



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **111195** (13) **U**
(51) МПК (2016.01)
C12N 5/00
G01N 33/483 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2016 02576	(72) Винахідник(и): Білаш Сергій Михайлович (UA), Борута Наталія Володимирівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 16.03.2016	(73) Власник(и): ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД УКРАЇНИ "УКРАЇНЬСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ", вул. Шевченка, 23, м. Полтава, 36011 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.11.2016	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.11.2016, Бюл.№ 21	

(54) СПОСІБ ІДЕНТИФІКАЦІЇ МАКРОФАГІВ ЕРИТРОБЛАСТНОГО ОСТРІВЦЯ ЧЕРВОНОГО КІСТКОВОГО МОЗКУ НА НАПІВТОНКИХ ЗРІЗАХ

(57) Реферат:

Спосіб ідентифікації макрофагів еритробластного острівця червоного кісткового мозку на напівтонких зрізах включає 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. З послідовних етапів ущільнення в Епон-812 вилучено просочення біоптатів осмієвою кислотою, а ідентифікація макрофагів відбувається за допомогою гематоксиліну Вейгерта з дофарбуванням пірфуксином.

UA 111195 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 клітинних елементів сполучної тканини на парафінових зрізах полягає у забарвленні їх за методом Ван-Гізона, з використанням залізного гематоксиліну Вейгерта, а як кислий барвник - пірфуксин. 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 Ван-Гізона став загальноприйнятим.

Недоліком цього є те, що виконання цієї гістохімічної реакції проводиться на парафінових зрізах, які за своєю товщиною не можуть бути використані для вірогідної ідентифікації структурних елементів при максимальних збільшеннях світлового мікроскопа, і неможливістю виявлення усіх елементів сполучної тканини. Також цей підхід не дає можливості відбору зразків для подальшого ультраструктурного аналізу.

Вище зазначені методи трудомісткі і складні для повсякчасної роботи, тому, в практиці морфологічних досліджень макрофагів еритробластних острівців, все частіше використовують методи їх ідентифікації імуногістохімічних досліджень, при яких використовуються сироватки, котрі не є доступними, у зв'язку з їх високою вартістю.

Найбільш близьким аналогом до способу, що з'являється, є спосіб ідентифікації елементів 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 шлунку на напівтонких зрізах / Білаш С.М., Шепітько В.І., Єрошенко Г.А. - № u 201209575; 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 пропитували 0,1 М ацетат-оцетнокислим 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 гідроксиду 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, Масоном-Гампреєм не достовірно виявляють сполучнотканинні елементи червоного кісткового мозку, і не чітко ідентифікують макрофаги еритробластного острівця. Тому вище зазначені методи фарбування, не можуть бути специфічними і однонаправленими при подібному роді експериментальних дослідженнях.

В основу корисної моделі поставлена задача модифікувати методику фарбування за Ван-Гізонам і використати її на напівтонких зрізах.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб ідентифікації макрофагів еритробластного острівця червоного кісткового мозку на напівтонких зрізах, який включає 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 проводять через спирти понижуючої концентрації до дистильованої води, і ущільнюються в Епон-812, згідно з корисною моделлю, з послідовних етапів ущільнення в Епон-812, вилучено просочення біоптатів осміевою кислотою, а ідентифікація макрофагів відбувається за допомогою гематоксиліну Вейгерта з дофарбуванням пірфуксином.

Запропонований спосіб здійснюють наступним чином:

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

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

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

відмивали абсолютним етанолом і проводили через спирти понижуючої концентрації до дистильованої води.

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

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

5 6. Препарати промивали дистильованою водою.

7. Надалі зрізи занурювали в гематоксилін Вейгерта на 2 хвилини і промивали дистильованою водою.

8. Потім препарати витримувались протягом 2 хвилин у розчині пірфуксину, який виготовляли шляхом розчинення в 100 мл. дистильованої води, кімнатної температури, 1,2 гр. пікринової кислоти, та 1 % водяного розчину кислого (не основного) фуксину. Обидва розчини змішують у розрахунку 10 мл. пікринової кислоти на 1 мл. фуксину. Отримали розчин пірфуксину гранатового кольору. Потім препарати швидко ополіскувався дистильованою водою.

9. Після цього зрізи витримувались протягом 1 хвилини у спирті з концентрацією 96°.

10. Далі препарати висушували і заключали в полістерол під покривні скельця.

15 Після проведеного забарвлення чітко визначався клітинний склад еритробластних острівців який був представлений макрофагами, проеритробластами, базофільними, поліхроматофільними і оксифільними еритробластами, нормоцитами, ретикулоцитами і зрілими еритроцитами. Ця методика дала змогу ідентифікувати, визначити гістотопографію, кількісний та якісний склад клітин еритробластних острівців червоного кісткового мозку, чітко візуалізувати "клітини-няньки" і сполучнотканинні компоненти.

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 специфічним методом при дослідженні елементів еритробластного острівця червоного кісткового мозку. Скорочення часу проведення методики дає змогу швидше визначити ділянки препарату для подальшого електронімікроскопічного дослідження.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

30 Спосіб ідентифікації макрофагів еритробластного острівця червоного кісткового мозку на напівтонких зрізах, який включає 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

35 **відрізняється** тим, що з послідовних етапів ущільнення в Епон-812 вилучено просочення біоптатів осміевою кислотою, а ідентифікація макрофагів відбувається за допомогою гематоксиліну Вейгерта з дофарбуванням пірфуксином.

Комп'ютерна верстка Т. Вахричева

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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