

Корисна модель належить до медицини, зокрема до патологічної анатомії, судинної хірургії, кардіології та неврології, і може застосовуватися в патологоанатомічних бюро, у 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 морфологічної верифікації нестабільності бляшок сонних артерій, уражених атеросклерозом, за умови правильного та точного дослідження післяопераційного матеріалу.

Дослідження ролі мікрокальцифікації у дестабілізації атеросклеротичних бляшок сонних артерій має високу клінічну та наукову значимість, оскільки стосується ключових механізмів розвитку ішемічного інсульту - превалюючої причини інвалідності, а часто і смерті в усіх країнах світу [Saba L, Nardi V, Cau R, Gupta A, Kamel H, Suri JS, et al. Carotid Artery Plaque Calcifications: Lessons From Histopathology to Diagnostic Imaging. *Stroke*. 2022; 53(1):290-7. [Електронний ресурс] Режим доступу до ресурсу: <http://dx.doi.org/10.1161/STROKEAHA.121.035692>]. Мікрокальцинати в атеросклеротичній бляшці є маркером активного запалення та ключовим механічним детермінантом її нестабільності, оскільки спричиняють локальну стрес-концентрацію напруження в фіброзній капсулі, що таким чином, підвищує ризик її розриву [Corti A, Khalil D, De Paolis A, Cardoso L. Size and proximity of micro-scale hard-inclusions increase the risk of rupture in fibroatheroma-like laboratory models. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2023; 141:105749. [Електронний ресурс] - Режим доступу до ресурсу: [http://dx.doi.org/10.1016/i.imbmb.2023.105749](http://dx.doi.org/10.1016/j.imbmb.2023.105749)]. Мікрокальцинати часто не візуалізуються неозброєним оком, тому детальне їх вивчення та аналіз потребує мікроскопічного дослідження з використанням різних технік забарвлення. Однак не завжди рутинна гістологічна методика дозволяє чітко ідентифікувати мікрокальцинати, тому часто для виявлення дрібнокристалічних структур є потреба у додатковому фарбуванні. Крім цього, в наукових дослідженнях наголошується на потребі доповнюючого методу - електронної мікроскопії, за допомогою якої, при візуалізації ультраструктури клітини, можливо верифікувати наявність нано- та мікрочастин кальцію у міжклітинному просторі, їх зв'язок з гладком'язовими клітинами та макрофагами чи вмістом везикул [Blaser MC, Buffolo F, Halu A, Turner ME, Schlotter F, Higashi H, et al. Multiomics of Tissue Extracellular Vesicles Identifies Unique Modulators of Atherosclerosis and Calcific Aortic Valve Stenosis. *Circulation*. 2023; 148(8):661-78. [Електронний ресурс] - Режим доступу до ресурсу: <http://dx.doi.org/10.1161/circulationaha.122.063402>]. Метою пропонованого способу є виявлення мікрокальцифікатів в структурі атеросклеротичної бляшки, як морфологічних маркерів її нестабільності шляхом виконання комплексних гістологічних та електронно-мікроскопічних досліджень. Отже, завданням є розробка способу, що дозволяє ідентифікувати мікрокальцинати атеросклеротичної бляшки після ендартеректомії, а тому має значення для подальшого ретроспективного аналізу та використання його у математичних та статистичних прогностичних моделях предикції ішемічних подій головного мозку.

Ендартеректомія сонних артерій, уражених атеросклерозом в Україні проводиться на основі нових міжнародних клінічних протоколів, використання яких дозволено Наказом МОЗ України № 751 від 28.09.2012 р., зі змінами від 06.03.2025 р., № 175 "Про створення та впровадження медико-технологічних документів зі стандартизації медичної допомоги в системі Міністерства охорони здоров'я України" ([Електронний ресурс] - Режим доступу до ресурсу: <https://ips.ligazakon.net/document/re43766?an=11>). Оцінку показів до каротидної ендартеректомії проводять згідно з Настановою 00762 "Транзиторна ішемічна атака", при виявленні гемодинамічно значущого стенозу та клінічними проявами судинної патології [Настанова 00762 "Транзиторна ішемічна атака" від 28.08.2017 р., рекомендована МОЗ України [Електронний ресурс] - Режим доступу до ресурсу: <https://guidelines.moz.gov.ua/documents/3549>]. Вирізку вологого післяопераційного матеріалу сонних артерій здійснюють у гістологічній лабораторії патологоанатомічного відділення з використанням спеціалізованого інструментарію із фіксацією зразків у витяжній шафі та подальшим окремим зберіганням тканин в 10 % розчині нейтрального забуференого формаліну [Методичні рекомендації "Організація роботи закладів та підрозділів патологоанатомічної служби України", затверджені Міністерством охорони здоров'я України, Українським центром наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи від 11.04.2017р. [Електронний ресурс] Режим доступу до ресурсу: <http://ir.librarynmu.eom/bitstream/123456789/204/1/%P0%9C%P0%A030%2017.pd> 1]. Мікрокальцинати атеросклеротичних бляшок є структурно дрібними, гетерогенно розподіленими та патогенетично значущими елементами, які не завжди виявляються при стандартній світлооптичній мікроскопії. Жодний окремо виконаний метод не дозволяє одночасно і максимально точно визначити локалізацію, хімічну природу, клітинне походження, ультраструктуру мікрокальцифікатів. Саме тому необхідний багаторівневий морфологічний підхід, що включає застосування макроскопічної оцінки, рутинного гістологічного дослідження, гістохімічних та імуногістохімічних методик, а також електронну мікроскопію.

Відомим є порядок гістологічного дослідження післяопераційного матеріалу, а саме: у патологоанатомічному відділенні здійснюють приймають та реєструють післяопераційний біоматеріал фрагменту сонної артерії з наступним виконанням макроскопічного опису, взяттям вирізкою тканини та

фіксацією її у 10 % нейтральному забуференому формаліні (до 2-х діб), проведенням етапів, що включають виготовлення парафінових блоків та надалі - препаратів з товщиною зрізів 4-5 мкм, рутинним забарвленням їх гематоксиліном-еозином, мікроскопічним вивченням з встановленням патогістологічного діагнозу. За потреби імуногістохімічного дослідження в описі зазначають назви використаних антитіл та їх клонів і 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 12.05.2025 р., 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 стандартний порядок етапів прижиттєвої патогістологічної діагностики більшості постопераційних тканин. Недоліками цього способу є відсутність селективного відбору ділянок із потенційною локалізацією мікрокальцинатів, зокрема у зоні фіброзної покритишки та на межі з ліпідно-некротичним ядром, а також відсутність гістохімічних методик, спрямованих на вибірккову верифікацію кальцієвих відкладень та відсутність електронно-мікроскопічного етапу дослідження, що виключає можливість виявлення нанокристалічних форм кальцію.

Найбільш близьким аналогом до запропонованого способу є спосіб, згідно з яким після операції видалені фрагменти сонної артерії з атероматозним вмістом негайно фіксують у 10 % розчині нейтрального забуференого формаліну, декальцинують, обробляють за стандартною методикою та готують послідовні зрізи для імуногістохімічного дослідження. Морфологічні особливості каротидних бляшок досліджують на зрізах товщиною 4-5 мкм, забарвлених гематоксиліном та еозином, а експресію остеопонтину за допомогою імуногістохімічного методу [Balmos IA, Horvath E., Brinzaniuc K., Muresan AV, Olah P., Molnar GB, et al. Inflammation, Microcalcification, and Increased Expression of Osteopontin Are Histological Hallmarks of Plaque Vulnerability in Patients with Advanced Carotid Artery Stenosis. *Biomedicine*. 2023; 11(3):881. [Електронний ресурс] - Режим доступу до ресурсу: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicine11030881>].

Порівняно з аналогом, який розглянуто, запропонований спосіб включає додатковий етап декальцинації, завдяки якому забезпечується уникнення пошкодження ножа мікротома та артефактів на зрізах без спричинення розривів тканини фіброзної покритишки бляшки внаслідок технологічного процесу. Таким чином покращується профарбовування зрізів гематоксиліном-еозином. Також найбільш близький аналог включає додаткову методику імуногістохімічного дослідження для визначення експресії остеопонтину підвищений рівень якого вказує на відкладення мікрокальцинатів у бляшках, роблячи їх вразливими. Проте основними недоліками зазначеного найбільш близького аналога є відсутність опису дій для додаткового забору тканин з метою проведення гістохімічного дослідження, що дозволяє провести кількісну оцінку площі мікрокальцифікації та хімічну верифікацію солей кальцію, а також відсутності додаткового забору тканин для електронно-мікроскопічного дослідження, яке дозволяє візуалізувати нано- та мікрокристали кальцію, недоступні для світлової мікроскопії.

Для усунення вказаного недоліку запропоновано спосіб дослідження мікрокальцинатів атеросклеротичної бляшки сонної артерії після ендартеректомії, в якому забезпечується вирізка фрагментів з біоматеріалу: першого фрагмента об'ємом близько 2 мм³ для електронно-мікроскопічного дослідження, другого фрагмента довільного розміру для гістологічного та імуногістохімічного дослідження з обов'язковим етапом декальцинації зразка, та третього фрагмента для проведення гістохімічного дослідження без етапу декальцинації, з наступним їх сортуванням, маркуванням, фіксацією та подальшим виготовленням блоків - для проведення максимальної кількості морфологічних методик вивчення післяопераційного біоматеріалу і з подальшою можливістю їх аналізу.

В основу корисної моделі поставлено задачу вдосконалити спосіб дослідження мікрокальцинатів атеросклеротичної бляшки сонної артерії після ендартеректомії шляхом розділення, сортування у фіксуючих розчинах, маркування зразків та подальшого виготовлення блоків, що включає: забір одного фрагмента об'ємом близько 2 мм³ - для електронно-мікроскопічного дослідження, другого фрагмента довільного розміру для рутинного гістологічного та імуногістологічного дослідження і третього фрагмента довільного розміру - для гістохімічного дослідження з наступною їх фіксацією в окремих контейнерах: шматочка об'ємом 2 мм³ - у розчині глутарового альдегіду, а інших шматочків довільного розміру - у розчині формаліну (з проведенням декальцинації зразка для гістологічного та імуногістологічного дослідження і виключенням етапу декальцинації зразка для гістохімічного дослідження після фіксації у формаліні), і подальшим маркуванням та наступними етапами - виготовленням блоків для гістологічного та електронно-мікроскопічного дослідження. Таким чином, застосування зазначеної сукупності відмінних ознак забезпечує можливість одночасного та взаємодоповнюючого рутинного гістологічного, імуногістохімічного, гістохімічного та ультраструктурного дослідження мікрокальцинатів атеросклеротичної бляшки сонної артерії з одного післяопераційного матеріалу, збереження кальцієвмісних структур у природному їх стані для їх гістохімічної верифікації, підвищення інформативності аналізу просторового розподілу мікрокальцинатів і їх взаємозв'язку з клітинними компонентами бляшки, а отже, і істотне розширення

технологічних можливостей способу.

Поставлена задача вирішується, тим що спосіб дослідження мікрокальцинатів атеросклеротичної бляшки сонної артерії після ендартеректомії, що включає фіксацію попередньої вирізки атеросклеротичної бляшки з постопераційного біоматеріалу після ендартеректомії з висіченням першого фрагмента об'ємом близько 2 мм³ для електронно-мікроскопічного дослідження, другого фрагмента довільного розміру для рутинного гістологічного та імуногістохімічного дослідження і третього фрагмента довільного розміру - для гістохімічного дослідження з подальшим сортуванням у фіксуючий розчин глютарового альдегіду - першого зразка та у розчин формаліну - другого і третього зразків, маркуванням, декальцинацією другого зразка (призначеного для рутинного гістологічного та імуногістохімічного дослідження) та виключенням етапу декальцинації для третього зразка (призначеного для гістохімічного дослідження), та проведенням стандартизованих методів виготовлення блоків і зрізів для електронно-мікроскопічного дослідження і блоків та зрізів для гістологічних методик, з урахуванням того, що декальциновані зразки нарізають за допомогою ротаційного мікротому, а недекальциновані - за допомогою санного мікротому. Згідно з корисною моделлю, новим є те, що забезпечують розширену вирізку атеросклеротичної бляшки сонної артерії із забраного післяопераційного біоматеріалу, яка включає додаткові етапи, а саме - розподіл біологічного матеріалу на трифрагментний забір, при цьому перший фрагмент об'ємом близько 2 мм³ використовують для електронно-мікроскопічного дослідження, другий фрагмент довільного розміру для рутинного гістологічного та імуногістохімічного дослідження, а третій фрагмент - гістохімічного дослідження, з подальшим сортуванням, маркуванням та фіксуванням зазначених фрагментів у відповідних фіксуючих розчинах, проведенням декальцинації другого фрагмента та виключенням етапу декальцинації для третього фрагмента, після чого здійснюють виготовлення відповідних блоків і зрізів, причому декальциновані зразки нарізають за допомогою ротаційного мікротому, а недекальциновані - за допомогою санного мікротому. Такий спосіб дасть можливість забезпечити комплексну верифікацію мікрокальцинатів, візуалізувати нанокристалічні форми, зберегти нативну структуру кальцієвих відкладень, що у результаті дозволить підвищити якість морфологічного аналізу. Таким чином, застосувавши додаткові етапи трикомпонентної вирізки атеросклеротичної бляшки післяопераційного матеріалу, диференційований підхід до декальцинації та застосування різних типів мікротомів розширить діагностичний потенціал за рахунок адаптації кожного фрагмента до оптимального методу обробки без взаємного компромісу між застосовуваними методиками.

Спосіб виконують наступним чином.

Після проведення операції каротидної ендартеректомії отримують біоматеріал (фрагменти стінки сонної артерії з атеросклеротичною бляшкою) негайно піддають макроскопічному опису та селективній вирізці бляшки. Спершу з найбільш змінених ділянок бляшки (зони фіброзної покритишки та межі з ліпідно-некротичним ядром) висікають три екземпляри тканин: перший фрагмент - шматочок об'ємом приблизно 2 мм³, який негайно занурюють у свіжоприготовлений 4 % розчин глютарового альдегіду для стабілізації ультраструктурних елементів. Другий фрагмент довільного розміру фіксують у 10 % розчині нейтрального забуференого формаліну впродовж 24-48 годин для подальшого рутинного гістологічного та імуногістохімічного дослідження. Третій фрагмент довільного розміру також фіксують у 10 % нейтральному забуференому формаліні, але маркують як зразок для гістохімічного аналізу без етапу декальцинації. Всі флакони маркують та щільно закривають. Надалі проводять етапи пробопідготовки та декальцинації, які теж, в свою чергу, розподіляються на три підвиди. Перший фрагмент готують за стандартним протоколом для електронної мікроскопії: постфіксація у 2 % розчині чотириокису осмію, дегідратація та заливка в епоксидні смоли. Другий фрагмент після фіксації віддають процедурі декальцинації з використанням спеціалізованого реактиву-декальцинатора до повного розм'якшення тканин, після чого зразок проводять через спирти зростаючої концентрації та заливають в парафін. Третій фрагмент проводять через спирти зростаючої концентрації та заливають у парафін без етапу декальцинації, що забезпечує збереження нативного вмісту солей кальцію в тканині. Потім виконують етапи виготовлення зрізів. З блока першого фрагмента на ультрамікротомі виготовляють напівтонкі та ультратонкі зрізи для дослідження за допомогою електронного мікроскопа. З парафінового блока другого фрагмента (декальцинованого) на ротаційному мікротомі виготовляють зрізи товщиною 4-5 мкм. З парафінового блока третього фрагмента (недекальцинованого) на санному мікротомі виготовляють зрізи для гістохімічного дослідження. Надалі виконують етапи морфологічного аналізу. Ультратонкі зрізи першого фрагмента вивчають в електронному мікроскопі для ідентифікації нанокристалів та оцінки стану клітин навколо них. Зрізи другого фрагмента забарвлюють гематоксиліном та еозином для загальної оцінки морфології, а також окремі зрізи з цього блока зафарбовують антитілами до остеопонтину. Зрізи третього фрагмента фарбують алізариновим червоним для точної візуалізації та морфометрії депозитів кальцію. 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 11.04.2017 р. та Наказом МОЗ України від 21.04.2025 р. № 693 "Деякі

питання проведення прижиттєвої патологоанатомічної діагностики" (із змінами, внесеними згідно з наказом МОЗ № 797 від 12.05.2025 р., поточна редакція від 17.06.2025 р.

Надалі отримані дані зіставляють, що дозволяє встановити повне заключення морфологічного дослідження із характеристикою мікрокальцинатів від субклітинного до макроскопічного рівнів.

Таким чином, завдяки застосуванню запропонованого способу можливо встановити наявність активного процесу мікрокальцифікації на нано- та мікрорівнях, дозволяє морфологічно класифікувати бляшку, як вразливу, незважаючи на відсутність великих петрифікатів.