



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 57453

(13) A

(51) 7 G01N21/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ПРЕМЕДУЛЯРНОЇ ЗОНИ ТИМУСА ССАВЦІВ ЗА АКТИВНІСТЮ НЕСПЕЦИФІЧНОЇ ЕСТЕРАЗИ

1

2

(21) 2002108350

(22) 22 10 2002

(24) 16 06 2003

(46) 16 06 2003, Бюл. № 6, 2003 р.

(72) Клименко Олег Миколайович, Коротюк Галина Володимирівна, Воловик Катерина Макарівна

(73) Клименко Олег Миколайович, Коротюк Галина Володимирівна, Воловик Катерина Макарівна

(57) Спосіб визначення премедулярної зони тимуса ссавців за активністю неспецифічної естерази, що включає фіксацію дослідного матеріалу, залив-

ку в парафін, виготовлення парафінових зрізів, їх депарафінування та виготовлення постійних гістохімічних препаратів, який відрізняється тим, що додатково використовують постановку гістохімічної якісної реакції на неспецифічну естеразу з  $\alpha$ -нафтилацетатом, внаслідок якої місця розміщення неспецифічної естерази забарвлюються в чорний колір, що вказує на наявність даного ферменту і на розміщення премедулярної зони тимуса

Спосіб визначення премедулярної зони тимуса ссавців за активністю неспецифічної естерази відноситься до гістохімії, гістології, біологічної хімії, і може бути використаний для визначення розташування премедулярної зони в тимусі ссавців.

За конфігурацією, кількістю та щільністю розташування клітин, клітинним складом в часточках та гістохімічними характеристиками субкапсулярна, кортикальна, премедулярна та медулярна зони в сільськогосподарських тварин мають певні відмінності.

Лімфоцити премедулярної зони тимуса ссавців виділяються лізосомальними та мітосомальними фракціями і наявність макрофагального внутрішньотимусного бар'єру. Активність неспецифічної естерази характерна для більшості часточок і проявляється як в окремих клітинах, так і в угруповуваннях клітин премедулярної зони. Цю властивість лімфоцитів використовують для визначення розміщення премедулярної зони в тимусі.

Одним з найбільш поширених способів виявлення лімфоцитів премедулярної зони в тимусі є спосіб лектинної гістохімії. Лімфоцити премедулярної зони визначаються за допомогою пектинів. Суть цього способу полягає в фіксації дослідного матеріалу в суміші Буена, заливці в парафін, виготовленні парафінових зрізів, їх депарафінуванні та обробці зрізів пектинами 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 пектинами, є висока вартість імпортованих препаратів для проведення дослідження, а також значна трудомісткість та складність отримання і очищення пектинів у випадку використання методів препаративної біохімії при застосуванні втисненої сировини.

В основу винаходу поставлено задачу розробити спосіб визначення премедулярної зони тимуса ссавців за допомогою якісної реакції на неспецифічну естеразу з  $\alpha$ -нафтилацетатом.

Поставлена задача вирішується тим, що суть способу полягає у фіксації дослідного матеріалу, заливці в парафін, виготовленні парафінових зрізів, їх депарафінуванні, та виготовлення постійних гістохімічних препаратів і відрізняється тим, що для визначення премедулярної зони використовується постановка гістохімічної якісної реакції на неспецифічну естеразу з  $\alpha$ -нафтилацетатом. Неспецифічна естераза лімфоцитів тимуса ссавців має здатність гідролізувати  $\alpha$ -нафтилацетат до  $\alpha$ -нафтолу і оцтової кислоти,  $\alpha$ -нафтол, в свою чергу, вступає в реакцію діазосполучення, в результаті чого місця розміщення неспецифічної естерази забарвлюються в чорний колір, що свідчить про наявність даного ферменту і вказує на розміщення премедулярної зони тимуса.

Спосіб здійснюється таким чином. Проводять фіксацію дослідного матеріалу в 10% розчині ней-

(13) A

(11) 57453

(19) UA

трального формаліну з подальшою заливкою в парафін. Після чого виготовляють парафінові зрізи, депарафінують їх.

Інкубаційне середовище наносять на 1-1,5хв. Інкубаційне середовище складається з  $\alpha$ -нафтилацетату і барвника прочного синього, розчинених у 0,1М фосфатному буфері (рН=7,4). Промивають проточною водою протягом 2хв, зневоднюють, освітлюють ксиолом та виготовлюють постійний гістологічний препарат.

Розташування премедулярної зони визнача-

ють за допомогою мікроскопії. Премедулярна зона виявляється за наявністю продуктів реакції діазосполучення чорного кольору, що локалізуються в лімфоцитах премедулярної зони.

Було досліджено 40 проб тканин тимуса великої рогатої худоби, 20 проб тимуса свиней, 20 проб тимуса овець.

Результати досліджень показали, що даний спосіб дає можливість чітко виявляти розташування премедулярної зони в тимусі ссавців.