



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **80458** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
A61B 10/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 14999	(72) Винахідник(и): Грабовий Олександр Миколайович (UA), Іващенко Леся Миколаївна (UA)
(22) Дата подання заявки: 27.12.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 27.05.2013	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ РАКУ, вул. Ломоносова, 33/43, м. Київ, 03022 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 27.05.2013, Бюл.№ 10	

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ ЯДЕРЦЕВИХ ОРГАНІЗАТОРІВ

(57) Реферат:

Спосіб виявлення ядерцевих організаторів включає імпрегнацію гістологічного препарату за допомогою нітрату срібла. В розчин барвника додають желатин-кислотний розчин, який одержують змішуванням рівних об'ємів розчину желатину та розчину з мурашиної кислоти лимонної кислоти, глюкози, гліцерину, води дистильованої. Забарвлюють препарат модифікованим розчином барвника з наступним підсиленням контрастності забарвлення за допомогою розчину хлорного золота.

UA 80458 U

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме до патологічної анатомії, гістологічної техніки, і може використовуватися для високоякісної візуалізації районів ядерцевого організатора (ЯО) в ядерцеутворюючих хромосомах.

ЯО являє собою тонкофібрилярне утворення центральної частини ядерця, який містить ділянки акроцентричних хромосом 13, 14, 15, 21 і 22, що несуть рибосомальні гени [1]. Візуалізація ЯО заснована на здатності до вибіркового зв'язування іонів срібла з негістоновими білками хромосом, які утворюють рибонуклеопротейнові комплекси зі знов синтезованою рРНК [2]. За допомогою імпрегнації сріблом виявляються ті ЯО, які в фазі G2 активно функціонують, беручи участь в синтезі 18S і 28S класів рРНК [3].

Найближчим аналогом є спосіб забарвлення гістологічних зрізів за методикою розробленою Ховелом і Блеком (Howell W.M. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method / W.M. Howell, D.A. Black // Experientia.-1980. - № 36. - P. 1014) для виявлення ядерцеутворюючих регіонів хромосом.

Позитивним у аналогу є те, що такий спосіб дозволяє візуалізувати ЯО у клітинах гістологічного препарату.

Недоліком аналога є те, що через випадіння осаду відновленого срібла під час реакції ускладнюється ідентифікація мікроядерця та морфометрична обробка матеріалу, а наявність виразного фонового забарвлення унеможливорює отримання якісного препарату із високою специфічністю реакції.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалити спосіб виявлення ядерцевих організаторів шляхом попередньої інкубації гістологічних зрізів в розчині кислот, модифікації розчину барвника, та підсилення контрастності з допомогою хлорного золота, що дасть можливість забезпечити високу специфічність забарвлення ЯО з їх чітким контрастним контуруванням та підвищити точність морфометричної оцінки цих утворень.

Поставлена задача вирішується наступним чином:

При виявленні ЯО шляхом імпрегнації гістологічного препарату нітратом срібла, желатин-кислотний розчин готують змішуванням рівних об'ємів 4 % розчину желатину та розчину, який складається з мурашиної кислоти (ЧДА) - 1,5 мл, лимонної кислоти - 0,5 г, глюкози - 4 г, гліцерину - 6 мл, води дистильованої до 100 мл з наступним підсиленням контрастності забарвлення за допомогою 0,05 % розчину хлорного золота, що забезпечує високе контрастне забарвлення ЯО.

Перевагами способу є чітка візуалізація ядерця у гістологічному зрізі, значно менше проявів неспецифічності реакції, відсутність осаду з гранул відновленого срібла. Це дає можливість не тільки полегшити загальну оцінку препарату за допомогою світлової мікроскопії, але й значно покращити якість морфометричної обробки [5].

Послідовна методика виконання способу:

Попередньо готуються наступні розчини:

1. Розчин для промивання зрізів:

мурашина кислота - 0,75 г

лимонна кислота - 0,25 г

вода дистильована до 100 мл.

Розчин готується напередодні, може зберігатися при температурі 0-4 °С до 2 тижнів.

2. Інкубаційно-проявляючий розчин: готується шляхом змішування розчину желатину (А) та кислотного розчину (Б) у співвідношення 1:1. Розчин готується напередодні, але не менш ніж за 1 добу до використання. Може зберігатися при температурі 0-4 °С до 2 тижнів.

А. Розчин желатину: до 4 г желатину додати 20 мл дистильованої води, через 20-30 хв. при кімнатній температурі, поки пройде набухання желатину; промити желатин в 4-5 порціях дистильованої води по 10 хв., постійно перемішуючи. До відмитого желатину додати дистильованої води до 100 мл, залишити до повного розчинення в термостаті (t-37 °С, 6-12 год.); профільтрувати.

Б. Кислотний розчин:

мурашина кислота (ЧДА) - 1,5 мл

лимонна кислота - 0,5 г

глюкоза - 4 г

гліцерин - 6 мл

вода дистильованої до 100 мл.

3. 50 % розчин азотнокислого срібла: до 5 г азотнокислого срібла додати дистильованої води, довівши об'єм розчину до 100 мл. Розчин готується безпосередньо перед використанням, повинен бути прозорим. При потемнінні, зміні кольору, втраті прозорості - використовувати не можна.

4. 5 % розчином аміаку (не можна використовувати повторно).
 5. 0,05 % розчин хлорного золота.
 6. 5 % розчин натрію тіосульфату. Готується безпосередньо перед застосуванням, повторно не використовується.

5 Методика імпрегнації ядерцевих організаторів:

1. Виготовляють гістологічний зріз, товщиною 4-5 мкм, монтують на предметне скельце. Висушують при кімнатній температурі або термостаті.

2. Депарафінують зрізи у 2-3 порціях ксилолу, проводять через 2-3 порції спирту, доводять до дистильованої води.

10 3. Зрізи на 30 с занурюють у розчині для промивання.

4. Промивають зрізи в 2 порціях дистильованої води по 2 хв.

5. На зріз послідовно наносять одну краплю інкубаційно-проявляючого розчину та дві краплі 50 % розчину азотнокислого срібла. Обережно, за допомогою скляної голки або куточка покривного скельця, змішують розчини та накривають зріз із нанесеним середовищем покривним скельцем. Не припустимий контакт розчинів із металевими інструментами.

15 7. Препарат поміщають у захищене від світла місце на одну год. при кімнатній температурі.

8. Змивають зі зрізу нанесені реагенти 5 % розчином аміаку та промивають у 3 порціях дистильованої води по 2 хв.

20 9. Зріз занурюють у розчин хлорного золота на 1-2 хв. (контролюють зміну кольору препарату - зріз повинен з жовто-коричневого набутти сіруватого-фіолетового кольору).

10. Переносять зріз у розчин натрію тіосульфату на 5 хв.

11. Промивають у 3 порціях дистильованої води по 2 хв., дегідратують в серії спиртів зростаючої концентрації, просвітляють у ксилолі та заключають у бальзам під покривне скельце.

25 Результат: ядерцеві організатори - чорно-фіолетового кольору, каріоплазма і цитоплазма - світло-сіро-фіолетові, контури ядер - чіткі, світло-фіолетові.

Прикладом конкретного виконання способу є дослідження достовірності оцінки стану ядерцевих організаторів у клітинах колоректального раку.

30 Дослідження проведено на матеріалі, отриманому від 10 пацієнтів, які страждали на колоректальний рак. З пухлини, що містилася в фрагменті кишки, видаленому операційно, вирізали шматочок пухлини розміром 10×5×15 мм, що орієнтувався перпендикулярно до внутрішньої поверхні кишки. Матеріал пухлини фіксували у 10 % забуференому формаліні й ущільнили у парапласт. З отриманих блоків виготовлені 2 серійні гістологічні зрізи товщиною 4 мкм. На одному гістологічному зрізі виявляли ядерцеві організатори за найближчим аналогом, на другому - зі застосуванням запропонованого способу.

35 Отримані препарати вивчали та фотографували за допомогою мікроскопа Eclipse 80i з камерою Nikon DS-5SMc/L2 за стандартизованих умов. Обробку цифрових зображень здійснювали за допомогою системи аналізу зображення Image J 1,4. Визначали кількість ядерців і вимірювали діаметр кожного в 50 клітинах кожної пухлини, а також розраховували їхній об'єм, проводили стандартну статистичну обробку отриманих результатів. Відмінність парних показників морфометричної оцінки ЯО, що виявляли за найближчим аналогом чи за запропонованим способом здійснювали за критерієм Фішера (табличне значення для обраних вибірок - 1,6).

40 Проведена парна морфометрична оцінка стану ЯО, виявлених за способом, який пропонується, та за способом аналогом, показала, що їхні показники відрізняються (Табл. 1, 2).

45

Таблица 1

Кількість ядерцевих організаторів у ядрах пухлинних клітин

Спосіб забарвлення	№-№ ПГЗ	Кількість ядерцевих організаторів у ядрах пухлинних клітин						
		M	$\bar{\delta}$	m	p	$\bar{\delta}^2$	V	K Фі
Заявлений спосіб	002-3584-5.09	2,96	0,97	0,14	0,05	0,94	0,33	
	004-5198.09	2,78	1,03	0,15	0,05	1,06	0,37	
	005-7621-2.09	2,68	1,07	0,15	0,06	1,14	0,40	
	006-8828-30.09	2,80	0,76	0,11	0,04	0,57	0,27	
	007-9022-3.09	2,18	0,98	0,14	0,06	0,96	0,45	
	008-11153-7.09	3,04	0,93	0,13	0,04	0,86	0,31	
	009-11240.09	3,10	0,95	0,13	0,04	0,90	0,31	
	012-16244.09	2,64	1,19	0,17	0,06	1,42	0,45	
	014-21253.09	3,22	0,95	0,13	0,04	0,91	0,30	
	024-18982-7.11	2,46	0,92	0,13	0,05	0,85	0,37	
Спосіб за найближчим аналогом	002-3584-5.09	2,12	1,36	0,19	0,09	1,85	0,64	1,97
	004-5198.09	2,31	1,31	0,19	0,08	1,72	0,57	1,62
	005-7621-2.09	2,14	1,36	0,19	0,09	1,85	0,64	1,62
	006-8828-30.09	2,32	1,16	0,16	0,07	1,35	0,50	2,35
	007-9022-3.09	2,11	1,23	0,17	0,08	1,51	0,58	1,58
	008-11153-7.09	3,00	1,34	0,19	0,06	1,80	0,45	2,08
	009-11240.09	2,74	1,33	0,19	0,07	1,77	0,49	1,96
	012-16244.09	2,15	1,39	0,20	0,09	1,93	0,65	1,36
	014-21253.09	2,23	0,98	0,14	0,06	0,96	0,44	1,06
	024-18982-7.11	2,26	1,18	0,17	0,07	1,39	0,52	1,65

Таблица 2

Сумарний об'єм ядерцевих організаторів у ядрах пухлинних клітин

Спосіб забарвлення	№-№ ПГЗ	Сумарний об'єм ядерцевих організаторів у ядрах пухлинних клітин						
		M	$\bar{\delta}$	m	p	$\bar{\delta}^2$	V	K Фі
Заявлений спосіб	002-3584-5.09	2,33	0,75	0,11	0,05	0,56	0,32	
	004-5198.09	2,85	0,92	0,13	0,05	0,85	0,32	
	005-7621-2.09	2,70	1,23	0,17	0,06	1,51	0,45	
	006-8828-30.09	2,46	0,74	0,11	0,04	0,55	0,30	
	007-9022-3.09	1,87	0,90	0,13	0,07	0,82	0,48	
	008-11153-7.09	2,25	0,82	0,12	0,05	0,67	0,36	
	009-11240.09	2,92	0,99	0,14	0,05	0,98	0,34	
	012-16244.09	2,05	0,83	0,12	0,06	0,69	0,41	
	014-21253.09	2,92	0,96	0,14	0,05	0,93	0,33	
	024-18982-7.11	1,62	0,83	0,12	0,07	0,68	0,51	
Спосіб за найближчим аналогом	002-3584-5.09	2,39	0,99	0,14	0,06	0,98	0,41	1,74
	004-5198.09	2,95	1,18	0,17	0,06	1,39	0,40	1,65
	005-7621-2.09	2,68	1,67	0,24	0,09	2,79	0,62	1,85
	006-8828-30.09	2,61	1,12	0,16	0,06	1,25	0,43	2,28
	007-9022-3.09	1,96	0,98	0,14	0,07	0,96	0,50	1,17
	008-11153-7.09	2,49	1,13	0,16	0,06	1,28	0,45	1,90
	009-11240.09	3,10	1,21	0,17	0,06	1,46	0,39	1,50
	012-16244.09	2,19	1,18	0,17	0,08	1,39	0,54	2,02
	014-21253.09	3,09	1,39	0,20	0,06	1,93	0,45	2,09
	024-18982-7.11	1,65	0,98	0,14	0,08	0,96	0,59	1,41

Примітка:

5 № - порядковий номер випадку;

№ ПГЗ - патогістологічного висновку;
 М - середнє арифметичне;
 δ - середньоквадратичне відхилення;
 m - помилка середнього;
 р - достовірність середнього;
 δ^2 - дисперсія;
 V - коефіцієнт варіації;
 К Фі - коефіцієнт Фішера.

Отже, середня кількість ЯО при застосуванні способу, що заявляється, виявляється більшою, ніж при застосуванні найближчого аналога. Крім цього дисперсія та коефіцієнт варіації у цих вибірках виявився вищим у аналозі, що пов'язане з виявленням більшої кількості мікроядерців. Попарна оцінка відмінностей показників, отриманих при використанні зазначених способів виявлення ЯО, за критерієм Фішера показала, що у 7 випадках з 10 вона є достовірною.

Сумарний об'єм ЯО, якій розраховувався для кожної клітини, виявився меншим при використанні заявленого способу імпрегнації ЯО, ніж при застосуванні аналога. Але, як і при визначенні кількості ЯО, дисперсія та коефіцієнт варіації у цих вибірках виявився вищим у найближчому аналозі, достовірність чого за критерієм Фішера у 7 випадках з 10.

Таким чином, отримані дані дають підставу стверджувати, що спосіб, який пропонується, у порівнянні з найближчим аналогом, забезпечує більше виявлення ЯО за рахунок мікроядерців. Запропонований спосіб забезпечує більш чітке контрастування ЯО, що підвищує точність оцінки їхніх розмірів.

Джерела інформації:

1. Аргирофильные белки областей ядрышковых организаторов. - маркеры скорости клеточной пролиферации / Н.Т. Райхлин, И.А. Букаева, Н.А. Пробатова [и др.] // Архив патологии.-2006. - № 3. - С. 47-51.

2. Модификация гистохимического метода выявления ядрышковых организаторов на гистологических срезах / И.П. Бобров, А.М. Авдалян, В.В. Климачев [и др.] // Архив патологии.-2010. - Т. 72, № 3. - С. 35-37.

3. Silver-stained nucleolar organizer regions in normal and dysplastic cervical lesions: correlation with DNA ploidy and S-phase fraction by flow cytometry / M. Singha, S. Prasada, N. Karlaa [et al.] // Oncology.-2006. - Vol. 71, № 5. - P. 411-416.

4. Howell W.M. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method / W.M. Howell, D.A. Black // Experientia.-1980. - № 36. - P. 1014 (прототип).

5. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия / Г.Г. Автандилов. - М.: Медицина, 1990. - 384 С.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб виявлення ядерцевих організаторів, що включає імпрегнацію гістологічного препарату за допомогою нітрату срібла, який **відрізняється** тим, що в розчин барвника (50 % AgNO_3) додають желатин-кислотний розчин, який одержують змішуванням рівних об'ємів 4 % розчину

желатину та розчину з
 мурашиної кислоти (ЧДА) - 1,5 мл
 лимонної кислоти - 0,5 г
 глюкози - 4 г
 гліцерину - 6 мл

води дистильованої до 100 мл,
 а гістологічний зріз попередньо оброблюють розчином з
 мурашиної кислоти (ЧДА) - 0,75 мл
 лимонної кислоти - 0,25 г

води дистильованої до 100 мл,
 забарвлюють препарат модифікованим розчином барвника з наступним підсиленням контрастності забарвлення за допомогою 0,05 % розчину хлорного золота.

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

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