



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **51016** (13) **U**
(51) МПК (2009)
A61B 10/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ТИПУ КОЛАГЕНОВИХ ВОЛОКОН

1

2

(21) u201000958

(22) 01.02.2010

(24) 25.06.2010

(46) 25.06.2010, Бюл.№ 12, 2010 р.

(72) БОЙКО ТЕТЯНА АНАТОЛІЇВНА, ШАПОВАЛОВА ОЛЕНА ЮРІЇВНА

(73) БОЙКО ТЕТЯНА АНАТОЛІЇВНА

(57) Спосіб оцінки типу колагенових волокон, який включає заливку фрагментів нирки, що розвива-

ється, в парафін, приготування гістологічних зрізів, наступне забарвлення з реактивами, який **відрізняється** тим, що наносять на зрізи лектини окуня і омели білої, кон'юговані з пероксидазою хрину, які попередньо розводять у забуференому ізотонічному розчині, потім проводять інкубацію протягом однієї години при кімнатній температурі, далі наносять діамінобензидин, промивають в дистилаті і визначають наявність колагенових волокон.

Корисна модель відноситься до області медицини, зокрема, до ембріології і патологічної анатомії, і може бути використана для виявлення колагену першого і третього типу, які формують волокнистий каркас первинної та кінцевої нирок ембріонів людини, що розвиваються, для наукових досліджень.

В якості найближчого аналога вибраний спосіб оцінки типу колагенових волокон (Sandberg M. M. Co-expression of collagens II and XI and alternative splicing of exon 2 of collagen II in several developing human tissues / M.M.Sandberg, H.E.Hirvonen, K.J.Elima // Biochem. J. - 1993. - V. 294, N 2. - P.595-602.) в складі строми ембріональних мезо- і метанефросу, який заключається в тому, що шматочки органа заливають в парафін, готують гістологічні зрізи та забарвлюють моноклональними антитілами до колагену першого і третього типу імуногістохімічним методом за загальноприйнятою методикою.

Ознаками, що співпадають із суттєвими ознаками заявляемого способу, є: заливка фрагментів нирки, що розвивається, в парафін, приготування гістологічних зрізів, наступне забарвлення з реактивами.

Технічним результатом корисної моделі є: підвищення точності оцінки присутності колагену першого і третього типу в складі волокнистої строми мезо- і метанефросу ембріонів людини, що розвиваються, та швидкості проведення реакції для діагностики аномалій розвитку нирки у ранніх зародків людини.

Причинами, що перешкоджають досягненню очікуемого технічного результату є: тривалий пері-

од проведення реакції внаслідок великої кількості виконаних етапів і використання комплексних хімічних розчинів, які вимагають великих тимчасових витрат для їх приготування і велика кількість компонентів, складність проведення реакції.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення способу-прототипу шляхом заміни реактивів для забарвлення гістологічних парафінових зрізів мезо- і метанефросу ембріонів людини, що розвивається, на лектини окуня і омели білої, кон'юговані з пероксидазою хрину, що дозволяє більш інформативно, швидко та доступно досягти очікуемого результату.

Поставлена задача рішення тим, що в способі оцінки типу колагенових волокон, який включає заливку фрагментів нирки, що розвивається, в парафін, приготування гістологічних зрізів, наступне забарвлення з реактивами, згідно корисної моделі, наносять на зрізи лектини окуня і омели білої, кон'юговані з пероксидазою хрину, які попередньо розводять у забуференому ізотонічному розчині, потім проводять інкубацію протягом однієї години при кімнатній температурі, далі наносять діамінобензидин, промивають в дистилаті і оцінюють наявність колагенових волокон.

Між сукупністю суттєвих ознак запропонованого способу та очікуваним технічним результатом простежується наступний причинно-слідчий зв'язок: використання лектиногістохімічного методу забарвлення гістологічних парафінових зрізів складок первинної і кінцевої нирок зародків людини лектинами окуня і омели білої, кон'югованих з пероксидазою хрину, дозволяє визначити на колагенових волокнах властиві колагену першого типу

(19) **UA** (11) **51016** (13) **U**

вуглеводні детермінанти альфа-L-фукози - рецептори лектину окуня та властиві колагену третього типу, вуглеводні детермінанти N-ацетил-D-галактозаміну - рецептори лектину омели білої, виявити присутність колагену першого і третього типу в складі волокнистої строми обох нирок швидко і точно, проведення інкубації одним етапом дозволяє скоротити час реакції, а використання більш простих розчинів дозволяє

Спосіб оцінки типу колагенових волокон закладається в наступному.

Виявлення колагену першого і третього типу в мезо- і метанефросі ембріонів людини, що розвивається, із застосуванням лектинів окуня і омели білої.

Цілий маленький ембріон або фрагмент первинної або кінцевої нирки, що розвивається, фіксують 10%-м нейтральним формаліном не менш 12 годин; потім проводиться проводка в спиртах зростаючої концентрації - 70% - 20хвил., 80% - 20хвил., 96% I - 15хвил. і 96% II - 15хвил.; потім проводка по ксилолам - I, II ксилол по 5хвил. і III ксилол - 10хвил., після чого проводять заливку в парафін. Зрізи виконують на мікромомі для світлової мікроскопії товщиною 5-7мкм.

Парафінові зрізи наносять на скельця без овальбуміну і висушують в термостаті протягом 48-72 годин при температурі 42°-45°С. Депарафінізацію здійснюють в двох ксилолах, після чого проводять дегідратацію в спиртах. Потім препарати переносять в забуферений ізотонічний розчин - 3IP (8г NaCl, 0,2г KCl, 1г Na₂PO₄×12H₂O і 0,1M Na₂PO₄) при pH 7,4. Кон'югат лектину з пероксидазою разбавляють 3IP і наносять на зрізи при кімнатній температурі протягом 45-60хвил. Розведення здійснюють у концентрації згідно паспорта лектинів. Після цього препарати, поміщені в темну камеру, оброблюють тричі в 3IP по 5хвил., а потім в 3IP з 0,005%-м 3,3'-діамінобензидином і 0,015%-м

H₂O₂ протягом 0,5-5хвил. Потім препарати промивають дистильованою водою, проводять дегідратацію в спиртах зростаючої концентрації і заключають в канадський бальзам.

Інкубацію в забуферений ізотонічний розчин проводять протягом однієї години при кімнатній температурі, далі наносять діамінобензидин, промивають в дистилаті,

Спосіб ілюструється наступним прикладом його виконання.

Приклад.

Для дослідження був використаний фрагмент нирки, що розвивається. Запропонованим способом була проведена оцінка типу колагенових волокон

Аналіз одержаних результатів показав, що коричнева бензидинова мітка з'являється на колагенових волокнах першого типу - рецептори лектину окуня і колагенових волокнах третього типу - рецептори лектину омели білої волокнистої строми мезо- і метанефросу. Співвідношення колагенових волокон першого типу і колагенових волокон третього типу у розвинутому мезонефросі становить 2,6:6,1. У волокнистій стромі кінцевої нирки, що розвивається, співвідношення колагенових волокон першого і третього типу дорівнює 2,8:6,4.

Даний спосіб не вимагає додаткових матеріальних витрат порівняно зі способом-прототипом, використовують реактиви з більш низькою вартістю, без застосування складної апаратури. Використання способу підвищує точність оцінки присутності колагену першого і третього типу в складі волокнистої строми мезо- і метанефросу ембріонів людини, що розвивається, та швидкість проведення реакції для діагностики аномалій розвитку нирки у ранніх зародків людини.

Заявляємий спосіб простий та інформативний, легко виконується в умовах лектиногістохімічної лабораторії.