



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **100223** (13) **U**
(51) МПК

G01N 1/04 (2006.01)
G01N 1/30 (2006.01)
G01N 15/05 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

| | |
|--|--|
| (21) Номер заявки: u 2015 02009 | (72) Винахідник(и): Панікар Ігор Ігорович (UA), Горальський Леонід Петрович (UA), Дунаєвська Оксана Феліксівна (UA), Горальська Ірина Юріївна (UA), Сокульський Ігор Миколайович (UA), Пінський Олег Вікентійович (UA), Прасолов Євген Якович (UA) |
| (22) Дата подання заявки: 05.03.2015 | |
| (24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.07.2015 | |
| (46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.07.2015, Бюл.№ 13 | (73) Власник(и): Панікар Ігор Ігорович, пров. Ломаний, 35, м. Полтава, 36002 (UA) |

(54) СПОСІБ ФАРБУВАННЯ ГІСТОЛОГІЧНИХ ЗРІЗІВ ОРГАНІВ КРОВОТВОРЕННЯ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ КЛІТИН КРОВІ ПРИ ВИВЧЕННІ ЇХ У НОРМІ ТА ПРИ ПАТОЛОГІЇ

(57) Реферат:

Спосіб фарбування клітин гістологічних зрізів органів кровотворення для виявлення клітин крові при вивченні їх у нормі та при патології, при якому спочатку проводять підготовку зрізу до фарбування шляхом заливання у целоїдин та нанесення на предметне скло, далі зрізи звільняють від целоїдину і перед фарбуванням зберігають в етиловому спирті. Далі зрізи переносять з етилового спирту в дистильовану воду і промивають, розміщують зрізи у розчині марганцевокислого калію, споліскують зрізи у дистильованій воді, переносять зрізи у розчин щавлевої кислоти, ретельно промивають зрізи у водопровідній воді. Далі процес фарбування клітин крові у гістологічних зрізах органів кровотворення фарбувальною сумішшю проводять шляхом нанесення даної одноразової дозованої суміші з барвником на горизонтально розміщене предметне скло зі зрізом і нагрівання кожного предметного скла зі зрізом. Зрізи швидко споліскують у воді, диференціюють у слабопідкисленій оцтовою кислотою воді до набуття рожевого відтінку. Зрізи швидко споліскують у дистильованій воді, диференціюють зрізи у етиловому спирті, до того моменту, коли перестане відходити синя фарба (азур). Зрізи двічі проводять через абсолютний етиловий спирт, просвітлюють у ксилолі і заводять у бальзам.

UA 100223 U

Спосіб належить до ветеринарної, гуманної медицини та біології та використовується переважно для морфологічних, патоморфологічних і цитоморфологічних досліджень, зокрема для фарбування органів кровотворення при вивченні їх у нормі та при патології.

5 Фарбування клітин крові застосовують для їх диференціації і визначення вмісту окремих їх різновидів у периферичній крові та органах кровотворення. Відомо, що клітини крові утворюються в органах кровотворення, які реагують на різні фізіологічні і, особливо патологічні фактори, зміною складу крові. Дослідження клітин крові у органах кровотворення надає можливість виявити приховані зміни у тканинах, органах та їх системах організму, визначити ускладнення, що виникають при тому чи іншому патологічному стані, диференціювати захворювання, контролювати ефективність лікування хворих тварин та прогнозувати перебіг хвороби.

10 Відомий спосіб фарбування цитологічних препаратів із операційного матеріалу [А. с. №1193498, СССР, МПК G01N1/30. Способ приготовления цитологических препаратов из операционного материала, Бюл. №43, Открытия. Изобретения.-1985, С. 171], який полягає у виготовленні цитологічних препаратів з операційного матеріалу з наступною фіксацією висушеного препарату у метанолі, прискоренні фарбування (5-30 с) та фарбування цитологічного препарату 0,5 % водному розчині катіонного синього основного.

20 Спосіб має недоліки - недостатньо ефективний, бо не дозволяє чітко візуалізувати ядерні структури клітин, що утруднює диференційну морфологічну діагностику захворювань щитовидної залози в ході інтраопераційного морфологічного дослідження.

Відомий спосіб забарвлення напівтонких зрізів [Патент України №75669, бюл. №23 від 10.12.2012] який включає послідовну обробку гістологічних зрізів розчином барвників, причому спочатку напівтонкі зрізи фарбуються 3-5 хв. при нагріванні до 70 °С розчином, до складу якого входить 1 % розчин метиленового синього на 1 % бури, який змішаний із 1 % розчином азуру II на дистильованій воді, а потім розчином, компонентами якого є 0,15 г основного фуксину, 10 мл 50 % етанолу, 90 мл дистильованої води, далі під мікроскопом із зоровим контролем досягається необхідне забарвлення.

Відомі способи отримання гістологічних препаратів після заливки шматочків органів в парафін, целоїдин, ізоаміловий спирт, отримання гістологічних зрізів із застосуванням целофанових плівок, розчинів желатину на заморожуючих мікротомах [Кисели Д. Практическая микротехника и гистохимия. - Будапешт: Изд. Академия наук Венгрии, 1962.-269 с; Лилли Р. Паталогическая техника и практическая гистохимия. - М.: Мир, 1969.-654 с; Меркулов Г. А. Курс паталогической техники. Л.: Медицина, 1969.-424 с; Гаврилин П. Н. Методические особенности изготовления тотальных гистограмм кроветворных органов // Проблемы зооинженерии та ветеринарної медицини / зб. наук. пр. Харків. Зоовет. Ін-ту. - Харків: ХЗВІ, 1999. - вип. 5 (29).-ч. 2.-С. 25-90].

Відомі способи мають недоліки: тривалий час на підготовку гістологічних препаратів, значна кількість допоміжних речовин (парафін, целоїдин, ксилол, бальзам), не виключається порушення структурних компонентів гістологічних зрізів і впливу на клітинні елементи.

40 Найближчим аналогом за технічною суттю є спосіб фарбування клітин крові у зрізах органів кровотворення піридин-азур-еозином за С. П. Алфеевою [Л. П. Горальский, В. Т. Хомич, О. І. Кононський. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології. Навч. посібник. - Житомир: "Полісся", 2011, - С. 215-216], згідно з яким для виготовлення зрізів матеріал заливають у целоїдин. Нанесені на предметне скло зрізи звільняють від целоїдину і перед фарбуванням зберігають у 70-75 % етиловому спирті. Далі зрізи переносять з етилового спирту в дистильовану воду і промивають їх протягом 2-3 хв. Потім зрізи поміщають у 0,25 %-ий розчин марганцевокислого калію на 15 хв. Далі зрізи споліскують у дистильованій воді та переносять у 5 %-ий розчин щавлевої кислоти на 5 хв. Потім зрізи ретельно промивають протягом 15-20 хв. у водопровідній воді. Предметне скло із зрізами поміщують у вертикальному положенні в стаканчиках з фарбувальною сумішшю на 4-24 год. Склад фарбувальної суміші: еозин водний (1:1000) - 13 мг; дистильована вода - 7 мл; азур II (1:1000) - 5 мл; піридин чистий (як протрава) - 6 крапель. Співвідношення між її складовими частинами фарбувальної суміші може змінюватися залежно від об'єкта дослідження, якості його фіксації, тривалості та способу зберігання. Суміш придатна до використання впродовж кількох днів. Перед використанням її необхідно збовтати, але не фільтрувати. Якщо азур дає слабе забарвлення, то до фарбувальної суміші додають його ще кілька крапель. Після використання фарбувальної суміші зрізи швидко споліскують у воді та диференціюють у слабопідкисленій оцтовою кислотою воді (1 крапля оцтової кислоти на 30 мл дистильованої води), доки вони не набудуть рожевого відтінку. Термін диференціювання залежить від тривалості фарбування та свіжості барвника. Зрізи споліскують у дистильованій воді та диференціюють зрізи у 96 %

етиловому спирті, допоки перестане відходити синя фарба (азур). Зрізи двічі проводять через абсолютний етиловий спирт, просвітлюють у ксилолі і заводять у бальзам.

Недоліком відомого способу є великий термін фарбування гістологічних зрізів, тобто до 24 годин, що призводить до затримки часу фарбування та виготовлення гістологічних зрізів, великих затрат реактивів та складності контролю протікання реакції. Фарбувальна суміш з часом випадає в незначний осад, що негативно діє на процес фарбування зрізу, а саме недостатня якість фарбування клітин крові і як наслідок - низька якість результатів визначення формули крові та проведення цитоморфометричних вимірів.

Виконаний заявником аналіз рівня техніки, який включає пошук по патентних і науково-технічних джерелах інформації, виявлення джерел, які містять відомості про аналоги заявленої корисної моделі, дозволив встановити, що заявник не виявив аналог, який характеризується ознаками, ідентичними суттєвим ознакам заявленого технічного рішення. Визначення із переліку аналогів найбільш близького до суттєвих ознак технічного рішення дозволило виявити сукупність суттєвих відносно до передбаченого технічного результату відмінних ознак в заявленому рішенні, яке виявлено в формулі корисної моделі.

В основу корисної моделі поставлена задача - спрощення способу отримання гістологічних препаратів, без порушення структурних компонентів гістологічних зрізів і впливу на клітинні елементи та покращення зафарбовування клітин крові у зрізах відповідних органів.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі фарбування гістологічних зрізів органів кровотворення для виявлення клітин крові при вивченні їх у нормі та патології, за яким спочатку проводять підготовку зрізів до фарбування шляхом їх заливання у целоїдин та нанесенні на предметне скло, далі зрізи звільняють від целоїдину і перед фарбуванням зберігають у 67-77 % етиловому спирті, потім зрізи переносять з етилового спирту в дистильовану воду і промивають їх протягом 1,5-3,5 хв., поміщають зрізи у 0,25 % розчин марганцевокислого калію на 14-17 хв., споліскують зрізи у дистильованій воді, переносять зрізи у 5 % розчин щавлевої кислоти на 4-6 хв., ретельно промивають зрізи у водопровідній воді протягом 14-22 хв., далі процес фарбування клітин крові у гістологічних зрізах органів кровотворення фарбувальною сумішшю проводять шляхом нанесення 5-12 крапель, даної одноразової дозованої суміші з барвником на горизонтально розміщене предметне скло зі зрізом і нагрівання кожного предметного скла зі зрізом впродовж 4-6 хв. над полум'ям спиртівки після цього, зрізи швидко споліскують у воді, диференціюють зрізи у слабо підкисленій оцтовою кислотою воді (1 крапля оцтової кислоти на 30 мг дистильованої води) до набуття рожевого відтінку. Термін диференціювання залежить від тривалості фарбування та свіжості барвника, далі зрізи швидко споліскують у дистильованій воді, диференціюють зрізи у 96 % етиловому спирті, допоки перестане відходити синя фарба (азур), зрізи двічі проводять через абсолютний етиловий спирт, просвітлюють у ксилолі і заводять у бальзам.

Застосування запропонованого способу фарбування клітин крові у гістологічних зрізах органів кровотворення дозволяє забезпечити наступний технічний результат:

при нагріванні зрізу з барвником відбувається зміна адсорбції барвника, що візуально сприймається як показник інтенсивності забарвлення, що при цьому надає чітке зафарбовування клітин крові у зрізах;

фарбувальна суміш не випадає в осад, що в свою чергу призводить до кращого проведення цитоморфометричних вимірів клітин крові;

виключається можливість виникнення ситуації з перефарбування зрізів.

Крім того:

забезпечує зручність і простоту постановки реакції, полегшує роботу лаборанта-гістолога;

скорочується термін фарбування гістологічних зрізів;

прискорюється термін отримання результатів дослідження, що надає 100 % позитивний ефект на гістологічних зрізах органів кровотворення при виявленні клітин крові, та їх диференціювання, необхідних для швидкої і правильної постановки діагнозу і наукових досліджень.

Таким чином, сукупність вищезазначених позитивних моментів дозволить прискорити термін отримання результатів дослідження та підвищити ефективність фарбування клітин крові для їх диференціації і визначення вмісту окремих їх різновидів.

Приклад виконання способу фарбування гістологічних зрізів органів кровотворення для виявлення клітин крові.

Матеріал (шматочки тканини), що досліджують, заливають у целоїдин. Далі, нанесені на предметні стекла зрізи звільняють від целоїдину і перед фарбуванням зберігають у 67-77 % етиловому спирті. У наступному переносять зрізи з етилового спирту в дистильовану воду і промивають їх в ній 1,5-3,5 хв. Поміщають зрізи у 0,25 % розчин марганцевокислого калію на 14-

17 хв. Споліскують зрізи у дистильованій воді. Переносять зрізи у 5 % розчин щавлевої кислоти на 4-6 хв. Ретельно промивають зрізи у водопровідній воді протягом 14-22 хв. Потім зрізи покривають фарбувальною сумішшю, проводять шляхом нанесення на кожне скло зі зрізом яке розташоване у горизонтальному положенні 5-12 крапель даної одноразової дозованої суміші і нагрівання кожного скла з барвником зі зрізом продовж 4-6 хвилин над полум'ям спиртівки. Після цього, зрізи швидко споліскують у воді, диференціюють зрізи у слабопідкислений оцтовою кислотою воді (1 крапля оцтової кислоти на 30 мл дистильованої води), доки вони не набудуть рожевого відтінку, зрізи споліскують у дистильованій воді, диференціюють у 96 % етиловому спирті, допоки перестане відходити синя фарба (азур), зрізи двічі проводять через абсолютний етиловий спирт, просвітлюють у ксилолі і заводять у бальзам.

Таким чином, сукупність наведених переваг запропонованого способу дозволить прискорити термін отримання результатів дослідження та підвищити ефективність фарбування клітин крові для їх диференціації і визначення вмісту окремих їх різновидів.

Спосіб, згідно з корисною моделлю, може використовуватися у ветеринарній, гуманітарній медицині та біології, наприклад, для морфологічних патаморфологічних і цитологічних досліджень, і, зокрема для фарбування органів кровотворення при вивченні їх у нормі та при патології. Опис способу фарбування гістологічних зрізів органів кровотворення для виявлення клітин крові виконаний в заявці повністю, що дає можливість широко використовувати його у лабораторних умовах.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб фарбування клітин гістологічних зрізів органів кровотворення для виявлення клітин крові при вивченні їх у нормі та при патології, при якому спочатку проводять підготовку зрізу до фарбування шляхом заливання у целоїдин та нанесення на предметне скло, далі зрізи звільняють від целоїдину і перед фарбуванням зберігають у 67-77 % етиловому спирті, далі зрізи переносять з етилового спирту в дистильовану воду і промивають 1,5-3,5 хв., розміщують зрізи у 0,25 % розчині марганцевокислого калію на 14-17 хв., ополіскують зрізи у дистильованій воді, переносять зрізи у 5 % розчин щавлевої кислоти на 4-6 хв., ретельно промивають зрізи у водопровідній воді протягом 14-22 хв., далі процес фарбування клітин крові у гістологічних зрізах органів кровотворення фарбувальною сумішшю проводять шляхом нанесення 5-12 крапель даної одноразової дозованої суміші з барвником на горизонтально розміщене предметне скло зі зрізом і нагрівання кожного предметного скла зі зрізом впродовж 4-6 хв. над полум'ям спиртівки, після цього зрізи швидко споліскують у воді, диференціюють зрізи у слабопідкисленій оцтовою кислотою воді (1 крапля оцтової кислоти на 30 мл дистильованої води), до набуття рожевого відтінку, потім зрізи швидко споліскують у дистильованій воді, диференціюють зрізи у 96° етиловому спирті, до того моменту, коли перестане відходити синя фарба (азур), зрізи двічі проводять через абсолютний етиловий спирт, просвітлюють у ксилолі і заводять у бальзам.

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

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

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