



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **149052** (13) **U**

(51) МПК (2021.01)

G01N 1/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2021 02516	(72) Винахідник(и): Гринцова Наталія Борисівна (UA), Романюк Анатолій Миколайович (UA), Линдін Микола Сергійович (UA)
(22) Дата подання заявки: 13.05.2021	(73) Володілець (володільці): СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Римського-Корсакова, буд. 2, м. Суми, 40007 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 14.10.2021	(74) Представник: ГУДКОВ СЕРГІЙ МИКОЛАЙОВИЧ
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 13.10.2021, Бюл.№ 41	

(54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ ГІСТОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ ГІПОФІЗА ЩУРІВ ДЛЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ МОРФОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

(57) Реферат:

Спосіб виготовлення гістологічних препаратів гіпофіза щурів для експериментальних морфологічних досліджень включає вилучення гіпофіза, фіксацію розчином нейтрального формаліну, зневоднення в батареї спиртів, ущільнення парафіном, виготовлення зрізів, забарвлення їх гематоксилін-еозином і покривання середовищем. Гіпофіз у невідокремленому стані від гіпофізарної ямки турецького сідла клиноподібної кістки в комплексі разом з прилеглими до нього фрагментами кісткової тканини вилучають єдиним блоком. Фіксацію блока проводять 5 % розчином нейтрального формаліну з додаванням до розчину фосфат-сольового буферу (Phosphate buffered saline (PBS), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl), з подальшим вилученням гіпофізу через 15-18 годин від початку фіксації з гіпофізарної ямки турецького сідла та продовженням фіксації вилученого гіпофіза протягом 2-3 годин.

UA 149052 U

Корисна модель належить до гістології, цитології, ембріології, нормальної анатомії та нормальної фізіології, патологічної анатомії та фізіології і може бути використана при проведенні експериментальних морфологічних досліджень для приготування якісних постійних гістологічних препаратів гіпофіза щурів та інших гризунів для гістологічних, органометричних, морфометричних та імуногістохімічних методів дослідження.

Питання якісного приготування гістологічних препаратів є актуальним питанням гістології та патологічної анатомії, експериментальної медицини та біології. Гіпофіз належить до найменших за масою та розмірами ендокринних залоз як у людини, так і у тварин, він є залозою внутрішньої секреції, займає одне з центральних місць в ендокринній регуляції життєдіяльності організму. Дослідження даного органа лабораторних щурів допомагає встановити токсичність ліків, отрут, проводити наукові дослідження по ендокринології, біохімії, зокрема, біологічну стандартизацію гормональних препаратів. Гіпофіз розташований біля основи головного мозку в турецькому сідлі (гіпофізарній ямці) клиноподібної кістки черепа і тісно пов'язаний анатомічно і функціонально з гіпоталамічною ділянкою мозку гіпофізарною (інфундибулярною) ніжкою - виступом III шлуночка. Гіпофіз складається з двох часток (аденогіпофіза та нейрогіпофіза), що мають різне ембріональне походження [1]. Аденогіпофіз має в розрізі буро-червоне забарвлення, що обумовлено наявністю у паренхімі великої кількості судин. Проміжна частина гіпофіза у щурів анатомічно виражена слабо, має вигляд звуженої ділянки поряд з нейрогіпофізом. Нейрогіпофіз в розрізі має жовтуватий колір, що обумовлене наявністю пігменту. Аденогіпофіз за розмірами значно превалює над нейрогіпофізом, покриваючи його з трьох боків [2]. Наявність в гіпофізі щурів тонкої сполучнотканинної капсули та порожнини гіпофіза робить цю залозу вразливою під час вилучення органа з ямки турецького сідла, так як існує високий ступінь вірогідності роз'єднання органа на фрагменти та відокремлення аденогіпофіза від нейрогіпофіза.

Відомі способи приготування гістологічних препаратів з гіпофізу щурів [3, 4], які не гарантують раціонального препарування та атравматичного відділення гіпофіза з гіпофізарної ямки турецького сідла внаслідок того, що у вказаних методиках для видалення гіпофіза використовувалася гостра препарувальна голка [3] або спеціальна лопаточка [4].

Найбільш близьким способом, вибраним за найближчий аналог, є спосіб приготування гістологічних препаратів з гіпофізу щурів [5], який включає відокремлення кісткового ложа (поглиблення турецького сідла) разом з гіпофізом від клиноподібної кістки з подальшим вилученням гіпофіза з гіпофізарної ямки турецького сідла, занурення гіпофіза у фіксуєчий розчин 10 % формаліну, зневоднення в батареї спиртів, ущільнення парафіном, виготовлення зрізів товщиною 5-7 мкм, забарвлення препаратів гематоксилін-еозином.

Недоліком цього способу є ймовірність пошкодження тканин гіпофіза під час проведення виділення органа, використання 10 % незабуференого розчину нейтрального формаліну для фіксації органа, що знижує базифілію цитоплазми та ядра і унеможливує фіксацію кислих білків і проведення в подальшому імуногістохімічних реакцій. Всі недоліки в комплексі не лише призводять до появи у гістологічних препаратах гіпофіза артефактів, механізм утворення яких різний та може бути пов'язаний як з порушенням цілісності органа, так і появою морфологічних картин, трактування яких може призвести до хибних, помилкових висновків.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення першого (вилучення) та другого (фіксація) етапів виготовлення гістологічних препаратів гіпофізу щурів для світлооптичних досліджень, при якому зменшується вірогідність пошкодження, роз'єднання, зайвого ущільнення органа, зменшення базифілії цитоплазми та ядра і стає можливою фіксація кислих білків.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі виготовлення гістологічних препаратів гіпофіза щурів для експериментальних морфологічних досліджень, що включає вилучення гіпофізу, фіксацію розчином нейтрального формаліну, зневоднення в батареї спиртів, ущільнення парафіном, виготовлення зрізів, забарвлення препаратів гематоксилін-еозином, покривання зрізів середовищем, згідно з корисною моделлю, гіпофіз у невідокремленому стані від гіпофізарної ямки турецького сідла клиноподібної кістки, в комплексі разом з прилеглими до нього фрагментами кісткової тканини вилучають єдиним блоком, і фіксацію блоку проводять 5 % розчином нейтрального формаліну з додаванням до розчину фосфат-сольового буферу (Phosphate buffered saline (PBS), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl), з подальшим вилученням гіпофізу через 15-18 годин від початку фіксації з гіпофізарної ямки турецького сідла та продовженням фіксації вилученого гіпофіза протягом 2-3 годин.

Використання способу, що заявляється, з усіма суттєвими ознаками, включаючи відмінні, дає можливість уникнути травматизації, роз'єднання та ущільнення органа, зменшення базифілії цитоплазми та ядра у клітинах гіпофіза, отримати якісні постійні гістологічні препарати гіпофіза без порушення цілісності структурних компонентів органа, з збереженням цитохімічних

показників клітин для подальших світлооптичних морфологічних, морфометричних та імуногістохімічних експериментальних досліджень. Вказаний спосіб запобігає утворенню розривів капсули та паренхіми органа, в тому числі і мікроскопічних, перешкоджає роз'єднанню органа на частини та появі артефактів у мікроскопічних препаратах.

5 Суть корисної моделі пояснюється кресленнями, де на фіг. 1 показано гіпофіз в кістковому ложі (гіпофізарній ямці турецького сідла) разом з фрагментами клиноподібної кістки; на фіг. 2
показано фіксацію гіпофіза в кістковому ложі разом з фрагментами клиноподібної кістки,
10 шляхом занурення у 5 % забуферений розчин нейтрального формаліну; на фіг. 3 показано процес вилучення гіпофізу з ямки турецького сідла після фіксації у 5 % забуференому розчині нейтрального формаліну протягом 15-18 годин; на фіг. 4 показано зафіксований гіпофіз після вилучення з ямки турецького сідла клиноподібної кістки; на фіг. 5 показано якісний постійний гістологічний препарат гіпофіза статевозрілого щура (забарвлення гематоксилін-еозином і збільшення $\times 100x$).

Спосіб здійснюють наступним чином.

15 В гіпофізарній ямці 2 турецького сідла клиноподібної кістки ідентифікують гіпофіз 1, покритий мозковою оболонкою. Гіпофіз 1 вилучають у невідокремленому стані від гіпофізарної ямки 2 турецького сідла клиноподібної кістки, в комплексі розмірами 1,3 \times 1,0 см разом з прилеглими до нього фрагментами кісткової тканини (фіг. 1). Фіксацію гіпофіза проводять безпосередньо після вилучення комплексу шляхом занурення у 5 % забуферений розчин
20 нейтрального формаліну з рН фіксованим у діапазоні 7,0-7,6 [6] (фіг. 2). Нейтральний забуферений розчин формаліну виготовляють шляхом додавання до 100,0 мл 5 % розчину нейтрального формаліну готового фосфат-сольового буферу (Phosphate buffered saline, PBS) у таблетованій формі - 1 таблетка. Даний фосфатний буфер містить у необхідних співвідношеннях $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ і NaCl . Об'єм фіксуючої рідини перевищує об'єм матеріалу у 10-15 разів. Нейтральний забуферений розчин формаліну швидко проникає в
25 тканини, а потім повільно її фіксує. Формалін особливо добре фіксує маленькі молекули, такі як гормони, що особливо важливо при фіксації ендокринної залози-гіпофіза. Використання нейтрального забуференого формаліну зниженої концентрації дозволяє в подальшому, окрім фарбування препаратів гіпофізу гематоксилін-еозином, застосовувати гістохімічні методи
30 дослідження, зокрема імуногістохімічні. Для поліпшення проникнення в тканини гіпофіза 1 фіксуючої рідини та зменшення часу фіксації матеріалу, через 15-18 годин від початку фіксації комплекс тимчасово виймають з фіксатора і вилучають гіпофіз 1 з гіпофізарної ямки 2 турецького сідла (фіг. 3). При цьому, орган має добре зафіксовану та дещо ущільнену капсулу 3, що запобігає зайвій травматизації та фрагментації органа під час вилучення. Потім вилучений гіпофіз 1 знову занурюють у свіжовиготовлений розчин 5 % нейтрального забуференого
35 формаліну. Час фіксації об'єкта 2-3 години. Після закінчення терміну фіксації гіпофіз 1 має добре зафіксовану структуру та підлягає наступним стандартним етапам виготовлення постійних гістологічних препаратів (фіг. 4). Після фіксації гіпофіз 1 вилучають з розчину формаліну та впродовж 20 хвилин промивають у проточній воді для звільнення його від залишків фіксатора. Зневоднюють традиційним способом - в спиртах висхідної концентрації, починаючи з 70 %, з подальшим просяканням хлороформом та сумішшю хлороформ-парафіну. Процес відбувається у автоматичному пристрої АТ-6 карусельного типу. Тривалість процесу зневоднення 20 годин. Після зневоднення проводять ущільнення матеріалу парафіном. Для цього гіпофіз 1 переноситься у першу порцію хлороформу на 30 хв., потім у другу порцію
45 хлороформу на 60 хв., потім у суміш хлороформ-парафін у термостат на 30 хв. при 37 °С. Вища температура суміші хлороформ-парафін призводить до "перепалювання матеріалу" та появі у препаратах артефактів. Подальше просякання гіпофізу 1 парафіном відбувається у термостаті при температурі 56 °С. Застосовують дві порції парафіну, що зумовлене необхідністю повного вивільнення об'єкта від хлороформу, домішки якого змінюють пластичність парафіну, роблять його крихким, що в подальшому ускладнює отримання гістологічних зрізів та призводить до виникнення артефактів на цьому етапі виготовлення препаратів. У першій порції парафіну об'єкт знаходиться у термостаті при температурі 56 °С протягом 36 хв., у другій порції парафіну - при температурі 56 °С протягом 60 хв. Виготовлення парафінових блоків відбувається шляхом
50 викладання у спеціальну формочку просякнутого парафіном гіпофізу, який заливають розплавленим у термостаті при температурі 56-57 °С парафіном. Після заливки парафіном, весь блок швидко охолоджують у холодній воді та монтують на дерев'яний брусок. Виготовлення зрізів відбувається за допомогою ротаційного механічного мікротома з товщиною леза мікротомного ножа від 3 до 5 мкм та подальшим монтуванням зрізів на попередньо підготовлені предметні скельця переважно вологим способом. Парафінові зрізи гіпофіза перед
60 забарвленням звільняють від парафіну за допомогою 2-х змін порцій ксилолу, в кожній із котрих

об'єкт перебував протягом 3-5 хв. Після розчинення парафіну препарати переносять у 96 % спирт на 5 хв. з подальшим промиванням у двох змінах водопровідної води. Для забарвлення препаратів гіпофіза 1 використовують стандартний розчин гематоксилін-еозину фабричного виготовлення. Покривання зрізів середовищем проводять після якісного просвітлення зрізів.

5 Препарати гіпофіза 1 по черзі занурюють у дві зміни порцій 96 % спирту, в кожній з яких об'єкт перебуває протягом 1 хв. та 3 хв. відповідно. В подальшому препарати переносять у дві зміни карбол-ксилолу, в яких об'єкти перебувають 5 хв. та 3 хв. відповідно з подальшим перенесенням на 3 хв. у ксилол. Після просвітлення гістологічні препарати покривають полістиролом та укладають під покривні скельця.

10 Таким чином, на гістологічних препаратах гіпофіза 1 щурів збережена цілісність сполучнотканинної капсули 3 органа, паренхіми залози, цілісність зв'язку всіх анатомічних складових гіпофіза: капсула 3, аденогіпофіз 4, дистальна частка аденогіпофіза 5, проміжна частка аденогіпофіза 6, порожнина гіпофіза 7, нейрогіпофіз 8 (фіг. 5).

15 За допомогою запропонованого способу Сумським державним університетом проведено близько 200 досліджень гіпофіза у щурів, виготовлені якісні гістологічні препарати, без порушень цілісності органа, придатні для гістологічних, органометричних та імуногістохімічних досліджень, що дозволило провести комплексне дослідження морфологічних особливостей залози (стромального, паренхіматозного та судинного компонентів), провести імуногістохімічне дослідження.

20 Запропонований спосіб вилучення гіпофіза дає змогу уникнути зайвої травматизації та ущільнення органа, в подальшому отримати якісні гістологічні препарати, без порушення цілісності органа та артефактів. Це дозволило в подальшому, при мікроскопічному дослідженні, провести достатньо точно органометричне дослідження органа (вимірювання довжини та ширини), провести дослідження строми, паренхіми, судинного русла гіпофіза, а також мати

25 змогу дослідити тісний зв'язок між структурними компонентами гіпофіза.
Джерела інформації:
1. Зербіно Д.Д., М.М. Багрій, Боднар Я.Я. Патоморфологія та гістологія (атлас)/ Д.Д. Зербіно [та ін.] - Вінниця: Нова Книга, 2016.

30 2. Чумаченко О.Ю. Анатомія гіпофізів щурів у віковому аспекті в екологічно несприятливих умовах /О.Ю. Чумаченко, О.Г. Редька//Питання біоіндикації та екології. - 2015. - № 1(20). - С. 187-193.

3. Кащенко С.А. Спосіб препарування гіпофіза у щурів / С.А. Кащенко, І.В. Бобришева, Д.П. Татаренко, А.О. Бобришева // ПУ № 81424 від 25.06.2013. - Бюл. № 12.

35 4. Смирнов С.М. Модифікований спосіб препарування гіпофіза у білих лабораторних щурів/Смирнов С.М., Дубова Г.А., Дубова Ю.М, Татаренко Д.П. // ПУ № 88650 від 25.03.2014. - Бюл. № 6.

5. Елизарова О.Н., Жидкова Л.В., Кочеткова Т.А. Пособие по токсикологии для лаборантов, М., "Медицина", 1974. - С. 149-157.

40 6. Иммуногистохимические методы: Руководство/Ed. by George L. Kumar, Lars Rudbeck.: ДАКО/Пер. с англ. под ред. Г.А. Франка и П.Г. Малькова. - М., 2011. - 224 с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

45 Спосіб виготовлення гістологічних препаратів гіпофіза щурів для експериментальних морфологічних досліджень, який включає вилучення гіпофіза, фіксацію розчином нейтрального формаліну, зневоднення в батареї спиртів, ущільнення парафіном, виготовлення зрізів, забарвлення їх гематоксилін-еозином і покривання середовищем, який **відрізняється** тим, що гіпофіз у невідокремленому стані від гіпофізарної ямки турецького сідла клиноподібної кістки, в комплексі разом з прилеглими до нього фрагментами кісткової тканини, вилучають єдиним

50 блоком, і фіксацію блока проводять 5 % розчином нейтрального формаліну з додаванням до розчину фосфат-сольового буферу (Phosphate buffered saline (PBS), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl), з подальшим вилученням гіпофізу через 15-18 годин від початку фіксації з гіпофізарної ямки турецького сідла та продовженням фіксації вилученого гіпофіза протягом 2-3 годин.

图 2

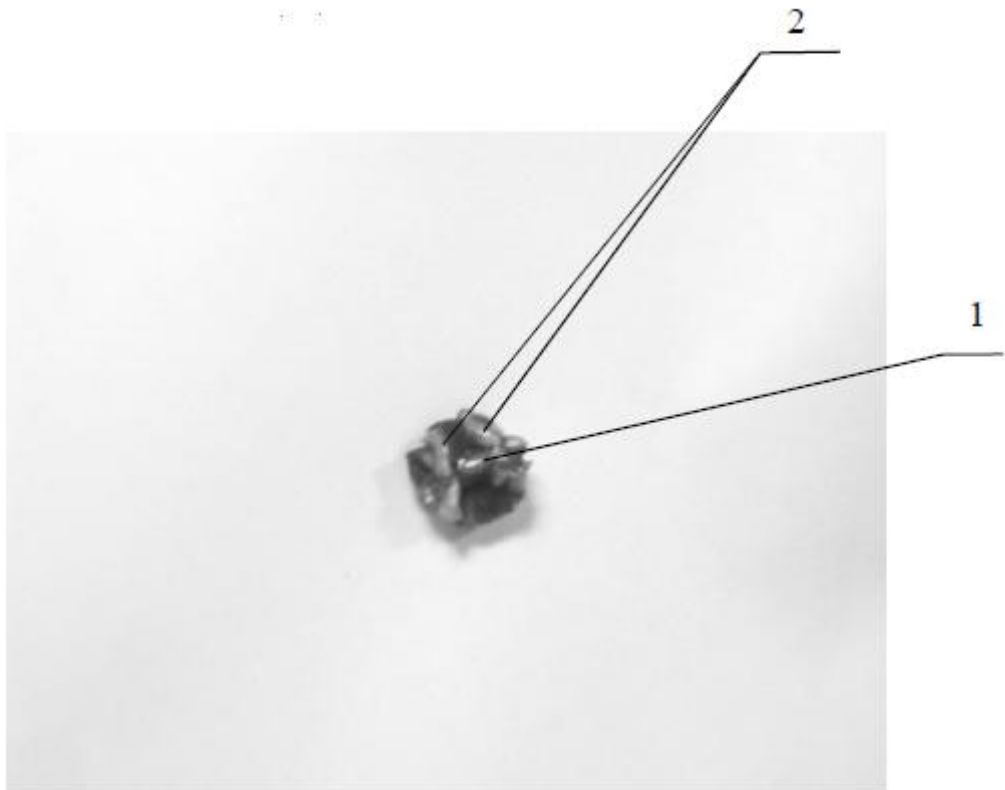
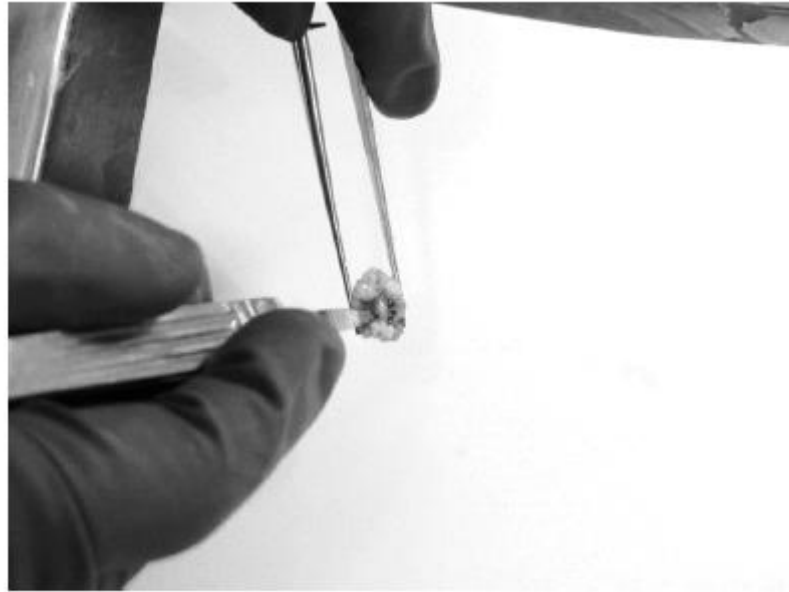


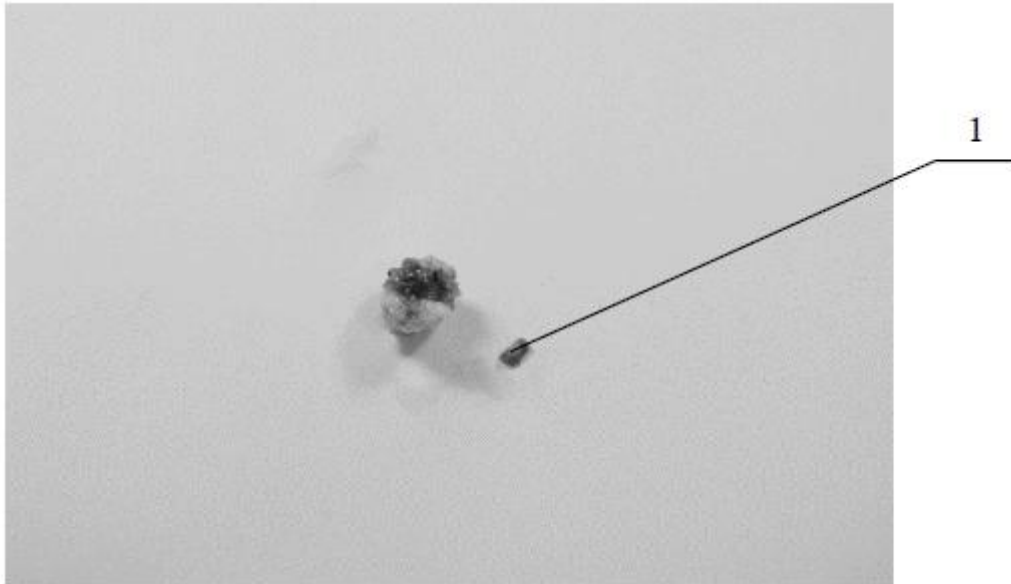
Fig. 1



Fig. 2



Φir. 3



Φir. 4

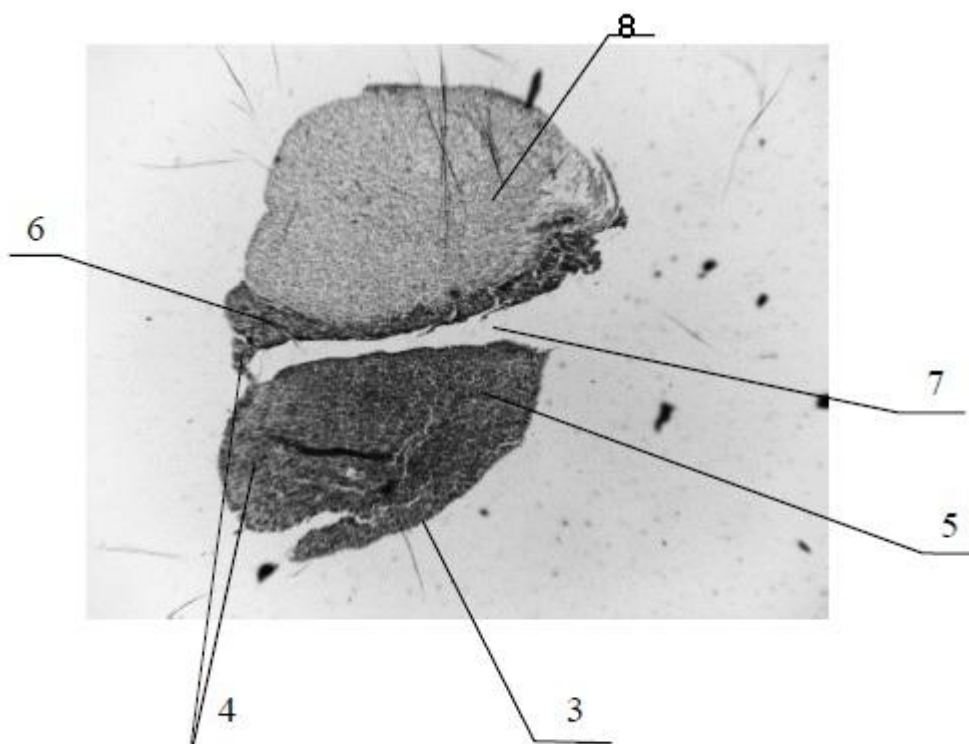


Fig. 5