



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 76903

(13) C2

(51) МПК (2006)

G01N 1/00

G01N 1/30

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ГЛІЦЕРИН-БУТАНОЛ-ПАРАФІНОВОЇ ЗАЛИВКИ МАТЕРІАЛУ ДЛЯ ГІСТОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

1

2

(21) а200501391

(22) 15.02.2005

(24) 15.09.2006

(46) 15.09.2006, Бюл. № 9, 2006 р.

(72) Ковальова Ілона Михайлівна

(73) Ковальова Ілона Михайлівна

(56) Бабанин А.А., Ромаскевич Ю.А. Способ гистологической обработки тканей для получения парафиновых блоков.// Функциональные и прикладные вопросы морфологии. Тр.Крымск. ордена Труд. Красн. Знам. мед. ин-та, т.120 - Симферополь, 1988.- С.192-193.

Муниров М.С. Сравнительно-анатомическая характеристика толстой кишки, ее замыкательного ап-

парата и кровеносного русла. Автореф... канд. мед.наук 14.00.02.- анатомия человека. Уфа - 2000. с.20.

(57) Спосіб гліцерин-бутанол-парафінової заливки матеріалу для гістологічних досліджень, який **відрізняється** тим, що при виготовленні гістологічних препаратів досліджуваний матеріал поступово зневоднюють у розведеннях гліцерину 25%, 50%, 75%, 90% та двох порціях 100% гліцерину по 2 години в кожній порції при температурі 37°C; проводять послідовно через суміш бутанол-гліцерин (37°C), дві порції чистого бутанолу (37°C), парафін №1 (54°C) -12 годин, парафін №2 (54°C) -12 годин.

Винахід стосується до області медицини, а саме гістології.

Відомі методи підготовки матеріалу для гістологічного дослідження шляхом заливки у парафін, які складаються з кількох етапів: зневоднення етанолом (рідко ацетоном, ізопропанолом, діоксаном та деякими іншими речовинами), заміщення етанолу будь-яким розчинником парафіну (ксилол, толуол, бензол, хлороформ, петролейний ефір, в окремих випадках діоксан, ізопропанол та бутанол) та просочення парафіном. Розповсюджені також методи заливки матеріалу у целоїдин, які мають етапи зневоднення етанолом та просочення целоїдином у розчинах висхідної концентрації, що готуються на суміші етанол-діетиловий ефір. Відомий метод комбінованої заливки матеріалу у целоїдин-парафін, який має такі етапи: зневоднення матеріалу в етанолі, просочення розчином целоїдину на суміші етанол-діетиловий ефір, заміщення суміші етанол-діетиловий ефір хлороформом, просочення парафіном [1-5].

Зневоднення для загальногістологічних і більшості спеціальних методик дослідження здійснюють з використанням ряду розведень етанолу у висхідній концентрації: 60°, 70°, 80°, 96° (1), 96° (2) і абсолютний етанол [4]. До недоліків цього способу зневоднення слід віднести: значну деформацію

структур, що вивчаються, стиснення та значне ущільнення матеріалу, можливість перепалення об'єктів в етанолі високої концентрації, надвисока хрупкість сполучної та кісткової тканин (особливо після фіксації зі сполуками хрому), що унеможливає виготовлення якісних препаратів з парафінових блоків.

Більш досконалим є ізопропанол-целоїдин-парафіновий метод заливки матеріалу, який має етапи зневоднення, послідовних просочень целоїдином та парафіном [6]. На всіх етапах обробку матеріалу здійснюють в середовищах, основою яких є ізопропанол, що забезпечує більш м'яке зневоднення. Недоліками цього способу є трудомісткість, велика тривалість (14 діб), можливість обробки лише невеликих кусочків матеріалу (біопсії).

Відомі також методи заливки, в яких для зневоднення використовують гліцерин [4, 7]. Для здійснення методу, що запропонований [7], матеріал промивають після фіксації у воді, послідовно переносять в 60%, 80% і 100% гліцерин на 2-3 години у кожний, потім їх поміщають в суміш гліцерин-ксилол на 2-3 години, ксилол №1 - 2-3 години, ксилол №2 - 2-3 години, ксилол-парафін (37°C) 2-3 години, парафін №1 (54°C) -1-2 години, парафін №2 (54°C) -1-2 години. Недоліками цього методу є

(13) C2

(11) 76903

(19) UA

неможливість проводки щільних тканин (сполучна та кісткова), кусочків тканини, більших 1-2мм, оскільки гліцерин не змішується з ксилолом і не відбувається його заміщення у проміжних середовищах.

Більш досконалим є метод з використанням бутанолу в якості проміжного середовища [8]. Відповідно до запропонованого методу матеріал після фіксації промивають, підсушують на фільтрувальному папері, переносять в 80% гліцерин, потім послідовно в три порції 100% гліцерину по дві години в кожній порції. Весь процес проводять в термостаті при температурі 37°C. Для просочення об'єктів парафіном матеріал переносять у суміш бутанол-гліцерин на 30 хвилин, бутанол - 1,5 години, суміш бутанол-бензол - 30 хвилин, бензол - до просвітлення об'єкта, насичений розчин парафіну в бензолі при 37°C 1-2 години, парафін в 2 порціях по 1-1,5 години в кожній (54°C). Недоліками цього способу є значне ущільнення тканин під час проводки через бензол, недостатня повнота зневоднення кусочків матеріалу (особливо сполучної та кісткової тканин).

Відомі способи для заливки щільних об'єктів з використанням суміші етилового та бутилового спирту [1, 3, 5]. Відповідно до однієї методики [3, С.142], матеріал (комахи) фіксують в суміші Жильсона, переносять на 30-60 хвилин в 35°C етиловий спирт, потім послідовно проводять через суміші етилового та бутилового спирту: а) 90см³ 45°C етилового спирту +10см³ бутилового спирту - 1-2 години; б) 80см³ 62°C етилового спирту +20см³ бутилового спирту - 2 години; в) 65см³ 77°C етилового спирту +35см³ бутилового спирту - 4 години; г) 45см³ 90°C етилового спирту +55см³ бутилового спирту - 6-24 години; д) 25см³ 90°C етилового спирту +75см³ бутилового спирту - 6-12 годин; е) чистий бутиловий спирт (двічі змінити) - 6 годин; ж) суміш бутиловий спирт-парафін (1:2) - 12-24 години; з) парафін або суміш парафіну і воску.

Відповідно до іншої методики [1, С.567], запропонованої для проводки дентину, матеріал після фіксації та декальцинації промивають протягом 24 годин в проточній воді, збезводнюють послідовно в 30, 50 та 70%-му етиловому спирті (по 24 години в кожній порції), потім в суміші 96%-го спирту і н-бутанолу (24 години) і в двох змінах н-бутанолу (по 24 години в кожній). Просочують протягом 12-24 годин твердим парафіном і заливають матеріал.

Відомий спосіб для скорочення обробки матеріалу з використанням бутанолу або ізобутанолу [5, С.82]. Відповідно до методики препарати після промивки з 50°C етилового спирту або більш міцного (але не з води) переносять в бутиловий спирт або проміжні суміші обох спиртів (в кожній 1-2 години). Після 24 годин перебування в абсолютному бутиловому спирті переносять спочатку в бутиловий спирт, насичений парафіном на холод, потім в насичений в теплі і в чистий парафін, в якому залишають на 24 години.

Однак при наведених вище способах не виключений вплив етилового спирту на тканини, просочення в проміжних середовищах з бутанолу, насиченого парафіном, недоцільне і вимагає зайвої витрати часу.

Метою винаходу є підвищення якості виготов-

лення препаратів за рахунок зменшення ущільнення тканин під час зневоднення і проводки.

Поставлена мета досягається тим, що при здійсненні способу досліджуваний матеріал збезводнюють у розведеннях гліцерину поступово у 25%, 50%, 75%, 90% та двох порціях 100% гліцерину по 2 години в кожній порції при температурі 37°C; проводять послідовно через суміш бутанол-гліцерин (37°C), дві порції чистого бутанолу (37°C), парафін №1 (54°C) - 12 годин, парафін №2 (54°C) - 12 годин.

Новизна методу, що пропонується для заливки матеріалу для гістологічних досліджень, полягає в тому, що зневоднення матеріалу здійснюють поступово у 25%, 50%, 75%, 90% та двох порціях 100% гліцерину по 2 години в кожній порції при температурі 37°C. Нами емпірично встановлено, що при цьому відбувається найбільш м'яке та повне зневоднення матеріалу, відсутнє ущільнення тканин. Зменшення початкової концентрації гліцерину або збільшення кількості розведень недоцільне і призводить до марної витрати часу. Збільшення концентрації гліцерину у початкових порціях призводить до неповного зневоднення тканин (особливо сполучної та кісткової), оскільки концентрований гліцерин повністю заміщає воду у поверхневих шарах кусочка (1-2мм) і не проходить у внутрішні шари. В зв'язку з тим, що щільність гліцерину вища, ніж у води, критерієм просочення, а отже, і послідовного зневоднення об'єктів є їх занурення на дно посуду. Цей час коливається в межах 1,5-2 годин при температурі 37°C і залежить від величини об'єкта та щільності тканини. Температура 37°C є оптимальною для проводки матеріалу. Використання бутанолу в якості проміжного середовища дозволяє уникнути надмірного ущільнення тканин, яке відбувається при використанні ксилолу та інших розчинників парафіну (толуол, бензол, хлороформ, петролейний ефір тощо).

Переваги запропонованого способу в забезпеченні якісної проводки великих, крихких та щільних об'єктів, об'єктів після фіксації сполуками хрому, уникнення надмірного ущільнення та деформації тканинних структур, яка дає можливість виготовлення зрізів товщиною 4-6мкм і застосовувати будь-які розповсюджені методи забарвлення.

Відомості, що підтверджують можливість здійснення винаходу

Спосіб здійснюють наступним чином.

Добре промитий від залишків фіксатора матеріал (кусочки твердої оболони головного мозку людини розміром 1×1×0,3см після фіксації в суміші хромової кислоти з залізними квасами) збезводнюють у 25%, 50%, 75%, 90% та двох порціях 100% гліцерину по 2 години в кожній порції при температурі 37°C; проводять послідовно через суміш бутанол-гліцерин (37°C) - 12 годин, дві порції чистого бутанолу (37°C) - 12 годин, парафін №1 (54°C) - 12 годин, парафін №2 (54°C) - 12 годин і заливають у парафін. В 76 випробуваннях ми отримали поперечні зрізи судинно-нервових комплексів твердої оболони головного мозку людини товщиною 5мкм, які забарвлювали за методиками Масона та Krut'say.

Запропонована методика забезпечує отримання якісних гістологічних препаратів для прове-

дення складних гістологічних, гістохімічних і кількісних цитологічних досліджень в науково-дослідницькій роботі і в патогістологічній практиці.

Джерела інформації, прийняті до уваги під час експертизи:

1. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. - М.: Мир, 1969.-645с.
2. Меркулов Г.А. Курс патологистологической техники. - Л.: «Медицина», 1969. - 423с.
3. Роскин Г.И., Левинсон Л.Б. Микроскопическая техника. - Москва.: «Советская наука», 1957. - 468с.
4. Микроскопическая техника: Руководство / Под ред. Д.С.Саркисова и Ю.Л.Перова. -М.: Медицина, 1996. - 544с.
5. Ромейс Б. Микроскопическая техника. - Мо-

сква.: Изд-во Иностранной литературы, 1953. - 718с.

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

7. Розенберг В. Д. Модификация процесса обезвоживания материала при парафиновой заливке в патогистологической практике. // Архив патологии. - 1991. - №. - С.70-71.

8. Бабанин А.А., Ромаскевич Ю.А. Способ гистологической обработки тканей для получения парафиновых блоков. // Фундаментальные и прикладные вопросы морфологии. Тр. Крымск. ордена Труд. Краен. Знамен. мед. ин-та, т.120 - Симферополь, 1988. - С.192-193.