



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **67143** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
G01N 33/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ КИСЛИХ ГЛІКОПРОТЕЇНІВ ІНТИМИ ВОРИТНОЇ ВЕНИ І ЇЇ КОРЕНІВ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ФЛЕБОПАТІЙ ПІРОЛІЗИДИНОАЛКАЛОЇДНОГО ГЕНЕЗУ

1

2

(21) u201105785

(22) 10.05.2011

(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 фарбування кислих глікопротеїнів інтими ворітної вени і її коренів для виявлення флебопатій піролізидиноалкалоїдного генезу, який

включає фарбування макропрепарату ворітної вени у розчині тіазинового фарбника при різних значеннях рН, який **відрізняється** тим, що об'єктом дослідження є не гістозріз, а макрофрагмент вени, який тричі забарвлюють у розчині тіазинового фарбника при рН - 2,8, рН - 4 і рН - 5 і реєструють інтесивність та колір офарблення при кожному значенні рН, при цьому, між фарбуванням, при кожному значенні рН, препарат відмивають від барвника у змінних порціях фізіологічного розчину до зникнення забарвлення, потім його фарбують при наступному значенні рН.

Корисна модель належить до гуманної та ветеринарної медицини, а саме до патоморфології і може бути використана для лабораторної діагностики отруєнь піролізидиновими алкалоїдами.

При отруєнні тварини і людини піролізидиновими алкалоїдами рослин: чорнокореня лікарського, жовтозілля лучного, кремени білої та геліотропа, токсиканти, що потрапляють до організму з просвіту кишкової трубки, відводяться за кореннями ворітної вени (*v. mesenterica cranialis* та *v. mesenterica caudalis*) і, власне, самої ворітної вени (*v. porta hepatis*) до печінки [9, 10].

Відомо, що під час зазначеного проходження піролізидинові алкалоїди і інші токсиканти вступають у контакт з ендотелієм судин, який, внаслідок цього, розрихлюється і відокремлюється від базальної мембрани [8]. Внаслідок цього, у венах розвиваються флебопатії, на інтимі вен з'являються кислі глікопротеїни сполучної тканини - сіалові (нейрамінові) кислоти, гіалуронова кислота (ГК), хондроїтинсірчана кислота (ХСК) і нейтральні глікопротеїни.

Сучасна гістохімія [1, 2, 4, 7] пропонує виявляти в гістологічних зрізах глікопротеїни, що секретуються слизовими залозами і глікопротеїни аморфної речовини сполучної тканини різними способами, в тому числі і за метахромазією. Остання розвивається в результаті взаємодії зазначених глікопротеїнів або глікозаміногліканів з тіазиновими барвниками (толуїдиновим синім,

азуром А, метиловим синім, крезиловим синім, тіонином та іншими).

Метахроматичні реакції ставляться на гістологічних зрізах при різних значеннях рН водних розчинів тіазинових фарбників [5, 7, 11]. Зазвичай, пропонується вести фарбування в наступних інтервалах значень рН - 1,5; 2,5; 4; 5,0.

У розчині барвника при рН - 5 метахроматично фарбуються всі кислі глікозаміноглікани, при рН - 4 фарбується гіалуронова кислота, при рН - 1,5-2,8 фарбуються сульфовмісні глікозаміноглікани.

Застосування вказаного способу метахроматичного забарвлення на патогістологічному рівні, дозволяє досліджувати лише один фрагмент вени, а побачити всю патохімію великого фрагмента вени або всієї вени неможливо. Крім того, при дослідженні випадково можна натрапити на ділянку вени зі збереженою притаманною їй організацією, тобто без розвитку патологій інтими і сполучної тканини. Це є недоліком патогістологічного способу дослідження глікозаміногліканів на основі метахромазії.

Найбільш близьким технічним рішенням до корисної моделі, що пропонується, є теоретична пропозиція щодо можливості постановки багатоступеневих гістохімічних реакцій на макро- мікроб'єктах при дослідженні глікопротеїнової активності залоз ділянок стінки різноманітних трубоподібних органів [6]. Але цей спосіб не за-

(19) **UA** (11) **67143** (13) **U**

стосовувався при дослідженні великих фрагментів стінки ворітної вени.

Тому, задачею корисної моделі є розробка способу, який би дозволяв отримувати інформацію про глікопротеїнову організацію великих ділянок стінки ворітної вени і її коренів після дії на неї піролізидинових алкалоїдів.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі фарбування кислих глікопротеїнів інтими ворітної вени і її коренів, який включає фарбування макропрепарату ворітної вени у розчині тіазинового фарбника при різних значеннях рН, згідно з корисною моделлю, об'єктом дослідження є не гістозріз, а макрофрагмент вени, який тричі забарвлюють у розчині тіазинового фарбника при рН - 2,8, рН - 4 і рН - 5 і реєструють інтенсивність та колір офарблення при кожному значенні рН, при цьому, між фарбуванням, при кожному значенні рН, препарат відмивають від барвника у змінних порціях фізіологічного розчину до зникнення забарвлення, а потім фарбують його при наступному значенні рН.

Приклад конкретного виконання

1. Підготовка кювети - емальована кювета підігрівається у сушильній шафі до 37 °С, до неї вливають розплавлену гарячу масу парафіну з воском (10:1). Вказану масу парафіну з воском готують у емальованому посуді, який нагрівають на електричній пічці.

2. Підготовка об'єкта дослідження - висікають фрагменти вен довжиною на 2-3 см менше довжини кювети. Відібрані фрагменти розсікають ножицями за довгою віссю з перетворенням трубки у стрічку.

Адвентицію ця стрічка укладається на застиглу парафіново-воскову масу. Один з довгих країв отриманої стрічки фіксують проколом голками через її край до парафіново-воскової маси через кожні 1-2 см, протилежний край злегка розтягують за допомогою пінцета і фіксують шляхом приколювання до застиглої парафіново-воскової суміші. Для фіксації використовують ін'єкційні або ботанічні голки.

3. Підготовка об'єкта для офарблення - промивання об'єкта. Кюветі надають вертикального положення і зовнішню інтимальну поверхню препарату злегка зрошують фізіологічним розчином так, щоб він вільно стікав згори до низу. Одразу після зрошення і стікання рідини кюветі надають горизонтального положення. Час зрошення складає не більше 3-х хвилин.

4. Забарвлення препарату - свіжоприготований 0,2 %-ний розчин тіазинового барвника наливають на препарат так, щоб його рівень над препаратом сягав 0,5 см. Час фарбування - 20-30 хвилин.

4.1.) Розчини фарбника з різними значеннями рН готуються на буфері Мак-Ільвейна який отримують шляхом змішування розчину гідрофосфату натрію (розчин А) і лимонної кислоти (розчин Б). Початкові розчини:

- Розчин А - 0,2 М розчин гідрофосфату натрію (0,2 М розчин містить 35,61 г солі в 1 л);

- Розчин В - 0,1 М розчин лимонної кислоти (0,1 М розчин містить 21,01 г кислоти в 1 л).

Для отримання 200,0 мл розчину з рН 2,8 змішують 31,7 мл розчину А і 168,3 мл розчину В, для такої ж кількості розчину з рН 4 береться 77,1 мл розчину А і до нього додається 122,9 мл розчину В, для отримання 200 мл розчину з рН=5 змішують 103,0 мл розчину А і 97,0 мл розчину В.

Таким чином отримують три розчини для фарбування з різними значеннями рН.

4.2.) Ступеневе офарблення виконується наступним чином:

1. препарат офарблюють у розчині обраного тіазинового барвника (кращі результати отримують при використанні толуїдинового синього або азура А) при рН - 2,8 - для виявлення сульфовмісних глікозаміногліканів;

2. препарат відмивають від барвника у змінних порціях фізіологічного розчину до зникнення забарвлення;

3. препарат забарвлюють при рН - 4 - для виявлення гіалуронової кислоти;

4. після другого промивання у фізіологічному розчині - фарбування при рН - 5 для виявлення всіх глікозаміногліканів.

Результати ступінчастого фарбування:

1. Офарблення інтими ворітної вени у синій колір свідчить про відсутність патологій, пов'язаних з появою на поверхні інтими вени глікозаміногліканів.

2. Наявність у препаратах метакроматично забарвлених у червоно-фіолетовий колір ділянок свідчить про розвиток у відібраних венах патологій з боку їх ендотеліального покриття, при яких має місце виявлення глікопротеїнів, що лежать під цим покриттям. У випадку відносно легких патологій - гіалуронової кислоти (ГК) - офарблення при рН - 4, а у випадку більш важких патологій - хондроїтинсірчанних кислот (ХСК) - офарблення при рН - 2,8.

3. Крім того, враховують не тільки метакроматичний ефект, але й площу його появи.

Таким чином, спосіб забарвлення кислих глікопротеїнів інтими ворітної вени і її коренів дозволяє: визначати наявність або відсутність різних глікопротеїнів на внутрішній поверхні коренів ворітної вени і самої ворітної вени після її контакту з піролізидиновими алкалоїдами і може бути використаний при дослідженні дії інших хімічних іритантів.

Джерела інформації.

1. Горальский Л.П. Основы гистологической техники и морфофункциональные методы исследования у норми та при патології / Л.П. Горальский, В.Т. Хомич, О.І. Кононський - Житомир: Полісся, 2005. - 284 с

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

3. Микроскопическая техника: [руководство; под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова]. - М.: Медицина, 1996. - 544 с.

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

5. Принципы и методы гистохимического анализа в патологии: [под ред. А. П. Авцына, А.И. Струкова, Б.Б. Фукса]. - Ленинград: Изд-во «Медицина»; Ленинградское отделение, 1971. - 368 с.

6. Синельников Р.Д. Новые направления в макро- микроскопической анатомии желез / Синель-

ников Р.Д., Щетинський І.М. // Матеріали VII Української республіканської конференції анатомів, гістологів і ембріологів, посвященій 100-летию со дня рождження академіка В.П. Вороб'єва. - Харків, 1976. - С. 99.

7. Шубич М.Т. Экономный метод дифференциального гистохимического анализа полисахаридов / Шубич М.Т., Лопунова Ж.К., Могильная Г.М. // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. - 1966. - № 1. - С. 71 - 74.

8. Щетинський І.М. Морфо-функціональна характеристика вено-окклюзійної хвороби великого рогатого скоту / Щетинський І.М., Павлов М.Е. // Проблеми зооінженерії і ветеринарної медицини:

Збірник наукових праць Харківської державної зооветеринарної академії. - Харків : РВ ХДЗВА, 2003. - Вип. 11 (35). - Ч. 2. - С. 265-296.

9. International programme on chemical safety (IPCS). Pyrrolizidine Alkaloids. Environmental Health Criteria 80.WHO. - Geneva, 1988. - 312 p.

10. Niebele J. Lehrbuch der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere / J. Niebele und H. Cohrs. - Jena : Veb Gustav Fischer Verlag, 1970. - tell II. - 1286 s.

11. Spicer S. S. Histochemical differentiation of mammalian mucopolysaccharides / S. S. Spicer // Annales of the New York Academy of Sciences. - 1963. - V. 106.-№ 2(3).-P. 379-388.