



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **54040** (13) **U**
(51) МПК (2009)
G01N 1/28МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ІЗОЛЬОВАНИХ КЛІТИН З МІКРОЯДРАМИ ІЗ ЕПІТЕЛІУ ШКІРИ**

1

2

(21) u201004852

(22) 22.04.2010

(24) 25.10.2010

(46) 25.10.2010, Бюл.№ 20, 2010 р.

(72) ЧЕРНИЧЕНКО ІГОР ОЛЕКСІЙОВИЧ, БАЛЕНКО НіНА ВАСИЛІВНА, ОСТАШ ОЛЬГА МИХАЙЛІВНА, СОВЕРТКОВА ЛАРИСА СТЕПАНІВНА

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ГІГІЄНИ ТА МЕДИЧНОЇ ЕКОЛОГІЇ ІМ. О.М.МАРЗЄЄВА АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ"

(57) Спосіб отримання ізольованих клітин з мікроядрами із епітелію шкіри, що включає фіксування матеріалу у розчині формаліну, лужну дисоціацію досліджуваного матеріалу, відокремлення епітелію, витримання у дистильованій воді, суспензування, центрифугування, виготовлення мазків з подальшим їх фарбуванням, який **відрізняється** тим, що лужну дисоціацію проводять протягом 13-14 годин при температурі 18-19°C, а центрифугування - протягом 9-10хв.

Корисна модель відноситься до дослідження та аналізу матеріалів шляхом визначення їх фізичних та хімічних властивостей, зокрема до підготовки зразків для досліджень клітин епітелію шкіри шляхом мікроядерного тестування і може бути використаний для оцінки генотоксичних властивостей ксенобіотиків.

Відомим є спосіб підготування епітеліальних клітин шлунково-кишкового тракту до гістологічних досліджень клітин з мікроядрами, який передбачає використання нефіксованого біологічного матеріалу шляхом його подрібнення у краплі сироватки крові, фільтруванні, промиванні сироваткою, центрифугуванні, суспензуванні та виготовленні мазків з подальшим їх фарбуванню у розчинах азура II і еозина. (див. Патент №1735737 A1, SU МПК G01N1/28 заявл. 31.08.1989, опублік. Бюл. №19, 1992р.).

Недоліками цього способу є використання нефіксованого, свіжого біологічного матеріалу, який неможливо зберігати тривалий час, як це необхідно в умовах хронічного досліду з великою кількістю піддослідних тварин одночасно. Крім того, біопатат обробляють та промивають у сироватці крові, що веде до подорожчання та технічного ускладнення таких досліджень.

Найбільш близьким до заявленого за технічною суттю є спосіб отримання ізольованих клітин з мікроядрами на суспензійних препаратах із органів піддослідних тварин, зокрема із передшлунку, оскільки епітелій передшлунку є найбільш близьким за структурою до покривного епітелію шкіри. Спосіб полягає у фіксуванні шматочка передшлунку експериментальних тварин розчином формаліну, промиванні від формаліну, проведенні лужної дисоціації епітелію передшлунку протягом 16-17 годин при температурі 20-21°C, зіскоблювання епітелію скальпелем у мікропробірку з дистильованою водою і піпетування до утворення суспензії клітин, центрифугування протягом 6-6,5хв. при 1500об/хв., виготовлення мазків із отриманої суспензії з подальшим їх фарбуванням [див. Методичні вказівки «Оценка мутагенной активности факторов окружающей среды в клетках разных органов млекопитающих микроядерным методом.- Москва, 2001.-22с.].

До недоліків цього способу відноситься те, що задані параметри, а саме, температура, тривалість проведення лужної дисоціації клітин епітелію передшлунку та термін центрифугування, як виявилось, непридатні для отримання якісної суспензії клітин із епітелію шкіри, тому що останні є більш стійкими до дії луку.

В основу способу, який пропонується, поставлено завдання розширення діапазону можливих видів тканин, які можна використати для оцінки генотоксичних змін, що відбуваються в організмі під впливом факторів довкілля за допомогою МЯ-тестів. Це стосується речовин, які потрапляють до організму переважно шляхом нашкірної дії.

Поставлене завдання вирішено тим, що в способі отримання ізольованих клітин з мікроядрами із епітелію шкіри, що включає фіксування матеріалу у розчині формаліну, лужну дисоціацію, відокремлення епітелію, витримання у дистильованій воді, суспензування, центрифугування,

(13) **U**(11) **54040**(19) **UA**

виготовлення мазків із суспензії клітин з подальшим їх фарбуванням, згідно із запропонованим рішенням, лужну дисоціацію проводять протягом 13-14 годин при температурі 18-19°C, а центрифугування протягом 9-10хв.

Спосіб дозволяє досягти повної дисоціації епітелію шкіри із отриманням якісної суспензії, яка містить цілі, неушкоджені ізольовані клітини, кількість яких складає 80-90%, та знижує ризик отримання зруйнованих клітин («голі» ядра) до 10-20%.

Спосіб здійснюється наступним чином:

Шматочок шкіри, зафіксований у розчині формаліну промивають у дистильованій воді, після чого піддають лужній дисоціації шляхом обробки 50% КОН протягом 13-14 годин при температурі 18-19°C у центрифужній пробірці. Зливають розчин лугу і додають у пробірку дистильовану воду. Виймають шматочок шкіри, закріплюють його спеціальною голкою на піноспластовій поверхні та обережно зіскоблюють скальпелем клітини епітелію шкіри у мікропробірку з дистильованою водою і витримують 2 години при температурі 20-21°C. Суспензування проводять обережним піпетуванням суміші. Подальше центрифугування здійснюють протягом 9-10хв. при 1500об/хв. Процедуру повторюють двічі. Надосадову рідину видаляють, краплю суспензії наносять на поверхню предметного скла для виготовлення мазків з подальшим їх фарбуванням.

Приклад здійснення способу:

Ділянку шкіри миші, яку умертвляли шляхом декапітації, вирізали на місці аплікацій досліджуваної речовини у розмірі 5×15мм), промивали та фіксували у 10% розчині формаліну протягом 2-х тижнів

Зафіксований шматочок шкіри промивали у проточній воді 8 годин. Відміту від формаліну шкіру переносили у центрифужні пробірки, заливали 1,5мл 50% лугу та витримували у ньому 13-14 годин при температурі 18-19°C. Далі лужний розчин

зливали і додавали у пробірку дистильовану воду. Оброблений таким чином шматочок шкіри виймали та фіксували голками на пінопластиковому століку. Обережно зіскоблювали епітелій шкіри скальпелем у мікропробірку з дистильованою водою та витримували при 20°C протягом 2 годин. Далі проводили дуже обережне піпетування до утворення суспензії, та центрифугування протягом 9-10хв. при 1500об/хв. Видаляли надосадову рідину та повторно заливали дистильованою водою. Краплю суспензії наносили за допомогою мікропіпетки з пластмасовою насадкою на край сухого, ретельно знежиреного скла. Шліфоване скло підводили до краплі суспензії і робили мазок під кутом 45°. Щільність розташування клітин контролювали під мікроскопом.

Препарат занурювали на 10хв. у виготовлену ex tempore суміш етилового спирту та оцтової кислоти (3:1) та висушували у повітрі. Фарбування мазків проводили 2,5% розчином орсеїну при температурі 37°C протягом 1 години. Надалі промивали 45% оцтовою кислотою 5-10сек. та у дистильованій воді двічі по 3-5сек. Цитоплазму клітин дофарбовували 1% спиртовим розчином фарбника світлого зеленого «Lichtgrun SF» протягом 1хв., після чого двічі промивали дистильованою водою та просушували предметне скло у повітрі.

Отримані препарати аналізували під мікроскопом за допомогою об'єктива з масляною імерсією при збільшенні 10×90 - 10×100 для виявлення та підрахунку кількості клітин з мікроядрами на кожну 1000 ізольованих клітин.

Таким чином, запропонований спосіб характеризується розширенням діапазону видів тканин, які можливо використовувати для оцінки генотоксичності ксенобіотиків мікроядерним методом, зокрема шкіри, при дослідженні речовин переважно місцевої дії та скороченням часу на проведення таких досліджень.