



УКРАЇНА

(19) UA (11) 67176 (13) U
(51) МПК (2012.01)
G01N 33/00ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ ЛУЖНОЇ ФОСФОМОНОЕСТЕРАЗИ (ЛУЖНОЇ ФОСФАТАЗИ-ЛФ)

1

2

(21) u201107328

(22) 10.06.2011

(24) 10.02.2012

(46) 10.02.2012, Бюл. № 3, 2012 р.

(72) ЩЕТИНСЬКИЙ ІГОР МИХАЙЛОВИЧ, ЗАХАР'ЄВ АНДРІЙ ВІКТОРОВИЧ, УЛЬЯНИЦЬКА АНАСТАСІЯ ЮРІЇВНА

(73) ХАРКІВСЬКА ДЕРЖАВНА ЗООВЕТЕРИНАРНА АКАДЕМІЯ

(57) Спосіб виявлення лужної фосфомоноестерази (лужної фосфатази - ЛФ), який включає метод Гоморі-Такамачу, який відрізняється тим, що у складі інкубаційного середовища використовують барбітурат, фармакопейний препарат - "тіопентал-натрій".

Корисна модель належить до патогістології, що застосовується при патоморфологічних дослідженнях у ветеринарній медицині, а саме до гістохімії лужної фосфомоноестерази (лужної фосфатази - ЛФ).

Лужна фосфомоноестераза каталізує реакції трансформування, приймає участь у багатьох видах обміну: нуклеїнових кислот, білків, ліпідів, вуглеводів [1, 3], за її допомогою здійснюється реакція:

$$\text{Моноєфір ортофосфату} + \text{H}_2\text{O} = \text{спирт} + \text{H}_3\text{PO}_4$$

У нирках і печінці ЛФ є своєрідним показником нормальності їх будови і функції [1]. У нирці висока активність лужної фосфатази виявляється в облямівці клітин, що вистеляють просвіт проксимального відділу канальців нефрону, які приймають участь у всмоктуванні макромолекул із первинної сечі [1, 3]. У печінці активність лужної фосфатази значно підвищується при холестазі. Збільшення синтезу ЛФ гепатоцитами пов'язано з підвищенням активності ЛФ пов'язано також з підвищенням виділенням ЛФ в синусоїди з плазматичних мембран гепатоцитів [1].

Існує кілька гістохімічних способів виявлення лужної фосфатази, один з яких - метод Гоморі-Такамачу, вважається одним з найкращих і може бути прототипом корисної моделі. При його застосуванні втрачається найменша кількість ферменту, що визначається.

Але у зв'язку з тим, що при цьому методі у складі інкубаційного середовища, використовується веронал або мединал, цей спосіб не може широко використовуватися, як раніше, оскільки доступ до мединалу і вероналу нині є обмеженим. Останнє зумовлено тим, що ці барбітурати (похідні

барбітурової кислоти) належать до сильнодіючих токсичних речовин (список А).

У складі інкубаційного середовища мединал або веронал використовується як буфер для забезпечення слабо лужних показників рН. Водні розчини цих барбітуратів мають рН 9,0-10,0 [4]. Склад інкубаційного середовища у стандартному методі Гоморі-Такамачу [2,5]: 0,6 г гліцерофосфату (β-, або суміші β-+ α-) натрію, 1 г хлориду кальцію, 0,5 г вероналу (або мединалу), 100 мл дистильованої води, 0,5 мл хлориду магнію. Крім того для проведення реакції потрібні 1-2 % розчин хлориду кальцію, 2 % розчин нітрату кобальту, або хлориду кобальту, 0,5-1 % сульфиду амонію.

Тому задачею корисної моделі, що пропонується, є розробка способу виявлення фермента лужної фосфомоноестерази (лужної фосфатази - ЛФ), який дозволить використовувати більш доступний для ветеринарної медицини реактив.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі виявлення лужної фосфомоноестерази (лужної фосфатази - ЛФ), який включає метод Гоморі-Такамачу, згідно з корисною моделлю, у складі інкубаційного середовища замість вероналу (мединалу) використовують інший барбітурат, фармакопейний препарат - «тіопентал-натрій».

Водні розчини «тіопенталу-натрію» мають рН біля 10,0 [4], як і водні розчини барбітуратів, які застосовуються у оригінальному методі Гоморі-Такамачу. Склад інкубаційного середовища у модифікованому вигляді наступний: 0,6 г гліцерофосфату (β-, або суміші β-+ α-) натрію, 1 г хлориду кальцію, 0,5 г тіопенталу-натрію, 100 мл дистильованої води, 0,5 мл хлориду магнію.

Приклад конкретного виконання.

Порядок постановки реакції з виявлення у гістопрепаратах ЛФ з використанням оригінального

(19) UA (11) 67176 (13) U

пропису інкубаційного середовища і прописом у запропонованій модифікації не відрізняється від рекомендованого у оригінальному методі за Гоморі-Такамачу і здійснюється наступним чином:

1. Фіксовані у холодному 10 % розчині нейтрального формаліну, або у етанолі, або в ацетоні шматочки тканини товщиною 2-3 мм використовують для виготовлення парафінових блоків з подальшим отриманням парафінових зрізів, або ущільнюють шляхом підморожування з отриманням заморожених зрізів.

2. Отримані у будь-який з наведених способів зрізи доводять до води.

3. Поміщують зрізи в інкубаційне середовище на 1-6 годин при температурі 37 °C.

4. Сполоскують зрізи у розчині хлориду кальцію протягом 1-2 хвилин.

5. Промивають зрізи у 2 % розчині нітрату кобальту протягом 5 хвилин.

6. Промивають у чотирьох порціях дистильованої води.

7. Переносять у 0,5 % розчин сульфиду амонію.

8. Промивають у проточній воді протягом 10 хвилин.

9. Зневоднюють у спиртах, просвітлюють у ксилолі, заключають у полістирол.

Результат реакції: місця локалізації ферменту визначаються за темно-коричневими осадами сульфиду кобальту.

Для постановки гістохімічного контролю використовують інкубаційне середовище, з якого вилучено гліцерофосфат натрію у складі: 1 г хлориду кальцію, 0,5 г тіопенталу-натрію, 100 мл дистильованої води, 0,5 мл хлориду магнію. Порядок постановки реакції контролю не відрізняється від вищенаведеного. При цьому у результаті реакції темно-коричневі осадки сульфиду кобальту в місцях локалізації ферменту не з'являються.

Таким чином, запропонований спосіб виявлення лужної фосфомоноестерази (лужної фосфатази - ЛФ) дозволить використовувати для приготування інкубаційної суміші за методом Гоморі-Такамачу доступний для ветеринарної медицини фармакопейний препарат «тіопентал-натрій» замість недоступного вероналу (мединалу).

Джерела інформації.

1. Агеев А. К. Гистохимия щелочной и кислой фосфатаз человека в норме и патологии / А. К. Агеев. - Ленинград: Медицина, ленинградское отделение, 1969. - 142 с.

2. Кононский А. И. Гистохимия / А. И. Кононский - К.: Вища школа, 1976. - 280 с.

3. Мари Р. Биохимия человека / [Мари Р., Греннер Д., Мейес П. и др.]; пер. с англ. - М.: Мир, 2004. - Т. 1. - 381 с.

4. Машковский М. Д. Лекарственные средства / М. Д. Машковский. - [12-е изд., перераб. и доп.]. - М.: Медицина, 1994. - Ч. 1. - С. 20-31.

5. Пирс Э. Гистохимия / Э. Пирс. - М.: издательство иностранной литературы, 1962. - 962 с.