

Изобретение относится к области определения влияния небелковых азотистых веществ на живой организм и может быть использовано в животноводстве, ветеринарии, медицине.

Известен способ гистологического исследования печени (1), с помощью которого изучают влияние веществ, например, стимуляторов роста на морфофункциональное состояние печени. Однако в связи с длительностью обработки материала и сложностью оценки влияния этих веществ на морфологию печени гистологические методы редко используются.

Наиболее близким к заявляемому объекту является способ оценки состояния ткани живого организма, по которому можно судить об изменениях, вызванных влиянием, например, небелковых азотистых веществ, вносимых в рацион животного (2).

Способ заключается в фиксации образца ткани в формалине, обезвоживании в этиловом спирте и обработке в реактивах: в частности в смеси ацетона, скипидара живичного, живицы кедровой или сосновой. Полученные образцы инкубируют в шести порциях парафина, после чего производят резание блоков. Полученный препарат получается тоньше, ткань меньше деформируется, общая продолжительность приготовления образцов до микроскопирования составляет 18-28 часов.

Микроскопирование ткани, полученной по описанному способу, не дает возможности получить достоверный ответ о влиянии небелковых азотистых веществ на организм животного. Кроме того, способ длителен и трудоемок.

Задачей настоящего изобретения является усовершенствование способа морфологической оценки влияния небелковых азотистых веществ на организм животного посредством сочетания предложенных операций, чем достигается высокая достоверность и сокращается время осуществления способа.

Поставленная задача решается тем, что в способе морфологической оценки влияния небелковых азотистых веществ на организм животного, включающем фиксацию образца ткани животного в формалине, обезвоживание его спиртом, промывку, обработку реактивами и микроскопическое определение состояния образца ткани, согласно изобретению, в качестве образца ткани животного исследуют ткань печени, причем фиксацию производят в 5% формалине в течение 30 мин., а обработку осуществляют гематоксином—эозином, после чего полученный образец освещают, заключают в оптическую среду и под микроскопом определяют содержание больших и пикнотических ядер, а при наличии менее 50% больших ядер и более 35% пикнотических ядер судят о гепатотропном влиянии азотистых веществ на организм животного.

Авторы определили, что использование морфометрического анализа генома печени при изучении влияния стимуляторов роста (небелковых азотистых веществ) в животноводстве является наиболее информативным.

В совокупности заявляемых признаков "выбор формалина 5% концентрации определяется тем, что при более низкой концентрации минимально повреждается ткань, а при концентрации выше 5% подключается деструктурирующее влияние на клетки печени. Время фиксации в 5% формалине в течение 30 минут является оптимальным и зависящим от выбранной концентрации формалина.

Все остальные операции вплоть до микроскопирования определены тем, что они в совокупности с рассмотренными признаками позволяют получить мазок клеток печени, несущий наиболее достоверную информацию об изменениях, происшедших в клетках исследуемой ткани.

Авторами опытным путем было найдено и подтверждено, что по состоянию исследуемой ткани (ткани печени), а именно: по наличию определенного соотношения больших и пикнотических ядер, можно судить об изменениях, происшедших в клетках под воздействием поступающих в организм азотистых небелковых веществ. Таким соотношением является наличие менее 50% больших ядер и более 35% пикнотических ядер.

Существенным отличием предлагаемого способа является:

1. Изготовление мазка из клеток печени.
2. Исключение процесса заливки в плотные среды (парафин, целлоидин).
3. Использование метода кариометрии.
4. Прием дифференцировки и раскладки ядер гепатоцитов на три группы.

Конкретно способ осуществляется следующим образом: у животного производят забор маленького кусочка печени, из которого срезают клетки печени и в виде тонкого мазка растягивают на предметном стекле, фиксируют в 5% нейтральном формалине в течение 30 минут, промывают проточной водой, окрашивают гематоксином-эозином, промывают проточной водой, обезвоживают в спиртах 40-60-80-96°, просветляют ксилолом, заключают в полистирол, микроскопируют при увеличении микроскопа об. 90, ок.10, с помощью микрометра определяют диаметры всех ядер и с помощью номограммы для определения объема ядер и клеток вычисляли их объем, определяли процент гепатоцитов с крупными, средними и пикнотическими ядрами.

Всего предложенным способом изучен гепатотропный эффект влияния небелковых азотистых веществ на 40 бычков. Все животные по характеру исследуемого вещества были разделены на 4 группы (табл.1).

Результаты исследования представлены в табл.2.

Как видно из табл. 2 использование углеаммонийных солей (II, III, IV группы) приводит к достоверному увеличению количества пикнотических ядер в печени, что свидетельствует о их гепатотропном эффекте.

Примеры конкретного выполнения.

Пример 1. В корм животного добавляли мочевины.

Бычок № 347 (гр.1). При забое бычка взяли печень, срезали с правой доли печени на глубине 10 см кусок органа толщиной 2 см, длиной 4 см.

Затем полученный кусок печени положили на фильтровальную бумагу и через 1-2 минуты после того как стекла кровь острым ножом легко сняли первый слой клеток, вытерли нож и еще раз с этой же поверхности сняли слой клеток, после чего его разместили на предметном стекле в виде тонкого мазка.

Мазок сразу же поместили в 5-ти % раствор формалина на 30 минут. После чего его промыли в 3-4 порциях проточной воды на протяжении 5 минут, выдержали в гематоксилине 2 минуты, промыли в проточной воде 3 минуты и выдержали в этиловом спирте,

подкисленном HCl. После этого выдержали образец для окрашивания в 1%-ном растворе эозина в течении 1 минуты, промыли в спирте 1 минуту, просветлили в ксилоле 3 минуты.

Полученный образец исследовали под микроскопом, измерили диаметр ядер при сплошной выборке. При этом было определено:

- больших ядер с четкими ядрышками и небольшим количеством хроматина (диаметр 6 мкм) 54,1%;
- ядер средних с четкими ядрышками и небольшим количеством хроматина (диаметр меньше 6 мкм) 15,0%;
- ядер пикнотических (мелкие, темные) с большим скоплением гетерохроматина незначительным количеством эухроматина, 30,5%.

Если количество больших ядер составляет больше 50%, а пикнотических ядер - меньше 35% - это свидетельствует об отсутствии гепатотропного влияния мочевины.

Пример 2. Бычок № 215. В корм животного добавляли углеаммонийные соли.

Все операции проводили, как в примере 1. При исследовании полученных препаратов обнаружили, что имеется 25,3% больших ядер, 16,4%-средних и 41,7% -пикнотических.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что добавка углеаммонийных солей в корм животного достаточно резко влияет на печень бычка.

Преимущества предложенного способа по сравнению с прототипом состоят в следующем (табл.3):

1. В сокращении времени исследования, поскольку только получение гистологического препарата сокращается до 3 часов.
2. Повышение доступности морфологического метода в оценке влияния веществ на печень животных.
3. Удешевлении исследования.
4. Уменьшении затрат труда и рабочего времени.

Ожидаемый положительный эффект состоит в более оперативном и точном отборе вещества целью дальнейшего исследования в качестве стимуляторов роста животных.

Потребность данного изобретения определяется острой необходимостью использования стимуляторов роста животных в сельскохозяйственной практике.

Т а б л и ц а 1

Схема опыта

Группы животных	Количество животных, гол.	Характер откорма животных в основной период
I	10	Основной рацион (ОР) + силос кукурузный без добавок + комбикорм с добавкой мочевины
II	10	ОР + силос кукурузный с добавкой мочевины при его заготовке + комбикорм без добавок
III	10	ОР + силос кукурузный с добавкой углеаммонийной соли при его заготовке + комбикорм без добавок
IV	10	ОР + силос кукурузный раскисленный углеаммонийной солью перед скармливанием + комбикорм без добавок

Т а б л и ц а 2

Влияние небелковых азотистых веществ на раскладку ядер гепатоцитов в %

Группы	Большие	Средние	Пикнотические
I	52,5 ± 1,3	14,33 ± 1,02	32 ± 1,48
II	32,8 ± 3,3	18,5 ± 2,1	51,3 ± 3,4
III	36,8 ± 4,9	17,4 ± 2,8	54,0 ± 3,8
IV	28,7 ± 2,5	18,5 ± 1,17	58,0 ± 2,83

Т а б л и ц а 3

## Сравнительная характеристика заявленного способа и прототипа

Наименование рассматриваемого аспекта	Прототип	Заявленный способ
1. Ускорение и доступность способа:		
а) затрата времени на изготовление гистологического препарата печени	28 часов	3-2 часа
б) реактивы и оборудование	Формалин, ацетон, скипидар живичный, живица кадровая, парафин, красители спирт ксилол, полистерол термостат микроскоп	формалин спирт красители ксилол, полистирол микроскоп
в) затраты труда и вредность	28 часов, контакт с парафином и ацетоном	3 часа, отсутствие контакта с парафином и ацетоном
г) возможность выполнения в отсутствии специальной морфологической лаборатории	нет	имеется