

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(19) ВУ (11) 8875

(13) С1

(46) 2007.02.28

(51)⁷ G 01N 1/28

(54) СПОСОБ ПОДГОТОВКИ ОБРАЗЦА ТКАНИ МОЗГА ДЛЯ ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

(21) Номер заявки: а 20040003

(22) 2004.01.08

(43) 2005.09.30

(71) Заявитель: Учреждение образования "Гродненский государственный медицинский университет" (ВУ)

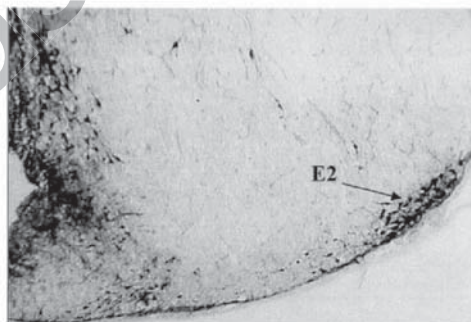
(72) Авторы: Зиматкин Сергей Михайлович; Кузнецова Вера Борисовна; Кравчук Римма Ивановна (ВУ)

(73) Патентообладатель: Учреждение образования "Гродненский государственный медицинский университет" (ВУ)

(56) Зиматкин С.М. и др. Морфология. - 1994. - Т. 106. - № 4-6. - С. 157-161. ВУ 1044 С1, 1996.

(57)

Способ подготовки образца ткани мозга для электронно-микроскопического исследования, заключающийся в том, что получают образец ткани, замораживают в жидком азоте, изготавливают два соседних криостатных среза толщиной 20 мкм и 60 мкм, криостатный срез толщиной 20 мкм размораживают, подсушивают при комнатной температуре и маркируют по методу Ниссля или специфическим маркером для выявления нужных структур мозга, второй срез толщиной 60 мкм в камере криостата помещают в охлажденный фиксатор, промывают и обезвоживают в спиртах с возрастающей концентрацией, затем под контролем маркированного среза в срезе толщиной 60 мкм, предназначенном для электронно-микроскопических исследований, вырезают зону, содержащую изучаемую структуру.



Ядро E2 в контрольном срезе гипоталамуса крысы (Р -3.80 мм). Окраска на выявление активности МАО Б. Об.х10. Цифровая микрофотография (окраска по методу С.М. Зиматкина, В.Ф.Цыдика, 1994).

Фиг. 1

Изобретение относится к биологии, а именно к гистологии и нейроморфологии и позволяет исследовать мелкие структуры мозга.

BY 8875 C1 2007.02.28

Известен способ приготовления электронно-микроскопических препаратов (Watson M.L., Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals, J. Biophys. Biochem. Cyt., 1958. - Vol. 4. - P. 475-478, Reynolds E. S., The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy., J. Cell Biol., 1963. - Vol. 17. - P. 208-212). Кусочки органа размером 1×1 мм фиксируют в течение 2 ч при +4 °С в двух порциях 1 % Os-фиксатора на буфере Миллонига pH 7,4 (Millonig G., Advantages of a phosphate buffer for OsO₄ solutions in fixation., J. Appl. Physics., 1961. - Vol. 32. - P. 1637-1643.). Затем промывают 10 мин в р-ре буфера Миллонига с сахарозой. Обезвоживают в спиртах возрастающей концентрации и ацетоне, заключают в заливочную среду (Аралдит М + Аралдит Наст + Дибутилфталат + ДМР-30). Полимеризуют при 65 °С 4 суток. Срезы изготавливают на ультрамикротоме. На окрашенных метиленовым синим полутонких срезах уточняют локализацию изучаемых гистологических структур. Ультратонкие срезы контрастируют уранилацетатом и цитратом свинца.

Недостатком этого способа является невозможность его использования для электронно-микроскопического исследования мелких структур мозга (размером менее 0,5 мм в диаметре), так как такие мелкие структуры целенаправленно иссечь технически невозможно.

Задача изобретения - разработать способ подготовки тканей для электронно-микроскопических исследований мелких структур мозга.

Поставленная задача решается путем получения образца ткани мозга, замораживания в жидком азоте, изготовления двух соседних криостатных срезов толщиной 20 м и 60 м, после чего криостатный срез толщиной 20 м размораживают, подсушивают при комнатной температуре и маркируют по методу Ниссля или специфическим маркером для выявления нужных структур мозга, второй срез толщиной 60 м в камере криостата помещают в охлажденный фиксатор, промывают и обезвоживают в спиртах с возрастающей концентрацией, затем под контролем маркированного среза в срезе толщиной 60 м, предназначенном для электронно-микроскопических исследований, вырезают зону, содержащую изучаемую структуру.

Способ осуществляют следующим образом. После декапитации животного проводят вскрытие черепной коробки, извлекают головной мозг с последующим выделением гипоталамуса. Последний, предварительно выдержав в парах азота, подвергают заморозке путем погружения в жидкий азот. После чего образец монтируют в криостате. Два среза толщиной 20 м и 60 м, готовят при $t = -15$ °С на уровне $P \approx -3,80$. Первый срез монтируют на предметное стекло, быстро расправляют и размораживают, подсушивают при комнатной температуре. Затем срез маркируют по методу Ниссля или специфическим маркером для выявления нужных структур мозга. Второй срез в камере криостата помещают в предварительно охлажденный до +4 °С 1 % Os-фиксатор. После чего его извлекают из камеры криостата во флаконе с фиксатором и фиксируют в течение 2 ч при +4 °С в двух порциях 1 % Os-фиксатора, приготовленного на буфере Миллонига (pH 7,4). В дальнейшем, после промывки в р-ре (буфер Миллонига (pH 7,4) (20 мл) + сахароза (900 мг)), проводят обезвоживание материала в 50 % и 70 % спиртах. Затем под контролем маркированного среза вырезают зоны, содержащие изучаемую структуру. Далее материал выдерживают ночь в холодильнике при +4 °С в 2 % уранилацетате на 70° спирте.

Дальнейшее обезвоживание материала проводят в спиртах возрастающей концентрации, смеси ацетона и спирта, ацетоне. После обезвоживания материал заключают в заливочную смолу с предварительным проведением через смеси смолы (Аралдит М + Аралдит Наст + Дибутилфталат + ДМР-30) и ацетона. Срезы изготавливают на ультрамикротоме. На окрашенных метиленовым синим полутонких срезах уточняют локализацию изучаемой структуры. Ультратонкие срезы контрастируют уранилацетатом и цитратом свинца. Сеточки опускают в каплю уранилацетата на 30 мин (для головного мозга) под темной

крышкой при RT. Промывают 50° спиртом 3 с. Промывают в 2-х порциях бидистиллированной H₂O по 5 с. Контрастируют цитратом свинца 10 мин. Промывают в 3-х порциях воды по 5 с. Изучают материал в электронном микроскопе.

Приводим пример, подтверждающий возможность осуществления способа.

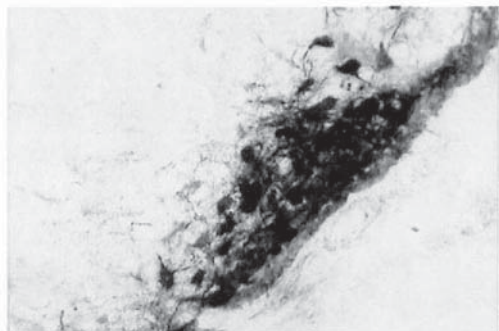
Пример 1.

Для исследования нейронов гистаминергического ядра E2 гипоталамуса мозга крысы в качестве специфического маркера использовалась моноаминоксидаза типа Б (МАО Б). После приготовления двух срезов толщиной 20 м и 60 м готовят при $t = -15^{\circ}\text{C}$ на уровне $P \approx -3,80$ первый срез, монтируют на предметное стекло, быстро расправляют и размораживают, а затем подсушивают при комнатной температуре. Маркируют первый срез на выявление МАО Б (Зиматкин С.М., Цыдик В.Ф. Гистохимический метод исследования активности моноаминоксидазы А и В в мозге // Морфология. - 1994. - № 4-6. - С. 157-161)). Второй срез приготавливают способом, описанным в прототипе. Затем под контролем маркированного среза на втором срезе вырезают зоны, содержащие нейроны гистаминергического ядра E2 гипоталамуса мозга крысы. Далее полученный материал выдерживают ночь в холодильнике при $+4^{\circ}\text{C}$ в 2 % уранилацетате на 70° спирте, обезживают, заключают в заливочную смолу с предварительным проведением через смеси смолы (Аралдит М + Аралдит Наст + Дибутилфталат + ДМР-30) и ацетона. Срезы изготавливают на ультрамикротоме. На окрашенных метиленовым синим полутонких срезах уточняют локализацию гистаминергического ядра. Ультратонкие срезы контрастируют уранилацетатом и цитратом свинца. Сеточки опускают в каплю уранилацетата на 30 мин (для головного мозга) под темной крышкой при RT. Промывают 50° спиртом 3 с, промывают в 2-х порциях бидистиллированной H₂O по 5 с, контрастируют цитратом свинца 10 мин, промывают в 3-х порциях воды по 5 с. После чего изучают в электронном микроскопе.

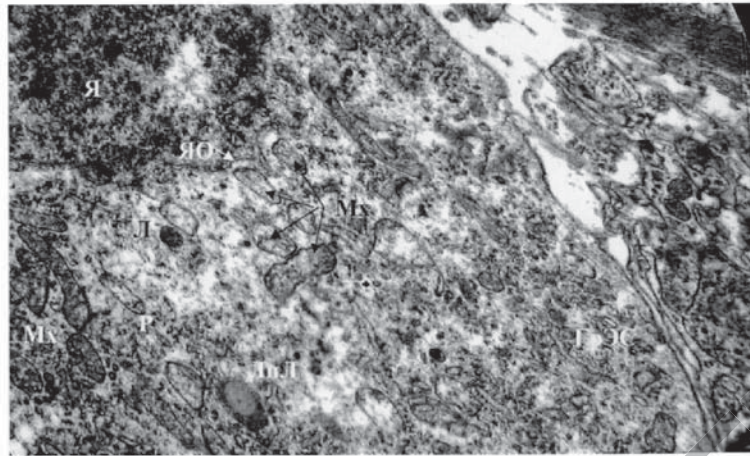
Для иллюстрации полученных результатов прилагаются микрофотографии маркированного среза (микрофотография E2 и E3 гистаминергических ядер гипоталамуса крысы на уровне $P = -3,80$) и электронные микрофотографии, полученные с соседнего криостатного среза, подверженного стандартному классическому способу приготовления электронно-микроскопических препаратов, описанному в прототипе (Фрагменты перикарионов нейронов гистаминергического ядра E2) (рис. 1, 2, 3).

Преимущества предлагаемого способа по сравнению с прототипом: возможность точного электронно-микроскопического исследования мелких структур мозга (менее 0,5 мм в диаметре).

Способ прост, надежен, хорошо воспроизводим. Может быть использован в любой электронно-микроскопической лаборатории.



Ядро E2 в контрольном срезе гипоталамуса крысы ($P -3,80 \text{ mm}$). Окраска на выявление активности МАО Б. Об.х40. Цифровая микрофотография.



Фрагмент цитоплазмы нейрона гистаминергического ядра E2. Ядро (Я). Видна ядерная оболочка (ЯО) с порами. Митохондрии (Мх) овальной и круглой формы, преимущественно мелких и средних размеров. Хорошо развита гранулярная эндоплазматическая сеть (ГрЭС), между мембранами ГрЭС значительное количество свободных рибосом (Р), лизосомы (Л) мелких и средних размеров, заполненные гомогенным и гетерогенным содержимым - липидолизосома (ЛпЛ). Ув.х 10000. Электронная микрофотография.

Фиг. 3