

DOI: 10.26693/jmbs06.01.303

УДК 611.43:616.432-089-092.9]:615.012

Гринцова Н. Б., Романюк А. М.

ОРИГІНАЛЬНИЙ СПОСІБ ВИЛУЧЕННЯ ТА ФІКСАЦІЇ ГІПОФІЗА СТАТЕВОЗРІЛИХ ЩУРІВ ДЛЯ ПРИГОТУВАННЯ ЯКІСНИХ ПОСТІЙНИХ ГІСТОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ

Сумський державний університет, Україна

natalia.gryntsova@gmail.com

Питання якісного приготування гістологічних препаратів є актуальним питанням гістології та патологічної анатомії, експериментальної медицини та біології. Гіпофіз належить до найменших за масою та розмірами ендокринних залоз як у людини так і у тварин, є залозою внутрішньої секреції та займає одно з центральних місць в ендокринній регуляції життєдіяльності організму. Вивчення особливостей вилучення гіпофіза з турецького сідла клиноподібної кістки черепа щурів залишається актуальним аспектом сучасної морфології.

Метою роботи було розроблення оригінальної методики-техніки що до удосконалення першого (вилучення) та другого (фіксація матеріалу) етапів приготування гістологічних препаратів гіпофізу щурів для проведення морфологічних, морфометричних та імуногістохімічних медико-біологічних експериментальних досліджень.

Розроблення методики проведено на 200 білих статевозрілих щурах різної статі масою 250-300г, віком 7-8 місяців у відповідності до Національних та загальноєвропейських біоетичних положень. Модифікація техніки вилучення гіпофіза щурів включає введення тварини у тіопенталовий наркоз, декапітацію, відсепарування шкіри та м'язових покривів голови, резекцію ділянки потиличної кістки черепної коробки, оголення та вилучення головного мозку, ідентифікацію гіпофізу, з наступним видаленням гіпофіза єдиним комплексом (блоком) разом з гіпофізарною ямкою турецького сідла та фрагментами прилеглої до неї клиноподібної кістки. Фіксацію залози проводили зниженою концентрацією 5 % розчину забуференого нейтрального формаліну. Через 15-18 годин від початку фіксації комплекс тимчасово вилучався з фіксатора та за допомогою скальпеля очного та пінцета очного вилучався гіпофіз з гіпофізарної ямки турецького сідла.

Орган мав добре зафіксовану та ущільнену капсулу, що запобігало зайвій травматизації та фрагментації органу під час вилучення. Вилучений гіпофіз знову занурювали у 5 % розчин нейтрального забуференого формаліну на 2-3 години. Після закінчення терміну фіксації гіпофіз мав добре зафіксовану структуру та підлягає наступним

стандартним етапам виготовлення постійних гістологічних препаратів.

Ключові слова: гіпофіз, формалін, гіпофізарна ямка, препарування.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана відповідно до плану наукових досліджень Медичного інституту Сумського державного університету і є складовою частиною науково-дослідної теми кафедри морфології «Морфофункціональні аспекти порушення гомеостазу організму», № державної реєстрації 0118U006611.

Вступ. Питання якісного приготування гістологічних препаратів є актуальним питанням гістології та патологічної анатомії, експериментальної медицини та біології. Гіпофіз – hypophysis (glandula pituitaria) є залозою внутрішньої секреції, займає одно з центральних місць в ендокринній регуляції життєдіяльності організму. Гіпофіз належить до найменших за масою та розмірами ендокринних залоз як у людини так і у тварин, він розташований у ділянці турецького сідла (гіпофізарній ямці) клиноподібної кістки черепа, анатомічно пов'язаний з гіпоталамусом гіпофізарною (інфундібулярною) ніжкою - виростом воронки III шлуночка [1-4]. Ця нейроендокринна залоза є похідним епітеліального та нейрального зачатків та функціонує як складна ендокринна залоза, знаходиться в прямій взаємодії з гемолімфатичною та лікворною системами організму [5]. Ці морфофізіологічні особливості органу обумовлюють участь гіпофіза в регуляторних ефектах нейроендокринної системи: регуляції метаболізму, репродуктивної функції, ріст тіла; участь у стрес-реакціях, тощо. Гіпофіз секретує тропні гормони, котрі здатні вибірково активізувати, або пригнічувати діяльність периферійних ендокринних залоз. Анатомічна будова гіпофіза щурів є типовою для ссавців [6]. У щурів гіпофіз належить до примітивного типу, так як все життя зберігається порожнина гіпофіза-cavum hypophysialis (Rathke), що представляє собою випинання епітелію задньої стінки ротової порожнини зародка на межі з глоткою та є зачатком аденогіпофіза. Гіпофіз складається з двох часток (аденогіпофіза та нейрогіпофіза), що мають різне ембріональне походження [7].

Аденогіпофіз має в розрізі буро-червоне забарвлення, що обумовлено наявністю у паренхімі великої кількості судин. Проміжна частина гіпофіза у щурів анатомічно виражена слабо, має вигляд звуженої ділянки поряд з нейрогіпофізом. Нейрогіпофіз в розрізі має жовтуватий колір, що обумовлено наявністю пігменту. Аденогіпофіз за розмірами значно превалює над нейрогіпофізом, покриваючи його з трьох боків [6]. Органо- і морфометричні показники гіпофіза знаходяться в певній залежності як від віку тварин, так і від їх статі. Розмір та форма аденогіпофіза значною мірою залежать від віку та індивідуальних особливостей організму [2]. Маса і розміри гіпофізів у самок значно перевищують такі ж показники у самців [3, 6]. Максимальний приріст площі гіпофіза спостерігається в період від 90 до 180 діб життєвого циклу щура [6]. Наявність в гіпофізі щурів тонкої сполучнотканинної капсули та порожнини гіпофіза робить цю залозу вразливою під час вилучення органу з ямки турецького сідла, так як існує висока ступінь вірогідності роз'єднання органу на фрагменти та відокремлення аденогіпофіза від нейрогіпофіза. В науковій літературі широко висвітлені питання гістологічної і фізіологічної будови залози як в нормі, так і при дії різноманітних екзо- та ендогенних чинників [6]. Однак, дані про техніку атравматичного вилучення та фіксації залози під час приготування гістологічних препаратів носять фрагментарний характер, або ж зовсім не висвітлюються у наукових роботах [5, 6, 8, 9]. Тому висвітлення інформації про особливості початкових етапів приготування постійних гістологічних препаратів гіпофіза щурів (вилучення органу та фіксація) є, на нашу думку, доцільним та актуальним.

Актуальність проблеми спонукало авторів до пошуку літературних джерел з описом способів вилучення та приготування гістологічних препаратів гіпофіза у мілких лабораторних тварин, в тому числі і щурів. Спеціальних способів атравматичного вилучення, препарування гіпофіза у щурів нами не знайдено. Прототипом розробленого авторами способу є способи ідентифікації та вилучення залоз центральної ендокринної системи у щурів [10], патенти на корисну модель [11, 12] та наукові статті [5]. Однак, наведені способи не гарантують раціонального препарування та атравматичного відділення гіпофіза з гіпофізарної ямки турецького сідла внаслідок того, що у вказаних методиках в першому випадку [11] для видалення гіпофіза використовувалася гостра препарувальна голка, а у другому [5, 12] - спеціальна лопаточка. Дані способи вилучення гіпофіза не гарантують в повній мірі збереження тонкої анатомічної та мікроскопічної будови залози, внаслідок особливостей тонкої анатомічної будови гіпофіза, в тому числі і наяв-

ності тонкої сполучнотканинної капсули у стромі та порожнини гіпофіза у паренхімі органу. Використання спеціальних інструментів, заявлених в раніш розроблених патентах на корисну модель, в багатьох випадках призводить до пошкодження тканин гіпофіза під час виділення органу та в подальшому до появи ряду артефактів при проведенні мікроскопічних, органометричних та морфометричних досліджень. Особливо це актуально, коли експериментальна робота ведеться з патологічно зміненим гіпофізом, внаслідок пухлинних процесів у органі (аденоми гіпофіза) [1, 13, 14], впливу порушень водного балансу організму та впливу негативних чинників зовнішнього середовища [15].

Наступний етап приготуванні гістологічних препаратів включає способи фіксації органу шляхом занурення видаленого гіпофіза у фіксуючий розчин 10 % нейтрального формаліну [5, 16], зневоднення в батареї спиртів, ущільнення парафіном, виготовлення зрізів, забарвлення препаратів гематоксилін-еозином. Недоліком цих способів є неможливість в повній мірі збереження тонкої анатомічної та мікроскопічної будови залози, зайве ущільнення органу в результаті агресивного впливу 10 % нейтрального формаліну. При дослідженні структури гіпофізів піддослідних тварин навіть на органному рівні часто виявляється виразний ефект експериментального впливу. На ці недоліки вказують самі дослідники у наукових роботах [5, 17, 18]. Як наслідок такого негативного впливу на орган, у гістологічних препаратах гіпофіза з'являються артефакти, механізм утворення котрих різних та може бути пов'язаний як з порушенням цілісності органу так і з появою морфологічних картин, трактування котрих може призвести до хибних, помилкових висновків.

Найбільш близьким способом, вибраним як аналог є спосіб видалення гіпофіза у щурів згідно [19] та спосіб приготування гістологічних препаратів з гіпофізу щурів [20]. Спосіб, вибраний за найближчий аналог, включає відокремлення кісткового ложа (поглиблення турецького сідла) разом з гіпофізом від клиноподібної кістки з подальшим вилученням гіпофіза з гіпофізарної ямки турецького сідла [19], зануренням гіпофіза у фіксуючий розчин 5 % розчин формаліну, зневоднення в батареї спиртів, ущільнення парафіном, виготовлення зрізів товщиною 5-7 мкм, забарвлення препаратів гематоксилін-еозином [20]. Але, недоліком цих способів є ймовірність пошкодження тканин гіпофіза під час проведення виділення органу, відсутність рекомендацій щодо використання стандартного медичного інструментарію для розтину черепної коробки, видалення головного мозку та гіпофізу, використання 5% незабуференого розчину нейтрального формаліну для фіксації органу,

що має ряд недоліків, а саме знижується базофілія цитоплазми та ядра, неможливість фіксації кислих білків, а також унеможлиблюється проведення в подальшому імуногістохімічних реакцій [21, 22, 23]. Всі недоліки в комплексі не лише призводять до появи у гістологічних препаратах гіпофіза артефактів, механізм утворення котрих різний та може бути пов'язаний як з порушенням цілісності органу так і появою морфологічних картин, трактування котрих може призвести до хибних, помилкових висновків.

Метою роботи стало розроблення оригінальної методики-техніки що до удосконалення першого (вилучення) та другого (фіксація матеріалу) етапів приготування гістологічних препаратів гіпофізу щурів для проведення морфологічних, морфометричних та імуногістохімічних експериментальних медико-біологічних досліджень.

Матеріали і методи дослідження Розроблення методики проведено на 200 білих статевозрілих щурах різної статі масою 250-300г, віком 7-8 місяців, що були отримані з віварію кафедри морфології медичного інституту Сумського державного університету. Наведена кількість щурів була обумовлена участю тварин у експериментальних біологічних дослідженнях в межах дисертаційної роботи. Щури утримувалися у звичайних умовах віварію, на стандартному питному та харчовому раціоні, з постійною температурою оточуючого середовища 20-22°. У віварії тварини перебували в однакових умовах утримання, харчування, належного догляду та природного освітлення (день/ніч).

Утримання тварин, всі маніпуляції та виведення тварин з експерименту шляхом введення у тіопенталовий наркоз проводилися у відповідності до положень «Загальноетичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001р.), «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985) та закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3477-IV від 21.02.2006 р. Фіксацію залози проводили зниженою концентрацією 5 % розчину забуференого нейтрального формаліну (з додаванням до розчину нейтрального формаліну фосфат-сольового буферу (Phosphate buffered saline (PBS), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl).

Загальний морфологічний аналіз якості гістологічних препаратів проводили за допомогою світлооптичного мікроскопа «Zeiss Primo Star», з об'єктивами x10, x20, x40, біокулярами 7, 10. Фотодокументування отриманих результатів проводили цифровою відеокамерою «axiocam ERC 5S Zeiss».

Опис методики дослідження. Спосіб здійснювали наступним чином: піддослідну тварину виводили з експерименту шляхом введення у тіопенталовий наркоз згідно загальноприйнятих біоетичних норм, зручно фіксували на препаратувальному столику [24] за допомогою спеціальних ременів. Виведення тварин з експерименту та всі маніпуляції, що до вилучення гіпофіза проводилися за допомогою загальнохірургічного, очного та стоматологічного інструментарію: пінцет анатомічний, пінцет хірургічний, скальпель очний, пінцет очний, ножиці прямі загострені, скальпель стоматологічний, ножиці тупокінцеві прямі, гачок хірургічний гострий, ножиці для офтальмологічних операцій (рис. 1).



Рис. 1. Загальнохірургічний, очний та стоматологічний інструментарій, використаний при вилученні епіфіза (нумерація зліва направо): 1. Пінцет анатомічний; 2. Пінцет хірургічний; 3. Скальпель очний; 4. Пінцет очний; 5. Ножиці прямі загострені; 6. Скальпель стоматологічний; 7. Ножиці тупокінцеві прямі; 8. Гачок хірургічний гострий; 9. Ножиці для офтальмологічних операцій. Цифрове фото

Після фіксації щура виводили з експерименту шляхом декапітації за допомогою прямих загострених хірургічних ножиць. Брили голову тварини у ліву руку, а правою рукою, за допомогою пінцета анатомічного та ножиць для офтальмологічних операцій відсепаровували шкіру голови по середній лінії у напрямку від великого потиличного отвору до носа щура. Потім великим та вказівним пальцями лівої руки розсовували краї розрізаної шкіри голови. За допомогою загострених ножиць прямих хірургічних відрізували шийні хребці та потиличну кістку, знімаючи її за допомогою пінцета хірургічного, підбивали браншу тупокінцевих прямих ножиць під дах черепа збоку та відкушували тим'яноскроневі кістки з обох сторін. Кісткові фрагменти склепіння черепа видаляли за допомогою гачка хірургічного гострого, пінцета хірургічного та пінцета очного та оголювали головний мозок. (рис. 2А).

Вилучення головного мозку проводили шляхом відтягування лобових часток кілька ззаду і догори за допомогою пінцета анатомічного. За допомогою скальпеля стоматологічного, скальпеля очного та ножиць для офтальмологічних операцій та пінцета очного перерізували зоровий тракт, підрізували по обидва боки тверду мозкову оболонку, яка покриває мозочок, перерізували обидва зорових нерви, сонні артерії, ніжку придатка мозку, ліворуч і праворуч перерізували мозочковий намет, підтримуючи головний мозок лівою рукою, перерізували черепно-мозкові нерви, спинний мозок в шийному відділі, бічні артерії та вени. За допомогою пінцета анатомічного виймали головний мозок разом з мозочком і довгастим мозком. В гіпофізарній ямці турецького сідла клиноподібної кістки ідентифікували гіпофіз, що покритий мозковою оболонкою. (рис. 2Б).

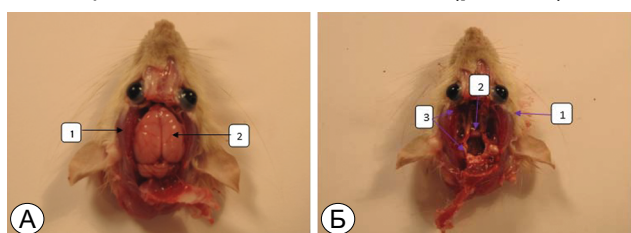


Рис. 2. Голова декапітованого щура:

А – 1 – фрагменти черепної коробки; 2 – оголений головний мозок. Б – 1 – фрагменти черепної коробки; 2 – гіпофіз у гіпофізарній ямці; 3 – клиноподібна кістка черепа. Цифрове фото

За допомогою скальпеля стоматологічного, пінцета анатомічного та ножиць для офтальмологічних операцій виконували надрізи в ділянках клиноподібної кістки черепної коробки, що оточує гіпофізарну ямку з гіпофізом, відступаючи 0,8-0,9 см від неї (рис. 3А). Щоб зняти мозкову оболонку її захоплювали пінцетом очним, що знаходився в лівій руці, підтягуючи догори і назад. За допомогою пінцета очного перетинали листки мозкової оболонки *dura mater encephali* та знімали її з боків гіпофізарної ямки. Гіпофіз вилучався у невідокремленому стані від гіпофізарної ямки турецького сідла клиноподібної кістки, в комплексі розмірами

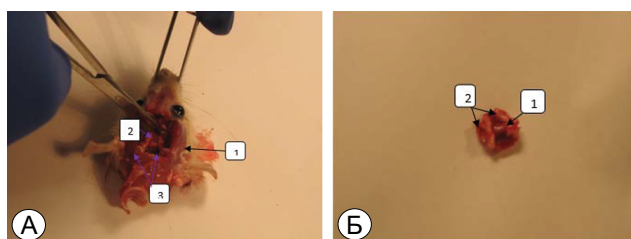


Рис. 3. Видаленням гіпофіза єдиним комплексом (блоком):

А – 1 – фрагменти черепної коробки; 2 – гіпофіз у гіпофізарній ямці; 3 – клиноподібна кістка черепа. Б – 1-гіпофіз у гіпофізарній ямці; 2 – фрагменти клиноподібної кістки черепа. Цифрове фото

1,3x1,0 см разом з прилеглими до нього фрагментами кісткової тканини. (рис. 3Б).

Фіксацію гіпофіза проводили безпосередньо після вилучення комплексу шляхом занурення у 5 % забуферений розчин нейтрального формаліну з рН фіксованим у діапазоні 7,0-7,6, запобігаючи підсиханню речовини залози (рис. 4).

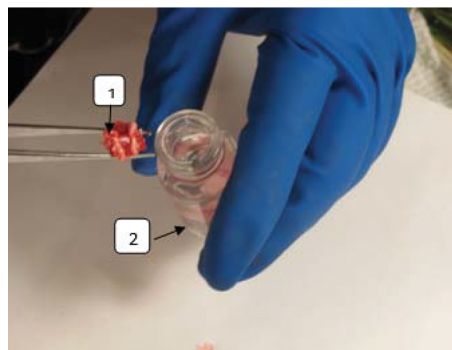


Рис. 4. Занурення комплексу (блоку) гіпофіза з фрагментами клиноподібної кістки у фіксуючий розчин:

А – 1 – комплекс(блок); 2 –фіксуючий розчин – 5 % забуферений нейтральний формалін. Цифрове фото

Нейтральний забуферений розчин формаліну виготовляли шляхом додавання до 100,0 мл 5 % розчину нейтрального формаліну готового фосфат-сольового буферу (Phosphate buffered saline, PBS) у вигляді таблетованої форми - 1 таблетка. Даний фосфатний буфер містить у необхідних співвідношеннях $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ і NaCl . Об'єм фіксуючої рідини перевищував об'єм матеріалу у 10-15 разів. Нейтральний забуферений розчин формаліну швидко проникає в тканини, а потім повільно її фіксує. Формалін особливо добре фіксує маленькі молекули, такі як гормони [23], що особливо важливо при фіксації ендокринної залози-гіпофіза. Використання нейтрального забуференого формаліну зниженої концентрації дозволяє в подальшому, окрім фарбування препаратів гіпофізу гематоксилін-еозином, застосовувати гістохімічні методи дослідження, зокрема імуногістохімічні.

Для поліпшення проникнення в тканини гіпофіза фіксуючої рідини та зменшення часу фіксації матеріалу, через 15-18 годин від початку фіксації комплекс тимчасово вилучався з фіксатора. За допомогою скальпеля очного та пінцета очного вилучали гіпофіз з гіпофізарної ямки турецького сідла. При цьому, орган мав добре зафіксовану та дещо ущільнену капсулу, що запобігає зайвій травматизації та фрагментації органу під час вилучення. (рис. 5).

Після цього вилучений гіпофіз знову занурювали у свіжовиготовлений розчин 5 % нейтрального забуференого формаліну. Час фіксації об'єкта -2-3 години. Після закінчення терміну фіксації гіпофіз мав добре зафіксовану структуру (рис. 6) та підлягав

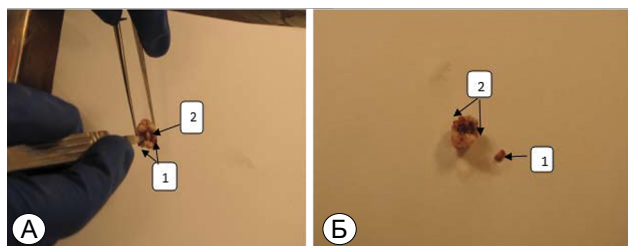


Рис. 5. Видаленням гіпофіза з гіпофізарної ямки турецького сідла:

А – 1 – фрагменти клиноподібної кістки; 2 – гіпофіз у гіпофізарній ямці. Б – 1 – вилучений гіпофіз; 2 – фрагменти клиноподібної кістки черепа з вилученим гіпофізом. Цифрове фото

наступним стандартним етапам виготовлення постійних гістологічних препаратів: промивання, зневоднення в спиртах висхідної концентрації, ущільнення матеріалу парафіном, виготовлення зрізів 3-5мм, забарвлення фарбником, просвітлення та заключення у середовище [21, 22, 25, 26].

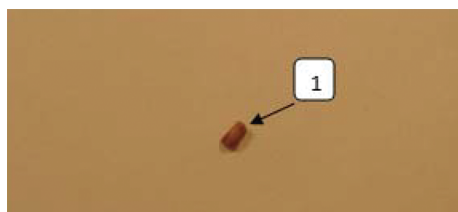


Рис. 6. Гіпофіз щура після фіксації (1). Цифрове фото

Результати дослідження та їх обговорення. На базі кафедри патологічної анатомії та морфології медичного інституту Сумського державного університету проведено близько 200 досліджень гіпофізів експериментальних щурів. При цьому, на мікрофотографіях гіпофізів щурів, що виготовлені за допомогою запропонованої методики та зафарбованих гематоксилін-еозином добре видно збережену цілісність сполучнотканинної капсули, паренхіми залози, збереженою цілісністю між структурними компонентами гіпофіза (**рис. 7**).

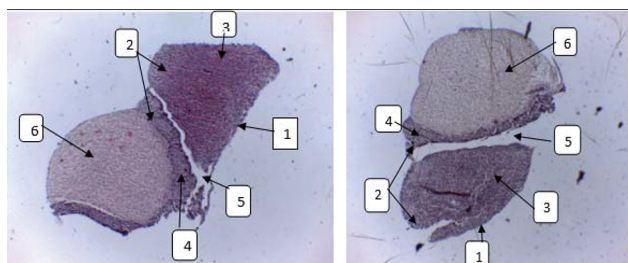


Рис. 7 А, Б. Якісні постійні гістологічні препарати гіпофіза статевозрілих щурів, виготовлених наведеним способом:

1 – капсула; 2 – аденогіпофіз; 3 – дистальна частка аденогіпофіза; 4 – проміжна частка аденогіпофіза; 5 – порожнина гіпофіза; 6 – нейрогіпофіз. Забарвлення гематоксилін-еозин. $\times 40x$

Крім того, препарати гіпофіза, виготовлені згідно запропонованої методики, були успішно використані для проведення імуногістохімічних досліджень, зокрема визначення експресії Hsp90 у гландулоцитах гіпофіза статевозрілого щура під впливом клітинної дегідратації з візуалізацією діамінобензидином (**рис. 8**).

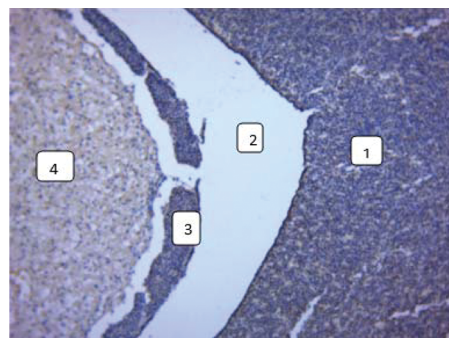


Рис. 8. Імуногістохімічне дослідження експресії Hsp90 у клітинах гіпофіза статевозрілого щура під впливом клітинної дегідратації з візуалізацією діамінобензидином:

1 – аденогіпофіз; 2 – порожнина гіпофіза; 3 – проміжна частка аденогіпофіза; 4 – нейрогіпофіз. ІГХ (Hsp90). $\times 100x$

Висновки. Отже, атравматичне вилучення гіпофізу у невідокремленому стані від гіпофізарної ямки турецького сідла клиноподібної кістки, в комплексі з прилеглими до нього фрагментами кісткової тканини зводить до мінімуму зайву травматизацію та фрагментацію органу. Подальша фіксація комплексу (блоку) відбувалася безпосередньо після вилучення у 5 % розчині забуференого формаліну, з подальшим вилученням залози з гіпофізарної ямки турецького сідла через 15-18 годин від початку фіксації та продовження фіксації гіпофіза ще на протязі 2-3 годин з моменту вилучення з гіпофізарної ямки турецького сідла.

Запропонований спосіб виготовлення гістологічних препаратів гіпофіза щурів дозволив отримати високоякісні гістологічні препарати, без порушень цілісності органу та артефактів, придатні для гістологічних, органомеричних, морфометричних та імуногістохімічних досліджень, що дозволило провести комплексне та різнобічне вивчення морфологічних особливостей залози (стромального, паренхіматозного та судинного компонентів), провести імуногістохімічне дослідження.

Використання наведеного способу зберігає цілісність органу та анатомічний взаємозв'язок між його структурами (аденогіпофізом та нейрогіпофізом), зменшує негативний вплив фіксуємого розчину на залозу шляхом зменшення концентрації фіксатора та його хімічного складу, часу експозиції та поліпшення проникнення фіксатора до досліджуваного матеріалу. Спосіб не вимагає

використання нових пристроїв чи інструментів, може бути виконаний загальнодоступним хірургічним, в тому числі очним та стоматологічним інструментарієм.

Перспективи подальших досліджень базуються на проведенні подальших імуногістохімічних досліджень на препаратах гіпофіза, виготовлених заявленим методом.

References

1. *Adenomy gipofiza: klinika, diagnostyka, likuvannya* [Pituitary adenomas: clinic, diagnosis, treatment]. Ed by BA Kadashev. M: OAO «Yzdatelstvo «Medytsyna»; 2007. 368 s. [Russian]
2. Lutsik OD, Ivanova AY, Kabak KS, Chaykovskiy YuB. *Gistologiya lyudini* [Human histology]. K: Kniga plyus; 2003. 592 s. [Ukrainian]
3. Zapadnyuk YP, Zapadnyuk VY, Zakharyya EA, Zapadnyu EA. *Laboratornye zhyvotnye. Razvedeniye, soderzhaniye, yspolzovaniye v eksperymentе* [Laboratory animals. Breeding, maintenance, use in the experiment]. K: Vyshcha shkola; 1983. 382s. [Russian]
4. Zerbino DD, Bagriy MM, Bodnar YaYa. *Patomorfologiya ta gistologiya (atlas)* [Pathomorphology and histology (atlas)]. Vinnitsya: Nova Kniga; 2016. 799 s. [Ukrainian]
5. Pykalyuk VS, Bessalova EYu. *Vozmozhnosti makro-mykroanatomicheskikh metodov v yssledovaniy gypofyzov belykh kryс* [Possibilities of macro-micro-anatomical methods in the study of the pituitary glands of white rats]. *Ukrayinskyy morfologichnyy almanakh*. 2011; 3(9): 200-202. [Ukrainian]
6. Chumachenko OYu, Redka OG. *Anatomiya gipofiziv shchuriv u vikovomu aspekti v ekologichno nespriyatlivikh umovakh* [Anatomy of rat pituitary glands in the age aspect in ecologically unfavorable conditions]. *Pytannya bioindikatsiyi ta ekologiyi*. 2015; 1(20): 187-193. [Ukrainian]
7. Nozdachev AD, Polyakov EL. *Anatomya kryсy (Laboratornye zhyvotnye)* [Anatomy of a Rat (Laboratory Animals)]. Pod red akademyka AD Nozdacheva. SPb: Izdatelstvo «Lan»; 2001. 464 s. [Russian]
8. Bobrysheva IV. *Osobennosti stroeniya atsidofilnykh endokrinotsitov adenogipofiza kryс posle primeneniya tsiklofosfamidа* [Features of the structure of acidophilic endocrinocytes of the adenohypophysis of rats after the use of cyclophosphamide]. *Vestnik SAFU. Seriya «Mediko-biologicheskie nauki»*. 2016; 3: 59-65. [Russian]
9. Kapytonova MYu, Ulla M, Kuznetsov SL, Khlebnykov VV, Nor-Ashykin MNK, Akhmad A. *Vozrastnaya morfofunktsionalnaya kharakterystyka follykulo-zvezdchatykh kletok gypofyza kryс pry stresse* [Age morphofunctional characteristics of follicle-stellate cells of the pituitary gland of rats under stress]. *Vestnyk RAMN*. 2013; 11: 98–102. [Russian]
10. Kashirina NK. *Metodika identifikatsiyi ta vidilennya organiv endokrinnoyi sekretiі u mishey* [Methods of identification and selection of endocrine secretion organs in mice]. *Byuleten eksperimentalnoyi biologiyi i meditsini*. 1987; 5: 630-631. [Russian]
11. *Patent 81424 Ukraine*, MPK A61B 17/00. *Sposib preparuvannya gipofiza u shchuriv* [The method of preparation of the pituitary gland in rats] / Kashchenko SA, Bobrysheva IV, Tatarenko DP, Bobrysheva AO. (UA); заявник і власник патенту Kashchenko SA, Bobrysheva IV, Tatarenko DP, Bobrysheva AO. (UA). № u201301459; заявл 07.02.13; опубл 25.06.13. Бул № 12. [Ukrainian]
12. *Patent 88650 Ukraine*, MPK A61B 17/00. *Modifikovaniy sposib preparuvannya gipofiza u bilikh laboratornikh shchuriv* [Modified method of pituitary preparation in white laboratory rats] / Smirnov SM, Dubova GA, Dubova YuM, Tatarenko DP. (UA); заявник і власник патенту Smirnov SM, Dubova GA, Dubova YuM, Tatarenko DP. (UA). № u201312254; заявл 21.10.13; опубл 25.03.14. Бул № 6. [Ukrainian]
13. Kalinin PL, Fomichov DV, Kadashev BA. *Metodyka endoskopichnoyi endonazalnoyi transsfenoidalnoyi adenomektomiyi* [Methods of endoscopic endonasal transsphenoidal adenomectomy]. *Pytannya neyrokhirurgiyi*. 2007; 4: 42-45. [Russian]
14. Kalinin PL, Kadashev BA, Fomichov DV, Kutin MA, Astaf'yeva LI. *Khirurgichne likuvannya adenom gipofiza* [Surgical treatment of pituitary adenomas]. *Klinichni rekomendatsiyi*. M; 2014. 3 s. [Russian]
15. **Hryntsova NB**, Khomenko IV, Romanyuk AM, Bumeister VI, Kravtsova IA. *Morphological and morphometric rearrangements of the rat adenohypophysial - thyroid system under the experimental extracellular dehydration*. *The world of medicine and biology*. 2019; 2(68): 178-183. [Ukrainian]
16. Korneykova IP. *Korektsiya strukturnykh zmin gipofiza tvaryn riznogo viku, yaki vynykli za umov gipoosmolyarnoyi gipergidriyi* [Correction of structural changes of the pituitary gland of animals of different ages, which arose under conditions of hypoosmolar hyperhydria]. *Ukrayinskyy morfologichnyy almanakh*. 2012; 4(15): 95-97. [Ukrainian]
17. Bessalova YeYu. *Morfologichni zmini organiv neyroendokrinnoyi sistemi samok ssavtsiv pri parenteralnomu vvedenni ksenogennoyi spinnomozkovoyi ridini* [Morphological changes of organs in the neuroendocrine system and female savts with parenteral introduction of xenogenous spinal cord]. *Naukoviy visnik Uzhgorodskogo universitetu. Seriya «Meditsina»*. 2008; 33: 10-13. [Ukrainian]

18. Fomyna KA. Organometrycheskiye pokazately gypofyza posle dvukhmesyachnogo vozdeystviya spyrtovoy nastoyky ekhynatsey [Organometric parameters of the pituitary gland after two months of exposure to alcoholic tincture of Echinacea] *Visnyk morfologiyi*. 2010; 2(16): 323-326. [Ukrainian]
19. Elizarova ON, Zhidkova LV, Kochetkova TA. *Posobie po toksikologii dlya laborantov* [A guide to toxicology for laboratory assistants]. M: Meditsina; 1974. 157 s. [Russian]
20. Mardar GI, Savchuk GG, Kavare VI, Kiptenko LI, Trybovska SV. Reaktsiya krovi, adenogipofiza ta kory nadnyrnnykiv bilykh shchuriv na ionizuyuche oprominennya i preparat Ersol [The reaction of blood, adenohypophysis and adrenal cortex of white rats to ionizing radiation and the drug Ersol]. *Naukovyy visnyk Chernivetskogo universytetu. Seriya «Biologiya»*. 2000; 77: 210-218. [Ukrainian]
21. Sapozhnikov AG, Dorosevich AE. *Gistologicheskaya i mikroskopicheskaya tekhnika. Rukovodstvo* [Histological and microscopic techniques]. Smolensk: "SAU"; 2000; 475 s. [Russian]
22. Afanasev YuY, Blanchuk VK, Vannykov LL, Donskykh NV. *Osnovy gystologyy y gystologicheskoy tekhniky* [Fundamentals of Histology and Histological Technique]. Pod obshch red VG Elyseeva. M: Medytsyna; 1967. 267 s. [Russian]
23. Kumar GL, Rudbeck L. *Immunogistokhimicheskie metody: Rukovodstvo* [Immunohistochemical Methods: Manual]. M; 2011. 224 s. [Russian]
24. Patent 79002 Ukraine, MPK A61B 17/00. Preparuvalnyy stolyk dlya fiksatsiyi laboratornykh tvaryn [Dissection table for fixing laboratory twins] / Kashchenko SA, Tatarenko DP, Ivanov OS. (UA); zayavnyky i vlasnyky patentu Kashchenko SA, Tatarenko DP, Ivanov OS. (UA). № u201210848; zayavl 17.09.12; opubl 10.04.13. Byul № 7. [Ukrainian]
25. Bagriy MM, Dibrova VA. *Metodiki morfologichnykh doslidzhen* [Methods of morphological research]. Vinnitsya: Nova Kniga; 2016. 295 s. [Ukrainian]
26. Koveshnykov VG Tkachenko OYa, Shevchenko YV. K usovershenstvovanyu metody gystologicheskoy obrabotky melkykh ob'ektov [To improve the technique of histological processing of small objects]. *Ukrayinsky medychnyy almanakh*. 2001; 5(4): 62-64. [Ukrainian]

УДК 611.43:616.432-089-092.9]:615.012

ОРИГИНАЛЬНЫЙ СПОСОБ ИЗЪЯТИЯ И ФИКСАЦИИ ГИПОФИЗА ПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ КАЧЕСТВЕННЫХ ПОСТОЯННЫХ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Гринцова Н. Б., Романюк А. М.

Резюме. Вопрос качественного приготовления гистологических препаратов является актуальным вопросом гистологии и патологической анатомии, экспериментальной медицины и биологии. Гипофиз принадлежит к самым маленьким по массе и размерам эндокринных желез как у человека, так и у животных, является железой внутренней секреции и занимает одно из центральных мест в эндокринной регуляции жизнедеятельности организма. Изучение особенностей изъятия гипофиза с турецкого седла клиновидной кости черепа крыс остается актуальным аспектом современной морфологии.

Целью работы была разработка оригинальной методики-техники по усовершенствованию первого (изъятие) и второго (фиксация материала) этапов приготовления гистологических препаратов гипофиза крыс для проведения морфологических, морфометрических и иммуногистохимических медико-биологических экспериментальных исследований. Разработка методики проведена на 200 белых половозрелых крысах разного пола массой 250-300г в возрасте 7-8 месяцев в соответствии с Национальными и общеевропейскими биоэтическими нормами.

Модификация техники извлечения гипофиза крыс включает введение животного в тиопенталовый наркоз, декапитацию, отсепаиривание кожи и мышечных покровов головы, резекцию участка затылочной кости черепной коробки, обнажение и изъятие головного мозга, идентификацию гипофиза, с последующим удалением гипофиза единым комплексом (блоком) вместе с гипофизарной ямкой турецкого седла и фрагментами прилегающей к ней клиновидной кости. Фиксацию железы проводили пониженной концентрацией 5% раствора забуференного нейтрального формалина. Через 15-18 часов от начала фиксации комплекс временно изымался из фиксатора и с помощью скальпеля глазного и пинцета глазного изымался гипофиз с гипофизарной ямки турецкого седла. Орган имел хорошо зафиксированную и уплотненную капсулу, что предотвращало излишнюю травматизацию и фрагментацию органа во время изъятия. Изъятый гипофиз снова погружали в 5% раствор нейтрального забуференного формалина на 2-3 часа. После окончания срока фиксации гипофиз имел хорошо зафиксированную структуру и подлежал следующим стандартным этапам изготовления постоянных гистологических препаратов.

Ключевые слова: гипофиз, формалин, гипофизарная ямка, препарирование.

UDC 611.43:616.432-089-092.9]:615.012

An Original Method for Removing and Fixing the Pituitary Gland of Sexually Mature Rats for Creating High-Quality Permanent Histological Preparations

Hryntsova N. B., Romanyuk A. M.

Abstract. The issue of high-quality creating histological preparations is an urgent issue of histology and pathological anatomy, experimental medicine and biology. The pituitary gland belongs to the smallest in mass and size of the endocrine glands in both humans and animals, it is an endocrine gland and occupies one of the central places in the endocrine regulation of the body's vital activity. The study of the features of the removal of the pituitary gland from Turkish saddle of the sphenoid bone of the skull of rats remains an important aspect of modern morphology.

The purpose of the work was to develop an original technique for improving the first (removal) and second (material fixation) stages of creating histological preparations of the rat pituitary gland for morphological, morphometric, and immunohistochemical medico-biological experimental studies.

Material and methods. The development of the methodology was carried out on 200 white sexually mature rats of different sex weighing 250-300 g at the age of 7-8 months in accordance with the National and European bioethical standards.

Results and discussion. Modification of the technique of extracting the pituitary gland of rats includes the introduction of the animal into thiopental anesthesia, decapitation, separation of the skin and muscular integument of the head, resection of the occipital bone of the skull, exposure and removal of the brain, identification of the pituitary gland, followed by removal of the pituitary gland with a single complex (block) together with the pituitary fossa Turkish saddle and fragments of the sphenoid bone adjacent to it. The gland was fixed with a reduced concentration of a 5% solution of buffered neutral formalin. After 15-18 hours from the beginning of fixation, the complex was temporarily removed from the fixator, and the pituitary gland was removed from the pituitary fossa of Turkish saddle using eye scalpel and eye forceps. The organ had a well-fixed and compacted capsule, which prevented unnecessary trauma and fragmentation of the organ during removal. The removed pituitary gland was again immersed in a 5% solution of neutral buffered formalin for 2-3 hours. After the end of the fixation period, the pituitary gland had a well-fixed structure and was subject to the following standard stages of making permanent histological specimens.

Keywords: pituitary gland, formalin, pituitary fossa, dissection.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 17.12.2020 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування