



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **49847** (13) **U**
(51) МПК (2009)
G01N 33/50

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ БЕТА-КЛІТИН АДЕНОГІПОФІЗА

1

2

(21) u200912692

(22) 07.12.2009

(24) 11.05.2010

(46) 11.05.2010, Бюл.№ 9, 2010 р.

(72) ЄЩЕНКО ЮЛІЯ ВІТАЛІІВНА

(73) ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
"ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ"
МІНІСТЕРСТВА ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

(57) Спосіб визначення бета-клітин аденогіпофіза,
що включає фіксацію гіпофіза, доведення його до

парафіну, приготування, забарвлення та мікроскопування зрізів, який **відрізняється** тим, що фіксацію гіпофіза здійснюють у холодному ацетоні, забарвлення депарафінованих зрізів виконують ацетоновим розчином 8-/бензолсульфоніламіно-/хіноліну, потім занурюють їх у гарячий розчин їдко-го натру, підсушують на повітрі та досліджують бета-клітини під люмінесцентним мікроскопом (світлофільтри ФС-1, ЖС-18) за жовто-зеленою люмінесценцією.

Спосіб відноситься до лабораторних методів дослідження клітин гіпофіза.

Відомий метод Ман-Лечи визначення клітин гіпофіза на парафінових зрізах (Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия.- М.: Мир, 1969. -562с, С.280.), який включає: фіксацію гіпофізу у спирті та доведення його до парафіну, приготування зрізів, їх депарафінування та обробку в ксилолах та спиртах, промивання водою, забарвлення зрізів упродовж 3-5хв. галуновим гематоксиліном, промивання водою, забарвлення 1% розчином міцного зеленого в 0,5% оцтової кислоти, споліскування водою, оброблення водним розчином Люголю, промивання спиртом, занурювання у спиртовий розчин фосфорновольфрамової кислоти, споліскування водою, зневоднювання та замикання у бальзам, дослідження за допомогою світлового мікроскопа. На препаратах бета-клітини аденогіпофізу забарвлені в чорнато-червоний колір.

Головним недоліком цього способу є низька специфічність забарвлення бета-клітин аденогіпофіза, тому цей спосіб не дозволяє отримувати стабільні та порівняльні результати, проводити кількісну оцінку інтенсивності забарвлення бета-клітин.

Спільними, із рішенням, що заявляється, ознаками є:

фіксація гіпофізу, доведення його до парафіна, приготування зрізів, забарвлення зрізів, мікроскопування.

Відомий спосіб забарвлення аденогіпофіза за Кареннії-Тейлором (Лилли Р. Патогистологическая

техника и практическая гистохимия.- М.: Мир, 1969. -562с, С.183.), який включає фіксацію гіпофіза у формаліні, зневоднення його та доведення до парафіну, приготування зрізів, їх депарафінування та обробку в ксилолах та спиртах, промивання водою, забарвлення водним розчином бензо-чисто-синього, промивання водою, забарвлення галуновим гематоксиліном, оброблення розчином фосфорнокислого натрію, споліскування водою, забарвлення еозином, споліскування водою, зневоднювання та замикання у бальзам, дослідження за допомогою світлового мікроскопа. На препаратах бета-клітини гіпофіза яскраво-сині.

Недоліком цього способу є неспецифічне забарвлення, тому що забарвлюються також інші клітини. Спосіб не дозволяє отримувати стабільні та порівняльні результати, проводити кількісну оцінку інтенсивності забарвлення бета-клітин аденогіпофізу.

Ознаками, спільними із рішенням, що заявляється, є: фіксація гіпофіза, доведення до парафіну, підготування зрізів, їх забарвлення, мікроскопування.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб визначення бета-клітин аденогіпофіза, який, шляхом їх селективного забарвлення флуорохромом, дозволяє отримувати стабільні та порівняльні результати.

Суттєвими ознаками способу є:

- фіксація гіпофіза в холодному ацетоні;
- доведення його до парафіну;
- приготування зрізів;
- їх депарафінування;

(13) **U**

(11) **49847**

(19) **UA**

- забарвлення зрізів гіпофізу 8-бензолсульфоніламіно/-хіноліном (8-БСХ);
- занурення їх у гарячий розчин їдкого натру;
- підсушування на повітрі;
- дослідження бета-клітин під люмінесцентним мікроскопом (світлофільтри ФС-1, ЖС-18) за жовто-зеленою люмінесценцією. Відмінними від найближчого аналога ознаками є:

- фіксація гіпофізу в холодному ацетоні;
- забарвлення депарафінованих зрізів 8-БСХ,
- занурювання їх у гарячий розчин їдкого натру;

- підсушування на повітрі;
- дослідження бета-клітин під люмінесцентним мікроскопом (світлофільтри ФС-1, ЖС-18) за жовто-зеленою люмінесценцією. Спосіб здійснюють таким чином: фіксують гіпофіз у холодному ацетоні при температурі $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ протягом 12 ± 5 год., проводять через два ксилоли (по 15 ± 3 хв. у кожному), суміш 50% ксилолу та 50% парафіну (впродовж 30 ± 6 хв. при $40\pm 3^{\circ}\text{C}$), два рідких парафіни (по $1,5\pm 0,5$ год. у кожному при $56\pm 5^{\circ}\text{C}$), заключають у парафін, готують зрізи, депарафінують їх шляхом проведення через два ксилоли та два спирти (по $3\pm 0,5$ хв. у кожному), обробляють $1\pm 0,5$ хв. 0,1% розчином 8-БСХ., занурюють в 0,1% розчин їдкого натру при температурі $70\pm 6^{\circ}\text{C}$, підсушують на повітрі та досліджують під люмінесцентним мікроскопом (світлофільтри ФС-1, ЖС-18). На препаратах визначається жовто-зелена люмінесценція бета-клітин. Інтенсивність реакції оцінюють за трибальною системою. За один бал приймають слабкопозитивну, два бали - помірну, три бали - виражену за інтенсивністю реакції. Середню величину інтенсивності реакції підраховують на 100 клітинах. Приклад конкретного виконання:

Приклад 1

У декапітованих контрольних (інтактних) щурів витягували гіпофіз та фіксували його в холодному

ацетоні при температурі $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ протягом 12 ± 5 год., проводили через два ксилоли (по 15 ± 3 хв. у кожному), суміш 50% ксилолу та 50% парафіну (впродовж 30 ± 6 хв. при температурі $40\pm 3^{\circ}\text{C}$, два рідких парафіни (по $1,5\pm 0,5$ год. у кожному при температурі $56\pm 5^{\circ}\text{C}$), заключаючи у парафін, готували зрізи, депарафінували їх шляхом проведення через два ксилоли та два спирти (по $3\pm 0,5$ хв. у кожному), обробляли 0,1% розчином 8-БСХ впродовж $1\pm 0,5$ хв., занурювали зрізи в 0,1% розчин їдкого натру при температурі $70\pm 6^{\circ}\text{C}$, підсушували на повітрі та досліджували під люмінесцентним мікроскопом (світлофільтри ФС-1, ЖС-18). На препаратах визначалася жовто-зелена люмінесценція бета-клітин. Інтенсивність реакції оцінювали за трибальною системою. За один бал приймали слабкопозитивну, два бали - помірну, три бали - виражену за інтенсивністю реакції. Середню величину інтенсивності реакції підраховували на 100 клітинах. У контрольних (інтактних) щурів інтенсивність люмінесцентної реакції 8-БСХ в бета-клітинах гіпофізу складала $1,0\pm 0,12$ умовних одиниць (балів).

Приклад 2

Щурів, які зазнавали фізичного навантаження, шляхом плавання у ванні протягом 2 годин, декапітували, витягували гіпофіз та досліджували його як вказано у прикладі 1. У щурів, які зазнали фізичного навантаження, інтенсивність реакції 8-БСХ була знижена на 33% ($P<0,001$). Фізичне навантаження викликало зменшення інтенсивності забарвлення бета-клітин аденогіпофізу, що підтверджує селективність цитохімічної реакції.

Таким чином, запропонований спосіб дозволяє швидко та селективно визначати бета-клітини аденогіпофіза, проводити напівкількісний аналіз інтенсивності їх забарвлення.