



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 3907

(13) U

(51) 7 G01N1/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПІДГОТОВКИ ТРЕПАНОБІОПТАТУ КІСТКОВОГО МОЗКУ ДЛЯ ГІСТОЛОГІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ

1

2

(21) 20040403203

(22) 28.04.2004

(24) 15.12.2004

(46) 15.12.2004, Бюл. №12, 2004р.

(72) Грабовий Олександр Миколайович, Каднікова
Тетяна Вікторівна, Поліщук Оксана Миколаївна,
Кабаченко Ірина Миколаївна, Пономаренко Олек-
сандра Борисівна(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ(57) Спосіб підготовки трепанобіоптату кісткового
мозку для гістологічного дослідження, що включає

його фіксацію, декальцинацію, зневоднення, обробку целлоїдином та ущільнення у парафіні, який відрізняється тим, що трепанобіоптат фіксують у ізоосмолярній рідині, що складається з 10 часток формаліну та 90 часток 0,9 % розчину натрію хлориду протягом 24 годин при 4°C; декальцинують у 5 % розчині етилендіамінтетраоцтової кислоти динатрієвої солі впродовж 5-7 діб, зневоднюють у розчинах ізопропанолу зростаючих концентрацій та обробляють у суміші целоїдин-рицинова олія.

Корисна модель, що пропонується відноситься до області гематології та патологічної анатомії, а саме до гістологічної техніки, і може бути використана для дослідження мікоморфології кісткового мозку.

Дослідження стану кісткового мозку є принципово важливою діагностичною процедурою при гематологічних захворюваннях. Найчастіше воно проводиться з використанням пункційного біоптату, що дозволяє вивчити клітинний склад кісткового мозку [1]. Але матеріал отриманий при стерильній пункції не дозволяє вивчити будову кісткового мозку як органу - перш за все стан його стромы, оцінити її зміни та взаємовідносини з гемопоетичною тканиною [2]. Для оцінки стану всіх складових елементів кісткового мозку з діагностичною метою використовують трепанобіоптати. Але поширеність цієї діагностичної процедури дуже мала, що, перш за все, пов'язано з складністю виготовлення гістологічних препаратів з трепанобіоптатів [1].

По-перше, складність виготовлення гістологічних препаратів з трепанобіоптатів пов'язана з наявністю в їх складі кісткової тканини. Це вимагає застосування їх спеціальної обробки для зменшення щільності кістки - декальцинації.

Проведення ж останньої у більшій або меншій мірі може призводити до погіршення здатності тканинних елементів до забарвлення при виготовленні гістологічних препаратів і, таким чином, до втрати діагностичної цінності матеріалу.

По-друге - у складі трепанобіоптатів налічують тканини які різко відрізняються між собою за щільністю: кісткова тканина, яка зберігає велику щільність і після декальцинації, та гемопоетична тканина, яка має напіврідку консистенцію. Різний ступінь набряку та ретракції цих тканин під час виготовлення гістологічних препаратів є серйозною перешкодою у виготовленні якісних гістологічних препаратів [3, 4, 5], в яких зберігалися б нормальні взаємовідносини між стромою та паренхімою.

Відомі способи запропоновані [2, 6], у яких з метою декальцинації трепанобіоптатів кісткового мозку використовуються хелатуючі речовини. Основною відмінністю цих способів є декальцинація зразків протягом 3-4 днів у розчині солей етилендіамінтетраоцтової кислоти. Такий спосіб підготовки матеріалу практично не змінює здатність тканин кісткового мозку до забарвлення, але не дозволяє зменшити різницю між ступенем ретракції різних за щільністю тканин.

(13) U

(11) 3907

(19) UA

Найбільш близьким за технічною суттю є спосіб [7], у відповідності з яким трепанобіоптат фіксується в ценкер-формолі, промивається водопровідною водою, декальцинується у рідині, що складається з рівних частин 85% розчину мурашиної кислоти і 20% розчину натрію цитрату, протягом 18-20 годин, обробляється 5% розчином алюмокалієвого галуноу 3-4 години, зневоднюється, обробляється у суміші целоїдин-гвоздична олія протягом 2-3 діб, відмивається у хлороформі і заливається у парафін. З оброблених таким чином біоптатів досить легко виготовляються гістологічні зрізи. Здатність до забарвлення кісткового мозку, особливо при використанні гематологічних способів фарбування, змінюється і не повністю відповідає картині, яка спостерігається при забарвленні мазків. Крім того спостерігається суттєво більша ретракція гемопоетичної тканини, ніж кісткової, що призводить до виникнення артефактів у вигляді великих щілин між ними.

Задача, що вирішується, полягає в забезпеченні зменшення виразності артефактів, що виникають за рахунок різного ступеня ретракції різних тканинних компонентів кісткового мозку при підготовці біоптатів до гістологічного дослідження та збереження їх здатності до забарвлення.

Технічний результат, що досягається полягає в підвищенні зберігання природних просторових співвідношень між тканинними компонентами кісткового мозку, що важливо при візуальному вивченні і принципово важливо при проведенні морфометричних досліджень, у поєднанні зі збереженням їх здатності до забарвлення.

Поставлена мета досягається за рахунок того, що у відомому способі підготовки трепанобіоптатів кісткового мозку для гістологічного дослідження, що включає його фіксацію, декальцинацію, зневоднення, обробку целоїдином та ущільнення у парафін, згідно з корисною моделлю трепанобіоптат фіксують у ізоосмолярній рідині, що складається з 10 часток формаліну та 90 часток 0,9% розчину натрію хлориду протягом 24 годин при 4°C; декальцинують у 5% розчині етилендіамінтетраоцтової кислоти динатрієвої солі впродовж 5-7 діб, зневоднюють у розчинах ізопропанолу зростаючих концентрацій, обробляють у суміші целоїдин-рицинова олія та заливають у парафін.

Відмінною особливістю способу, що використовується, є застосування ізоосмолярного фіксатора який попереджає набряк тканин, що обробляються, зі "м'яким" зневодненням ізопропанолом, що забезпечує високу ступінь зберігання природних просторових співвідношень між тканинними компонентами кісткового мозку, у поєднанні з збереженням їх здатності до забарвлення.

Запропонований спосіб підготовки трепанобіоптатів кісткового мозку для гістологічного дослідження здійснюють слідуєчим чином:

1. Трепанобіоптати відразу після отримання занурюють в рідину, що складається з 1 частки формаліну та 9 часток 0,9% розчину натрію хлориду, протягом 24 годин при 4°C. Промивають зразки у двох порціях 0,9% розчину натрію хлориду по 5 хвилин.

2. Декальцинують зразки в 5% розчині динатрієвої солі, етилендіамінтетраоцтової кислоти

протягом 5-7 діб з щоденною зміною розчину. Мінімальне співвідношення між об'ємами біоптата та розчину 1:50.

3. Зневоднюють у розчинах ізопропанолу зростаючих концентрацій (70%, 80%, 90%, 99%, 100%, 100%) по 12 годин у кожному.

4. Обробляють зразки протягом 10 діб у суміші целоїдин-рицинова олія, яка готують наступним чином: 2г целоїдину розчиняють у 20мл ацетону; до отриманого розчину додають 100% ізопропанол до досягнення загального обсягу 50мл; до отриманого розчину додають 50мл рицинової олії.

5. Проводять трепанобіоптати через три порції хлороформу, по годині у кожній. Занурюють зразки у насичену суміш хлороформ-парафін при 37°C на одну годину. Проводять зразки через дві порції чистого парафіну при 56°C по 30 хвилин, заливають у парафін.

Результат: при виготовленні гістологічних препаратів забезпечується високий ступінь зберігання природних просторових співвідношень між тканинними компонентами кісткового мозку. Це принципово важливо при проведенні морфометричних досліджень у зв'язку зі зменшенням рівня об'єктивної помилки, а також збереженням їх тинкторіальних властивостей як при використанні загальногістологічних та гематологічних, так і спеціальних методів забарвлення гістологічних зрізів, що підвищує діагностичну цінність препаратів.

Прикладами конкретного виконання способу, що пропонується, є виготовлення гістологічних препаратів з трепанобіоптатів людей, що страждають на різні форми лейкозів, фрагменти губчастої кістки з груднини собаки. Зрізи товщиною 7мм забарвлювалися гематоксином та еозином, азур-ІІ-еозином, фосфорновольфрамовим гематоксином за Маллорі, за ван Гізона, за Новеллі; ставили реакції ШІК та Хейла. Проведене вивчення препаратів показало, що всі тканинні елементи на гістологічних зрізах адекватно забарвлюються. Практично відсутні щілини між кістковими балками та гемопоетичною тканиною, відсутні в складі останньої мікротріщини.

Джерела інформації

1. Абдулкадыров К. М., Бессмельцев С. С., Рукавицин О. П. Хронический миелолейкоз. - СПб: Специальная литература, 1998. - 464с.

2. Третьак Н. М., Настаенко О. П., Коваль А. І., Мнишенко В. М. Методики проведення трепанобіопсії кісткового мозку і підготовки біоптата до морфологічного аналізу.- К.: ТОВ "Міжнар. фін. агенція", 1996.- 13с.

3. Hopwood D. Fixatives and fixation: a review //Histochem. J.- 1969.- V.1, №4.-P.323-360.

4. Грабовий О. М., Проша М. В. Ізопропанол-целоїдин-парафіновий метод заливки матеріалу для гістологічних досліджень //Український журнал медичної техніки і технології, 1994.- №1-2.- С.44-47.

5. Ташке К. Введение в количественную цитогистологическую морфологию. Бухарест: Академия, 1980. - 191с.

6. Thiele Ju., Kvasnicka H. M., Beelen D. W., et al. Megakaryopoiesis and ' Myelofibrosis in Chronic Myeloid Leukemia after Allogeneic Bone Marrow Transplantation: An Immunohistochemical Study of

127 Patients //Modern Pathology.-2000.-V.14.-P.129-138.

7. Теодорович В. П., Абдулкадыров К. М. Тре-

панобиопсия костного мозга при некоторых гематологических заболеваниях //Л.: Медицина, 1977.-94с.