



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **111230** (13) **U**

(51) МПК (2016.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 1/06 (2006.01)

G01N 21/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2016 03217</p> <p>(22) Дата подання заявки: 28.03.2016</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.11.2016</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.11.2016, Бюл.№ 21</p>	<p>(72) Винахідник(и): Мамонтова Тетяна Василівна (UA), Кайдашев Ігор Петрович (UA), Весніна Людмила Едуардівна (UA), Гординська Інга Леонідівна (UA), Боброва Нелля Олександрівна (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 ІМУНОГІСТОХІМІЧНОЇ ДЕТЕКЦІЇ ПЕПТИДНИХ КОМПЛЕКСІВ НА ПАРАФІНОВИХ ГІСТОЛОГІЧНИХ ЗРІЗАХ ТКАНИН

(57) Реферат:

Спосіб імуногістохімічної детекції пептидних комплексів на парафінових гістологічних зрізах тканин включає відбір тканинного матеріалу, фіксацію у формаліні, регідrataцію гістологічних зрізів і видалення із них залишків парафіну, демаскування антигену, блокування ендogenous пероксидази і потім неспецифічної сорбції імуноглобулінів, обробку гістологічних зрізів первинними та вторинними антитілами проявлення пероксидазної активності з 3-аміно-9-етилкарбазолом (ЕАК), фарбування, візуалізацію та оцінку локації пептидних комплексів в тканинах за наявності специфічного забарвлення продукту реакції. Фіксацію тканин здійснюють у 4 % нейтральному забуференому формаліні впродовж 8 годин, а демаскування антигенної специфічності пептидних комплексів проводять із застосуванням технології мікрохвильової обробки. Інкують гістологічні зрізи з поліклональними антитілами (інактивована сироватка кроля, імунізованого поліпептидами кіркової речовини нирок та стегових м'язів щурів) з наступною інкубацією їх з вторинними антитілами (кон'югатом пероксидази хрому з моноспецифічними афінно очищеними антитілами вівці до імуноглобулінів кроля (IgG, IgA та IgM)).

UA 111230 U

Корисна модель належить до біології та медицини, а саме до імунології.

Визначення локалізації антигенів пептидних комплексів у різних тканинах на сьогоднішній день досить часто є неможливим без застосування спеціальних методів дослідження [Л.Э. Веснина Тканевые регуляторные пептиды (теоретические основы и перспективы практического применения) / Л.Э. Веснина, А.Л. Гаркович, Н.Н. Грицай и др.; Под общ. ред. И.П. Кайдашева, В.П. Мищенко, В.К. Рыбальченко. - К.: Здоров'я. - 2003. - 392 с.]. Активне впровадження сучасних високотехнологічних методів, зокрема імуногістохімічного, в експериментальну та клінічну практику визначається перевагами даного аналізу. В основі імуногістохімічного методу лежить реакція антиген-антитіло та стабільність утвореного комплексу пероксидази з хромогеном, що дозволяє виявляти, ідентифікувати і встановлювати локалізацію молекулярних компонентів клітин і тканин [Yamashita S. Heat-induced antigen retrieval: mechanisms and application in histochemistry / S. Yamashita // Progress Histochem. Cytochem. - 2007. - Vol. 41. - P. 141-200].

При проведенні імуногістохімічного методу вимагається, перш за все, так обробляти зрізи досліджуваних тканин, щоб в них зберігалась нативність антигенів, які виявляються [Лимфоциты: Методы: Пер. с англ. / Под ред Дж. Клауса. - М.: Мир. - 1990. - 395 с., ил.]. Однак, цьому завжди протистоїть необхідність досягти адекватної морфологічної картини досліджуваних клітин і тканин, яка дозволила б вірно інтерпретувати результати. Метод парафінових зрізів забезпечує гарну морфологічну картину, але викликає при цьому руйнування більшості мембранних антигенів. Зокрема, відомо, що фіксація матеріалу у формаліні впливає на антигенні детермінанти і може суттєво погіршити виявлення певних антигенів. Формальдегід реагує з основними амінокислотами білків з утворенням метиленових місточків, що призводить до маскування окремих епітопів антигенів і створює необхідність застосування методів антигенного демаскування. Тим не менше, в більшості гістологічних досліджень використовуються фіксуючі рідини, які містять формалін [Norwood D. Cell and tissue fixation, 1972-1982. / D. Norwood // Histochem J. - 1985. - Vol. 17(4). - P. 389-442]. Сьогодні 10 % нейтральний забуферений формалін є стандартом в патоморфологічних дослідженнях, який дозволяє фіксувати матеріал та зберігати структуру клітин і тканин впродовж тривалого часу (декілька років). Але концентрація даного фіксатора та час фіксації у формаліні, що рекомендовані для проведення імуногістохімічного методу (не менше 18 годин), не завжди є доцільними та оптимальними [Коржевский Д.В. Применение методов иммуногистохимии теплового демаскирования антигенов на парафиновых срезах головного мозга крыс / Д.В. Коржевский, Е.А. Юмкина // Морфология. - 2005 - Т. 127, вып. 2. - С. 76-77; Коржевский Д.Э. Иммуноцитохимический метод выявления ЕС-(энтерохромафинных) клеток эпителия слизистой оболочки кишки крысы / Д.Э. Коржевский, Р.В. Драй, С.В. Костюкевич // Морфология. - 2008. - Т. 133. - № 1. - С. 78-81]. Тому сучасні вимоги до проведення імуногістохімічного аналізу на парафінових зрізах спонукають до активного пошуку такої модифікації методу, яка б дозволила вирішити проблему збереження антигенних детермінант та з'ясування морфологічної локалізації досліджуваних антигенів у гістологічних структурах.

Відомі різні способи посилення чутливості імуногістохімічного методу з приводу визначення локалізації антигенних детермінант у парафінових зрізах. Є спосіб збереження цитоплазматичних антигенів та посилення чутливості методу після короткочасної обробки зрізів деякими протеолітичними ферментами (трипсином або проназою) [Curran R.C. Demonstration of immunoglobulin in cryostat and paraffin sections of human tonsil by immunofluorescence and immunoperoxidase techniques. Effects of processing on immunohistochemical performance of tissues and on the use of proteolytic enzymes to unmask antigens in sections / R.C. Curran., J. Gregory J. // J. Clin. Pathol. - 1978. - Vol. 31(10). - P. 974-983]. Але його застосування може призводити до часткового чи повного руйнування мембранних антигенів. Є спосіб посилення чутливості методу шляхом застосування солей деяких металів на кінцевому етапі методу. Варто відзначити, що їх застосування не стільки підвищує чутливість методу, скільки контрастує досліджувані об'єкти, перетворюючи їх золотаво-коричневе фарбування, яке отримують без застосування солей металів, у синьо-чорні кольори. Недоліками даного методу є посилення фонового забарвлення зрізів, а також те, що деякі солі металів, наприклад оксид осмію (IV), є токсичними речовинами, внаслідок чого вони є малодосяжними широкому загалу (Полак Дж. Введение в иммуноцитохимию: Современные методы и проблемы / Полак Дж., Ван Норден С. - М.: Мир. - 1987. - 80 с.). Відомий спосіб підвищення детекції антигенів на гістологічних зрізах за допомогою низьких значень рН розчинів, які використовуються в імуногістохімічному методі, зокрема на етапі обробки гістологічних зрізів первинними антитілами [Shi S.R. Antigen retrieval technique utilizing citrate buffer or urea solution for immunohistochemical demonstration of androgen receptor in formalin-fixed paraffin sections / S.R. Shi, B. Chaiwun, L. Young, R.J. Cote, C.R. Taylor // J.

Histochem, Cytochem. - 1993. - Vol. 41(11). - P. 1599-1604]. Однак відомо, що в таких випадках відмічається неспецифічне фарбування зрізів. Є дані, що використання ацетатних буферів рН 5,0-5,1 знижує чутливість методу, оскільки при низьких значеннях рН реєструється різке зниження авідності антигенів і антитіл.

5 Найбільш близьким до запропонованої корисної моделі є спосіб імуногістохімічної детекції протеїнів на гістологічних зрізах, що вибрано нами за прототип [Пат 2098825 Российская Федерация, МПК G01N33/53, G01N1/28. Способ иммуногистохимической детекции протеинов на гистологических срезах / Козлов Д.В., Жабин С.Г.; заявитель и патентообладатель Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей. - № 94003431/14; заявл. 28.01.1994, опубл., Бюл. № 3]. Суть способу полягає в наступному: проводять регідратацію гістологічних зрізів і видаляють із них залишки парафіну, блокують ендogenous пероксидазу і потім неспецифічну сорбцію імуноглобулінів, проводять обробку гістологічних зрізів первинними антитілами з наступною інкубацією їх з вторинними антитілами, обробку комплексом авідин-пероксидаза, проявку пероксидазної активності, фарбування і детекцію
10
15 протеїнів по наявності золотаво-коричневого забарвлення, при цьому перед обробкою гістологічних зрізів первинними антитілами в їх розчин додатково вводять поліетиленгліколь - 6000 в кінцевій концентрації у розчині 5 %. Недоліками відомого способу є посилення фонового забарвлення зрізів, трудомісткість та тривалість самого дослідження.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб, шляхом удосконалення
20 відомого, щоб досягти підвищення чутливості методу, зберегти нативність виявлюваних антигенів, скоротити строки проведення аналізу, покращити інформативність та достовірність імуногістохімічного методу.

Поставлену задачу вирішують створенням способу імуногістохімічної детекції пептидних комплексів на парафінових гістологічних зрізах тканин, що включає відбір тканинного матеріалу, фіксацію у нейтральному забуференому формаліні, регідратацію гістологічних зрізів і видалення із них залишків парафіну, демаскування антигену, блокування ендogenous пероксидази і потім неспецифічної сорбції імуноглобулінів, обробку гістологічних зрізів первинними та вторинними антитілами проявлення пероксидазної активності з 3-аміно-9-етилкарбазолом (ЕАК), фарбування, візуалізацію та оцінку локації пептидних комплексів в
25
30 тканинах за наявністю специфічного забарвлення продукту реакції, у якому, згідно з корисною моделлю, фіксацію тканин здійснюють у 4 % нейтральному забуференому формаліні впродовж 8 годин, а демаскування антигенної специфічності пептидних комплексів проводять із застосуванням технології мікрохвильової обробки, інкубують гістологічні зрізи з поліклональними антитілами (інактивована сироватка кроля, імунізованого поліпептидами кіркової речовини нирок та стегових м'язів щурів) з наступною інкубацією їх з вторинними антитілами (кон'югатом пероксидази хрому з моноспецифічними афінно очищеними антитілами вівці до імуноглобулінів кроля (IgG, IgA та IgM)).

Спосіб здійснюють наступним шляхом:

1. На початковому етапі роботи проведено експериментальне дослідження по підборі
40 оптимального протоколу для фіксації тканин нирок та скелетних м'язів щурів у нейтральному забуференому формаліні із максимальним збереженням виявлюваних антигенів пептидних комплексів для подальшої їх ідентифікації. Експериментальним шляхом встановлено, що стандартна фіксація у 10 % нейтральному забуференому формаліні впродовж 8 і більше годин викликає збільшення неспецифічного фону і призводить до ускладнення ідентифікації пептидних комплексів. Дослідним шляхом визначено, що фіксація тканин у 4 % нейтральному забуференому формаліні впродовж 8 годин є найбільш результативними та оптимальними для збереження антигенів та ідентифікації пептидних комплексів, не викликають розвитку посилення неспецифічного фону у тканинах нирки та скелетних м'язів щурів.

2. Матеріал для дослідження одержують за допомогою біопсії досліджуваної тканини (нирки або скелетні м'язи) та негайно поміщають у 4 % нейтральний забуферений формалін. Фіксують
50 тканини не довше 8 годин.

3. Препарати тканин нирки та стегових м'язів зневоднюють, заливають у парафін.

4. Парафінові зрізи товщиною 4-6 мкм фіксують на предметних скельцях з використанням як адгезиву 0,1 % розчину полі-L-лізину.

55 5. Проводять регідратацію зрізів тканин і видаляють з них залишки парафіну. Основна мета даного етапу - зневоднення і максимальне видалення парафіну з тканин, так як мінімальні залишки останнього приводять до підвищеного фонового забарвлення. Для цього зрізи поміщають у термостат при температурі 56 °С на 10 хвилин, потім послідовно проводять через 3 порції о-ксилолу, спирт 96° 2 порції, спирт 70°, дистильовану воду по 5 хвилини у кожній порції
60 рідині.

6. Для блокування ендогенної клітинної пероксидази препарати занурюють в 3 % розчин H_2O_2 на 5 хвилин, з наступним відмиванням у дистильованій воді протягом 5 хвилин.

7. Блокування неспецифічної сорбції імуноглобулінів досягають шляхом нанесення на зріз кіньської сироватки (Novocastra, США) на 10 хвилин.

8. Демаскування антигену (руйнування формальдегідних місточків, які утворюються в результаті фіксації формаліном) проводять із застосуванням технології мікрохвильової обробки - препарати занурюють у цитратний буфер (pH 6,0) і поміщають у мікрохвильову піч (Мрія МВ, Україна). Встановлюють потужність 650-750 Вт та час обробки - 2 рази по 5 хвилин з інтервалом між циклами 1-2 хвилини [Гуревич Л.Е. Использование в иммуногистохимических исследованиях метода восстановления антигенной специфичности воздействием микроволн на ткани, фиксированные формалином и заключенные в парафин / Л.Е. Гуревич, В.А. Исаков // Архив патологии. - 1999. - № 2. - С. 48-50]. Дія мікрохвиль дозволяє збільшити чутливість та покращити якість реакції з відповідними антигенами та суттєво покращує дифузію первинних антитіл.

9. Після закінчення обробки препарати охолоджують у цитратному буфері при кімнатній температурі 15-20 хв.

10. Після цього препарати інкубують з поліклональними антитілами до пептидних екстрактів кіркової речовини нирок та стегових м'язів, які отримують з сироватки крові кролів, попередньо імунізованих пептидними комплексами нирок та стегових м'язів щурів з додаванням 0,01 % азиду натрію у вологій камері протягом 24 годин при +4 °С.

11. Потім препарати промивають у розчині фосфатно-сольового буферу (ФСБ, pH=7,2-7,4) 2 рази по 5 хвилин.

12. Препарати інкубують з вторинними антитілами - моноспецифічними афінно очищеними антитілами вівці до імуноглобулінів IgG, IgA та IgM кроля, кон'югованих з пероксидазою хрому в розведенні 1:20 (ИМТЕК, Россия) у вологій камері при 37 °С протягом 1,5 години.

13. Препарати промивають у розчині ФСБ 2 рази по 5 хвилин.

14. На препарати наносять проявну суміші АЕК (розчин складається з 2 мг АЕК, 0,5 мл диметилформаміду, 9,5 мл 0,05 М ацетатного буферу pH 5,0, 0,3 % розчин пероксиду водню), яка утворює червоне забарвлення на місці знаходження антигену (етап проявлення пероксидазної активності). Зрізи інкубують з субстратом впродовж 10 хвилин. Реакцію зупиняють відмиванням препаратів у дистильованій воді.

15. Контрастують ядра клітин барвником гематоксиліном за методом Круцай протягом 8-10 хвилин, що дозволяє оцінити співвідношення виявлених антигенів пептидних комплексів з гістологічною будовою тканин нирки або скелетних м'язів.

16. Проводять візуальну оцінку за наявністю та інтенсивністю реакції, результати фотографують за допомогою світлового мікроскопу Leica DM500 з фотонасадкою (Leica, Німеччина, об'єктив $\times 4$, 10, 40).

17. В роботі було використано парафінові зрізи тканин нирки та м'язів стегна щурів. Як негативний контроль специфічності зв'язування слугують препарати, де замість поліклональних антитіл інкубацію проводять з неіммунною сироваткою тварин - донорів специфічних антитіл (Negative control reagent DAKO).

18. Для оцінки фонового забарвлення вторинними антитілами використовують вищеописаний метод, але без інкубування препаратів у розчині первинних поліклональних антитіл - інкубацію проводять з фосфатно-сольовим буфером (ФСБ, pH 7,2-7,4) з додаванням бичачого сироваткового антигену (БСА). У цьому випадку також контролюють виявлення неспецифічного забарвлення ендогенної пероксидази. Результати фарбування у цих ділянках мають бути негативними.

19. Як позитивний контроль використовують зрізи тканин нирки щурів, які обробляють як первинні антитіла поліклональною сироваткою кролів, імунізованих пептидними комплексами стегових м'язів, а також зрізи тканин стегових м'язів щурів, які обробляють поліклональною сироваткою кролів, імунізованих пептидними комплексами нирки. Результати дослідження підтверджують наявність позитивного забарвлення тканин.

Приклад 1

Аналіз тканинних зрізів дозволив виявити ряд деталей локалізації пептидних комплексів у нирці. Виявлено, що рівень експресії антигенів пептидного комплексу нирок був більш вираженим у юкстамедулярному, ніж у периферичному шарі кіркової речовини. Встановлено незначну експресію антигенів пептидного комплексу нирок у мозковій речовині нирки.

Встановлено експресію антигенів пептидного комплексу нирок на поверхні та всередині епітеліальних клітин проксимального і дистального звивистих каналців нефронів нирки щурів. Зареєстровано поодинокі скупчення антигенів пептидного комплексу нирок на поверхні

епітеліальних клітин кровеносних капілярів. Запропоноване технічне рішення пояснюється фіг. 1, на якій зображено: імуногістохімічне виявлення у парафінових гістологічних зрізах тканин нирок щурів антигену поліпептидного комплексу нирок у відділі проксимальних і дистальних звивистих каналців, збільшення $\times 40$.

5 Приклад 2

Дослідження локалізації пептидного комплексу стегових м'язів виявило позитивну реакцію в міосимпластах поперечнопосмугованих м'язових волокон. На поперечному зрізі тканин стегових м'язів виявлена найбільш інтенсивна реакція на даний пептидний комплекс на поверхні мембрани та в цитоплазмі міосимпластів. На поздовжньому зрізі тканини м'язів відзначено виражені у вигляді поодиноких скупчень антигени пептидного комплексу стега на поверхні міосимпластів. В рідких випадках виявлено незначні скупчення антигену пептидного комплексу стега в ендотелії кровеносних капілярів.

Запропоноване технічне рішення пояснюється фіг. 2, на якій зображено: імуногістохімічне виявлення у парафінових гістологічних зрізах поперечнопосмугованих м'язових тканин щурів антигену поліпептидного комплексу стега, збільшення $\times 40$.

Представлені результати досліджень, проведені запропонованим методом, дозволяють зробити висновок про високу інформативність виявлення зовнішньо- та внутрішньоклітинної локалізації пептидних комплексів в тканинах нирки та стегових м'язів щурів на глибокому структурно-морфологічному рівні. Продемонстровано різний рівень експресії та різноманітність локалізації пептидних комплексів у досліджених тканинах. Застосування даного методу дозволяє уникнути зайвого неспецифічного забарвлення та скоротити час на проведення дослідження без руйнування антигенних детермінант пептидних комплексів за рахунок підбору концентрації фіксатора та часу фіксації тканин, застосування технології мікрохвильової обробки для відновлення антигенної специфічності пептидних комплексів. Застосування даного методу може сприяти уточненню клітинної та тканинної локалізації і розкриттю ролі пептидних комплексів в імунних механізмах патогенезу ряду захворювань.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

30 Спосіб імуногістохімічної детекції пептидних комплексів на парафінових гістологічних зрізах тканин, що включає відбір тканинного матеріалу, фіксацію у нейтральному забуференому формаліні, регідратацію гістологічних зрізів і видалення із них залишків парафіну, демаскування антигену, блокування ендогенної пероксидази і потім неспецифічної сорбції імуноглобулінів, обробку гістологічних зрізів первинними та вторинними антитілами проявлення пероксидазної активності з 3-аміно-9-етилкарбазолом (ЕАК), фарбування, візуалізацію та оцінку локації пептидних комплексів в тканинах за наявністю специфічного забарвлення продукту реакції, який **відрізняється** тим, що фіксацію тканин здійснюють у 4% нейтральному забуференому формаліні впродовж 8 годин, а демаскування антигенної специфічності пептидних комплексів проводять із застосуванням технології мікрохвильової обробки, інкубують гістологічні зрізи з поліклональними антитілами (інактивована сироватка кроля, імунізованого поліпептидами кіркової речовини нирок та стегових м'язів щурів) з наступною інкубацією їх з вторинними антитілами (кон'югатом пероксидази хрому з моноспецифічними афінно очищеними антитілами вівці до імуноглобулінів кроля (IgG, IgA та IgM)).

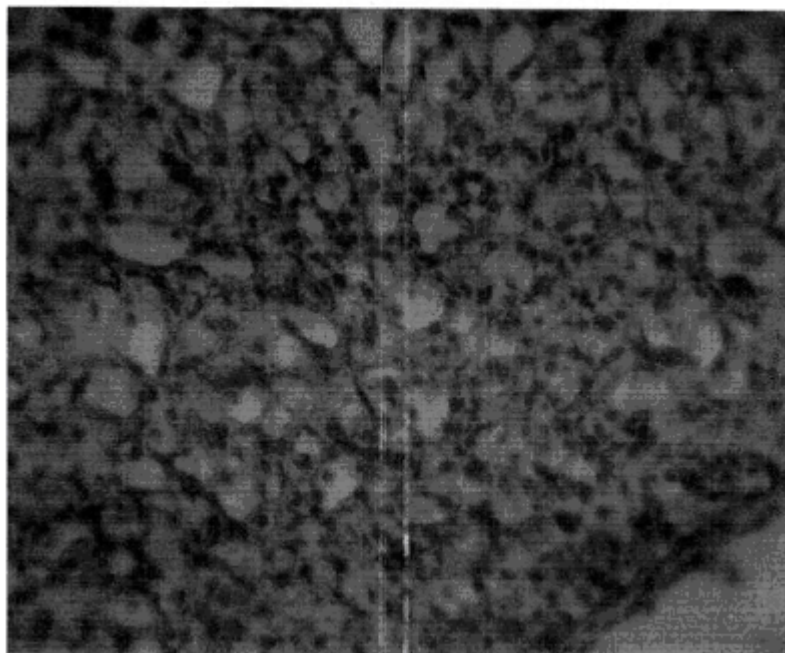


Fig. 1

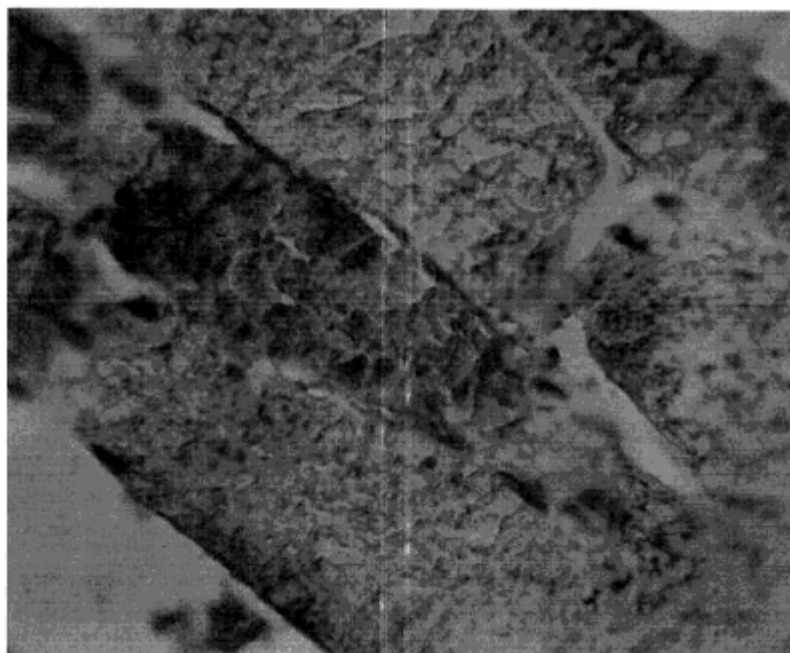


Fig. 2

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