

Фиксирующие растворы в электронно-микроскопическом исследовании тканей легких

С.А.Кравченко

ГУ «Национальный институт фтизиатрии и пульмонологии им. Ф.Г.Яновского» НАМН Украины,
лаборатория патоморфологии
Киев, Украина

Рассмотрены методики приготовления фиксирующих растворов, применяемых для получения образцов тканей легких, которые необходимо исследовать при помощи просвечивающего электронного микроскопа. Представлены наиболее эффективные прописи фиксирующих растворов для приготовления срезов.

Ключевые слова: электронная микроскопия, просвечивающий электронный микроскоп, фиксирующий раствор, ткани легких.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение ультраструктуры легких превратилось в самостоятельную область исследований благодаря широкому применению и совершенствованию методов электронной микроскопии. Электронная микроскопия является единственным морфологическим методом, который позволяет изучать макромолекулярную структуру легких, а в некоторых случаях – переходить и на молекулярный уровень исследований. В то же время она обладает возможностями, которые присущи методам световой микроскопии (при увеличениях порядка 1500-3000), а использование «полутонких» (толщина 0,5-1 мкм) срезов позволяет объединить классические и современные методы исследования ультраструктурных особенностей легких как в норме, так и при патологии [5].

Ведущим направлением в электронно-микроскопических исследованиях ультратонких срезов тканей является просвечивающая электронная микроскопия [4]. Приготовление ультратонких срезов ткани легких (так же, как и других тканей) для исследования при помощи просвечивающего электронного микроскопа состоит из следующих последовательных этапов: забор материала, его фиксация, дегидратация, заливка, приготовление ультратонких срезов, их окраска или контрастирование. После выполнения этих процедур срез помещают в электронный микроскоп и изучают [2].

Одним из наиболее важных моментов в приготовлении хороших срезов для электронно-микроскопического исследования является фиксация материала. Фиксация преследует две взаимосвязанные цели: остановить происходящие в ткани метаболические процессы и воспрепятствовать посмертному распаду молекул; стабилизировать то пространственное положение супрамолекулярных комплексов и внутриклеточных структур, которые они занимали в момент, предшествующий фиксации.

Технике приготовления материала, в частности его фиксации, для электронно-микроскопического исследования посвящен ряд обзоров и книг [1, 3, 21, 23], однако методы, описанные в этих публикациях, носят общий характер. В них не выделяют особенности приготовления срезов именно легочной ткани, хотя упоминается необходимость в наличии необходимых свойств фиксирующих растворов, которые оказались наиболее удачными при проведении фиксации разных биологических тканей. Методики для их приготовления разбросаны в многочисленных журнальных публикациях и носят несистематический характер. Поэтому целью настоящей публикации является обзор и систематизация методик, используемых для фиксации ткани легких, которые предпочтительно использовать с целью последующего электронно-микроскопического исследования указанных образцов.

Идеальных методов фиксации не существует, и любой из применяемых на сегодняшний день фиксаторов имеет как положительные, так и отрицательные стороны, поскольку при любой фиксации стабилизируются лишь некоторые молекулярные комплексы, в то время как другие разрушаются или экстрагируются из материала. При этом в той или иной степени утрачиваются истинная форма и размеры структур, изменяется их взаимное расположение, иногда образуются артефактные структуры. Необходимо подчеркнуть, что чрезвычайно важным фактором, влияющим на качественную фиксацию тканей, является фактор времени: чем быстрее начинается фиксация после изъятия материала, тем скорее фиксатор проникает в ткань, и, следовательно, появляется больше возможности получить хороший результат – адекватный срез ткани [22, 24].

МЕТОДИКИ

Согласно опубликованным данным, полученным при исследованиях качества фиксации собственно легочной ткани, было установлено, что фиксирующий раствор должен иметь рН, соответствующий физиологическим показателям плазмы крови (7,2-7,4), обладать достаточной буферной емкостью, быть изотоничным и изоосмотичным по отношению к ткани легкого [13, 20]. Изотоничность и изоосмотичность фиксирующего раствора обеспечивается подбором соответствующего буферного раствора, от правильности приготовления которого также зависит качество фиксации. Наиболее широко употребляемыми являются фосфатный [6, 15, 19, 32], мышьяковистый (какодилатный) [8, 10, 17, 27, 30, 31] и *s*-коллиндиновый буферные растворы [7, 26]. В некоторых случаях для фиксации тканей легких используется веронал-ацетатная буферная смесь [18].

Первым фиксирующим раствором для электронной микроскопии был раствор четырехоксида осмия (OsO_4) [1]. Четырехокись осмия блокирует ферментную активность, стабилизирует липопротеиновые комплексы и фосфолипиды в ядре и цитоплазме клеток за счет реакций с липидами, с S-H и S-S группами белков [11]. Кроме того, OsO_4 окрашивает субмикроскопические структуры клеток. Такое сочетание свойств делает OsO_4 особенно важным в приготовлении материала для электронно-микроскопического исследования. Фиксация 1-2% забуференным раствором четырехоксида осмия при рН 7,2-7,4 нашла широкое распространение после работ Пэлэйда [19, 25]. Этот же рас-

твор очень часто применяется для постфиксации тканей (повторной фиксации), если в качестве первичного фиксирующего агента используется другой фиксирующий компонент (альдегиды) [1, 23]. Первичную фиксацию погружением в растворы OsO_4 проводят 2-4 ч при температуре от 1°C до 4°C, в то время как постфиксация в OsO_4 проводится при комнатной температуре в течение 1-2 ч.

Для улучшения сохранности ультраструктуры клеток в фиксирующие растворы часто добавляют глюкозу или сахарозу [8, 9], а также стараются приблизить солевой состав фиксирующих растворов к естественному набору солей плазмы крови, для чего используют растворы различных солей [1, 8].

Новый этап в электронно-микроскопических исследованиях легочной ткани открылся с применением методов фиксации в растворах, содержащих альдегиды, в первую очередь глутаральдегид, который является на сегодняшний день основным веществом для фиксации тканей легкого [14, 28, 29].

Фиксация в растворах альдегидов обеспечивает более высокую сохранность ультраструктур клетки, и, таким образом, получают более адекватную цитологическую картину, обеспечивающую более подробную детализацию по сравнению с фиксацией в четырехокиси осмия, который, как уже упоминалось, был основным фиксирующим агентом на начальном этапе развития электронно-микроскопических исследований. Особенно успешно при фиксации в растворах с глутаральдегидом сохраняются микротрубочки, фибриллы и внутриклеточные мембраны клеток. В основе действия глутаральдегида лежит стабилизация белковых молекул с образованием поперечных связей, что является особенно важным для сохранения локализации этих молекул в клетке. В то же время обратимость ряда связей, образуемых глутаральдегидом, а также то, что фосфолипиды и ненасыщенные липиды не стабилизируются при этой фиксации, вызывает необходимость дополнительной фиксации в растворе с четырехокисью осмия [1].

Средняя продолжительность фиксации растворами глутаральдегида составляет промежуток времени от 30 мин. до 2-4 ч, в некоторых случаях фиксация может длиться вплоть до 24 ч [4]. Укороченные сроки фиксации продолжительностью в 10-15 мин. без постфиксации в OsO_4 с последующей заливкой в водорастворимую смолу предоставляют возможность проведения гистохимических реакций с красителями [27].

Концентрация глутаральдегида может варьировать достаточно широко, обычно употребляются 2%, 2,5%, 4%, 5% и 6% растворы глутаральдегида. Предпочтительным для разведения глутаральдегида являются фосфатный [6, 15, 19, 32] и какодилатный [8, 10, 17, 27, 30, 31] буферные растворы, реже используется s-коллиндиновый буфер [7].

В стандартном случае при подготовке материала для электронно-микроскопического исследования образец, полученный в ходе хирургической операции, сразу помещают в фиксирующий раствор, где этот образец измельчают до кусочков размерами 3-5 мм. Если используется постфиксация в растворе четырехокси осмия, образец перед постфиксацией измельчают до размеров 0,2-3 мм³, наиболее качественные результаты получают, когда объем исследуемого кусочка составляет 0,5 мм³. Следует учитывать, что фиксирующие растворы проникают в ткань медленно и плохо. В связи с этим центральная часть крупного кусочка оказывается фиксированной значительно хуже по сравнению с периферическим участком. Однако приповерхностные участки ткани мало пригодны для исследования из-за механических повреждений при выделении и измельчении образца. Таким образом, оптимальной для изучения является субпериферическая зона, расположенная на некотором расстоянии от края кусочка, которое составляет приблизительно от 0,05 мм до 0,4 мм.

По мнению некоторых исследователей [12], наиболее оптимальным методом для фиксации только что полученного кусочка операционного материала является его погружение в фиксатор Карновского [16], который представляет собой смесь 4% формальдегида, получаемого из твердого параформальдегида, и 5% глутаральдегида в фосфатной буферной смеси. Образец опускают в фиксирующий раствор, предварительно охлажденный до 0-5 С, и хранят в холодильнике не менее 2 ч. При этом авторы отмечают, что образец может храниться в этом фиксирующем растворе вплоть до года без существенных повреждающих последствий [12]. Однако слишком длительная фиксация часто приводит к образованию жестких и ломких образцов, к экстракции из ткани внутриклеточных структур и к образованию разнообразных артефактов.

После первичной фиксации в необходимых фиксирующих растворах на протяжении требуемого времени образец погружают в буферный раствор также на определенное время (от

1 ч до 12 ч), чтобы удалить избыток фиксирующего компонента, который не прореагировал с тканью. Затем погружают в 1-2% раствор четырехокси осмия на 1-2 ч для выполнения постфиксации. Необходимо отметить, что фиксирующий раствор для первичной фиксации, раствор для ополаскивания и раствор для повторной фиксации должны быть приготовлены на основе одинаковых буферных растворов. После проведения постфиксации образец трижды промывают в дистиллированной воде (выдерживают по 5 мин. при каждом погружении в воду). На этом этапе образец готов для последующих манипуляций (дегидратация, заливка), необходимых в ходе подготовки ультратонких срезов для электронно-микроскопического исследования.

Ниже приводятся примеры наиболее оптимальных, на наш взгляд, прописей фиксирующих растворов для приготовления образцов тканей легких с последующим электронно-микроскопическим исследованием.

Пропись 1. Раствор четырехокси осмия для фиксации погружением [25] (модификация метода Пэлэйда). Состав раствора: OsO₄ 2% – 75 мл, фосфатный буфер (0,2 М) рН 7,2-7,4 – 75 мл, сахароза – 6 г, CaCl₂ – 0,375 г. Этот раствор можно использовать как для первичной фиксации изучаемого образца (продолжительность 2-3 ч), так и для проведения постфиксации. Если первичная фиксация проводилась в глутаровом альдегиде или в смеси паральдегид-глутаральдегид, которые приготовлены на соответствующем буферном растворе, тогда раствор четырехокси осмия для постфиксации готовят на том же буферном растворе. Вместо фосфатного буфера необходимо добавить соответственно 75 мл мышьяковистого буферного раствора (0,2 М) рН 7,2-7,4 [16] или 50 мл s-коллиндинового буферного раствора (0,2 М) рН 7,2-7,4 [7]. Продолжительность постфиксации в таком растворе – 1-2 ч (некоторые авторы считают достаточным 30 мин. [12]).

Пропись 2. Раствор четырехокси осмия для фиксации погружением [19] (модификация метода Лоу). Можно использовать пропись «а» или «б».

а) Предварительно необходимо приготовить следующие растворы: раствор А – NaH₂PO₄*H₂O – 2,26%; раствор Б – NaOH – 2,52%; раствор В – глюкоза – 5,4%; раствор Г – раствор А (41,5 мл) + раствор Б (8,5 мл). Фиксирующий раствор получают смешиванием следующих компонентов: раствор Г – 45 мл, раствор В – 5 мл, OsO₄ – 0,5 г.

б) Предварительно необходимо приготовить следующие растворы: раствор А – $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 5,1% или $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 5,7%; раствор Б – NaOH – 5,5 %; раствор В – глюкоза – 5,4%; раствор Г – раствор А (49,5 мл) + раствор Б (10,8 мл). Фиксирующий раствор получают смешиванием следующих компонентов: раствор Г – 20 мл, раствор В – 5 мл, OsO_4 (2%) – 25 мл. OsO_4 желательно приготовить на фосфатном буфере (0,2 М) с рН 7,2-7,4. Фиксация кусочков: 2-4 ч при температуре 0-5°C.

Пропись 3. Раствор параформальдегид-глутаральдегида для фиксации погружением [33] (метод Карновского). Пропись раствора для фиксации: параформальдегид – 2 г, $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист.}}$ – 25 мл, NaOH (1М) – 2 капли, глутаральдегид (50%) – 5 мл, буферный раствор – до 50 мл. Приготовление: 2 г параформальдегида растворить в 25 мл дистиллированной воды при нагревании до 60-70°C, добавить 1-3 капли NaOH (1 М) до просветления раствора (допускается легкая опалесценция). Охладить раствор, добавить в охлажденный раствор 5 мл 50% глутаральдегида, довести объем фиксирующего раствора до 50 мл какодилатным или фосфатным буферным раствором (0,2 М) рН 7,4-7,6. Окончательный рН раствора 7,2. Если используется какодилатный буферный раствор, добавить 2,5 г CaCl_2 .

Пропись 4. Раствор параформальдегид-глутаральдегида для фиксации погружением (модификация метода Карновского): параформальдегид – 1,2 г, $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист.}}$ – 20 мл, какодилатный буферный раствор – 15 мл, глутаральдегид (25%) – 5 мл, CaCl_2 – 0,4 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Электронная гистохимия / Г.Гайер. – Москва: Мир, 1974. – 488 с.
2. Электронная микроскопия для начинающих / Б.Уикли. – Москва: Мир, 1975. – 324 с.
3. Basic techniques for transmission electron microscopy / Edited by M.A.Hayat. – Academic Press: Orlando, 1985. – 514 p.
4. Electron microscopy. Methods in molecular biology / Edited by J.Kuo, 2nd edition. – Vol. 369. – Humana Press Inc., New Jersey, 2007. – 625 p.
5. Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications / Edited by M.A.Hayat, 3d edition. – CRC Press, Boca Raton, 1989. – 708 p.
6. Asada Sakae. Fine structural change in the lung following cardiopulmonary bypass / Sakae Asada, Masahiro Yamaguchi // Chest. – 1971. – Vol. 59. – P. 478-483.
7. Bennet H.S. s-Collidine as a basis for buffering fixatives / H.S.Bennet, J.H.Luft // J. Biophys. Biochem. Cytol. – 1959. – Vol. 6. – P. 113-114.
8. Brooks R.E. Mouse Mammary Tumor Metastases in Lung: An Electron Microscopic Study / R.E.Brooks // Cancer Research. – 1970. – Vol. 30. – P. 2156-2165.
9. Caulfield J.B. Effects of varying the vehicle of OsO_4 in tissue fixation / J.B.Caulfield // J. Biophys. Biochem. Cytol. – 1957. – Vol. 3. – P. 827-830.
10. Cutz E. Ultrastructure and cytochemistry of Clara cells / E.Cutz, P.E.Conen // American Journal of Pathology. – 1971. – Vol. 62. – P. 127-134.
11. The stability and structure of mixed lipid monolayers and bilayers: Properties of lipid and lipoprotein monolayers on OsO_4 solutions and the role of cholesterol, retinol, and tocopherol in stabilizing lecithin monolayers / K.D.Dreher, J.H.Schulman, O.R.Anderson, O.A.Roels // Journal of Ultrastructure Research. – 1967. – Vol. 19. – P. 586-599.
12. Erlandson R.A. Preparing cells and tissues for ultrastructural examination / R.A.Erlandson. – Raven Press, New York, 1994. – P. 7-13.
13. Gil J. The role of buffers in lung fixation with glutaraldehyde and osmium tetroxide / J.Gil, E.R.Weibel // Journal of Ultrastructure Research. – 1968. – Vol. 25. – P. 331-348.
14. Hayat M.A. Glutaraldehyde: Role in electron microscopy / M.A.Hayat // Micron and Microscopica Acta. – 1986. – Vol. 17. – P. 115-135.
15. Histopathological features and prognostic significance of the micropapillary pattern in lung adenocarcinoma / Kazunori Kamiya, Yuichiro Hayashi, Junya Douguchi [et al.] // Modern Pathology. – 2008. – Vol. 21. – P. 992-1001.
16. Karnovsky M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy / M.J.Karnovsky // J. Cell. Biol. – 1965. – Vol. 27. – P. 137-138.
17. Karnovsky M.J. The ultrastructural basis of alveolar-capillary membrane permeability to peroxidase used as a tracer / E.E.Schneeberger-Keeley, M.J.Karnovsky // The Journal of Cell Biology. – 1968. – Vol. 37. – P. 781-793.
18. Karrer H.E. Electron microscopic study of the phagocytosis process in lung / H.E.Karrer // J. Biophys. Biochem. Cytol. – 1960. – Vol. 7. – P. 357-367.
19. Low F.N. The electron microscopy of sectioned lung tissue after varied duration of fixation in buffered osmium tetroxide // The Anatomical Record. – 1954. – Vol. 120. – P. 827-851.
20. Mathieu O. Differential effect of glutaraldehyde and buffer osmolality on cell dimensions: A study on lung tissue / O.Mathieu, H.Claassen, E.R.Weibel // Journal of Ultrastructure Research. – 1978. – Vol. 63. – P. 20-34.
21. Maunsbach A.B. Fixatives / A.B.Maunsbach, B.A.Afzelius // Biomedical Electron Microscopy. – 1999. – P. 31-58.
22. Maunsbach A.B. Fixative application / A.B.Maunsbach, B.A.Afzelius // Biomedical Electron Microscopy. – 1999. – P. 79-102.
23. McDowell E.M. Fixation and processing / In: Diagnostic electron microscopy. – Ed. by B.F.Trump, R.T.Jones. – Vol. 1. – New York: J. Willey and Sons, 1978. – P. 113-139.
24. McDowell E.M. Histological fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy / E.M.McDowell,

- B.F.Trump // Arch. Patol. Lab. Med. – 1976. – Vol. 100. – P. 405-414.
25. Palade G.E. A study of fixation for electron microscopy / G.E.Palade // J. Exp. Med. – 1952. – Vol. 95. – P. 285-297.
26. Popovic N.A. Effects of biliary obstruction on pulmonary ultrastructure in the rat / N.A.Popovic // American Journal of Pathology. – 1972. – Vol. 68. – P. 97-104.
27. Rodrigo R.N. Biochemical and ultrastructural lung damage induced by rhabdomyolysis in the rat / R.N.Rodrigo, S.Trujillo, C.Bosco // Exp. Biol. Med. – 2006. – Vol. 231. – P. 1430-1438.
28. Russell A.D. The biological uses and importance of glutaraldehyde / A.D.Russell, D.Hopwood // Progress in Medicinal Chemistry. – 1976. – Vol. 13. – P. 271-301.
29. Sabatini D.D. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation / D.D.Sabatini, K.G.Bensch, R.J.Barnett // J. Cell. Biol. – 1963. – Vol. 17. – P. 19-58.
30. Ultrastructure of the reticular basement membrane in asthmatic adults, children and infants / S.Saglani, C.Molyneux, H.Gong [et al.] // Eur. Respir. J. – 2006. – Vol. 28. – P. 505-512.
31. Wagenvoort C.A. Electron microscopy of pulmonary vasculature after application of fulvine / C.A.Wagenvoort, K.P.Dingemans // Thorax. – 1974. – Vol. 29. – P. 511-521.
32. Watson R.R. Minimal distensibility of pulmonary capillaries in avian lungs compared with mammalian lungs / R.R.Watson, Z.Fu, J.B.West // Respir. Physiol. Neurobiol. – 2008. – Vol. 160. – P. 208-214.

С.О.Кравченко. Фіксуючі розчини в електронно-мікроскопічному дослідженні тканини легень. Київ, Україна.

Ключові слова: електронна мікроскопія, просвічуючий електронний мікроскоп, фіксуючий розчин, тканина легень.

Розглянуті методики приготування фіксуючих розчинів, що використовуються для отримання зразків тканини легень, які необхідно дослідити за допомогою просвічуючого електронного мікроскопа. Представлені найбільш ефективні прописи фіксуючих розчинів для приготування зрізів.

S.A.Kravchenko. Fixatives in electron microscopy studying of lung tissue. Kyiv, Ukraine.

Key words: electron microscopy, transmission electron microscope, fixative, lung tissue.

Fixatives preparation techniques using in studying of lung tissue ultrastructure by transmission electron microscopy are reviewed. The most effective samples of fixatives are presented.

Надійшла до редакції 03.02.2011 р.