



МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119070** (13) **U**
(51) МПК
C12N 15/10 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2017 02817	(72) Винахідник(и): Москаленко Роман Андрійович (UA), Піддубний Артем Михайлович (UA), Романюк Анатолій Миколайович (UA)
(22) Дата подання заявки: 27.03.2017	(73) Власник(и): СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, 40007 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 11.09.2017	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 11.09.2017, Бюл.№ 17	

(54) СПОСІБ ВИДІЛЕННЯ ІНТРАЛЮМІНАЛЬНИХ ВКЛЮЧЕНЬ ЗАЛОЗ ПРОСТАТИ З ПАРАФІНОВИХ ГІСТОЛОГІЧНИХ БЛОКІВ

(57) Реферат:

Спосіб виділення інтралюмінальних включень залоз простати, який включає відбір біологічного матеріалу, інкубацію у фосфатному буфері та відокремлення цільового продукту, причому відбір біологічного матеріалу виконують шляхом одержання із парафінового блока тканин простати на мікромомі гістологічних зрізів тканин, які потім підготовлюють гістологічним методом, переносять їх на предметне скельце та здійснюють депарафінізацію при кімнатній температурі шляхом поетапної відмивки від парафіну із використанням ксилолу та етилового спирту, при цьому предметне скельце з гістологічними зрізами тканин простати витримують два рази у ксилолі протягом 5 хвилин, після чого проводять двократну промивку зрізів 96 % етиловим спиртом впродовж 10 хвилин для кожної промивки і двократну промивку зрізів у 70 % етиловому спирті протягом 2 хвилин, потім занурюють у порцію дистильованої води 2 рази впродовж 2 хвилин, після цього предметні скельця з гістологічними зрізами інкубують впродовж 10 хвилин у фосфатному буфері, а потім за допомогою тонкого пінцета здійснюють відокремлення гістологічного зрізу простати від предметного скельця, а вміст залоз простати, який залишається на предметному скельці, збирають за допомогою стерильного скальпеля в пробірку.

UA 119070 U

Корисна модель належить до галузі медицини та біології, а саме до патологічної анатомії, урології, патологічної фізіології, гістології та може бути використана для аналізу білків за допомогою мас-спектрометрії, вестерн-блоту та дот-блоту, вивчення структури включень за допомогою скануючої, просвічуючої електронної та атомної силової мікроскопії.

5 Відомий спосіб виділення зразків інтралюмінального вмісту залоз простати для проведення експериментальних та клінічних досліджень, який включає послідовно проведені стадії, а саме розрізання і макроскопічне дослідження простати, виділення з протокової системи залоз видимих простатолітів та амілоїдних тілець за допомогою стерильних пінцетів або щипців, переміщення простатолітів та амілоїдних тілець у ємність з стерильним фосфатним буфером, проціджування зазначеного розчину через нейлоновий сітчастий фільтр для збору простатичних включень (див. статтю Sfanos et al. Acute inflammatory proteins constitute the organic matrix of prostatic corpora amyloacea and calculi in men with prostate cancer. PNAS. 2009; 106 (9):3443-48).

Даний спосіб є найбільш близьким по суті та результатам, які досягаються, тому його обрано за прототип.

15 Однак недоліком прототипу є те, що за допомогою цього способу можливо дослідження лише великих простатолітів і амілоїдних тілець простати та лише під час макроскопічного дослідження.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу виділення інтралюмінальних включень залоз простати, таких як простатоліти, амілоїдні тілця з парафінових гістологічних блоків шляхом відмінностей при заборі матеріалу та виділення вмісту залоз, що дозволяє досліджувати дрібні об'єкти, ефективно виділяти білок для дослідження, виконувати дослідження в будь-який зручний час впродовж тривалого часового проміжку (відповідає часу зберігання парафінових блоків).

20 Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі виділення інтралюмінальних включень простати, який включає відбір біологічного матеріалу, інкубацію у фосфатному буфері та виділення цільового продукту, згідно з корисною моделлю, відбір біологічного матеріалу виконують шляхом одержання із парафінового блока тканин простати на мікромомі гістологічних зрізів тканин, які потім підготовлюють гістологічним методом, переносять на предметні скельця та здійснюють депарафінізацію при кімнатній температурі шляхом поетапної відмивки парафіну із використанням ксилолу та етилового спирту, при цьому предметні скельця з гістологічними зрізами тканин простати витримують два рази у ксилолі протягом 5 хвилин, після чого проводять двократну промивку зрізів 96 % етиловим спиртом впродовж 10 хвилин для кожної промивки і двократну промивку зрізів у 70 % етиловому спирті протягом 2 хвилин, потім занурюють у порцію дистильованої води 2 рази впродовж 2 хвилин, після чого предметні скельця з гістологічними зрізами інкубують впродовж 10 хвилин у фосфатному буфері, а потім за допомогою тонкого пінцета здійснюють відокремлення гістологічного зрізу від предметного скельця, а вміст залоз простати, який залишається на предметному скельці, збирають за допомогою стерильного скальпеля у пробірку.

Використання заявленого способу з усіма суттєвими ознаками, включаючи відмінні, дозволяє досліджувати дрібні об'єкти, ефективно виділяти білок для широкого спектру досліджень із включень просвіту залоз простати впродовж всього часу зберігання парафінового блока тканини.

45 Запропонований спосіб є детальним та точним, дозволяє отримати якісні біологічні зразки для мас-спектрометрії, вестерн-блоту та дот-блоту, скануючої, просвічуючої електронної та атомної силової мікроскопії. Отримані на мікромомі гістологічні зрізи дають можливість проаналізувати банк зразків парафінових блоків тканин з архівів патологоанатомічних відділень і бюро та вибірково досліджувати інтралюмінальний вміст залоз простати впродовж тривалого часу спостереження, особливо у випадку злоякісних пухлин, парафінові блоки яких зберігаються 25 років. Виділення інтралюмінальних включень простати завжди здійснюється після стандартного гістологічного дослідження, тому дослідник вже точно знає про наявність у гістологічних зрізах матеріалу для виділення. Депарафінізація гістологічних зрізів дозволяє видалити парафін з тканин, відмивання у дистильованій воді та фосфатному буфері сприяє очищенню гістологічних зрізів від домішок і дрібного сміття. Інкубація гістологічних зрізів у фосфатному буфері сприяє легкому відокремленню тканини від предметного скельця. Проведення всіх маніпуляцій на предметному скельці значно полегшує збір матеріалу до пробірки. Всі зазначені маніпуляції дозволяють отримати досліджуваний матеріал з низьким відсотком втрат та механічного uszkodження.

Спосіб здійснюється таким чином.

60 Приклад. Відбір біологічного матеріалу проводиться з вибраних парафінових гістологічних блоків тканин простати людини, в яких після гістологічного дослідження уже виявлені

інтралюмінальні включення. Для дослідження були відібрані 40 парафінових блоків, які зберігалися в архіві філії Сумського патологоанатомічного бюро впродовж 1-2 років. З кожного парафінового блока на мікромомі було отримано 3-4 зрізи товщиною 10-15 мкм, які були перенесені на предметне скельце.

5 Проводять депарафінізацію підготовлених гістологічних зрізів при кімнатній температурі шляхом поетапної відмивки зрізів тканин від парафіну із використанням ксилолу та етилового спирту. Гістологічні зрізи тканини простати на предметному скельці витримують у ксилолі (100 мл) протягом 5 хвилин два рази. Після проводять двократну промивку зрізів 96 % етиловим спиртом (100 мл) впродовж 10 хвилин для кожної промивки, потім 70 % етиловим спиртом (100 мл) впродовж 2 хвилин 2 рази, потім занурюють у порцію дистильованої води (100 мл) впродовж 2 хвилин 2 рази. Після цього предметні скельця з гістологічними зразками інкубують впродовж 10 хв. у фосфатному буфері (100 мл).

10 За допомогою тонкого пінцета здійснюють відокремлення гістологічного зрізу тканини простати від предметного скельця, а вміст залоз простати, які залишаються на предметному скельці збирають за допомогою стерильного скальпеля в пробірку типу "Еппендорф" для подальших досліджень.

15 Таким чином, спосіб дозволяє досліджувати дрібні об'єкти, ефективно виділяти білок для широкого спектра досліджень із включень просвіту залоз простати впродовж всього часу зберігання парафінового блока тканини, є детальним і точним, дозволяє отримувати якісні біологічні зразки для мас-спектрометрії, вестерн-блоту та дот-блоту, скануючої, просвічуючої електронної та атомної силової мікроскопії.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

25 Спосіб виділення інтралюмінальних включень залоз простати, який включає відбір біологічного матеріалу, інкубацію у фосфатному буфері та відокремлення цільового продукту, який **відрізняється** тим, що відбір біологічного матеріалу виконують шляхом одержання із парафінового блока тканин простати на мікромомі гістологічних зрізів тканин, які потім підготовлюють гістологічним методом, переносять їх на предметне скельце та здійснюють

30 депарафінізацію при кімнатній температурі шляхом поетапної відмивки від парафіну із використанням ксилолу та етилового спирту, при цьому предметне скельце з гістологічними зрізами тканин простати витримують два рази у ксилолі протягом 5 хвилин, після чого проводять двократну промивку зрізів 96 % етиловим спиртом впродовж 10 хвилин для кожної промивки і двократну промивку зрізів у 70 % етиловому спирті протягом 2 хвилин, потім

35 занурюють у порцію дистильованої води 2 рази впродовж 2 хвилин, після цього предметні скельця з гістологічними зрізами інкубують впродовж 10 хвилин у фосфатному буфері, а потім за допомогою тонкого пінцета здійснюють відокремлення гістологічного зрізу простати від предметного скельця, а вміст залоз простати, який залишається на предметному скельці, збирають за допомогою стерильного скальпеля в пробірку.

40

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601