

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц
09.08.2012
Регистрационный № 110-0812

**СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ В БИОПСИЙНОМ
И АУТОПСИЙНОМ МАТЕРИАЛЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ИММУНОПЕРОКСИДАЗНОГО МЕТОДА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Белорусский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. В.В. Руденок, О.С. Сает, А.В. Сокол,
А.В. Никитский, канд. мед. наук, доц. Н.А. Трушель

Минск 2012

Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) устанавливает порядок выявления регуляторных пептидов (РП): вазоактивного интестинального полипептида, кальцитонин-ген-родственного пептида, мет-энкефалина в биопсийном и аутопсийном материале с использованием иммунопероксидазного метода (ИПМ).

Данный метод сочетает в себе возможности трех широко используемых диагностических методов: гистологического, биохимического и иммунологического. Он основан на применении первичных антител, специфичных к исследуемым антигенам. Антитела образуют с антигенами иммунные комплексы, которые обнаруживаются с помощью вторичных антител, связанных с пероксидазно-антипероксидазным комплексом. Иммунопероксидазный метод имеет целый ряд преимуществ по сравнению с традиционными гистохимическими и люминесцентными при выявлении РП. Среди достоинств, в первую очередь, следует выделить высокую селективность к различным антигенным детерминантам, стойкость иммунных комплексов, простоту и надежность в выполнении, а также возможность выявлять антигены со слабой экспрессией. Предлагаемый метод позволяет эффективно обнаруживать регуляторные пептиды: вазоактивный интестинальный полипептид, кальцитонин ген-родственный пептид, мет-энкефалин в клетках нервной, эпителиальной, соединительной ткани, органах иммунной системы, кровеносных сосудах и в другом сохранном биологическом материале, полученном путем биопсии или аутопсии. Иммунопероксидазный метод является доступным и реально выполнимым в условиях патоморфологической или гистологической лаборатории.

Материалом для выявления регуляторных пептидов могут служить практически все ткани человека, полученные методом биопсии или аутопсии.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Криостат (замораживающий микротом).
2. Сменные одноразовые лезвия для микротома.
3. Универсальный светооптический микроскоп.
4. Прикладная морфометрическая программа.
5. Предметные и покровные стекла.
6. Пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, переменным объемом 0,5–10; 5–50; 50–200 мкл.
7. Одноразовые наконечники до 300 мкл.
8. Кюветы для предметных стекол.
9. Весы электронные.

Вспомогательные устройства и материалы:

1. Шкаф вытяжной.
2. Холодильник бытовой.
3. Инкубационная камера.
4. Маркер (стеклограф).

Реактивы:

1. Параформальдегид (4%).

2. Пикриновая кислота (1,2%).
3. Фосфатный буфер (рН = 7,4).
4. Физиологический раствор (0,9%).
5. Спирт этиловый (50%).
6. Сахароза (20%).
7. Дистиллированная вода.
8. Нормальная козья сыворотка (10%).
9. Поликлональные антитела к вазоактивному интестинальному полипептиду (Affinity, VA 1285, 1:400), кальцитонин ген-родственному пептиду (Peninsula, ИНС 6012, 1:200), мет-энкефалину (Peninsula, ИНС 8601, 1:200).
10. Козья сыворотка с вторичными антителами (GAR IgG, Dakopatts Z421).
11. Раствор, содержащий пероксидазно-антипероксидазный (ПАП) комплекс (Dakopatts Z113, разведение 1:100).
12. Диаминобензидин (0,01%).
13. Акватекс (Amersham).

Допускается использование других устройств и материалов, которые не уступают по своим характеристикам приведенным выше.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Выявление регуляторных пептидов: вазоактивного интестинального полипептида, кальцитонин-ген-родственного пептида, мет-энкефалина в клетках нервной, эпителиальной, соединительной ткани, органах иммунной системы, кровеносных сосудах и в другом сохранном биологическом материале, полученном методом биопсии или аутопсии.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Подготовка оборудования

Включают замораживающий микротом и вводят значение уровня охлаждения -22°C . Монтируют микротомный нож и регулятором устанавливают максимальный показатель толщины изготавливаемых срезов для формирования их плоскости. Затем с помощью регулятора устанавливают требуемую толщину срезов (8–10 мкм).

Образцы биологического материала, полученные методом биопсии или аутопсии, размером 5×5 мм фиксируются 5–7 дней в универсальном растворе для иммуногистохимических исследований биологического материала: растворе Замбони, включающем в свой состав 100 мл 4% раствора параформальдегида, 35 мл 1,2% раствора пикриновой кислоты и 65 мл дистиллированной воды (рН = 7,4).

1. После фиксации образцы ткани при комнатной температуре ($18-20^{\circ}\text{C}$) последовательно промываются в фосфатном буфере (рН = 7,4), 50% этиловом спирте, фосфатном буфере (рН = 7,4) по 10 мин в каждом. Затем биологический материал помещается в 20% раствор сахарозы, где он сохраняется в течение 12 ч в холодильнике при температуре 4°C . После извлечения из 20% раствора сахарозы материал помещается в 0,9% физиологический раствор для последующей заморозки.

2. Серийные срезы толщиной 8-10 мкм готовятся из замороженных в 0,9% физиологическом растворе образцов ткани с помощью автоматического замораживающего микротомы при температуре -22°C и помещаются на предметные стекла.

3. Срезы высушиваются при комнатной температуре $18-20^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин.

4. Затем срезы помещаются в кюветы для предметных стекол и дважды промываются в 0,1 М фосфатном буфере ($\text{pH} = 7,4$) в течение 20 мин.

5. После извлечения из кювет на срезы микропипеткой наносится 10% раствор нормальной козьей сыворотки (Dakoratts; X907). Обработанные сывороткой срезы помещаются в инкубационную камеру на 30 мин при комнатной температуре ($18-20^{\circ}\text{C}$).

6. Козья сыворотка удаляется путем промывания срезов фосфатным буфером ($\text{pH} 7,4$), затем на срезы микропипеткой наносятся сыворотки, содержащие поликлональные антитела к регуляторным пептидам: вазоактивному кишечинальному полипептиду (Affinity, VA 1285, 1:400), кальцитонин-генродственному пептиду (Peninsula, ИНС 6012, 1:200), или мет-энкефалину (Peninsula, ИНС 8601, 1:200) и срезы помещаются в инкубационную камеру на 24 ч при комнатной температуре $18-20^{\circ}\text{C}$.

7. По истечении срока инкубации срезы извлекаются из инкубационной камеры и дважды по 10 мин промываются в кюветах с фосфатным буфером ($\text{pH} = 7,4$) при комнатной температуре ($18-20^{\circ}\text{C}$).

8. На срезы микропипеткой наносится козья сыворотка с вторичными антителами (GAR IgG, Dakoratts Z421) в разведении 1:100. Срезы помещаются в инкубационную камеру на 12 ч при комнатной температуре $18-20^{\circ}\text{C}$.

9. Вторичные антитела удаляются путем промывания фосфатным буфером ($\text{pH} = 7,4$), затем на срезы наносится раствор, содержащий пероксидазно-антипероксидазный комплекс (Dakoratts Z113, разведение 1:100) и срезы помещаются в камеру для инкубации на 12 ч при комнатной температуре $18-20^{\circ}\text{C}$.

10. По истечении срока инкубации срезы извлекаются из инкубационной камеры и дважды по 10 мин промываются в кюветах с фосфатным буфером ($\text{pH} = 7,4$) при комнатной температуре $18-20^{\circ}\text{C}$.

11. Для выявления продукта реакции в качестве хромогена на срезы микропипеткой наносится диаминобензидин (0,01%) на 5-10 мин при комнатной температуре $18-20^{\circ}\text{C}$.

12. Затем срезы промываются дистиллированной водой в кюветах в течение 10 мин при комнатной температуре $18-20^{\circ}\text{C}$ и заключаются под покровные стекла с использованием акватекса.

Оценка результатов исследования проводится на светооптическом уровне при увеличении 400x с использованием универсального светооптического микроскопа. Продукт реакции определяется в клетках ткани в виде мелкодисперсных зерен коричневого цвета. Морфометрические исследования состоят в определении числа клеток с контурирующимися ядрами, демонстрирующими положительную реакцию к регуляторным пептидам в пяти произвольно выбранных областях на каждом срезе. После этого высчитывается средний показатель. Статистический анализ полученных

в ходе исследования данных проводится по стандартным методам и формулам на ЭВМ IBM PC с использованием пакета программ STATISTICA 6.0. В шейно-грудных узлах новорожденных с тетрадой Фалло количество иммунореактивных к вазоактивному кишечинальному полипептиду и кальцитонин ген-родственному пептиду нервных клеток составляло 95 и 88%. В тимусе новорожденных количество иммунореактивных к вазоактивному кишечинальному полипептиду и кальцитонин ген-родственному пептиду клеток составляло 15 и 8%. При стенозе аорты популяция VIP-иммунореактивных нейронов в шейно-грудных узлах достигала 94%, а КГРП-иммуноположительные нервные клетки составляли 84% от общего числа нервных клеток. При остром инфаркте миокарда иммунореактивные к вазоактивному кишечинальному полипептиду, кальцитонин ген-родственному полипептиду и мет-энкефалину нейроны по отношению к общему числу нервноклеточной популяции составляли 96; 87 и 42% соответственно.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Для данного метода требуется тщательное соблюдение всех этапов технологии. Особое внимание следует уделять срокам инкубации, правилам забора биопсийного и аутопсийного материала, а также его фиксации.