

Корисна модель належить до медицини, зокрема до патологічної анатомії, судинної хірургії та цитоморфології, і може застосовуватися в патологоанатомічних бюро, клініках з патологоанатомічними відділеннями, що мають гістологічні та імуногістохімічні лабораторії, у навчально-наукових центрах морфологічного аналізу з додатковим оснащенням для електронно-мікроскопічних досліджень, з метою виявлення новоутворених мікросудин в інтимі сонних артерій, уражених атеросклерозом, за умови точного та стандартизованого дослідження післяопераційного матеріалу.

Під час потовщення інтими сонної артерії, як одного з етапів розвитку атеросклерозу, відбувається обмеження дифузії кисню, що індукує компенсаторне поширення ендотеліоцитів з vasa vasorum адвентиційної оболонки судини [Zhang L, Deng C, Wang S, Shi B, Xu G. Neovascularization in Atherosclerotic Plaques: Clinical Implications, Detection, and Prevention Strategies. *Rev Cardiovasc Med*. 2025;26(7). [Електронний ресурс] - Режим доступу до ресурсу: <http://dx.doi.org/10.31083/RCM36468>]. Процес неоваскуляризації при атеросклерозі є патологічним станом, оскільки новоутворені судини відзначаються неповноцінністю та незрілістю, що, у свою чергу, зумовлює підвищену проникність, інфільтрацією макрофагами і призводить до гіпоксії, запалення, некрозу, подальшого потовщення стінки судини. Часто відбувається розрив тонкостінних новоутворених судин в атеросклеротичній бляшці, що підтримує запальний процес і, як наслідок, сприяє розвитку її нестабільності [Moreno PR, Purushothaman M, Purushothaman K. Plaque neovascularization: defense mechanisms, betrayal, or a war in progress. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012;1254(1):7-17. [Електронний ресурс] - Режим доступу до ресурсу: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06497.x>] Таким чином, вивчення неангіогенезу атеросклеротичної бляшки сонної артерії за допомогою морфологічних методик має ключове значення для розуміння механізмів розвитку її нестабільності та у подальшому сприятиме встановленню кореляції між радіологічною та гістологічною картиною, що стане підґрунтям для розробки ультразвукових in vivo маркерів раннього визначення ризику інсульту.

Відомим є порядок патогістологічного дослідження операційного матеріалу, а саме: після надходження біологічного матеріалу для патогістологічної діагностики здійснюють його прийом і реєстрацію, далі проводять макроскопічне дослідження, опис, відбір необхідних для діагностики фрагментів тканини, їх фіксацію в 10 % нейтральному забуференому формаліні (не більше 48 годин), гістологічну обробку та виготовлення парафінових блоків. Надалі з блоків готують патогістологічні препарати зі зрізами товщиною 4-5 мкм, які забарвлюють гематоксиліном-еозином, після чого здійснюють мікроскопічне дослідження з формулюванням патогістологічного діагнозу. У разі додаткового проведення імуногістохімічного дослідження в описі вказують назви застосованих антитіл та їх клонів, а також результати реакцій з ними [Наказ МОЗ України від 21.04.2025р. №693 "Деякі питання проведення прижиттєвої патологоанатомічної діагностики" (із змінами, внесеними згідно з наказом МОЗ № 797 від 12.05.2025р., поточна редакція від 17.06.2025 р.) [Електронний ресурс] - Режим доступу до ресурсу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0676-25#Text>]. Зазначений спосіб відтворює послідовність етапів стандартизованої прижиттєвої патогістологічної діагностики операційного матеріалу. Його недоліком є занадто узагальнений опис процедури без деталізації та акценту дослідження новоутворених судин атеросклеротичної бляшки сонної артерії після ендартеректомії. Крім того, передбачена фіксація всіх відібраних шматочків лише у формаліні унеможлиблює виконання електронно-мікроскопічного дослідження у разі потреби.

Найближчим аналогом є спосіб згідно з яким видалений фрагмент сонної артерії негайно промивають стерильним 0,9 % фізіологічним розчином, швидко заморожують у рідкому азоті та зберігають при температурі мінус 80 °С. Після цього артерії фіксують протягом 24 години в забуференому розчині формаліну, проводять декальцинацію, заливають в парафін і виготовляють на мікротомі зрізи товщиною 5 мкм, які фарбують гематоксиліном-еозином. Зрізи, отримані з інтервалом 3 мм, оцінюють; найбільш репрезентативні з них депарафінізують в ксилолі, регідратують у спиртах спадаючої концентрації, промивають дистильованою водою, обробляють 10 % перексидом водню в метанолі, блокують фосфатно-буферним розчином та інкубують зі первинними антитілами на вибір - анти-CD105 або анти-CD34. Далі, за допомогою оптичної мікроскопії при збільшенні ×200, вручну підраховують кількість новоутворених мікросудин на квадратний міліметр, забарвлених вибраним антитілом [Luque A, Slevin M, Turu MM, Juan-Babot O, Badimon L, Krupinski J. CD105 positive neovessels are prevalent in early stage carotid lesions, and correlate with the grade in more advanced carotid and coronary plaques. *Journal of Angiogenesis Research*. 2009;1(1):6. [Електронний ресурс] - Режим доступу до ресурсу: <http://dx.doi.org/10.1186/2040-2384-1-6>].

Порівняно з аналогом, який розглянуто, цей спосіб включає додатковий етап декальцинації, що забезпечує можливість тонкого нарізання тканини без ризику пошкодження мікротома, а також проведення імуногістохімічного дослідження із застосуванням одного антитіла на вибір для виявлення експресії ангіогенних ендотеліальних клітин. Проте основними недоліками зазначеного прототипу є відсутність використання додаткових морфологічних методів, необхідних для деталізації стану ендотелію судин, що зумовлює потребу у додатковому зборі тканини для проведення електронно-

мікроскопічного дослідження. Саме воно дає змогу візуалізувати ультраструктуру клітин і міжклітинного матриксу та здійснити кореляцію з результатами імуногістохімічних реакцій. Крім того, відсутнє застосування гістохімічних методів для визначення наявності та давності внутрішньобляшкових крововиливів.

Для усунення вказаного недоліку нами пропонується спосіб дослідження неоваскуляризації атеросклеротичної бляшки сонної артерії після ендартеректомії, в якому забезпечують у патогістологічній лабораторії заготовку двох фрагментів післяопераційного матеріалу для проведення гістологічної, гістохімічної, імуногістохімічної діагностики та електронно-мікроскопічного аналізу із подальшими етапами виготовлення блоків і зрізів, оптичною мікроскопією структурних елементів неоваскуляризації, імуногістохімічним типуванням ендотелію судин, гістохімічним визначенням давності внутрішньобляшкового крововиливу та електронно-мікроскопічним дослідженням клітинних структур новоутворених судин.

В основу корисної моделі поставлено задачу вдосконалити спосіб дослідження неоваскуляризації атеросклеротичної бляшки сонної артерії після ендартеректомії шляхом заготовки доставлених в патогістологічну лабораторію фрагментів тканини, виготовлення препаратів, проведення оптичної мікроскопії новоутворених судин атеросклеротичної бляшки при рутинному забарвленні гематоксилін-еозином, гістохімічному зафарбуванні барвниками для ідентифікації крововиливу та його давності, імуногістохімічному типуванні ендотелію судин антитілами та електронно-мікроскопічному дослідженні клітинних елементів судинної стінки, що включає: відбір одного шматочка з загального біоматеріалу сонної артерії об'ємом 2 мм³ для електронно-мікроскопічного дослідження, виготовлення епоксидних блоків, напівтонких та ультратонких зрізів, проведення вивчення клітинних компонентів ендотелію новоутворених судин атеросклеротичної бляшки з великою роздільною здатністю та відбір другого шматочка з післяопераційного матеріалу довільного розміру для гістологічного дослідження, виготовлення парафінових блоків та зрізів, проведення оптичної мікроскопії, подальшого гістохімічного забарвлення та імуногістохімічного типування маркерами, тропними до ендотелію судин. Таким чином, застосувавши додатковий етап розділення післяопераційного матеріалу стінки сонної артерії, ураженої атеросклерозом із подальшим виконанням трьох методів дослідження, забезпечується одночасне морфологічне дослідження структурних та ультраструктурних особливостей новоутворених судин, а отже, і istotне розширення технологічних можливостей способу.

Поставлена задача вирішується за рахунок заготівлі та попереднього розділення постопераційного біоматеріалу після ендартеректомії, що забезпечує можливість застосування гістологічної техніки з оптичною мікроскопією новоутворених судин атеросклеротичної бляшки, подальшого проведення гістохімічного фарбування барвниками для визначення давності крововиливу, імуногістохімічного дослідження з маркуванням ендотелію судин та електронно-мікроскопічного аналізу ультраструктурних клітинних елементів неоваскуляризації. Згідно з пропонованою корисною моделлю, окрім рутинної оптичної мікроскопії з забарвленням гематоксилін-еозином, застосовують розширену вирізку із забраного післяопераційного біоматеріалу стінки ураженої атеросклерозом сонної артерії, що включає додатковий етап, а саме - розподіл біологічного матеріалу на двофрагментний забір: перший шматочок об'ємом близько 2 мм³ - для електронно-мікроскопічного дослідження, та другий шматочок довільного розміру - для гістологічних методик, з наступним їх сортуванням, фіксуванням у відповідних розчинах і маркуванням, декальцинуванням зразка, зануреного у розчин формаліну та подальшим виготовленням блоків і зрізів, а також проведенням додаткових методів забарвлення - гістохімічного та імуногістохімічного. Такий спосіб дасть можливість за допомогою двокомпонентної вирізки біоматеріалу сонної артерії отримати декілька екземплярів для проведення різних морфологічних досліджень, які є інформативно взаємодоповнюючими. Таким чином, вирізавши з отриманого післяопераційного матеріалу два шматочки та надалі зафіксувавши їх у розчинах формаліну та глутарового альдегіду відповідно, буде отримано можливість провести рутинне гістологічне гістохімічне, імуногістохімічне вивчення, а також електронно-мікроскопічний аналіз неоваскуляризації.

Спосіб виконують наступним чином.

Після проведення ендартеректомії з постопераційного матеріалу стінки сонної артерії, ураженої атеросклерозом, проводять вирізку зразків: спершу висікають шматочок екземпляру об'ємом близько 2 мм³ для електронно-мікроскопічного дослідження та занурюють його у свіжоприготовлений 4 % розчин глутарового альдегіду, а надалі висікають шматочок другого екземпляру довільного розміру для гістологічного дослідження та занурюють його у нейтральний забуферений 10 % формалін для його фіксації на 3 дні. Обидва флакони маркують та щільно закривають. Потім у лабораторії патологоанатомічного відділення (бюро) флакон для електронної мікроскопії поміщують у холодильник на зберігання при температурі плюс 4 °С до початку проведення наступних етапів. Обов'язковим наступним етапом для фіксованого шматочка у розчині формаліну є проведення декальцинації тканини, застосувавши реагент-декальцинатор. Надалі проводять виготовлення парафінових блоків, з яких отримують паралельні зрізи тканин, товщиною 4 мкм та поміщають у гарячу водяну баню при 42 °С. Зрізи розташовують на предметне скло з водяної бані. Скельця

розкладають на теплій плиті при температурі 37 °С для подальшої фіксації зрізів протягом 24 годин. Скельця нумерують з допомогою маркеру. Надалі зрізи на предметних скельцях фарбують за допомогою рутинної техніки фарбування гематоксиліном і еозином, яка дозволяє спостерігати загальну морфологію новоутворених судин атеросклеротичної бляшки під світловим мікроскопом. Обрані зрізи, де оптично визначено крововилив, зафарбовують гістохімічними методиками, а саме: берлінською лазур'ю з діамінобензидином та забарвленням за Ван Гізоном - для визначення давності крововиливу. Надалі проводять імуногістохімічне дослідження, використовуючи ті самі парафінові блоки, з яких виготовляють зрізи 4 мкм, які депарафінізують на водяній бані з ксиленом, регідрують в спиртах спадаючої концентрації, та проводять етапи підготовки зрізів згідно стандартизованої методики імуногістохімічного дослідження. Надалі інкубують зрізи протягом години з антитілами для експресії білків: CD31, CD68, CD105, NFκ beta, за допомогою яких типують ендотеліальні клітини, що вистилають стінку новоутворених судин атеросклеротичної бляшки. Охолоджений матеріал, занурений у 4 % розчин глутарового альдегіду фіксують, промивають, контрастують та заливають сумішшю епоксидних смол з наступним виготовленням напівтонких та ультратонких зрізів за стандартизованою методикою електронно-мікроскопічного дослідження. Документування усіх етапів проводять згідно з Методичними рекомендаціями "Організація роботи закладів та підрозділів патологоанатомічної служби України", затвердженими Міністерством охорони здоров'я України, Українським центром наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи від 11.04.2017р. та Наказом МОЗ України від 21.04.2025р. №693 "Деякі питання проведення прижиттєвої патологоанатомічної діагностики" [із змінами, внесеними згідно з наказом МОЗ № 797 від 12.05.2025р., поточна редакція від 17.06.2025 р].

Надалі отримані результати гістологічної, гістохімічної, імуногістохімічної та електронно-мікроскопічної діагностики вносять в таблицю для ретроспективного аналізу даних.

Таким чином, двокомпонентний забір біологічних зразків з післяопераційного матеріалу стінки сонної артерії, ураженої атеросклерозом, забезпечує можливість застосування рутинної гістологічної, гістохімічної, імуногістохімічної методик та електронно-мікроскопічного аналізу. Це дозволяє комплексно поєднати різні види морфологічної діагностики для оцінки та співставлення гістологічних та ультраструктурних змін з подальшим визначенням впливу стану неоваскуляризації на стабільність атеросклеротичної бляшки.