



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **66996** (13) **U**
(51) **МПК**
G01N 33/15 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ЯКІСНОГО МІКРОГІСТОХІМІЧНОГО ВИЯВЛЕННЯ ПІРОЛІВ І ПІРОЛОВМІСНИХ СПОЛУК ПРИ ОТРУЄННІ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ПІРОЛІЗИДИНОВИМИ АЛКАЛОЇДАМИ

1

2

(21) u201108839

(22) 14.07.2011

(24) 25.01.2012

(46) 25.01.2012, Бюл.№ 2, 2012 р.

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

(73) ХАРКІВСЬКА ДЕРЖАВНА ЗООВЕТЕРИНАРНА АКАДЕМІЯ

(57) Спосіб якісного мікрогістохімічного виявлення піролів і піроловмісних сполук при отруєнні великої

рогатої худоби піролізидиновими алкалоїдами, який **відрізняється** тим, що їх пошук проводять безпосередньо у гістологічних зрізах, отриманих з нефіксованого матеріалу після ущільнення зразків підморожуванням, шляхом постановки якісних аналітичних реакцій з солянокислим розчином п-диметиламінобензальдегіду з окисом селену у водному розчині, з ізатином, і реакції з хлоридом ртуті(II), що дозволяє знайти зв'язок між гістопатологією і патогеном, що викликає ці патології.

Корисна модель належить до ветеринарної медицини, а саме до способів виявлення піролу і піроловмісних сполук на патогістологічному рівні у фрагментах печінки, нирок і інших органів від великої рогатої худоби, у якої мало місце смертельне отруєння піролізидиновими алкалоїдами чорнокореня лікарського і жовтозілля лучного.

Зазначений спосіб виявлення може бути застосований при проведенні патоморфологічної діагностики і при вирішенні деяких недостатньо ясних нині питань патогенезу отруєнь тварин піролізидиновими алкалоїдами.

Нині встановлені два принципово важливих положення відносно токсикокінетики піролізидинових алкалоїдів [2].

За першим з цих положень, піролізидинові алкалоїди, що містяться у рослинах, які їх продукують, є водорозчинними, зв'язаними з органічними кислотами сполуками, вони не становлять небезпеки для організму.

За другим положенням небезпечними для організму піролізидинові алкалоїди стають, коли вони досягають печінки і починають знешкоджуватися у гепатоцитах. Вважається, що частина з них у цитозолі, у лізосомах, пероксисомах і мітохондріях піддається гідрокислюванню (окисленню, відновленню і гідролізу), інша частина може перетворюватися у продукти "летального синтезу" [2,3].

Продукти "летального синтезу" - це піролізидинові алкалоїди, що не повністю піддалися процесу знешкодження, такими речовинами можуть бути піролізидин, піролідин, піроловмісні сполуки і сам пірол. Ці продукти знешкоджуються іншим шляхом - за участю вільних радикалів. Однак, вільні радикали не тільки знешкоджують патогени, що потрапили в клітини, але і порушують цілісність мембран клітин. У результаті цього руйнування фрагменти мембран стають вторинними вільними радикалами, вони перетворюються на альдегіди, діальдегіди, кетони та ін.

Піроли і піроловмісні сполуки добре і відносно просто виявляються за допомогою аналітичних реакцій на піроли [1,4], якщо вони знаходяться у рідких субстратах. Цими реакціями є: реакція з солянокислим розчином п-диметиламінобензальдегіду (червоне офарблення), реакція з SeO_2 у водному розчині (фіолетове офарблення), реакція з ізатином (сине офарблення), реакція з HgCl_2 (утворення осаду білого кольору). Зазначені аналітичні реакції до сьогодні не використовувалися для виявлення піролів у тканинах тварин. Відомі нині патогістологічний і патогістохімічний аналізи не мають способу виявлення піролу і піроловмісних сполук. Це є певним недоліком патоморфологічної діагностики отруєнь піролізидиновими алкалоїдами.

(19) **UA** (11) **66996** (13) **U**

Задачею корисної моделі є розробка методу пошуку піролу та його сполук, в гістологічних зрізах на основі використання тих хімічних визначень, що застосовуються в якісних аналітичних реакціях на піроли.

Поставлена задача вирішується тим, що для якісного мікрогістохімічного виявлення піролів і піроловмісних сполук при проведенні патоморфологічних досліджень, згідно з корисною моделлю, їх пошук проводять безпосередньо у гістологічних зрізах, отриманих з нефіксованого матеріалу після ущільнення зразків підморожуванням, шляхом постановки якісних аналітичних реакцій з солянокислим розчином *n*-диметиламінобензальдегіду, з окисом селену у водному розчині, з ізатином, і реакції з хлоридом ртуті(II), що дозволяє знайти зв'язок між гістопатологією і патогеном, що викликає ці патології.

У серії дослідів (матеріалом були фрагменти печінки і інших органів від трупів тварин, що загинули у результаті гострих і хронічних отруєнь піролізидиновими алкалоїдами чорнокореня лікарського і жовтозілля лучного): 1) проводилось патогістологічне дослідження змін, що властиві для цих отруєнь і 2) проводився пошук піролу і піроловмісних сполук у якісних аналітичних реакціях на паралельно отриманих гістологічних зрізах.

У результаті проведених досліджень було визначено, що у випадку важких форм отруєння піролізидиновими алкалоїдами у печінці виявляються піроли і піроловмісні сполуки, які офарблювалися в вище зазначених аналітичних реакціях.

Приклад конкретного виконання

Обов'язковою умовою отримання об'єктивного результату при постановці реакцій на піроли на патогістологічному рівні є, по-перше, отримання зрізу з нативного, нефіксованого матеріалу, а по-друге, матеріал слід ущільнювати тільки шляхом його підморожування.

Для виконання цих умов висічений з органів матеріал - плівка товщиною не більше 0,5 см. вкладається на заморожувачий столик ТОС-2 з селенітовим вирівнювачем струму і з відведенням тепла за рахунок проведення через столик водопровідної води, для досягнення глибокого і повного підморожування краще через столик пропускати воду за допомогою ультратермостата, у ємність якого додають лід.

Різання здійснюється на санному мікротомі - столик монтується на місці його препаратотримувального пристрою, у вільну гільзу цього пристрою поміщується шток заморожувача столика.

Для постановки реакції отриманий зріз переноситься на предметне скельце, після цього на сам зріз за допомогою очної піпетки наносять відповідні реактанти, їх надлишок видаляють піпеткою або фільтрувальним папером.

Для мікроскопії оброблених зрізів використовують мікроскоп з малим збільшення, або МБС-2.

Порядок постановки реакції:

1. Висікання матеріалу;
2. Підморожування;
3. Різання;

4. Перенесення зрізу одразу після його отримання на предметне скельце;

5. Постановлення реакції:

5.13 реактивом Ерліха (з *n*-диметиламінобензальдегідом).

Реактив готують шляхом розчинення 0,5 г *n*-диметиламінобензальдегіду у 75 мл розбавленої соляної кислоти.

Постановка реакції: а) на отриманий заморожений зріз наносять краплину 96° етилового спирту, надлишок спирту випаровується або видаляється фільтрувальним папером; б) на зріз наносять 1-2 краплини реактиву Ерліха.

Результат реакції: пірол і піроловмісні сполуки дають у препаратах червоне офарблення.

5.2 Реакція з окисом селену.

Робочі розчини: а) 1,0 г окису селену розчиняють у 10 мл дистильованої води, б) концентрована азотна кислота.

Постановка реакції: а) на отриманий заморожений зріз наносять краплину 96° етилового спирту, надлишок спирту випаровується або видаляється фільтрувальним папером; б) на зріз наносять 3-4 краплини розчину окису селену і 1 краплину концентрованої азотної кислоти; в) предметне скельце на якому ставиться реакція підігрівається до відходження парів.

Результат реакції: пірол і піроловмісні сполуки дають у препаратах фіолетове офарблення.

5.3 Реакція з ізатином.

Робочі розчини: а) 0,5 г ізатину розчиняють у 50 мл дистильованої води, б) розбавлена сірчана кислота.

Постановка реакції: а) на отриманий заморожений зріз наносять краплину 96° етилового спирту, надлишок спирту випаровується або видаляється фільтрувальним папером; б) на зріз наносять 1-2 краплини розчину ізатину і 1 краплину розбавленої сірчаної кислоти; в) зрізи витримують 3-4 хвилини.

Результат реакції: пірол і піроловмісні сполуки дають у препаратах темно-синє офарблення. 5.4 Реакція з хлоридом ртуті (II).

Робочі розчини: а) 0,4 г хлориду ртуті розчиняють у 10 мл дистильованої води, б) льодова оцтова кислота.

Постановка реакції: а) на отриманий заморожений зріз наносять краплину 96° етилового спирту, надлишок спирту випаровується або видаляється фільтрувальним папером; б) на зріз наносять 1 краплину льодової оцтової кислоти і 1 краплину розчину $HgCl_2$; в) зрізи витримують 2-3 хвилини.

Результат реакції: пірол і піроловмісні сполуки дають появу на препаратах аморфних осадів.

Таким чином, розроблений спосіб якісного мікрогістохімічного виявлення піролів і піроловмісних сполук дозволяє виявляти зазначені сполуки безпосередньо у гістологічних зрізах тканин.

Джерела інформації.

1. Бобрівник Л. Д. Органічна хімія /Л. Д. Бобрівник, В. М. Руденко, Г. О. Лезенко. – К.: Ірпінь, 2002.-543 с

2. Келина Н. Ю. Токсикология в таблицах и схемах / Н. Ю. Келина, Н. В. Безручко. - Ростов-на-Дону: Феникс, 2006.-142 с.

3. Кононський О. І. Органічна хімія / О. І. Кононський. – К.: Дакор, 2003.-567 с.

4. Юровская М. А. Пиррол / М. А. Юровская // Химическая энциклопедия. -[гл. ред. И. Л. Кнунянц]. - Т. 3.-1992. - С. 1078-1080.