



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **57367** (13) **U**  
(51) МПК (2011.01)  
G01N 33/50

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

### (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЦИНКУ В КЛІТИНАХ ТКАНИН ОРГАНІЗМУ

1

(21) u201009284

(22) 23.07.2010

(24) 25.02.2011

(46) 25.02.2011, Бюл.№ 4, 2011 р.

(72) ЄЩЕНКО ЮЛІЯ ВІТАЛІЙВНА

(73) ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД  
"ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ"  
МІНІСТЕРСТВА ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

(57) Спосіб визначення цинку в клітинах тканин організму, що включає фіксацію шматочків тканини в холодному 70° спирті, насиченому сірководнем, проведення їх через спирти зростаючої міцності, ксилоли, суміш ксилолу та парафіну, замикання у

2

парафін, готування зрізів, їх забарвлення розчином 8-(п-толуолсульфоніламіно)-хіноліну (8-ТСХ), промивання гарячим розчином їдкого натру, підсушування на повітрі, замикання в гліцерин та дослідження зрізів під люмінесцентним мікроскопом, визначення цинку за жовто-зеленим світінням гранул у клітинах, який **відрізняється** тим, що забарвлення зрізів виконують спиртовим розчином 8-ТСХ, а промивання їх - 0,1н гарячим розчином їдкого натру, вимірюють інтенсивність люмінесцентної реакції за допомогою мікрофлуориметра, визначають кількість цинку в клітинах за допомогою калібрувальної кривої.

Спосіб відноситься до лабораторних методів дослідження та стосується методів цитохімічного визначення цинку.

Відомий спосіб цитохімічного визначення цинку (Лилли Р. Цитогистологическая техника и практическая гистохимия. М. Мир, 1969. -с.528, С.416-417.), в якому шматочки тканини організму фіксують у 100% спирті, проводять через ксилоли та замикають у парафін, готують зрізи, депарафінують їх у ксилолі, підсушують на повітрі, та забарвлюють сумішшю, яка містить 24мл ацетонового розчину дитизону та 18 мл дистильованої води, 5,8 мл комплексуючого буфера, який готують розчиненням у 100 мл дистильованої води 55 г тіосульфату натрію, 9 г ацетату натрію та 1 г ціаністого калію, забарвлені зрізи промивають дистильованою водою та замикають у гліцерин, досліджують під світловим мікроскопом, на препаратах цинк виявляють у клітинах за червоним забарвленням гранул.

Однак цей спосіб не дозволяє отримувати стабільні та добре порівняльні результати, тому не може бути використаний для кількісного визначення цинку в клітинах. Іншим недоліком цього способу є використання отруйної речовини - ціаністого калію.

Спільними з рішенням, що заявляється, ознаками, є: фіксація шматочків тканини у спирті, проведення їх через ксилоли, замикання у парафін, готування зрізів, їх забарвлення хелантом-хромомформом, промивання дистильованою водою, замикання в гліцерин та мікроскопування, визна-

чення цинку за червоним забарвленням гранул у клітинах.

Відомий також спосіб цитохімічного визначення цинку (Єщенко Ю.В. Вісник Запорізького національного університету. - 2009.- №1. - С.77-79), прийнятий як прототип. Шматочки тканини фіксують протягом 4 годин у холодному 70° спирті, насиченому сірководнем; зневоднюють їх у спиртах зростаючої міцності (80°, 90°, 96°, 100° - по 4 год. у кожному); проводять їх через 2 ксилоли - по 15 хв. у кожному, суміш 50% ксилолу та 50% парафіну - 30 хв. при 40°, два рідкі парафіни - по 1,5 год. у кожному при 56 °С та замикають у парафін; готують зрізи; депарафінують їх у 2 ксилолах, та 2 спиртах - по 3 хв. у кожному, забарвлюють зрізи впродовж 3 хв. 0,1% ацетоновим розчином 8-(п-толуолсульфоніламіно)-хіноліну (8-ТСХ), промивають гарячим 0,1 % розчином їдкого натру, підсушують на повітрі, досліджують під люмінесцентним мікроскопом (світлофільтри ФС- 1, ЖС-18), на препаратах цинк визначають у клітинах за жовто-зеленим світінням гранул.

Цей спосіб не дозволяє проводити кількісне визначення цинку в клітинах.

Спільними з найближчим аналогом ознаками є: фіксація шматочків тканини в холодному 70° спирті, насиченому сірководнем, проведення їх через спирти зростаючої міцності, ксилоли, суміш 50% ксилолу та 50% парафіну, замикання в парафін, готування зрізів, їх забарвлення розчином 8-ТСХ, промивання гарячим розчином їдкого натру, підсушування на повітрі, замикання в гліцерин, та

(19) **UA** (11) **57367** (13) **U**

дослідження зрізів під люмінесцентним мікроскопом, визначення цинку за жовто-зеленим світінням гранул у клітинах.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб визначення цинку в клітинах тканин організму, який шляхом забарвлення зрізів спиртовим розчином 8-(п-толуолсульфоніламіно)-хіноліну (8-ТСХ) та дослідження інтенсивності люмінесцентної реакції за допомогою мікрофлуориметра з використанням калібрувальної кривої дозволяє отримувати стабільні і порівняльні результати, проводити кількісне визначення цинку в клітинах.

Суттєвими ознаками способу, що заявляється, є:

- фіксація шматочків тканини у 70° холодному спирті, насиченому сірководнем;
- проведення шматочків через спирти зростаючої міцності, 2 ксилоли, суміш 50% ксилолу та 50% парафіну, 2 рідкі парафіни;
- замикання шматочків у парафін;
- приготування зрізів;
- депарафінування їх;
- забарвлення зрізів 0,1% спиртовим розчином 8-ТСХ;

- промивання 0,1 н гарячим розчином їдкого натру;

- висушування зрізів на повітрі;
- замикання у гліцерин;
- визначення цинку за жовто-зеленим світінням гранул у клітинах та вимірювання інтенсивності люмінесцентної реакції 8-ТСХ за допомогою мікрофлуориметра (світлофільтри ФС-1, ЖС-18);
- кількісне визначення цинку в клітинах за допомогою калібрувальної кривої, яка відображає залежність інтенсивності люмінесцентної реакції від вмісту цинку в стандартних розчинах 8-ТСХ.

Відмінними від найближчого аналогу ознаками способу, що заявляється, є:

- забарвлення зрізів 0,1 % спиртовим розчином 8-ТСХ;
- промивання їх 0,1 н гарячим розчином їдкого натру;

- вимірювання інтенсивності люмінесцентної реакції 8-ТСХ за допомогою мікрофлуориметра;

- кількісне визначення цинку в клітинах за допомогою калібрувальної кривої яка відображає залежність інтенсивності люмінесцентної реакції від вмісту цинку в стандартних розчинах 8-ТСХ.

Спосіб здійснюють таким чином: шматочки тканини фіксують упродовж 4 год. у холодному 70° спирті, насиченому сірководнем; проводять їх через спирти зростаючої міцності (80°, 90°, 96°, 100° - по 4 год. у кожному), через два ксилоли (по 15 хв. у кожному), суміш 50% ксилолу та 50% парафіну - 30хв. при 40 °С, два рідкі парафіни - по 1,5 год. у кожному при 56 °С; замикають у парафін. Готують зрізи 5мм завтовшки, депарафінують їх обробкою 2 ксилолами та 2 спиртами по 3 хв. у кожному, забарвлюють протягом 3 хв. 0,1% спиртовим розчином 8-ТСХ, промивають 0,1 н розчином їдкого натру, підсушують зрізи на повітрі, замикають у гліцерин та визначають цинк за жовто-зеленим світінням гранул клітин, вимірюють інтенсивність люмінесцентної реакції 8-ТСХ за допомогою мік-

рофлуориметра (світлофільтри ФС-1, ЖС-18), визначають кількість цинку в клітинах за допомогою калібрувальної кривої, яка відображає залежність інтенсивності люмінесцентної реакції від вмісту цинку в стандартних розчинах 8-ТСХ.

Для побудови калібрувальної кривої спочатку готують основний розчин, для чого змішують 0,43г сірчаноокислого цинку, 91мл 1% ацетонового розчину 8-ТСХ, 1л дистильованої води, отриману суміш фільтрують через беззольний фільтр, осад підсушують до постійної ваги, 100 мг його розчиняють у 100 мл ацетону, отриманий основний розчин містить в 1 мл (0,8 г) 100 мкг цинку;

Стандартні розчини для мікрофлуориметрії готують розбавленням ацетоном основного розчину, так щоб у 1 мл містилося 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 мкг/мл цинку.

На основі даних інтенсивності люмінесцентної реакції в клітинах на калібрувальній кривій визначають відповідне значення вмісту цинку.

Саме поєднання забарвлення клітин, що містять цинк, 0,1% спиртовим розчином 8-ТСХ, з їх промиванням гарячим 0,1н розчином їдкого натру та дослідження зрізів за допомогою мікрофлуориметра з використанням калібрувальної кривої дозволяє проводити кількісне визначення вмісту цинку в клітинах.

Приклад 1.

Шматочки підшлункової залози контрольних (інтактних) кролів фіксували впродовж 4 год. у 70° холодному спирті, насиченому сірководнем; проводили через спирти зростаючої міцності (80°, 90°, 96°, 100° - по 4 год. у кожному), через два ксилоли - по 15 хв. у кожному, суміш 50 % ксилолу та 50 % парафіну - впродовж 30 хв. при 40°С, два рідкі парафіни - по 1,5 год. У кожному при 56 °С; замикали у парафін. Готували зрізи 5мм завтовшки, депарафінували зрізи обробкою 2 ксилолами та 2 спиртами по 3 хв. у кожному, забарвлювали їх упродовж 3 хв. 0, 1% спиртовим розчином 8-ТСХ, промивали 0,1н гарячим розчином їдкого натру, підсушували зрізи на повітрі, замикали в гліцерин та визначали цинк за жовто-зеленим світінням гранул клітин, вимірювали інтенсивність люмінесцентної реакції 8-ТСХ за допомогою мікрофлуориметра (світлофільтри ФС-1, ЖС-18), визначали кількість цинку в клітинах підшлункової залози за допомогою калібрувальної кривої, яка відображала залежність інтенсивності люмінесцентної реакції від вмісту цинку в стандартних розчинах 8-ТСХ.

У контрольних (інтактних) кролів вміст цинку у В-інсулоцитах складав  $90 \pm 6,2$  мкг/г.

Приклад 2. У кролів, які голодували впродовж двох діб, досліджували підшлункову залозу за прикладом 1.

Вміст цинку у В-інсулоцитах був підвищений на 34% порівняно з контролем ( $121 \pm 10,3$  мкг/г,  $P < 0,001$ ).

Приклад 3. Через 2 год. після введення кролям внутрішньовенно 10г/кг глюкози витягали підшлункову залозу та досліджували її як у прикладі 1.

Вміст цинку у В-інсулоцитах був знижений на 31% порівняно з контролем ( $62 \pm 5,4$  мкг/г,  $P < 0,05$ ).

Приклад 4. Дослідження проводили аналогічно прикладу 1.

У контрольних (інтактних) щурів вміст цинку складав:

50±3,8 мкг/г у нейронах гіпокампу;

21±1,7 мкг/г у гіпоталамусі;

27±1,8 мкг/г у кортикотрофах гіпофізу;

11±0,8 мкг/г у клітинах пучкової зони наднирників.

Таким чином, спосіб, що заявляється, дозволяє здійснювати кількісне визначення вмісту цинку в клітинах різних органів. Спосіб має високу чутливість.