



МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 116485

(13) U

(51) МПК

G01N 33/535 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2016 11862**

(22) Дата подання заявки: **23.11.2016**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.05.2017**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.05.2017, Бюл.№ 10**

(72) Винахідник(и):

**Білаш Сергій Михайлович (UA),
Борута Наталія Володимирівна (UA),
Шепітько Володимир Іванович (UA),
Єрошенко Галина Анатоліївна (UA),
Білаш Валентина Павлівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ
ЗАКЛАД УКРАЇНИ "УКРАЇНСЬКА
МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА
АКАДЕМІЯ",
вул. Шевченка, 23, м. Полтава, 36011 (UA)**

(54) СПОСІБ ЛЕКТИНОХІМІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ

(57) Реферат:

Спосіб лектинохімічного дослідження, при якому поміщають досліджуваний препарат у 10 % розчин формаліну з подальшою декальцинацією та заключенням у парафін за загальноприйнятою методикою. Далі парафінові зрізи дофарбовують гематоксиліном Майєра на малій експозиції.

UA 116485 U

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме до експериментальної медицини, і може бути застосована для ідентифікації вуглеводних детермінант червоного кісткового мозку на парафінових зрізах.

Відомий метод лектиногістохімії [Луцик А.Д., Детюк Е.С., Луцик М.Д. Лектины в гистохимии. - Львов: Вища школа. Изд-во при Львовском ун-те, 1989. - 144 с. Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Луцик А.Д. Лектины. - Львов: Вища школа. Изд-во при Львовском ун-те, 1981. - 156 с. Ponder B.A.G. Lectin histochemistry // Immunocytochemistry. Practical applications in pathology and biology / Ed. Polak J., van Noorden S. - Bristol, 2003. - P. 129-142.]. Завдяки простому виконанню та гарній відтворюваності результатів на парафінових зрізах метод лектиногістохімії став загальноприйнятим.

Відомий метод виявлення сіалогліканів з допомогою 1 %-го розчину альціанового синього 8GXУ при рН 2,5 [Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная // М., 1962. - 962 с.]. Метод забарвлення заснований на утворенні альціановим синім сольових зв'язків з кислотними групами глікопротеїнів, у тому числі і тих, які містять у складі молекули залишки сіалової кислоти. Розчин альціанового синього забарвлює структурні компоненти сполучної тканини і більшу частину муцинів залозистого епітелію.

Відомий також спосіб виявлення сіалогліканів при обробці гістологічних зрізів альціановим синім після метилування з подальшим омиленням. Але такий спосіб складний у технічному виконанні. Спосіб полягає у тому, що обробку зрізів проводять лектином бузини чорної, кон'югованим з пероксидазою хрому, який специфічний до залишків сіалової кислоти, D-галактози і NAcD-галактозаміну. Для блокування останніх зрізи попередньо інкубували у розчинах нативних лектинів (не кон'югованих з пероксидазою) арахісу (PNA) і сої (SBA).

Суть відмінностей запропонованого способу полягає в тому, що для вибіркового виявлення залишків сіалових кислот у складі молекул глікополімерів використовується блокування залишків D-галактози і NAcD-галактозаміну негативними лектинами арахісу і сої, а після цього проводиться візуалізація залишків сіалової кислоти за допомогою кон'югату лектину бузини чорної з пероксидазою. Спосіб виконується наступним шляхом. Із фіксованої 10 % нейтральним у формаліні і заключної у парафін тканини ми готовили зрізи товщиною 5-7 мкм.

Після депарафінації активність ендогенної пероксидази інгібували при інкубації зрізів у метанолі, який містив 0,3 % H_2O_2 і через спирти низхідної концентрації доводили до забуференого фізіологічного розчину (ЗФР). Обробляти лектином можна і кріостатні зрізи. З метою блокування субтермінальних залишків D-галактози і NAc-D-галактозаміну, перед обробкою кон'югованим з пероксидазою лектином бузини чорної проводили їх інкубацію у нативних розчинах лектину арахісу і сої протягом 30 хв. при концентрації лектину у інкубаційному розчині 50 мкг/мл. Після відмивання надлишку лектинів арахіса і сої у двох порціях ЗФР, зрізи обробляли лектином бузини чорної кон'югованим з пероксидазою. Активність пероксидази проявляли за допомогою діамінобензидину в присутності 0,0015 % H_2O_2 , препарати після дегідратації заключали у канадський бальзам. Як контроль проводили обробку препаратів нейрамінідазою (ферментативне видалення сіалових кислот), а також м'яке метилування при 37 °С і "жорстке" метилування при 60 °С з подальшим омиленням. Спосіб апробований на підщелепних слинних залозах вівці. Після обробки препаратів підщелепних слинних залоз вівці запропонованим нами методом ми встановили, що найбільш інтенсивно забарвлюються мукоцити, на тлі інших ареактивних структур [Яценко А.М. Лектины как гистохимические маркеры в норме и патологии дис. д-ра мед. наук: 14.03.09. - Львів, 2004-281с.].

Однак, суттєвим недоліком даного способу є те, що у випадку коли структурні компоненти того чи іншого органу не мають вуглеводної специфічності до того чи іншого лектину, ці структури не забарвлюються, що унеможливує їх подальшу ідентифікацію. Тому, вище зазначені методи забарвлення, не можуть бути специфічними і однонаправленими при подібних експериментальних дослідженнях.

В основу корисної моделі поставлена задача модифікувати спосіб лектинохімічного дослідження.

Поставлена задача вирішується шляхом створення способу лектинохімічного дослідження, при якому поміщають досліджуваний препарат у 10 % розчин формаліну з подальшою декальцинацією та заключенням у парафін за загальноприйнятою методикою, згідно з корисною моделлю, далі парафінові зрізи дофарбовують гематоксиліном Майєра на малій експозиції.

Запропонований спосіб здійснюється наступним чином:

1. Шматочки тканин червоного кісткового мозку стегнової кістки щурів 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 декальціновані фрагменти червоного кісткового мозку заключають в парафін за загальноприйнятою методикою.

3. Зрізи товщиною 7-8 мкм звільняють від парафіну шляхом занурення на 5 хвилин у ксилол, після чого ретельно відмивають абсолютним етанолом, 90 %-му, 80 %-му, 70 %-му розчині етилового спирту та 50 %-му етанолі, з розрахунку по 10 хвилин кожна і проводять через спирти понижуючої концентрації до дистильованої води.

4. Потім препарати підлягали лектинохімічному дослідженню із таким спектром лектинів, як лектин виноградного слимака, лектин кори золотого дощу, лектин арахісу, лектин насіння сої, лектин бузини чорної, лектин омели білої та лектин зародків пшениці.

5. Після цього зрізи дофарбовують гематоксиліном Майєра при малій експозиції. Для приготування барвника використовуємо гематоксилін кристалічний - 1,0 г; дистильовану воду - 1000,0 мл. Гематоксилін розчиняємо при кімнатній температурі, після цього додаємо галун та окислювач і їх розчиняємо: галун алюмокалієвий або алюмоамонійний - 50,5 г та натрій/калій йоднуватокислий ($\text{NaIO}_3/\text{KIO}_3$) - 0.2 г. Барвник спочатку набуває світло-фіолетового кольору, а пізніше швидко темніє. У потемнілий розчин додаємо лимонну кислоту кристалічну - 1,0 г та 50,0 г хлоралгідрату. Розчин набуває червонуватого відтінку. Після розчинення всіх компонентів барвник фільтруємо і використовуємо для забарвлення парафінових зрізів.

6. Препарат витримуємо у барвнику протягом 1 хв. Ретельно промиваємо у кількох змінах води (10-20 хв. і більше) для повного видалення залишків кислоти.

7. Далі препарати промиваємо в дистильованій воді, висушуємо та заключаємо під покривні скельця.

Таким чином, запропонований спосіб дозволяє виявити вуглеводну специфічність до того чи іншого лектину глікопротеїнових комплексів еритробластних островців червоного кісткового мозку на парафінових зрізах і зберігає гістотопографію клітинних елементів.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб лектинохімічного дослідження, при якому поміщають досліджуваний препарат у 10 % розчин формаліну з подальшою декальцинацією та заключенням у парафін за загальноприйнятою методикою, який **відрізняється** тим, що далі парафінові зрізи дофарбовують гематоксиліном Майєра на малій експозиції.