



УКРАЇНА

(19) UA (11) 157425 (13) U
(51) МПК (2024.01)
G01N 1/00
G01N 33/48 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2024 00299	(72) Винахідник(и): Горальський Леонід Петрович (UA), Сокульський Ігор Миколайович (UA), Колеснік Наталія Леонідівна (UA), Романюк Руслана Костянтинівна (UA), Павлюченко Олеся Вікторівна (UA), Рагуля Максим Русланович (UA)
(22) Дата подання заявки: 17.01.2024	
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 17.10.2024	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 16.10.2024, Бюл.№ 42	(73) Володілець (володільці): ЖИТОМИРСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА, вул. В. Бердичівська, буд. 40, м. Житомир, 10008 (UA), ПОЛІСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, бул. Старий, 7, м. Житомир, 10008 (UA)
	(74) Представник: Стукало Олександр Павлович, реєстр. №218

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ОБ'ЄМУ СОМАТИЧНИХ КЛІТИН У ССАВЦІВ

(57) Реферат:

У способі визначення об'єму соматичних клітин у ссавців відпрепаровують органи для подальшого гістологічного дослідження. Фіксують шматочки матеріалу в формаліні. Промивають в проточній воді з подальшою заливкою матеріалу в ущільнююче середовище. Виготовляють зрізи для диференціації структурних елементів. Зрізи фарбують. Споліскують у воді, зневоднюють їх у спиртах зростаючої міцності, просвітлюють у карбол-кислоті і поміщують у бальзам, покриваючи гістологічну структуру покривним скельцем. Як об'єкт досліджування використовують м'язові волокна міокарду. Фіксацію шматочків матеріалу проводять у ценкер-формолі. Фарбують для диференціації структурних елементів шляхом перенесення зрізів у розчин з вмістом йоду, витримуючи до стану пожовтіння, причому останній контролюють за насиченістю під мікроскопом, для чого зрізи споліскують у воді, переносять їх у 0,25 % розчин гіпосульфїту до повного обезбарвлення. Промивають у дистильованій воді. Переносять у 2,5 % розчин на дистильованій воді залізоамонійних галунів. Видаляють надлишкову фарбу шляхом промивання протягом 1-2-х годин у водопровідній воді. Споліскують у дистильованій воді. Переносять зрізи у розчин гематоксилину на 24-36 годин. Далі послідовно споліскують у водопровідній і дистильованій воді та диференціюють у 2,5 % розчині на дистильованій воді залізоамонійних галунів. Споліскують у дистильованій воді до стану чітко виражених чорного кольору ядер кардіоміоцитів, а самих кардіоміоцитів до сіро-синього кольору з вираженою поперечною смугастістю. Відповідні зрізи остаточно промивають у водопровідній воді. Зневоднюють гістологічні зрізи у 96° і абсолютному етиловому спирті. Просвітлюють у карбол-кислоті. Поміщують у бальзам і визначають для кожного кардіоміоциту їх об'єм та їх середнє значення.

UA 157425 U

UA 157425 U

Корисна модель належить до біології, гуманної та ветеринарної медицини, і може бути використана у морфології для дослідження морфофункціонального стану серцевих міоцитів (кардіоміоцитів) у нормі, експерименті та патології.

Відомий спосіб визначення об'єму соматичних клітин у ссавців, при якому відпрепаровують органи для подальшого гістологічного дослідження, фіксують (шматочки матеріалу) в формаліні, промивають в проточній воді, заливають в ущільнююче середовище (парафін), виготовляють зрізи та фарбують їх гематоксиліном та еозином для дослідження структурних елементів, зневоднюють у спиртах зростаючої міцності 70° та 96°, просвітлюють у карбол-кислоті, наносять бальзам і накривають гістологічну структуру покривним скельцем та в подальшому проводять мікроскопію (див. Горальський Л.П. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи дослідження у нормі та при патології / Л.П. Горальський, В.Т. Хомич, О.І. Кононський. Житомир: ЖНАЕУ, 2019. С. 70).

Однак, даний спосіб фарбування гістозрізів гематоксиліном та еозином не є точним для розрахунків визначення об'єму кардіоміоцитів, показники якого є основним морфологічним критерієм морфофункціонального стану соматичних клітин у нормі та за патології, тому що виключається можливість диференціювати серцеві клітини у структурі м'язових волокон міокарду, що ускладнює інтерпретацію результатів досліджень.

За даного методу забарвлення можливо лише визначити товщину (діаметр) кардіоміоцитів, не даючи при цьому можливості провести розрахунки щодо визначення об'єму кардіоміоцитів, показники якого є об'єктивним критерієм морфофункціонального стану (типових) серцевих міоцитів.

В основу корисної моделі поставлена задача створити спосіб визначення об'єму скоротливих кардіоміоцитів міокарду у ссавців, при якому за фарбування гістопрепаратів з'являються умови для чіткого диференціювання скоротливих кардіоміоцитів (виявлення контактів - вставних дисків), які розміщуються ланцюжком один над одним, що сприяє визначенню об'єму кардіоміоцитів, задля оцінки критеріїв морфофункціонального стану серця у нормі, експерименті та патології.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі визначення об'єму соматичних клітин у ссавців, при якому відпрепаровують органи для подальшого гістологічного дослідження, фіксують шматочки матеріалу в формаліні, промивають в проточній воді з подальшою заливкою матеріалу в ущільнююче середовище, виготовляють зрізи для диференціації структурних елементів, зрізи фарбують, споліскують у воді, зневоднюють їх у спиртах зростаючої міцності, просвітлюють у карбол-кислоті і поміщують у бальзам, покриваючи гістологічну структуру покривним скельцем, згідно з корисною моделлю, як об'єкт досліджування використовують м'язові волокна міокарду, а фіксацію шматочків матеріалу проводять у ценкер-формалі, фарбують для диференціації структурних елементів шляхом перенесення зрізів у розчин з вмістом йоду, витримуючи до стану пожовтіння, причому останній контролюють за насиченістю під мікроскопом, для чого зрізи споліскують у воді, переносять їх у 0,25 % розчин гіпосульфиту до повного обезбарвлення, промивають у дистильованій воді, переносять у 2,5 % розчин на дистильованій воді залізоамонійних галунів, видаляють надлишкову фарбу шляхом промивання протягом 1-2-х годин у водопровідній воді, споліскують у дистильованій воді, переносять зрізи у розчин гематоксилину на 24-36 годин, причому далі послідовно споліскують у водопровідній і дистильованій воді та диференціюють у 2,5 % розчині на дистильованій воді залізоамонійних галунів, споліскують у дистильованій воді до стану чітко виражених чорного кольору ядер кардіоміоцитів, а самих кардіоміоцитів до сіро-синього кольору з вираженою поперечною смугастістю, відповідні зрізи остаточно промивають у водопровідній воді, причому зневоднюють гістологічні зрізи у 96° і абсолютному етиловому спирті, просвітлюють у карбол-кислоті, поміщають у бальзам і визначають для кожного кардіоміоциту їх об'єм та середнє значення за наступним математичним виразом:

$$V = \pi \cdot (B/2)^2 \cdot A, \text{ де:}$$

V - об'єм кардіоміоциту;

π - 3,14;

A - довжина кардіоміоциту;

B - ширина кардіоміоциту.

Поставлена задача вирішується також за рахунок того, що як ущільнююче середовище може бути використаний парафін або целоїдин, а як розчин з вмістом йоду може бути використаний розчин Люголя або 50-70° етиловий спирт з настоячкою йоду.

Використання як об'єкта дослідження м'язових волокон міокарду, проведення фіксації шматочків матеріалу у ценкер-формолі, фарбування для диференціації структурних елементів шляхом перенесення зрізів у розчин з вмістом йоду, витримання до стану пожовтіння,

причому контроль останнього за насиченістю здійснюють під мікроскопом, для чого зрізи споліскують у воді, перенесення гістологічних зрізів у 0,25 % розчин гіпосульфїту до повного обезбарвлення, промивання у дистильованій воді, перенесення у 2,5 % розчин на дистильованій воді залізоамонійних галунів, видалення надлишкової фарби шляхом промивання протягом 1-2-х годин у водопровідній воді, споліскування у дистильованій воді, перенесення зрізів у розчин гематоксиліну на 24-36 годин, причому послідовне споліскування у водопровідній і дистильованій воді та диференціювання у 2,5 % розчині на дистильованій воді залізоамонійних галунів, споліскування у дистильованій воді до стану чітко виражених чорного кольору ядер кардіоміоцитів, а самих кардіоміоцитів до сіро-синього кольору з вираженою поперечною смугастістю, промивання відповідних зрізів остаточно у водопровідній воді, причому зневоднення гістологічних зрізів у 96° і абсолютному етиловому спирті, просвітлення у карбол-кислоті, поміщення у бальзам для визначення для кожного кардіоміоциту їх об'єму та середнє значення за наступним математичним виразом:

$V = \pi \cdot (B/2)^2 \cdot A$, де:

V - об'єм кардіоміоциту;

π - 3,14;

A - довжина кардіоміоциту;

B - ширина кардіоміоциту.

дозволяє визначити можливість виявлення місць контактів (вставні диски) з'єднань кардіоміоцитів між собою, забезпечує диференціювання циліндричної форми серцевих міоцитів, і як наслідок, проведення морфометрії щодо визначення їх об'єму. Це також дає можливість оцінити критерії їх морфофункціонального стану у нормі, експерименті та патології.

Застосування способу визначення об'єму соматичних клітин (кардіоміоцитів) у ссавців дозволяє забезпечити наступний технічний результат:

- забезпечується можливість виявлення місць контактів (вставні диски), з'єднань кардіоміоцитів між собою;

- забезпечується диференціювання циліндричної форми серцевих міоцитів;

- з'являється можливість проведення морфометрії щодо визначення їх об'єму;

- з'являється можливість оцінки критерію морфофункціонального стану кардіоміоцитів у нормі, експерименті та патології.

Крім того:

- з'являється можливість оцінки рівню метаболізму, виявлення прояву компенсаторних реакцій;

- з'являється можливість визначення ядерно-цитоплазматичного відношення кардіоміоцитів, які можуть бути індикатором запальних процесів, захворювань серцево-судинної системи.

На графічному зображенні показаний фрагмент гістологічної структури кардіоміоцитів м'язових волокон міокарда у поздовжньому напрямку з вираженою довжиною (A) та шириною кардіоміоциту (B).

Мікроскопічна будова міокарду серця сформована поперечнопосмугованими м'язовими волокнами, які побудовані з клітин - кардіоміоцитів, які з'єднані між собою у м'язові волокна вставними дисками. Під світловим мікроскопом, зафарбованих гістопрепаратів за методом Гейденгайна, кардіоміоцити на поздовжньому зрізі мають вигляд темних прямокутної форми смужок. Фотографування гістологічних препаратів здійснювали відеокамерою CAM V-200 (Інтер Мед, КНР, 2017), вмонтованою у тубус мікроскопа.

Спосіб визначення об'єму соматичних клітин (кардіоміоцитів) у ссавців здійснюють наступним чином.

Відпрепаровують орган серцево-судинної системи (серце). Відділять фрагмент міокарду для подальшого гістологічного дослідження. Фіксують останній у ценкер-формолі, фарбують для диференціації структурних елементів шляхом перенесення зрізів у розчин з вмістом йоду (розчин Люголя або 50-70° етиловий спирт з настоякою йоду), витримуючи до стану пожовтіння. Стан пожовтіння контролюють за насиченістю під мікроскопом, для чого зрізи споліскують у воді, переносять гістологічні зрізи у 0,25 % розчин гіпосульфїту до повного обезбарвлення, промивають у дистильованій воді, переносять у 2,5 % розчин на дистильованій воді залізоамонійних галунів, видаляють надлишкову фарбу шляхом промивання протягом 1-2-х годин у водопровідній воді, споліскують у дистильованій воді, переносять зрізи у розчин гематоксиліну на 24-36 годин. Далі послідовно споліскують у водопровідній і дистильованій воді та диференціюють у 2,5 % розчині на дистильованій воді залізоамонійних галунів, споліскують у дистильованій воді до стану чітко виражених чорного кольору ядер кардіоміоцитів, а самих кардіоміоцитів до сіро-синього кольору з вираженою поперечною смугастістю. Відповідні зрізи остаточно промивають у водопровідній воді, причому зневоднюють гістологічні зрізи у 96° і

абсолютному етиловому спирті, просвітлюють у карбол-кислоті, поміщають у бальзам і визначають для кожного кардіоміоциту їх об'єм та середнє значення за наступним математичним виразом:

$V = \pi \cdot (B/2)^2 \cdot A$, де:

- 5 V - об'єм кардіоміоциту;
- π - 3,14;
- A - довжина кардіоміоциту;
- B - ширина кардіоміоциту.

Таким чином визначають об'єм для кожного кардіоміоциту та їх середнє значення.

- 10 При морфометричному дослідженні у лабораторії патоморфології використовували шматочки відпрепарованого серця клінічно здорових тварин, у подальшому виготовляли гістологічні зрізи для дослідження. У результаті визначили об'єм соматичних клітин (кардіоміоцитів) у досліджуваних тварин, а саме шлуночків міокарду та передсердь серця великої рогатої худоби (Bos Taurus L): найбільший об'єм мають кардіоміоцити лівого шлуночка
- 15 (11225,73±824,42 мкм³), менший правого (7963,60±627,09 мкм³), найменший - кардіоміоцити передсердь (5361,60±583,91 мкм³). На основі цих даних була визначена норма.

- Збільшення об'єму кардіоміоцитів міокарду лівого шлуночка (функціонує в основному як насос), порівняно з правим (функціонує, як об'ємний), пов'язано з функціональними особливостями м'язової тканини міокарду, здатної до спонтанних ритмічних скорочень,
- 20 сприяючи руху крові по судинам: кардіоміоцити лівого шлуночка виконують більше навантаження, сприяючи руху крові по судинам великого кола кровообігу, кардіоміоцити правого шлуночка - менше навантаження, сприяючи руху крові по судинам малого кола кровообігу.

- Найменші параметри об'єму кардіоміоцитів передсердь щодо шлуночків можуть бути пов'язані з морфофункціональною діяльністю роботи серця: передсердя отримують кров, яка повертається до серця від тіла тварин, а шлуночки перекачують кров від серця до тіла,
- 25 виконуючи при тому найбільше навантаження.

- На основі цих даних було визначено середній об'єм кардіоміоцитів у статевозрілої великої рогатої худоби, який може бути критерієм як показник норми у клінічно здорових тварин даного виду.

30

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 1. Спосіб визначення об'єму соматичних клітин у ссавців, при якому відпрепаровують органи для подальшого гістологічного дослідження, фіксують шматочки матеріалу в формаліні,
- 35 промивають в проточній воді з подальшою заливкою матеріалу в ущільнююче середовище, виготовляють зрізи для диференціації структурних елементів, зрізи фарбують, споліскують у воді, зневоднюють їх у спиртах зростаючої міцності, просвітлюють у карбол-кислоті і поміщають у бальзам, покриваючи гістологічну структуру покривним скельцем, який **відрізняється** тим, що як об'єкт досліджування використовують м'язові волокна міокарда, а фіксацію шматочків
- 40 матеріалу проводять у ценкер-формолі, фарбують для диференціації структурних елементів шляхом перенесення зрізів у розчин з вмістом йоду, витримуючи до стану пожовтіння, причому останній контролюють за насиченістю під мікроскопом, для чого зрізи споліскують у воді, переносять їх у 0,25 % розчин гіпосульфиту до повного обезбарвлення, промивають у дистильованій воді, переносять у 2,5 % розчин на дистильованій воді залізоамонійних галунів,
- 45 видаляють надлишкову фарбу шляхом промивання протягом 1-2-х годин у водопровідній воді, споліскують у дистильованій воді, переносять зрізи у розчин гематоксиліну на 24-36 годин, причому далі послідовно споліскують у водопровідній і дистильованій воді та диференціюють у 2,5 % розчині на дистильованій воді залізоамонійних галунів, споліскують у дистильованій воді до стану чітко виражених чорного кольору ядер кардіоміоцитів, а самих кардіоміоцитів до сіро-синього кольору з вираженою поперечною смугастістю, відповідні зрізи остаточно промивають у водопровідній воді, причому зневоднюють гістологічні зрізи у 96° і абсолютному етиловому
- 50 спирті, просвітлюють у карбол-кислоті, поміщають у бальзам і визначають для кожного кардіоміоциту їх об'єм та середнє значення за наступним математичним виразом:

$V = \pi \cdot (B/2)^2 \cdot A$,

55 де:

- V - об'єм кардіоміоциту;
- π - 3,14;
- A - довжина кардіоміоциту;
- B - ширина кардіоміоциту.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що як ущільнююче середовище використовують парафін або целоїдин.
3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що як розчин з вмістом йоду використовують розчин Люголя або 50°-70° етиловий спирт з настоякою йоду.

