



УКРАЇНА

(19) UA (11) 62175 (13) A

(51) 7 G01N21/88

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВИДАЄТЬСЯ ПІД
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ
ВЛАСНИКА
ПАТЕНТУ

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО СВИНЦЮ В ОРГАНАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН

1

2

(21) 2003010195

(22) 08 01 2003

(24) 15 12 2003

(46) 15 12 2003, Бюл. № 12, 2003 р.

(72) Луговський Сергій Павлович, Комаров Максим
Анатолійович, Легкоступ Людмила Анатоліївна,
Кліменко Павло Павлович(73) УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІН-
СТИТУТ ПРОМИСЛОВОЇ МЕДИЦИНИ

(57) Спосіб виявлення внутрішньоклітинного свинцю в органах експериментальних тварин шляхом ультрагістохімічного дослідження тканин, який відрізняється тим, що попередньо протягом 30 хвилин проводять перфузію органів теплим (+37°C) розчином фіксатора з кінцевим рН 7,2, приготованого ех tempore на основі 0,2 М кокаділатного буфера (рН 7,4-7,6) з вмістом по об'єму

2,5 % глутарового альдегіду, 4 % параформу та 3 % біхромату калію, потім вирізають шматочки тканин розміром 1,0 x 1,0 x 1,0 мм, фіксують двічі, по 12 годин, при температурі 4°C у свіжих порціях цього ж фіксатора, проводять цитохімічну реакцію, обробляючи шматочки тричі, по 12 годин, у 3 % розчині біхромату калію, приготованого на 0,2 М кокаділатному буфері (рН 7,2), після чого промивають тричі по 30 хвилин у цьому ж буфері, фіксують 1 годину в 1 % розчині чотириокису осмію на 0,2 М кокаділатному буфері, зневоднюють у ацетонах, занурюють в епоксидну смолу, готують ультратонкі зрізи тканин та визначають наявність вмісту свинцю по утворенню в клітинах поліморфних, різного розміру електронно-щільних гранул і депозитів за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа

Винахід відноситься до медицини, а саме до мікроскопічної техніки (ультрагістохімії) і може бути використаний для морфо-функціонального дослідження токсикокінетичних і токсикодинамічних процесів на клітинному і субклітинному рівнях, а також для морфологічної діагностики свинцевої інтоксикації в умовах експерименту.

Найближчим до запропонованого способу є ультрагістохімічний метод Тімма [Гайер Г. Электронная гистохимия. Пер с нем. - М. Мир, 1974 - 488 с.]

Однак цей спосіб трудомісткий і не специфічний. Низька його специфічність обумовлена тим, що за допомогою реакції сульфід-срібла в тканинах і клітинах внутрішніх органів може виявлятися ціла низка важких металів (свинець, платина, срібло, золото, кадмій, мідь, кобальт, нікель, цинк, олово, ртуть та ін.) у вигляді загальної групи.

В основу винаходу поставлено задачу розробити спосіб виявлення внутрішньоклітинного свинцю в органах експериментальних тварин шляхом ультрагістохімічного дослідження тканин, такими хімічними реагентами і в такій послідовності, які

забезпечать високу специфічність способу, стабілізацію свинцю у внутрішньоклітинних структурах при гістохімічній обробці зразків тканин, надійну і стабільну фіксацію клітинних ультраструктур для уникнення артефактів і зменшать трудомісткість способу.

Поставлена задача досягається тим, що органи тварин, які підлягають дослідженню, послідовно обробляють необхідний час із підтримкою температурного режиму і рН хімічними препаратами і розчинами, приготовленими на основі 0,2 М кокаділатного буфера (рН 7,4-7,6) для послідовного проведення гістохімічної реакції, виготовлення ультратонких зрізів і визначення в них під електронним мікроскопом наявності, або відсутності свинцю в тканинах піддослідних тварин.

Спосіб здійснюється таким чином.

Піддослідних тварин, після введення їм в організм сполук свинцю різними способами наркотизують, роблять розтин черевної і/або грудної порожнини і через канюлю, яку накладають на черевний або грудний відділ аорти, або катетер, який вводять у лівий шлуночок серця здійснюють пер-

(13) A

(11) 62175

(19) UA

фузію органів на протязі 30 хвилин теплим (+37°C) розчином фіксатору, який готують *ex tempore* на основі 0,2 М кокаділатного буферу з вмістом 2,5% по об'єму глютарового альдегіду, 4% параформу і 3% біхромату калію з кінцевим рН 7,2. Після цього вирізали із органів, які підлягають дослідженню (печінка, нирки, головний мозок, селезінка та ін) шматочки тканин розміром 1,0x1,0x1,0 мм, занурюють їх у свіжу порцію цього ж фіксатору. Шматочки фіксують по 12 годин при температурі +4°C у двох свіжих порціях фіксатору, проводять цитохімічну реакцію, обробляючи шматочки тричі, по 12 годин у 3% розчині біхромату калію, який приготовлений на основі 0,2 М кокаділатного буферу з кінцевим рН 7,2 при температурі +4°C і промивають тричі, по 30 хвилин у 0,1 М кокаділатному буфері. Після цього шматочки фіксують 1 год в 1% розчині чотирьохокису осмію, зневозжують у ацетонах, занурюють в епоксидну смолу для їх ущільнення. Із залитих у смолу тканинних блоків за допомогою ультрамикротому типу LKB III готують ультратонкі зрізи, які досліджують за допомогою трансмісійного електронного мікроскопу типу TEM 125K, або іншого аналогічного.

При спостереженні в електронному мікроскопі свинець виявляють у вигляді поліморфних електронно-щільних гранул, або аморфних електронно-щільних депозитів, які часто розташовуються у внутрішньоклітинних органах, або безпосередньо в цитоплазмі клітин, які мають не високу електронну щільність. При наявності свинцю в клітинах, його відкладення спостерігаються на внутрішніх мембранах і в матриці мітохондрій, у складі ліпідних гранул, у фаголізосомах, залишкових тілцях, та в гранулах ліпофусцину. В окремих випадках (епітелій проксимальних відділів нефрону нирок) свинець виявляється у вигляді аморфного або мілкогранулярного електронно-щільного матеріалу у складі білкових тілець.

Спосіб пояснюється таким прикладом.

Щуру вагою 200 г в черевну порожнину одноразово вводили 1,0 мл водного розчину ацетату свинцю в дозі 1/5 DL_{50} (5 мг/100 г маси). Через 72 години, під ефірним наркозом щуру робили розтин грудної порожнини і катетеризацію лівого шлуночку серця. Через катетер під тиском 20 мм рт.ст. на протязі 30 хвилин здійснювали перфузію внутрішніх органів щура теплим (+37°C) розчином фіксатору, який був приготовлений *ex tempore* на основі 0,2 М кокаділатного буферу з вмістом 2,5% по об'єму глютарового альдегіду, 4% параформу і 3% біхромату калію з кінцевим рН 7,2. Виток крові здійснювався через попередньо накладену канюлю на нижню полу вену. Після цього виділяли печінку, з якої вирізали шматочки розміром 1,0x1,0x1,0 мм, занурювали їх у свіжу порцію фіксатору і витримували 12 годин, при температурі +4°C, після чого робили зміну фіксатору і продовжували фіксацію ще на протязі такого ж часу. Після фіксації, шматочки обробляли тричі по 12 годин у 3% розчині біхромату калію, приготовленого на 0,2 М кокаділатному буфері з кінцевим рН 7,2 при тій же температурі. Промивали тричі по 30 хвилин

у 0,1 М розчині буферу, фіксували їх у 1% розчині чотирьохокису осмію на протязі 1 год, зневозжували у ацетонах, занурювали у суміш Епон-Арапдит і залишали на 48 годин для полімеризації. З тканинних блоків за допомогою ультрамикротому LKB III готували ультратонкі зрізи, які досліджували у трансмісійному електронному мікроскопі TEM 125K. В гепатоцитах спостерігали накопичення свинцю в мітохондріях клітин у вигляді електронно-щільних, мілких гранул, розташованих на внутрішній поверхні внутрішніх мембран мітохондрій і їх внутрішньому матриксі, а також на зовнішній поверхні ліпідних внутрішньоклітинних крапель, у вигляді аморфного, електронно-щільного матеріалу та вторинних лізосом, у складі гранул ліпофусцину. Запропонований спосіб виявлення внутрішньоклітинного свинцю в органах експериментальних тварин дає можливість спостерігати різний характер накопичення свинцю у внутрішньоклітинних структурах.

Картина, що спостерігається в електронному мікроскопі пояснюється фотознімками (фіг 1, фіг 2, фіг 3, фіг 4).

На фіг 1 представлено накопичення свинцю в мітохондрії гепатоциту у вигляді надто мілких електронно-щільних гранул, які розташовані практично на всій внутрішній поверхні її зовнішньої мембрани та у вигляді великих, округлої форми гранул, які розташовані на одному з полюсів внутрішнього матриксу мітохондрії (вказано стрілкою).

На фіг 2 представлено накопичення свинцю в різних за характером пошкодження мітохондрій гепатоцитів. Одна з мітохондрій, яка має надто просвітлений матрикс і порушені кристи, з окремими їх вакуолізованими фрагментами практично не містить свинцю. Інша мітохондрія (вказано стрілкою) містить велику кількість свинцю, який розташовується у внутрішньому матриксі у вигляді мілкогранулярного та електронно-щільного аморфного матеріалу наряду з різнокаліберними, поліморфними електронно-щільними гранулами.

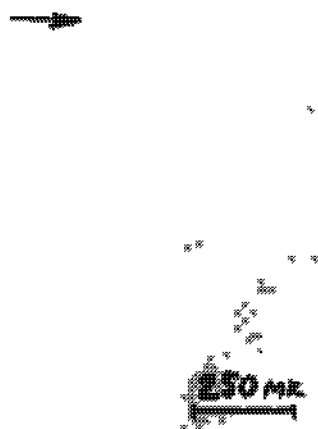
На фіг 3 представлено накопичення свинцю в жирових включеннях гепатоцитів, яке відбувається за рахунок взаємодії сполук свинцю з ліпідами. Мілкогранулярний електронно-щільний матеріал в ліпідних краплях розташовується переважно по їх краю.

На фіг 4 представлено накопичення свинцю у складі осміфільних мембран мієліноподібних тілець, які розташовані в просвіті жовчаних капілярів у вигляді мілких електронно-щільних гранул.

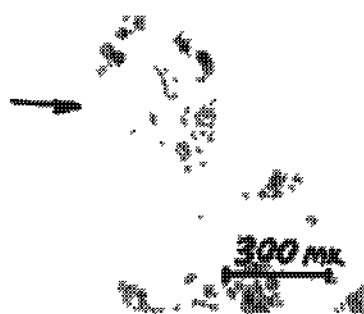
Спосіб дає можливість вивчати на клітинному і субклітинному рівнях організації живої системи токсикокінетичні характеристики і токсикодинаміку впливу свинцю і його сполук на живий організм при його екзогенному впливі в умовах токсикологічного експерименту, що вкрай необхідно для визначення механізмів біологічної дії свинцю на живий організм, розробки сучасних уявлень про морфогенез і патогенез свинцевих уражень, а також розробки способів діагностики, засобів та методів патогенетичної профілактики і лікування сатурнізму.



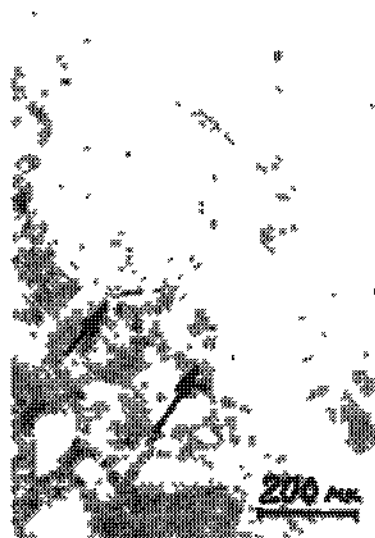
Фіг. 1



Фіг. 3



Фіг. 2



Фіг. 4