

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **225959**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **410503**

(22) Data zgłoszenia: **11.12.2014**

(51) Int.Cl.

**C09J 4/04 (2006.01)**

**C09J 9/00 (2006.01)**

**C09J 11/06 (2006.01)**

**G01N 1/36 (2006.01)**

(54)

**Lepiszczce do zamykania preparatów mikroskopowych**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**20.06.2016 BUP 13/16**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**30.06.2017 WUP 06/17**

(73) Uprawniony z patentu:

**AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA  
IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE,  
Kraków, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**MAREK NOCUŃ, Świątniki Górne, PL  
JERZY NIEDŹWIEDZKI, Kraków, PL  
PAWEŁ KRZYŚCIAK, Kraków, PL**

**PL 225959 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest lepiszcze do zamykania preparatów mikroskopowych zawierających materiał mikrobiologiczny lub medyczny, zapewniające ich przechowywanie przez długi okres czasu bez widocznych zmian degradacyjnych.

Wykonanie mikrobiologicznego preparatu mikroskopowego polega na naniesieniu na szkiełko mikroskopowe podstawowe zawiesiny drobnoustrojów pochodzących z hodowli lub wymazu. W technikach immunofluorescencyjnych badane próbki biologiczne podaje się reakcjom z odpowiednimi przeciwciałami znakowanym fluorochromami tj. barwnikami fluorescencyjnymi. Z kolei preparaty biologiczne wykonuje się poprzez naniesienie na szkiełko podstawowe materiału biologicznego, który poddaje się utrwaleniu i/lub barwieniu zgodnie ze znaną metodyką np. metodą Grama, Ziehla-Neelsena lub Schaeffera-Fultona. Alternatywną techniką stosowaną w mikologii jest przygotowanie preparatów poprzez naniesienie badanego materiału biologicznego na szkiełko mikroskopowe podstawowe, dodanie kropli odpowiedniego odczynnika i przykrycie szkiełkiem nakrywkowym.

Preparaty mikroskopowe są nietrwałe i po pewnym czasie ulegają degradacji. W przypadku preparatów trwałych, które zamierza się archiwizować, należy zabezpieczyć je poprzez zamknięcie, które polega na wypełnieniu lepiszczem przestrzeni między szkiełkiem nakrywkowym, a podstawowym z naniesionym materiałem przeznaczonym do badań. Zabezpiecza to preparaty przed niekorzystnym działaniem czynników zewnętrznych mogących powodować uszkodzenia mechaniczne, wysychanie i utlenianie niektórych barwników. W celu zapewnienia jak najlepszej jakości preparatów trwałych, lepiszcze do zamykania preparatów mikroskopowych powinno być bezbarwne i przejrzyste, nie mieć szkodliwego wpływu na zatapiane tkanki, chronić je oraz użyte barwniki przed mechanicznym i chemicznym uszkodzeniem. Zastosowany materiał ponadto powinien w temperaturze pokojowej hermetycznie i trwale spajać szkiełka oraz posiadać taki sam współczynnik załamania światła jak szkło, aby uniknąć zjawiska uginania światła na granicy faz.

Znane jest z publikacji J. Ochei, A. Kolhatkar, pt.: „Medical laboratory science: theory and practise” Tata McGraw-Hill Education Pvt. Ltd., New Delhi, Indie, 2000, lepiszcze w postaci balsamu kanadyjskiego, naturalnej żywicy uzyskiwanej z jodły kanadyjskiej *Abies balsamea*. Do sporządzania preparatów stosuje się 40–50% roztwór w ksylenie. Jednak w miarę upływu czasu, ze względu na utlenianie ksylenu do kwasów benzoesowych i ftalowych odczyn balsamu staje się kwaśny. Może to powodować erozję węglanów wapnia, a także delikatnych struktur niektórych organizmów np. kokolitów i ostrakodów oraz minerałów. Ponadto obserwuje się szybsze blaknięcie barwników zasadowych.

Innym znanym z publikacji S. Renshaw pt.: „Immunochemical staining techniques. In Immunohistochemistry: methods express series, 2005 lepiszczem pochodzenia naturalnego, wykorzystywanym do zamykania preparatów jest Euparal, zawierający w swym składzie kilka żywic tj. sandarak, żywicę z północno-wschodnioafrykańskiego drzewa *Tetraclinia articulata*, eukaliptol, kamforę, salicylan fenylu lub metylu oraz paraldehyd. Substancja ta może jednak powodować blaknięcie wybarwionych hematoksyliną jąder komórkowych.

Do zamykania preparatów mikroskopowych stosowane są również żywice syntetyczne epoksydowe i akrylowe dostępne na rynku, np. „Acrotol” firmy Leica Biosystem, „Araldite” firmy Huntsman Advanced Materials, „Durcupan” firmy Sigma-Aldrich GmbH, „Entellan” firmy Merck oraz wiele innych.

Odrębną pod względem chemicznym grupę substancji zamykających stanowią polimery nitrocelulozy np. „Glyceel”, żywice naftalenowe takie jak „Hyrax”, czy „Naphrax”, żywice terpenowe m.in. „Clarion”, „Harleco synthetic resin”, „Coverbond”, preparaty polistyrenowe „DPX”, „DePeX”, żywice oparte na kumaronie np. „Technicon”, „Gurr’s MM”, żywica formaldehydowo-dimetylohydantoinowa „Realgar” i inne.

Ze zgłoszenia WO9807802 A1 znana jest kompozycja do klejenia szkła zawierająca monomer cyjanoakrylanowy, co najmniej jeden plastyfikator w ilości 15–60% wagowych w stosunku do masy kompozycji wybrany z grupy zawierającej m.in. ftalany alkilowe, adypiniany, cytryniany, fosforany, bursztyniany, benzoesany, co najmniej jeden silan w ilości 0,01–5,0% wagowych w stosunku do masy kompozycji o wzorze  $R'_{(4-n)}Si(OR)_n$  gdzie  $n = 1-4$ , a  $R'$  i  $R''$  mogą być różne lub jednakowe i są niezależnie wybrane z grupy obejmującej m.in. wodór, węglowodór, aryl, węglowodory aromatyczne i ich podstawione pochodne.

Znane jest ze zgłoszenia US20130174981 A1 lepiszcze cyjanoakrylanowe, o podwyższonej odporności na wodę, który zawiera w przeliczeniu na masę lepiszcza co najmniej jeden ester

2-cyjanoakrylanowy w ilości co najmniej 30% wagowych, co najmniej jeden bis-silan w ilości 0,01–0,5% wagowych i co najmniej jeden monosilan w ilości 0,05–2,00% wagowych. Bis – silany są reprezentowane przez związek o wzorze  $(R^4O)_{(3-q)}(R^3)_qSi-B-Si(R^1)_p(OR^2)_{(3-p)}$ , w którym  $p = 0-3$ , B to dwuwartościowa grupa wiążąca, zawierająca 1–40 atomów węgla,  $R^1$  i  $R^2$  są niezależnie wybrane z grupy obejmującej alkil, cykloalkil, alkenyl, aryl lub acyl. Natomiast monosilan występuje w postaci  $A-Si(R^5)_n(OR^6)_{(3-n)}$ , gdzie  $n = 0-3$ , A to grupa zawierająca 1–40 atomów węgla,  $R^5$  wybrany jest z grupy obejmującej wodór, halogeny, alkil, cykloalkil, alkeny, aryl lub acyl, zaś  $R^6$  jest niezależnie wybrany z grupy obejmującej alkil, cykloalkil, alkenyl, aryl lub acyl.

Lepiszczka znane ze stanu techniki często reagują z barwnikami użytymi do przygotowania preparatów mikroskopowych i powodują ich blaknięcie. Ponadto są nieodporne na promieniowanie UV stosowane w mikroskopii fluorescencyjnej i mogą się rozkładać się pod jego wpływem.

Znane lepiszczka wykazują również niewystarczającą odporność na wilgoć oraz zbyt słabą adhezję do powierzchni szkła, dla zastosowań takich jak zamykanie preparatów mikroskopowych.

Okazało się, że niedogodności znanego stanu techniki mogą zostać ograniczone przez rozwiązanie będące przedmiotem niniejszego wynalazku.

Lepiszczka do zamykania preparatów mikroskopowych według wynalazku zawierające 50–90% objętościowych 2-cyjanoakrylanu metylu i/lub etylu oraz silany, charakteryzuje się tym, że zawiera fenylotrimetoksylan w ilości 5–50% objętościowych oraz metylotrimetoksylan w ilości 1–30% objętościowych.

Lepiszczka według niniejszego wynalazku wykazuje odporność na wodę i parę wodną dzięki zawartości metylotrimetoksylanu oraz fenylotrimetoksylanu, które wykazują silne właściwości hydrofobowe. Ponadto użyte silany wykazują silną adhezję do powierzchni szkła, co istotnie zwiększa wytrzymałość mechaniczną preparatu i jego odporność na starzenie.

Lepiszczka według wynalazku pozwala też na bardzo szybkie zamykanie preparatów, w ciągu około 1 minuty, dzięki czemu może być stosowane do preparowania trwałych preparatów mikrobiologicznych.

Uzyskane preparaty mogą być przechowywane przez długi okres czasu bez widocznych zmian degradacyjnych.

Lepiszczka nie interferuje z barwnikami użytymi w preparacie mikroskopowym i nie wykazuje fluorescencji, ani nie rozkłada się pod wpływem promieniowania UV stosowanego w mikroskopii fluorescencyjnej.

#### P r z y k ł a d 1

Lepiszczka do zamykania preparatów mikroskopowych składa się objętościowo z:

70% 2-cyjanoakrylanu etylu, prod. Aldrich, nr kat. Z105880, wzór chemiczny:  $C_6H_7NO_2$ , lepkość 0,03–0,05 Pa·s;

25% fenylotrimetoksylanu, prod. Aldrich, nr kat. 104744, wzór chemiczny:  $C_6H_5Si(OCH_3)_3$ , gęstość  $1,062\text{ g/cm}^3$  w  $25^\circ\text{C}$ , współczynnik załamania światła  $n_{20/D} = 1,468$ ;

5% metylotrimetoksylanu, prod. Aldrich, nr kat. 440175, wzór chemiczny:  $CH_3Si(OCH_3)_3$ , gęstość  $0,955\text{ g/cm}^3$  w  $25^\circ\text{C}$ , współczynnik załamania światła  $n_{20/D} = 1,371$ .

Powyższe składniki wprowadza się do strzykawki polipropylenowej i poddaje odgazowaniu. Lepiszczka przechowywane w temperaturze  $4^\circ\text{C}$  w strzykawce bez dostępu powietrza, zachowuje swoją przydatność przez okres do 7 dni.

Lepiszczka do zamykania preparatów mikroskopowych charakteryzuje się następującymi właściwościami:

- ciecz bezbarwna o charakterystycznym zapachu,
- czas wiązania około 1 minuta,
- pełna wytrzymałość mechaniczna, 24 h,
- wytrzymałość na ścinanie: około 3,5 MPa,
- współczynnik załamania światła:  $n_{20/D} = 1,41$ .

Odwodniony preparat mikrobiologiczny zamknięto poprzez naniesienie lepiszczka w ilości zapewniającej wypełnienie przestrzeni pomiędzy szkiełkami: podstawowym, a nakrywkowym. Lepiszczka dozowano w taki sposób, aby unikać jego nadmiaru i aby nie wyciekało poza obrys szkiełka nakrywkowego.

Zabezpieczony preparat przechowywany w komorze klimatyzacyjnej w temperaturze  $27^\circ\text{C}$  i wilgotności 100% przez okres 1 miesiąca nie wykazał zmian degradacyjnych.

**Przykład 2**

Lepiszczce do zamykania preparatów mikroskopowych składa się objętościowo z:

- 55% 2-cyjanoakrylanu etylu, prod. NALMAT Trzebinia PL, nr kat. C-129, wzór chemiczny:  $C_6H_7NO_2$ , lepkość 0,04 Pa·s;
- 20% 2-cyjanoakrylanu metylu, prod. CHEMISTIK S.J. Jaworzno, CAS: 137-05-3, wzór chemiczny:  $C_5H_5NO_2$ , lepkość 0,03–0,05 Pa·s;
- 20% fenylotrimetoksylanu, prod. Aldrich, nr kat. 104744, wzór chemiczny:  $C_6H_5Si(OCH_3)_3$ , gęstość  $1,062\text{ g/cm}^3$  w  $25^\circ\text{C}$ , współczynnik załamania światła  $n_{20/D} = 1,468$ ;
- 5% metylotrimetoksylanu, prod. Aldrich, nr kat. 440175, wzór chemiczny:  $CH_3Si(OCH_3)_3$ , gęstość  $0,955\text{ g/cm}^3$  w  $25^\circ\text{C}$ , współczynnik załamania światła  $n_{20/D} = 1,371$ .

**Przykład 3**

Lepiszczce do zamykania preparatów mikroskopowych składa się objętościowo z:

- 70% 2-cyjanoakrylanu metylu, prod. CHEMISTIK S.J. Jaworzno, CAS: 137-05-3, wzór chemiczny:  $C_5H_5NO_2$ , lepkość 0,03–0,05 Pa·s;
- 25% fenylotrimetoksylanu, prod. Aldrich, nr kat. 104744, wzór chemiczny:  $C_6H_5Si(OCH_3)_3$ , gęstość  $1,062\text{ g/cm}^3$  w  $25^\circ\text{C}$ , współczynnik załamania światła  $n_{20/D} = 1,468$ ;
- 5% metylotrimetoksylanu, prod. Aldrich, nr kat. 440175, wzór chemiczny:  $CH_3Si(OCH_3)_3$ , gęstość  $0,955\text{ g/cm}^3$  w  $25^\circ\text{C}$ , współczynnik załamania światła  $n_{20/D} = 1,371$ .

**Zastrzeżenie patentowe**

Lepiszczce do zamykania preparatów mikroskopowych zawierające 50–90% objętościowych 2-cyjanoakrylanu metylu i/lub etylu oraz silany, **znamiennie tym**, że zawiera fenylotrimetoksylan w ilości 5–50% objętościowych oraz metylotrimetoksylan w ilości 1–30% objętościowych.