведения флуоресцентной и конфокальной лазерной микроскопии.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проекты 12-04-31857 мол_а, 11-04-01693а, 10-04-00180а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева О. С., Коржевский Д. Э., Отеллин В. А. и др. Преадаптация гипоксией к азотному наркозу и белки теплового шока в нейронах коры головного мозга при этих состояниях. Докл. РАН, 2009, Т. 425, № 4, с. 553–555.

2. Григорьев И. П., Василенко М. С., Сухорукова Е. Г. и Коржевский Д. Э. Применение различных антител к тирозингидроксилазе для изучения катехоламинергических систем головного мозга млекопитающих. *Морфология*, 2010, т. 138, вып. 6, с. 60–63.
3. Григорьев И. П., Гилерович Е. Г., Петрова Е. С. и др. Катехоламинергические структуры переднего мозга крыс после транзиторной ишемии. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*, 2012, т. 11, № 2, с. 57–60.
4. Григорьев И. П., Шкляева М. А., Кирик О. В. и др. Распределение альфа-тубулина в структурах переднего мозга крысы. *Морфология*, 2013, т. 143, вып. 1, с. 7–10.
5. Закурина А. Н., Коржевский Д. Э. и Павлова Н. Г. Плацентарная недостаточность — морфофункциональные параллели. *Журн. акушерства и женских болезней*, 2010, т. 59, № 5, с. 51–55.
6. Кирик О. В., Власов Т. Д. и Коржевский Д. Э. Маркеры нейральных стволовых клеток нестин и *musashi-1* в клетках конечного мозга крысы после транзиторной фокальной ишемии. *Морфология*, 2012, т. 142, вып. 4, с. 19–24.
7. Кирик О. В., Ворончихин П. А., Чумасов Е. И. и Коржевский Д. Э. Применение реакции на синаптофизин для выявления нейроэпителлиальных телец легкого крысы. В кн.: *Бабухинские чтения в Орле, М., Из-во ЗАО «Ретиноиды»*, 2011, вып. 32, с. 70–71.
8. Кирик О. В. и Коржевский Д. Э. Виментин в клетках эпендимы и субвентрикулярной пролиферативной зоны конечного мозга крысы. *Клеточные технологии в биологии и медицине*, 2012, № 4, с. 210–214.
9. Кирик О. В., Сухорукова Е. Г. и Коржевский Д. Э. Кальций-связывающий белок Iba-1/AIF1 в клетках головного мозга крысы. *Морфология*, 2010, т. 137, вып. 2, с. 5–8.
10. Колос Е. А. и Коржевский Д. Э. Изучение нейрогенеза в спинномозговых ганглиях крысы с помощью иммуногистохимических маркеров дифференцировки. В кн.: *Функциональная межполушарная асимметрия и пластичность мозга*. М., Изд-во ФГБУ НЦН РАМН, 2012, с. 293–296.
11. Коржевский Д. Э., Григорьев И. П. и Отеллин В. А. Применение обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейрогистологических исследованиях. *Морфология*, 2006, т. 129, вып. 1, с. 85–86.
12. Коржевский Д. Э., Драй Р. В. и Костюкевич С. В. Иммуногистохимический метод выявления ЕС (энтерохромаффинных)-клеток эпителия слизистой оболочки кишки крысы. *Морфология*, 2008, т. 133, вып. 1, с. 78–81.
13. Коржевский Д. Э., Кирик О. В. и Безнин Г. В. Метод селективного выявления пролиферирующих клеток в структурах формирующейся нервной системы, основанный на определении фосфорилированного гистона H3. *Морфология*, 2012, т. 142, вып. 6, с. 69–72.
14. Коржевский Д. Э., Кирик О. В. и Гиляров А. В. Клетки головного мозга крысы, содержащие эзрин (цитовиллин). *Морфология*, 2011, т. 140, вып. 6, с. 86–88.
15. Коржевский Д. Э., Кирик О. В., Петрова Е. С. и Сухорукова Е. Г. Изучение пролиферации клеток в структурах развивающейся нервной системы. В кн.: *Вопросы морфологии XXI века*. СПб., Изд-во ДЕАН, 2012, вып. 3, с. 65–69.
16. Коржевский Д. Э., Кирик О. В., Сухорукова Е. Г. и др. Изучение пространственной организации астроцитов головного мозга при помощи конфокальной лазерной микроскопии. *Морфология*, 2009, т. 135, вып. 3, с. 76–79.
17. Коржевский Д. Э., Кирик О. В., Сухорукова Е. Г. и Власов Т. Д. Структурная организация микроглиоцитов стриатума после транзиторной фокальной ишемии. *Морфология*, 2012, т. 141, вып. 2, с. 28–32.
18. Коржевский Д. Э., Ленцман М. В., Кирик О. В. и Отеллин В. А. Виментин-иммунопозитивные клетки конечного мозга крысы после экспериментального ишемического инсульта. *Морфология*, 2007, т. 132, вып. 5, с. 23–27.
19. Коржевский Д. Э., Отеллин В. А., Григорьев И. П. и др. Иммуногистохимическое выявление нейрональной NO-синтазы в клетках головного мозга крысы. *Морфология*, 2007, т. 132, вып. 4, с. 77–80.
20. Коржевский Д. Э., Петрова Е. С., Кирик О. В. и Отеллин В. А. Оценка дифференцировки нейронов в эмбриогенезе крысы с использованием иммуногистохимического выявления дабл-кортина. *Морфология*, 2008, т. 133, вып. 4, с. 7–10.
21. Лилли Р. *Патогистологическая техника и практическая гистохимия*. М., Мир, 1969.
22. Нагорнев В. А., Чумасов Е. И., Коржевский Д. Э. и др. Современные подходы к изучению нервных аппаратов артерий при атеросклерозе и сахарном диабете. *Мед. акад. журн.*, 2010, т. 10, № 3, с. 19–27.
23. Петрова Е. С. Виментин и глиальный фибриллярный кислый белок в клетках эктопических нейротрансплантатов неокортекса. *Морфология*, 2011, т. 139, вып. 2, с. 22–26.
24. Петрова Е. С. Астроглиогенез в гетеротопических аллотрансплантатах эмбрионального неокортекса крыс. *Бюл. экспер. биол.*, 2011, т. 151, № 4, с. 191–195.
25. Петрова Е. С., Власов Т. Д., Колос Е. А. и Коржевский Д. Э. ГАМК-ергические нейроны стриатума крыс в норме и при ишемическом повреждении. В кн.: *Функциональная межполушарная асимметрия и пластичность мозга*. М., Изд-во ФГБУ НЦН РАМН, 2012, с. 347–349.
26. Петрова Е. С., Исаева Е. Н. и Коржевский Д. Э. Иммуногистохимическое исследование дифференцировки диссоциированных клеток эмбрионального спинного мозга и неокортекса крыс в условиях аллотрансплантации в поврежденный нерв. В кн.: *Функциональная межполушарная асимметрия и пластичность мозга*. М., Изд-во ФГБУ НЦН РАМН, 2012, с. 344–347.
27. Сухорукова Е. Г., Алексеева О. С., Кирик О. В. и др. Сравнительные аспекты структурной организации астроцитов I слоя коры головного мозга человека и крысы. *Журн. эволюц. биохим.*, 2012, т. 48, № 3, с. 280–286.
28. Сухорукова Е. Г., Кирик О. В. и Коржевский Д. Э. Применение иммуногистохимического метода для выявления микроглии головного мозга в парафиновых срезах. *Бюл. экспер. биол.*, 2010, т. 149, № 6, с. 709–712.
29. Чумасов Е. И., Ворончихин П. А. и Коржевский Д. Э. Эфферентная иннервация сосудов и бронхов легкого крысы (иммуногистохимическое исследование). *Морфология*, 2012, т. 142, вып. 4, с. 49–53.
30. Чумасов Е. И., Петрова Е. С. и Коржевский Д. Э. Иммуноморфологический анализ иннервации хромаффинных клеток параганглиев артерий и сердца млекопитающих. *Журн. эволюц. биохим.*, 2011, т. 47, № 4, с. 325–331.

31. Beckstead J. H. A simple technique for preservation of fixation-sensitive antigens in paraffin-embedded tissues: addendum. *J. Histochem. Cytochem.*, 1995, v. 43, № 3, p. 345.
32. Benerini-Gatta L., Cadei M., Balzarini P. et al. Application of alternative fixatives to formalin in diagnostic pathology. *Europ. J. histochem.*, 2012, v. 56, p. 63–70.

Поступила в редакцию 13.02.2013

**ADVANTAGES AND DISADVANTAGES
OF ZINK-ETHANOL-FORMALDEHYDE
AS A FIXATIVE FOR IMMUNOCYTOCHE-
MISTRY AND CONFOCAL LASER MICRO-
SCOPY**

*D. E. Korzhevskiy, Ye. G. Sukhorukova, Ye. G. Gilerovich,
Ye. S. Petrova, O. V. Kirik and I. P. Grigoriev*

The paper presents an analysis of authors' results obtained using fixation of various tissues in zink-ethanol-formaldehyde

(ZEF). It was found that fixation in ZEF, in comparison with other methods of fixation, allowed to achieve higher sensitivity of immunocytochemical reaction for a large number of antigens studied and, in many cases, to avoid heat unmasking of antigens. It also provided high resolution of the images obtained using the fluorescent and confocal laser microscopy. However, the studies of antigens with small molecular mass revealed the antigen diffusion from the site of original localization. The data obtained suggest that fixation of a material in ZEF fixative is promising for both immunocytochemical studies, including those using the fluorescent and confocal laser microscopy, and general histological practice.

Key words: *immunocytochemistry, fixation technique, confocal laser microscopy*

Laboratory of the Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, RAMS North-Western Branch Institute of Experimental Medicine