

УКРАЇНА



# ПАТЕНТ

НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

№ 129067

**СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ КЛІТИН ПАНЕТА У СТІНЦІ  
АПЕНДИКСА ПЛОДІВ ЛЮДИНИ НА НАПІВТОНКИХ ЗРІЗАХ**

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні моделі 25.10.2018.

Заступник міністра економічного розвитку і торгівлі України

М.І. Тітарчук





УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **129067** (13) **U**  
(51) МПК  
**G01N 1/30** (2006.01)  
**G01N 33/48** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

(21) Номер заявки: <b>u 2018 02455</b>	(72) Винахідник(и): <b>Гринь Володимир Григорович (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>12.03.2018</b>	(73) Власник(и): <b>ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД УКРАЇНИ "УКРАЇНСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ", вул. Шевченка, 23, м. Полтава, 36011 (UA)</b>
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>25.10.2018</b>	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.10.2018, Бюл.№ 20</b>	

**(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ КЛІТИН ПАНЕТА У СТІНЦІ АПЕНДИКСА ПЛОДІВ ЛЮДИНИ НА НАПІВТОНКИХ ЗРІЗАХ**

**(57) Реферат:**

Спосіб виявлення клітин Панета у стінці апендикса плодів людини на напівтонких зрізах якій включає фіксацію тканин в розчині нейтрального формаліну, дегідратацію. При цьому для ущільнення біологічного матеріалу використовують ущільнювач "Елон-812".

**UA 129067 U**

Корисна модель належить до медицини, зокрема - до лабораторних методів дослідження в морфології.

Відомий спосіб виявлення гранул клітин Панета, що полягає в постановці реакції шифф-йодна кислота (ШИК-реакції) (Шабадаш А.Л. Рациональна методика гістохімічного виявлення глікогену і її теоретичне обґрунтування // Известия АН СССР. - 1947. - № 6. - С. 745-760). Шматочки тонкої кишки (не більше 3'3 мм) фіксують 3 год. у першому розчині, а потім 3 год. у другому розчині. Перший розчин представляє собою суміш 100 мл 96°-ного етилового спирту, 1,8 г нітрату міді, 0,9 г нітрату кальція, 10 мл формаліну. Другий розчин готують змішуванням 100 мл 96°-ного етилового спирту, 2,6 г нітрату кадмія, 10 мл формаліну. Фіксовані шматочки промивають у трьох-чотирьох змінах 70°-ного спирту по 2 год. і через спирти зростаючої концентрації і ксилоли доводяться до парафіну. Зрізи товщиною 5-10 мкм депарафінують і доводять до води, потім занурюють в розчин на 20-30 хв. Для одержання періодату розчиняють 1 г періодату калія або 2,5 г періодату натрія в 100 мл дистильованої води. Оброблені в розчині зрізи ретельно промивають у двох-трьох порціях дистильованої води (по 3-5 хв) і поміщають в реактив Шиффа на 10-20 хв. Для приготування останнього розчиняють 1 г лужного фуксину у 200 мл киплячої дистильованої води і, періодично потрушуючи посудину з розчином, продовжують кип'ятіння на протязі 5 хв. Потім, охолодивши вміст до 50 °С, розчин фільтрують, додають 20 мл 1н розчину соляної кислоти і охолоджують до 25 °С, після чого додають 1 г метабісульфіту натрія або калія і залишають у темноті. Через 18-24 год. в розчин всипають 2 г активованого вугілля, потрушують на протязі 1 хв., відфільтровують і зберігають у темряві при 0-4 °С. Готовий реактив Шиффа безбарвний або має світложовте забарвлення. Почервоніння розчину в процесі зберігання свідчить про його розклад і непридатність до використання. Витягнені з реактиву Шиффа зрізи обробляють у трьох порціях свіжоприготовленої сірчистої води. Для приготування останньої до 200 мл дистильованої води додають 4 мл концентрованої соляної кислоти: в 25 мл дистильованої води розчиняють 4 г безводного сульфату натрію; потім обидва розчини з'єднують. Після обробки в сірчистій воді зрізи промивають у водопровідній воді на протязі 10 хв, прополощують в дистильованій воді, зневоджують, просвітлюють і поміщують в бальзам. На препаратах гранули клітин Панета забарвлюються в червоно-пурпуровий колір.

Відомий спосіб виявлення гранул панетовських клітин (Патент України № 28844. МПК: G01H 1/28. Спосіб визначення гранул клітин панета / Єщенко В.А., Бовт В.Д., Прохвятилова А.В., Плетень СВ., Драніцин О.В., Малько М.М. - № 97105001 від 13.10.1997; дата публікації 16.10.2000), що полягає в: фіксація в нейтральному формаліні; окраска зрізів гематоксиліном в суміші з алюмокалієвими галунами, біхроматом калія, сірчаною кислотою і розчином флоксину; обробка забарвлених зрізів розчином фосфорно-вольфрамової кислоти. Спосіб здійснюють таким чином: шматочки тонкої кишки фіксують у нейтральному формаліні і через спирти та ксилоли доводять до парафіну. Зрізи звільняють від парафіну і забарвлюють сумішшю гематоксиліну, алюмокалієвого галуну, біхромату калію, сірчаної кислоти, а потім розчином флоксину, забарвлені зрізи обробляють розчином фосфорно-вольфрамової кислоти і поміщають в бальзам.

Приклад конкретного виконання:

1. Шматочки тонкої кишки фіксують на протязі 1 доби в нейтральному формаліні. Для приготування останнього в посудину засипають карбонат кальцію в такій кількості, щоб на дні утворився шар товщиною 1,5-2 см. Потім наливають формалін, декілька раз взбовтують і залишають стояти 24-48 год.

2. Зневоджують шматочки проведенням через спирти зростаючої концентрації (70°-ний, 80°-ний, 90°-ний, 96°-ний, абсолютний - по 4 год.).

3. Витримують шматочки в двох частинах ксилола (по 15 хв), суміші 50 %-го ксилола і 50 %-го парафіна (30 хв. при 37 °С), двох парафінах (по 1,5 год. при 56 °С) і заливають їх в парафін.

4. Парафінові зрізи товщиною в 5 мкм звільняють від парафіна витриманням в двох ксилолах (по 3 хв), доводять до води проведенням їх через спирти понижуючої концентрації (абсолютний, 90°-ний, 70°-ний - по 3 хв), промивають у водопровідній воді на протязі 5 хв.

5. Зрізи забарвлюють на протязі 5 хв. сумішшю, що складається з 5 мл 1 %-ного розчину гематоксиліну, 5 мл 1 %-ного розчину алюмокалієвого галуну, 0,4 мл 5 %-ного розчину біхромату калія, 0,2 мл 5 %-ного розчину сірчаної кислоти.

6. Зрізи обробляють 1 хв. 96°-ним спиртом.

7. Промивають їх 3 хв. в водопровідній воді.

8. Забарвлюють зрізи 3 хв. 0,5 %-ним розчином флоксину.

9. Обробляють їх 2 хв. 5 %-ним розчином фосфорно-вольфрамової кислоти.

10. Промивають зрізи 5 хв. водопровідною водою.

11. Зневоднюють їх обробкою спиртами зростаючої концентрації (90°-ним, 96°-ним, абсолютним по 2 хв).

12. Витримують зрізи в двох частинах ксилола (по 2 хв).

13. Поміщають зрізи в бальзам.

5 Однак суттєвим недоліком даного способу є те, що дані дослідження проводились на тонкій кишці експериментальних тварин. Апробація даної методики на стінці апендикса плодів людини не проводилась. Методика довготривала за часом її проведення, затратна та трудомістка, а також в ході її проведення використовуються канцерогенні речовини.

10 В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб для ідентифікації клітин Панета апендиксів плодів людини на напівтонких зрізах.

15 Поставлена задача вирішується тим, що у способі виявлення клітин Панета у стінці апендикса плодів людини на напівтонких зрізах, що включає фіксацію тканин в розчині нейтрального формаліну, дегідратацію, згідно з корисною моделлю, для ущільнення біологічного матеріалу використовують ущільнювач "Епон-812" (Epon 812, Fluka Chemie, Switzerland), для виготовлення напівтонких серійних зрізів, використані речовини є менш канцерогенними, менш затратними та зменшують час проведення забарвлення оболонок апендикса для ідентифікації, визначення гістотопографії, кількісного та якісного складу клітин Панета.

20 Запропонований спосіб здійснюється наступним чином: препарати апендиксів фіксували в 10 % розчині нейтрального формаліну, надалі піддавали відмиванню, переходили до процедури їх дегідратації в спиртах зростаючої кріпості (50 %, 70 %, 80 %, 96 %), а потім проводили заміну суміші ацетон-спирт (пропорції: 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1 та в 1-й порції чистого ацетону) по 15 хвилин в кожній. Далі проводили промивку в епоксидній смолі шляхом заміни ацетону на суміш А+В "Епон-812" (пропорції: 3:1, 1:1, 1:3) по 30 хвилин в кожній порції та 1 порція в суміші епоксидної смоли на 1 годину при температурі 35 °С. Для приготування суміші А потрібно: епон-812-6,2 мл та епон-DDSA-10 мл; суміші В: епон-812-10 мл, епон-MNA-8,9 мл, ДМП-30-0,8 мл. Всі складові спочатку окремо, а потім в одній посудині перемішати протягом 40 хвилин. До початку змішування смоли, останню поставити у термостат при температурі 30 °С на 1 годину.

30 Просочені апендикси поміщаються в чисту суміш епоксидної смоли в прозорі пластикові контейнери. Наступним етапом проводили полімеризацію: 1-а доба - 35 °С, 2-а доба - 45 °С, 3-4-а доба - 56 °С. Після полімеризації необхідний для дослідження епоксидний блок із укладеним тканинним об'єктом апендикса піддавали шліфуванню до одержання гладкої площини без яких-небудь подряпин. Для цього служили шліфувальні диски з різною тонкістю абразив, які поперемінно закріплювали в тримачі свердильної установки. Крім того, спеціально для

35 вивчення препаратів у світловому мікроскопі при більших збільшеннях виготовляли пластинчасті шліфи із двостороннім поліруванням, товщина яких не перевищувала 0,5 мм. На цьому етапі препарати придатні для фарбування відповідними барвниками, найдоступнішим із яких, простим і ефективним є 1 % розчин метиленового синього на 1 % розчині бури. Час занурення в барвник 10 хвилин. Потім препарати промивали під проточною водою протягом 5

40 хвилин, висушували в термостаті при температурі 37 °С і гоміщали в полістерол під покривні скельця. Вивчення препаратів і одержання необхідних мікрофотографій здійснювали за допомогою біокулярної лули і світлового мікроскопа, оснащених цифровою фотоприставкою.

45 Гранули клітин Панета апендикса плодів людини забарвлювались в темно-синій колір (фото: 1 - слизова оболонка; 2 - клітини Панета; 3 - мезенхімна основа), інші структури - в блакитний колір, що дало змогу ідентифікувати, визначити гістотопографію, кількісний та якісний склад клітин Панета апендикса.

50 Застосування як фіксатора 10 % нейтрального формаліну, ущільнювача - епоксидну смолу "Епон-812", а як барвника доступного та менш затратного 1 % розчину метиленового синього на 1 % розчині бури, дозволяє чітко виявляти гранули клітин Панета, підраховувати їх кількість і по кількості гранул оцінювати функціональний стан клітин. Запропонований спосіб дозволяє скоротити час проведення методики. Скорочення часу проведення методики дає змогу швидше визначити ділянки препарату, для подальшого мікроскопічного дослідження.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

55

Спосіб виявлення клітин Панета у стінці апендикса плодів людини на напівтонких зрізах, який включає фіксацію тканин в розчині нейтрального формаліну, дегідратацію, який відрізняється тим, що для ущільнення біологічного матеріалу використовують ущільнювач "Епон-812".