

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 2006
УДК 578.61

Д.Э. Коржевский, И.П. Григорьев и В.А.Отеллин

ПРИМЕНЕНИЕ ОБЕЗВОЖИВАЮЩИХ ФИКСАТОРОВ, СОДЕРЖАЩИХ СОЛИ ЦИНКА, В НЕЙРОГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ*

Отдел морфологии (зав. — чл.-кор. РАН проф. В.А.Отеллин) Института экспериментальной медицины РАН, Санкт-Петербург

Изучена пригодность обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, для нейрогистологического исследования парафиновых срезов с использованием окраски по Ниссля и методов иммуноцитохимии. Установлено, что содержащие цинк обезвоживающие фиксаторы (цинк-этанол-формальдегид и цинк-ацетон-изопропанол-формальдегид) обладают способностью хорошо сохранять структуру и антигенные свойства нервной ткани и могут быть рекомендованы для использования в нейрогистологических исследованиях.

Ключевые слова: цинк, фиксация, головной мозг, иммуноцитохимия, окраска по Ниссля.

Обезвоживающие фиксирующие среды (спиртовые фиксаторы) часто применяют в нейрогистологических исследованиях, поскольку они позволяют добиться высокого качества окраски по методу Ниссля. Однако фиксация в этаноле или жидкости Карнуа не способствует оптимальному выявлению иммуноцитохимических маркеров. Кроме того, эти фиксаторы не позволяют в дальнейшем использовать методы теплового и протеолитического демаскирования.

Не так давно в печати появились сообщения об особых фиксирующих свойствах солей цинка, которые при добавлении в альдегидные фиксаторы, приготовленные на водной основе [3] и при действии в буферной среде [4] обеспечивают очень хорошую сохранность тканевых антигенов и ДНК [7], даже при последующей заливке в парафин, что подтверждается и нашими исследованиями [1]. Остается неизвестным, обладают ли столь же ценными свойствами обезвоживающие фиксаторы, приготовленные на спиртовой основе с добавлением солей цинка.

Цель настоящего исследования состояла в изучении пригодности обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, для нейрогистологического исследования парафиновых срезов с использованием окраски по Ниссля и методов иммуноцитохимии.

В работе использован головной мозг крыс линий Вистар и Sprague—Dowley. Содержание животных и все экспериментальные манипуляции осуществляли с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Головной мозг фиксировали методом погружения в 4 различных фиксирующих среды (таблица). Фиксированный материал обезвоживали с помощью 96° этанола и абсолютированного (99%) изопропанола (Вектон,

Россия) и заливали в парафин по общепринятой методике. Готовили срезы толщиной 4 и 7 мкм. Выявление иммуноцитохимических маркеров осуществляли при помощи моноклональных антител к белкам нейрофиламентов (клон 2F11, DakoCytomation, Дания) и ядерному белку нервных клеток NeuN (клон A60, Chemicon, США), которые чувствительны к перефиксации и требуют проведения демаскирования при использовании обычных иммуноцитохимических фиксаторов [5,6]. Для выявления связавшихся первичных антител применяли реагенты фирмы DakoCytomation (Дания): EnVision+ /HRP-Mouse, нормальную сыворотку крови крысы и набор DAB+. После проведения иммуноцитохимической реакции часть срезов докрашивали квасцовым гематоксилином (после реакции на нейрофиламенты) и метиленовым зеленым (после реакции на белок NeuN).

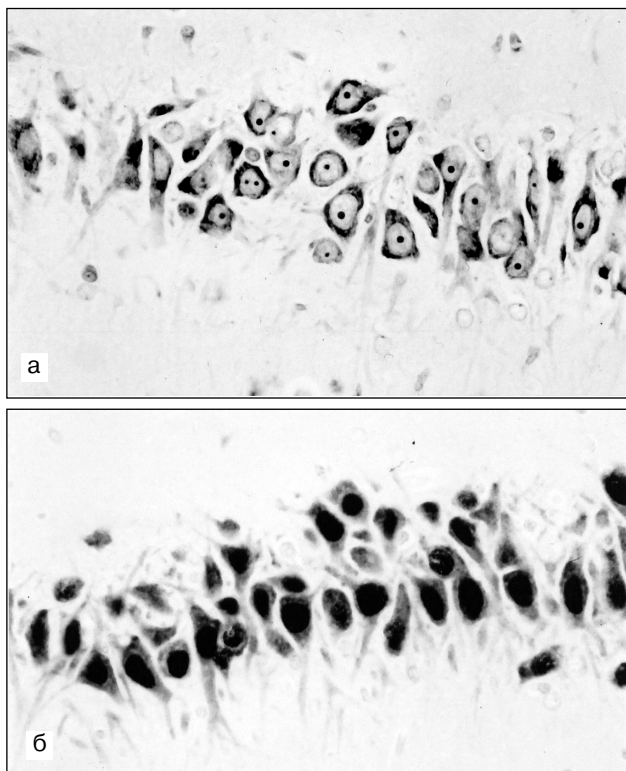
Окраску по Ниссля проводили в соответствии с общепринятыми рекомендациями (регрессивным способом, с дифференцировкой в подкисленном 96° этаноле), используя толудиновый синий фирм Acros и Serva (Германия).

Проверка пригодности цинк-содержащих обезвоживающих фиксаторов для нейрогистологического исследования показала, что цинк-этанол по Рейману и Унна и цинк-ацетон-изопропанол не позволяют добиться хорошей сохранности нервной ткани из-за значительного сжатия материала, что ведет к деформации мозга по краю препаратов и сморщиванию нейронов. Цинк-этанол-формальдегид (ЦЭФ) и цинк-ацетон-изопропанол-формальдегид (ЦАИФ) позволяют хорошо сохранить структуру нервной ткани и избежать артефактной деформации нервных клеток. Окраска по Ниссля удается как после фиксации в цинк-этанол-формальдегиде, так и после ЦАИФ (рисунк). Иммуноци-

Состав исследованных фиксирующих сред

Компоненты	Цинк-этанол по Рейману и Унна [2]	Цинк-этанол-формальдегид	Цинк-ацетон-изопропанол	Цинк-ацетон-изопропанол-формальдегид
Хлорид цинка, г	2	1	1	1
96° этанол, мл	100	100	—	—
Ацетон (ЧДА), мл	—	—	50	50
99% изопропанол, мл	—	—	50	50
35–38% водный раствор формальдегида, мл	—	10	—	10

*Работа выполнена при поддержке программы «Ведущие научные школы России» (проект — НШ-1163.2004.4) и грантов РФФИ 05-04-49397 и 04-04-48227.



Пирамидные нейроны гиппокампа крысы (область CA2) после фиксации в цинк-этанол-формальдегиде при окраске по Нислю (а) и после иммуноцитохимической реакции на нейрональный ядерный антиген NeuN (б).

Об. 20, ок. 10.

тохимические реакции на белки нейрофиламентов и ядерный белок NeuN после фиксации в ЦЭФ и ЦАИФ удаются без применения методов демаскирования (см. рисунок). Сравнение результатов иммуноцитохимических реакций, проведенных после фиксации в ЦЭФ и ЦАИФ, с результатами аналогичных реакций, поставленных на парафиновых срезах головного мозга после фиксации в этанол-формальдегиде и цинк-формалине, показало, что обезвоживающие цинк-содержащие фиксаторы сохраняют ядерный антиген NeuN и антигены нейрофиламентов лучше, чем этанол-формальдегид. Сохранность антигенов после применения ЦЭФ и ЦАИФ не хуже, чем после фиксации в цинк-формалине, а окраска по Нислю удается лучше.

Таким образом, содержащие цинк обезвоживающие фиксаторы (ЦЭФ и ЦАИФ) обладают способностью хорошо сохранять структуру и антигенные свойства нервной ткани и могут быть рекомендованы для использования в нейрогистологических исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коржевский Д.Э., Отеллин В.А. и Григорьев И.П. Иммуноцитохимическое выявление катехоламинергических структур в парафиновых срезах головного мозга крысы после различных способов фиксации. *Морфология*, 2005, т. 127, вып. 1, с. 63–64.
2. Ромейс Б. Микроскопическая техника. М., Изд-во иностр. лит. 1954.
3. Abbondanzo S.L., Allred D.C., Lampkin S. and Banks P.M. Enhancement of immunoreactivity among lymphoid malignant neoplasms in paraffin-embedded tissues by refixation in zinc sulfate-formalin. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 1991, v. 115, № 1, p. 31–33.
4. Beckstead J.H. A simple technique for preservation of fixation-sensitive antigens in paraffin-embedded tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, 1994, v. 42, № 8, p. 1127–1134.
5. Hess D.C., Hill W., Martin-Studdard A. et al. Bone marrow as a source of endothelial cells and NeuN-expressing cells after stroke. *Stroke*, 2002, v. 33, № 5, p. 1362–1368.
6. Sarnat H.B., Nochlin D. and Born D.E. Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in early human fetal nervous system. *Brain Dev.*, 1998, v. 20, № 2, p. 88–94.
7. Wester K, Asplund A, Backvall H. et al. Zinc-based fixative improves preservation of genomic DNA and proteins in histoprocessing of human tissues. *Lab. Invest.*, 2003, v. 83, № 6, p. 889–899.

Поступила в редакцию 07.11.2005 г.

APPLICATION OF ZINC-CONTAINING DEHYDRATING FIXATIVES FOR NEUROHISTOLOGICAL STUDIES

D.E. Korzhevskiy, I.P. Grigoriev, V.A. Otellin

The suitability of zinc-containing dehydrating fixatives for neurohistological study of paraffin sections using Nissl staining and immunocytochemical techniques was examined. It was found that zinc-containing dehydrating fixatives (zinc-ethanol-formaldehyde and zinc-acetone-isopropanol-formaldehyde) had a capacity for good preservation of both structure and antigenic properties of the nervous tissue and could be recommended for application in neurohistological studies.

Key words: *zinc, tissue fixation, immunocytochemistry, brain, Nissl stain.*

Department of Morphology, RAMS Scientific Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg.