

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ФИКСАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ (ОБЗОР)

DOI: 10.17691/stm2018.10.2.19

УДК 57.083.3

Поступила 12.07.2017 г.



И.П. Григорьев, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии;
Д.Э. Коржевский, д.м.н., профессор РАН, зав. лабораторией функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376, ул. Академика Павлова, 12

На основе собственного опыта и данных литературы рассмотрены современные способы фиксации биологического материала, используемые при проведении иммуногистохимических исследований. Среди необходимых свойств иммуногистохимического фиксатора на первом месте должны быть способность обеспечивать сохранность структуры ткани при наименьшем влиянии на антигенные свойства макромолекул. С этой точки зрения в обзоре анализируется применимость для иммуногистохимии ряда фиксаторов, широко используемых в гистологической, цитологической и иммуногистохимической практике: альдегидов (формальдегид, глутаральдегид, глиоксаль), обезживающих (коагулирующих) фиксаторов (этанол, метанол, ацетон), комбинированных фиксирующих растворов (жидкость Буэна, жидкость Карнуа, метакарн и др.), а также современных цинксодержащих фиксаторов и коммерческих продуктов, предлагаемых для фиксации биологических образцов. Использование большинства фиксаторов ведет к нарушению третичной и четвертичной структуры многих белков, что требует для их выявления с помощью иммуногистохимии дополнительной процедуры демаскирования эпитопов с помощью протеолитических ферментов или повышенной температуры. На основании анализа данных иммуногистохимических исследований различных антигенов отмечено высокое качество нового цинксодержащего фиксатора — цинк-этанол-формальдегида. Тем не менее сделан вывод, что ни один из известных на сегодняшний день фиксаторов не обладает таким сочетанием свойств, которые бы позволяли получать гистологические препараты высокого качества и при этом обеспечивали возможность выявления любых антигенов в изучаемой ткани.

Ключевые слова: фиксация биологического материала; иммуногистохимия; формалин; этанол; глутаральдегид; соли цинка; цинк-этанол-формальдегид; тепловое демаскирование антигенов.

Как цитировать: Grigorev I.P., Korzhevskii D.E. Current technologies for fixation of biological material for immunohistochemical analysis (review). *Sovremennyye tehnologii v medicine* 2018; 10(2): 156–165, <https://doi.org/10.17691/stm2018.10.2.19>

English

Current Technologies for Fixation of Biological Material for Immunohistochemical Analysis (Review)

I.P. Grigorev, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Functional Morphology of Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology;

Для контактов: Григорьев Игорь Павлович, e-mail: ipg-iem@yandex.ru

D.E. Korzhevskii, MD, PhD, Professor of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Functional Morphology of Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology

Institute of Experimental Medicine, 12 Akademika Pavlova St., Saint Petersburg, 197376, Russia

Based on their own experience and published reports the authors provide an insight into the existing methods of fixation of biological material used in immunohistochemistry. The first quality of an immunohistochemical fixative should be its ability to preserve the tissue structure so that the antigenic properties of macromolecules are minimally affected. Considering this point, the review analyzes the applicability of commonly used fixatives to immunohistochemical staining; among those, aldehydes (formaldehyde, glutaraldehyde, glyoxal), dehydrating (coagulating) agents (ethanol, methanol, acetone), combined fixation solutions (Bouin's solution, Carnoy's solution, methacarn, etc.), as well as the recent zinc-containing fixatives and commercial products. Most of these fixatives inevitably change the tertiary and quaternary structure of many proteins; therefore, the detection of these proteins by immunohistochemistry requires an additional procedure of unmasking the epitopes using proteolytic enzymes or elevated temperatures. When compared for the preservation of antigenic structures, a high quality of the novel zinc-containing fixative — zinc-ethanol-formaldehyde — was noted. It has been concluded that none of the fixatives known to date has such a combination of properties that allow obtaining high-quality histological preparations and, at the same time, allows for detecting of any antigens in the stained tissue.

Key words: fixation of biological material; immunohistochemistry; formalin; ethanol; glutaraldehyde; zinc salts; zinc-ethanol-formaldehyde; heat induced epitope retrieval.

Введение

Иммуногистохимия — это уникальный современный метод исследования биологических объектов, позволяющий визуализировать локализацию различных молекул в изучаемой ткани, причем на разных уровнях — в клетках и субклеточных структурах, а также в межклеточном веществе. Для получения корректных результатов необходимо зафиксировать биологический объект так, чтобы он сохранил структуру клеточных органелл и внеклеточных компонентов ткани. При этом для иммуногистохимического выявления белков важно, чтобы они после фиксации не потеряли своих антигенных свойств. Таким образом, первостепенным свойством фиксатора, предназначенного для последующего иммуногистохимического исследования, должна быть способность обеспечить сохранность биологической ткани при наименьшем влиянии на антигенные свойства макромолекул.

Немаловажными качествами любых гистологических фиксаторов являются также отсутствие токсичности, простота приготовления и невысокая цена компонентов. В настоящий момент отмечается обилие существующих методов и технологий фиксации биологического материала, отличающихся разной сложностью иммуногистохимических протоколов и опасностью нераспознавания артефактов. Возникает резонный вопрос, насколько эти конкретные технологии и способы фиксации хороши для проведения адекватного и информативного иммуногистохимического исследования. Поэтому целью настоящего обзора является сравнительная оценка классических и современных технологий обработки биологического материала, предназначенного для проведения иммуногистохимического исследования.

Альдегиды. Наиболее распространенными фиксаторами,

используемыми в гистологической и электронно-микроскопической практике, в том числе и при проведении иммуногистохимических исследований как на светооптическом, так и на ультраструктурном уровнях, являются альдегиды, обычно муравьиный и глутаровый, которые чаще называют формальдегидом и глутаральдегидом соответственно.

Формальдегид — это газ, растворимый в воде. Концентрация насыщенного раствора формальдегида в воде составляет 40% (по объему) или 37% (по массе). Водный раствор формальдегида называют формалином, насыщенный его раствор считается 100%-ным. Для фиксации биологической ткани используют 10% формалин [1]. Такой раствор содержит 4% формальдегида. Молекулы формальдегида в растворе с течением времени вступают во взаимодействие друг с другом, образуя полимеры (со степенью полимеризации до 100 единиц), которые называются параформом. В концентрированных растворах формалина образующиеся полимеры постепенно формируют белый осадок, количество которого зависит от условий хранения реагента. Для уменьшения полимеризации формальдегида производители добавляют в его 40% раствор 10% метанола.

В растворах формалина молекулы формальдегида взаимодействуют друг с другом не только при реакции полимеризации, но и в ходе реакции Канниццаро, при которой одна молекула формальдегида восстанавливается до метанола, а другая окисляется до муравьиной кислоты [2, 3]. В результате этого процесса в формалине при хранении постепенно увеличивается количество муравьиной кислоты, что вызывает закисление раствора и может негативно сказываться на качестве фиксации. Вследствие этого для стандартизации фиксации биологического материала предпочтительнее использовать свежий формалин, который

можно приготовить непосредственно в лабораторных условиях из коммерческого препарата параформа, поставляемого на рынок ведущими производителями химических реактивов, путем растворения в горячей воде в соотношении 4 г сухого параформальдегида на 100 мл дистиллированной воды.

Формалин фиксирует ткани путем химического преобразования макромолекул, образуя внутри- и межмолекулярные метиленовые сшивки между аминокислотами (как свободными, так и в составе белков), между нуклеиновыми кислотами, а также между аминокислотами и нуклеиновыми кислотами [2, 4–9]. Сшивки могут образовываться только при наличии незаряженных аминогрупп, что возможно в нейтральных растворах. Поэтому, чтобы формалин действовал как фиксатор, необходимо его использовать в составе буферного раствора, который готовят, как правило, при помощи 0,1 М фосфатного буфера (рН=7,2–7,4). Именно нейтральный забуференный 10% формалин применяется как стандарт при фиксации тканей при проведении патологоанатомического исследования уже многие десятилетия. Такая фиксация позволяет получать высококачественные гистологические препараты, полностью удовлетворяющие требованиям патогистологической диагностики.

Глутаральдегид фиксирует ткань сходным образом с формальдегидом, образуя меж- и внутримолекулярные сшивки в белках и нуклеиновых кислотах, однако каждая молекула глутаральдегида содержит не одну, как формальдегид, а две альдегидных группы, поэтому способность его взаимодействовать с макромолекулами в биологической ткани выше и степень изменения структуры белков значительнее, чем при формалиновой фиксации [10–12]. При этом межмолекулярные сшивки, образуемые глутаральдегидом между полипептидными молекулами, настолько прочны, что глутаральдегид используется даже в сердечно-сосудистой хирургии для сшивки коллагеновых волокон и усиления их механических свойств [13]. Молекулы глутаральдегида при хранении растворов образуют олигомеры [11], которые медленнее проникают вглубь фиксируемого объекта. Поэтому для фиксации глутаральдегидом необходимо использовать только небольшие кусочки ткани. После фиксации в образце может задерживаться значительное количество непрореагировавших молекул глутаральдегида, которые способны неспецифически связывать антитела, а также гистологические и гистохимические красители, вследствие чего требуется использовать специальные процедуры удаления избытка глутаральдегида перед применением методов иммуногистохимии [2].

Важно отметить, что ткань, фиксированная глутаральдегидом, обладает сильной автофлюоресценцией (за счет реакции глутаральдегида с некоторыми аминами, белками, в частности, с коллагеном, а также липидами [11, 14]), что существенно ограничивает использование глутаральдегида для фиксации материала, предназначенного для исследования с помощью

флюоресцентной и лазерной конфокальной микроскопии, и вынуждает проводить дополнительные процедуры для блокирования автофлюоресценции [14–20]. Следует заметить, что и после фиксации в формалине отмечается автофлюоресценция тканевых структур, особенно в материале, который длительно пребывал в фиксирующем растворе, но она слабее, чем после обработки глутаральдегидом [21–25].

Существенным недостатком глутаральдегидной фиксации является то, что за счет увеличенного количества сшивок в белковых молекулах образуется более плотная ткань, которая с трудом пропускает расплавленный парафин, что затрудняет ее пропитку парафином. Кроме того, фиксация вызывает чрезмерное уплотнение полученных тканевых блоков и усложняет изготовление стандартных парафиновых срезов. Эти факторы значительно сужают возможности использования глутаральдегида при использовании парафиновой заливки гистологических объектов [2]. В связи с этим раствор глутаральдегида обычно используется для фиксации образцов малого размера, предназначенных для исследования методами электронной микроскопии и электронной иммуноцитохимии, которые включают в специальные полимеризующиеся смолы, способные проникать в зафиксированную глутаральдегидом ткань [16, 26–32].

Нарушение третичной и четвертичной структуры белков формалином и глутаральдегидом [4, 10, 11, 33–41] изменяет антигенные свойства белков, маскируя часть эпитопов, что не позволяет им взаимодействовать с антителами и, соответственно, препятствует их иммуногистохимическому выявлению [42–46]. И хотя имеются данные, что не только при фиксации, но и на других стадиях обработки материала происходит маскировка антигенов биологического образца [47–49], именно фиксация является основным фактором, ухудшающим выявляемость тканевых антигенов [46], и степень этого ухудшения зависит от концентрации фиксатора [50].

Использование срезов, изготовленных из нефиксированных замороженных образцов, позволяет эффективнее применять методы иммуногистохимии, однако качество сохранения тканевых и клеточных структур при использовании такого подхода остается очень низким.

Образование межмолекулярных сшивок после формалиновой фиксации обратимо, по меньшей мере частично, и эпитопы выявляемых антигенов возможно демаскировать с помощью протеолитических ферментов или повышенной температуры [51–53]. Для ферментативного демаскирования применяют трипсин, химотрипсин, пепсин, проназу, протеиназу К и ряд других протеаз. Для теплового демаскирования антигенов использовались ранее и предлагаются к использованию различные буферные среды, а повышение температуры достигается различными способами: нагрев препаратов с помощью микроволновой печи, нагрев в микроволновой печи в сочетании с высоким давлени-

ем, автоклавирование, варка под давлением, нагрев паром, на водяной бане [51, 54–56]. Отмечено важное значение кислотности (pH) буферной среды, в которой проводят тепловое демаскирование [4]. Оптимальный способ теплового или ферментативного демаскирования определяется экспериментально для каждого конкретного антигена [51, 57]. В ряде случаев после теплового демаскирования антигенов необходимо применять дополнительные блокировки для подавления неспецифической и фоновой реакции изучаемого образца [52].

В последнее время для иммуногистохимических исследований используется еще один альдегидный фиксатор — **глиоксаль** [58]. Этот простейший диальдегид обладает тем преимуществом перед формальдегидом, что фиксирует ткань быстрее и в значительно меньшей степени образует сшивки между белковыми молекулами. Тем самым он меньше нарушает структуру полипептидов и их антигенные свойства, что позволяет иммуногистохимически исследовать многие антигены без процедуры демаскирования [58, 59]. Глиоксаль, однако, реагирует с аргининовыми остатками в полипептидных цепях с образованием имидазола, в результате чего нарушается структура антигенов, богатых аргинином, и они не выявляются иммуногистохимически после глиоксальной фиксации.

Обезвоживающие фиксаторы. Помимо альдегидов другая важная группа фиксаторов — обезвоживающие (коагулирующие) фиксаторы. Они включают в себя этанол и метанол, а также ацетон. Эти вещества давно используются для фиксации биологического материала — самостоятельно или, чаще, в различных комбинациях с другими химикатами. Спирты и ацетон обезвоживают ткань, причем замещение молекул воды молекулами спирта или ацетона разрушает гидрофобные и водородные связи, что ведет к денатурации белков, изменению их третичной структуры и снижению (или искажению) их антигенных свойств [35, 60]. Однако снижение антигенных свойств после использования обезвоживающих фиксаторов выражено в меньшей степени, чем после фиксации в формалине [61], вследствие чего даже предлагалось материал, фиксированный в формалине, помещать в этанол или смесь этанол-уксусная кислота (2:1) перед последующим использованием для иммуногистохимии [33, 62, 63]. В то же время на однослойной культуре клеток была обнаружена плохая сохранность внутриклеточных структур, особенно мембранных, и значительное ухудшение выявляемости некоторых белков после фиксации в ацетоне или метаноле в сравнении с формалином или глутаральдегидом [64].

Необходимо заметить, что фиксация в коагулирующих фиксаторах негативно сказывается прежде всего на выявляемости низкомолекулярных соединений и гаптенных, которые частично могут переходить в раствор и недостаточно прочно фиксируются в клеточных компартментах. Высокомолекулярные соединения, не

связанные с мембранами (например, белки промежуточных филаментов), напротив, лучше выявляются после обработки тканей коагулирующими фиксаторами [65].

Другие фиксаторы. Помимо вышеперечисленных основных фиксаторов создано также большое число фиксирующих жидкостей, состоящих из основных фиксирующих веществ, смешанных в разных пропорциях с добавлением других компонентов. В гистологической практике широко используются такие фиксаторы, как жидкость Буэна (смесь насыщенного водного раствора пикриновой кислоты, формалина и ледяной уксусной кислоты в соотношении 15:5:1); жидкость Карнуа (абсолютный спирт, хлороформ и ледяная уксусная кислота, 6:3:1); метакарнуа или метакарн — жидкость Карнуа, в которой этиловый спирт заменен метиловым (метанол, хлороформ и ледяная уксусная кислота, 6:3:1); спирт-формол (96° этанол и формалин, 9:1); спирт-формальдегид-уксусная кислота, 85:10:5); периодат-лизин-параформальдегид — PLP (3% параформальдегид, 75 мМ L-лизин, 10 мМ NaIO₄ на 0,1 М фосфатном буфере) и др. Кроме того, для фиксации используют растворы солей тяжелых металлов — ртути, хрома, осмия (жидкость Ценкера, хромовая кислота и двуххромовокислый калий, четырехокись осмия).

Некоторые из этих фиксирующих растворов были опробованы при подготовке материала для иммуногистохимического исследования и сопоставлены с другими фиксаторами. К примеру, отмечалось, что после фиксации в жидкости Карнуа хорошо выявляются многие антигены, часто даже лучше, чем после стандартной фиксации в нейтральном формалине [66–69]. Фиксация метакарном также позволила визуализировать некоторые эпитопы лучше, чем после формалиновой фиксации [70]. Сопоставление фиксации ацетоном, этанолом, нейтральным формалином и нейтральным формалином с добавлением хлористого кальция дало неоднозначные результаты: разные антигены выявлялись хорошо после разных фиксаторов, но, по мнению авторов [71, 72], при использовании нейтрального формалина большинство исследованных с помощью иммуногистохимии антигенов выявлялись лучше. Напротив, в других исследованиях [60, 73] отмечалась худшая выявляемость антигенов после формалиновой фиксации в сравнении со всеми другими тестируемыми фиксаторами: этанолом, метанолом, ацетоном, жидкостью Буэна, спирт-формолом, цинк-формалином. Особенно сильно ухудшалась выявляемость эпитопов после длительной фиксации в нейтральном формалине [7, 74, 75].

Фиксатор PLP сохраняет антигенные свойства значительно лучше, чем формалин, в результате чего для ряда белков отпадает необходимость демаскирования антигенов [61]. Однако сопоставление сохранности материала, фиксированного разными фиксаторами, обнаружило наиболее сильное сжатие ткани, фиксированной именно PLP; в меньшей степени ткань де-

формировалась после использования формалина, а наименьшая деформация ткани была отмечена после использования цинксодержащих фиксаторов [76]. Есть данные о хорошей сохранности антигенных свойств тканей беспозвоночных, фиксированных смесью уранилацетата, трегалозы и метанола [77].

В связи с токсичностью тяжелых металлов были попытки избежать их использования в соответствующих фиксаторах. В результате исследований удалось заменить хлорид ртути солями цинка (хлоридом, сульфатом) и создать фиксатор, в котором ионы цинка являются единственным фиксирующим агентом [78]. Хотя механизм фиксирующего действия ионов цинка не вполне понятен, препараты, фиксированные с их помощью, обнаруживают хорошую сохранность клеток и внеклеточного материала и лучшую сохранность антигенов по сравнению с нейтральным формалином [78–82] и периодат-лизин-параформальдегидом [83]. Тем не менее, как отмечают авторы, водные растворы солей цинка недостаточно быстро проникают в глубину фиксируемого образца ткани, что может приводить к неодинаковой иммунореактивности изучаемых антигенов в поверхностных и глубоких слоях изучаемого объекта.

В отделе морфологии Института экспериментальной медицины (Санкт-Петербург) разработан новый цинксодержащий комбинированный фиксатор — цинк-этанол-формальдегид (1 г хлористого цинка в смеси 96% этанола и концентрированного формалина, 9:1) [84], который продемонстрировал хорошую сохранность ткани головного мозга и внутренних органов лабораторных животных и человека [85, 86]. Иммуногистохимическое изучение препаратов нервной ткани (дефинитивной и эмбриональной) и периферических органов, фиксированных в цинк-этанол-формальдегиде, показало хорошую выявляемость большого числа исследованных белков: кальбиндина, кальретинина, холинацетилтрансферазы, глутаматдекарбоксилазы, глиального фибриллярного кислого белка, белков Iba-1 и NeuN, нейрон-специфической энolahзы, синаптофизина, тирозингидроксилазы, альфа-тубулина, виментина, нестина и других [87–98]. При этом иммуногистохимическая визуализация некоторых из исследованных антигенов не требовала проведения процедуры теплового демаскирования.

Современные коммерческие предложения. В поисках фиксаторов, которые бы обеспечивали хорошую сохранность всех морфологических особенностей ткани и одновременно минимально нарушали антигенные свойства белков, различные коммерческие компании, специализирующиеся на поставках оборудования, реагентов и расходных материалов для патоморфологических лабораторий, постоянно предлагают новые виды фиксирующих растворов для иммуногистохимических работ, такие, например, как CytoSkelFix, F-Solv, FineFIX, Sensofix, RCL2, LN-FIX, FineFIX, UMFIX, Glyo-Fixx, FineFIX, HOPE, NEO-FIX, Cell-Block, ExcellPlus,

Greenfix, UPM, CyMol и др. [73, 99–109]. Под торговыми наименованиями, как правило, скрываются комбинации общеизвестных альдегидных или спиртовых фиксаторов в разных сочетаниях, иногда с различными оригинальными добавками. Так, например, фиксатор UPM представляет собой смесь этанола, метанола, 2-пропанола и формалина; CyMol — этанола, метанола и 2-пропанола; Greenfix — этанола и этандиола. Однако точный состав этих фиксаторов, как правило, не раскрывается, вследствие чего сложно оценить влияние компонентов коммерческих продуктов на сохранность биологического материала и его антигенные свойства.

Фиксация биологического материала для электронно-микроскопической иммуноцитохимии характеризуется особыми требованиями, обусловленными необходимостью изучения ультраструктуры объектов в электронном микроскопе. Материал, предназначенный для последующего исследования ультраструктуры, фиксируют обычно глутаровым альдегидом, четырехокисью осмия и уранилацетатом, причем последние два соединения являются также веществами, контрастирующими препарат, что необходимо для его просмотра в электронном микроскопе.

Для комбинированного свето- и электронно-микроскопического иммуноцитохимического исследования объектов применяют смесь глутарового альдегида и параформа — так называемый фиксатор Карновского и его варианты [10, 110–112]. Используют также акролеин (альдегид акриловой кислоты), который в меньшей мере, чем глутаральдегид, маскирует антигены ткани, но является чрезвычайно токсичным соединением, поэтому его применяют редко и обычно в комбинации с глутаральдегидом или формальдегидом [10].

Четырехокись осмия, как было установлено, маскирует антигены [10, 113, 114], что делает нежелательным ее использование в иммуноцитохимии. Вследствие этого предложено в качестве замены осмию фиксировать ткани таниновой кислотой, которая обеспечивает хороший уровень контрастности материала при наблюдении в электронном микроскопе и улучшает выявляемость антигенов на ультраструктурном уровне [115–117]. Другой вариант — использовать только глутаральдегид и растворять его в буфере со сбалансированным ионным составом [118]. Хорошая сохранность ультраструктуры и антигенных свойств была достигнута после фиксации материала периодат-лизин-параформальдегидом [119].

Заключение

Как показал анализ литературы, за последние 25 лет в иммуногистохимических исследованиях получены выдающиеся результаты по фиксации биологических образцов различными фиксирующими растворами. Но ни один из известных на сегодняшний день фиксаторов не обладает таким сочетанием свойств,

которые бы давали возможность получить гистологические препараты высокого качества, обеспечивающие реальное представление о микроструктурах биологических объектов, и при этом позволяли легко (без дополнительных сложных процедур) выявить любые антигены в изучаемой ткани. Вывод из этой ситуации напрашивается только один: для иммуногистохимического изучения того или иного белка необходимо подбирать оптимальный фиксатор и разрабатывать оптимальный протокол обработки материала, основываясь на опыте аналогичных работ других исследователей с данным белком и конкретным типом антител. Ориентироваться при этом на коммерческие фиксаторы с неизвестной рецептурой не следует, поскольку прекращение их производства не зависит от желания потребителя, а точное их воспроизведение в лабораторных условиях, как правило, невозможно.

Финансирование исследования. Работа финансировалась из средств Государственного задания №007-01354-17-00 (шифр: 0557-2016-0017).

Конфликт интересов. Конфликты интересов, связанные с данным исследованием, отсутствуют.

Литература/References

1. Коржевский Д.Э. Фиксация материала для гистологического исследования. В кн.: Морфологическая диагностика: подготовка материала для морфологического исследования и электронной микроскопии. Под ред. Коржевского Д.Э. СПб; 2013; с. 10–25. Korzhevskii D.E. Fiksatsiya materiala dlya gistologicheskogo issledovaniya. V kn.: *Morfologicheskaya diagnostika: podgotovka materiala dlya morfoloicheskogo issledovaniya i elektronnoy mikroskopii* [Fixation of material for histological research. In: Morphological diagnostics: preparing the material for morphological research and electron microscopy]. Pod red. Korzhevskogo D.E. [Korzhevskii D.E. (editor)]. Saint Petersburg; 2013; p. 10–25.
2. Kiernan J.A. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: what they are and what they do. *Micros Today* 2000; 8(01): 8–13, <https://doi.org/10.1017/s1551929500057060>.
3. Walker J.F. *Formaldehyde*. New York: Reinhold; 1964.
4. Dapson R.W. Macromolecular changes caused by formalin fixation and antigen retrieval. *Biotech Histochem* 2007; 82(3): 133–140, <https://doi.org/10.1080/10520290701567916>.
5. Helander K.G. Kinetic studies of formaldehyde binding in tissue. *Biotech Histochem* 1994; 69(3): 177–179, <https://doi.org/10.3109/10520299409106282>.
6. Jamur M.C., Oliver C. Cell fixatives for immunostaining. *Methods Mol Biol* 2010; 588: 55–61, https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0_8.
7. Leong A.S., Gilham P.N. The effects of progressive formaldehyde fixation on the preservation of tissue antigens. *Pathology* 1989; 21(4): 266–268, <https://doi.org/10.3109/00313028909061071>.
8. Masuda N., Ohnishi T., Kawamoto S., Monden M., Okubo K. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Res* 1999; 27(22): 4436–4443, <https://doi.org/10.1093/nar/27.22.4436>.
9. Puchtler H., Meloan S.N. On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. *Histochemistry* 1985; 82(3): 201–204, <https://doi.org/10.1007/bf00501395>.
10. Griffiths G. *Fine structure immunocytochemistry*. Springer Berlin Heidelberg; 1993, <https://doi.org/10.1007/978-3-642-77095-1>.
11. Hopwood D. Theoretical and practical aspects of glutaraldehyde fixation. In: *Fixation in histochemistry*. Stoward P.J. (editor). Springer US; 1973; p. 47–83, https://doi.org/10.1007/978-1-4899-3260-0_2.
12. Southern L.J., Hughes H., Lawford P.V., Clench M.R., Manning N.J. Glutaraldehyde-induced cross-links: a study of model compounds and commercial bioprosthetic valves. *J Heart Valve Dis* 2000; 9(2): 241–249.
13. Jang W., Choi S., Kim S.H., Yoon E., Lim H.G., Kim Y.J. A comparative study on mechanical and biochemical properties of bovine pericardium after single or double crosslinking treatment. *Korean Circ J* 2012; 42(3): 154–163, <https://doi.org/10.4070/kcj.2012.42.3.154>.
14. Werkmeister J.A., Tebb T.A., Peters D.E., Ramshaw J.A. The use of quenching agents to enable immunofluorescent examination of collagen-based biomaterials showing glutaraldehyde-derived autofluorescence. *Clinical Materials* 1990; 6(1): 13–20, [https://doi.org/10.1016/0267-6605\(90\)90040-3](https://doi.org/10.1016/0267-6605(90)90040-3).
15. Callis G. Glutaraldehyde-induced autofluorescence. *Biotech Histochem* 2010; 85(4): 269–270, <https://doi.org/10.3109/10520290903472415>.
16. Hayat M.A. *Principles and techniques of electron microscopy: biological applications*. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.
17. Kiernan J.A. *Histological and histochemical methods: theory and practice*. Oxford: Butterworth-Heinemann; 1999.
18. Lee K., Choi S., Yang C., Wu H.C., Yu J. Autofluorescence generation and elimination: a lesson from glutaraldehyde. *Chem Commun (Camb)* 2013; 49(29): 3028–3030, <https://doi.org/10.1039/c3cc40799c>.
19. Ruzin S.E. *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford, New York: Oxford University Press; 1999.
20. Schelkle K.M., Schmid C., Yserentant K., Bender M., Wacker I., Petzoldt M., Hamburger M., Herten D.P., Wombacher R., Schröder R.R., Bunz U.H. Cell fixation by light-triggered release of glutaraldehyde. *Angew Chem Int Ed Engl* 2017; 56(17): 4724–4728, <https://doi.org/10.1002/ange.201612112>.
21. Constantinou P., Dacosta R.S., Wilson B.C. Extending immunofluorescence detection limits in whole paraffin-embedded formalin fixed tissues using hyperspectral confocal fluorescence imaging. *J Microsc* 2009; 234(2): 137–146, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2009.03155.x>.
22. Del Castillo P., Llorente A.R., Stockert J.C. Influence of fixation, exciting light and section thickness on the primary fluorescence of samples for microfluorometric analysis. *Basic Appl Histochem* 1989; 33(3): 251–257.
23. Kajimura J., Ito R., Manley N.R., Hale L.P. Optimization of single- and dual-color immunofluorescence protocols for formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissues. *J Histochem Cytochem* 2016; 64(2): 112–124, <https://doi.org/10.1369/0022155415610792>.
24. Robertson D., Isacke C.M. Multiple immunofluorescence

- labeling of formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Methods Mol Biol* 2011; 724: 69–77, https://doi.org/10.1007/978-1-61779-055-3_4.
25. Suetterlin R., Baschong W., Laeng R.H. Immunofluorescence and confocal laser scanning microscopy of chronic myeloproliferative disorders on archival formaldehyde-fixed bone marrow. *J Histochem Cytochem* 2004; 52(3): 347–354, <https://doi.org/10.1177/002215540405200305>.
26. Galkina M.V., Snopova L.B., Prodanets N.N., Lapshin R.D., Belousova I.I., Abrosimov D.A., Bugrova M.L. Atrial and brain natriuretic peptides of secretory cardiomyocytes in salt loading in experiment. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2016; 8(3): 49–55, <https://doi.org/10.17691/stm2016.8.3.05>.
27. Grigor'ev I.P. Ultrastructural reorganizations in the rat cerebral cortex after injection of ascorbic acid into the ventricular fluid. *Neurosci Behav Physiol* 1989; 19(6): 529–534, <https://doi.org/10.1007/bf01181871>.
28. Mrini A., Moukhles H., Jacomy H., Bosler O., Doucet G. Efficient immunodetection of various protein antigens in glutaraldehyde-fixed brain tissue. *J Histochem Cytochem* 1995; 43(12): 1285–1291, <https://doi.org/10.1177/43.12.8537644>.
29. Отеллин В.А., Неокесарийский А.А., Коржевский Д.Э. Изменения структуры ядра нейронов неокортекса при дефиците серотонина и катехоламинов. *Цитология* 1998; 40(4): 256–259. Otellin V.A., Neokesariiskii A.A., Korzhevskii D.E. Changes in the structure of the nucleus of neocortical neurons during deficiency of serotonin and catecholamines. *Tsitologiya* 1998; 40(4): 256–259.
30. Bilinski S.M., Jaglarz M.K., Dougherty M.T., Kloc M. Electron microscopy, immunostaining, cytoskeleton visualization, in situ hybridization, and three-dimensional reconstruction of *Xenopus* oocytes. *Methods* 2010; 51(1): 11–19, <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.12.003>.
31. De Paul A.L., Mukdsi J.H., Petiti J.P., Gutiérrez S., Quintar A.A., Maldonado C.A., Torres A.I. Immunoelectron microscopy: a reliable tool for the analysis of cellular processes. *Applications of Immunocytochemistry* 2012, <https://doi.org/10.5772/33108>.
32. Winey M., Meehl J.B., O'Toole E.T., Giddings T.H. Jr. Conventional transmission electron microscopy. *Mol Biol Cell* 2014; 25(3): 319–323, <https://doi.org/10.1091/mbc.e12-12-0863>.
33. Baum H.P., Reichrath J., Theobald A., Schock G. Fixation requirements for the immunohistochemical reactivity of PCNA antibody PC10 on cryostat sections. *Histochem J* 1994; 26(12): 929–933, <https://doi.org/10.1007/bf00174008>.
34. D'Amico F., Skarmoutsou E., Stivala F. State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry. *J Immunol Methods* 2009; 341 (1–2): 1–18, <https://doi.org/10.1016/j.jim.2008.11.007>.
35. Eltoum I., Fredenburgh J., Grizzle W.E. Advanced concepts in fixation: 1. Effects of fixation on immunohistochemistry, reversibility of fixation and recovery of proteins, nucleic acids, and other molecules from fixed and processed tissues. 2. Developmental methods of fixation. *J Histotechnol* 2001; 24(3): 201–210, <https://doi.org/10.1179/his.2001.24.3.201>.
36. Mason J.T., O'Leary T.J. Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation. *J Histochem Cytochem* 1991; 39(2): 225–229, <https://doi.org/10.1177/39.2.1987266>.
37. Meyer W., Hornickel N. Tissue fixation — the most underestimated methodical feature of immunohistochemistry. In: Méndez-Vilas A., Díaz J. (editors). *Microscopy: science, technology, applications and education. Vol. 2. Formatex. Microscopy Series*. Badajoz: Formatex Research Center; 2010; p. 953–959.
38. Polak J.M., van Noorden S. *Introduction to immunocytochemistry*. Oxford: BIOS Scientific Publishers; 2003.
39. Shi S.R., Shi Y., Taylor C.R. Antigen retrieval immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades. *J Histochem Cytochem* 2011; 59(1): 13–32, <https://doi.org/10.1369/jhc.2010.957191>.
40. Vincek V., Nassiri M., Nadjji M., Morales A.R. A tissue fixative that protects macromolecules (DNA, RNA, and protein) and histomorphology in clinical samples. *Lab Invest* 2003; 83(10): 1427–1435, <https://doi.org/10.1097/01.lab.0000090154.55436.d1>.
41. Wine Y., Cohen-Hadar N., Freeman A., Frolow F. Elucidation of the mechanism and end products of glutaraldehyde crosslinking reaction by X-ray structure analysis. *Biotechnol Bioeng* 2007; 98(3): 711–718, <https://doi.org/10.1002/bit.21459>.
42. De Marzo A.M., Fedor H.H., Gage W.R., Rubin M.A. Inadequate formalin fixation decreases reliability of p27 immunohistochemical staining: probing optimal fixation time using high-density tissue microarrays. *Hum Pathol* 2002; 33(7): 756–760, <https://doi.org/10.1053/hupa.2002.126187>.
43. Fritschy J.M. Is my antibody-staining specific? How to deal with pitfalls of immunohistochemistry. *Eur J Neurosci* 2008; 28(12): 2365–2370, <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06552.x>.
44. Oyama T., Ishikawa Y., Hayashi M., Arihiro K., Horiguchi J. The effects of fixation, processing and evaluation criteria on immunohistochemical detection of hormone receptors in breast cancer. *Breast Cancer* 2007; 14(2): 182–188, <https://doi.org/10.2325/jbcs.976>.
45. Ramos-Vara J.A. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* 2005; 42(4): 405–426, <https://doi.org/10.1354/vp.42-4-405>.
46. Watanabe J., Asaka Y., Kanamura S. Relationship between immunostaining intensity and antigen content in sections. *J Histochem Cytochem* 1996; 44(12): 1451–1458, <https://doi.org/10.1177/44.12.8985137>.
47. Grizzle W.E., Stockard C.R., Billings P.E. The effects of tissue processing variables other than fixation on histochemical staining and immunohistochemical detection of antigens. *J Histotechnol* 2001; 24(3): 213–219, <https://doi.org/10.1179/his.2001.24.3.213>.
48. Hayat M.A. *Microscopy, immunohistochemistry, and antigen retrieval methods: for light and electron microscopy*. Springer US; 2002, <https://doi.org/10.1007/b112626>.
49. Otali D., Stockard C.R., Oelschlager D.K., Wan W., Manne U., Watts S.A., Grizzle W.E. Combined effects of formalin fixation and tissue processing on immunorecognition. *Biotech Histochem* 2009; 84(5): 223–247, <https://doi.org/10.3109/10520290903039094>.
50. Muñoz de Toro de Luque M., Luque E.H. Effect of microwave pretreatment on proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections. *J Histotechnol* 1995; 18(1): 11–16, <https://doi.org/10.1179/his.1995.18.1.11>.
51. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Протеолитическое и тепловое демаскирование антигенов. В кн.: Теоретические основы и практическое применение методов иммуногисто-

химии. Под ред. Д.Э. Коржевского. СПб; 2012; с. 30–35. Korzhevskii D.E., Gilyarov A.V. Proteoliticcheskoe i teplovoe demaskirovanie antigenov. V kn.: *Teoreticheskie osnovy i prakticheskoe primenenie metodov immunogistokhimii* [Proteolytic and heat retrieval of antigens. In: Theoretical bases and practical application of immunohistochemical methods]. Pod red. D.E. Korzhevskogo [Korzhevskii D.E. (editor)]. Saint Petersburg; 2012; p. 30–35.

52. Коржевский Д.Э., Юмкина Е.А. Применение метода теплового демаскирования антигенов на парафиновых срезах головного мозга крысы. *Морфология* 2005; 127(2): 76–77. Korzhevskii D.E., Iumkina E.A. Application of methods of heat retrieval of antigens in paraffin sections of rat brain. *Morfologiya* 2005; 127(2): 76–77.

53. Leong T.Y., Leong A.S. How does antigen retrieval work? *Adv Anat Pathol* 2007; 14(2): 129–131, <https://doi.org/10.1097/pap.0b013e31803250c7>.

54. Boenisch T. Heat-induced antigen retrieval: what are we retrieving? *J Histochem Cytochem* 2006; 54(9): 961–964, <https://doi.org/10.1369/jhc.6p6945.2006>.

55. Shi S.-R., Key M.E., Kalra K.L. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1991; 39(6): 741–748, <https://doi.org/10.1177/39.6.1709656>.

56. Shi S.-R., Cote R.J., Taylor C.R. Antigen retrieval techniques: current perspectives. *J Histochem Cytochem* 2001; 49(8): 931–937, <https://doi.org/10.1177/002215540104900801>.

57. Gill S.K., Ishak M., Rylett R.J. Exposure of nuclear antigens in formalin-fixed, paraffin-embedded necropsy human spinal cord tissue: detection of NeuN. *J Neurosci Methods* 2005; 148(1): 26–35, <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2005.03.008>.

58. Dapson R.W. Glyoxal fixation: how it works and why it only occasionally needs antigen retrieval. *Biotech Histochem* 2007; 82(3): 161–166, <https://doi.org/10.1080/10520290701488113>.

59. Dapson R.W., Feldman A.T., Wolfe D. Glyoxal fixation and its relationship to immunohistochemistry. *J Histotechnol* 2006; 29(2): 65–76, <https://doi.org/10.1080/01478885.2006.11800879>.

60. Arnold M.M., Srivastava S., Fredenburgh J., Stockard C.R., Myers R.B., Grizzle W.E. Effects of fixation and tissue processing on immunohistochemical demonstration of specific antigens. *Biotech Histochem* 1996; 71(5): 224–230, <https://doi.org/10.3109/10520299609117164>.

61. Suzuki M., Katsuyama K., Adachi K., Ogawa Y., Yorozu K., Fujii E., Misawa Y., Sugimoto T. Combination of fixation using PLP fixative and embedding in paraffin by the AMeX method is useful for histochemical studies in assessment of immunotoxicity. *J Toxicol Sci* 2002; 27(3): 165–172, <https://doi.org/10.2131/jts.27.165>.

62. Otali D., He Q., Stockard C.R., Grizzle W.E. Preservation of immunorecognition by transferring cells from 10% neutral buffered formalin to 70% ethanol. *Biotech Histochem* 2013; 88(3–4): 170–180, <https://doi.org/10.3109/10520295.2012.754496>.

63. Otali D., He Q., Grizzle W.E. The effect of antigen retrieval on cells fixed in 10% neutral buffered formalin followed by transfer to 70% ethanol. *PLoS One* 2013; 8(12): e82405, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082405>.

64. Hoetelmans R.W., Prins F.A., Cornelese-ten Velde I.,

van der Meer J., van de Velde C.J., van Dierendonck J.H. Effects of acetone, methanol, or paraformaldehyde on cellular structure, visualized by reflection contrast microscopy and transmission and scanning electron microscopy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2001; 9(4): 346–351, <https://doi.org/10.1097/00129039-200112000-00010>.

65. Korzhevskii D.E., Lentsman M.V., Kirik O.V., Otellin V.A. Vimentin-immunopositive cells in the rat telencephalon after experimental ischemic stroke. *Neurosci Behav Physiol* 2008; 38(8): 845–848, <https://doi.org/10.1007/s11055-008-9061-y>.

66. Giaccone G., Canciani B., Puoti G., Rossi G., Goffredo D., Iussich S., Fociani P., Tagliavini F., Bugiani O. Creutzfeldt-Jakob disease: Carnoy's fixative improves the immunohistochemistry of the proteinase K-resistant prion protein. *Brain Pathol* 2000; 10(1): 31–37, <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2000.tb00240.x>.

67. Pereira M.A., Dias A.R., Faraj S.F., Cirqueira Cdos S., Tomitao M.T., Nahas S.C., Ribeiro U. Jr., de Mello E.S. Carnoy's solution is an adequate tissue fixative for routine surgical pathology, preserving cell morphology and molecular integrity. *Histopathology* 2015; 66(3): 388–397, <https://doi.org/10.1111/his.12532>.

68. Shetye J.D., Scheynius A., Mellstedt H.T., Biberfeld P. Retrieval of leukocyte antigens in paraffin-embedded rat tissues. *J Histochem Cytochem* 1996; 44(7): 767–776, <https://doi.org/10.1177/44.7.8675998>.

69. Yoneyama M., Kitayama T., Taniura H., Yoneda Y. Immersion fixation with Carnoy solution for conventional immunohistochemical detection of particular N-methyl-D-aspartate receptor subunits in murine hippocampus. *J Neurosci Res* 2003; 73(3): 416–426, <https://doi.org/10.1002/jnr.10622>.

70. James J.D., Hauer-Jensen M. Effects of fixative and fixation time for quantitative computerized image analysis of immunohistochemical staining. *J Histotechnol* 1999; 22(2): 109–111, <https://doi.org/10.1179/his.1999.22.2.109>.

71. Bos P.K., van Osch G.J., van der Kwast T., Verwoerd-Verhoef H.L., Verhaar J.A. Fixation-dependent immunolocalization shift and immunoreactivity of intracellular growth factors in cartilage. *Histochem J* 2000; 32(7): 391–396, <https://doi.org/10.1023/a:1004023902080>.

72. Shi S.R., Liu C., Pootrakul L., Tang L., Young A., Chen R., Cote R.J., Taylor C.R. Evaluation of the value of frozen tissue section used as “gold standard” for immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol* 2008; 129(3): 358–366, <https://doi.org/10.1309/7cxyxt23e5al8kq>.

73. Sillevs Smitt P.A., van der Loos C., Vianney de Jong J.M., Troost D. Tissue fixation methods alter the immunohistochemical demonstrability of neurofilament proteins, synaptophysin, and glial fibrillary acidic protein in human cerebellum. *Acta Histochem* 1993; 95(1): 13–21, [https://doi.org/10.1016/s0065-1281\(11\)80381-8](https://doi.org/10.1016/s0065-1281(11)80381-8).

74. Eastwood S.L., Burnet P.W., McDonald B., Clinton J., Harrison P.J. Synaptophysin gene expression in human brain: a quantitative in situ hybridization and immunocytochemical study. *Neuroscience* 1994; 59(4): 881–892, [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90292-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90292-5).

75. Webster J.D., Miller M.A., Dusold D., Ramos-Vara J. Effects of prolonged formalin fixation on diagnostic immunohistochemistry in domestic animals. *J Histochem Cytochem* 2009; 57(8): 753–761, <https://doi.org/10.1369/jhc.2009.953877>.

76. Wehrl H.F., Bezrukov I., Wiehr S., Lehnhoff M., Fuchs K., Mannheim J.G., Quintanilla-Martinez L.,

- Kohlhofer U., Kneilling M., Pichler B.J., Sauter A.W. Assessment of murine brain tissue shrinkage caused by different histological fixatives using magnetic resonance and computed tomography imaging. *Histol Histopathol* 2015; 30(5): 601–613.
77. Schmidt J., Bodor O., Gohr L., Kunz W. Paramyosin isoforms of *Schistosoma mansoni* are phosphorylated and localized in a large variety of muscle types. *Parasitology* 1996; 112(5): 459–467, <https://doi.org/10.1017/s0031182000076927>.
78. Beckstead J.H. A simple technique for preservation of fixation-sensitive antigens in paraffin-embedded tissues. *J Histochem Cytochem* 1994; 42(8): 1127–1134, <https://doi.org/10.1177/42.8.8027531>.
79. Ismail J.A., Poppa V., Kemper L.E., Scatena M., Giachelli C.M., Coffin J.D., Murry C.E. Immunohistologic labeling of murine endothelium. *Cardiovasc Pathol* 2003; 12(2): 82–90, [https://doi.org/10.1016/s1054-8807\(02\)00166-7](https://doi.org/10.1016/s1054-8807(02)00166-7).
80. Lynn J.A., Whitaker B.P., Hladik C.L., Robinson R.J., Joie J.B., Stigliano W.W., Carson F.L. Zinc isopropyl alcoholic unbuffered formalin as a postfixative for routine surgical pathology specimens. *J Histotechnol* 1994; 17(2): 105–109, <https://doi.org/10.1179/014788894794710986>.
81. Ott S.R. Confocal microscopy in large insect brains: zinc-formaldehyde fixation improves synapsin immunostaining and preservation of morphology in whole-mounts. *J Neurosci Methods* 2008; 172(2): 220–230, <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.04.031>.
82. Wester K., Asplund A., Bäckvall H., Micke P., Derveniece A., Hartmane I., Malmström P.U., Pontén F. Zinc-based fixative improves preservation of genomic DNA and proteins in histoprocessing of human tissues. *Lab Invest* 2003; 83(6): 889–899, <https://doi.org/10.1097/01.lab.0000074892.53211.a5>.
83. Accart N., Sergi F., Rooke R. Revisiting fixation and embedding techniques for optimal detection of dendritic cell subsets in tissues. *J Histochem Cytochem* 2014; 62(9): 661–671, <https://doi.org/10.1369/0022155414539963>.
84. Коржевский Д.Э., Григорьев И.П., Отеллин В.А. Применение обезвоживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейрогистологических исследованиях. Морфология 2006; 129(1): 85–86. Korzhevskii D.E., Grigor'ev I.P., Otellin V.A. Use of zinc-containing dehydrating fixatives for neurohistological studies. *Morfologiya* 2006; 129(1): 85–86.
85. Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Gilerovich E.G., Petrova E.S., Kirik O.V., Grigor'ev I.P. Advantages and disadvantages of zinc-ethanol-formaldehyde as a fixative for immunocytochemical studies and confocal laser microscopy. *Neurosci Behav Physiol* 2014; 44(5): 542–545, <https://doi.org/10.1007/s11055-014-9948-8>.
86. Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Kirik O.V., Grigorev I.P. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde. *Eur J Histochem* 2015; 59(3): 2530, <https://doi.org/10.4081/ejh.2015.2530>.
87. Alekseeva O.S., Vetosh A.N., Kostkin V.B., Korzhevskiy D.E., Otellin V.A. Heat shock proteins in brain neurons and hypoxic preconditioning. *Dokl Biol Sci* 2009; 425(1): 98–100, <https://doi.org/10.1134/s0012496609020045>.
88. Gilerovich E.G., Fedorova E.A., Grigor'ev I.P., Korzhevskii D.E. Morphological basics for reorganization of the rat cerebellar cortex during senescence. *J Evol Biochem Physiol* 2015; 51(5): 421–427, <https://doi.org/10.1134/s0022093015050087>.
89. Grigor'ev I.P., Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Gusel'nikova V.V., Kirik O.V. Intranuclear ubiquitin-immunopositive structures in human substantia nigra neurons. *Cell and Tissue Biology* 2016; 10(1): 29–36, <https://doi.org/10.1134/s1990519x16010053>.
90. Grigor'ev I.P., Vasilenko M.S., Sukhorukova E.G., Korzhevskii D.E. Use of different antibodies to tyrosine hydroxylase to study catecholaminergic systems in the mammalian brain. *Neurosci Behav Physiol* 2012; 42(2): 210–213, <https://doi.org/10.1007/s11055-011-9555-x>.
91. Kirik O.V., Korzhevskii D.E. Expression of neural stem cell marker nestin in the kidney of rats and humans. *Bull Exp Biol Med* 2009; 147(4): 539–541, <https://doi.org/10.1007/s10517-009-0541-z>.
92. Kirik O.V., Korzhevskii D.E. Vimentin in ependymal and subventricular proliferative zone cells of rat telencephalon. *Bull Exp Biol Med* 2013; 154(4): 553–557, <https://doi.org/10.1007/s10517-013-1998-3>.
93. Kirik O.V., Grigorev I.P., Alekseeva O.S., Korzhevskii D.E. Three-dimensional organization of the cytoplasmic neuroglobin-immunopositive structures in the rat brainstem neurons. *Biochem Moscow Suppl Ser A* 2016; 10(4): 333–337, <https://doi.org/10.1134/s1990747816030065>.
94. Korzhevskii D.E., Grigor'ev I.P., Kirik O.V., Alekseeva O.S. Neuroglobin distribution in the rat cerebellar Purkinje cells. *J Evol Biochem Phys* 2015; 51(6): 517–519, <https://doi.org/10.1134/s0022093015060095>.
95. Коржевский Д.Э., Григорьев И.П., Сухорукова Е.Г., Гусельникова В.В. Иммуногистохимическая характеристика нейронов черного вещества головного мозга человека. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова 2017; 117(4): 50–55. Korzhevskii D.E., Grigor'ev I.P., Sukhorukova E.G., Gusel'nikova V.V. Immunohistochemical characteristics of the substantia nigra neurons of the human. *Zhurnal nevrologii i psikhiatrii im. S.S. Korsakova* 2017; 117(4): 50–55, <https://doi.org/10.17116/jnevro20171174150-55>.
96. Petrova E.S., Isaeva E.N., Korzhevskii D.E. Differentiation of dissociated rat embryonic brain after allotransplantation into damaged nerve. *Bull Exp Biol Med* 2013; 156(1): 136–138, <https://doi.org/10.1007/s10517-013-2296-9>.
97. Chumasov E.I., Korzhevskii D.E., Petrova E.S., Sapronov N.S., Kuznetsova N.N. Glial reaction of the subventricular zone of the telencephalon of the rat brain on modeling of Alzheimer's disease. *Neurosci Behav Physiol* 2012; 42(1): 67–71, <https://doi.org/10.1007/s11055-011-9535-1>.
98. Chumasov E.I., Petrova E.S., Korzhevskii D.E. Distribution and structural organization of the autonomic nervous apparatus in the rat pancreas (an immunohistochemical study). *Neurosci Behav Physiol* 2012; 42(8): 781–788, <https://doi.org/10.1007/s11055-012-9635-6>.
99. Benerini Gatta L., Cadei M., Balzarini P., Castriciano S., Paroni R., Verzeletti A., Cortellini V., De Ferrari F., Grigolato P. Application of alternative fixatives to formalin in diagnostic pathology. *Eur J Histochem* 2012; 56(2): e12, <https://doi.org/10.4081/ejh.2012.12>.
100. Lassalle S., Hofman V., Marius I., Gavric-Tanga V., Brest P., Havet K., Butori C., Selva E., Santini J., Mograbi B., Hofman P. Assessment of morphology, antigenicity, and nucleic acid integrity for diagnostic thyroid pathology using formalin substitute fixatives. *Thyroid* 2009; 19(11): 1239–1248, <https://doi.org/10.1089/thy.2009.0095>.
101. Moelans C.B., ter Hoeve N., van Ginkel J.W., ten Kate F.J., van Diest P.J. Formaldehyde substitute

fixatives. Analysis of macroscopy, morphologic analysis, and immunohistochemical analysis. *Am J Clin Pathol* 2011; 136(4): 548–556, <https://doi.org/10.1309/ajcphh1b0cocbgom>.

102. Nadji M., Nassiri M., Vincek V., Kanhoush R., Morales A.R. Immunohistochemistry of tissue prepared by a molecular-friendly fixation and processing system. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005; 13(3): 277–282, <https://doi.org/10.1097/01.pai.0000146544.51771.79>.

103. Nykänen M., Kuopio T. Protein and gene expression of estrogen receptor alpha and nuclear morphology of two breast cancer cell lines after different fixation methods. *Exp Mol Pathol* 2010; 88(2): 265–271, <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2009.12.003>.

104. Olert J., Wiedorn K.H., Goldmann T., Kuhl H., Mehraein Y., Scherthan H., Niketeghad F., Vollmer E., Müller A.M., Müller-Navia J. HOPE fixation: a novel fixing method and paraffin-embedding technique for human soft tissues. *Pathol Res Pract* 2001; 197(12): 823–826, <https://doi.org/10.1078/0344-0338-00166>.

105. Paavilainen L., Edvinsson A., Asplund A., Hober S., Kampf C., Pontén F., Wester K. The impact of tissue fixatives on morphology and antibody-based protein profiling in tissues and cells. *J Histochem Cytochem* 2010; 58(3): 237–246, <https://doi.org/10.1369/jhc.2009.954321>.

106. Preusser M., Plumer S., Dirnberger E., Hainfellner J.A., Mannhalter C. Fixation of brain tumor biopsy specimens with RCL2 results in well-preserved histomorphology, immunohistochemistry and nucleic acids. *Brain Pathol* 2010; 20(6): 1010–1020, <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2010.00400.x>.

107. Robinson R.W., Snyder J.A. An innovative fixative for cytoskeletal components allows high resolution in colocalization studies using immunofluorescence techniques. *Histochem Cell Biol* 2004; 122(1): 1–5, <https://doi.org/10.1007/s00418-004-0656-2>.

108. Vollmer E., Galle J., Lang D.S., Loeschke S., Schultz H., Goldmann T. The HOPE technique opens up a multitude of new possibilities in pathology. *Rom J Morphol Embryol* 2006; 47(1): 15–19.

109. Zanini C., Gerbaudo E., Ercole E., Vendramin A., Forni M. Evaluation of two commercial and three home-made fixatives for the substitution of formalin: a formaldehyde-free laboratory is possible. *Environ Health* 2012; 11: 59, <https://doi.org/10.1186/1476-069x-11-59>.

110. Hinova-Palova D.V., Landzhov B., Dzhambazova E., Minkov M., Edelstein L., Malinova L., Paloff A., Ovtcharoff W. Neuropeptide Y immunoreactivity in the cat claustrum: a light- and electron-microscopic investigation. *J Chem*

Neuroanat 2014; 61–62: 107–119, <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2014.08.007>.

111. Persson S., Havton L.A. Retrogradely transported fluorogold accumulates in lysosomes of neurons and is detectable ultrastructurally using post-embedding immuno-gold methods. *J Neurosci Methods* 2009; 184(1): 42–47, <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.07.017>.

112. Watanabe I.S., Dias F.J., Mardegan Issa J.P., dos Santos Haemmerle C.A., Cury D.P., Takada S.H., Sosthenes M.C., Pereira da Silva M.C., Campos L.M., Nogueira M.I., Iyomasa M.M. Immunohistochemistry and ultrastructural characteristics of nerve endings in the oral mucosa of rat. *Microscopy* 2013; 62(2): 259–270, <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfs068>.

113. Stirling J.W. Ultrastructural localization of lysozyme in human colon eosinophils using the protein A-gold technique: effects of processing on probe distribution. *J Histochem Cytochem* 1989; 37(5): 709–714, <https://doi.org/10.1177/37.5.2467929>.

114. Koga D., Kusumi S., Bochimoto H., Watanabe T., Ushiki T. Correlative light and scanning electron microscopy for observing the three-dimensional ultrastructure of membranous cell organelles in relation to their molecular components. *J Histochem Cytochem* 2015; 63(12): 968–979, <https://doi.org/10.1369/0022155415609099>.

115. Berryman M.A. Effects of tannic acid on antigenicity and membrane contrast in ultrastructural immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 1992; 40(6): 845–857, <https://doi.org/10.1177/40.6.1350287>.

116. Phend K.D., Rustioni A., Weinberg R.J. An osmium-free method of epon embedment that preserves both ultrastructure and antigenicity for post-embedding immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 1995; 43(3): 283–292, <https://doi.org/10.1177/43.3.7532656>.

117. Zhong L., Brown J.C., Wells C., Gerges N.Z. Post-embedding immunogold labeling of synaptic proteins in hippocampal slice cultures. *J Vis Exp* 2013; 74: e50273, <https://doi.org/10.3791/50273>.

118. Heck W.L., Slusarczyk A., Basaraba A.M., Schweitzer L. Subcellular localization of GABA receptors in the central nervous system using post-embedding immunohistochemistry. *Brain Res Brain Res Protoc* 2002; 9(3): 173–180, [https://doi.org/10.1016/s1385-299x\(02\)00143-5](https://doi.org/10.1016/s1385-299x(02)00143-5).

119. Kinugasa S., Tojo A., Sakai T., Fujita T. Silver-enhanced immunogold scanning electron microscopy using vibratome sections of rat kidneys: detection of albumin filtration and reabsorption. *Med Mol Morphol* 2010; 43(4): 218–225, <https://doi.org/10.1007/s00795-010-0500-9>.