



УКРАЇНА

(19) UA (11) 17837 (13) U
(51) МПК (2006)
G01N 13/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ІНСУЛІНПРОДУКУЮЧИХ КЛІТИН

1

(21) u200604222

(22) 17.04.2006

(24) 16.10.2006

(46) 16.10.2006, Бюл. № 10, 2006 р.

(72) Григорова Наталія Володимирівна, Єщенко
Юлія Віталіївна, Бовт Валентина Дем'янівна, Єще-
нко Віталій Андрійович

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

(57) Спосіб визначення інсулінпродукуючих клітин,
що полягає у фіксації шматочків підшлункової за-

2

лози, доведенні їх до парафіну, готуванні зрізів, депарафінуванні, окислюванні, відновленні, промиванні дистильованою водою, забарвленні зрізів альдегідфуксином, обробці їх спиртом, промиванні водою, поміщенні у середовище та мікроскопуванні, який **відрізняється** тим, що зрізи переносять безпосередньо в пробірку, в якій послідовно проводять депарафінування, обробку окислювачем, відновником, дистильованою водою, барвником, спиртом та водою, після цього зрізи розміщують на предметні стекла та поміщають у гліцерин-желатин.

Спосіб відноситься до гістологічних методів і стосується способів визначення інсулінпродукуючих клітин.

Відомий спосіб визначення інсулінпродукуючих клітин [Торопцев І.В., Єщенко В.А. Експериментальний дитизоновий діабет. - Томск.: Изд-во Томского ун-та, 1975, с.19-20], що полягає в забарвленні гематоксилін-флоксином депарафінованих зрізів підшлункової залози, яку фіксували в рідині Буена. Спосіб здійснюють таким чином: Шматочки підшлункової залози фіксують протягом 1 доби в суміші, яка містить 15мл насиченого розчину пікринової кислоти, 5мл нейтрального формаліну, 1мл льодяної оцтової кислоти. Потім шматочки проводять через серію спиртів зростаючої концентрації (70°-ний, 80°-ний, 90°-ний, 96°-ний, абсолютний - по 4год. в кожному), два ксилоли (по 15хв. у кожному), суміш 50% ксилолу та 50% парафіну (протягом 30хв. при 37°С), два рідких парафіни (по 1,5год. в кожному при 56°С), заливають у парафін. Готують зрізи. Депарафінування зрізів проводять витримуванням їх у двох ксилолах (по 3хв. в кожному), спиртах зниженої концентрації (абсолютному, 90°-ному, 80°-ному, 70°-ному по 3хв. в кожному). Після промивання протягом 5хв. у водопровідній воді зрізи витримують до порудіння в окислювачі (суміш 20мл 2,5%-ного розчину марганцевокислого калію, 20мл 5%-ного розчину сірчаної кислоти та 80мл дистильованої води) і відновнику (2,5%-ному розчині щавлевої кислоти).

Потім зрізи промивають 5хв. у водопровідній воді та забарвлюють протягом 6хв, сумішшю, яка містить гематоксилін. Для виготовлення цієї суміші беруть 50мл 1%-ного розчину гематоксиліну, додають до нього 50мл 1%-ного розчину біхромату калію та 1мл 5%-ного розчину сірчаної кислоти. Забарвлені зрізи диференціюють під мікроскопом за допомогою 0,5%-ного розчину соляної кислоти на спирті, щоб островки стали бліднішими та краще виявлялись на більш темному фоні екзокринної тканини залози. Після промивки протягом 3хв. у водопровідній воді зрізи забарвлюють 0,5%-ним розчином флоксину. Потім їх витримують протягом 2хв. в 5%-ному розчині фосфорно-вольфрамової кислоти, промивають 5хв. проточною водопровідною водою, диференціюють під мікроскопом 85°-ним спиртом, обробляють по 1-2хв. у 96°-ному та абсолютному спиртах, 2 ксилолах та заключають у бальзам. На препаратах зернистість острівцевих клітин А червоного кольору, а клітин В - сіро-блакитного.

Ознаками, спільними із запропонованим рішенням, є: фіксування шматочків підшлункової залози в рідині Буена, доведення їх до парафіну, готування зрізів, депарафінування зрізів, їх забарвлення, диференціювання, промивка водопровідною водою, заключення у середовище та мікроскопування.

Недоліками цього методу є його складність (двохступеневі забарвлення та диференціювання), а також те, що він не дозволяє чітко виявляти сіро-

(19) UA (11) 17837 (13) U

блакитну (специфічну) зернистість інсулінпродукуючих клітин.

Відомий спосіб визначення інсулінпродукуючих клітин [Гольдберг Е.Д., Ещенко В.А., Бовт В.Д. Сахарный диабет. Этиологические факторы. - Томск: из-во Томского ун-та, 1993., С.43-44], який включає: фіксування шматочків підшлункової залози протягом 1 доби в рідині Буена, яка містить 15мл насиченого розчину пікринової кислоти, 5мл нейтрального формаліну, 1мл льодяної оцтової кислоти; проведення шматочків залози через: серію спиртів зростаючої концентрації (70°-ний, 80°-ний, 90°-ний, 96°-ний, абсолютний по 4год. у кожному), два ксилоли (по 15хв. у кожному, суміш 50% ксилолу та 50% парафіну (протягом 30хв. при 37°С); заливання шматочків у парафін, приготування зрізів, їх депарафінування, для чого зрізи проводять через два ксилоли (по 3хв. у кожному) і спирти знижуваної концентрації (абсолютний, 90%-ний, 80%-ний, 70%-ний - по 3хв. в кожному) та промивають протягом 5хв. у дистильованій воді; витримування зрізів до порудіння в окислювачі (суміші 20мл 2,5%-ного розчину марганцевокислого калію, 20мл 5%-ного розчину сірчаної кислоти та 80мл дистильованої води) і знебарвлення у відновнику (2,5%-ному розчині щавлевої кислоти); промивання зрізів протягом 5хв. дистильованою водою та забарвлення протягом 6хв. розчином альдегідфуксину. Для виготовлення барвника у 25мл 70°-ного спирту розчиняють 250мг альдегідфуксину, сюди ж додають 75мл 70°-ного спирту та 1мл льодяної оцтової кислоти. Забарвлення зрізів проводять у герметично закритому посуді. Забарвлені зрізи 1хв. обробляють 96°-ним спиртом, промивають 5 хв. водопровідною водою і забарвлюють протягом 1-2хв. сумішшю Хелмі. Остання складається з 250мг ліхттрюна, 1г оранжа Ж, 0,5г фосфорно-молібденової кислоти, 0,5г хромотропа 2Р, 1мл льодяної оцтової кислоти та дистильованої води, яку додають до об'єму 100мл. Забарвлені сумішшю Хелмі зрізи промивають протягом 1-2хв. 0,2%-ним розчином оцтової кислоти. Потім їх проводять через 96°-ний та абсолютний спирти, два ксилоли (по 1-2хв. в кожному з них) та занурюють у бальзам, диференціюють під мікроскопом. На препаратах зернистість острівцевих клітин А оранжевого, а клітин В - синьо-фіолетового кольору.

Однак цей спосіб складний (передбачає двохступеневе забарвлення), має низьку чутливість і не дозволяє з високою точністю проводити дослідження інсулінпродукуючих клітин.

Ознаками, спільними з запропонованим рішенням, є: фіксування шматочків підшлункової залози та доведення їх до парафіну, готування зрізів, депарафінування зрізів, обробка в окислювачі та відновнику, промивання дистильованою водою, забарвлення розчином альдегідфуксину, обробка спиртом, промивання водопровідною водою, заключення у середовище та мікроскопічне їх дослідження.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб визначення інсулінпродукуючих клітин, який шляхом почергової обробки зрізів підшлункової залози в пробірці ксилолами, спиртами, окислювачем, відновником та барвником до-

зволяє підвищити чутливість цитохімічної реакції альдегідфуксину та отримувати стабільні, у високому ступені порівняльні результати.

Суттєвими ознаками способу є:

- фіксування шматочків підшлункової залози в рідині Буена;

- доведення їх до парафіну (шляхом витримування їх послідовно: в спиртах зростаючої концентрації (70°-; 80°-; 90°-; 96°-ний, абсолютний), у двох ксилолах, в суміші 50% ксилолу та 50% парафіну, у двох рідких парафінах; заливання в парафін);

- готування зрізів;

- перенесення зрізів безпосередньо з мікромного ножа в пробірку;

- депарафінування зрізів (шляхом обробки в пробірці ксилолами, спиртами та промивки дистильованою водою);

- обробка в пробірці окислювачем;

- обробка в пробірці відновником;

- промивка в пробірці дистильованою водою;

- обробка в пробірці барвником;

- обробка зрізів у пробірці спиртом;

- витримування зрізів у пробірці з водопровідною водою;

- виловлювання зрізів на предметні стекла;

- заключення зрізів у гліцерин-желатин;

- мікроскопування зрізів (на основі підрахунку у 100 клітинах виводять середнє значення інтенсивності цитохімічної реакції, синьо-фіолетове забарвлення панкреатичних клітин оцінюють за трьохбальною системою: за один бал приймають слабопозитивну; два бали - помірну; три бали - виражену за інтенсивністю реакцію);

Ознаками, відмінними від прототипу, є:

- перенесення зрізів безпосередньо з мікромного ножа в пробірку;

- депарафінування зрізів (шляхом обробки у пробірці ксилолами, спиртами та промивання дистильованою водою);

- обробка в пробірці окислювачем;

- обробка в пробірці відновником;

- промивка в пробірці дистильованою водою;

- обробка в пробірці барвником;

- обробка зрізів у пробірці спиртом;

- витримування зрізів у пробірці з водопровідною водою;

- виловлювання зрізів на предметні стекла;

- заключення зрізів у гліцерин-желатин.

Обробка зрізів у пробірці дозволяє: уникнути розправлення зрізів у воді, їх фіксування на предметному склі і підсушування на повітрі; чітко виявляти сіро-блакитну (специфічну) зернистість і проводити з високою точністю дослідження інсулінпродукуючих клітин.

Спосіб здійснюють таким чином:

- шматочки підшлункової залози фіксують протягом 24±5год. у рідині Буена;

- доводять їх до парафіну / шляхом витримування послідовно: в спиртах зростаючої концентрації (70°-; 80°-; 90°-; 96° -ний, абсолютний протягом 4±0,5год у кожному), у двох ксилолах (по 15хв. у кожному), в суміші 50% ксилолу та 50% парафіну при 40±2°С протягом 30±2хв., у двох рідких парафінах по 2±0,5год. у кожному при температурі 60±3°С, занурювання в парафін;

- готують зрізи товщиною $5\pm 1\text{мкм}$ і безпосередньо з мікротомного ножа переносять їх у пробірку;

- депарафінують зрізи (шляхом послідовної обробки у пробірці двома ксилолами (по $3\pm 0,5\text{хв}$ у кожному), спиртами концентрації, що знижується (абсолютний; 90° -ний; 80° -ний; 70° -ний протягом $3\pm 0,5\text{хв}$. у кожному), промивання дистильованою водою $5\pm 0,5\text{хв}$);

- витримують у пробірці до порудіння в окислювачі (суміш 20мл 2,5%-ного розчину марганцевокислого калію, 20мл 5%-ного розчину сірчаної кислоти та 80мл дистильованої води);

- знебарвлюють у пробірці у відновнику (2,5%-ному розчині щавлевої кислоти);

- промивають у пробірці дистильованою водою $5\pm 0,5\text{хв}$;

- зрізи у пробірці забарвлюють розчином альдегідфуксину протягом $6\pm 0,5\text{хв}$., для виготовлення якого у 25мл 70° -ного спирту розчиняють 250мг альдегідфуксину, сюди ж додають 75мл 70° -ного спирту та 1мл льодяної оцтової кислоти;

- обробляють у пробірці протягом $1\pm 0,2\text{хв}$. 96° -ним спиртом;

- витримують у пробірці $5\pm 0,5\text{хв}$. у водопровідній воді;

- виловлюють зрізи на предметні стекла, для чого спочатку вміст пробірки виливають у чашку Петрі з водопровідною водою;

- зрізи заключають у гліцерин-желатин;

- зрізи досліджують під мікроскопом (на основі підрахунку у 100 клітинах виводять середнє значення інтенсивності цитохімічної реакції, синьо-фіолетове забарвлення панкреатичних клітин оцінюють за трьохбальною системою: за один бал приймають слабопозитивну; два бали - помірну; три бали - виражену за інтенсивністю реакцію);

Спосіб дозволяє чітко виявляти сіро-блакитну (специфічну) зернистість і за інтенсивністю альдегідфуксинової реакції в клітинах робити висновок про вміст у них інсуліну.

Приклад конкретного виконання.

Мишу забивали декапітацією. Вилучали підшлункову залозу, шматочки якої фіксували протягом $24\pm 5\text{год}$. у рідині Буена, доводили до парафіну шляхом витримування послідовно: в спиртах зростаючої концентрації (70° -; 80° -; 90° -; 96° -ний, абсолютний протягом $4\pm 0,5\text{год}$ у кожному), у двох ксилолах (по 15хв. у кожному), в суміші 50% ксилолу та 50% парафіну при $40\pm 2^\circ\text{C}$ протягом $30\pm 2\text{хв}$., у двох рідких парафінах по $2\pm 0,5\text{год}$. у кожному при температурі $60\pm 3^\circ\text{C}$; заливали в парафін; готували зрізи товщиною $5\pm 1\text{мкм}$ і безпосередньо з мікротомного ножа переносили їх в пробірку; депарафінували їх шляхом послідовної об-

робки у пробірці двома ксилолами (по $3\pm 0,5\text{хв}$ у кожному), спиртами концентрації, що знижується (абсолютний; 90° -ний; 80° -ний; 70° -ний протягом $3\pm 0,5\text{хв}$. у кожному, промивання дистильованою водою $5\pm 0,5\text{хв}$); витримували у пробірці до порудіння в окислювачі (суміш 20мл 2,5%-ного розчину марганцевокислого калію, 20мл 5%-ного розчину сірчаної кислоти та 80мл дистильованої води); знебарвлювали у пробірці у відновнику (2,5%-ному розчині щавлевої кислоти); промивали у пробірці дистильованою водою $5\pm 0,5\text{хв}$.; зрізи у пробірці забарвлювали розчином альдегідфуксину протягом $6\pm 0,5\text{хв}$., для виготовлення якого у 25мл 70° -ного спирту розчиняли 250мг альдегідфуксину, сюди ж додавали 75мл 70° -ного спирту та 1мл льодяної оцтової кислоти; обробляли у пробірці протягом $1\pm 0,2\text{хв}$. 96° -ним спиртом; витримували у пробірці $5\pm 0,5\text{хв}$. у водопровідній воді; виловлювали зрізи на предметні стекла, для чого спочатку вміст пробірки виливали в чашку Петрі з водопровідною водою; зрізи заключаали в гліцерин-желатин.

У контрольної (інтактної) миши на препаратах інсулінпродукуючі клітини забарвлювалися в синьо-фіолетовий колір. Середня інтенсивність цитохімічної реакції складала $1,4\pm 0,11$ умовних одиниць ($p<0,01$).

Другу мишу, якої внутрішньочеревно вводили 10г/кг 40%-ного розчину глюкози, забивали через 2год. На препаратах цієї миші середня інтенсивність цитохімічної реакції складала $1,0\pm 0,08$ умовних одиниць ($p<0,01$). Глюкоза є специфічним стимулятором секреції інсуліну, з чим і пов'язане зменшення вмісту цього гормону в β -інсулоцитах.

Третя миша голодувала протягом 12год. Середня інтенсивність її цитохімічної реакції складала $1,8\pm 0,14$ умовних одиниць ($p<0,05$). Посилення реакції альдегідфуксину в інсулінпродукуючих клітинах пояснюється пригніченням їх секреторної функції при голодуванні.

Четвертої миші підшкірно вводилось 400мг/кг 5%-ного розчину алоксану, в результаті чого розвивався діабет. Тварину було забито через 5 діб після ін'єкцій. На препаратах спостерігалася повна дегрануляція інсулінпродукуючих клітин. Негативна цитохімічна реакція альдегідфуксину в інсулінпродукуючих клітинах пов'язана з відсутністю в них інсуліну в діабетичних тварин.

Спосіб відповідає критеріям корисної моделі, він дозволяє чітко виявляти сіро-блакитну (специфічну) зернистість інсулінпродукуючих клітин, проводити з високою точністю дослідження інтенсивності альдегідфуксинової реакції і робити висновок про вміст в них інсуліну.