



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **114636** (13) **U**
(51) МПК

G01N 1/28 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C09K 19/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2016 10325</p> <p>(22) Дата подання заявки: 10.10.2016</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.03.2017</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.03.2017, Бюл.№ 5</p>	<p>(72) Винахідник(и): Білаш Сергій Михайлович (UA), Борута Наталія Володимирівна (UA), Єрошенко Галина Анатоліївна (UA), Лисаченко Ольга Дмитрівна (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД УКРАЇНИ "УКРАЇНЬСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ", вул. Шевченка, 23, м. Полтава, 36011 (UA)</p>
---	---

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ ГЛІКОПРОТЕЇНОВИХ КОМПЛЕКСІВ ЕРИТРОБЛАСТНОГО ОСТРІВЦЯ ЧЕРВОНОГО КІСТКОВОГО МОЗКУ НА НАПІВТОНКИХ ЗРІЗАХ

(57) Реферат:

Спосіб виявлення глікопротеїнових комплексів еритробластного острівця червоного кісткового мозку на напівтонких зрізах включає в себе звільнення напівтонких зрізів завтовшки 1 мкм від епоксидної смоли шляхом занурення на 10 хв. в насичений розчин гідроокису калію в абсолютному етанолі. Після цього вони ретельно відмиваються абсолютним етанолом і проводяться через спирти понижуючої концентрації до дистильованої води, і ущільнюються в Епон-812. Ущільнення проводиться без попереднього просочення біоптатів осміевою кислотою. Потім виявляються глікопротеїнові комплекси за допомогою періодату натрію. Як барвник використовується реактив Шиффа.

UA 114636 U

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме до експериментальної медицини, і може бути застосована для ідентифікації макрофагів еритробластного острівця червоного кісткового мозку на напівтонких зрізах.

Відомий гістохімічний спосіб виявлення глікопротеїнових комплексів на парафінових зрізах полягає у забарвленні їх за допомогою реакції Шифф-періодної кислоти (ШИК-PAS-реакції), з використанням періодату натрію, а як барвника - реактиву Шиффа. Встановлено, що позитивну реакцію дають не всі клітинні елементи еритробластного острівця червоного кісткового мозку [Меркулов Г.А. Курс патологической техники / Г.А. Меркулов // - Медицина. - Ленинградское отделение. - 1969 - С. 168-171.]. Завдяки простому виконанню та гарній відтворюваності результатів на парафінових зрізах метод ШИК-PAS-реакції став загальноприйнятим.

Недоліком цього способу є те, що виконання цієї гістохімічної реакції проводиться на парафінових зрізах, які за своєю товщиною не можуть бути використані для вірогідного виявлення глікопротеїнових комплексів при максимальних збільшеннях світлового мікроскопа. Також цей підхід не дає можливості відбору зразків для подальшого ультраструктурного аналізу.

Вище зазначені методи трудомісткі і складні для повсякчасної роботи, тому в практиці морфофункціональних досліджень глікопротеїнових комплексів еритробластних острівців все частіше використовують імуногістохімічні методи їх виявлення, при яких використовуються сироватки, які не є доступними, у зв'язку з їх високою вартістю.

Найбільш близьким до способу, що пропонується є спосіб ідентифікації глікопротеїнових комплексів дифузної ендокринної системи у стінці шлунку на напівтонких зрізах [Деклараційний патент на корисну модель № 77729 Україна МПК А61D 7/00. Спосіб виявлення клітин дифузної ендокринної системи у стінці шлунка на напівтонких зрізах / Білаш С.М., Шепітько В.І., Єрошенко Г.А. - № u201209575; заявл. 2012.06.08, Опубл. 2013.02.25, Бюл. № 4]. Дана методика полягає у тому, що біоптати фіксували у забуференій рідині Буена і промивали 0,1 М фосфатним буфером (рН 7,4) після чого матеріал дофіксували 1 % OsO₄ на фосфатному буфері, зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації і ущільнювали в Епон-812; напівтонкі зрізи завтовшки 1 мкм звільняли від епоксидної смоли зануренням на 10 хвилин в насичений розчин гідроокису калію в абсолютному етанолі, після чого ретельно відмивали абсолютним етанолом і проводили через спирти понижуючої концентрації до дистильованої води; протягом 2 годин зрізи фіксували в рідині Буена і промивали 1 годину дистильованою водою; протягом 5 хвилин зрізи просочували 0,1 М ацетат-оцтовокислим буфером (рН 5,6), а потім занурювали у свіжовиготовлений 0,3 % розчин азотнокислого срібла на ацетатному буфері (рН 5,6) в темній посудині на 24 години при температурі 37 °С; інкубовані зрізи проявляли 1 % розчином гідрокінону на 5 % розчині сульфату натрію протягом 3 хвилин при температурі 45 °С; препарати промивали дистильованою водою висушували та заключали в суміш епонових смол.

Однак, суттєвим недоліком даного способу є те, що методи забарвлення за Грімеліусом, Массоном-Гампреєм не чітко ідентифікують глікопротеїнові комплекси еритробластного острівця. Тому, вище зазначені методи забарвлення, не можуть бути специфічними і однаправленими при подібному роді експериментальних дослідженнях.

В основу корисної моделі поставлена задача модифікувати методику фарбування ШИК-PAS-реакції і використати її на напівтонких зрізах.

Задача вирішується шляхом створення способу виявлення глікопротеїнових комплексів еритробластного острівця червоного кісткового мозку на напівтонких зрізах, включає в себе звільнення напівтонких зрізів завтовшки 1 мкм від епоксидної смоли шляхом занурення на 10 хвилин в насичений розчин гідроокису калію в абсолютному етанолі, після чого вони ретельно відмиваються абсолютним етанолом і проводяться через спирти понижуючої концентрації до дистильованої води, і ущільнюються в Епон-812, відрізняється цей спосіб тим, що ущільнення проводиться без попереднього просочення біоптатів осмієвою кислотою, потім виявляються глікопротеїнові комплекси за допомогою періодату натрію, і як барвник використовується реактив Шиффа.

Запропонований спосіб здійснюється наступним чином:

1. Шматочки тканин червоного кісткового мозку стегової кістки шурів розміром 0,5-1 см., фіксують в 10 % нейтральному розчині формаліну з наступною декальцинацією у розчині етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА) з дотриманням рН 7,4.

2. Потім отримані декальциновані фрагменти червоного кісткового мозку заключають в Епон-812 за загальноприйнятою методикою для електронікроскопічних досліджень, вилучивши етапи до фіксування в осмієвій кислоті.

3. Напівтонкі зрізи товщиною 1 мкм звільняють від епоксидної смоли зануренням на 10 хвилин в насичений розчин гідроокису натрію на абсолютному етанолі, після чого ретельно

відмивають абсолютним етанолом і проводять через спирти понижуючої концентрації до дистильованої води.

4. Надалі зрізи товщиною 1 мкм занурюють у ксилол на 1 хвилину.

5. Потім зрізи витримують протягом 1 хвилини у спирті з концентрацією 96 °С.

5 6. Препарати промивають дистильованою водою.

7. Надалі зрізи занурюють в періодат натрію на 2 хвилини і ретельно промивають дистильованою водою.

8. Потім препарати витримують протягом 7 хвилин у реактиві Шиффа, який виготовляють шляхом розчинення в 200 мл кип'яченої бідистильованої води 1 г основного фуксину. Розчин кип'ятять на протязі 5 хвилин, фільтрують та охолоджують. Потім додають 2 г метабісульфіту калію, змішуючи декілька хвилин, після чого додавали 20 мл. 1 н. соляної кислоти. Для висвітлення розчин витримують протягом доби в темному місці. Отримують реактив Шиффа прозорого кольору.

10 9. Після цього зрізи ополіскують в 3 порціях сірчаної води.

15 10. Далі препарати промивають в дистильованій воді, висушують і заключають в полістерол під покривні скельця.

Після проведеного забарвлення чітко визначають глікопротеїнові комплекси еритробластних острівців. Ця методика дала змогу виявляти глікопротеїнові комплекси еритробластних острівців червоного кісткового мозку на напівтонких зрізах.

20 Таким чином, запропонований спосіб дозволяє скоротити час проведення методики, вилучити етапи роботи з канцерогенними речовинами, а саме із осміевою кислотою, здешевити методику забарвлення, і рекомендувати його, як специфічний метод при дослідженні глікопротеїнових комплексів еритробластного острівця червоного кісткового мозку. Скорочення часу проведення методики дає змогу швидше визначити ділянки препарату для подальшого
25 електрономікроскопічного дослідження.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

30 Спосіб виявлення глікопротеїнових комплексів еритробластного острівця червоного кісткового мозку на напівтонких зрізах, що включає в себе звільнення напівтонких зрізів завтовшки 1 мкм від епоксидної смоли, шляхом занурення на 10 хвилин в насичений розчин гідроокису калію в абсолютному етанолі, після чого вони ретельно відмиваються абсолютним етанолом і проводяться через спирти понижуючої концентрації до дистильованої води, і ущільнюються в Епон-812, який **відрізняється** тим, що ущільнення проводиться без попереднього просочення
35 біоптатів осміевою кислотою, потім виявляються глікопротеїнові комплекси за допомогою періодату натрію, і як барвник використовується реактив Шиффа.