



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 53473

(13) A

(51) 7 G01N33/50

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВИДАЄТЬСЯ ПІД
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ
ВЛАСНИКА
ПАТЕНТУ

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ СУБКАПСУЛЯРНИХ ЛІМФОЦИТІВ У ТИМУСІ ССАВЦІВ І ПТАХІВ

1

2

(21) 2002064779

(22) 11 06 2002

(24) 15 01 2003

(46) 15 01 2003, Бюл. № 1, 2003 р.

(72) Клименко Олег Миколаєвич

(73) ІНСТИТУТ ЕПІЗООТОЛОГІЇ УААН

(57) Спосіб виявлення субкапсулярних лімфоцитів у тимусі ссавців і птахів, що включає фіксацію дослідного матеріалу, заливку в парафін, виготовлення парафінових зрізів, їх депарафінування та

виготовлення постійних гістохімічних препаратів, який відрізняється тим, що для виготовлення постійних гістохімічних препаратів використовується постановка гістохімічної реакції на фосфомоноестеразу з утворенням нерозчинного осаду сульфиду свинцю чорно-коричневого кольору, який локалізується в ділянках з підвищеною активністю ферменту - кислоти фосфомоноестерази, що свідчить про наявність даного ферменту

Винахід відноситься до біології та ветеринарної медицини, а саме до лабораторної діагностики функціональних порушень міграції претимічних попередників Т-клітин в тимус ссавців та птахів.

Лімфоїдні клітини Т-ряду, які дійшли до певного ступеня зрілості, мають достатньо високу рухливість, щоб подолати адгезивну взаємодію та мігрувати з кісткового мозку. Циркуючи з кров'ю по судинному руслу тимуса, ці клітини реагують позитивним хемотаксисом на сигнал, що виходить з клітин тимуса (макрофагів, лімфоцитів і відростчастих епітеліоцитів), потрапляють в його епітеліальний компартмент, долаючи гемато-тимічний бар'єр. Частина з цих клітин затримується на стадії ПТЛ (претимічні лімфоцити) та формує резерв для регенерації органу, без якого були б неможливі репараційні процеси в ньому. Місцем локалізації цих клітин є субкапсулярна зона часточок тимуса.

Одним з найбільш поширених способів виявлення лімфоцитів субкапсулярної зони в тимусі є спосіб лектинної гістохімії. Лімфоцити субкапсулярної зони (зовнішнього шару кори тимуса) визначаються за допомогою лектину арахіса. Суть цього способу полягає в фіксації дослідного матеріалу в суміші Буена, заливці в парафін, виготовленні парафінових зрізів, їх депарафінуванні та обробці зрізів лектином арахісу та виготовленні постійних гістохімічних препаратів (А.Д. Луцик, Е.С. Детюк, М.Д. Луцик. Лектини в гістохімії - Львів «Вища школа», 1989 - 24-36, 67).

Недоліком цього методу, як взагалі методів роботи з лектинами, є висока вартість імпортованих препаратів для проведення дослідження, а також

значна трудомісткість та складність отримання і очищення лектину у випадку використання методів препаративної біохімії при застосуванні вітчизняної сировини.

В основу винаходу поставлено задачу удосконалити спосіб виявлення субкапсулярних лімфоцитів тимуса, шляхом заміни обробки препарату лектином арахісу постановкою гістохімічної реакції із солями металів, що приводить до утворення нерозчинного забарвленого осаду.

Перевага даного способу полягає в тому, що використання розчинів солей металів не потребує використання лектинів, їхньої очистки та дає чітку, стійку картину параметрів та локалізації субкапсулярних лімфоцитів тимуса.

Суть способу полягає в тому, що для виявлення субкапсулярних лімфоцитів у тимусі ссавців і птахів та виготовлення постійних гістохімічних препаратів використовується постановка гістохімічної реакції на фосфомоноестеразу з утворенням нерозчинного осаду сульфиду свинцю чорно-коричневого кольору, який локалізується в ділянках з підвищеною активністю ферменту, що свідчить про наявність ферменту - кислоти фосфомоноестерази.

Кисла фосфомоноестераза є гідролазою, тобто ферментом, який здійснює каталітичну дію при участі води та діє на естерази. Цей фермент належить до класу гідролаз, підкласу гідролаз фосфомоноєфірів та має систематичну назву фосфогідролаз моноєфірів ортофосфорної кислоти (КФ 3.1.3.2) (А.И. Кононский, 1976).

Як інкубаційне середовище використовують

(13) A

(11) 53473

(19) UA

ацетатний буфер, в якому розчинені гліцерофосфат натрію і нітрат свинцю. При каталітичній дії кислоти фосфомоноестерази відбувається гідроліз гліцерофосфату з утворенням дигідрофосфату натрію, який, в свою чергу, вступає в реакцію з нітратом свинцю з утворенням дигідрофосфату свинцю. При обробці реагентом - сульфідом амонію в місцях локалізації ферменту утворюється осад сульфідів свинцю чорно-коричневого кольору.

Спосіб здійснюють таким чином: проводять фіксацію дослідного матеріалу в 10% розчині нейтрального формаліну з подальшою заливкою в парафін. Після чого виготовляють парафінові зрізи, депарафінують їх, поміщають в інкубаційне середовище на 24 год при 37°C. Інкубаційне середовище складається з ацетатного буферу, в якому розчинені гліцерофосфат натрію і нітрат свинцю. При каталітичній дії кислоти фосфомоноестерази відбувається гідроліз гліцерофосфату з утворенням дигідрофосфату натрію, який, в свою чергу, вступає в реакцію з нітратом свинцю з утворенням дигідрофосфату свинцю. Зрізи промивають у дистильованій воді, переносять у розчин оцтової кислоти на 2хв, сполоскують у дистильованій воді і переносять в розчин сульфідів амонію на 2хв. Після

проведення обробки гістозрізів сульфідом амонію, як реагентом, локалізацію ферменту визначають за локалізацією осаду сульфідів свинцю чорно-коричневого кольору і виготовляють постійні гістологічні препарати.

Інтенсивність гістохімічної реакції на постійних препаратах оцінюється за допомогою мікроскопії. При постановці гістохімічних реакцій на кислоту фосфатазу ділянки підвищеної ферментативної активності чітко обмежені субкапсулярною зоною. Нерозчинний осад сульфідів свинцю локалізується чітко по периметру часточок тимуса. В окремих випадках, при наявності дифузії продуктів реакції, кислота фосфатаза розташована у вигляді осаду не тільки в лімфоцитах, але і в міжклітинних просторах, але її розташування завжди обмежене субкапсулярною зоною. Виключення становить певна ферментативна активність кислоти фосфатази в місцях розташування тимічних тілець.

Було досліджено 30 проб тканин тимуса великої рогатої худоби симентальської та чорно-рябої породи та 20 курей породи леггорн різних вікових груп. Результати дослідження доводять, що спосіб дозволяє чітко виявляти кількість, розміри та морфологічні показники епітеліальних клітин тмурської породи.