



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **68020** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
A61B 5/00
A61B 10/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2011 10514	(72) Винахідник(и): Трач Росоловська Світлана Василівна (UA), Боднар Ярослав Ярославович (UA)
(22) Дата подання заявки: 30.08.2011	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 12.03.2012	(73) Власник(и): ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО, Майдан Волі, 1, м. Тернопіль, 46001 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 12.03.2012, Бюл.№ 5	

(54) СПОСІБ ГІСТОХІМІЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ХОЛІНЕСТЕРАЗИ

(57) Реферат:

Спосіб гістохімічного визначення холінестерази включає обробку гістологічного зрізу тіолоцтовою кислотою. Досліджуваний матеріал після префіксації і виготовлення кріотомних зрізів інкубують у розчині з тіолоцтовою кислотою з одночасним впливом енергії ультразвукових коливань при частоті випромінювання 0,88 МГц, потужності 0,2-0,4 Вт/см² і температурі 18-22 °С упродовж 10-20 хв. Виконують етап промивання тканинних зрізів дистильованою водою за аналогічних умов ультразвукового опромінення впродовж 2-4 хв. із подальшим виготовленням мікропрепарату за загальноприйнятою методикою.

UA 68020 U

Корисна модель стосується біології і медицини, а саме гістологічної техніки і гістохімічного аналізу, і може бути використана для гістохімічного аналізу активності холінестерази.

Відомий спосіб гістохімічного визначення холінестерази, що включає обробку гістологічного зрізу тіолоцтовою кислотою [1]. За відомим способом, тіолоцтова кислота при наявності ферменту при температурі 30 °C гідролізується до вільної оцтової кислоти та сірководню з утворенням преципітату сульфідів свинцю, за яким роблять висновок про активність холінестерази.

Недоліком відомого способу є недостатній рівень методичності, що впливає з того, що через неоднаковий рівень вивільнення внутрішньоклітинного ферменту в різних тканинах, не весь фермент вступає у взаємодію в тестових реакціях. Саме через це, наведений недолік призводить до недостатньої точності визначення та інформативності результатів.

В основу корисної моделі поставлено задачу вдосконалити відомий спосіб, в якому шляхом зміни технології гістохімічної обробки тканинного зрізу, спрямованої на покращання вивільнення ферменту і зв'язування його з індикатором, досягають підвищення методичності, а отже точності дослідження та інформативності аналізу в цілому.

При вирішенні поставленої задачі було взято до уваги те, що застосування в технології гістохімічної обробки додаткового індуктора вивільнення холінестерази із тканини сприятиме інтенсифікації процесів взаємодії між ферментом і реактивом. Крім того, посилення процесу дифузії інгредієнтів тестової реакції забезпечуватиме оптимізацію умов хемосорбції вказаних інгредієнтів, що позитивно позначиться на контрастності гістохімічного препарату. Додатковим індуктором процесу взаємодії доцільно використати енергію механічних коливань ультразвукового діапазону, оскільки фізико-хімічні властивості ультразвуку перш за все пов'язані з посиленням проникності клітинних мембран, а також покращенням ефективності взаємодії інгредієнтів у реакції. До того ж, вказаний методичний прийом вигідно вирізняється тим, що енергія ультразвукових коливань підлягає регульованому контролю і керуванню [2].

Беручи до уваги наведені міркування, у відомому способі гістохімічного визначення холінестерази, що включає обробку гістологічного зрізу тіолоцтовою кислотою, відповідно до корисної моделі досліджуваний матеріал після префіксації і виготовлення кріотомних зрізів інкубують у розчині з тіолоцтовою кислотою з одночасним впливом енергії ультразвукових коливань при частоті випромінювання 0,88 МГц, потужності 0,2-0,4 Вт/см² і температурі 18-22 °C упродовж 10-20 хв., після чого виконують етап промивання тканинних зрізів дистильованою водою за аналогічних умов ультразвукового опромінення впродовж 2-4 хв. з подальшим виготовленням мікропрепарату за загальноприйнятою методикою.

Перелік фігур.

Фіг.1. Холінестеразопозитивні нервові волокна в міокарді правого передсердя. Інтактний щур репродуктивного віку. Метод з тіолоцтовою кислотою. Збільш.: x1000.

Фіг.2. Холінестеразопозитивні нервові волокна в міокарді правого передсердя. Інтактний щур репродуктивного віку. Метод з тіолоцтовою кислотою із використанням ультразвуку. Збільш.: x1000.

Спосіб здійснюють наступним чином. Для префіксації досліджуваний матеріал поміщають в охолоджений 10 % розчин нейтрального формаліну і витримують 12-16 годин у холодильнику при температурі 4 °C. Матеріал заморожують і виготовляють кріотомні зрізи товщиною 20-30 мкм з подальшим промиванням їх у холодній воді. Зрізи обережно переносять на предметне скло, розкладають в чашки Петрі і заливають інкубаційним розчином наступного складу і необхідного об'єму, а саме: 0,1М цитратного буферу рН 6,2-20 мл, 0,5 % розчину нітрату свинцю - 0,5 мл та тіолоцтової кислоти - 0,03 мл. У чашку Петрі занурюють головку випромінювача джерела ультразвукових коливань, в якому імпульси генеруються з частотою 0,88 МГц і потужністю 0,2-0,4 Вт/см при безперервному режимі тривалості імпульсів модуляції. Інкубацію здійснюють впродовж 10-20 хвилин. Після завершення часу інкубації, інкубаційний розчин зливають і промивають тканинні зрізи в дистильованій воді, використовуючи при цьому ультразвук упродовж 2-4 хвилин. Готують мікропрепарат за загальноприйнятою методикою та досліджують у полі зору мікроскопа. Про наявність ферменту судять за темно-коричневим осадом сульфідів свинцю, що утворюється в місцях локалізації холінестерази.

Для доказу того, що обраний метод виявляє саме холінестеразу, частину кріотомних зрізів перед інкубацією поміщають у розчин прозерину 1×10^{-4} М. Відсутність в цих зрізах темно-коричневого осаду сульфідів свинцю, як кінцевого продукту реакції, свідчитиме про її специфічність.

Приклад 1. Для префіксації досліджуваний матеріал - серце інтактного статевозрілого щура, помістили в охолоджений 10 % розчин нейтрального формаліну і витримали 16 годин при температурі 4 °C. Орган заморозили, виготовили на кріотомі зрізи товщиною 20-30 мкм,

промили їх водою і обережно перенесли на предметне скло, розклали в чашки Петрі і залили інкубаційним розчином наступного складу і необхідного об'єму: ОДМ цитратною буферу рН 6,2-20 мл, 0,5 % розчину нітрату свинцю - 0,5 мл, тіолоцтової кислоти (Sigma-Aldrich/ Germany, молекулярною масою 76,12) - 0,03 мл. Як джерело ультразвуку використали ультразвуковий апарат 1-01-Ф - "Мед-ТеКо" з генерацією ультразвукових коливань частотою 0,88 МГц при потужності 0,2-0,4 Вт/см² у безперервному режимі тривалості імпульсів модуляції. Випромінювальну головку генератора занурили в чашку Петрі з інкубаційним розчином на 10 хв. з тривалістю кожної експозиції 2 хв. Далі предметне скло із тканинними зрізами промили дистильованою водою із використанням випромінювача ультразвуку упродовж 2 хв. Після промивання предметне скло висушили, зрізи заключили в гліцерин желатину і дослідили в полі зору мікроскопа. Про наявність ферменту робили висновок за утворенням темно-коричневого осаду сульфідів свинцю, що утворювався в місцях зосередження в тканині холінестерази.

Приклад 2. За запропонованим способом здійснили визначення активності холінестерази в експерименті на 12 щурах (по 6 у кожній групі). Завдяки впливу на тканинні взірці енергії механічних коливань ультразвукової частоти досягнуто стабільно повного виходу з клітин холінестерази для наступного гістохімічного визначення діагностично важливого ферменту з високим рівнем контрастності елементів у мікропрепараті, що особливо важливо з огляду на практичне усунення артефактів (фіг. 1, 2).

Таким чином, запропонований спосіб забезпечує вищу, ніж за відомим способом-прототипом, точність та інформативність, а отже і вищий рівень методичності способу, що знайде використання в практиці гістохімічного аналізу.

Джерела інформації:

1. Николаев Г. М. О гистохимическом методе активности холинэстеразы/ Г. М. Николаев// Архив патологии, 1971. - № 9. - С. 67-70.

2, Акопян Б. В. Основы взаимодействия ультразвука с биологическими объектами: учеб. пособие [для студ. выс. учеб. зав.] / Б. В. Акопян, Ю. А. Ершов. - М.: Изд-во МГТУ им. Н. Э. Баумана, 2005.-224 с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб гістохімічного визначення холінестерази, що включає обробку гістологічного зрізу тіолоцтовою кислотою, який **відрізняється** тим, що досліджуваний матеріал після префіксації і виготовлення кріотомних зрізів інкубують у розчині з тіолоцтовою кислотою з одночасним впливом енергії ультразвукових коливань при частоті випромінювання 0,88 МГц, потужності 0,2-0,4 Вт/см² і температурі 18-22 °С упродовж 10-20 хв., після чого виконують етап промивання тканинних зрізів дистильованою водою за аналогічних умов ультразвукового опромінення впродовж 2-4 хв. із подальшим виготовленням мікропрепарату за загальноприйнятою методикою.



Fig. 1

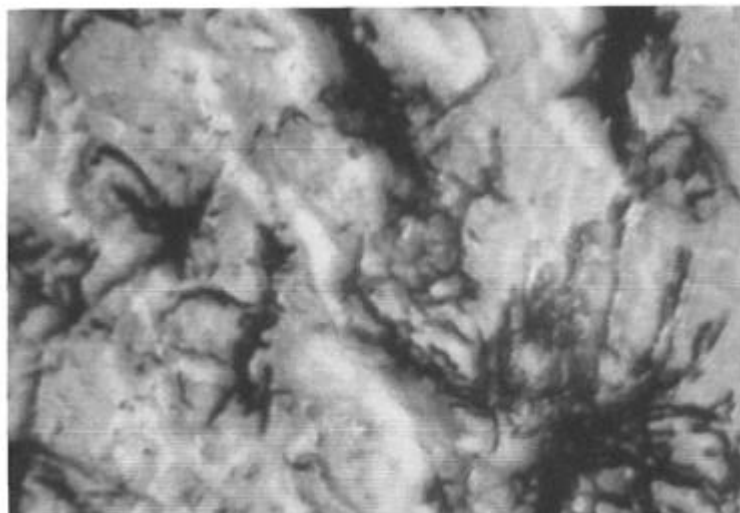


Fig. 2

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601