



MD 3059 F1 2006.05.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **3059** ⁽¹³⁾ **F1**
(51) Int. Cl.: *G01N 1/28* (2006.01)
G01N 1/30 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
(21) Nr. depozit: a 2005 0164 (22) Data depozit: 2005.06.09	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2006.05.31, BOPİ nr. 5/2006
(71) Solicitant: INSTITUȚIE MEDICO-SANITARĂ PUBLICĂ INSTITUTUL DE CERCETĂRI ȘTIINȚIFICE ÎN DOMENIUL OCROTIRII SĂNĂTĂȚII MAMEI ȘI COPILULUI, MD (72) Inventatori: SINIȚÎN Lilia, MD; FUIOR Ion, MD; CECOLTAN Svetlana, MD (73) Titular: INSTITUȚIE MEDICO-SANITARĂ PUBLICĂ INSTITUTUL DE CERCETĂRI ȘTIINȚIFICE ÎN DOMENIUL OCROTIRII SĂNĂTĂȚII MAMEI ȘI COPILULUI, MD	

(54) **Procedeu de obținere a preparatelor histologice**

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la medicină, în particular la un procedeu de obținere a preparatelor histologice și poate fi utilizată în morfopatologie.

Procedeu de obținere a preparatelor histologice include fixarea țesutului, îmbibarea cu parafină topită, obținerea secțiunilor cu grosimea de 5...7 μm, deparafinarea lor, spălarea cu apă distilată și colorarea, care se efectuează timp de 30 min într-un amestec constituit din volume egale de soluții, una dintre care conține 0,5 M tampon de acetat cu pH 4,8, iar a doua conține, părți de volum: soluție apoasă de verde de metilen de 2% - 10, soluție

2
5 apoasă de pironină G de 5% - 17,5 și apă distilată - 250. După colorare preparatele se spală timp de 2...3 s cu apă distilată, se usucă pe hârtie de filtru, se diferențiază timp de 1...2 s în amestecul acetona:xilen (1:1) și se includ în balsam.

10
Rezultatul invenției constă în ameliorarea gradului de colorare și în reducerea duratei de colorare a preparatelor histologice.

Revendicări: 1

15

MD 3059 F1 2006.05.31

MD 3059 F1 2006.05.31

3

Descriere:

Invenția se referă la medicină, în particular la un procedeu de obținere a preparatelor histologice și poate fi utilizată în morfopatologie.

5 Este cunoscut procedeu de obținere a preparatelor histologice pentru examinarea structurilor celulare, care include utilizarea verdelui de metilen și a pironinei pentru colorarea citoplasmei, nucleului și nucleolilor. Acest procedeu asigură rezultate obiective, dar are un șir de dezavantaje, dintre cele mai importante sunt: cale laborioasă, de durată, absența secțiunii-martor, precum și extragerea nedorită a pironinei din citoplasmă în timpul deshidratării și diferențierii [1].

10 Mai este cunoscut procedeu de obținere a preparatelor histologice pentru examinarea citoplasmei, nucleului și nucleolilor în baza colorării acizilor nucleici – ADN (localizat în nucleu) și ARN (localizat în special în nucleol și, mai puțin, în citoplasmă), conform căruia fragmentele de țesuturi se fixează în alcool absolut, se îmbibă cu parafină topită în felul următor: se tratează cu amestec de alcool : cloroform (1:1) timp de 6...12 ore, cloroform 6...12 ore, amestec de cloroform : parafină (1:1) 2...3 ore la temperatura de 37°C, parafină la temperatura de 54°C timp de 1,5...2,5 ore, apoi iarăși în parafină la
15 temperatura 54°C timp de 1,5...2,5 ore, se răcește cu apă, blocul se decupează și se înleie pe o cală din lemn. Se efectuează secțiuni tisulare cu grosimea de 5...7 μm, se deparafinează cu xilol, se deshidratează în alcool de 70° și 80°. Două secțiuni deparafinate se colorează simultan cu un amestec compus din verde de metilen și pironină, una din secțiuni fiind în prealabil tratată cu acid tricloracetic de 5% timp de 15...20 min la temperatura de 90°C sau cu soluție de HCl 1N timp de 5 min, la
20 temperatura de 60°C. Secțiunile se spală cu apă distilată (3...10 min) și se amplacează într-un amestec compus din verde de metilen și pironină timp de (15...20)...(60...120) minute.

Secțiunile iarăși se spală cu apă distilată, timp de cel mult 15...30 s, după aceasta – cu alcool etilic, timp de 3...5 s. Secțiunile se diferențiază și se deshidratează în alcool butilic timp de 0,5...1,5 ore, apoi se spală în xilol și se includ în balsam.

25 Dezavantajul acestui procedeu constă în durata îndelungată a colorării și extragerea nedorită a pironinei din citoplasmă în timpul deshidratării și diferențierii, ceea ce duce la colorarea insuficientă sau lipsa colorării citoplasmei [2].

Problema pe care o rezolvă invenția constă în sporirea rapidității, calității și intensificarea colorației citoplasmei, nucleului și nucleolilor.

30 Procedeu de obținere a preparatelor histologice include fixarea țesutului, îmbibarea cu parafină topită, obținerea secțiunilor cu grosimea de 5...7 μm, deparafinarea lor, spălarea cu apă distilată și colorarea, care se efectuează timp de 30 min într-un amestec constituit din volume egale de soluții, una dintre care conține 0,5 M tampon de acetat cu pH 4,8, iar a doua conține, părți de volum: soluție apoasă de verde de metilen de 2% - 10, soluție apoasă de pironină G de 5% - 17,5 și apă distilată - 250. După
35 colorare preparatele se spală timp de 2...3 s cu apă distilată, se usucă pe hârtie de filtru, se diferențiază timp de 1...2 s în amestecul acetona:xilen (1:1) și se includ în balsam.

Rezultatul invenției constă în ameliorarea gradului de colorare și în reducerea duratei de colorare a preparatelor histologice.

Exemplul 1

40 Pentru obținerea preparatelor histologice, în scopul examinării structurilor celulare s-a prelevat material tisular care s-a fixat în alcool absolut. S-a prelucrat în bateria cu reagenți chimici până la etapa îmbibării cu parafină topită, apoi s-au efectuat secțiuni tisulare cu grosimea de 5...7 μm.

Pentru colorare s-au pregătit 2 soluții de bază: o soluție conține 17,5 ml soluție apoasă de pironină G de 5% și 10 ml soluție apoasă de verde de metilen de 2%, la care se adaugă 250 ml apă distilată. A 2-
45 a soluție conține 0,5 M soluție-tampon de acetat cu pH 4,8. Amestecul de lucru conține volume egale ale acestor soluții.

Secțiunile cu grosimea de 5...7 μm se deparafinează, se spală cu apă distilată timp de 5 min, se colorează timp de 30 min în amestecul preparat, se spală în apă distilată timp de 2...3 s, se usucă pe hârtie de filtru, se diferențiază timp de 1...2 s în amestecul acetona:xilen (1:1) și se includ în balsam.

50 Ca rezultat, s-au obținut secțiuni colorate intens: citoplasma se prezintă în roșu sau diverse nuanțe roz, nucleolele – în verde-albastru, nucleolii – în roșu.

Exemplul 2

Pentru obținerea datelor comparative, secțiunile se colorează conform procedurii cunoscut. Secțiunile pregătite conform procedurii descris în exemplul 1 se colorează timp de
55 (15...20)...(60...120) min în colorant cu următoarea compoziție: verde de metilen 0,15 g; pironină G 0,25 g; alcool 96° 2,5 ml; glicerină 20 ml; 0,5 M soluție de acid carbohidric 100 ml. Secțiunile se spală în apă distilată timp de 15...30 s, în alcool etilic de 96° timp de 3...5 s. Se diferențiază și se deshidratează în alcool butilic normal timp de 30...90 min. Se clătesc cu xilol și se includ în balsam. Ca rezultat, citoplasma se colorează în diverse nuanțe ale culorii roz și roșu, nucleolele celulare – în verde,
60 albastru-verde sau albastru, nucleolii – în roșu.

MD 3059 F1 2006.05.31

4

Datele comparative obținute indică asupra faptului că procedeul propus face posibilă obținerea unei colorații mai calitative într-un interval de timp mai redus.

5

(57) Revendicare:

- 10 Procedeul de obținere a preparatelor histologice ce include fixarea țesutului, îmbibarea cu parafină topită, obținerea secțiunilor cu grosimea de 5...7 μm , deparafinarea, spălarea cu apă distilată, colorarea, spălarea, uscarea, diferențierea și includerea în balsam, **caracterizat prin aceea că** colorarea preparatelor se efectuează timp de 30 min într-un amestec constituit din volume egale de soluții, una dintre care conține 0,5 M tampon de acetat cu pH 4,8, iar a doua conține, părți de volum: soluție apoasă de verde de metilen de 2% - 10, soluție apoasă de pironină G de 5% - 17,5 și apă distilată - 250, după
- 15 colorare preparatele se spală timp de 2...3 s cu apă distilată și se usucă pe hârtie de filtru, iar diferențierea se efectuează timp de 1...2 s în amestecul acetonă:xilen (1:1).

20

(56) Referințe bibliografice:

1. Лили Р. Патогистологическая техника и практическая гистология. Москва, Мир, 1969, с. 145...146
2. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. Ленинградское отделение, Медицина, 1969, с. 275...279

Șef Secție:

GUȘAN Ala

Examinator:

BANTAȘ Valentina

Redactor:

LOZOVANU Maria