



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **112588**

(13) **U**

(51) МПК

**G01N 1/30** (2006.01)

**A61K 31/197** (2006.01)

**G01N 33/48** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

(21) Номер заявки: **u 2016 05814**

(22) Дата подання заявки: **30.05.2016**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **26.12.2016**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **26.12.2016, Бюл.№ 24**

(72) Винахідник(и):

**Шелешко Петро Венедиктович (UA),  
Шелешко Маргарита Султанбеківна (UA)**

(73) Власник(и):

**ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ  
ЗАКЛАД УКРАЇНИ "УКРАЇНСЬКА  
МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА  
АКАДЕМІЯ",  
вул. Шевченка, 23, м. Полтава, 36011 (UA)**

**(54) СПОСІБ ФІКСАЦІЇ ТКАНИН ДЛЯ ЕЛЕКТРОННО-МІКРОСКОПІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ З ДОДАВАННЯМ ГАММА-АМІНОМАСЛЯНОЇ КИСЛОТИ**

(57) Реферат:

Спосіб фіксації тканин для електронно-мікроскопічного дослідження з додаванням гамма-аміномасляної кислоти включає стандартний процес перфузії органів, зрошення поверхні вибраної зони; занурення тканин у фіксуючий розчин та відмивання шматочків після першої фіксації в буферному розчині. При цьому для приготування фіксуючих розчинів роблять суміш 1 % глютаральдегіду та 2,5 % параформальдегіду (1 фіксатор - перфузат) і 2 % розчину тетроксиду осмію (2 фіксатор); та для відмивання шматочків після першої фіксації в буферному розчині обов'язково додають гамма-аміномасляну кислоту.

**UA 112588 U**



Корисна модель належить до галузі медицини, а саме до нейроморфології.

У літературі відомо багато методів фіксації мозку [Боголепов Н.Н. "Методы электронно-микроскопического исследования мозга". - М.: Мед., 1976]. Техніка Карновського (1965) є найбільш поширеною. Суть її у фіксації за допомогою перфузії судинного русла, доповненої дофіксацією перфузату 12-14 годин з відмиванням в фосфатному буфері і зануренням в 2 % розчин тетроксиду осмію на 2 години, що і завершує цю стадію підготовки матеріалу для електронно-мікроскопічного дослідження (ЕМД). Автори провідних методик підкреслюють, що дотримання технік не рятує від появи артефактів фіксації при електронній мікроскопії об'єкта, особливо від змін екстра клітинного простору [K.K. Patel, I.F. Hartman and M.M. Cohen, J. Neurol. Sci, 1971. - 12: 275-288]. Згідно з цим методом, вводили розчин глютамінової кислоти в рідину для інкубації шматочків і до розчинення осмію (1 гр. на 100 мл розчину) та домоглися ефекту зменшення набухання клітин і звуження екстра клітинного простору. Враховуючи, що відносини в нервовій тканині не просто осмотичні, а включають енергетичний обмін [Франк та ін., 1968. - K.K. Patel et al., 1971], передбачалось, що введення фактора перевтілення глютамінової кислоти гамма-аміномасляної кислоти (ГАМК) в перфузат і фосфатний буфер могло також запобігти появі артефактів фіксації, що виникають при пошкодженні нервових структур у процесі взяття шматочків мозку *in vivo*.

Задачею корисної моделі є пошук такої фіксації, яка покращує ультраструктуру тканин нервових елементів ЦНС і ПНС, і так само соматичних органів.

Поставлена задача вирішується у способі фіксації тканин для електронно-мікроскопічного дослідження з додаванням гамма-аміномасляної кислоти, що включає стандартний процес перфузії органів, зрошення поверхні вибраної зони; занурення тканин у фіксуючий розчин та відмивання шматочків після першої фіксації в буферному розчині, у якому, згідно з корисною моделлю, для приготування фіксуючих розчинів роблять суміш 1 % глютаральдегіду та 2,5 % параформальдегіду (1 фіксатор - перфузат) і 2 % розчину тетроксиду осмію (2 фіксатор); для відмивання шматочків після першої фіксації в буферному розчині обов'язково додають гамма-аміномасляну кислоту: фізіологічність дає - 1М фосфатний буфер рН 7,2-7,4, та ГАМК, яка додана до обох фіксаторів і буферу в пропорції 1 грам на 100 мл кожного розчину.

Спосіб здійснюється наступним чином. Для максимального наближення до прижиттєвого стану клітин і нейропілю в суміш по Карновському (перфузат) і в фосфатний буфер додавали ГАМК в пропорції 1 грам на 100 мл. Після перфузії через серце сумішшю розчинів 1 % глютаральдегіду та 2,5 % параформальдегіду на 1М фосфатному буфері рН=7,4 декапітації і розтину черепа тварин перед видаленням шматочків ми скористалися аплікацією охолодженим до 2-5 градусів фіксатором з ГАМК на поверхню мозку. Виділені шматочки мозку для дофіксації розміщали також в перфузат, приготований на буфері, що містить ГАМК. Розсікали на тонкі пластинки, відмивали фосфатним буфером з ГАМК.

Оптимальною є перфузія протягом 15-30 хвилин, зрошення та дофіксація зануренням в свіжому охолодженому перфузаті 30-60 хвилин, подрібнення та продовження дофіксації 12 годин, промивання фосфатним буфером з ГАМК та постфіксація в 2 % тетраоксиді осмію 2 години (рН 7,2-7,4). Триразовим промиванням дистильованою водою закінчували процес фіксації і переходили до наступного етапу підготовки тканини для ЕМД - дегідратації.

Таким чином, відмінністю способу стало додавання ГАМК в перфузат і в буферний розчин, застосований для розведення обох фіксаторів у вищезазначеній пропорції, промивання шматочків після фіксації в перфузаті цим буферним розчином та фіксація в осмії з ГАМК.

Даний спосіб був застосований до ЕМД різних об'єктів, а саме до кори мозку, периферійних нервів в контролі регенерації щурів та у хворих пухлин шлунка (електронограми фіг. 1-7).

Фіг. 1: Електронограма 1: Нервова тканина ЦНС сенсомоторної кори щура. Контроль. Міжклітинні щілини вузькі. Відростки без ознак вакуолізації та зрушення структур. Збільшення 9450. Фіксація перфузією, зрошенням та зануренням.

Фіг. 2: Електронограма 2: Астроцит сенсомоторної кори щура. Міжклітинні простори вузькі. Органели та контактні відростки активні. Збільшення 9450. Фіксація (див. приклад 1).

Фіг. 3: Електронограма 3: Міжнейронні зв'язки. Мієлінові волокна. Нейропіль сенсомоторної кори півкуль інтактного щура. Збільшення 9450. Фіксація (див. приклади 1 та 2).

Фіг. 4: Електронограма 4: Мієлінові та безмієлінові волокна посттравматичної регенерації сідничного нерва щура. Контроль регенерації у периферійному відростку. Збільшення 3800. Фіксація зрошенням та зануренням.

Фіг. 5: Електронограма 5: Становлення мієлінової оболонки в периферичному відростку сідничного нерва щура після травматичної регенерації 30 днів. Активні лемоцити 17.03.2016, Значний розвиток колагену. Набряку строми немає. Збільшення 3800. Фіксація зрошенням та зануренням.

Фіг. 6: Електронограма 6: Хвора на саркому шлунка К. Історія хвороби № 1976. Слизова оболонка, поверхневий епітелії поза пухлиною. Міжклітинні зв'язки не порушені, ознак набряку немає. Збільшення 18000. Фіксація зануренням.

5 Фіг. 7: Електронограма 7: Хворий Г. Історія хвороби № 2255. Аденокарцинома шлунку. Клітини пухлини. Збільшення 10000. Фіксація зануренням.

10 Позитивний ефект способу полягає в тому, що подібне поєднання процесів фіксації найвище наближає стан нервової тканини до прижиттєвого вигляду, діючи на елементи нейропілю та їх взаємини, екстраклітинні простори, на судини нервової тканини і структури гематоенцефалічного бар'єру. Наведені приклади електронограм підтверджують, що цей спосіб дозволяє визначити зміни, що найбільш рано виникають внаслідок забою тварин, наближаючи субмікроскопічні дані до стану структур непошкодженої тканини *in vivo*. Спосіб надійний в плані подальшого ЕМД нервової системи, механізмів впливу ГАМК на тканини через фіксатори. Він представляється не тільки як спосіб для фіксації нервової тканини методом перфузії, але й для фіксації тільки зануренням, наприклад, елементів периферійної нервової системи або шматочків соматичних органів. У всіх випадках використання даних розчинів ми спостерігали досить хорошу ультраструктуру нервових елементів тканин ЦНС і ПНС за відсутності артефактів фіксації. Спроба застосування подібного прийому до фіксації тканин інших органів для ЕМД за допомогою даного засобу підкріпила позитивні результати (тканини шлунка).

## 20 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб фіксації тканин для електронно-мікроскопічного дослідження з додаванням гамма-аміномасляної кислоти, що включає стандартний процес перфузії органів, зрошення поверхні вибраної зони; занурення тканин у фіксуючий розчин та відмивання шматочків після першої  
25 фіксації в буферному розчині, який **відрізняється** тим, що для приготування фіксуючих розчинів роблять суміш 1 % глютаральдегіду та 2,5 % параформальдегіду (1 фіксатор - перфузат) і 2 % розчину тетроксиду осмію (2 фіксатор); та для відмивання шматочків після першої фіксації в буферному розчині обов'язково додають гамма-аміномасляну кислоту: фізіологічність дає - 1М фосфатний буфер рН 7,2-7,4, та ГАМК, яку додають до обох фіксаторів і  
30 буферу в пропорції 1 грам на 100 мл кожного розчину.

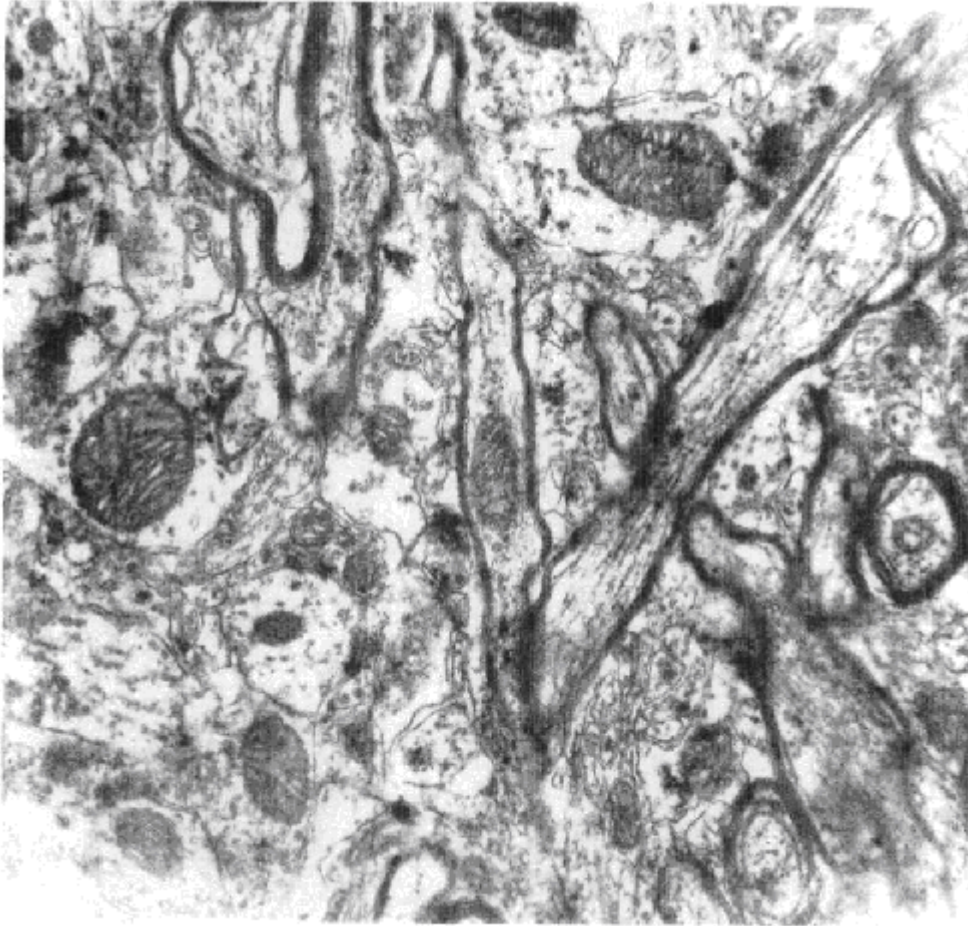


Fig. 1

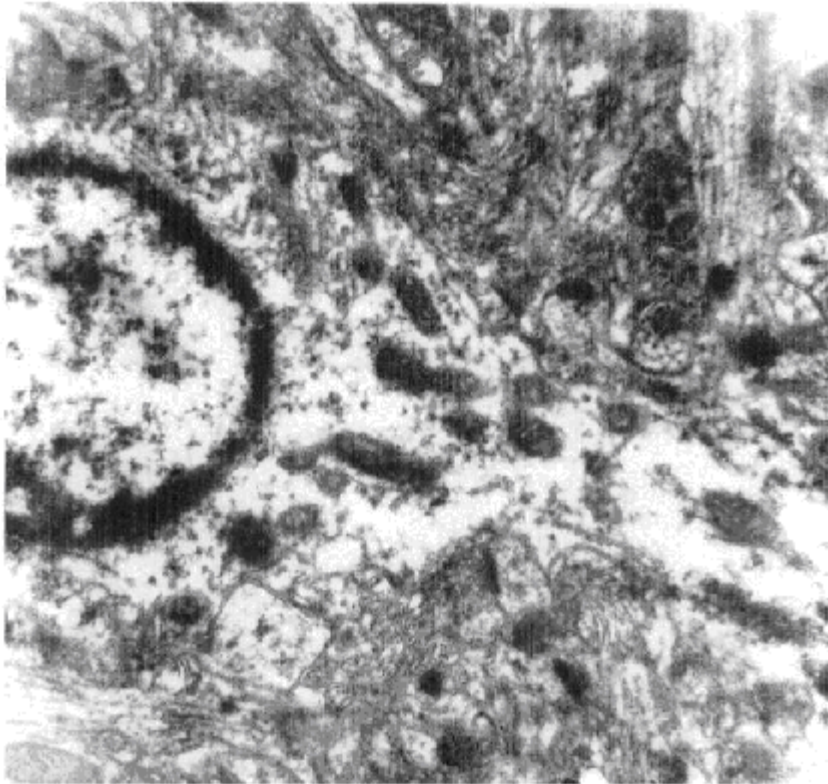


Fig. 2

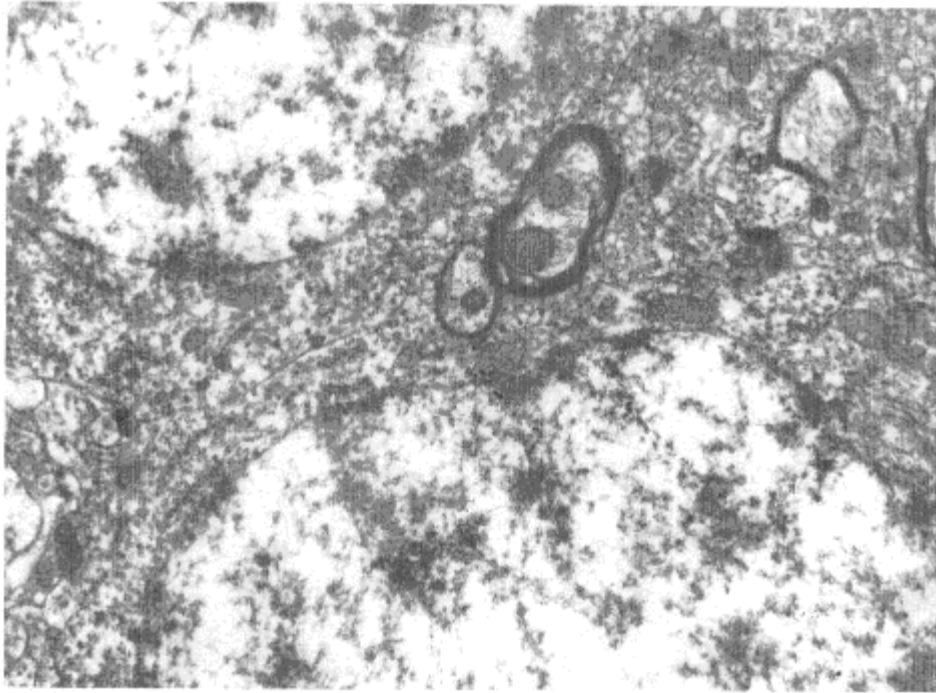


Fig. 3

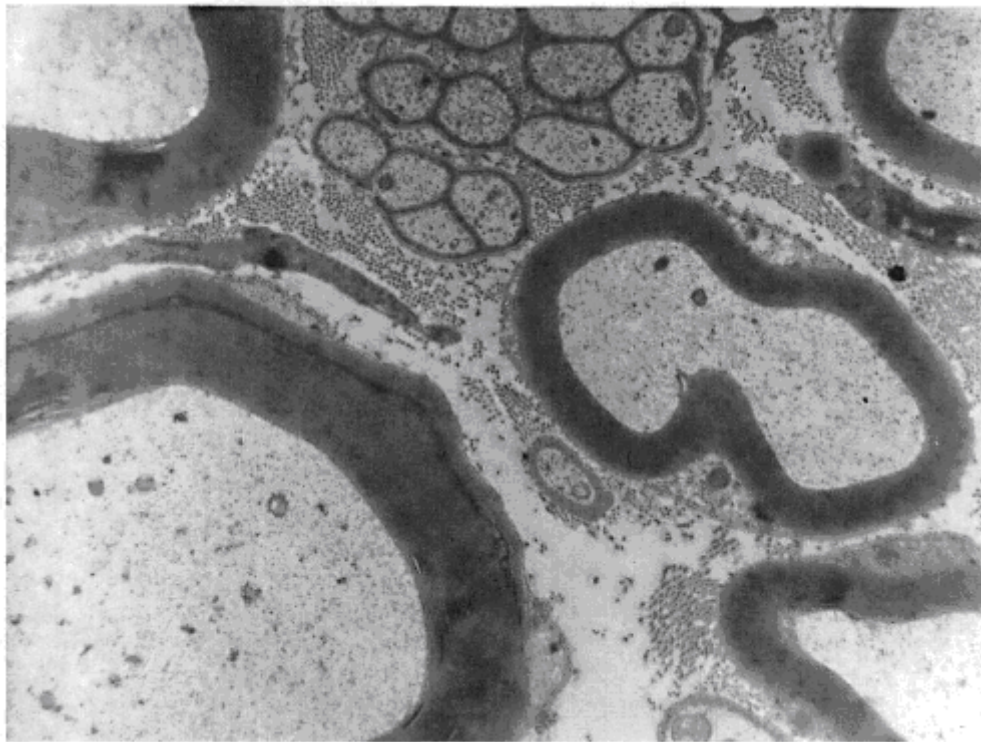


Fig. 4





Fig. 5

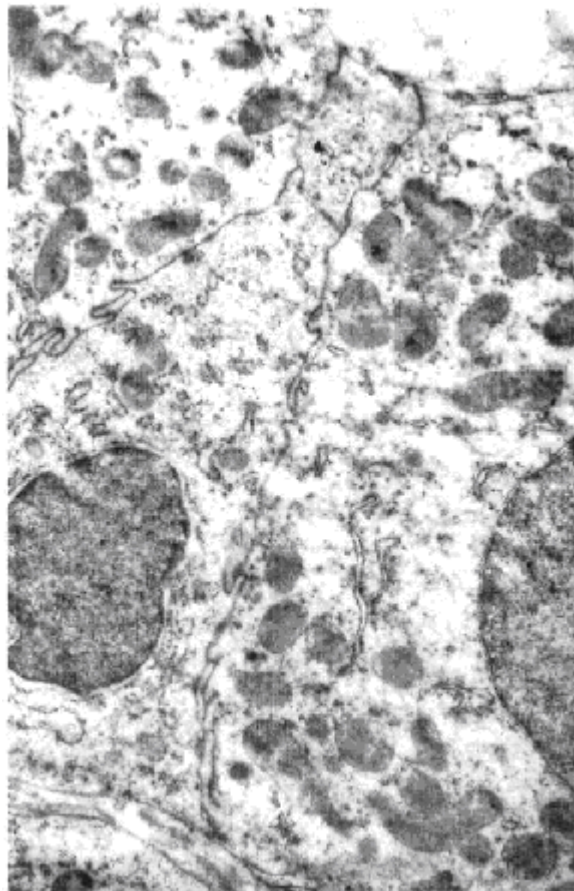
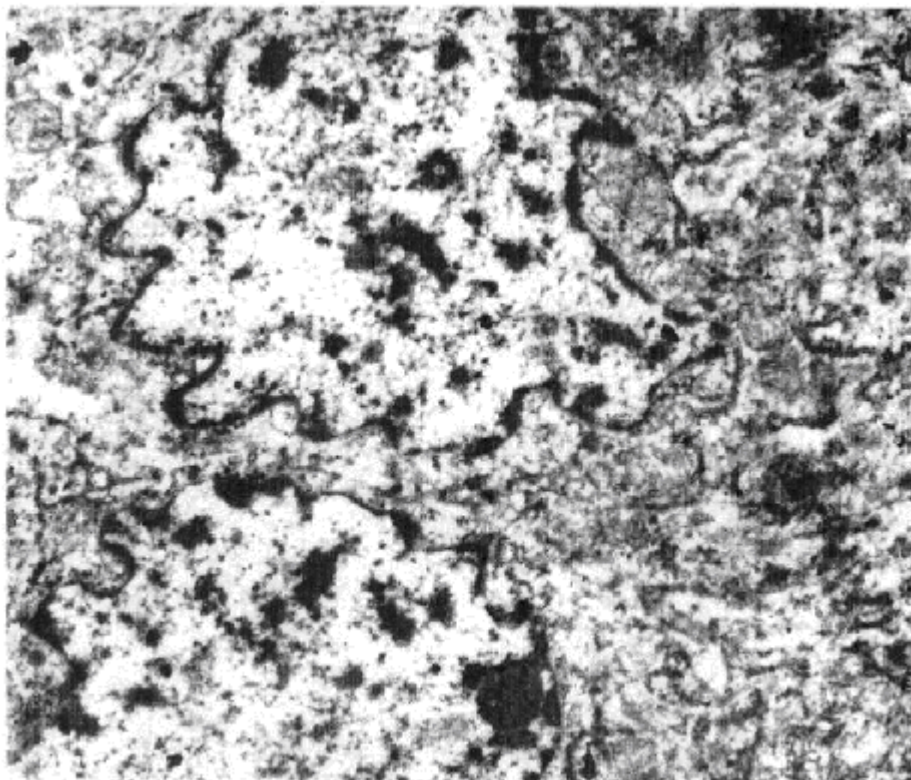


Fig. 6



**Fig. 7**

---

Комп'ютерна верстка М. Мацело

---

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

---

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