

Корисна модель належить до галузі ветеринарної медицини, а саме способу гістологічної обробки тканин (органи і тканини, в яких можливі патологічні зміни) біологічного об'єкта. Гістологічна обробка тканин відіграє вирішальну роль у отриманні якісного гістологічного препарату, що сприяє ефективній інтерпретації результатів діагностичних патоморфологічних досліджень. Проте, це довготривалий метод[4,5,6].

Для скорочення терміну отримання якісних гістологічних препаратів поставлено задачу зменшити тривалість фіксації, підібрати ефективні реагенти для фіксації, дегідратації, знежирення та просочування тканин, а також розробити єдину цілісну процедуру пробопідготовки з урахуванням характеристик сучасного гістологічного обладнання.

Перспективним напрямком скорочення терміну гістологічної обробки тканин є зменшення тривалості фіксації, заміна спиртів різної концентрації на ізопропіловий спирт однієї концентрації, використання гістологічного парапласта (наприклад, Surgipath Paraplast фірми Leica Biosystems або аналогів) та тверднучих середовищ на водній основі з урахуванням технічних характеристик сучасної гістологічної техніки.[4,7]

Найближчим аналогом корисної моделі є спосіб гістологічної обробки тканин з використанням автомату карусельного типу для гістологічної обробки тканин STP-120 (Microm International GmbH, Thermo Fisher Scientific). Цей аналог не передбачає єдиної цілісної процедури пробопідготовки, а складається з окремих етапів, які виконуються переважно вручну[4,5]. Зокрема, фіксацію проводили протягом 7 діб при товщині зразків 2-5 мм, після чого матеріал промивали у воді протягом 30 хв, підсушували на фільтрувальному папері та зневоднювали шляхом послідовного проведення через спирти концентрацією 70 %, 80 %, 90 % та 96 %. Далі зразки просочували розчинником парафіну (ксилол або хлороформ), переносили у насичений розчин парафіну в ксилолі (хлороформі), витримували у розплавленому парафіні при температурі 54-55 °C (на 2-3 °C вище температури його плавлення), заливали у дерев'яні або паперові форми, швидко охолоджували і наклеювали на дерев'яні кубики[4-6].

Парафінові блоки зберігали в сухому місці. Зрізи виготовляли на санному мікротомі. З мікротома їх переносили у теплу воду при температурі 35-40 °C, розправляли, а потім наклеювали на попередньо підготовлені предметні скельця. Наклеєні зрізи висушували на повітрі протягом близько 24 год (або 12 год у термостаті). Просушені зрізи депарафінували безпосередньо перед фарбуванням і фарбували без додаткового просушування.

Зазначений метод є трудомістким, оскільки всі операції виконуються вручну, а загальна тривалість гістологічної проводки тканин становить 7-14 днів. Основними недоліками аналога є обмежена продуктивність (автомат розрахований лише на 120 касет), високі витрати реагентів (потрібні великі об'єми спиртів і ксилолу), швидке насичення реагентів жирами та білками при тривалому використанні, тривалість програм, робота з токсичними парами та висока вартість оригінальних комплектуючих.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб гістологічної експрес-обробки тканин дослідного біологічного об'єкта з єдиною процедурою пробопідготовки в автоматичному режимі та механізовані операції обробки тканин з використанням автомату карусельного типу для гістологічної обробки тканин, станції для заливки в парафін, ротаційного мікротома із системою переносу зрізів, автомату для фарбування та апарату для заключення гістологічних зрізів.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб гістологічної експрес-обробки тканин дослідного біологічного об'єкта, що включає фіксацію, промивання, дегідратацію, знежирення, просочування розчинником парафіну, заливку в парафіні, виготовлення зрізів, депарафінізацію та фарбування, згідно з корисною моделлю фіксацію проводять протягом 24-48 год, а дегідратацію і знежирення здійснюють ізопропіловим спиртом однієї концентрації 99,9 % в автоматичному режимі.

Порівняльний аналіз заявленого способу з відомим способом гістологічної обробки тканин, де всі операції виконувалися вручну окремими етапами, показує, що запропонований спосіб відрізняється від існуючого використанням сучасної гістологічної техніки та безпечних процедур. Це дає можливість якісно провести гістологічну обробку тканин у скорочений термін (до 48 год), спростити процес дегідратації, мінімізувати затрати праці та забезпечити новизну корисної моделі.

Приклад виконання способу. Модифікацією запропонованого способу стало використання ізопропілового спирту як основного реагенту для гістологічної проводки. Завдяки меншій токсичності ізопропіловий спирт добре змішується з розплавленим парафіном і надає тканинам необхідної пластичності. Ізопропанол ефективно застосовується для обробки різних типів біологічних зразків, зокрема органів і тканин тварин, операційного матеріалу, пухлин, біоптатів, харчових продуктів та нервової тканини. Для дегідратації і знежирення використовували ізопропіловий спирт однієї концентрації 99,9 %, що дозволяє суттєво заощадити час і ресурси на приготування розчинів, спростити процедуру проводки та знизити її собівартість.

Через 24-48 год після фіксації дослідного біологічного матеріалу гістологічну обробку тканин проводили промивання, дегідратацію, знежирення та просочування розчинником парафіну в автоматичному режимі на карусельному гістологічному процесорі.

Для цього касети з об'єктами дослідження поміщали у спеціальний кошик, який надійно фіксували до відповідних тримачів апарату. Сумарний час виконання встановленої технологічної програми в автоматі складав 16 год 30 хв.

Формування парафінових блоків здійснювали за допомогою станції заливки в парафін, використовуючи спеціальні форми та касети (табл. 1). Форми переносили на заливочну площадку, пінцетом розміщували шматочки тканини у відповідному положенні, накривали касетою і заливали розплавленим парафіном. Після цього форми переносили на охолоджуючу площадку до повного застигання парафіну. Сформований парафіновий блок виймали та зачищали.

Зрізи товщиною 5-7 мкм виготовляли на ротаційному мікротомі із системою переносу зрізів та водяною банею. Отримані зрізи розташовували на поверхні води за температури 45 °С, розправляли, а потім переносили на підготовлені предметні скельця. Зрізи висушували протягом 12-18 год на повітрі або закріплювали на склі шляхом прогрівання в термостаті при температурі 37 °С протягом 12-18 год. Після висушування предметні скельця маркували, вказуючи номер робочого протоколу, дату надходження зразків та індекс шматочка.

Таблиця 1

Режим формування парафінових блоків

Реагент	Концентрація, %	Експозиція, хв	Температура, °С
Формалін	10	60	20-25
Вода дистильована	-	60	20-25
Ізопропанол 1	99,9	90	20-25
Ізопропанол 2	99,9	90	20-25
Ізопропанол 3	99,9	90	20-25
Ізопропанол 4	99,9	60	20-25
Ізопропанол 5	99,9	60	20-25
Ізопропанол 6	99,9	60	20-25
Ксилол/Ізопропанол	3/1	90	20-25
Ксилол/Ізопропанол	-	90	20-25
Парафін гістологічний	-	120	62
Парафін гістологічний	-	120	62

Примітка. Використання товстих (10 мкм і більше) зрізів приховує у собі небезпеку невірної інтерпретації результатів.

Після завершення етапів пробопідготовки та виготовлення зрізів проводили депарафінізацію - видалення парафіну зі зрізів, наклеєних на предметні скельця. Депарафінізацію здійснювали розчинником парафіну (ксилолом) згідно з табл. 2. Для видалення залишків розчинника зрізи переносили у спирти, після чого вони були готові до фарбування. Процедуру фарбування виконували в автоматі HMS 70, встановленому у витяжній шафі.

Пофарбовані зрізи занурювали у бальзам або інше заключне середовище, накривали накривним склом і залишали для висушування протягом 12-18 год.

Морфологічний аналіз отриманих гістопрепаратів показав, що запропонований спосіб гістологічної експрес-обробки тканин дослідного біологічного об'єкта дозволяє в скорочений термін (до 48 год) якісно провести обробку тканин без їх пошкодження. При цьому тканини фіксуються в стані, близькому до фізіологічного, процес дегідратації суттєво спрощується, а затрати праці значно зменшуються.

Отже, запропонований спосіб гістологічної експрес-обробки тканин дослідного біологічного об'єкта може широко використовуватися в лабораторіях ветеринарної медицини, районних і обласних управліннях, лікарнях ветеринарної медицини, а також слухачами факультетів післядипломного навчання, науковцями, викладачами та студентами вищих навчальних закладів.

Спосіб дозволяє ефективно та максимально безпечно отримувати якісні гістологічні препарати у прискорений термін (до 48 год), знижує собівартість обробки та сприяє своєчасному проведенню патоморфологічних досліджень органів і тканин тварин.

Таблиця 2

Депарафінізація та фарбування зрізів у автоматі лінійного типу*

Реагент	Концентрація, %	Експозиція, хв
Ксилол	-	5

Ксилол	-	5
Спирт	96	5
Спирт	96	5
Вода проточна	-	5
Гематоксилін	-	10
Проточна вода	-	5
Еозин спиртовий	0,3	1
Вода проточна	-	5
Спирт	70	5
Спирт	96	5
Спирт	96	5
Карбол-ксилол	3:1	5
Ксилол	-	5

Примітка. "Тривалість програми складає 1 год 10 хв; за потреби використовували диференційне фарбування.

Істотними відмінностями корисної моделі є:

1. Єдина цілісна процедура пробопідготовки тканин.
2. Механізація процедур гістологічної обробки тканин.
3. Зменшення токсичного навантаження на персонал під час проведення гістологічної проводки.
4. Спрощення процедури приготування реагентів шляхом використання готових розчинів, які не потребують розведення.
5. Зниження собівартості гістологічної обробки.
6. Значне скорочення затрат часу на проведення процедур (фіксація тканин зменшена з 7 діб до 48 год).

Джерела інформації:

1. ДСТУ 4221:2004 Спирт етиловий ректифікований. Технічні умови.
2. ДСТУ 2708-94 Метрологія. Повірка засобів вимірювань. Організація і порядок проведення.
3. ДСТУ EN45001-98 Загальні вимоги до діяльності випробувальних лабораторій.
4. Bancrofts Theory and Practice of Histological Techniques (7th Ed). Suvama S., Layton C., Bancroft J., Limited E.; China, 2013; 604 p. ISBN: 978-0-7020-5032-9.
5. ПВ.ДНДІЛДВСЕ 7.2-7-11. Гістологічний метод дослідження з використанням гістологічної техніки.
6. Методичні рекомендації з організації та відбору проб для діагностичних досліджень на заразні хвороби тварин та птиці: метод, рекомендації. (2019). О.В. Піщанський, Т.О. Гаркавенко, А.О. Меженський та ін.; Київ: ДНДІЛДВСЕ; 123 с.
7. Модифікація техніки виготовлення гістологічних препаратів: метод, рекомендації. (2022). Ложкіна О.В., Чечет О.М., Коваленко В.Л., Гайдей О.С, Павлунько В.Г., Литвиненко С.М., Купневська М.В., Омеляненко М.М., Мазуркевич Т.А., Марчук О.Т., Теплих Н.І., Тишківська А.М.; Київ, ДНДІЛДВСЕ; 21 с.
8. Методичні рекомендації патолого-гістологічна техніка та приготування музейних препаратів: метод, рекомендації. (2003). Мандигра М.С., Камінська Л.П., Мірко В.І.; Рівне; 37 с.