



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **142931** (13) **U**
(51) МПК (2020.01)
G01N 23/00

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2019 10506</p> <p>(22) Дата подання заявки: 21.10.2019</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.07.2020</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.07.2020, Бюл.№ 13</p>	<p>(72) Винахідник(и): Новак Віталій Петрович (UA), Бевз Ольга Сергіївна (UA), Мельниченко Антоніна Петрівна (UA), Кузьменко Оксана Анатоліївна (UA), Мельниченко Юлія Олександрівна (UA), Нечипорук Євгенія Віталіївна (UA)</p> <p>(73) Власник(и): БІЛОЦЕРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, пл. Соборна, 8/1, м. Біла Церква, Київська обл., 01117 (UA)</p>
--	---

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ДЕГЕНЕРАТИВНИХ ЗМІН НЕРВОВИХ ВОЛОКОН ССАВЦІВ

(57) Реферат:

Спосіб визначення дегенеративних змін нервових волокон ссавців полягає в діагностиці ознак уолерівської дегенерації, який відрізняється тим, що використовують поляризаційну мікроскопію з перехрещеними ніколями (темне поле) та розщеплені на окремі волокна свіжі нервові стовбури, змонтовані в тимчасовий гістологічний препарат.

UA 142931 U

Корисна модель належить до галузі ветеринарної медицини, зокрема гістологічної техніки та поляризаційної мікроскопії, та може бути використана для швидкого виявлення морфологічних ознак переродження мієлінової оболонки нервових волокон магістральних нервів ссавців за уолерівської (вторинної) дегенерації за обробки експериментального матеріалу після екстравертебральної гангліоектомії, пересічення та перетиснення магістральних нервів, а також для підтвердження та уточнення патологоанатомічного епікризу парезів та паралічів.

Руйнування дистальної та певної частини проксимальної зони пересіченого мієлінізованого волокна відоме як уолерівська дегенерація. Дегенерація є жировою дистрофією пошкодженого нервового волокна, що розвивається всередині оболонки нерва, дистальніше зони ушкодження [1].

Відомі методи вивчення та діагностики ознак уолерівської дегенерації - мікрочиповий аналіз, флуоресцентна мікроскопія і конфокальне відстеження окремих YFP-мічених аксонів, імуногістохімія, MPT та КТ, ультраструктурні дослідження, імуофарбування, метод мічення RGCs флуоресцентним білком TdTomato, in vitro, метод обробки зеленим флуоресцентним протеїном (GFP), мають принципово інші схеми обробки матеріалу та мікроскопування.

Мікрочиповий аналіз. Тотальну РНК екстрагували з використанням Trizol (Lifetechnologies, Carlsbed, CA) відповідно до інструкцій виробника. Оброблену ДНК видаляли з використанням спін-колонок RNeasy (Qiagen, Valencia, CA). Якість виділених зразків РНК оцінювали за допомогою Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Санта-Клара, Каліфорнія) і очищену РНК визначали кількісно з використанням спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Infinigen Biotechnology Inc., CityofIndustry, CA). Для проведення аналізу з використанням мікроматриць були використані піч для гібридизації Affymetrix Gene Chip 640 і сканер Gene Array 3000. Платформа R software (v.2.13.0) була застосована для аналізу даних мікроматриць, а пакет limma (модель лінійної регресії) був використаний для статистичного аналізу диференційно експресованих генів. Гени, що мають кратне змінам > 2 або < -2 і скоригований $p < 0,05$, вважалися диференційно вираженими [2].

Флуоресцентна мікроскопія і конфокальне відстеження окремих YFP-мічених аксонів після різних часів поразки. Як у YFP-H, так і у потрійних гетерозиготних мишей після різаного або розчавленого ураження всі нервові волокна від проксимального відділу сідничного нерва до дистального великогомілкового нерва були ретельно вирізані, периневрій і гілка стегового нерва видалені, а що ділянки залишилися довжиною $\sim 2,5$ сантиметра обробляли для флуоресцентного препарату, використовуючи Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories). Для грубої орієнтації препарати фотографували на проксимальному і дистальному кінцях відрізаного нервового сегмента з використанням мікроскопа Zeiss Axiophot, з'єднаного з системою цифрової камери (Universal Imaging Corporation). Конфокальне композитне зображення з високою роздільною здатністю всієї внутрішньої нервової течії індивідуального YFP-міченого типу, що проходить через уражені відрізки по всій їх довжині. Поодинокі зображення були отримані за допомогою програмного забезпечення Laser Sharp 2000, підключеного до системи лазерного сканування Biorad Radiance 2000 (Hemel Hempsted, Великобританія), а складові зображення на чорному фоні були створені з використанням Adobe Photoshop [3].

Недоліком цих методів є довготривалість, трудомісткість, витратність та відсутність відповідних реактивів та апаратури.

Поляризаційна мікроскопія дозволяє отримувати зображення нефарбованих анізотропних структур (наприклад, колагенових волокон, міофібрил або клітин мікроорганізмів). Принцип методу оснований на вивченні об'єкта в світі, утвореному двома променями, поляризованими у взаємно перпендикулярних площинах [4].

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб визначення дегенеративних змін нервових волокон ссавців шляхом використання поляризаційної мікроскопії в темному полі, що забезпечить виявлення морфологічних ознак уолерівської дегенерації в результаті переродження мієлінової оболонки нервових волокон магістральних нервів.

Поставлена задача вирішується у способі визначення дегенеративних змін нервових волокон ссавців, що полягає в діагностиці ознак уолерівської дегенерації, згідно з корисною моделлю, використовують поляризаційну мікроскопію з перехрещеними ніколями (темне поле) та розщеплені на окремі волокна свіжі нервові стовбури, змонтовані в тимчасовий гістологічний препарат.

В поляризаційному світлі можна відрізнити перероджені мієлінові нервові волокна від нормальних.

Спосіб полягає у наступному: за допомогою спеціально підгострених препарувальних голків з нервових стовбурів знімають епіневрій. Стовбур розділяють на пучки. Звільняють від

периневрію і розділяють на пучечки. Під налобною лупою, кожний пучечок, з одного кінця, розщеплюють голками за типом "пензлика". На предметне скло крапають декілька крапель ізотонічного розчину 0,85 % натрію хлориду та вкривають покривним скельцем. Вивчення матеріалу проводять під поляризаційним мікроскопом з перехрещеними ніколями в темному полі за збільшення мікроскопа х320.

Під час визначення дегенеративних змін нервових волокон використовують як свіжий матеріал, так і фіксований. Кращими були препарати зі свіжого матеріалу. Під час поляризаційного мікроскопування в темному полі зору чітко видно мієлінову оболонку різної товщини, залежно від діаметра волокна, у вигляді блискучої світлої смужки, з добре помітними насічками і перехватами. Осьовий циліндр завжди залишається чорним. Чітко помітні мієлінові нервові волокна різних нервів норми з яскравим рівномірним світінням мієлінової оболонки на темному фоні (так як мікроскопування проводилося у темному полі), так на фіг. 1 відображено нервові волокна стегнового нерва в нормальному стані за екстравертебральної гангліоектомії 7-го поперекового сегмента (L₇): 1 - мієлінова оболонка; 2 - насічки Шмідта-Лантермана; на фіг. 2 відображено нормальні нервові волокна низхідного колінного нерва за екстравертебральної гангліоектомії 1-го крижового сегмента (S₁): 1 - мієлінова оболонка; 2 - насічки Шмідта-Лантермана, 3 – перехвати Ранв'є.

Нормальний стан нервових волокон значно відрізняється від переродженого. Так, на фіг. 3 чітко помітні ранні стадії уолерівської дегенерації у нервових волокнах сідничного нерва за екстравертебральної гангліоектомії 6-го поперекового сегмента (L₆) - незначне розширення осьового циліндра та збільшення кількості насічок мієліну: 1 - мієлінова оболонка; 2 - насічки Шмідта-Лантермана. На фіг. 4, 5 відображені більш виражені зміни мієлінової оболонки у стегновому нерві - нерівність контурів оболонки та початок формування овоїдів: 1 - мієлінова оболонка; 2 - насічки Шмідта-Лантермана. З подальшим ходом дегенеративних змін спостерігаються послідовні дегенеративні ознаки. Так, на фіг. 6 відображено пізні стадії уолерівської дегенерації - значне потовщення мієлінової оболонки, згладжені гострі грані та виступи, початок фрагментарного світіння мієліну: 1 - мієлінова оболонка; 2 - насічки Шмідта-Лантермана. На фіг. 7 відображені прикінцеві стадії уолерівської дегенерації у маломілкового нерві за екстравертебральної гангліоектомії 4-го поперекового сегмента (L₄), які виражаються у поступовому зникненні мієлінової оболонки - її бліде фрагментарне світіння: 1 - мієлінова оболонка; 2 - насічки Шмідта-Лантермана.

Запропонований спосіб дозволяє швидко і якісно диференціювати перероджені нервові волокна від нормальних та визначити ступінь дегенеративних процесів.

Запропонований спосіб дозволяє швидко і якісно диференціювати перероджені нервові волокна від нормальних та визначити ступінь дегенеративних процесів.

Джерела інформації:

1. Vargas V. E., Barres B. A. Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow? *Ann Rev Neurosci.* 2007; 30: 153-79. DOI: 10.1146/annurev.neuro.30.051606.094354. PMID: 17506644.

2. Sheng Yi, Xin Tang, Jun Yu et al. Microarray and qPCR Analyses of Wallerian Degeneration in Rat Sciatic Nerves *Front. Cell. Neurosci.*, 2017 <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00022>

3. Beirowski B., Adalbert R., Wagner D., et al. The progressive nature of Wallerian degeneration in wild-type and slow Wallerian degeneration (Wld^S) nerves. *BMC Neurosci.* 2005; 6: 6. doi: 10.1186/1471-2202-6-6

4. Wallerian_degeneration. https://en.wikipedia.org/wiki/Wallerian_degeneration

5. Микроскопическая техника, www.Labx.narod.ru

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення дегенеративних змін нервових волокон ссавців, що полягає в діагностиці ознак уолерівської дегенерації, який **відрізняється** тим, що використовують поляризаційну мікроскопію з перехрещеними ніколями (темне поле) та розщеплені на окремі волокна свіжі нервові стовбури, змонтовані в тимчасовий гістологічний препарат.

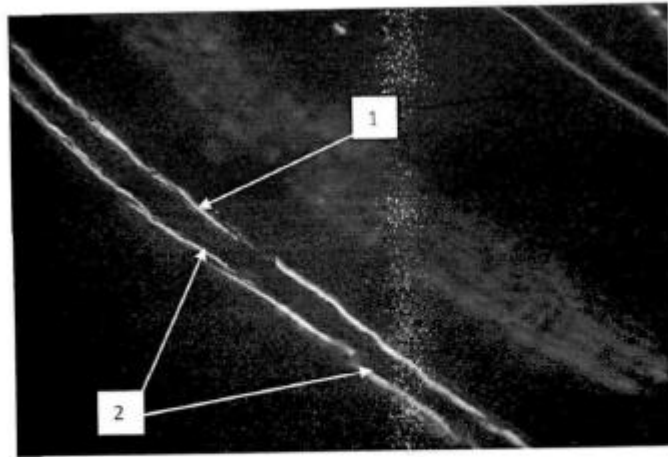


Fig. 1

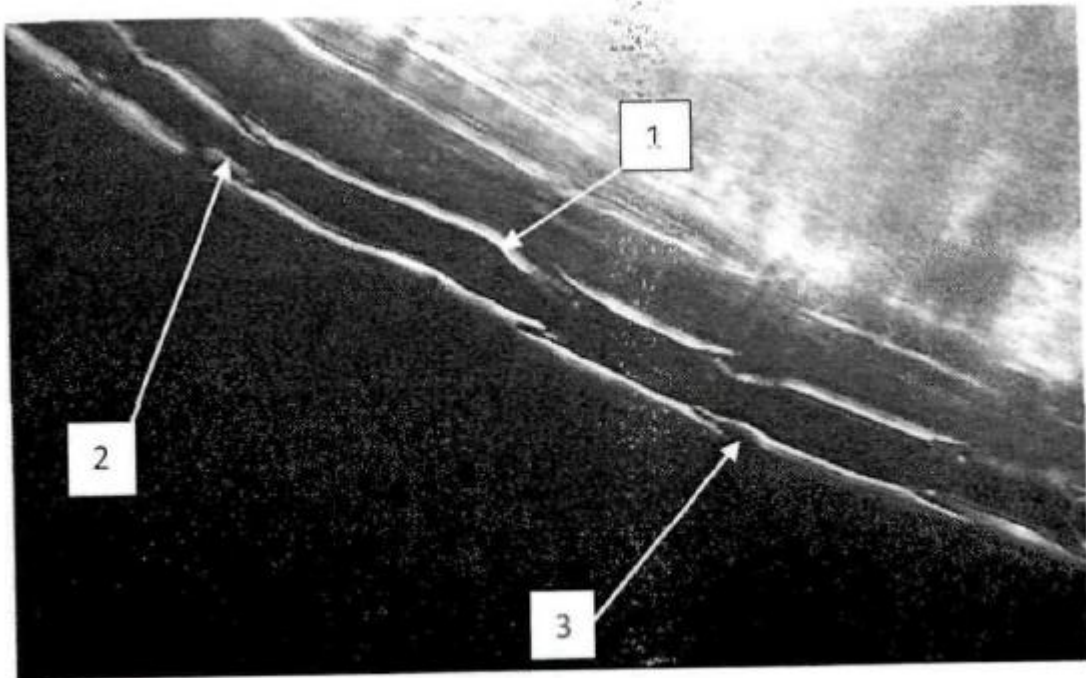


Fig. 2

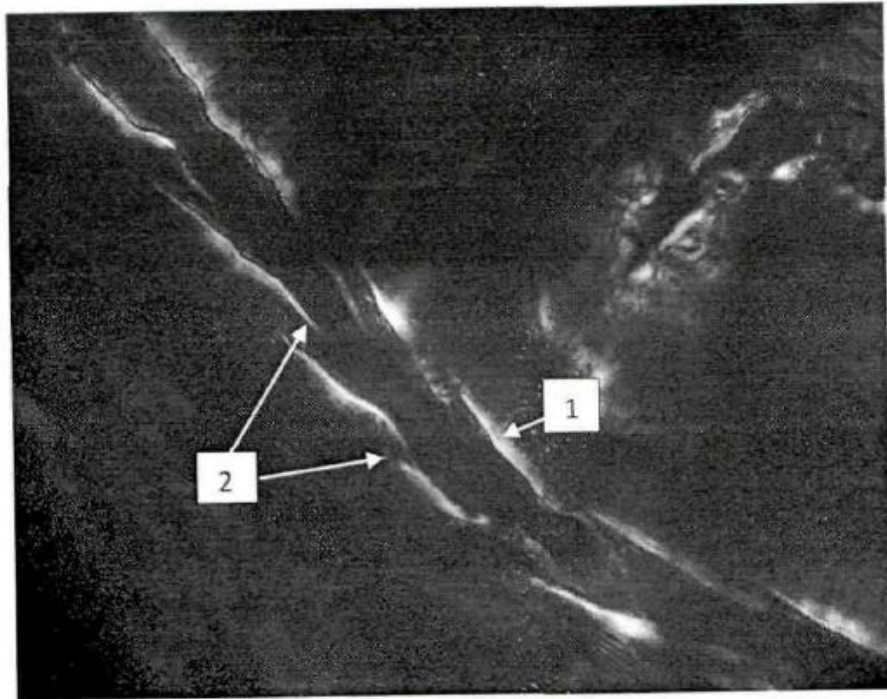


Fig. 3

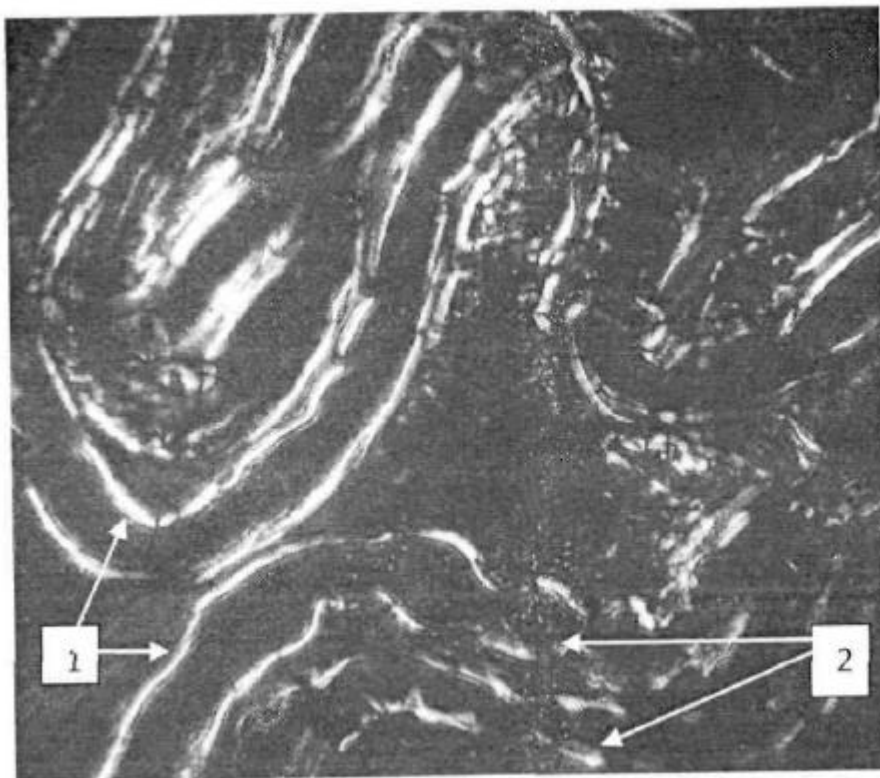


Fig. 4

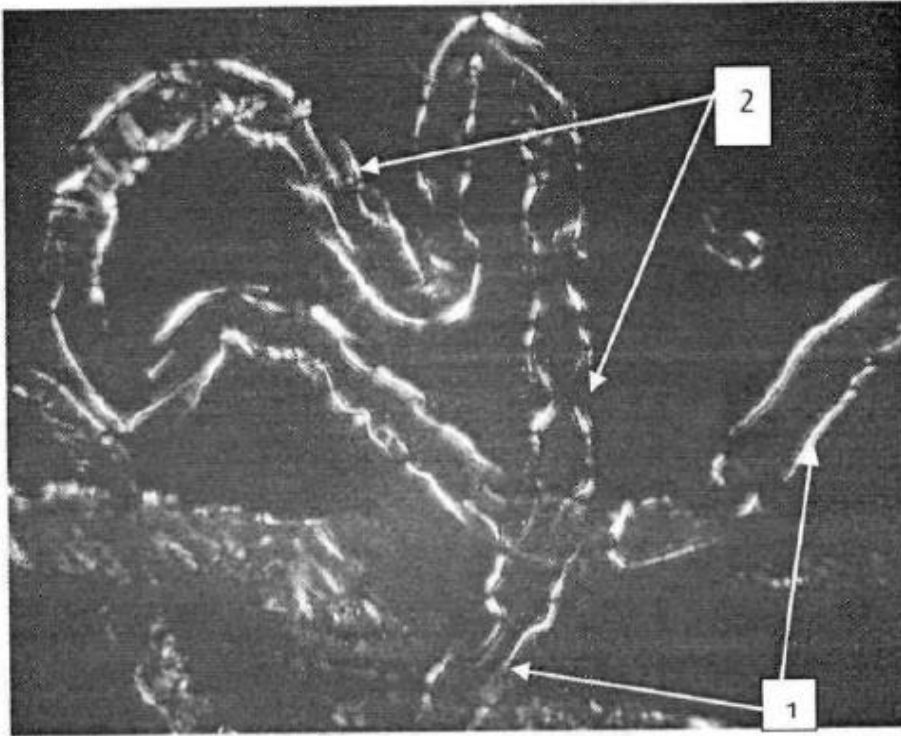


Fig. 5

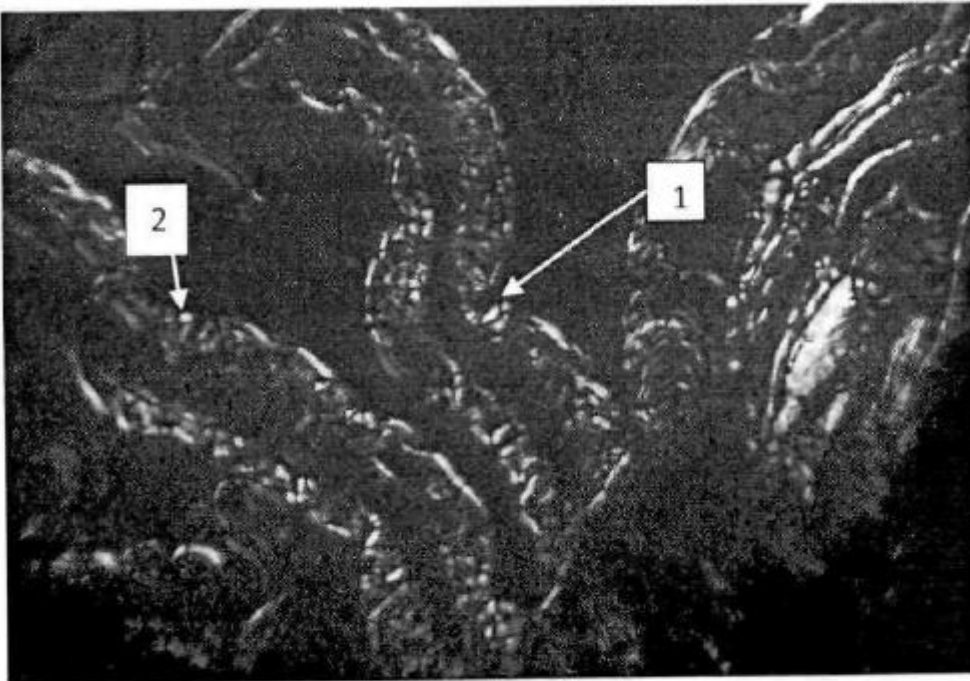
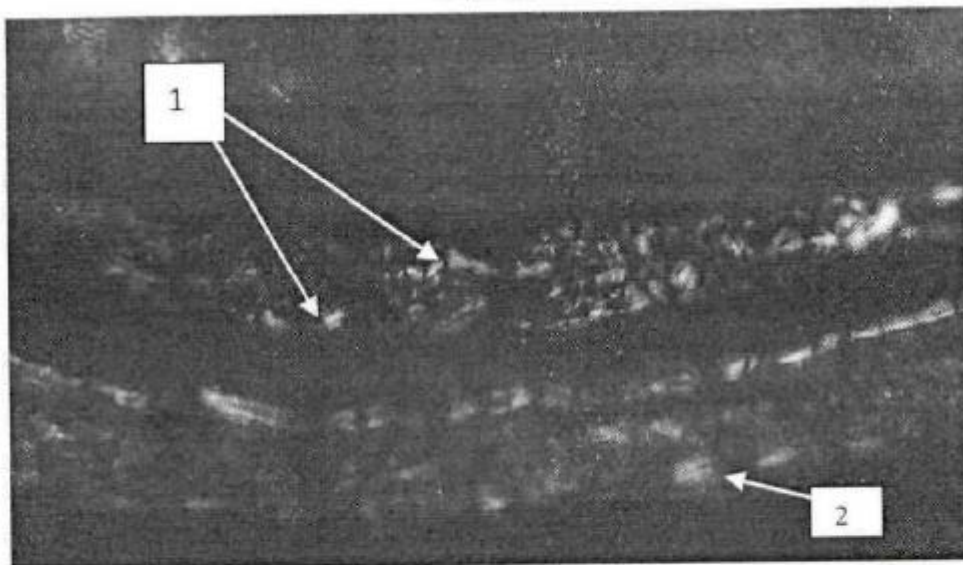


Fig. 6



Фіг. 7

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601