

Д.Э. Коржевский и А.В. Гиляров

ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ ТКАНЕВЫХ АНТИГЕНОВ ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ ОБЪЕКТОВ В МЕТИЛСАЛИЦИЛАТЕ

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

Цель настоящего исследования состояла в проверке возможности выявления различных тканевых антигенов стандартными методами иммуноцитохимии в парафиновых срезах объектов, хранившихся в метилсалицилате, перед заливкой в парафин в течение двух лет и более. На примере иммуноцитохимических реакций к белкам промежуточных филаментов нестину, виментину, GFAP, нейрональным маркерам NeuN, нейрон-специфической енолазе, даблкортину показано, что длительное хранение обезвоженных объектов в метилсалицилате не препятствует выявлению антигенов при постановке иммуноцитохимических реакций.

Ключевые слова: метилсалицилат, заливка в парафин, иммуноцитохимия.

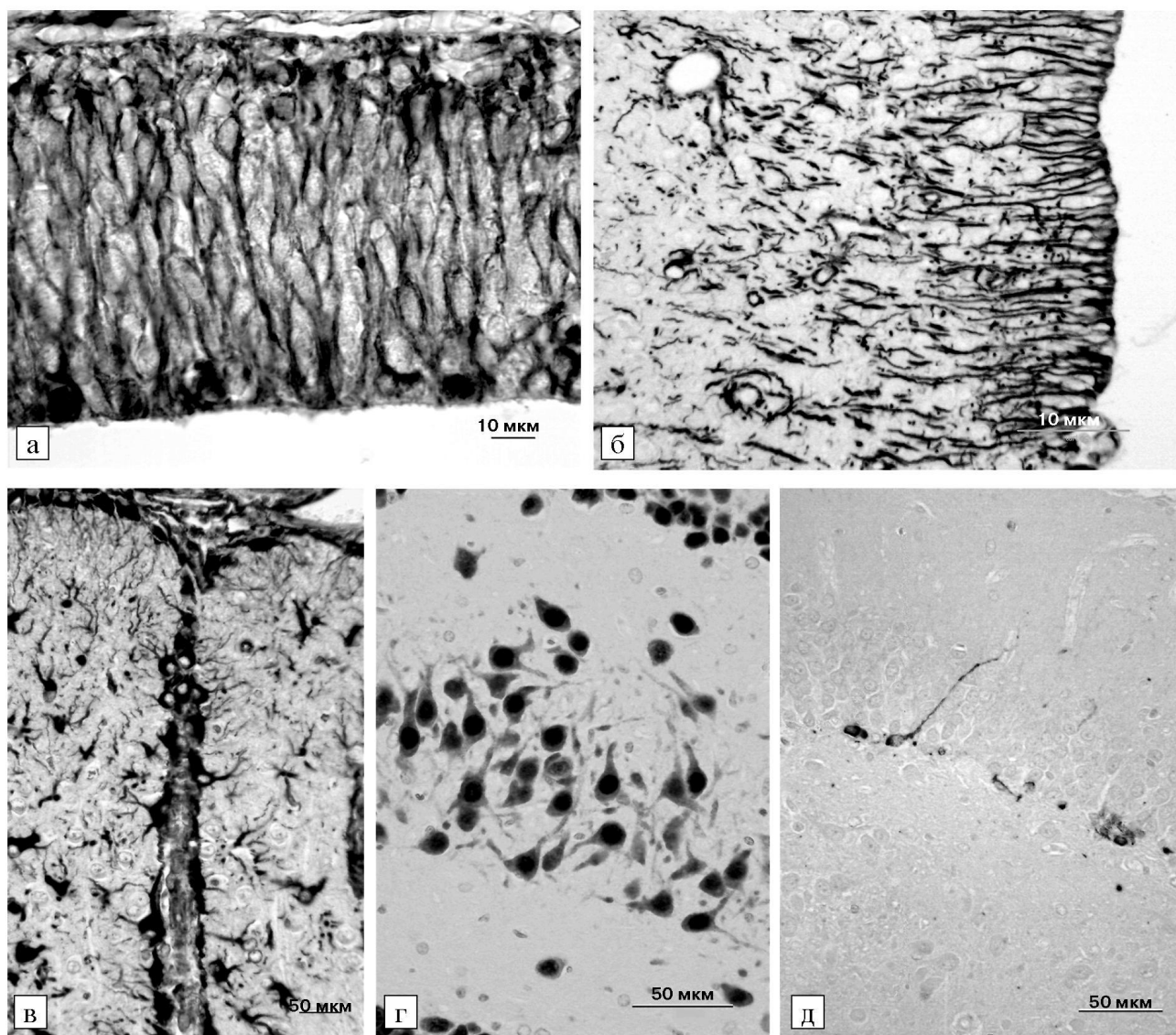
Метилсалицилат (метиловый эфир салициловой кислоты) используется для завершения процесса обезвоживания гистологического материала перед заливкой в парафин, а также для длительного хранения обезвоженных объектов перед заливкой [1]. Основными достоинствами метилсалицилата, дающими ему преимущество перед другими способами хранения еще не залитого в парафин архивного материала, являются: возможность его использования после обезвоживающих фиксаторов [4] без регидратации объектов; возможность визуального контроля процесса обезвоживания; отсутствие необходимости смены и пополнения испарившегося реагента при длительном хранении объектов; смягчение плотных объектов (мышечная ткань, кожа) [1]. Несмотря на эти преимущества, до настоящего времени остается неизвестным, приводит ли длительное воздействие метилсалицилата на биологические объекты к нарушению выявляемости тканевых антигенов методами иммуноцитохимии, что ограничивает его применение в современных морфологических исследованиях.

Цель настоящего исследования состояла в проверке возможности выявления различных тканевых антигенов стандартными методами иммуноцитохимии в парафиновых срезах объектов, хранившихся в метилсалицилате, перед заливкой в парафин в течение двух лет и более.

В исследовании использованы головной мозг половозрелых крыс (n=3) и головной мозг эмбрионов крыс линии Вистар (n=3). При умерщвлении животных руководствовались «Правилами проведения работ с использованием эксперимен-

тальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.).

Материал был фиксирован этанол-формальдегидом. После завершения фиксации объекты обезвоживали в нескольких порциях этанола возрастающей концентрации. Для завершения обезвоживания и последующего хранения объектов применяли метилсалицилат отечественного (Вектон, Россия) и зарубежного (ICN, США) производства. Длительное хранение объектов (2 и 4 года) осуществляли при комнатной температуре в герметично закрытых полипропиленовых контейнерах и пробирках (EiKey, США). Перед заливкой в парафин объекты промывали в трех порциях петролейного эфира марки 40-70 (Вектон, Россия), помещали в раствор парафина в петролейном эфире (37 °C) в термостат на ночь и заливали в парафин общепринятым способом. Для проверки сохранности антигенов в исследуемом материале были поставлены иммуноцитохимические реакции с антителами к белкам промежуточных филаментов (нестину, глияльному фибриллярному кислому белку GFAP и виментину), нейрональным маркерам — ядерному белку NeuN и цитоплазматическому белку (ферменту), нейрон-специфической енолазе, а также к белку, стабилизирующему микротрубочки, даблкортину (DCX). При постановке реакций использовали моноклональные антитела к нестину (Rat-401, BD Pharmingen, США, разведение 1:400), к виментину (V-9, DAKO, Дания, разведение изготовителя), к белку NeuN (A60, Chemicon, США, разведение 1:350) и поликлональные кроличьи антитела к белку GFAP (DAKO, Дания, разведение изготовителя), нейрон-специфической ено-



Результаты постановки иммуноцитохимических реакций на срезах объектов, длительное время хранившихся в метилсалицилате.

а — радиальные глиоциты формирующегося конечного мозга эмбриона крысы 14 сут развития; б — танициты стенки III желудочка мозга крысы; в — периваскулярные астроциты коры большого мозга крысы; г — нейроны области СА1 гиппокампа крысы; д — дифференцирующиеся нейроны зубчатой извилины гиппокампа крысы. Иммуноцитохимические реакции на нестин (а), белок GFAP (б), виментин (в), белок NeuN (г) и даблортин (д) без подкраски (а, б), со слабой подкраской метиленовым зеленым (в, г) и квасцовым гематоксилином (д).

лазе (Chemicon, США, разведение 1:250) и DCX (Abcam, Великобритания, разведение 1:500). Для выявления связавшихся первичных антител использовали реагенты фирмы DAKO (Дания): наборы EnVision+/HRP-Mouse, EnVision+/HRP-Rabbit, DAB+, разбавитель для антител, нормальную крысиную сыворотку в соответствии с ранее опубликованными протоколами [2, 3, 5, 6]. Часть срезов после постановки иммуноцитохимической реакции подкрашивали квасцовым гематоксилином, метиленовым зеленым или толуидиновым синим по Нисслию [6].

В результате постановки иммуноцитохимических реакций получены удовлетворительные результаты выявления специфических антигенов со всеми использованными антителами. Распределение окрашенного продукта реакции в каждом случае соответствовало общим представлениям о локализации структур, которые должны его содержать (внутренний положительный контроль). Нестин был выявлен в радиальных глиоцитах (рисунок, а).

Положительную реакцию на GFAP давали типичные астроциты и танициты (см. рисунок, б).

Виментин-иммунопозитивными были клетки мозговых оболочек, поверхностные и периваскулярные астроциты (см. рисунок, в), эпендимоциты, танициты, эндотелиоциты сосудов мозга. Положительную реакцию на ядерный белок NeuN давали дифференцированные нейроны разных областей локализации (см. рисунок, г). Нейрон-специфическая енолаза выявлялась в перикарионах нейронов и нейронах. DCX-иммунопозитивные клетки обнаруживались у половозрелых крыс в латеральной субвентрикулярной области и зубчатой извилине гиппокампа (см. рисунок, д), которые являются зонами постнатального нейрогенеза [7].

Интенсивность реакции была сопоставима с интенсивностью реакции срезов материала, не подвергавшегося действию метилсалицилата, с соответствующими антителами.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что длительное пребывание фиксированного и обезвоженного биологического материала в метилсалицилате не приводит к ухудшению выявляемости антигенов различных групп (ядерных, цитоплазматических, белков цитоскелета). Таким образом, объекты, хранившиеся в метилсалицилате, можно успешно использовать для проведения иммуноцитохимического исследования.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проекты 07-04-00354 и 05-04-49397).

ЛИТЕРАТУРА

1. Коржевский Д.Э. Использование метилсалицилата в качестве промежуточной среды при заливке в парафин. Морфология, 1996, т. 109, вып. 1, с. 105.
2. Коржевский Д.Э., Гилерович Е.Г., Зинькова Н.Н. и др. Иммуноцитохимическое выявление нейронов головного мозга с помощью селективного маркера NeuN. Морфология, 2005, т. 128, вып. 5, с. 76–78.
3. Коржевский Д.Э. и Гиляров А.В. Оптимизация метода иммуноцитохимического выявления нестина на парафиновых срезах головного мозга крысы. Морфология, 2006, т. 130, вып. 6, с. 77–79.
4. 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. 85–87.
5. 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.
6. Коржевский Д.Э. и Отеллин В.А. Иммуноцитохимическое выявление астроцитов в срезах головного мозга в сочетании с окраской по Ниссля. Морфология, 2004, т. 125, вып. 3, с. 100–102.
7. Brown J.P., Couillard-Despres S., Cooper-Kuhn C.M. et al. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. J. Comp. Neurol., 2003, v. 467, № 1, p. 1–10.

Поступила в редакцию 01.11.07

IMMUNOCYTOCHEMICAL DEMONSTRATION OF TISSUE ANTIGENS AFTER A LONG-TERM STORAGE OF SAMPLES IN METHYLSALICYLATE

D.E. Korzhevskiy and A.V. Hiliarov

The aim of the present study was to test the possibility of different antigens detection in the biological objects after their storage in methylsalicylate for two or more years before embedding in paraffin, using routine immunocytochemical methods. Using immunocytochemical reactions demonstrating intermediate filaments nestin, vimentin, and GFAP, as well as neuronal markers NeuN, neuron-specific enolase, and doublecortin, as the examples, it was shown that long-term storage in methylsalicylate does not prevent immunocytochemical detection of these antigens.

Key words: *methylsalicylate, paraffin embedding, immunocytochemistry.*

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