



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **77729** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
A61D 7/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2012 09575**
(22) Дата подання заявки: **06.08.2012**
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **25.02.2013**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.02.2013, Бюл.№ 4**

(72) Винахідник(и):
**Білаш Сергій Михайлович (UA),
Шепітько Володимир Іванович (UA),
Єрошенко Галина Анатоліївна (UA),
Білаш Валентина Павлівна (UA),
Рябушко Микола Миколайович (UA)**

(73) Власник(и):
**Білаш Сергій Михайлович,
вул. Р. Люксембург, 56-в, кв. 3, м. Полтава,
36002 (UA),
Шепітько Володимир Іванович,
вул. Міщенка, 5, кв. 2, м. Полтава, 36011
(UA),
Єрошенко Галина Анатоліївна,
вул. Зигіна, 6, кв. 2, м. Полтава, 36000 (UA),
Білаш Валентина Павлівна,
вул. Р. Люксембург, 56-в, кв. 3, м. Полтава,
36002 (UA),
Рябушко Микола Миколайович,
вул. Баленка, 12, кв. 35, м. Полтава, 36007
(UA)**

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ КЛІТИН ДИФУЗНОЇ ЕНДОКРИННОЇ СИСТЕМИ У СТІНЦІ ШЛУНКА НА НАПІВТОНКИХ ЗРІЗАХ

(57) Реферат:

Спосіб виявлення клітин дифузної ендокринної системи у стінці шлунка на напівтонких зрізах включає в себе методику Грімеліуса, причому для ущільнення біологічного матеріалу використовується ущільнювач ЕПОН-812, з метою виготовлення напівтонких серійних зрізів, і використовуються хімічні речовини, які є менш канцерогенними та зменшують час проведення забарвлення оболонок шлунка для ідентифікації, визначення гістотопографії, кількісного та якісного складу апудоцитів.

UA 77729 U

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме до експериментальної медицини, і може бути застосована для ідентифікації, кількісного і якісного аналізу та визначення гістотопографії клітин дифузної ендокринної системи шлунка на напівтонких зрізах.

Відомий гістохімічний Спосіб виявлення клітин дифузної ендокринної системи полягає у імпрегнації зрізів сріблом за методом Грімеліуса. Встановлено, що позитивну аргірофільну реакцію дає більшість ендокринних клітин АПУД-системи [Grimelius L. Enterochromaffine cells in the gut's wall / L. Grimelius, E. Wilander // Invest. Cell Path.-1980. - Vol. 3. - P. 3-12.]. Завдяки простому виконанню та гарній відтворюваності результатів на парафінових зрізах метод Грімеліуса став загальноприйнятим. Недоліком цього методу є те, що виконання цієї гістохімічної реакції проводиться на парафінових зрізах, які за своєю товщиною не можуть бути використані для чіткої ідентифікації структурних елементів при збільшенні світлового мікроскопа у 1000 разів. Також цей підхід не дає можливості відбору зразків для подальшого виготовлення ультратонких зрізів при проведенні електронної мікроскопії, а також не дає можливості вивчення розподілу секреторних гранул в цитоплазмі ендокринних клітин.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб, який модифікований з способу Грімеліуса і який виконується вже на напівтонких зрізах [Улітина Е.Д. Модифікація метода Грімеліуса для ідентифікації апудоцитів на полутонках. срезях / Е.Д.Улітина, В.В.Южаков // Архив патологии. - М.: Медицина.-1990. - Т. 52. - С. 63-64]. Слід відмітити, що можливості світлової мікроскопії для точної морфологічної ідентифікації типу апудоцитів обмежені. Методи електронномікроскопічних досліджень трудомісткі і складні для повсякчасної роботи, тому в практиці морфологічних досліджень цих ендокринних клітин, все частіше використовують метод серійних напівтонких зрізів. Ця гістохімічна реакція проводилась наступним чином: шматочки тканин дванадцятипалої кишки Об'ємом близько 1 мм^2 фіксували в забуференій рідині Буена і промивали 0,1 М фосфатним буфером (рН 7,4) після чого матеріал дофіксували 1 % OsO_4 на фосфатному буфері; зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації і ущільнювали в ЕПОН; 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 понижаючої 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 в свіжовиготовлений 0,3 % розчин азотнокислого срібла на ацетатному буфері (рН 5,6) в темній посудині на 24 години при температурі 37°C ; інкубовані зрізи проявляли 1 % розчином гідрокінону на 5 % розчині сульфату натрію протягом 3 хвилин при температурі 45°C ; препарати промивали дистильованою водою висушували та поміщали в суміш епонових смол.

В результаті проведення даного забарвлення секреторні гранули аргірофільних клітин закритого і відкритого типу, які розташовувались в криптах дванадцятипалої кишки, забарвлювались в інтенсивний чорно-коричневий колір, гранули клітин Панета - в коричневий колір, а оточуюча тканина в світло-жовтий.

Однак суттєвим недоліком даного способу є те, що дані дослідження проводились на ендокринних клітинах дванадцятипалої кишки. Апробація даної методики на стінці шлунка не проводилась. Методика довготривала за часом її проведення, а також в ході її проведення використовуються канцерогенні речовини.

В основу корисної моделі поставлена задача модифікувати методику Грімеліуса для ідентифікації апудоцитів на напівтонких зрізах.

Поставлена задача вирішується застосуванням методу Грімеліуса та згідно з корисною моделлю, відрізняється тим, що для ущільнення біологічного матеріалу використовується ущільнювач ЕПОН-812, з метою виготовлення напівтонких серійних зрізів, і використовуються хімічні речовини, які є менш канцерогенними та зменшують час проведення забарвлення оболонок шлунка для ідентифікації, визначення гістотопографії, кількісного та якісного складу апудоцитів.

Запропонований спосіб здійснюється наступним чином:

1. Шматочки тканин стінки шлунка щурів об'ємом близько 30 мм^3 фіксували у 2,5 % розчині глютарового альдегіду і ущільнювали в ЕПОН-812 за загальноприйнятою методикою для електронномікроскопічних досліджень;

2. Напівтонкі зрізи товщиною 1 мкм звільняли від епоксидної смоли зануренням на 10 хвилин в насичений розчин гідроокису натрію в абсолютному етанолі, після чого ретельно відмивали абсолютним етанолом і проводили через спирти понижуючої концентрації до дистильованої води;

3. Протягом 5 хвилин зрізи занурювали в розчин фосфатного буферу з рН 5,6;

4. Потім зрізи витримували протягом 4 годин у свіжовиготовленому 0,3 % розчині азотнокислого срібла на фосфатному буфері (рН 5,6) під ковпаком на прямому сонячному промінні;

5. Надалі зрізи проявляли протягом 3 хвилин 1 % розчину гідрохінону на 5 % розчині сульфату натрію у термостаті при 45 °С;

6. Препарати проминали дистильованою водою протягом 10 хвилин, висушували в термостаті при температурі 37 °С і поміщали в полістирол під покривні скельця.

10. Гранули ендокриноцитів шлункових залоз забарвлювались в темно-коричневий колір, інші структури - в жовтий колір, що дало змогу ідентифікувати, визначити гістологію, кількісний та якісний склад клітин дифузної ендокринної системи шлунка.

15. Таким чином, запропонований спосіб дозволяє скоротити час проведення методики. Вилучити етапи роботи з канцерогенними речовинами, а саме: пікриною, оцтовою кислотою та формальдегідом, які використовуються у виготовленні розчину Буена. Позитивним є заміна ацетатного буферу на фосфатний, який є більш доступним. Скорочення часу проведення методики дає змогу швидше визначити ділянки препарату, для подальшого електронікроскопічного дослідження.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

20. Спосіб виявлення клітин дифузної ендокринної системи у стінці шлунка на напівтонких зрізах включає в себе методику Грімеліуса, який **відрізняється** тим, що для ущільнення біологічного матеріалу використовується ущільнювач ЕПОН-812, з метою виготовлення напівтонких серійних зрізів, і використовуються хімічні речовини, які є менш канцерогенними та зменшують час проведення забарвлення оболонок шлунка для ідентифікації, визначення гістології, кількісного та якісного складу апудоцитів.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

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

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