



УКРАЇНА

(19) UA (11) 37456 (13) U
(51) МПК (2006)
A61B 10/02МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ МОРФОЛОГІЧНОЇ ВЕРИФІКАЦІЇ АПОПТОЗУ

1

2

(21) u200808708

(22) 01.07.2008

(24) 25.11.2008

(46) 25.11.2008, Бюл.№ 22, 2008 р.

(72) ЯКОВЦОВА АНТОНІНА ФЕДОРІВНА, UA, ГУ-
БІНА-ВАКУЛИК ГАЛИНА ІВАНІВНА, UA, КИХТЕН-
КО ОЛЕНА ВАЛЕРІЇВНА, UA, ГАРГІН ВІТАЛІЙ ВІ-ТАЛІЙОВИЧ, UA, МИРОШНИЧЕНКО МИХАЙЛО
СЕРГІЙОВИЧ, UA(73) ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ, UA(57) Спосіб морфологічної верифікації апоптозу,
що включає візуалізацію клітин біологічного зраз-
ка, який **відрізняється** тим, що клітини візуалізу-
ють фарбуванням їх за Ейнарсоном.

Корисна модель відноситься до медицини, а саме до патоморфології, і може бути використаною для виявлення апоптозних тілець гістохімічним методом.

Загальноновизнано, що загибель клітини може бути програмована (апоптоз). Припинення життєдіяльності клітин при апоптозі має чіткі морфологічні ознаки. Для апоптозу характерні зменшення розміру клітини, конденсація цитоплазми й внутрішньоклітинних органел, поява випинань і фрагментація клітини на апоптозні тільця, що фагоцитуються сусідніми клітинами. Реакція запалення відсутня, оскільки вміст клітини при апоптозі назовні не виходить. Спостерігається міжнуклеосомне розщеплення дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) ендонуклеазою [Завалишин І. А., Захарова М. Н. Гибель нейрона - кардинальная проблема неврологии и психиатрии // Вісник РАМН. - 1999. - №1. - С.28-33; Белушкина Н. Н., Северин С. Є. Молекулярные основы патологии апоптоза // Архив патологии. - 2001. - №1. - С.51-60; Владимирська О. Б. Апоптоз и его роль в регуляции клеточного равновесия (лекция) // Клінічна лабораторна діагностика 2002 - Апоптоз - 2002. - №1. - С.28-33].

У патоморфології методи виявлення інтенсивності апоптотичних процесів у різних органах і тканинах при нормальному функціонуванні клітинних

популяцій, а також при різних патологічних станах використовуються дуже широко. По ступені інтенсивності апоптозу судять про ступінь ушкодження клітин під впливом різних шкідливих факторів.

Дотепер найбільш популярними методиками для верифікації апоптозу в патоморфології є імуногістохімічні методи дослідження. При цьому імунні клітини (антигени) диференціюють за допомогою моноклональних антитіл (МКАТ), отриманих від різних ссавців (миші, щури, кролики, морські свинки, коні, велика й дрібна рогата худоба), до різних типів клітин фірм Dako (Данія), Serotec (Німеччина) і Chemicon (Великобританія).

Імуногістохімічне фарбування засноване на взаємодії ферменту, яким позначені антитіла, із субстратом (антигеном) і утворенням кінцевого продукту реакції. Найбільш часто для світлової мікроскопії використовується непрямий пероксидазний метод, для імунофлуоресцентної - непрямий метод Кунса.

У даний момент найпоширенішим ферментом в імуногістохімії є пероксидаза хрому. Цей фермент виділений з кореня хрому, він розщеплює перекис водню (H_2O_2). Метод визначення активності пероксидази хрому заснований на фарбуванні хромогену, що виступає в ролі донора електронів, у присутності перекису водню. Як хромоген найбільш часто використовують 3-діамінбензидін тетрахлорид (ДАБ). Продукт реакції коричневого кольору, добре помітний в світловій мікроскоп.

Методика проводиться таким чином. Матеріал фіксується в 10% розчині формальдегіду на протязі 2-3 діб. Потім шматочки тканини піддаються стандартній гістологічній парафіновій проводці [Пирс Э. Гистохимия (теоретическая и прикладная). - Москва: Иностранная литература, 1962. -

(13) U

(11) 37456

(19) UA

962 с; Лили Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. - М.: Мир, 1960. - 648 с; Микроскопическая техника: Руководство / Под ред. Д. С. Саркисова, Ю. Л. Перова. - М.: Медицина, 1996. - 544с; Меркулов Г. А. Курс патологистологической техники. - М.: Медицина, 1961. - 339 с]. Із виготовлених таким способом блоків виготовляють серійні зрізи товщиною 4-5 $\times 10^{-6}$ м. Порядок подальших дій такий:

1. Проводять депарафінування зрізів шляхом промивання спочатку в ксилолі (15-20 хвилин), потім у спиртах концентрації, що зростає: 70%, 90% абсолютний спирт (по 5-10 хвилин); промивають у дистильованій воді - 2 рази по 10-15 хвилин.

2. Зрізи поміщають у забуферений фізіологічний розчин на Тріс-Буфері (ТБС), що має рН 7,4. Інкубують 10 хвилин у термостаті при температурі 80°C.

3. Для блокування ендогенної пероксидазної активності зрізи поміщають в 1% розчин перекису водню на 20 хвилин, після чого промивають у дистильованій воді - 3 рази по 3 хвилини.

4. На зрізи наносять неімунну сироватку (донор вторинних антитіл), інкубують 30 хвилин.

5. Без промивання на зрізи наносять вторинні антитіла (кон'юговані з пероксидазою хрому антитіла проти імуноглобулінів тварини - донор первинних антитіл), інкубують 30 хвилин. Зрізи промивають в ТБС - 3 рази по 3 хвилини, потім у дистильованій воді - також 3 рази по 3 хвилини.

6. На зрізи наносять ДАБ і інкубують 15 хвилин, після чого зрізи промивають в дистильованій воді 3 рази по 3 хвилини.

7. Ядра дофарбовують гематоксиліном і накривають накривним склом.

Непрямий метод Кунса проводиться за методикою Brosman [Brosman M. Immunofluorescence bysetrovanie formal-parafinovego materialu. // Cs. patol. - 1979. - Vol. 15 (4). - P.215-220.]. У якості люмінесцентної мітки використовують F (ab)-2 - мічені фрагменти кролячих антитіл проти імуноглобулінів миші (FITS).

Методика проводиться таким способом. Матеріал фіксується в 10% розчині формальдегіду на протязі 2-3 діб. Потім шматочки тканини піддаються стандартній гістологічній парафіновій проводці [Пирс Э. Гистохимия (теоретическая и прикладная). - Москва: Иностранная литература, 1962. - 962 с; Лили Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. - М.: Мир, 1960. - 648 с; Микроскопическая техника: Руководство / Под ред. Д. С. Саркисова, Ю. Л. Перова. - М.: Медицина, 1996. - 544с; Меркулов Г. А. Курс патологистологической техники. - М.: Медицина, 1961. - 339с.]. Із виготовлених таким чином блоків виготовляють серійні зрізи товщиною 4-5 $\times 10^{-6}$ м. Порядок подальших дій такий:

1. Проводять депарафінування зрізів шляхом промивання спочатку в ксилолі (15-20 хвилин), потім у спиртах концентрації, що зростає: 70%, 90% абсолютний спирт (по 5-10 хвилин); промивають у дистильованій воді - 2 рази по 10-15 хвилин.

2. Зрізи поміщають в 1% розчин трипсину або 2,5% розчин пепсину й витримують у термостаті протягом 1 години при температурі 37°C, після чого промивають у дистильованій воді (3 рази по 10 хвилин) і занурюють у фізіологічний розчин, що має рН 7,4.

3. Зрізи горизонтально розташовують у чашках Петрі на вологому фільтрі. Готують розчин моноклональних антитіл (у співвідношенні 1:15) і капають його на скло. Чашки із препаратами накривають кришками й поміщають у термостат на 1 годину при температурі 37°C, після чого промивають у фізіологічному розчині 3-4 рази по 10 хвилин.

4. Зрізи горизонтально розташовують у чашках Петрі на вологому фільтрі. Готують розчин флуоресціюючого антиглобуліну (у співвідношенні 1:30) і капають його на скло. Чашки із препаратами накривають кришками й поміщають у термостат на 30 хвилин при температурі 37°C, після чого промивають у фізіологічному розчині 3-4 рази по 10 хвилин.

5. Скельця зі зрізами просушують у темному місці. Препарати вивчають у люмінесцентному мікроскопі.

Даний спосіб верифікації апоптозних тілець є найбільш близьким до того, що заявляється, за технічною суттю та результатом, який може бути досягнутим, тому його обрано за прототип.

Негативними якостями обох описаних вище методик є по-перше - дорожнеча реактивів, по-друге - громіздкість і трудомісткість.

У зв'язку з вищевикладеним, в основу корисної моделі покладено задачу здешевлення та спрощення способу морфологічної верифікації апоптозу.

Задачу, яку покладено в основу корисної моделі, вирішують тим, що у відомому способі морфологічної верифікації апоптозу, що включає візуалізацію клітин біологічного зразка, згідно з корисною моделлю, клітини візуалізують їх фарбуванням за Ейнарсом.

Технічний ефект корисної моделі обумовлений тим, що виявлення апоптозу клітин біологічного зразку здійснюють просто, швидко й із значним здешевленням методики при високій якості одержаних результатів.

Спосіб виконують наступним чином:

Для морфологічної верифікації апоптозу використовують фарбування біологічного зразка за Ейнарсом. При цьому одночасно офарблюють рибонуклеїнову кислоту (РНК) і ДНК. Останні, як відомо, є фрагментами ядра клітини, що гине, і виявляються вже на фінальних стадіях апоптотичного процесу.

Склад і готування барвного розчину наступні: хромові галуни - 5,0гр; галоціанін - 0,15гр. Розчин готують шляхом розчинення хромових галунів у дистильованій воді, після чого додають галоціанін. Поступово нагріваючи, його доводять до кипіння й кип'ятять 5 хвилин. Після охолодження розчин фільтрують і доводять його обсяг до 100,0мл дистильованою водою.

Методика проведення реакції включає наступні етапи:

1. Проводять депарафінування зрізів шляхом промивання спочатку в ксилолі (15-20 хвилин), потім у спиртах концентрації, що зростає: 70%, 90% абсолютний спирт (по 5-10 хвилин); промивають у дистильованій воді - 2 рази по 10-15 хвилин.

2. Зрізи поміщають у приготовлений барвний розчин на 48 годин при кімнатній температурі.

3. Зрізи промивають водопровідною водою 1-2 хвилини, споліскують дистильованою водою й збезводнюють у двох порціях 96% спирту, по 1-2 хвилини в кожній.

4. Послідовно просвітлюють зрізи в карбон-ксололі й ксилолі, потім покривають накривним склом.

Результат: структури, що містять нуклеїнові кислоти, офарблюються в сірувато-блакитний колір.

Ефективність способу ілюструють наступні приклади:

Приклад 1. Епіфіз кролика, що утримувався 6 місяців в умовах цілодобового висвітлення. Є безліч вільно лежачих апоптозних тілець. Фарбування за Ейнарсоном, збільшення в 1000 разів.

Приклад 2. Епіфіз кролика контрольної групи, що утримувались в умовах нормальної зміни денного й нічного висвітлення. Апоптозні тільца відсутні. Фарбування за Ейнарсоном, збільшення в 1000 разів.

Здешевлення способу ілюструють таблиці 1 та 2.

Таблиця 1

Назва клону	Фасовка	Ціна за упаковку (грн.)
CD ₉₅	1мл	4741,00
Каспаза-3	1мл	4466,00

В таблиці 1 наведена вартість нерозведених моноклональних антитіл виробництва фірми Dako (Данія);

Таблиця 2

Назва	фасовка	Ціна за упаковку (грн.)
Система візуалізації	15мл	3984,75
Вторинні антитіла	125мл	646,8
Імунофлуоресцентна мітка	15мл	323,4
Тріс-Буфер	10л	739,2
Хромоген	500мл	808,5

У таблиці 2 наведена вартість систем візуалізації й інших додаткових реактивів, що використовуються для постановки описаних імуногістохімічних реакцій.

Таким чином, сукупна вартість реактивів, необхідних для постановки непрямой реакції Кунса з CD₉₅ становить 5064грн 40коп, з каспазою-3 -

4789грн 40коп. Вартість реактивів для непрямой пероксидазної реакції з CD₉₅ становить 10 тисяч 920грн 05коп, з каспазою-3 - 10 тисяч 15грн 50 копійок.

При цьому вартість реактивів, необхідних для виконання способу, що заявляється, не перевищує 150,0грн.