



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **61047** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/50 (2006.01)МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ ГІСТОБАКТЕРІОСКОПІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ КИШКИ**

1

(21) u201013969

(22) 23.11.2010

(24) 11.07.2011

(46) 11.07.2011, Бюл.№ 13, 2011 р.

(72) ГОРОХОВСЬКИЙ ЄГОР ЮРІЙОВИЧ, ЄЩЕНКО ЮЛІЯ ВІТАЛІЙВНА

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

(57) Спосіб гістобактеріоскопічного дослідження кишки, який включає взяття тканини, іммобілізацію пристінкового слизового шару тканини за допомогою гелю, фіксацію тканини в розчині формаліну,

2

зневоднення в спиртах, просвітлення у ксилолі, просочування парафіном та заливку в парафінові блоки, виготовлення з блоків мікротомних зрізів, депарафінування зрізів, забарвлення зрізів тканини, видову ідентифікацію бактерій та підрахунок їх кількості, який **відрізняється** тим, що іммобілізацію слизового шару кишки здійснюють шляхом наповнення порожнини кишки охолодженим гелем, до складу якого входить нейтральний формалін, фіксацію тканини здійснюють охолодженим розчином нейтрального формаліну та виконують цитохімічне дослідження клітин кишки.

Спосіб відноситься до бактеріології та цитохімії, стосується оцінки бактеріальної флори пристінкового слизового шару кишки і дозволяє проводити кількісну оцінку бактеріальної флори пристінкового слизового шару кишки та цитохімічні дослідження клітин кишки завдяки одночасній іммобілізації пристінкового слизового шару та фіксації клітин кишки.

Відомо, що гістобактеріоскопічний аналіз дозволяє досліджувати мікроорганізми безпосередньо в зрізах тканин і завдяки цьому можлива одночасна оцінка не тільки кількості та складу мікроорганізмів, а ще й ефектів, які виникають внаслідок взаємодії між мікроорганізмами та тканинами організму, що є суттєвою перевагою перед стандартними бактеріологічними методами, при використанні яких можливо дослідити лише кількісний та якісний склад мікрофлори, без урахування впливу бактерій на орган, з якого зроблено бактеріологічний посів.

Відомий спосіб гістохімічного аналізу слизового шару кишки [Matsuo K., Ota H., Akamatsu T., Sugiyama A., Katsuyama T. Histochemistry of the surface mucous gel layer of the human colon. - 1997. - Gut. - Vol. 40. - P.782-789], який включає аутопсію ділянки кишки, фіксацію її в рідині Карнуа (абсолютний спирт : хлороформ : крижана оцтова кислота в об'ємному співвідношенні 15:5:1) протягом 2 годин, зневоднення у спирті, просвітлення у ксилолі, просочування парафіном, заливку тканини

кишки в парафінові блоки, виготовлення з блоків зрізів на мікротомі, забарвлення слизового шару на зрізах та його гістохімічний аналіз.

Ознаками, спільними з аналогом, є:

- взяття тканини кишки;
- фіксація пристінкового слизового шару кишки;

- зневоднення тканини кишки у спирті;
- просвітлення у ксилолі;
- просочування парафіном;
- заливка тканини кишки в парафінові блоки;
- виготовлення з блоків зрізів на мікротомі;
- депарафінування зрізів;
- забарвлення пристінкового слизового шару на зрізах кишки.

Недоліком аналогу є те, що внаслідок дії на тканину кишки абсолютного спирту, хлороформу та крижаної оцтової кислоти, які входять у склад фіксатора, порушується тонка цитологічна структура клітин кишки: відбуваються дегрануляція, лізис мітохондрій та комплексу Гольджі, що не дозволяє проводити деякі з методів цитохімічного аналізу тканин кишки, в основі яких лежить дослідження гранулярного апарату клітин кишки.

Найближчим аналогом за суттю та досягнутим результатом є відомий спосіб гістобактеріоскопічного аналізу [Морозов И.А Проблемы морфологической диагностики Helicobacter pylori в желудке. // Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопрокт. - 1999 - №2. - С.46-48.], який включає біопсію ткани-

(13) **U**
(11) **61047**
(19) **UA**

ни шлунку, іммобілізацію слизового шару шляхом занурення в попередньо підігрітий 1% розчин агарозного гелю, фіксацію тканини у 10% розчині формаліну, зневоднення у спирті, просвітлення в ксилолі, просочування парафіном, заливку тканини в парафінові блоки, виготовлення зрізів з блоку на мікромомі, забарвлення зрізів, підрахунок кількості бактерій та їх видову ідентифікацію.

Ознаками, спільними з прототипом, є:

- взяття тканини;
- іммобілізація пристінкового слизового шару тканини за допомогою гелю;
- фіксація тканини в розчині формаліну;
- зневоднення в спиртах;
- просвітлення в ксилолі;
- просочування парафіном;
- заливка тканини в парафінові блоки;
- виготовлення з блоків мікромомних зрізів;
- депарафінування зрізів;
- забарвлення зрізів тканини;
- видова ідентифікація бактерій;
- підрахунок їх кількості.

Недоліками цього способу є: використання підігрітого агарозного гелю для іммобілізації слизового шару тканини, що не дозволяє зберегти тонку цитологічну структуру клітин кишки, тому що менш ніж через 15 хвилин після зупинки кровообігу починається аутоліз тканин кишки під дією травних ферментів, а також відбувається дегрануляція клітин кишки.

В основу способу поставлено задачу розробити спосіб гістобактеріоскопічного дослідження кишки, який шляхом іммобілізації пристінкового слизового шару кишки гелем, до складу якого входить фіксатор, дозволяє уникнути дегрануляції та лізису клітин кишки що дозволяє проводити ідентифікацію бактерій у слизовому шарі кишки, підраховувати їх кількість та досліджувати взаємозв'язок між станом клітин кишки та бактеріальною флорою шляхом цитохімічного аналізу клітин кишки.

Суттєвими ознаками способу є:

- взяття тканини кишки;
- іммобілізація пристінкового слизового шару тканини шляхом наповнення кишки охолодженим гелем, до складу якого входить нейтральний формалін;
- фіксація тканини в охолодженому розчині нейтрального формаліну;
- зневоднення в спиртах;
- просвітлення в ксилолі;
- просочування парафіном;
- заливка тканини кишки в парафінові блоки;
- виготовлення з блоків мікромомних зрізів;
- депарафінування зрізів;
- забарвлення зрізів кишки;
- видова ідентифікація бактерій;
- підрахунок їх кількості;
- цитохімічне дослідження клітин кишки.

Відмінними від аналогу ознаками способу є:

- іммобілізація слизового шару кишки шляхом наповнення її порожнини охолодженим гелем, до складу якого входить нейтральний формалін;

- фіксація тканини охолодженим розчином нейтрального формаліну;
- цитохімічне дослідження клітин кишки.

Спосіб здійснюють таким чином: здійснюють взяття ділянки кишки, порожнину якої наповнюють охолодженим до 4-8°C гелем, до складу якого входить фіксатор - нейтральний формалін, потім тканину фіксують в охолодженому до 4-8°C 10 % розчині нейтрального формаліну впродовж 48-52 годин, зневоднюють у спиртах, просвітлюють у ксилолі, просочують парафіном, заливають у парафінові блоки, з яких роблять мікромомні зрізи, які депарафінують та забарвлюють фарбником, проводять видову ідентифікацію і підрахунок бактерій та цитохімічний аналіз клітин кишки.

Спосіб дозволяє не тільки зберегти асоційовану із пристінковим слизовим шаром мікрофлору, а й запобігти швидкому аутолізу та дегрануляції клітин кишки завдяки використанню охолодженого гелю, до складу якого входить нейтральний формалін, для іммобілізації пристінкового слизового шару та фіксації тканини в охолодженому фіксаторі.

Приклад конкретного виконання: відразу після аутопсії порожнину відділу кишки довжиною 10 мм за допомогою шприца заповнювали охолодженим до 4°C гелем, який містив води дистильованої стерильної - 90 мл, нейтрального формаліну - 10 мл, желатину - 15 г, потім фіксували протягом 48 годин у 10% нейтральному формаліні при 4°C. Фіксовану тканину без промивання переносили для зневоднення у 96° спирт на 1 годину, потім остаточно зневоднювали в абсолютному спирті (дворазово, по 1 годині) просвітлювали в ксилолі (дворазово по 30 хвилин), просочували в суміші парафіну та ксилолу при 37°C, протягом 30 хв, у чистому парафіні при 56°C (дворазово по 1,5 год) та заливали в парафін, з парафінових блоків на ротаційному мікромомі виготовляли зрізи товщиною 2 мкм, які наклеювали на предметні скельця та висувували при кімнатній температурі протягом 24 год, депарафінували у ксилолі (дворазово по 5 хв), та забарвлювали гематоксилін-флоксином, для чого зрізи попередньо доводили крізь спирти (100°, 90°, 96°, 80°, 70°) до води, на забарвлених зрізах ідентифікували бактерії та підраховували їх кількість, а також кількість гранул в клітинах Панета клубової кишки за допомогою мікроскопа (збільшення $\times 1500$), на основі підрахунку кількості гранул в 100 клітинах та бактерій у слизовому шарі 100 кишкових ворсинок розраховували середню арифметичну, похибку середньої арифметичної; порівняння вибірок проводили за допомогою t-критерію.

Для оцінки заявленого способу гістобактеріоскопічного дослідження кишки проводили дослідження гранул клітин Панета клубової кишки та вмісту бактерій в її слизовому шарі. Дослідження проводили на 27 безпородних здорових неінфікованих щурах, вагою 193 \pm 29 г. Результати досліджень наведено у таблиці.

Таблиця

Кількість гранул у клітинах Панета та бактерій у слизовому шарі клубової кишки ($\bar{X} \pm m$)

Група тварин	Кількість тварин	Кількість гранул	Кількість бактерій у слизовому шарі
Контроль	7	49,2±1,33	1,8±0,04
Голодування	10	65,5±1,70*	1,3±0,03*
Прийом їжі, інфікованої E. coli	10	12,7±0,81*	9,6±0,04*

*p<0,001

Чинниками, що впливали на кількість бактерій у слизовому шарі кишки були голодування та прийом їжі, інфікованою рідкою бактеріальною культурою E. coli. Тварин виводили з експерименту через 6 годин після початку голодування або прийому інфікованої їжі, шматочки клубової кишки після біопсії обробляли як вказано вище. Контролем слугували інтактні тварини.

Кількість гранул у тварин контрольної групи дорівнювала 49,2±1,33, кількість бактерій у полі зору - 1,8±0,04. Після голодування кількість гранул секреторного матеріалу в клітинах Панета збільшувалась на 33%, відносно контролю; кількість бактерій зменшувалась на 28%.

Після прийому інфікованої їжі кількість гранул у клітинах Панета зменшувалась на 84%, у порівнянні з контролем; кількість бактерій збільшувалась на 433%. Таким чином, запропонований спосіб

дозволяє спостерігати зміни кількості гранул у клітинах Панета, які викликані зміною кількості бактерій у пристінковому слизовому шарі клубової кишки.

За результатами дослідження можна зробити висновок, що завдяки запропонованому способу добре зберігається не тільки бактеріальна мікрофлора, асоційована з пристінковим слизовим шаром кишки, а також тонка цитологічна структура клітин кишки, що дозволяє досліджувати взаємозв'язок між станом клітин кишки та бактеріальною флорою.

Таким чином, запропонований спосіб гістобактеріоскопічного дослідження кишки дозволяє одночасно проводити аналіз як бактеріальної флори, так і стану клітин кишки, є легким для виконання і не потребує складного обладнання та реактивів з високою вартістю.