

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

© Е. А. Колос, Д. Э. Коржевский, 2013
УДК 578.61

Е. А. Колос и Д. Э. Коржевский

ВЫЯВЛЕНИЕ НЕЙРОНАЛЬНЫХ И ГЛИАЛЬНЫХ АНТИГЕНОВ ПОСЛЕ ДЕКАЛЬЦИНАЦИИ В РАСТВОРЕ МУРАВЬИНОЙ КИСЛОТЫ И ФИКСАЦИИ В ЦИНК-ЭТАНОЛ-ФОРМАЛЬДЕГИДЕ

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

Цель настоящего исследования состояла в определении возможности иммуногистохимического выявления различных тканевых антигенов на парафиновых срезах спинного мозга крысы, окруженного костной тканью позвоночника и прилежащими мышцами, фиксированного в цинк-этанол-формальдегиде после проведения декальцинации муравьиной кислотой у взрослых крыс ($n=5$) и новорожденных крысят ($n=2$) линии Вистар. В работе использовали антитела к глиальному фибриллярному белку, нейрофиламентам, к ядерному белку нервных клеток, к тиразингидроксилазе, к белку синаптических пузырьков — синаптофизину и белку промежуточных филаментов — виментину. Сочетание фиксации объектов в цинк-этанол-формальдегиде и декальцинации в 21% растворе муравьиной кислоты обеспечивает оптимальную сохранность изученных антигенов.

Ключевые слова: иммуногистохимия, декальцинация, фиксатор цинк-этанол-формальдегид

В настоящее время иммуногистохимическое выявление различных нейрональных и глиальных белков широко используется для изучения спинного мозга и чувствительных узлов спинномозговых нервов (ЧУСН). Описанный в литературе метод извлечения спинного мозга с оболочками, корешками и ЧУСН из позвоночного канала довольно трудоемкий и требует большой квалификации оперирующего [3]. Однако даже при использовании этого малотравматичного способа не в полной мере сохраняются все анатомические соотношения структур. Для некоторых исследований предпочтительным является изготовление срезов органокомплекса, состоящего из спинного мозга, окруженного позвонками и прилежащими мышцами. Приготовление парафиновых срезов объектов, которые содержат костные фрагменты, и их дальнейшее иммуногистохимическое исследование требуют предварительного декальцинирования образцов. Обычно с этой целью применяют разбавленные сильные кислоты (азотную или соляную) [4], хелатирующие агенты (этилендиаминтетрауксусную кислоту) [5, 7, 10] или слабые кислоты (муравьиную, уксусную или пикриновую) [4]. Однако ряд исследований показывают, что применение данных реагентов может вызвать

денатурацию белков, что проявляется снижением активности ферментов и уменьшением чувствительности иммуногистохимических реакций [5, 6, 8]. J. A. Ramos-Vara и M. A. Miller [9] показали, что различные антигены не одинаково реагируют на кислотное декальцинирование и длительность воздействия декальцинирующих агентов.

Цель настоящей работы состояла в определении возможности иммуногистохимического выявления различных тканевых антигенов на парафиновых срезах спинного мозга крысы, фиксированного в цинк-этанол-формальдегиде после проведения декальцинации муравьиной кислотой.

Содержание и умерщвление животных осуществляли с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Исследовали шейный отдел спинного мозга, окруженного костной тканью позвоночника и прилежащими мышцами у взрослых крыс ($n=5$) и новорожденных крысят ($n=2$) линии Вистар. Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [2] в течение 1 сут и декальцинировали в растворе следующего состава: вода дистиллированная — 150 мл; раствор муравьиной кислоты 85% (Вектон, Россия) — 50 мл; формиат натрия (Ч, Вектон, Россия) — 7 г. Материал от взрослых

Сведения об авторах:

Колос Елена Андреевна, Коржевский Дмитрий Эдуардович (e-mail: iemmorphol@yandex.ru), лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

крыс декальцинировали в растворе муравьиной кислоты в течение 3 сут при комнатной температуре, материал от новорожденных крысят — в течение 1 сут при комнатной температуре и перемешивании. Степень завершенности процесса декальцинации контролировали с помощью препаровальной иглы. После завершения декальцинирования материал промывали в дистиллированной воде, обезжовивали в спиртах возрастающей концентрации, удаляли этанол петролейным эфиром и заливали в парафин. Серийные срезы толщиной 5 мкм подготавливали к иммуногистохимическим исследованиям по общепринятой методике с использованием теплового демаскирования антигенов [1].

Для проверки сохранности антигенов в исследуемом материале были проведены иммуногистохимические реакции с применением антител к разным группам антигенов (ядерных, цитоплазматических). В настоящем исследовании использовали реакции на глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), нейрофиламенты (NF), ядерный белок нервных клеток (NeuN), тирозингидроксилазу (TH), белок синаптических пузырьков — синаптофизин (SYN) и белок промежуточных филаментов — виментин (Vim). При постановке реакций использовали различные первичные и вторичные антитела (таблица). Иммуногистохимическое выявление антигенов проводили в соответствии с ранее опубликованными протоколами [1]. Для контроля иммуногистохимической реакции использовали препараты ЧУСН взрослых крыс (n=3), а также препараты спинного мозга новорожденных крысят, не подвергшиеся декальцинации (n=3).

При постановке иммуногистохимических реакций были получены хорошие результаты выявления всех специфических антигенов со всеми используемыми антителами. Распределение окрашенного продукта реакции в каждом исследуемом случае соответствовало общим представлениям о локализации структур, которые должны его содержать (внутренний положительный контроль).

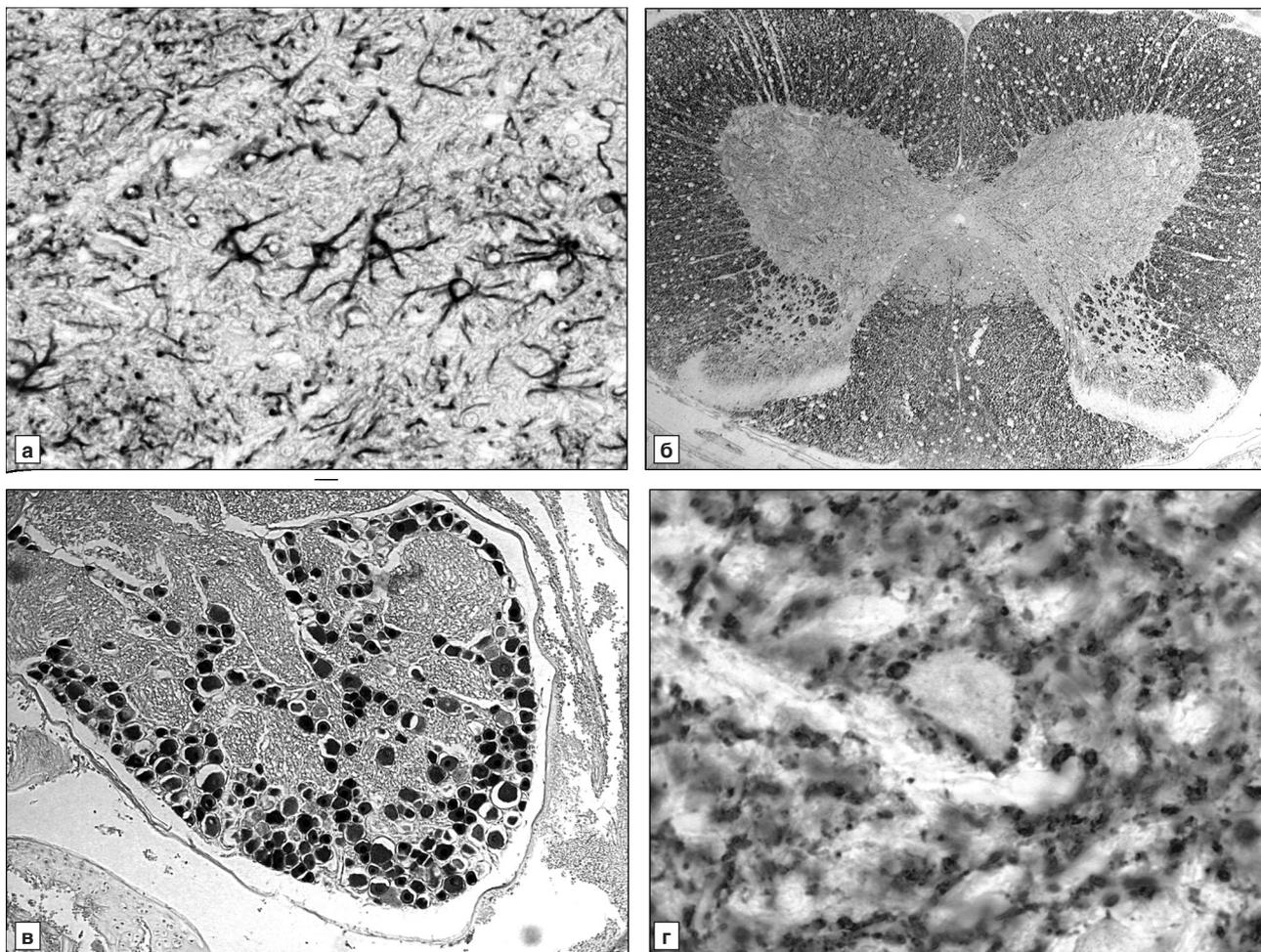
Как известно, GFAP образует глиальные промежуточные филаменты как в зрелых, так и в дифференцирующихся астроцитах [1]. В спинном мозгу новорожденных крысят и у взрослых крыс положительную реакцию на GFAP давали астроциты, локализованные в белом и сером веществе (рисунки, а).

При выявлении NF наблюдалось окрашивание толстых нервных волокон в белом веществе и сети тонких переплетенных волокон в сером веществе спинного мозга (см. рисунок, б). Также в мышечной ткани вблизи спинного мозга наблюдалось окрашивание небольших нервных пучков и нервных стволов с толстыми осевыми цилиндрами.

TH является маркером катехоламинергических нейронов [1]. В настоящем исследовании в белом веществе спинного мозга было выявлено небольшое количество TH-иммунопозитивных тонких осевых цилиндров. В сером веществе наблюдалось окрашивание нервных волокон, локализованных преимущественно в задних рогах спинного мозга. В прилегающих к спинному мозгу мышцах положительная реакция на TH была обнаружена в нервных волокнах вокруг поперечных срезов мелких сосудов.

Иммуногистохимические реагенты

Маркер	Первичные антитела (разведение указано при использовании концентрированных антител)	Вторичные антитела
Ядерный белок нервных клеток	Мышиные моноклональные антитела (клон A60) (Chemicon, США), 1:300	EnVision+System Labeled Polymer-HRP Anti-Mouse(K4001; Dako, Дания)
Тирозингидроксилаза	Кроличьи поликлональные (AbCam, Великобритания), 1:1000	Super Sensitive Polymer-HRP Detection Kit HRP/Dab (Bio Genex, США)
Нейрофиламенты	Мышиные моноклональные антитела (клон 2F11) (Dako, Дания)	EnVision+System Labeled Polymer (K4001; Dako, Дания)
Глиальный фибриллярный кислый белок	Кроличьи поликлональные антитела (Dako, Дания)	Super Sensitive Polymer-HRP Detection Kit HRP/Dab (Bio Genex, США)
Глиальный фибриллярный кислый белок	Мышиные моноклональные антитела (клон SPM507)(Spring Bioscience, США), 1:100	EnVision+System Labeled Polymer-HRP Anti-Mouse(K4001;Dako, Дания)
Синаптофизин	Мышиные моноклональные антитела (клон SY38) (Dako, Дания), 1:30	EnVision+System Labeled Polymer-HRP Anti-Mouse (K4001; Dako, Дания)
Виментин	Мышиные моноклональные антитела (клон V9) (Dako, Дания), 1:100	EnVision+System Labeled Polymer-HRP Anti-Mouse (K4001; Dako, Дания)



Результаты иммуногистохимического выявления глиального фибриллярного кислого белка (а), нейрофиламентов (б), синаптофизина (г) в спинном мозгу взрослой крысы, ядерного белка нервных клеток (в) в чувствительном узле спинномозгового нерва на препаратах, полученных после декальцинации в растворе муравьиной кислоты.

Ув.: а, г — 1000; б — 40; в — 100

Положительную реакцию на NeuN давали многие нейроны, локализованные в сером веществе спинного мозга, а также ярко окрашивались ядра большинства нейронов ЧУСН (см. рисунок, в).

Реакция на SYP позволила выявить в сером веществе вокруг нейронов и их отростков большое количество синаптических бутонов различного размера (см. рисунок, г). Иммунопозитивная реакция на SYP обнаружена в цитоплазме некоторых крупных и мелких нейронов ЧУСН. За пределами спинного мозга хорошо выявились SYP-позитивные терминалы вблизи сосудов скелетных мышц.

Положительную реакцию на Vim давали эпендима центрального канала, эндотелий кровеносных сосудов, а также глиальные элементы ЧУСН.

Интенсивность реакций была сопоставима с интенсивностью реакции на срезах материала, не подвергнутого декальцинации.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что фиксация в цинк-этанол-формальдегиде позволяет стабилизировать нейрональные и глиальные антигены и сохранять их при дальнейшей декальцинации в растворе муравьиной кислоты для проведения иммуногистохимического исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коржевский Д. Э., Кирик О. В., Карпенко М. Н. и др. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии: руководство. СПб., СпецЛит, 2012.
2. Коржевский Д. Э., Сухорукова Е. Г., Гилерович Е. Г. и др. Преимущества и недостатки цинк-этанол-формальдегида как фиксатора для иммуногистохимических исследований и конфокальной лазерной микроскопии. Морфология, 201, т. 143. вып. 2, с. 81–85.
3. Таюшев К. Г. Руководство по лабораторной нейростологической технике. СПб., Изд-во Российск. науч.-исслед. нейрохир. института им. проф. А. Л. Поленова, 2005.
4. Athanasou N. A., Quinn J., Heryet A. et al. Effect of decalcification agents on immunoreactivity of cellular antigens. J. Clin. Pathol., 1987, v. 40, № 8, p. 874–878.

5. Hosoya A., Hoshi K., Sahara N. et al. Effects of fixation and decalcification on the immunohistochemical localization of bone matrix proteins in fresh-frozen bone sections. *Histochem. Cell Biol.*, 2005, v. 123, № 6, p. 639–646.
6. Kawamoto T. and Shimizu M. A method for preparing 2- to 50-mm-thick fresh-frozen sections of large samples and undecalcified hard tissues. *Histochem. Cell Biol.*, 2000, v. 113, № 5, p. 331–339.
7. Mori S., Sawai T., Teshima T. et al. A new decalcifying technique for immunohistochemical studies of calcified tissue, especially applicable to cell surface marker demonstration. *J. Histochem. Cytochem.*, 1988, v. 36, № 1, p. 111–114.
8. Mullink H., Henzen-Logmans S. C., Tadema T. M. et al. Influence of fixation and decalcification on the immunohistochemical staining of cell-specific markers in paraffin-embedded human bone biopsies. *J. Histochem. Cytochem.*, 1985, v. 33, № 11, p. 1103–1109.
9. Ramos-Vara J. A. and Miller M. A. Immunohistochemical identification of canine melanocytic neoplasms with antibodies to melanocytic antigen PNL2 and tyrosinase: comparison with melan A. *Vet. Pathol.*, 2011, v. 48, № 2, p. 443–450.
10. Yamamoto-Fukuda T., Shibata Y., Hishikawa Y. et al. Effects of various decalcification protocols on detection of DNA strand breaks by terminal dUTP nick end labelling. *Histochem. J.*, 2000, v. 32, № 11, p. 697–702.

Поступила в редакцию 14.04.2013

DECALCIFICATION IN FORMIC ACID AFTER FIXATION IN ZINC-ETHANOL-FORMALDEHYDE DOES NOT PRECLUDE IDENTIFICATION OF NEURONAL AND GLIAL MARKERS

E. A. Kolos and D. E. Korzhevskiy

The aim of this study was to determine the possibility of immunohistochemical demonstration of various tissue antigens in paraffin sections of zinc-ethanol-formaldehyde-fixed spinal cord, surrounded by the vertebral tissues and adjacent muscles, after decalcification in formic acid, in adult (n=5) and newborn (n=2) Wistar rats. In the present work, the antibodies used were against: glial fibrillary acidic protein, neurofilaments, neuronal specific nuclear protein, enzyme tyrosine hydroxylase, protein of synaptic vesicles — synaptophysin and the intermediate filament protein — vimentin. Combination of fixation in zinc-ethanol-formaldehyde and decalcification in 21% formic acid solution was shown to provide an optimal preservation of the antigens studied.

Key words: *immunohistochemistry, decalcification, fixation in zinc-ethanol-formaldehyde*

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, St. Petersburg