



УКРАЇНА

(19) UA (11) 65514 (13) U
(51) МПК
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ КАТІОННИХ БІЛКІВ У КЛІТИНАХ

1

(21) u201105730
(22) 06.05.2011
(24) 12.12.2011
(46) 12.12.2011, Бюл.№ 23, 2011 р.
(72) ГОРОХОВСЬКИЙ ЄГОР ЮРІЙОВИЧ, ЄЩЕНКО ЮЛІЯ ВІТАЛІЙВНА
(73) ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД "ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ" МІНІСТЕРСТВА ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
(57) Спосіб визначення катіонних білків у клітинах, що включає: взяття тканини, фіксацію клітин, забарвлення клітин діахромним фарбником, мікроскопічне дослідження забарвлених препаратів, оці-

2

нку вмісту катіонних білків у клітинах, який **відрізняється** тим, що фіксацію тканин проводять у нейтральному формаліні, а потім зневоднюють тканину в спиртах, просвітлюють у ксилолі, просочують парафіном, заливають тканину в парафінові блоки, виготовляють з блоків мікротомні зрізи, приклеюють зрізи на предметні скельця, депарафінують зрізи, забарвлюють зрізи бромфеноловим синім, забарвлюють ядра клітин розчином основного фуксину, зневоднюють забарвлені зрізи в спирті, просвітлюють зневоднені зрізи в ксилолі, замикають просвітлені зрізи в бальзам під покривне скельце.

Корисна модель належить до цитохімії, стосується визначення катіонних білків у мікротомних зрізах тканин і дозволяє здійснювати оцінку вмісту катіонних білків у клітинах організму людини та тварин.

Катіонні білки (цекропіни комах, магаїніни земноводних, дефенсини ссавців) - антимікробні пептиди, які відіграють важливу роль в антибактеріальному захисті від патогенів у багатьох організмів: рослин, безхребетних та хребетних тварин, а також людини. Вони разом з іншими антибактеріальними пептидами, наприклад лізоцимом, є першою ланкою неспецифічної імунної відповіді, яка розвивається у відповідь на дію чужорідних антигенів [Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms / M. Zasloff // Nature. - 2002. - Vol. 415. - P. 389-395].

Для визначення катіонних білків, які відносяться до групи дефенсинів, у нейтрофілах крові та інших клітинах організму останнім часом запропоновані імуногістохімічні методи визначення з використанням мічених моноклональних антитіл та розроблені комерційні набори, наприклад ELISA Kit for Defensin Alpha 5 Paneth cell specific (DEFA5), виробництва USCN Life Sciences Inc. Ці методи мають високу селективність, але для них характерні деякі суттєві недоліки. По-перше, їх застосування обмежується високою вартістю та складністю отримання моноклональних антитіл. По-друге, оскільки методи імуногістохімії засновані на використанні моноклональних антитіл, тому вони є

специфічними для конкретного виду тварин, для якого ці антитіла були отримані. Відомі методи визначення дефенсинів у клітинах миші, щура та людини. Імуногістохімічних або цитохімічних методів визначення катіонних білків, і дефенсинів зокрема, в клітинах (за виключенням гранулоцитів крові) інших видів ссавців, а тим більш хребетних тварин інших класів (птахів, рептилій, амфібій, риб), на даний час не існує, хоча, безперечно, їх визначення має як практичне значення для ветеринарної медицини, так і суто теоретичне, наприклад, для дослідження еволюції механізмів неспецифічного антибактеріального захисту в тварин.

Відомий спосіб цитохімічного визначення катіонних білків у лейкоцитах крові людини [Шубич М.Г. Выявление катионного белка в цитоплазме лейкоцитов с помощью бромфенолового синего / М.Г. Шубич // Цитология. - 1974. - № 10. - С. 1321-1322], який включає фіксацію мазків крові у 5 % сульфосаліциловій кислоті, промивання в дистильованій воді, забарвлення мазків 0,1 % розчином бромфенолового синього в боратному буфері (рН=8,1), промивання мазків у боратному буфері (тричі по 1-3 хвилини), забарвлення 0,05 % розчином основного фуксину, промивання у воді, висушування мазків, проведення мікроскопічного дослідження вмісту катіонних білків у лейкоцитах крові.

Ознаками, спільними з аналогом, є:
- фіксація клітин;

(19) UA (11) 65514 (13) U

- забарвлення клітин 0,1 % розчином бромфенолового синього в боратному буфері (pH=8,1);
- забарвлення 0,05 % розчином основного фуксину;
- промивання у воді;
- мікроскопічне дослідження забарвлених препаратів;
- оцінка вмісту катіонних білків у клітинах.

Недоліком аналогу є те, що його застосування обмежене лише цитологічними дослідженнями мазків крові в гематології та клінічній діагностиці. Використання цього методу для виявлення катіонних білків у секреторних гранулах клітин на мікротомних зрізах тканин не дозволяє отримати їх якісне забарвлення.

Найбільш близьким за суттю та досягнутим результатом є відомий спосіб визначення катіонних білків у клітинах епітелію шлунка [Пат. 2007728 Российской Федерации МПК G01N33/68. Способ прогнозирования течения язвенной болезни желудка и 12-перстной кишки у больных с пилорическим кампилобактером / Рубцов М.А., Рубцова Н.И., Перкин Э.М.; заявитель Новокузнецкий институт усовершенствования врачей, патентообладатель Рубцов М.А. - № 4945533/14, заявл. 17.06.1991, опубл. 15.02.1994], який включає біопсію тканини шлунку, виготовлення мазків-відбитків на предметному скельці, фіксацію мазка-відбитка метиловим спиртом протягом 5 хвилин, забарвлення діахромним фарбником (розчином міцного зеленого, pH 8,1-8,2) протягом 20 хвилин, забарвлення ядер клітин у трьох порціях 0,02 % сафраніну по 5 секунд у кожному, висушування мазків, мікроскопічний аналіз препаратів, оцінку вмісту катіонних білків напівкількісним методом, за п'ятибальною шкалою.

Ознаками, спільними з найближчим аналогом, є:

- взяття тканини;
- фіксація клітин;
- забарвлення клітин діахромним фарбником;
- мікроскопічне дослідження забарвлених препаратів;
- оцінка вмісту катіонних білків у клітинах.

Недоліком цього способу, по-перше, є те, що він також призначений для аналізу вмісту катіонних білків у цитологічних препаратах у вигляді мазків-відбитків, а не мікротомних зрізах тканин. Відомо, що препарати-відбитки роблять переважно із паренхіматозних органів, які характеризуються однорідною структурою тканини, наприклад, селезінки, печінки, лімфатичних вузлів тощо, переважно із метою швидкої клінічної діагностики. Відбиток же, наприклад із тканини кишечника або шкіри, клітини яких також містять катіонні білки, зробити практично неможливо; до того ж у наукових дослідженнях препарати у вигляді відбитків застосовуються вкрай рідко, оскільки важливо досліджувати всю тканину, а не лише окремі її клітини. По-друге, безпосереднє використання метилового спирту для фіксації тканин органів небажане, оскільки він практично не використовується в гістологічній практиці, тому що викликає значне стискання тканини внаслідок швидкої дегідратації, що обумовлює низьку якість мікропрепаратів. По-третє, у

цьому методі фарбниками використовують міцний зелений та сафранін, які не мають широкого застосування у вітчизняній цитологічній практиці, і низький попит на них робить їх досить дефіцитними реагентами.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб визначення катіонних білків у клітинах, у якому завдяки забарвленню зрізів діахромним фарбником досліджують вміст катіонних білків у клітинах організмів різних класів на мікротомних зрізах тканин.

Суттєвими ознаками способу є:

- взяття тканини;
- фіксація тканини в нейтральному формаліні;
- зневоднення тканини в спиртах;
- просвітлення в ксилолі;
- просочування парафіном;
- заливка тканини в парафінові блоки;
- виготовлення з блоків мікротомних зрізів;
- приклеювання зрізів на предметні скельця;
- депарафінування зрізів;
- забарвлення зрізів тканини діахромним фарбником;
- забарвлення ядер клітин;
- зневоднення забарвлених зрізів у спирті;
- просвітлення зневоднених зрізів у ксилолі;
- замикання просвітлених зрізів у бальзам під покривне скельце;
- мікроскопічне дослідження забарвлених зрізів.

Відмінними від найближчого аналога ознаками способу є:

- фіксація тканини нейтральним формаліном;
- зневоднення тканини в спиртах;
- просвітлення в ксилолі;
- просочування парафіном;
- заливка тканини в парафінові блоки;
- виготовлення з блоків мікротомних зрізів;
- приклеювання зрізів на предметні скельця;
- депарафінування зрізів;
- забарвлення зрізів бромфеноловим синім;
- забарвлення ядер клітин розчином основного фуксину;
- зневоднення забарвлених зрізів у спирті;
- просвітлення зневоднених зрізів у ксилолі;
- замикання просвітлених зрізів у бальзам під покривне скельце.

Спосіб здійснюють таким чином: роблять біопсію тканини, шматочки якої (1-2 мм завтовшки) фіксують у 10 % розчині нейтрального формаліну впродовж 4-6 годин, зневоднюють у спиртах, просвітлюють у ксилолі, просочують парафіном, заливають у парафінові блоки, з яких роблять мікротомні зрізи, які депарафінують та забарвлюють для визначення катіонних білків діахромним фарбником – 0,1 % розчином бромфенолового синього в боратному буфері (pH=8,1-8,2); промивають у воді, забарвлюють ядра клітин 0,05 % розчином основного фуксину, забарвлені зрізи зневоднюють в абсолютному спирті, просвітлюють у ксилолі, замикають у бальзам під покривне скельце та досліджують під мікроскопом вміст катіонних білків у клітинах.

Спосіб дозволяє визначати та досліджувати в клітинах тканин органів секреторні гранули, які містять катіонні білки.

Приклад конкретного виконання запропонованого способу.

Відразу після виведення із досліду в тварин (щурів та мишей) брали термінальний відділ клубової кишки довжиною 10 мм, який фіксували протягом 6 годин у 10 % нейтральному формаліні. Фіксовану тканину промивали в проточній воді протягом 1 години, переносили для зневоднення у спирти (70°, 80°, 90°, абсолютний, по 2 години у кожній порції) просвітлювали в ксилолі (двічі по 30 хвилин), просочували в суміші парафіну та ксилолу при 37 °С, протягом 30 хвилин, у чистому парафіні при 56 °С (двічі по 1,5 години) та заливали в парафінові блоки, з яких на ротаційному мікроскопі виготовляли зрізи товщиною 6 мкм, наклеювали їх на предметні скельця за допомогою 0,1 % розчину желатину, висушували при кімнатній температурі протягом 24 годин, депарафінували в ксилолі (двічі по 5 хвилин) та забарвлювали бромфеноловим синім, для чого зрізи попередньо доводили крізь спирти (100°, 90°, 70°) до води, на препарати наносили декілька крапель 0,1 % розчину бромфенолового синього у боратному буфері (рН=8,1-8,2), забарвлювали протягом 30 хвилин,

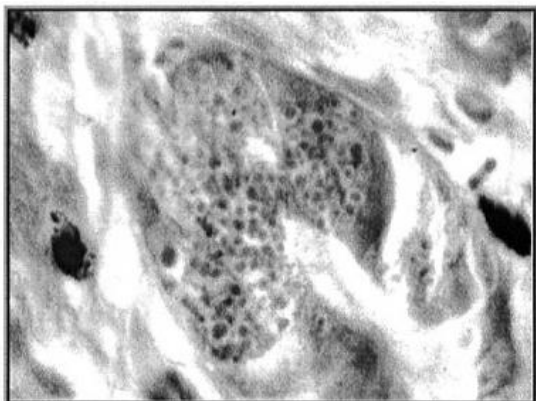
швидко промивали в дистильованій воді, забарвлювали ядра клітин 0,05 % розчином основного фуксину, забарвлені зрізи зневоднювали в абсолютному спирті (15 секунд), просвітлювали у ксилолі (двічі, по 2 хвилини), замикали в кедровий бальзам під покривне скельце, та під мікроскопом при загальному збільшенні $\times 400$ – $\times 1000$ спостерігали гранули синього кольору, які містять катіонні білки.

На фіг. 1 зображено гранули, які містять катіонні білки в клітинах Панета миші.

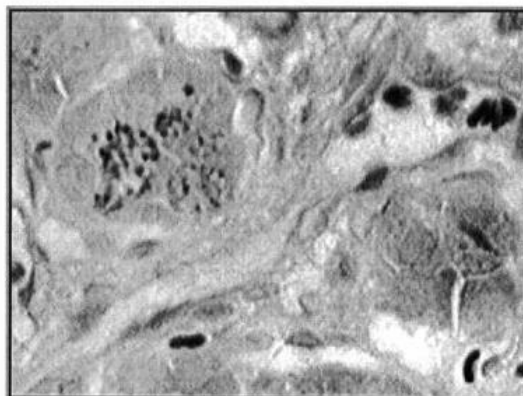
На фіг. 2 зображено гранули, які містять катіонні білки в клітинах Панета щура.

За результатами дослідження можна зробити висновок, що за допомогою запропонованого цитохімічного способу можна визначати катіонні білки на мікротомних зрізах тканин та проводити оцінку їх вмісту в клітинах.

Таким чином, запропонований спосіб визначення катіонних білків у клітинах дозволяє визначати їх на парафінових зрізах органів тварин різних видів, оцінювати їх вміст у клітинах. Спосіб простий для виконання, має добру відтворюваність, не потребує складного обладнання та дефіцитних реактивів і може бути запропонований для використання як у ветеринарній, так і в науковій практиці.



Фіг. 1



Фіг. 2