



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **108321** (13) **U**  
(51) МПК (2016.01)  
**G01N 21/00**  
**G01N 1/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

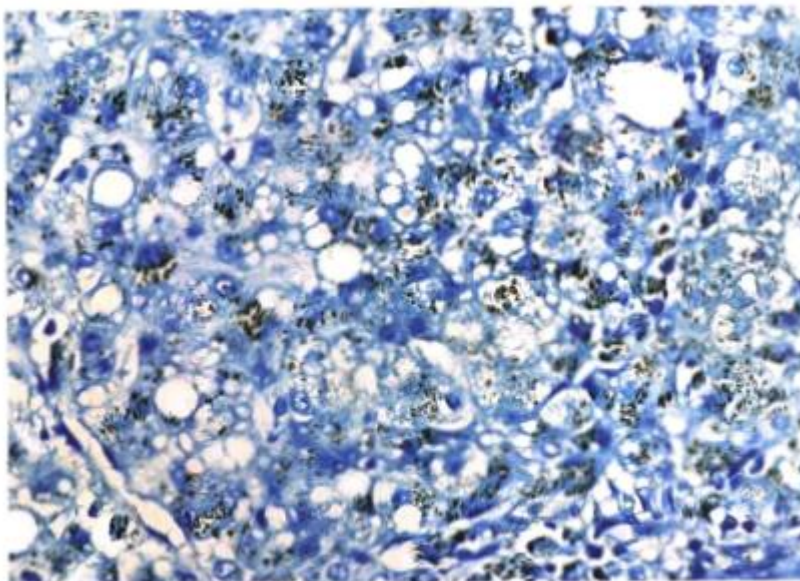
## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	<b>u 2016 00602</b>	(72) Винахідник(и):	<b>Туманський Валерій Олексійович (UA), Фень Сергій Вікторович (UA)</b>
(22) Дата подання заявки:	<b>25.01.2016</b>	(73) Власник(и):	<b>ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ,</b>
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	<b>11.07.2016</b>		<b>пр. Маяковського, 26, м. Запоріжжя, 69035 (UA)</b>
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>11.07.2016, Бюл.№ 13</b>		

## (54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ ДОВОАЛЕНТНОГО ЗАЛІЗА В БІОПСІЙНОМУ МАТЕРІАЛІ

### (57) Реферат:

Спосіб виявлення двовалентного заліза в біопсійному матеріалі шляхом фіксації тканини в 10 % формаліні, забуференому до рН 7,0, основного забарвлення з використанням розчину батофенантроліну у 3 % оцтовій кислоті протягом 2 годин, стабілізації заліза в біоптаті, подальшого дозабарвлення, промивання, висушування та поміщення зрізів. Стабілізацію здійснюють шляхом поміщення біоптату до забарвлення батофенантроліном в окремий 5 % водний розчин L-цистеїну на 20-30 хв. Забарвлення тканини за допомогою батофенантроліну проводять у термостаті при 60 °С протягом 2-3 год., а дофарбовування зрізів проводять водним 0,5 % розчином анілінового синього протягом 20 с. Місця локалізації двовалентного заліза визначають за кольором від блідо-рожевого до цегляно-червоного, залежно від інтенсивності накопичення заліза, а ядра клітин диференціюють за синім кольором.



Фіг. 1

UA 108321 U



Корисна модель належить до медицини, а саме патоморфології, гістохімії та гепатології, і може бути використаною для більш детальної діагностики біопсійного матеріалу паренхіматозних органів при дифузних захворюваннях, пов'язаних з порушенням метаболізму двовалентного ( $\text{Fe}^{2+}$ ) заліза.

Існує декілька гістохімічних методів виявлення двовалентного ( $\text{Fe}^{2+}$ ) заліза в тканинах, в тому числі в печінці, легенях, селезінці, лімфатичних вузлах, кишечнику, але вони нерідко малоінформативні та не завжди ефективні внаслідок недостатньої специфічності реагентів, їх активності тощо, що викликало необхідність удосконалення гістохімічних методів для виявлення двовалентного ( $\text{Fe}^{2+}$ ) заліза у досліджувальному матеріалі.

Найбільш близьким за технічною суттю та результатом, що досягається, є спосіб, який полягає у використанні батофенантроліну (4,7-дифеніл-1,10-фенантролін), запропонований Р.В. Nukill & F.A. Putt (1962) (Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия: [пер. с англ.] / Р. Лилли - М.: Мир, 1969. - С. 375-376). Спосіб полягає у наступному:

1. Тканину фіксують у 10 % формаліні, забуференому до рН 7.0, заливають в парафін і готують зрізи товщиною 5 мк; монтують їх на предметні скельця, депарафінізують і доводять до дистильованої води, як звичайно.

2. Забарвлюють зрізи за допомогою батофенантроліну 2 години. Для приготування основного розчину 100 мг батофенантроліну розчиняють у 100 мл 3 % оцтової кислоти і залишають на ніч при 60 °С, добре струснувши вміст колби на самому початку для рівномірного розподілу осаду в розчиннику. Отриманий розчин зберігають при кімнатній температурі або на холоді (стійкий близько місяця). Для приготування реагенту безпосередньо перед проведенням реакції до 40 мл розчину батофенантроліну додають 0,2 мл тіоглікольової кислоти і суміш добре перемішують. Використаний розчин можна вилити назад в основний, але так як реагент легко окислюється на повітрі, кожного разу потрібно перед використанням додавати все більше і більше тіоглікольової кислоти.

3. Після фарбування зрізи споліскують в дистильованій воді, дофарбовують 3 хв. у 0,5 % водному розчині метиленового синього і промивають у трьох змінах дистильованої води (по 1 хв. у кожній).

4. Промокають, висушують і укладають в пермаунт.

Спільними суттєвими ознаками прототипу і корисної моделі, що заявляється, є такі:

- фіксація тканини в 10 % забуференому формаліні, при рН 7.0,
- основне забарвлення з використанням розчину батофенантроліну з 3 % оцтовою кислотою протягом 2 годин,
- стабілізація заліза в біоптаті,
- подальше дозabarвлення,
- промивання зрізів в дистильованій воді,
- висушування зрізів,
- заключення зрізів в бальзам або полістирол.

Цей спосіб є недостатньо ефективним, тому що у запропонованому авторами способі використовується комплексний розчин батофенантроліну та тіоглікольової кислоти, чим довше використовується розчин батофенантроліну, тим більша кількість додається тіоглікольової кислоти, але це знижує аналітичну ефективність розчину, і перешкоджає більш точному визначенню двовалентного ( $\text{Fe}^{2+}$ ) заліза. Також тіоглікольова кислота утворює з важкими металами (Ag, Cu, Mn, Ni, Co) комплексні забарвлені сполуки, що при мікроскопічному дослідженні матеріалу дає помилковий результат у вигляді додаткових забарвлених гранул. Фарбування тканини за оригінальною методикою в розчині батофенантроліну відбувається при кімнатній температурі, де реакція проходить дуже слабо або зовсім не відбувається, та при патоморфологічному аналізі залізо виявляється в дуже мізерних об'ємах. Дофарбовування тканини 3 хв. автори рекомендують в 0,5 %-му водному розчині метиленового синього, після чого потрібно промивати зрізи в трьох змінах дистильованої води, що в підсумку робить тканину блідою або зовсім її знебарвлює.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу виявлення двовалентного ( $\text{Fe}^{2+}$ ) заліза шляхом введення додаткових етапів та використання інших реактивів, що забезпечить підвищення ефективності та достовірності виявлення двовалентного ( $\text{Fe}^{2+}$ ) заліза в біопсійному матеріалі.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі виявлення двовалентного заліза в біопсійному матеріалі шляхом фіксації тканини в 10 % формаліні, забуференому до рН 7,0, основного забарвлення з використанням розчину батофенантроліну у 3 % оцтовій кислоті протягом 2 годин, стабілізації заліза в біоптаті, подальшого дозabarвлення, промивання, висушування та поміщення зрізів, новим є те, що стабілізацію здійснюють шляхом поміщення

біоптату до забарвлення батофенантроліном в окремий 5 % водний розчин L-цистеїну на 20-30 хвилин, забарвлення тканини за допомогою батофенантроліну проводять у термостаті при 60 °C протягом 2-3 год., а дофарбовування зрізів проводять водним 0,5 % розчином анілінового синього протягом 20 с, та місця локалізації дивалентного (Fe<sup>2+</sup>) заліза визначають за кольором від блідо-рожевого до цегляно-червоного кольору, залежно від інтенсивності накопичення заліза, ядра клітин диференціюють за синім кольором.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються, та технічним результатом полягає у наступному.

Заміна тіоглікольної кислоти на L-цистеїн дозволяє більшою мірою виявити депозити дивалентного (Fe<sup>2+</sup>) заліза в тканині без супутніх металів та зберегти гістологічну структуру клітин.

Приготування двох окремих розчинів L-цистеїну та батофенантроліну без їхнього змішування зберігає реактиви в чистому вигляді, не погіршуючи аналітичний ефект, гістологічні зрізи занурюють спочатку в окремий розчин L-цистеїну, який не змішують з батофенантроліном, що більшою мірою підвищує ефективність виявлення дивалентного (Fe<sup>2+</sup>) заліза, не окислюючи його в тканині, та стабілізує валентність (II) заліза завдяки (-SH) групі цистеїну.

Виявлення дивалентного (Fe<sup>2+</sup>) заліза в розчині батофенантроліну відбувається в термостаті при температурі 60 °C, що підвищує аналітичну ефективність реактиву.

Для дофарбовування зрізів використовують 0,5 %-й водний розчин анілінового синього, що більш ефективно візуалізує тканину при патогістологічному дослідженні та зменшує час фарбування з 3 хв. до 20 с.

Пропонований спосіб пояснюється мікрофотографіями, де на фіг. 1 зображено класичний метод Хьюкіла-Пута, а на фіг. 2 - модифікований метод Хьюкіла-Пута.

Таким чином, сукупність вищезазначених позитивних впливів дозволить підвищити ефективність та специфічність способу.

Спосіб здійснюють таким чином:

1. Тканину фіксують у 10 % забуференому формаліні рН 7,0, заливають в парафін і готують зрізи товщиною 4 мкм, монтують на предметні скельця, депарафінізують і доводять до дистильованої води.

2. Після дистильованої води зрізи поміщають в 5 % водний розчин L-цистеїну на 20-30 хвилин.

3. Після цього зрізи переносять у розчин батофенантроліну на 2-3 години в термостат при температурі 60 °C, до появи рожевого кольору тканини (робочий розчин батофенантроліну готують за відомим способом - P.B. Hukill & F.A. Putt (1962)) таким чином: (100 мг батофенантроліну розчиняють у 100 мл 3 % оцтової кислоти і залишають на 24 години в термостаті при температурі 60 °C, добре струснвши вміст колби на самому початку для рівномірного розподілу осаду в розчиннику).

4. Після фарбування зрізи необхідно промити в одній зміні дистильованої води 30 с, потім їх дофарбовують 20 с в 0,5 %-му водному розчині анілінового синього і промивають в двох змінах дистильованої води по 1 хв. у кожній (комплекс металу з батофенантроліном  $[\text{Fe}(\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_2)_3]^{2+}$  легко розчинний в спиртах та більшості рідин, що розчиняють ліпіди (ксилол, толуол та ін.), але не розчинний у воді).

5. Зрізи висушують (в термостаті 60 °C, без застосування фільтрувального паперу, контакт тканини з фільтрувальним папером змінює забарвлення дивалентного заліза з червоного на чорний) і укладають в бальзам або полістирол.

Результат: місця локалізації дивалентного (Fe<sup>2+</sup>) заліза забарвлюються від блідо-рожевого до цегляно-червоного кольору, залежно від інтенсивності накопичення заліза, ядра забарвлюються в синій колір.

## ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб виявлення дивалентного заліза в біопсійному матеріалі шляхом фіксації тканини в 10 % формаліні, забуференому до рН 7,0, основного забарвлення з використанням розчину батофенантроліну у 3 % оцтовій кислоті протягом 2 годин, стабілізації заліза в біоптаті, подальшого дозбарвлення, промивання, висушування та поміщення зрізів, який **відрізняється** тим, що стабілізацію здійснюють шляхом поміщення біоптату до забарвлення батофенантроліном в окремий 5 % водний розчин L-цистеїну на 20-30 хвилин, забарвлення тканини за допомогою батофенантроліну проводять у термостаті при 60 °C протягом 2-3 годин, а дофарбовування зрізів проводять водним 0,5 % розчином анілінового синього протягом 20 с, та місця локалізації дивалентного заліза визначають за кольором від блідо-рожевого до

цегляно-червоного, залежно від інтенсивності накопичення заліза, а ядра клітин диференціюють за синім кольором.

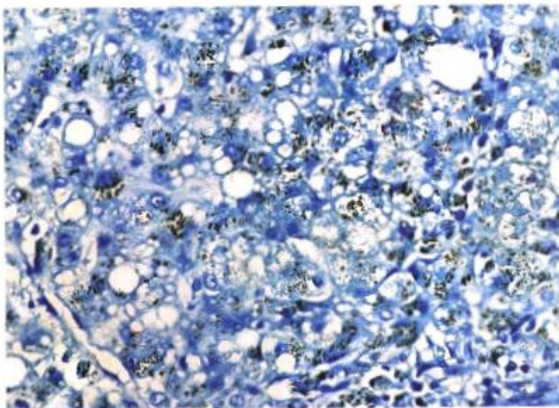


Fig. 1

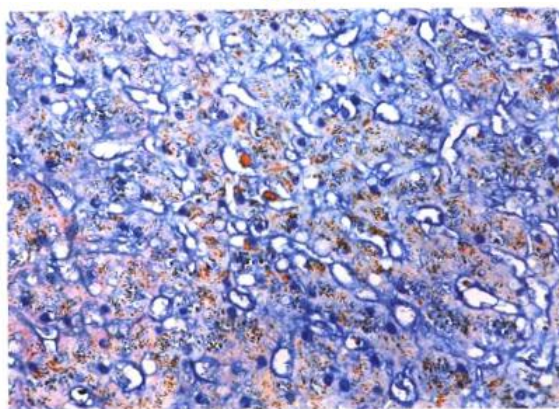


Fig. 2

---

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

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