



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **142314** (13) **U**
(51) МПК (2020.01)
G01N 1/00

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

| | |
|--|---|
| <p>(21) Номер заявки: u 2019 12202</p> <p>(22) Дата подання заявки: 24.12.2019</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.05.2020</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.05.2020, Бюл.№ 10</p> | <p>(72) Винахідник(и): Гринцова Наталія Борисівна (UA), Романюк Анатолій Миколайович (UA), Линдін Микола Сергійович (UA), Линдіна Юлія Миколаївна (UA)</p> <p>(73) Власник(и): СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, 40007 (UA)</p> |
|--|---|

(54) МОДИФІКОВАНИЙ СПОСІБ ПРИГОТУВАННЯ ГІСТОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ ЕПІФІЗА ЩУРІВ

(57) Реферат:

Модифікований спосіб приготування гістологічних препаратів епіфіза щурів включає вилучення органа, фіксацію розчином нейтрального забуференого формаліну, зневоднення в батареї спиртів, ущільнення парафіном, виготовлення зрізів, забарвлення препаратів гематоксилін-еозином, покривання зрізів середовищем. Вилучення епіфіза проводять єдиним комплексом (блоком) з прилеглою тканиною півкуль головного мозку та прилеглою частиною мозочка дорсальної частини проміжного мозку, для запобігання зайвого ущільнення та зменшення об'єму органа фіксацію залози проводять зниженою концентрацією 5 % розчину 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), для збільшення проникнення фіксуючого розчину до епіфіза та зменшення часу фіксації, через 3-4 години після початку фіксації частково зрізають прилеглі тканини головного мозку з усіх сторін, що оточують епіфіз.

UA 142314 U

Корисна модель належить до галузі експериментальної медицини та біології, а саме гістології, цитології, ембріології, нормальної та патологічної анатомії, і може бути використана для приготування постійних гістологічних препаратів для гістологічних, органометричних, морфометричних та імуногістохімічних методів дослідження.

5 Питання якісного приготування гістологічних препаратів є актуальним питанням гістології та патологічної анатомії, експериментальної медицини. Епіфіз, який займає одно з центральних місць в ендокринній регуляції життєдіяльності організму, належить до найменших за масою та розмірами ендокринних залоз як у людини так і у тварин. Залозу для проведення морфологічних досліджень вилучають єдиним органомкомплексом разом з фрагментами великих півкуль головного мозку та прилеглої частини мозочка в дорсальній частині проміжного мозку і в подальшому використовують для виготовлення постійних гістологічних препаратів. Епіфіз неможливо повністю відокремити від епіталамусу проміжного мозку, не пошкодивши його тонкої структури.

15 Найбільше близьким аналогом є спосіб приготування гістологічних препаратів з епіфізу щурів [11]. Спосіб включає вилучення шишкоподібної залози разом з прилягаючими до неї судинами, занурення у фіксуючий розчин 10 % нейтрального формаліну, зневоднення в батареї спиртів, ущільнення парафіном, виготовлення зрізів товщиною 4 мкм, забарвлення препаратів гематоксилін-еозином.

20 Недоліком цього способу є неможливість в повній мірі збереження тонкої анатомічної та мікроскопічної будови залози, що в свою чергу призводить до появи у гістологічних препаратах епіфіза артефактів, механізм утворення котрих різний та може бути пов'язаний як з порушенням цілісності органу так і появою морфологічних картин, трактування котрих може призвести до хибних, помилкових висновків.

25 В основу корисної моделі, що заявляється, поставлена задача удосконалення першого (вилучення) та другого (фіксація матеріалу) етапів приготування гістологічних препаратів епіфізу щурів, при якому зменшується надлишкове ущільнення органу, запобігання зменшенню об'єму досліджуваного об'єкта, зменшується тривалість приготування гістологічних препаратів епіфіза, отримують якісні постійні гістологічні препарати епіфіза без порушення цілісності структурних компонентів органу та з збереженням тісного зв'язку епіфіза з судинним сплетінням для подальших морфологічних, морфометричних та імуногістохімічних експериментальних досліджень.

30 Поставлена задача вирішується тим, що у способі приготування гістологічних препаратів епіфіза щурів, що включає вилучення органу, фіксацію, промивання, зневоднення, ущільнення, виготовлення зрізів, забарвлення препаратів, покривання зрізів середовищем, згідно з корисною моделлю, вилучення епіфіза проводять єдиним комплексом (блоком) з прилеглою тканиною півкуль головного мозку та прилеглою частиною мозочка дорсальної частини проміжного мозку, фіксацію залози проводять зниженою концентрацією 5 % розчину 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), для збільшення проникнення фіксуючого розчину до епіфіза та зменшення часу фіксації, через 3-4 години після початку фіксації, частково зрізають прилеглі тканини головного мозку з усіх сторін, що оточують епіфіз.

40 Використання способу, що заявляється, з усіма суттєвими ознаками, включаючи відмінні, дає можливість отримати якісні постійні гістологічні препарати епіфіза без порушення цілісності структурних компонентів органу та з збереженням тісного зв'язку епіфіза з судинним сплетінням для подальших морфологічних, морфометричних та імуногістохімічних експериментальних досліджень.

45 Суть корисної моделі пояснюється за допомогою фото, де на Фіг. 1 показано єдиний органомкомплекс епіфіза з прилеглими тканинами: фрагментами великих півкуль головного мозку та прилеглої до епіфіза частини мозочка; на Фіг. 2 показана фіксація органомкомплексу епіфіза у 5 % розчині нейтрального формаліну; на Фіг. 3 показаний процес максимального відокремлення епіфіза від оточуючих тканин без порушення анатомічного зв'язку з ними після закінчення терміну фіксації; на Фіг. 4 показано використання епіфіза щурів для подальших етапів приготування гістологічних препаратів; на Фіг. 5 показано гістологічний препарат епіфіза статевозрілого щура з збереженою цілісністю сполучнотканинної капсули, паренхіми залози, збереженою цілісністю зв'язку епіфіза з судинним сплетінням головного мозку і збільшенням $\times 100$; на Фіг. 6 показано гістологічний препарат паренхіми епіфіза статевозрілого щура і збільшенням $\times 400$; на Фіг. 7 показано імуногістохімічне дослідження експресії ХgА у пінеалоцитах епіфіза статевозрілого щура під впливом солей важких металів з візуалізацією діамінобензидином і збільшенням $\times 100$; на Фіг. 8 показано імуногістохімічне дослідження

експресії ХгА у пінеалоцитах епіфіза статевозрілого щура під впливом солей важких металів з візуалізацією діамінобензидином і збільшенням $\times 400$. Спосіб здійснюють наступним чином.

Епіфіз 1 разом з прилеглими фрагментами великих півкуль 2 головного мозку та прилеглої до епіфіза частини мозочка 3 в дорсальній ділянці проміжного мозку вилучають не ізольовано, а єдиним органокомплексом розмірами, в середньому, $1,2 \times 1,0 \times 0,8$ см. Фіксацію проводять безпосередньо після вилучення органокомплексу шляхом занурення у 5 % нейтральний забуферений розчин формаліну, запобігаючи підсиханню речовини залози (Фіг. 2). Нейтральний забуферений розчин формаліну виготовляють шляхом додавання до 100,0 мл 5 % розчину формаліну готового фосфат-сольового буферу (Phosphate buffered saline, PBS) у вигляді таблетованої форми - 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. Використання нейтрального забуференого формаліну дозволяє в подальшому, окрім фарбування препаратів епіфізу гематоксилін-еозином, застосовувати гістохімічні методи дослідження, зокрема імуногістохімічні.

Для поліпшення проникнення в тканини фрагментів півкуль 2 головного мозку, мозочка 3 та епіфізу 1 фіксуючої рідини та зменшення часу фіксації матеріалу, через 3-4 години, після декотрого ущільнення, органокомплекс тимчасово вилучають з фіксатора та частково зрізають прилегли тканини головного мозку з усіх сторін, що оточують епіфіз та в подальшому не підлягають мікроскопічному дослідженню (Фіг 3). Це суттєво зменшує час фіксації матеріалу. Органокомплекс зрізають по 2 бічним, верхній та нижній поверхнях, за допомогою ножиць для офтальмологічних операцій до розмірів, в середньому, $1,0 \times 0,7 \times 0,6$ см. Після цього об'єкт знову занурюють у свіжовиготовлений розчин 5 % нейтрального формаліну. Час фіксації об'єкта - 15-18 годин. Після закінчення терміну фіксації епіфіз 1 має добре зафіксовану структуру, він максимально, але не повністю відокремлюється від оточуючих тканин та підлягає наступним етапам виготовлення постійних гістологічних препаратів (Фіг 4). Після фіксації органокомплекс 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 об'єкт переноситься у першу порцію хлороформу на 30 хв., потім у другу порцію хлороформу на 60 хв., потім у суміш хлороформ-парафін у термостат на 30 хв. при 37°C (більш висока температура суміші хлороформ-парафін призводить до "перепалювання матеріалу" та появи у препаратах артефактів). Подальше просякання об'єкта парафіном відбувається у термостаті при температурі 56°C . Застосовується 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°C протягом 36 хв., у другій порції парафіну - при температурі 56°C протягом 60 хв. Виготовлення парафінових блоків відбувається шляхом викладання у спеціальну формочку просякненого парафіном органокомплексу, який заливають розплавленим у термостаті при температурі $56-57^\circ\text{C}$ парафіном. При цьому, поверхню органокомплексу, де анатомічно знаходиться епіфіз, та з якої, в подальшому необхідно робити зрізи, повертають вниз і орієнтують паралельно до дна формочки. 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 епіфіза перед 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 епіфіза використовують стандартний розчин гематоксилін-еозину фабричного виготовлення. Покривання зрізів середовищем проводять після якісного просвітлення зрізів. Препарати епіфіза 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 котрих 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.

На базі кафедри патологічної анатомії та морфології медичного інституту Сумського державного університету проведено близько 200 досліджень епіфізів у експериментальних

щурів різних вікових груп. Виготовлені гістологічні препарати епіфіза статевозрілого щура з збереженою цілісністю сполучнотканинної капсули 4, паренхіми залози 5, збереженою цілісністю зв'язку 6 епіфіза з судинним сплетінням головного мозку (Фіг. 5), гістологічні препарати паренхіми епіфіза статевозрілого щура, за якими досліджують пінеалоцити 7, сполучнотканинні трабекули 8 (Фіг. 6), проведені імуногістохімічні дослідження експресії ХгА у пінеалоцитах 7 епіфіза статевозрілого щура під впливом солей важких металів з визначенням пінеалоцитів, з інтенсивно забарвленою цитоплазмою 9 (Фіг. 7), та пінеалоцитів з позитивною реакцією в цитоплазмі та клітинній оболонці 10 (Фіг. 8).

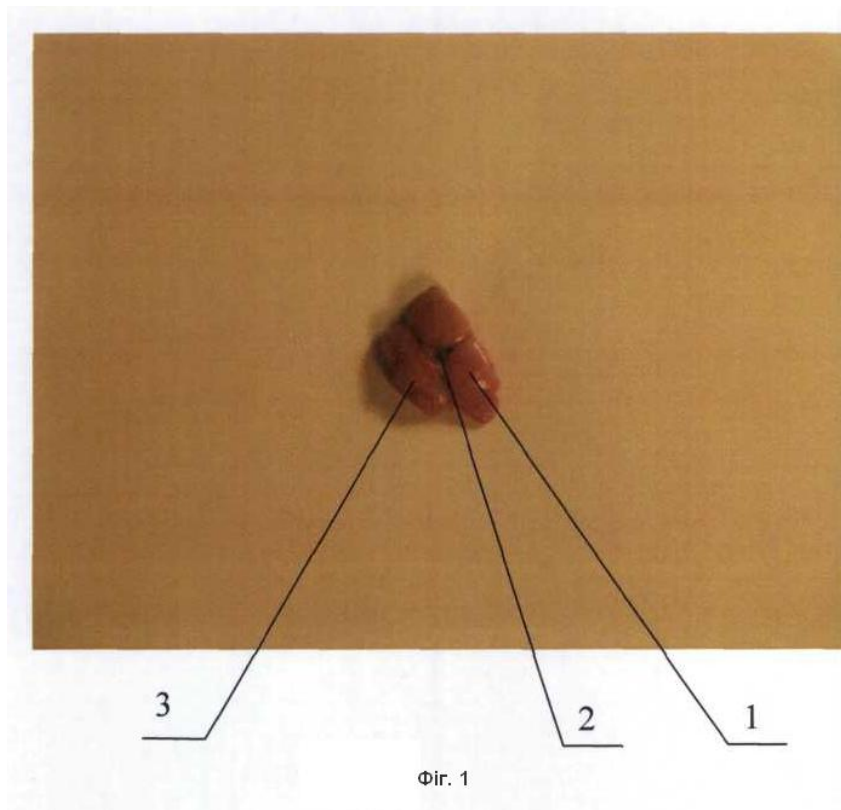
Запропонований спосіб виготовлення гістологічних препаратів епіфіза щурів дозволив отримати високоякісні гістологічні препарати, без порушень цілісності органу та артефактів, придатні для гістологічних, органометричних, морфометричних та імуногістохімічних досліджень, що дозволило провести комплексне та різнобічне вивчення морфологічних особливостей залози (стромального, паренхіматозного та судинного компонентів), провести імуногістохімічне дослідження. Використання наведеного способу зберігає цілісність структур органу та його зв'язок з судинним сплетінням головного мозку, зменшує негативний вплив фіксуємого розчину на залозу шляхом зменшення концентрації фіксатора та його хімічного складу, часу експозиції та поліпшення проникнення фіксатора до досліджуваного матеріалу. Спосіб не вимагає використання нових пристроїв чи інструментів, може бути виконаний загальнодоступним хірургічним, в тому числі і очним та стоматологічним інструментарієм.

Джерела інформації:

1. Афанасьев Ю.И., Бланчук В.К., Ванников Л.Л., Донских Н.В. и др., под общ. ред. Елисеева В.Г. "Основы гистологии и гистологической техники". - М.: "Медицина", 1967. - 267 с.
2. Войно-Ясенецкий М.В., Жаботинский Ю.М. Источники ошибок при морфологических исследованиях. - изд. "Медицина" Ленинградское отделение 1970. - С. 322.
3. Герасимов А.В., Логвинов С.В., Костюченко В.П. Морфологические изменения в эпифизе у крыс при длительном освещении ярким светом// Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 2010. - Т. 150, № 7. - С. 97-99.
4. Елизарова О.Н., Жидкова Л.В., Кочеткова Т.А. «Пособие по токсикологии для лаборантов». - М.: "Медицина", 1974.
5. Зербіно Д.Д., М.М. Багрій, Я.Я. Боднар Патоморфологія та гістологія (атлас)/ Д.Д. Зербіно [та ін.] - Вінниця: Нова Книга, 2016.
6. Каширина Н.К. Методика идентификации и выделения органов эндокринной секреции у мышей /Н.К. Каширина// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 1987. - № 5. - С. 630-631.
7. Ковешников В.Г., Ткаченко О.Я., Шевченко И.В. К усовершенствованию методики гистологической обработки мелких объектов /Український медичний альманах. - 2001. - № 5, Т. 4. - С. 62-64.
8. Методики морфологічних досліджень/за редакцією М.М. Багрія, В.А. Діброви. - Вінниця: Нова Книга, 2016.
9. Ноздрачев А.Д., Поляков Е.Л. Анатомия крысы (Лабораторные животные) /Под ред. академика А.Д. Ноздрачева. - СПб.: Издательство "Лань", 2001. - 464 с.
10. Пішак В.П. Клінічна анатомія шишкоподібного тіла /В.П. Пішак // Тернопіль, "Укрмедкнига", 2000. - 158 с.
11. Пшиченко В.В. Морфофункциональная характеристика шишковидной железы крыс при моделировании круглосуточного освещения и острого стресса /В.В. Пшиченко /Кубанский научный медицинский вестник. - 2014. - № 1(143). - С. 150-154.
12. Пшиченко В.В., Черно В.С. Морфологічний аналіз порушень мікроциркуляції та стан мікроциркуляторного русла шишкоподібної залози при іммобілізаційному стресі /В.В. Пшиченко, В.С. Черно // Вісник проблем біології та і медицини. - 2012. - № 3, том 1 (94). - С. 154-157.
13. Пшиченко В.В., Волобуєв М.А. Морфологічний стан екстра органного кровоносного русла шишкоподібної залози при іммобілізаційному стресі та цілодобового освітлення /В.В. Пшиченко, М.А. Волобуєв // Вісник проблем біології та і медицини. - 2013. - № 3. - С. 32-35.
14. Пшиченко В.В. Морфологічні особливості шишкоподібної залози щурів в умовах гострого стресу /В.В. Пшиченко // Вісник проблем біології та і медицини. - 2015. - № 3, том 1 (94). - С. 84-87.
15. Сапожников А.Г., Доросевич А.Е. Гистологическая и микроскопическая техника. Руководство /А.Г. Сапожников, А.Е. Доросевич // Смоленск: изд. "САУ", 2000. - 475 с.
16. Хелимский А.М. Эпифиз /А.М. Хелимский / Москва: изд. «Медицина», 1969. - 183 с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- Модифікований спосіб приготування гістологічних препаратів епіфіза щурів, що включає вилучення органа, фіксацію розчином нейтрального забуференого формаліну, зневоднення в батареї спиртів, ущільнення парафіном, виготовлення зрізів, забарвлення препаратів гематоксилін-еозином, покривання зрізів середовищем, який **відрізняється** тим, що вилучення епіфіза проводять єдиним комплексом (блоком) з прилеглою тканиною півкуль головного мозку та прилеглою частиною мозочка дорсальної частини проміжного мозку, для запобігання зайвого ущільнення та зменшення об'єму органа фіксацію залози проводять зниженою концентрацією 5% розчину 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), для збільшення проникнення фіксуючого розчину до епіфіза та зменшення часу фіксації, через 3-4 години після початку фіксації частково зрізають прилеглі тканини головного мозку з усіх сторін, що оточують епіфіз.



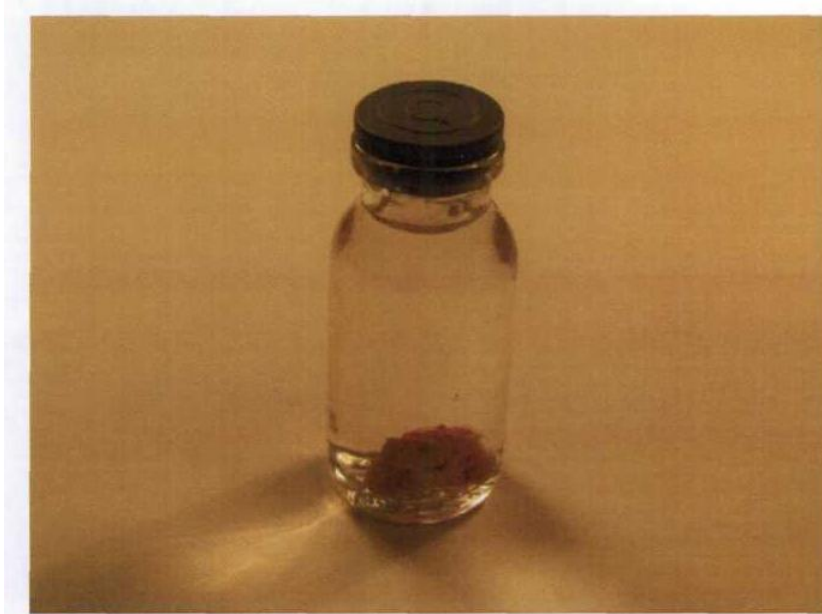


Fig. 2



Fig. 3

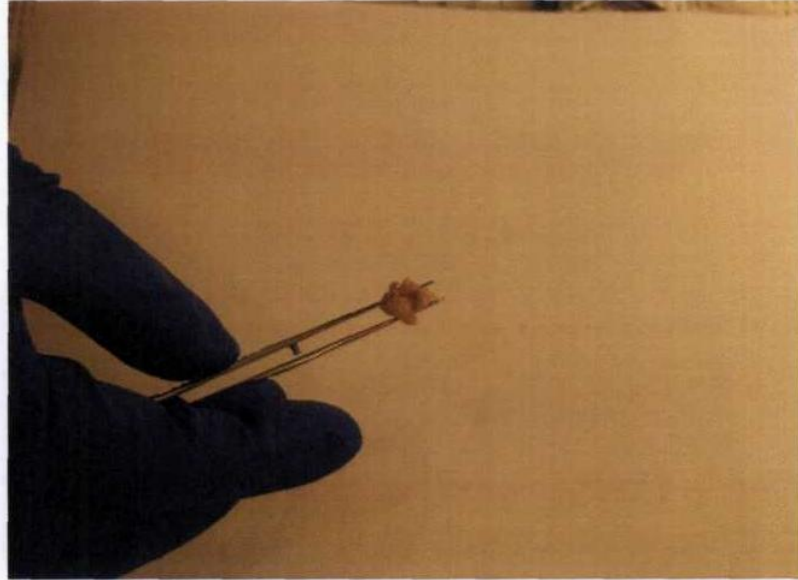


Fig. 4

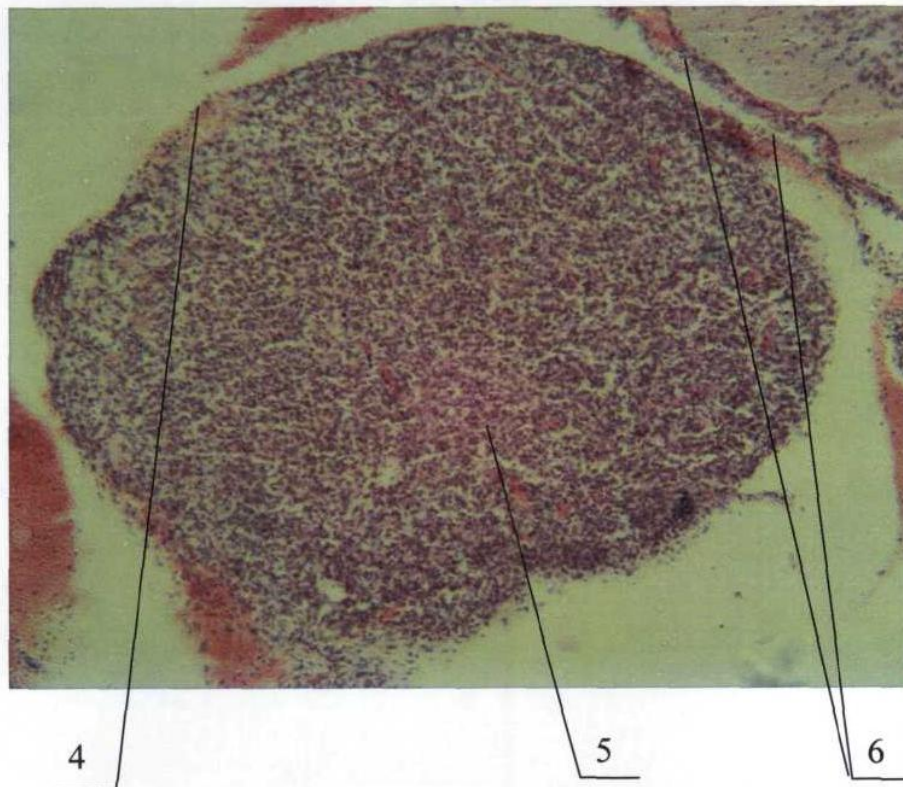


Fig. 5

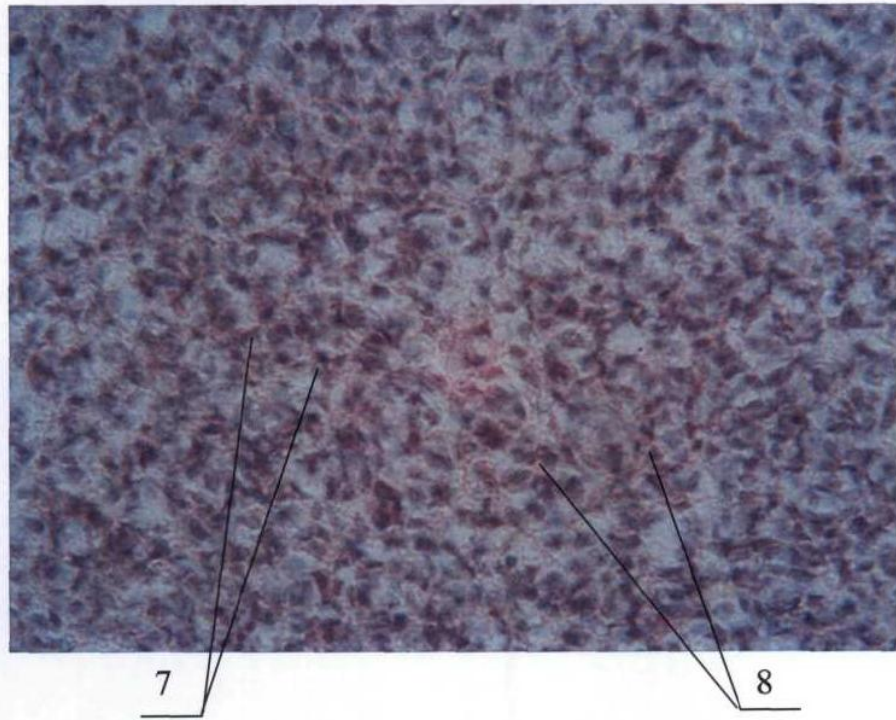


Fig. 6

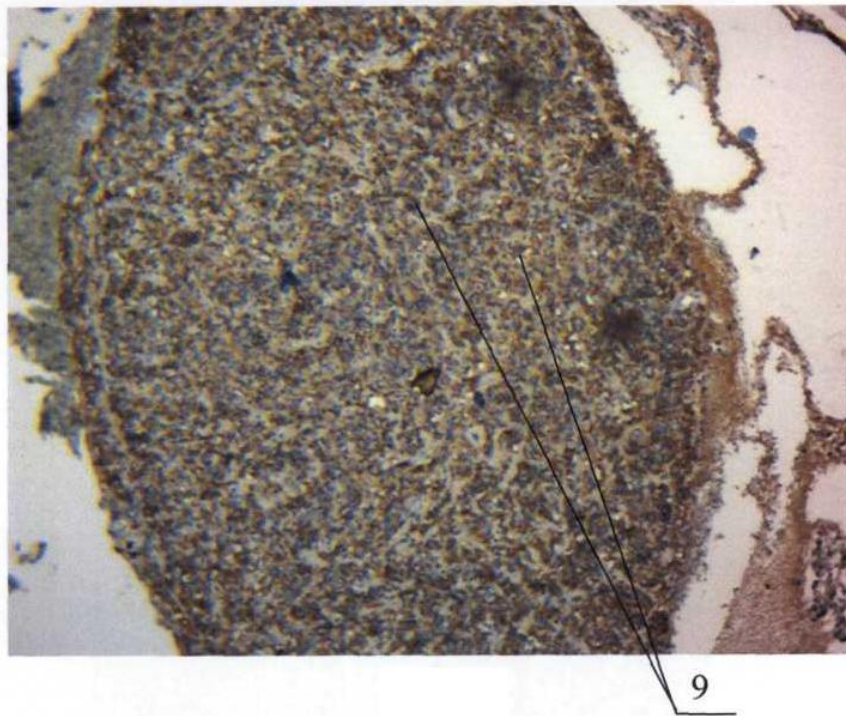
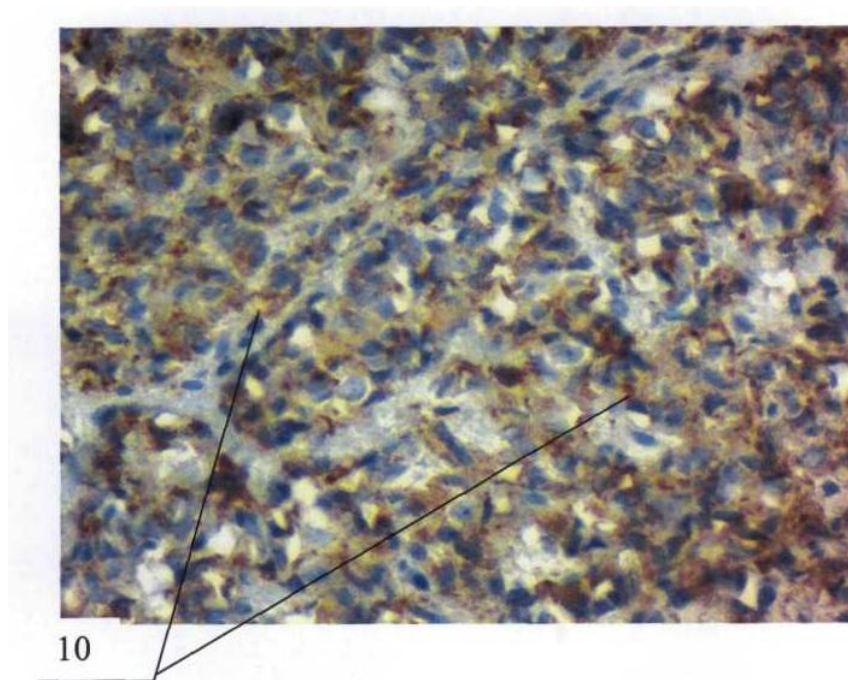


Fig. 7



Фіг. 8

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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