© Коллектив авторов, 2026
DOI: 10.31088/CEM2026.15.5.83-94 УДК: 57.086.1

Оптимизация пробоподготовки гистологических образцов тканей *Danio rerio* с применением изопропанола и минерального масла

Н.И. Сафонова[1], Д.М. Долматова[2], В.С. Фадеев[2], Г.М. Алипер[2], Ю.Ю. Силаева[1], Ю.П. Байкова[1]

[1] ФГБУН Институт биологии гена РАН, Москва, Россия
[2] ФГБУН Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Резюме. *Введение.* Рыбы *Danio rerio* являются одним из популярных объектов для проведения биомедицинских исследований – как фундаментальных, так и прикладных. Они удобны прежде всего простотой и относительной дешевизной содержания, наличием отработанных протоколов моделирования патологических состояний, относительной легкостью наблюдения за стадиями эмбрионального развития. Для оценки фенотипических проявлений патологий используют разные методы, в частности анализ гистологических срезов. Тем не менее проведение адекватного патоморфологического и патогистологического анализа возможно только при наличии препарата, лишенного артефактов. При этом качество в значительной степени определяется выбранной схемой пробоподготовки, включающей этапы фиксации, декальцинации и гистологической проводки исследуемых образцов. В литературе приведены методики подготовки гистологических препаратов *Danio rerio*, однако обращает на себя внимание отсутствие общепринятых протоколов пробоподготовки для различных тканей *Danio rerio*. В связи с этим целями настоящей работы были проверка применимости ряда существующих протоколов фиксации, декальцинации и стандартной проводки, а также адаптация режимов пробоподготовки под ручную проводку, основанную на использовании изопропанола и минерального масла, и определение оптимальных схем изготовления гистологических препаратов *Danio rerio*.
Материалы и методы. В качестве объекта исследования были выбраны взрослые самцы и самки (до нереста и после него) *Danio rerio* дикого типа возраста 7 месяцев.
Результаты. Проведенное исследование показало, что оптимальным фиксатором для любых образцов *Danio rerio* является 10% нейтральный забуференный формалин, за исключением исследования брюшной полости половозрелых самок до нереста. Для образцов, содержащих костную ткань, предпочтительна 24-часовая хелатная декальцинация с использованием 0.5М раствора этилендиаминтетрауксусной кислоты pH 8,0.
Заключение. Гистологическая проводка с использованием изопропанола и минерального масла показала хорошие результаты и может быть признана эффективной и безопасной альтернативой классической проводке через этанол и ксилол в гистологии рыб.

Ключевые слова: *Danio rerio*, гистология, фиксация, декальцинация, изопропанол, минеральное масло

Для корреспонденции: Юлия Павловна Байкова. E-mail: baykjulia@gmail.com

Для цитирования: Сафонова Н.И., Долматова Д.М., Фадеев В.С., Алипер Г.М., Силаева Ю.Ю., Байкова Ю.П. Оптимизация пробоподготовки гистологических образцов тканей *Danio rerio* с применением изопропанола и минерального масла. Клин. эксп. морфология. 2026;15(5):83–94. DOI: 10.31088/CEM2026.15.5.83-94.

Эта статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0).

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 25-14-00373).

Статья поступила 02.06.2026. **Получена после рецензирования** 11.06.2026. **Принята в печать** 22.06.2026.

Optimization of sample preparation protocol for histological analysis of *Danio rerio* tissues using isopropanol and mineral oil

N.I. Safonova[1], D.M. Dolmatova[2], V.S. Fadeev[2], G.M. Aliper[2], Yu.U. Silaeva[1], Iu.P. Baikova[1]

[1] Institute of Gene Biology, Moscow, Russia
[2] Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow, Russia

Abstract. *Introduction. Danio rerio* is a common model in both fundamental and applied biomedical research because it is cost effective and easy to maintain. Moreover, published and validated protocols are available

to model various pathologies, and embryonic development can be assessed at any stage. Pathological phenotypes can be analyzed using various methods, including histology. However, adequate pathomorphological and pathohistological analyses require high-quality artefact-free specimens, whose quality largely depends on preparation protocol, including fixation, decalcification, and histological processing. Although there exist various protocols for preparing *Danio rerio* specimens, standardized protocols for different *Danio rerio* tissues have not yet been developed. Thus, this study aimed to analyze the applicability of existing fixation, decalcification, and processing protocols, adapt them for manual processing with isopropanol and mineral oil, and identify optimal protocols for histological preparation of various *Danio rerio* tissues.
Materials and methods. We used adult 7-month-old male and female (before and after spawning) wild-type *Danio rerio*.
Results. 10% NBF is an optimal universal fixative for examining all *Danio rerio* tissues, except for the abdominal ones of sexually mature female fish before spawning. For specimens containing bone tissue, a 24-hour chelation decalcification protocol using 0.5M EDTA (pH 8.0) is preferred.
Conclusion. Histological processing using isopropanol and mineral oil has yielded satisfactory results and may serve as an effective and safe alternative to the standard ethanol- and xylene-based processing protocols in histological studies of *Danio rerio* tissues.

Keywords: *Danio rerio*, histology, fixation, decalcification, isopropanol, mineral oil

Corresponding author: Iuliia P. Baikova. E-mail: baykjulia@gmail.com

For citation: Safonova N.I., Dolmatova D.M., Fadeev V.S., Aliper G.M., Silaeva Yu.U., Baikova Iu.P. Optimization of sample preparation protocol for histological analysis of *Danio rerio* tissues using isopropanol and mineral oil. Clin. exp. morphology. 2026;15(5):83–94 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2026.15.5.83-94.

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0).

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 25-14-00373.

Received 02.06.2026. **Received in revised form** 11.06.2026. **Accepted** 22.06.2026.

Введение

Приготовление гистологических препаратов включает в себя следующие последовательные этапы: вырезка, фиксация, декальцинация (при необходимости), проводка, заливка, микротомия, окрашивание.

Фиксация – это процесс, направленный на предотвращение аутолиза и сохранение прижизненной структуры исследуемых образцов. Фиксация и выбор фиксирующего средства могут оказать существенное влияние на последующие этапы пробоподготовки, поскольку каждый фиксатор вносит характерные артефакты в образцы тканей, сказывается на сохранности и окрашиваемости клеточных компонентов [1]. Наиболее часто используемыми фиксаторами для *Danio rerio* являются 10% нейтральный забуференный формалин (neutral buffered formalin, NBF) или свежеприготовленный незабуференный 4% параформальдегид (paraformaldehyde, PFA) [1–5], фиксаторы Дитриха и Дэвидсона [3, 6] и фиксатор Буэна [3, 7–9].

При наличии в исследуемых образцах костных структур из них необходимо удалить соли кальция. Этот процесс осуществляется с помощью химических агентов – 5–10% растворов органических или неорганических кислот, образующих растворимые соли кальция, или хелатирующих агентов, которые связываются с ионами кальция [1, 10, 11]. На следующем этапе из образцов удаляются вода и остатки фиксатора. Так как вода в тканях встречается в двух формах, свободной и связанной, необходимо применять правильные схемы дегидратации тканей, которые будут удалять только свободную воду. Удаление связанной воды может приводить к появлению артефактов, вызывать сухость и хрупкость тканей, что препятствует нормальной микротомии [1]. Стандартным агентом для дегидратации при гистологической проводке является этиловый или изопропиловый спирт (ИПС) [12–15].

После полной дегидратации для последующего пропитывания парафином необходим этап просветления. Просветляющие агенты полностью замещают в ткани спирты, обеспечивая лучшую смешиваемость образцов с расплавленным парафином. Традиционно для этой цели используется ксилол, однако ввиду высокой токсичности в современных методиках его часто заменяют менее вредными веществами, например минеральным маслом [12–16]. Рекомендуемый протокол просветления с его применением включает последовательную обработку образца сначала промежуточной смесью изопропанола и минерального масла в соотношении 5:1, затем смесью в соотношении 2:1 с последующей финальной выдержкой в чистом минеральном масле [12].

Далее ткань пропитывают расплавленным гистологическим парафином так, чтобы парафин полностью вытеснил просветляющий агент и заполнил межклеточные пространства. После завершения инфильтрации формируется парафиновый блок – образец ориентируют в металлической (или иной) заливочной форме, заливают парафином, затем устанавливают кассету как основание блока и быстро охлаждают на холодной плите до полного затвердевания. После его можно закрепить в микротоме и получить серийные срезы для окрашивания и дополнительных исследований [17, 18].

Значительное разнообразие используемых в гистологической практике техник, реактивов и протоколов требует от исследователя тщательного подбора мето-

дики. Основной задачей нашего исследования было создание методологических гистологических протоколов, оптимальных для такого объекта как взрослые особи *Danio rerio*, применимых для ручной проводки образцов, не требующих узкоспециализированного лабораторного оборудования и максимально безопасных для оператора. С этой целью после анализа литературы были выбраны, отработаны, модифицированы и проанализированы наиболее часто используемые в мировой практике протоколы.

Материалы и методы

Формирование экспериментальных групп. В качестве объекта исследования были выбраны взрослые самцы и самки (до нереста и после него) *Danio rerio* дикого типа возраста 7 месяцев. Группы для эксперимента включали в себя самцов (общее количество 50 штук) и самок (общее количество 50 штук, из них 40 до нереста и 10 после него). Все этапы исследования соответствуют законодательству Российской Федерации и нормативным документам, а также одобрены локальным этическим комитетом Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН (протокол № 2 от 26.12.2025).

Условия содержания и оснащение. Комплексная система содержания рыб и выращивания мальков Aquaneering (Aquaneering, США) с автономной и централизованной фильтрацией Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН. Температура воды 26°C, pH 7,5, dH 10° (все параметры контролируются динамически). Объем емкостей для содержания рыб составлял 5 литров для индивидуального содержания и 20 литров для групп до 15 особей, с частичной подменой воды, 10% ежедневно. Кормление осуществлялось через час после включения света. Кормление двухдневными науплиями рачков *Artemia salina*, выращенными из цист. Свет от 600 до 1100 лк, освещение по таймеру 12/12.

Выведение из эксперимента проводилось с использованием трикаин метансульфоната (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 800 мг/л с последующим помещением рыбы в ледяную воду до полного прекращения сердцебиения.

После выведения из эксперимента особь фиксировали на столе при помощи игл для фиксации за хвост и нижнюю челюсть. Делали разрез кожи и мышц вдоль брюшка от анального отверстия до оперкулума и удаляли боковую стенку. На следующем этапе удаляли часть стенки плавательного пузыря. Далее удаляли хвостовую часть, проводя разрез непосредственно за анальным отверстием, и отделяли голову [11]. Необходимость отделения головы была обусловлена рекомендуемым для используемого оборудования размером парафинового блока 20×20 мм для получения среза оптимального качества. У половины особей были сепарированы головной мозг, органы брюшной полости и позвоночный столб.

После препарирования были получены следующие варианты образцов для дальнейшего исследования (один образец – один блок).

1. Голова до заднего края жаберных крышек.
2. Сепарированный головной мозг.
3. Туловище с одной боковой стенкой.
4. Комплекс органов брюшной полости.
5. Очищенный от мягких тканей позвоночный столб.

Используемое оборудование: термостат Binder BD023-230V (Binder, Германия), микротом ротационный полуавтоматический RMD-3000 («МедТехникаПоинт», Россия), слайдбаня-30/60 (КБ «Техном», Россия), нагревательный столик «Микростат 30/80» (КБ «Техном», Россия), микроскоп Nikon Eclipse-Ti (Nikon, Япония).

Используемые реактивы: PFA (Acros Organics, Бельгия), 10% NBF («Медикс», Россия), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА, «Ареолаб», Россия), ледяная уксусная кислота (PanReac AppliChem, Испания), фиксатор Буэна (LTB, Россия), изопропиловый спирт «Дегидратант» («Медикс», Россия), трихлоруксусная кислота («ЛенРеактив», Россия), азотная кислота (Уральский завод химических реактивов, Россия), алюмокалиевые квасцы («ЛенРеактив», Россия), промежуточная среда № 1 («Медикс», Россия), промежуточная среда № 2 («Медикс», Россия), минеральное масло («Медикс», Россия), универсальная парафиновая заливочная среда («Медикс», Россия), депарафинирующий раствор («Медикс», Россия), ксилол («Медикс», Россия), набор для окрашивания гематоксилином регрессивным и эозином спиртовым («Медикс», Россия), среда для заключения (Diapath, Италия).

С каждого полученного блока было получено от 5 до 10 стекол (в зависимости от размера образца), по 3–4 среза толщиной 5 мкм на стекло с подрезкой в 50 микрон между срезами. Для получения микрофотографий использовали режим сшивки для захвата всех полей зрения и/или выбирали центральное по отношению к срезу поле зрения.

Статистическая обработка дизайном эксперимента не предполагалась.

Результаты

Для образцов, содержащих костную ткань, на основе анализа данных литературы составлено 64 варианта протоколов, различающихся фиксирующими растворами, декальцинирующими агентами и временем проводки. На первом этапе было решено определить необходимое время выдержки в спиртах для дегидратации и достаточное время декальцинации в ЭДТА, что позволило бы значительно уменьшить число необходимых экспериментов (табл. 1).

Исходя из данных литературы, спиртосодержащие фиксаторы могут требовать уменьшения времени дегидратации, а фиксаторы на основе пикриновой кислоты его увеличения [19]. На основании полученных нами ранее данных с использованием различных модельных объектов (мыши, кролики, крысы) и источников

Таблица 1 | Table 1

Схема предварительного эксперимента для образцов, содержащих костную ткань | Experimental design for samples containing bone tissue

Образец | Sample	Фиксация | Fixation	Декальцинация | Decalcification	Проводка | Processing	Результат | Result
Голова целиком – 32 штуки (16 ♂, 16 ♀ до нереста) | Whole head – 32 samples (16 ♂, 16 ♀ before spawning) Туловище с боковой стенкой – 32 штуки (16 ♂, 16 ♀ до нереста) | Trunk with body wall – 32 samples (16 ♂, 16 ♀ before spawning) Позвоночный столб – 16 штук (16 ♂) | Spine – 16 samples (16 ♂) Итого: 2 образца головы, 1 образец позвоночного столба, 2 образца туловища с боковой стенкой на протокол | Total (per protocol): two whole-head specimens, one spine specimen, two trunks with body wall	10% NBF – 1 сутки с последующим отмыванием в проточной воде 1 час | 10% NBF – 24 h, followed by rinsing in running water for 1 h	0,5М ЭДТА pH 8,0 ● 1 сутки ● 3 суток ● 5 суток ● 7 суток с последующим отмыванием в проточной воде 1 час | 0.5M EDTA (pH 8.0) ● 1 day ● 3 days ● 5 days ● 7 days, followed by rinsing in running water for 1 h	1) ИПС 70%, 80%, 90%, две смены 100%: ● по 20 минут ● по 30 минут ● по 40 минут ● по 60 минут 2) промежуточные среды 1 и 2 – по 90 минут 3) минеральное масло – 2 суток 4) универсальная парафиновая среда – четыре смены по 1 часу в каждой, температура 58°C | 1) 70%, 80%, 90% IPA, 2 × 100% IPA changes for: ● 20 min ● 30 min ● 40 min ● 60 min 2) a 5:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min; a 2:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min 3) mineral oil – 2 days 4) paraffin wax – 4 changes, 1 h each, 58°C	Удовлетворительные фиксация, отмывание и декальцинация (независимо от времени декальцинации); недостаточная дегидратация при выдержке при 20 и 30 минутах (невозможно получить срез); пересыхание мышечной ткани при дегидратации в 60 минут | Satisfactory fixation, rinsing, and decalcification (irrespective of decalcification time); insufficient dehydration with 20 and 30 min exposition (sectioning was not possible); excessive drying of muscle tissue during 60-minute dehydration

литературы [1, 3, 6, 9] мы полагаем, что ключевыми параметрами для времени дегидратации являются толщина, размер образца, плотность и тип ткани. Для предварительного эксперимента были выбраны наиболее распространенный фиксатор 10% NBF, время фиксации в котором составляет 24 часа и не требует подбора, и бескислотный декальцинатор как более подходящий для оценки морфологии благодаря действию при pH 8,0. Согласно данным литературы, время декальцинации в бескислотном декальцинаторе во многом зависит от размера и плотности образца. С учетом того, что строение костей *Danio rerio* схоже с таковым у млекопитающих [20], нами был выбран временно́й интервал декальцинации от 1 до 7 суток с ежедневной сменой декальцинирующей жидкости и механической проверкой степени декальцинации. Таким образом, предварительное исследование включало в себя как подбор времени декальцинации для бескислотного декальцинатора, так и оценку дегидратации на основе протокола, обеспечивающего удовлетворительную декальцинацию. На данном этапе были использованы образцы самцов *Danio rerio* и самок до нереста (самки до нереста были выделены в отдельную группу, поскольку большое содержание белков, липидов и воды в икре, а также более крупный размер рыбы могли повлиять на время дегидратации). Физические параметры самок после нереста практически не отличались от таковых у самцов.

Обнаружено, что оптимальное время выдержки в растворах ИПС в ходе эксперимента составляет 40 минут. Также определено, что 24 часа декальцинации в 0.5М ЭДТА pH 8,0 достаточно для удаления солей кальция (приведенные параметры совпадают с данными ряда исследователей) [1, 3]. Итоговая схема эксперимента содержала семь вариантов протоколов, включая опубликованные ранее протоколы [5, 7, 11] для фиксаторов Дитриха и Буэна с последующей декальцинацией с использованием 5% раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ) (табл. 2). С парафиновых блоков, полученных по данным протоколам, делали срезы толщиной 5 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином регрессивным и эозином спиртовым согласно протоколу фирмы-производителя.

Полученные нами результаты позволяют сделать вывод, что наиболее простым является протокол на основе 10% NBF и 0.5М ЭДТА pH 8,0 (рис. 3, 4). Следует отметить, что протокол с использованием фиксатора Буэна показал идентичные по качеству результаты, однако использование данного фиксатора делает невозможным иммуногистохимическое исследование и требует больших затрат изопропанола на этапе отмывания.

Таблица 2 | Table 2

Варианты протоколов для образцов *Danio rerio*, содержащих костную ткань | Protocols for *Danio rerio* samples containing bone tissue

Образец | Sample	Фиксация | Fixation	Декальцинация | Decalcification	Проводка | Processing	Результат | Result
Голова целиком – 21 штука (14 ♂, 7 ♀) | Whole head – 21 samples (14 ♂, 7 ♀) Туловище с боковой стенкой – 14 штук (7 ♂, 7 ♀ до нереста) | Trunk with body wall – 14 samples (7 ♂, 7 ♀ before spawning) Позвоночный столб – 7 штук (7♂) | Spine – 7 samples (7 ♂)	4% PFA – 1 сутки с последующим отмыванием в проточной воде 1 час | 4% PFA – 24 h, followed by rinsing in running water for 1 h	0.5M ЭДТА pH 8,0 – 1 сутки с последующим отмыванием в проточной воде 1 час | 0.5M EDTA (pH 8.0) – 24 h, followed by rinsing in running water for 1 h	1) ИПС 70%, 80%, 90%, две смены 100% по 40 минут в каждом 2) промежуточные среды 1 и 2 – по 90 минут 3) минеральное масло – 2 суток 4) универсальная парафиновая среда – четыре смены по 1 часу в каждой, температура 58°C | 1) 70%, 80%, 90% IPA, 2 × 100% IPA changes for 40 min each 2) a 5:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min; a 2:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min 3) mineral oil – 2 days 4) paraffin wax – 4 changes, 1 h each, 58°C	Удовлетворительно | Satisfactory
	10% NBF – 1 сутки с последующим отмыванием в проточной воде 1 час | 10% NBF – 24 h, followed by rinsing in running water for 1 h			
Итого: 3 образца головы, 1 образец позвоночного столба, 2 образца туловища с боковой стенкой на протокол | Total (per protocol): three whole-head specimens, one spine, two trunks with body wall	Фиксатор Дитриха – 1 сутки | Dietrich's fixative – 24 h	5% ТХУ – 1 сутки с последующим отмыванием в трех сменах по 30 минут в 70% ИПС | 5% TCAA – 24 h, followed by three changes of rinsing in 70% IPA, 30 min each	1) ИПС 80%, 90%, две смены 100% по 40 минут в каждом 2) промежуточные среды 1 и 2 – по 90 минут 3) минеральное масло – 2 суток 4) универсальная парафиновая среда – четыре смены по 1 часу в каждой, температура 58°C | 1) 80%, 90% IPA, 2 × 100% IPA changes for 40 min each 2) a 5:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min; a 2:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min 3) mineral oil – 2 days 4) paraffin wax – 4 changes, 1 h each, 58°C	Выявленные артефакты: слабые деформационные изменения тканей брюшной полости, слабое окрашивание, вызванное, вероятно, ТХУ (рис. 1) | Artefacts – subtle distortions of the abdominal cavity, weak staining probably due to TCAA (Fig. 1)
	Фиксатор Дэвидсона – 1 сутки | Davidson's fixative – 24 h			
	4% PFA – 1 сутки с последующим отмыванием в проточной воде 1 час | 4% PFA – 24 h, followed by rinsing in running water for 1 h	5% раствор азотной кислоты – 1 сутки. Нейтрализация кислоты и стабилизация тканей в 5% растворе алюмокалиевых квасцов ($KAl(SO_4)_2$) с последующим отмыванием в проточной воде 1 час | 5% nitric acid – 24 h. Acid neutralization and tissue stabilization in 5% potassium alum solution ($KAl(SO_4)_2$) followed by rinsing in running water for 1 h	1) ИПС 80%, 90%, две смены 100% по 40 минут в каждом 2) промежуточные среды 1 и 2 – по 90 минут 3) минеральное масло – 2 суток 4) универсальная парафиновая среда – четыре смены по 1 часу в каждой, температура 58°C | 1) 80%, 90% IPA, 2 × 100% IPA changes for 40 min each 2) a 5:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min; a 2:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min 3) mineral oil – 2 days 4) paraffin wax – 4 changes, 1 h each, 58°C	Выявленные артефакты: нарушение морфологии мягких тканей (рис. 2) | Artefacts – disturbed soft tissue morphology (Fig. 2)
	10% NBF – 1 сутки с последующим отмыванием в проточной воде 1 час | 10% NBF – 24 h, followed by rinsing in running water for 1 h			

Окончание таблицы 2 | End table 2

Образец | Sample	Фиксация | Fixation	Декальцинация | Decalcification	Проводка | Processing	Результат | Result
	Фиксатор Буэна – 1 сутки с последующим отмыванием в трех сменах 70% ИПС по 30 минут в каждой | Bouin fixative – 24 h, followed by three changes of rinsing in 70% IPA, 30 min each	0.5М ЭДТА pH 8,0 1 сутки с последующим отмыванием в проточной воде 1 час | 0.5M EDTA (pH 8.0) – 24 h, followed by rinsing in running water for 1 h	1) ИПС 70%, 80%, 90%, две смены 100% по 40 минут 2) промежуточные среды 1 и 2 – по 90 минут 3) минеральное масло – 2 суток 4) универсальная парафиновая среда – четыре смены по 1 часу в каждой, температура 58°C | 1) 80%, 90% IPA, 2 × 100% IPA changes for 40 min each 2) a 5:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min; a 2:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min 3) mineral oil – 2 days 4) paraffin wax – 4 changes, 1 h each, 58°C	Удовлетворительно | Satisfactory

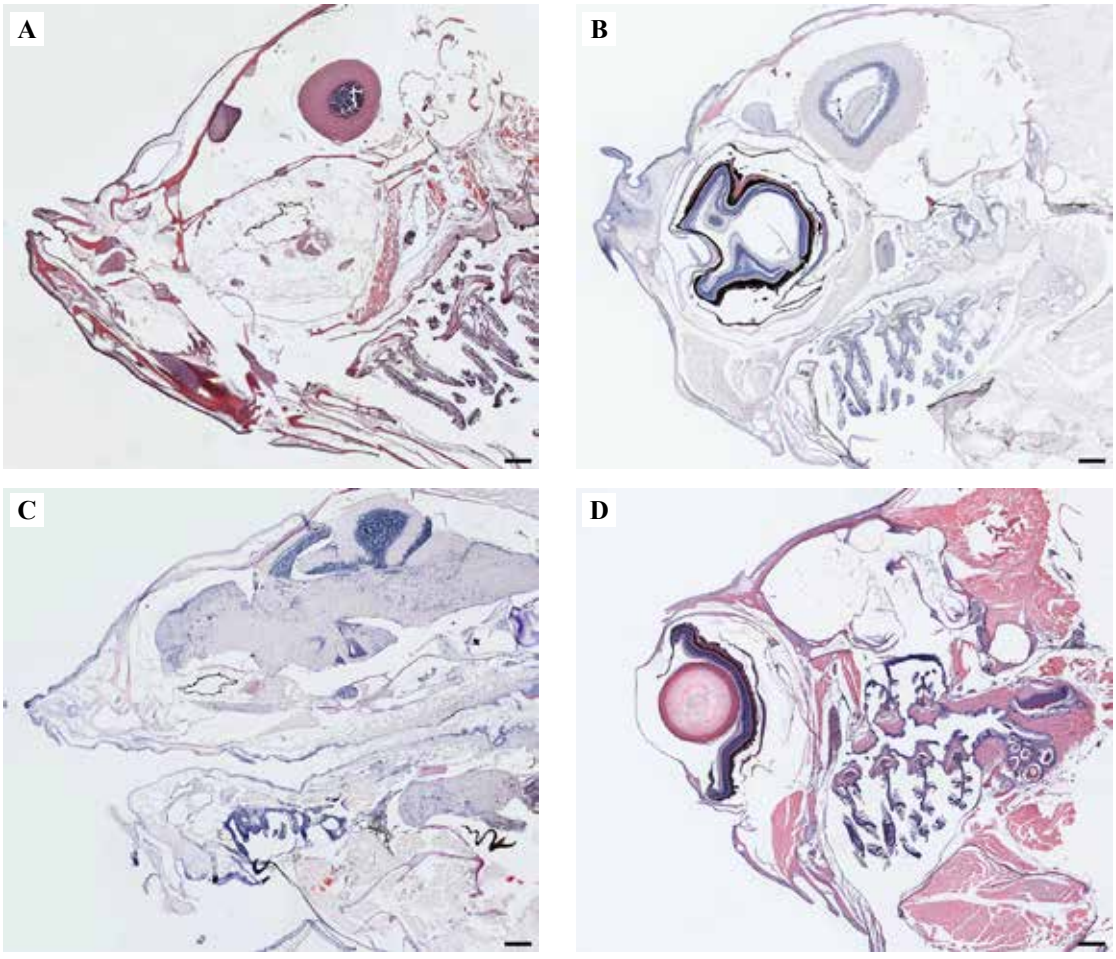


Рис. 1. Фронтальные срезы головы *Danio rerio.*
A – после фиксации 10% NBF и декальцинации в 5% HNO_3. B – после фиксации раствором Дитриха и декальцинации в 5% ТХУ. C – после фиксации раствором Дэвидсона и декальцинации в 5% ТХУ. D – после фиксации раствором Буэна и декальцинации в ЭДТА 0.5М pH 8,0. Окрашивание гематоксилином и эозином. Масштабный отрезок 300 мкм

Fig. 1. Frontal *Danio rerio* head samples.
A – after fixation with 10% NBF and decalcification with 5% HNO_3. B – after fixation with Dietrich's fixative and decalcification with 5% TCAA. C – after fixation with Davidson's fixative and decalcification with 5% TCAA. D – after fixation with Bouin fixative and decalcification with 0.5M EDTA (pH 8.0). H&E stain. Scale bar 300 μm

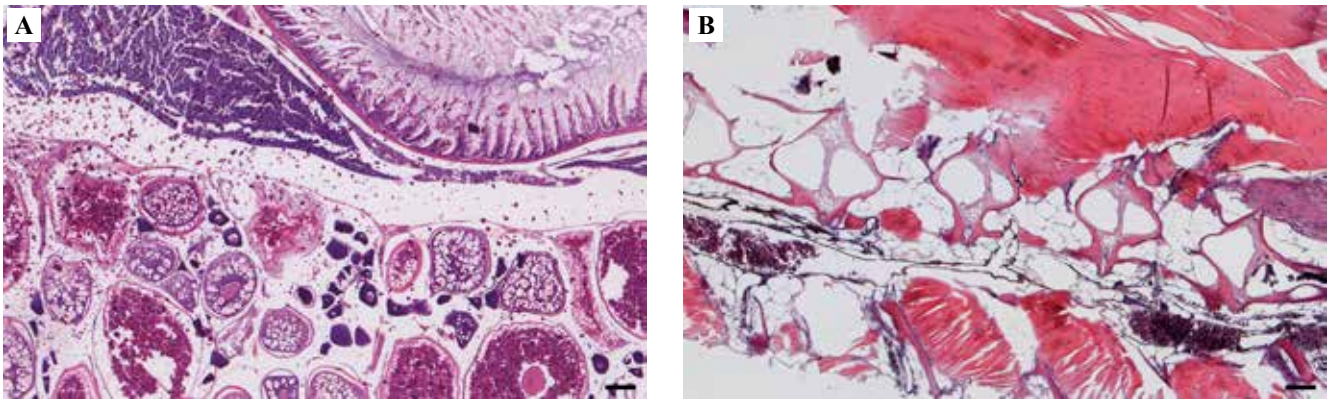


Рис. 2. Прочие артефакты, вызванные декальцинацией 5% HNO_3.
А – сагиттальный срез органов брюшной полости самки *Danio rerio*. В – сагиттальный срез в области позвоночника *Danio rerio*. Окрашивание гематоксилином и эозином. Масштабные отрезки 100 мкм

Fig. 2. Other artefacts caused by 5% HNO_3 decalcification.
A – *Danio rerio* female internal organs sagittal section. B – *Danio rerio* spine sagittal section. H&E stain. Scale bar 100 μm

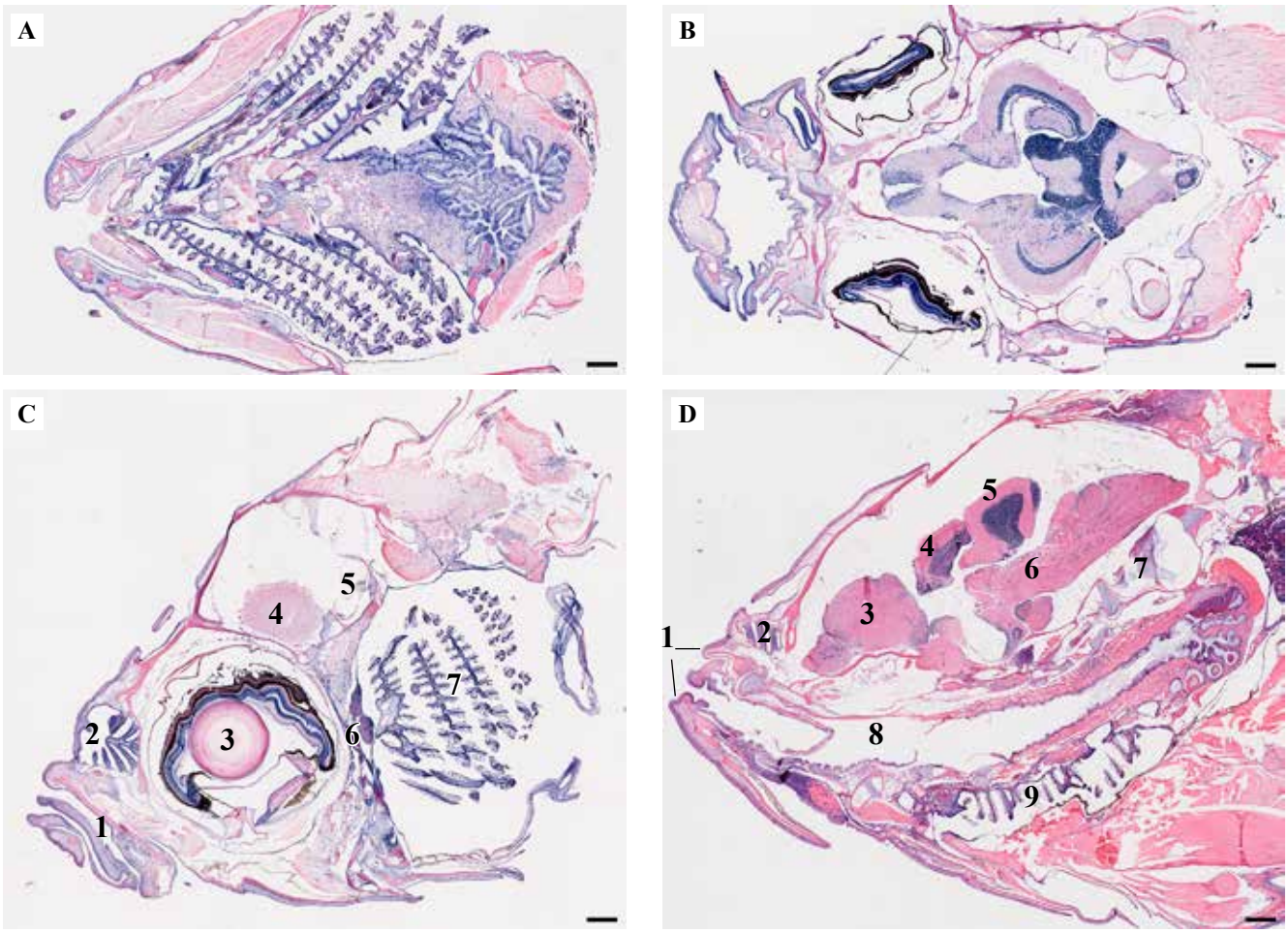


Рис. 3. Фронтальный и сагиттальный срезы головы *Danio rerio*.
А, В – фронтальные срезы головы *Danio rerio*. С, D – сагиттальные срезы головы *Danio rerio*. Окрашивание гематоксилином и эозином. Масштабный отрезок 300 мкм
С: 1 – ротовая полость, 2 – обонятельная сумка, 3 – глаз, 4 – мозг, 5 – внутреннее ухо, 6 – псевдожабра, 7 – жабры
D: 1 – губы, 2 – обонятельная сумка, 3 – конечный мозг, 4 – средний мозг, 5 – мозжечок, 6 – промежуточный мозг, 7 – внутреннее ухо, 8 – пищевод, 9 – жабры

Fig. 3. Frontal and sagittal *Danio rerio* head sections.
A, B – frontal. C, D – sagittal. H&E stain. Scale bar 300 μm.
C: 1 – oral cavity, 2 – olfactory organ, 3 – eye, 4 – brain, 5 – inner ear, 6 – pseudobranchia, 7 – gills
D: 1 – lips, 2 – olfactory organ, 3 – telencephalon, 4 – mesencephalon, 5 – cerebellum, 6 – diencephalon, 7 – inner ear, 8 – esophagus, 9 – gills

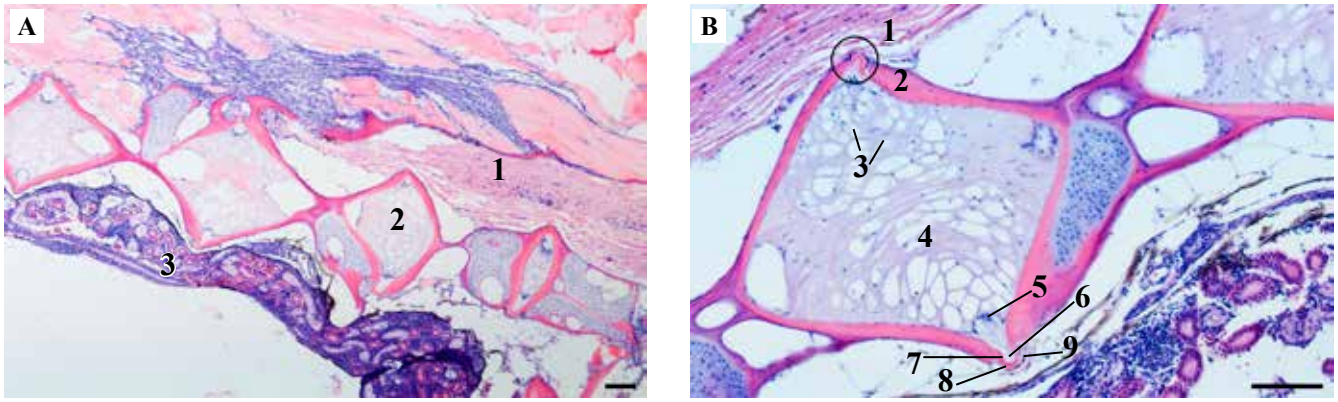


Рис. 4. Сагиттальный срез позвоночника *Danio rerio.*
А – сагиттальный срез позвоночника *Danio rerio*, ×4. В – сагиттальный срез позвоночника *Danio rerio*, ×10. Окрашивание гематоксилином и эозином. Масштабные отрезки 100 мкм
А: 1 – спинной мозг, 2 – позвоночник, 3 – почка
В: 1 – межпозвоночное соединение, 2 – костный матрикс, 3 – вакуолизированные клетки нотохорды, 4 – нотохорда, 5 – базальные клетки нотохорды, 6 – оболочка нотохорды, 7 – наружная эластическая мембрана, 8 – наружная связка, 9 – соединительная ткань наружной связки

Fig. 4. *Danio rerio* spine sagittal section.
A – *Danio rerio* spine sagittal section, ×4. B – *Danio rerio* spine sagittal section, ×10. H&E stain. Scale bar 100 μm.
A: 1 – spinal cord, 2 – spine, 3 – kidney
B: 1 – intercentral joint, 2 – bone matrix, 3 – notochord vacuolated cells, 4 – notochord, 5 – notochord basal cells, 6 – notochord sheath, 7 – elastic externa, 8 – external ligament, 9 – external ligament connective tissue

Для образцов, не содержащих костную ткань, на основе данных литературы составлено 20 протоколов, отличающихся фиксирующими агентами и временем выдержки в спиртах на этапе дегидратации. Как и в случае с образцами, содержащими костную ткань, было решено сначала определить необходимое время выдержки в спиртах (табл. 3). Для данного этапа использовали образцы сепарированного головного мозга и комплекса органов брюшной полости самцов, оставшиеся от предыдущих этапов исследования, а также образцы самок до нереста.

Определено, что достаточное время выдержки в спиртах составляет 30 минут. Итоговая схема эксперимента включала в себя пять вариантов протоколов (табл. 4).

Таблица 3 | Table 3

Схема предварительного эксперимента для образцов, не содержащих костную ткань | Experimental design for samples without bone tissue

Образец | Sample	Фиксация | Fixation	Проводка | Processing	Результат | Result
Сепарированный головной мозг – 16 штук (16 ♂) | Dissected brain – 16 samples (16 ♂) Комплекс органов брюшной полости – 24 штуки (16 ♂, 8 ♀) | Abdominal organs – 24 samples (16 ♂, 8 ♀) Итого: по 4 сепарированных мозга, 4 комплекса органов брюшной полости ♂, 2 комплекса органов брюшной полости ♀ до нереста на протокол | Total (per protocol): four dissected brains, four abdominal organ complexes ♂, two abdominal organ complexes ♀ before spawning	10% NBF – 1 сутки с последующим отмыванием в проточной воде 1 час | 10% NBF – 24 h, followed by rinsing in running water for 1 h	1) ИПС 70%, 80%, 90%, две смены 100%: • по 20 минут • по 30 минут • по 40 минут • по 60 минут 2) промежуточные среды 1 и 2 – по 90 минут 3) минеральное масло – 2 суток 4) универсальная парафиновая среда – четыре смены по 1 часу в каждой, температура 58°C | 1) 70%, 80%, 90% IPA, 2 × 100% IPA changes for: • 20 min • 30 min • 40 min • 60 min 2) a 5:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min; a 2:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min 3) mineral oil – 2 days 4) paraffin wax – 4 changes, 1 h each, 58°C	Удовлетворительные фиксация и отмывание. Недостаточная дегидратация при выдержке 20 минут. Пересушивание образцов при выдержке более 30 минут | Satisfactory fixation and rinsing. Insufficient dehydration with a 20-minute exposure. Excessive drying when exposed to IPA longer than 30 min

Таблица 4 | Table 4

Варианты протоколов для образцов *Danio rerio*, не содержащих костную ткань | Protocols for *Danio rerio* samples without bone tissue

Образец | Sample	Фиксация | Fixation	Проводка | Processing	Результат | Result
Сепарированный головной мозг – 30 штук (4 ♂, 16 ♀ до нереста, 10 ♀ после нереста) | Dissected brain – 30 samples (4 ♂, 16 ♀ before spawning, 10 ♀ after spawning) Комплекс органов брюшной полости – 29 штук (10 ♂, 9 ♀ до нереста, 10 ♀ после нереста) | Abdominal organs – 29 samples (10 ♂, 9 ♀ before spawning, 10 ♀ after spawning) Итого: по 6 образцов сепарированного мозга, 2 комплекса органов брюшной полости ♂, 2 комплекса органов брюшной полости ♀ до нереста (за исключением протокола с 10% NBF, где был 1 образец), по 2 комплекса органов брюшной полости ♀ после нереста на протокол | Total (per protocol): six dissected brains, two abdominal organ complexes ♂, two abdominal organ complexes ♀ before spawning (excluding the protocol with 10% NBF, for which a single sample was used), two abdominal organ complexes ♀ after spawning	4% PFA – 1 сутки с последующим отмыванием в проточной воде 1 час | 4% PFA – 24 h, followed by rinsing in running water for 1 h	1) ИПС 70%, 80%, 90%, две смены 100% по 30 минут в каждом 2) промежуточные среды 1 и 2 – по 90 минут 3) минеральное масло – 2 суток 4) универсальная парафиновая среда – четыре смены по 1 часу в каждой, температура 58°C | 1) 70%, 80%, 90% IPA, 2 × 100% IPA changes for 30 min each 2) a 5:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min; a 2:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min 3) mineral oil – 2 days 4) paraffin wax – 4 changes, 1 h each, 58°C	Удовлетворительно для всех образцов | Satisfactory for all samples
	10% NBF – 1 сутки с последующим отмыванием в проточной воде 1 час | 10% NBF – 24 h, followed by rinsing in running water for 1 h		
	Фиксатор Дитриха – 1 сутки | Dietrich's fixative – 24 h	1) ИПС 80%, 90%, две смены 100% по 30 минут в каждом 2) промежуточные среды 1 и 2 по 90 минут 3) минеральное масло – 2 суток 4) универсальная парафиновая среда – четыре смены по 1 часу в каждой, температура 58°C | 1) 80%, 90% IPA, 2 × 100% IPA changes for 30 min each 2) a 5:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min; a 2:1 IPA-to-mineral oil solution – 90 min 3) mineral oil – 2 days 4) paraffin wax – 4 changes, 1 h each, 58°C	Удовлетворительно для всех образцов. Обработка с использованием фиксатора Дэвидсона дает более качественный срез и контрастное окрашивание в случае комплексов органов брюшной полости самок до нереста | Satisfactory for all samples; Davidson's fixative provided better-quality sections and more pronounced staining of abdominal organ complexes from pre-spawning females
	Фиксатор Дэвидсона – 8 часов с последующим отмыванием в трех сменах 70% ИПС по 30 минут в каждой | Davidson's fixative – 8 h, followed by three changes of rinsing in 70% IPA, 30 min each		
	Фиксатор Буэна – 1 сутки с последующим отмыванием в трех сменах 70% ИПС по 30 минут в каждой | Bouin fixative – 24 h, followed by three changes of rinsing in 70% IPA, 30 min each		

Полученные нами результаты позволяют сделать вывод, что наиболее простыми являются протоколы на основе 10% NBF и фиксатора Буэна для самцов и самок после нереста и на основе фиксатора Дэвидсона для самок с икрой (рис. 5, 6). Фиксатор Дэвидсона, по-видимому, препятствует расслоению содержимого зрелых ооцитов, что положительно сказывается на качестве окрашенных гематоксилином и эозином срезов. Для рутинной работы целесообразнее использовать протокол на основе 10% NBF, так как он позволяет сократить объем используемого ИПС, необходимого для фиксаторов Дэвидсона и Буэна на этапе отмывания после фиксатора.

По неопубликованным нами к настоящему моменту данным, изопропанол и минеральное масло могут быть использованы в том числе для проводки объектов малых размеров (с учетом сокращения времени выдержки в спиртах до 10 минут), таких как мальки *Danio rerio* в возрасте от 1 недели до 1 месяца, эмбрионы мыши со стадии e8.5 (фиксация 10% NBF), глазные яблоки

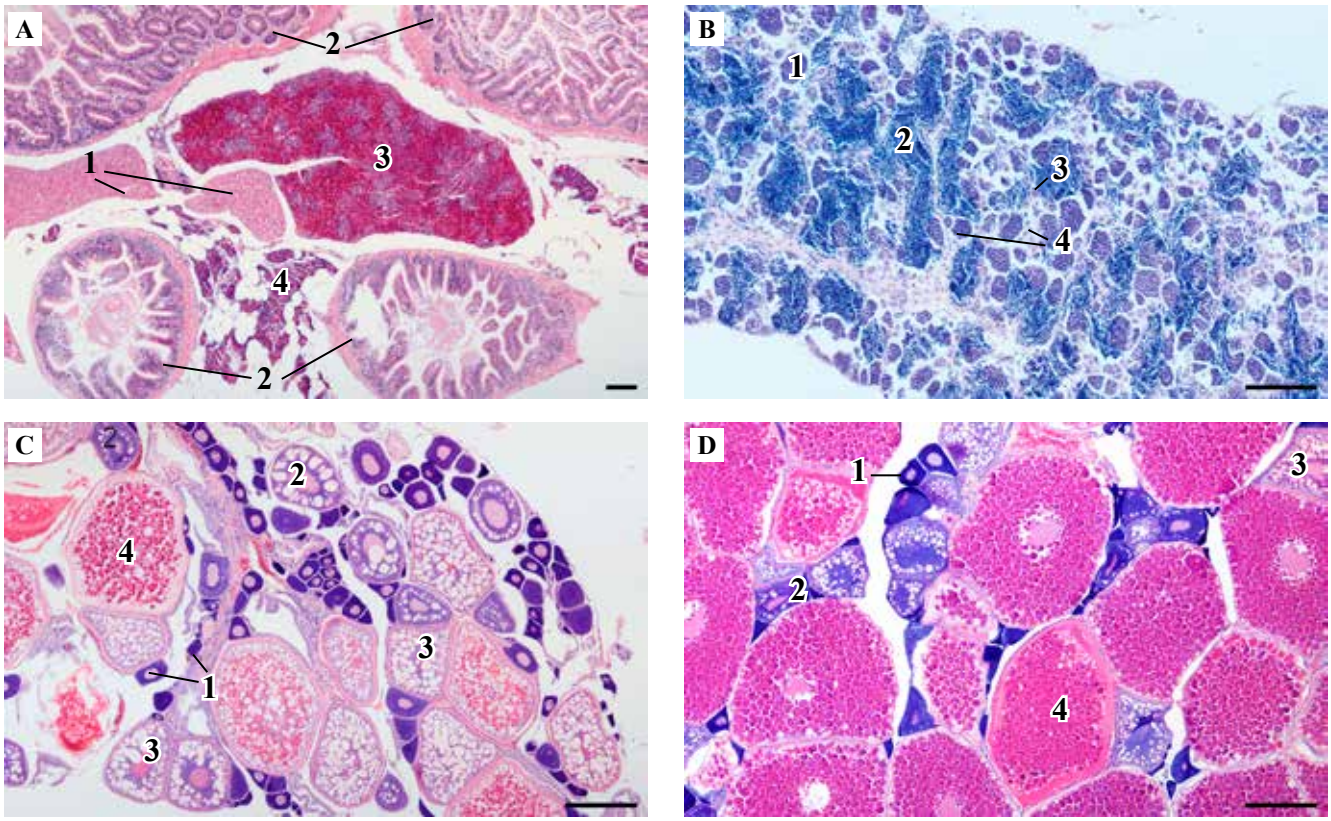


Рис. 5. Сагиттальный срез органов брюшной полости *Danio rerio.*
А – органы брюшной полости самца, ×4. B – гонады самца, ×10. C – гонады самки после нереста, ×10. D – гонады самки до нереста, ×10. Окрашивание гематоксилином и эозином. Масштабные отрезки 100 мкм
A: 1 – печень, 2 – кишечник, 3 – селезенка, 4 – поджелудочная железа
B: 1 – сперматоциты, 2 – сперматозоиды, 3 – сперматогонии, 4 – базальная мембрана и соединительнотканный листок
C: 1 – ооцит первого порядка, 2 – стадия кортикальных альвеол, 3 – стадия вителлогенеза, 4 – зрелый ооцит
D: 1 – ооцит первого порядка, 2 – стадия кортикальных альвеол, 3 – стадия вителлогенеза, 4 – зрелый ооцит

Fig. 5. *Danio rerio* internal organs sagittal section.
A – male internal organs, ×4. B – male gonads, ×10. C – female gonads after spawning, ×10. D – female gonads before spawning, ×10. H&E stain. Scale bar 100 μm
A: 1 – liver, 2 – intestines, 3 – spleen, 4 – pancreas
B: 1 – spermatocytes, 2 – spermatozoa, 3 – spermatogonia, 4 – basement membrane and connective tissue layer
C: 1 – primary oocyte, 2 – cortical alveoli stage, 3 – vitellogenesis, 4 – mature oocyte
D: 1 – primary oocyte, 2 – cortical alveoli stage, 3 – vitellogenesis, 4 – mature oocyte

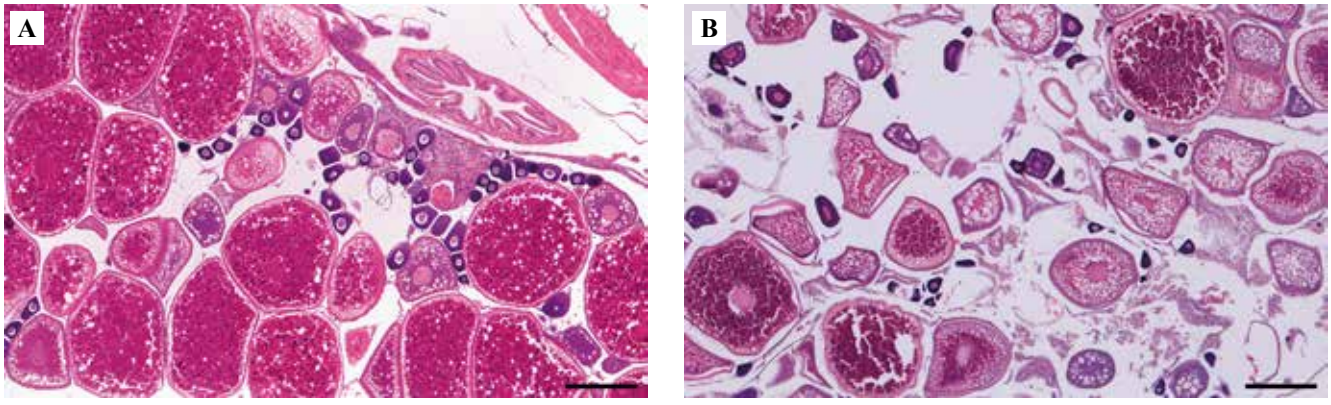


Рис. 6. Сагиттальный срез органов брюшной полости *Danio rerio*.
А – гонады самки до нереста после фиксации 10% NBF. B – гонады самки до нереста после фиксации раствором Буэна. Окрашивание гематоксилином и эозином. Масштабные отрезки 100 мкм

Fig. 6. *Danio rerio* sagittal section of internal organs.
A – female gonads before spawning after fixation with 10% NBF. B – female gonads after fixation with Bouin fixative. H&E stain. Scale bar 100 μm

новорожденных мышат (предпочтительная фиксация раствором Дэвидсона). Эти протоколы были опробованы нами и используются в рутинных исследованиях на таких малых объектах как яичники [21] и фрагменты диафрагмы мышей [22]. При работе с крупными объектами, такими как мозг взрослой мыши и эмбрионы мыши со стадии e15.5, личинки от 8 см длиной и поперечные срезы взрослой особи миноги *Lampetra fluviatilis*, также получены удовлетворительные результаты (данные готовятся к публикации). В этом случае экспериментально определенное время выдержки в спиртах составляет от 30 до 40 минут. Мы предполагаем, что полученные нами протоколы могут являться универсальными и требовать незначительных изменений на этапе дегидратации при работе с широким спектром биологических объектов.

Заключение

Таким образом, оптимальным фиксатором для любых образцов *Danio rerio* является 10% нейтральный забуференный формалин, однако в случае исследования брюшной полости половозрелых самок до нереста лучше использовать фиксатор Дэвидсона, препятствующий расслоению ооплазмы зрелых ооцитов и дающий впоследствии более яркое окрашивание гематоксилином и эозином. Если образцы содержат костную ткань, предпочтительна суточная хелатная декальцинация с использованием 0.5М этилендиаминтетрауксусной кислоты pH 8,0. Время выдержки в спиртах варьирует от 30 минут для мягких тканей до 40 минут для образцов, содержащих костную ткань, но следует учитывать, что это актуально для взрослых особей *Danio rerio* (7 месяцев, 3–3,5 см). Время выдержки должно быть изменено и подобрано экспериментально в зависимости от размера особи. В целом, гистологическая проводка с использованием изопропанола и минерального масла показала хорошие результаты и может быть признана эффективной и безопасной альтернативой классической проводке через этанол и ксилол в гистологии рыб.

Вклад авторов
Концепция и дизайн исследования – Ю.П. Байкова, Ю.Ю. Силаева.
Поддержание системы содержания рыб Aquaneering и сбор материала – Д.М. Долматова, В.С. Фадеев, Г.М. Алипер.
Обработка материала – Н.И. Сафонова, Ю.П. Байкова.
Написание текста – Ю.П. Байкова.
Редактирование – Ю.П. Байкова, Ю.Ю. Силаева, В.С. Фадеев.

Author contributions
Conceived the study and designed the experiment – Iu.P. Baikova, Yu.U. Silaeva.
Maintaining the aquatic culture system Aquaneering and material collection – D.M. Dolmatova, V.S. Fadeev, G.M. Aliper.
Collected the data and performed the analysis – N.I. Safonova, Iu.P. Baikova.
Wrote the paper – Iu.P. Baikova.
Edited the manuscript – Iu.P. Baikova, Yu.U. Silaeva, V.S. Fadeev.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Благодарности. Работа по получению гистологических срезов проводилась с использованием приборной базы Института биологии гена РАН, поддержанной Министерством науки и высшего образования Российской Федерации.

Acknowledgments. Histological sections were prepared using facilities and specialized equipment of the Institute of Gene Biology RAS, supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

Литература/References

1. *Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD*. Bancroft's theory and practice of histological techniques. 8th ed. London: Elsevier, 2019. 557 p. DOI: 10.1016/C2015-0-00143-5.
2. *Ulucan A, Yuksel H, Dortbudak MB, Yakut S.* Comparative examination of commonly used some fixatives with routine histochemical staining's for the optimal histological appearance in the gill tissue of zebrafish. Kocatepe Vet J. 2019;12(2):158–67. DOI: 10.30607/kvj.526779.
3. *Amatruda JF, Houart C, Kawakami K, Poss KD.* Zebrafish. Methods and protocols. 3rd ed. New York: Humana, 2024. 361 p. DOI: 10.1007/978-1-0716-3401-1.
4. *Peterson TS, Kent ML, Ferguson JA, Watral VG, Whipps CM.* Comparison of fixatives and fixation time for PCR detection of *Mycobacterium* in zebrafish *Danio rerio.* Dis Aquat Organ. 2013;104(2):113–20. DOI: 10.3354/dao02585.
5. *Moore JL, Aros M, Steudel KG, Cheng KC.* Fixation and decalcification of adult zebrafish for histological, immunocytochemical, and genotypic analysis. Biotechniques. 2002;32(2):296–8. DOI: 10.2144/02322st03.
6. Zebrafish International Resource Center. Fixing zebrafish for histopathology. SOP: Vet-0003, Rev: 1.0 [Internet]. Eugene (OR): Zebrafish International Resource Center; 2009 Jul 13. Available from: https://zebrafish.org/wiki/_media/protocols/health/fixing_zebrafish_for_histopathology.pdf (accessed 28.05.2026).
7. *Evensen Ø, Olesen NJ.* Immunohistochemical detection of VHS virus in paraffin-embedded specimens of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): the influence of primary antibody, fixative, and antigen unmasking on method sensitivity. Vet Pathol. 1997;34(3):253–61. DOI: 10.1177/030098589703400316.
8. *Bunton TE.* The immunocytochemistry of cytokeratin in fish tissues. Vet Pathol. 1993;30(5):418–25. DOI: 10.1177/030098589303000503.
9. *Miki M, Ohishi N, Nakamura E, Furumi A, Mizuhashi F.* Improved fixation of the whole bodies of fish by a double-fixation method with formalin solution and Bouin's fluid or Davidson's fluid. J Toxicol Pathol. 2018;31(3):201–6. DOI: 10.1293/tox.2018-0001.
10. *Dey P.* Basic and advanced laboratory techniques in histopathology and cytology. 2nd ed. Singapore: Springer Singapore, 2022. 340 p. DOI: 10.1007/978-981-19-6616-3.
11. *Copper JE, Budgeon LR, Foutz CA, van Rossum DB, Vanselow DJ, Hubley MJ et al.* Comparative analysis of fixation and embedding techniques for optimized histological preparation of zebrafish. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2018;208:38–46. DOI: 10.1016/j.cbpc.2017.11.003.

12. *Buesa RJ, Peshkov MV.* Histology without xylene. Ann Diagn Pathol. 2009;13(4):246–56. DOI: 10.1016/j.anndiagpath.2008.12.005.
13. *Devendrababu YV, Vikram V, Anandbabu T.* Safer and sustainable alternatives to xylene in histopathology: a comprehensive review. J Appl Toxicol. 2026;46(3):775–92. DOI: 10.1002/jat.70029.
14. *Yadav S, Mallya V, Khurana N*. Xylene-free staining: is it possible and practical? Indian J Pathol Microbiol. 2019;62(2):274–8. DOI: 10.4103/IJPM.IJPM_39_18.
15. *Falkeholm L, Grant CA, Magnusson A, Möller E.* Xylene-free method for histological preparation: a multicentre evaluation. Lab Invest. 2001;81(9):1213–21. DOI: 10.1038/labinvest.3780335.
16. *Darsheny S, Nway Aye S, Krishnappa P, Ravindran R*. Comparative study of microwave oven-assisted tissue processing with isopropanol and mineral oil mixture and propylene glycol methyl ether on morphological quality of tissue sections. IMJM. 2021;20(4):53–7. DOI: 10.31436/imjm.v20i4.1724.
17. CELLINK. Paraffin embedding protocol: version 3 [Internet]. Gothenburg (Sweden): CELLINK; 2023 Mar 28. Available from: https://www.cellink.com/wp-content/uploads/2023/03/Paraffin-Embedding-Protocol_28-Mar-2023.pdf (accessed 28.05.2026).
18. Electron Microscopy Sciences. EMS Rapid Pro Processing System. Protocol: paraffin manual processing for fresh and pre-treated tissue: instructional manual, Cat. #26750 Series [Internet]. Hatfield (PA): Electron Microscopy Sciences. Available from: https://www.emsdiasum.com/docs/technical/manuals/26750-paraffin.pdf (accessed 28.05.2026).
19. *Malatesta M.* Histological and histochemical methods – theory and practice. Eur J Histochem [Internet]. 2016;60(1). DOI: 10.4081/ejh.2016.2639.
20. *Chang Z, Chen PY, Chuang YJ, Akhtar R.* Zebrafish as a model to study bone maturation: nanoscale structural and mechanical characterization of age-related changes in the zebrafish vertebral column. J Mech Behav Biomed Mater. 2018;84:54–63. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2018.05.004.
21. *Kuznetsova NA, Kochegarova KK, Baikova IP, Korshunov EN, Ilchuk LA, Kubekina MV et al.* Ubiquitous expression of *mPolg*^{mut} leads to the accumulation of cytotoxic CD8+ T lymphocytes in young mice. Life. 2025;15(12):1863. DOI: 10.3390/life15121863.
22. *Baikova IP, Ilchuk LA, Safonova PD, Varlamova EA, Okulova YD, Kubekina MV et al.* Two novel mouse models of Duchenne muscular dystrophy with similar Dmd exon 51 frameshift mutations and varied phenotype severity. Int J Mol Sci. 2024;26(1):158. DOI: 10.3390/ijms26010158.

Информация об авторах

Наталья Ибрагимовна Сафонова – гистотехник Центра коллективного пользования «Геномное редактирование» Института биологии гена РАН.

Дарья Михайловна Долматова – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории факторов транскрипции Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

Виталий Сергеевич Фадеев – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории факторов транскрипции Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

Глеб Миронович Алипер – старший лаборант лаборатории факторов транскрипции Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

Юлия Юрьевна Силаева – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Центра коллективного пользования «Геномное редактирование» Института биологии гена РАН.

Юлия Павловна Байкова – кандидат биологических наук, научный сотрудник, гистолог Центра коллективного пользования «Геномное редактирование» Института биологии гена РАН.

Author information

Natalia I. Safonova – Histotechnician, Core Facility Center “Genome Editing,” Institute of Gene Biology.
https://orcid.org/0009-0004-5992-3878

Daria M. Dolmatova – Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Laboratory of Transcription Factors, Engelhardt Institute of Molecular Biology.
https://orcid.org/0000-0002-8396-2672

Vitaliy S. Fadeev – Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Laboratory of Transcription Factors, Engelhardt Institute of Molecular Biology.
https://orcid.org/0009-0007-0909-0427

Gleb M. Aliper – Senior Laboratory Assistant, Laboratory of Transcription Factors, Engelhardt Institute of Molecular Biology.
https://orcid.org/0009-0003-2711-4737

Yulia Yu. Silaeva – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Core Facility Center “Genome Editing,” Institute of Gene Biology.
https://orcid.org/0000-0003-2070-9001

Iuliia P. Baikova – Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Histologist, Core Facility Center “Genome Editing,” Institute of Gene Biology.
https://orcid.org/0000-0002-1901-3640