

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **034938**(13) **B1**

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2020.04.08**

(21) Номер заявки  
**201790857**

(22) Дата подачи заявки  
**2014.11.18**

(51) Int. Cl. **A61K 31/35** (2006.01)  
**C07D 311/30** (2006.01)

---

### (54) СОСТАВ КРАСИТЕЛЯ ДЛЯ ТКАНЕЙ И КЛЕТОК С НОВОЙ МОЛЕКУЛОЙ, ПОЛУЧЕННОЙ ИЗ PAPAVER RHOEAS

---

(31) **2014/12329**

(32) **2014.10.21**

(33) **TR**

(43) **2017.12.29**

(86) **PCT/TR2014/000410**

(87) **WO 2016/064353 2016.04.28**

(71)(72)(73) Заявитель, изобретатель и  
патентовладелец:

**БУДАК МЕХМЕТ; БУДАК ГЮРЕР  
ГЮВЕН (TR)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

(56) **WO-A1-9505169**

Danijela A. Kostic ET AL.: "Phenolic contents, antioxidant and antimicrobial activity of Papaver rhoeas L. extracts from Southeast Serbia", Journal of Medicinal Plants Research, 4 September 2010 (2010-09-04), pages 1727-1732, XP55174047, DOI: 10.5897/JMPR10.121 Retrieved from the Internet: URL: [http://www.researchgate.net/profile/Milan\\_Mitic/publication/228495369\\_Phenolic\\_contents\\_antioxidant\\_and\\_antimicrobial\\_activity\\_of\\_Papaver\\_rhoeas\\_L.\\_extracts\\_from\\_Southeast\\_Serbia/links/02e7e5333f29aa45b9000000.pdf?ev=pub\\_ext\\_doc\\_dl&origin=publication\\_detail&inViewer=true](http://www.researchgate.net/profile/Milan_Mitic/publication/228495369_Phenolic_contents_antioxidant_and_antimicrobial_activity_of_Papaver_rhoeas_L._extracts_from_Southeast_Serbia/links/02e7e5333f29aa45b9000000.pdf?ev=pub_ext_doc_dl&origin=publication_detail&inViewer=true) [retrieved on 2015-03-05] the whole document

MARKHAM ET AL.: "The structures of amentoflavone glycosides isolated from Psilotum nudum", PHYTOCHEMISTRY, PERGAMON PRESS, GB, vol. 23, no. 9, 21 August 1984 (1984-08-21), pages 2053-2056, XP026606129, ISSN: 0031-9422, DOI: 10.1016/S0031-9422(00)84969-9 [retrieved on 1984-08-21] the whole document

SHASHANK KUMAR ET AL.: "Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview", THE SCIENTIFIC WORLD JOURNAL, vol. 4, no. 10, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 847-16, XP55175108, DOI: 10.1186/1475-2859-11-155

SUNDAY EWAOCH ETODO: "Phytochemical Properties and Staining Ability of Red Onion (Allium cepa) Extract on Histological Sections", JOURNAL OF CYTOLOGY & HISTOLOGY, vol. 05, no. 06, 1 January 2014 (2014-01-01), XP55175049, DOI: 10.4172/2157-7099.1000275 the whole document

(57) Изобретение относится к соединению для окрашивания ядер клеток, полученному из экстракта Papaver rhoeas. Также раскрыто применение указанного соединения для окрашивания ядер клеток для микроскопической оценки в гистопатологии, микробиологии или цитологии в автоматизированных или ручных диагностических способах окрашивания. Кроме того, предложена композиция для окрашивания ядер клеток при микроскопической оценке в гистопатологии, микробиологии или цитологии в автоматизированных или ручных диагностических способах окрашивания, содержащая указанное соединение.

**B1****034938****034938****B1**

### Область техники

Краситель из *Paraver rhoeas* содержит новый биофлавоноид вместе с производными и синергическими молекулами. Новый ядерный краситель составляют из экстракта *Paraver rhoeas* для диагностических целей, обеспечивая специфическое окрашивание ядер "клеток и тканей". Настоящее изобретение относится к красителю, являющемуся составом, альтернативным общепринятому красителю "гематоксилину", а также обладающим преимуществами для диагностики в секторе здравоохранения и вносящим вклад в экономику.

### Обзор

Состав *Paraver rhoeas*, в основном, используют в качестве ядерного красителя, и он содержит новую молекулу, может приносить 10-15 млрд долларов в экономику ежегодно и является альтернативой гематоксилину. Источник будет способствовать усилиям по сохранению находящихся под угрозой исчезновения тропических лесов, балансирующих региональные экологические системы, и будет полезен в качестве промышленного продукта (Anatech LTD. "The volatile hematoxylin market", Summer 2 008 INNOVATOR).

Состав *Paraver rhoeas* является рациональной альтернативой общепринятому красителю гематоксилину, используемому в рутинной диагностике. Увеличение потребности в гематоксиле является результатом увеличения численности человеческой популяции и диагностических терапевтических медицинских процедур. Продажная цена гематоксилина на 1 г является очень высокой, и его производство приводит к риску для мировых тропических лесов, а также для экологической системы.

В настоящем описании *Paraver rhoeas* является новым источником открытого и составленного красителя для клеток и тканей. Молекула *Paraver rhoeas* является очень активной, функциональной молекулой биофлавоноида, и ее комбинируют с эозином. Сама молекула вместе со своими производными и синергическими молекулами обеспечивает четкое окрашивание ядра в ткани и в других источниках, таких как грибы, из микробиологических образцов, делающее возможным точное окрашивание деталей, и ее можно использовать в гистопатологии, цитологии для диагностических целей. Широкий спектр цветов и подсвечивание и детализация признаков при диагностике обеспечивают получение новых диагностических параметров и результатов.

Методология окрашивания в больницах, лабораториях и на производстве, оборудование и материалы являются схожими для общепринятых способов, не требуя значительных дополнительных инвестиций. Молекулу можно использовать в качестве регулятора иммунной системы, Т-клеточного активатора, противовирусных средств, для защиты и регенерации тканей, а также в качестве индикатора и для синтеза новых витаминных комплексов. Его также можно использовать в качестве красителя в виноделии, инертного для окрашивания пищи, военной формы, детской одежды и игрушек, экологически чистом текстиле, а также для омоложения и разглаживания кожи и в качестве средства против пигментных пятен и морщин. Косметические продукты используют в окрашивании хирургических протезов и шовного материала. Они находят применение в биохимических диагностических тестах. Их также, в частности, можно использовать в производстве плазменных телевизоров, экранов монитора, нанотехнологиях, сенсорных технологиях для синтеза наночастиц для производства картриджей для принтеров. И снова, для диагностических целей будут использовать иммуногистохимию в отдельности или в комбинации с другой цифровой технологией визуализации.

### Предпосылки изобретения

*Paraver rhoeas*, как правило, растет в природе. Названием вида является *Paraver rhoeas* L, названием семейства является *Paraveraceae*. Другими названиями являются мак-самосейка, дикий мак, фландрский мак, мак садовый, *Paraver Roubini*, *Paraver tenuissima*, *Paraver tumigil*, *Paraver trilobum*, *Paraver strigosum*, которые представляют собой один и тот же вид (1-6).

Как правило, есть черное пятно на лепестке различного размера, 2 и 4 большие мохнатые чашелистики и красные листья. Завязь расположена в центре и окружена черной областью. Количество пыльцы варьируется в зависимости от размера плода, растение содержит более 200 семян на плод.

*Paraver rhoeas* растет в солнечном климате и лучше всего растет на песчаной почве. Лепесток *Paraver rhoeas* имеет химический цвет и дает реакцию, включающую *Paraveric acid*. Он имеет успокаивающий эффект, смягчающие кожу свойства и эффект в регуляции менархе, отхаркивающие, снотворные, затормаживающие наркотические и седативные свойства (7-9), применим в лечении лихорадки, симптомов бронхита и кашля, бессонницы, нарушений пищеварения и боли (10-12). Также его можно использовать для лечения неврологических симптомов, таких как гиперактивность и бессонница. Также показано, что он безопасен для детей (13-15).

Флавоноиды являются фенольными структурами, в природе присутствующими во фруктах, овощах, зерне, коре, корнях, и их обнаруживают в цветах, чае и вине (16). Идентифицировано более 5000 видов флавоноидов, однако специфический эффект встречается очень редко. Биофлавоноиды отвечают за окраску плодов (17-20). Их прием с пищей снижает степень сердечно-сосудистых заболеваний и показатель смертности (21, 22). Их производные также обнаруживают в овощах и их характеризуют как витамины, такие как, например, витамин Р (рутин). (23). Флавоноиды повышают проницаемость стенок капилляров (24), что было открыто в 1950-х гг. Флавоноиды разделяют на 4 основные группы (25, 26) и (27) их мож-

но разделять на подгруппы. Флавоноиды показаны для каждой группы характеристик в молекулярной структуре.

Флаван имеет двойную связь в ароматическом кольце в центре и планарную структуру. Флавоноиды включают 2-фенилбензопириное ароматическое гетероциклическое кольцо. Биофлавоноиды придают окраску растению, также играют важную роль в росте и развитии растений. Они создают природный барьер против УФ-излучения, при этом биофлавоноиды грибов помогают бороться с ростом оппортунистических грибов. Показано, что они имеют противомикробные и антипаразитарные эффекты. Можно осуществлять генетические изменения молекул флавоноидов микроорганизмов. Но технически эти способы являются дорогостоящими (28).

В соответствии с IUPAC 4.5 флавоноиды разделяют на 2 группы, изофлавоноиды и неофлавоноиды. Они включают 3-фенилхромен-4-он (3-фенил-1,4-бензопиран), полученный из структуры изофлавонов, и фенилкумаран, (4-фенил-1,2-бензопиран), полученный из структуры биофлавоноида.

Биофлавоноидам дают название соединения в зависимости от того, содержат ли они кетон, флавоны и флавонолы. Термин "флавоноиды" также является более широким, чем "неполигидроксикетон", используемый для описания соединений полифенолов. Флавоноиды содержат три кольца, или гетероциклическая структура имеет конфигурацию, соответствующую общей 3-кольцевой модели структуры флороглюцина. Молекулы изофлавоноидов можно получать посредством генетической инженерии (28).

Лепестки и коробочки *Paraver rhoeas* продуцируют некоторые алкалоиды. Эти алкалоиды при нагревании с кислотой преобразуются в активный комплекс под названием порфирин. В результате известной реакции сложные алкалоиды приобретают красную окраску. В Клауман это называют "принципом красного окрашивания" (29-33), и окрашивание проявляется в зависимости от pH реакций (33-35).

Биофлавоноиды контролируют кислородное повреждение, предотвращая перекисное окисление липидов (36-38), ускоряя реакции в качестве антиоксиданта против активных форм кислорода. (39, 40). Такие восстановители, как супероксиддисмутаза, каталаза и глутатионпероксидаза, аскорбиновая кислота и  $\alpha$ -токоферол, снижают внутреннее окисление активных форм кислорода (41).

Некоторые флавоноиды преобразуют активные формы кислорода в неактивный радикал пероксинитрит (42). Многие флавоноиды могут взаимодействовать с эндотелиальными клетками и макрофагами, в которых они снижают активность оксида азота, синтазы оксида азота (43) и, таким образом, реагируют с крайне вредным пероксинитритом, индуцируя продукцию бескислородных радикалов.

Флавоноиды действуют в качестве антиоксидантов, также устраняя остаточные свободные радикалы и, таким образом, снижая повреждение клеток, и также могут реагировать с оксидом азота (44), и флавоноиды ингибируют молекулы оксида азота (45).

Оксидативное повреждение флавоноидами (46, 47) приводит к ингибированию оксидазной активности ксантина (48) и делает возможным снижение лейкоцитарного воспаления (49). Продукция супероксида некоторыми флавоноидами (50) ингибирует дегрануляцию нейтрофилов без каких-либо последствий. Дегрануляция тучных клеток направлена внутрь мембраны, т.к. рецептор  $\text{Ca}^{2+}$  имеет эффект в отношении контроля канала (51, 52).

Флавоноиды имеют железосвязывающие и железостабилизирующие свойства, также ингибируя перекисное окисление липидов (53-56). Некоторые флавоноиды (57-59) снижают количество воспалительных клеток, т.к. адгезия нейтрофилов обеспечивает оптимальную воспалительную реакцию. Однако, в основном, они могут снижать активацию комплемента. Флавоноиды снижают продукцию пероксидазы. Активация A1-антитрипсина посредством его восстановления ингибирует продукцию активных форм кислорода. Протеолитические ферменты будут демонстрировать прогрессивную инактивацию арахидоновой кислоты в ферментативных системах (60-62) вместе с противовоспалительными и антитромбогенными свойствами (63).

Исследования среднего суточного потребления флавоноидов ограничены. Например, потребление витамина С более чем в три раза превосходит потребление флавоноидов (64). Потребление флавоноидов значительно варьируется в разных странах (65, 66). Определение потребления флавоноидов с пищей с помощью когортных исследований является затруднительным. Исследования, посвященные метаболизму, абсорбции и экскреции флавоноидов на людях, также ограничены (67-72). Гликозилированная форма абсорбируется лучше, чем агликоновая форма. Конъюгация происходит в кишечнике и печени (73).

Метаболизм флавоноидов начинается в клетках кишечника, конъюгация глюкуронида происходит посредством связывания альбумина после транспорта в печень и завершения присоединения сульфатной группы, метильной группы или и того, и другого к конъюгату флавоноида. Чем более активен конъюгированный биофлавоноид, тем ниже показатели смертности и сердечно-сосудистых заболеваний у жителей Средиземноморья.

Так называемые токсические эффекты биофлавоноидов плохо изучены (74-79). Широко обсуждаются их мутагенные свойства (80-82). Однако другие длительные исследования на людях демонстрируют низкую вероятность определенных канцерогенных побочных эффектов. Флавоноиды токсичны для злокачественных клеток или иммортализованных клеток, но они менее токсичны для нормальных клеток (83-85). В исследованиях флавоноидов *in vitro* показана противоаллергическая, антиоксидантная, противомикробная, антибактериальная, противогрибковая, а также некоторая другая биологическая, фармако-

логическая активность, а также противовирусный эффект.

Wang et al. (87) продемонстрировали противовирусную активность флавоноидов в исследовании, осуществленном с помощью вируса простого герпеса, ВИЧ, а также респираторно-синцитиального вируса, вируса парагриппа и аденовируса. Эффекты флавоноидов могут отличаться для разных стадий репликационного цикла вируса (88). Агликоновая форма флавоноида (89) имеет ингибиторный эффект в отношении ротавируса. Есть исследования их ингибиторной активности как средств против ВИЧ, действующих на обратную транскриптазу или ДНК-зависимую РНК-полимеразу (90). Значительное влияние ранее определенных флавоноидов на лечение пациентов с ВИЧ не определено (91). Исследования флавоноидов *in vitro* в отношении генетики лейкоза (MLL) считают важными в исследовании мутационных эффектов при репликации ДНК по причине ингибирования ферментов топоизомераз. Влияние на циклооксигеназу и липоксигеназу наблюдают по противовоспалительным эффектам. Мембранная тирозинкиназа (92, 93) является ключом к ингибированию флавоноидами различных иммунных ответов.

Эндотелиальный ангиогенез регулируется рядом развивающихся реакций. При этом потребление флавоноида имеет обратную корреляцию со скоростью роста рака легких и меланомы. Однако механизм антиангиогенных эффектов флавоноидов не ясен. Возможным механизмом может являться ингибирование протеинкиназы (94-104).

Клинические исследования на мужчинах показали, что регулярное потребление флавоноидов с пищей, по-видимому, снижает риск смерти от ишемической болезни сердца. Кроме того, предполагают, что потребление флавоноидов (105, 106) предотвращает развитие деменции. Сообщают об обратной корреляции между общими концентрациями холестерина в плазме и наличием оксидативного стресса и повреждением сосудов. Потребление флавоноидов снижает риск деменции. Изменяя механизмы сосудистого воспаления можно в значительной степени регулировать артериальное давление и гипертензию. Кровеносные сосуды ингибируют связанные с оксидативным стрессом пути передачи сигнала в клетках, повышая функцию эндотелия капилляров, снижая риск атеросклероза. Образование тромба является ингибированием образования тромба посредством ингибирования агрегации тромбоцитов. Флавоноиды имеют (а) прямую антибактериальную активность, (б) синергическую с антибиотиками активность и (с) те же супрессорные эффекты в отношении вирулентности бактерий.

Кроме того, неподходящие процедуры и ограниченная работа с оксидативным повреждением клеток и цель измерить *in vivo* эффекты чрезмерной величины силы. Необходима разработка аналитических способов для получения большего количества данных в отношении абсорбции и экскреции. В свете известной на настоящий момент информации рекомендуют потребление флавоноидов (107-112) с фруктами, овощами и напитками (например, чаем и красным вином).

В гистопатологии и цитологии в диагностических, учебных и исследовательских целях фиксированные и живые образцы тканей и клеток окрашивают для идентификации конкретных патологических признаков с использованием микроскопического исследования и оценки для определения диагностических признаков в тканях и клетках. Сначала образцы тканей или клеток помещают на предметное стекло для микроскопической оценки. Перед окрашиванием составом из *Paraver rhoeas* эти образцы являются бесцветными, полупрозрачными или прозрачными. Новый состав активно проникает в слои ткани и достигает мембраны клетки, а затем ядра. Окрашивание, обеспечиваемое составом, представляет собой способ окрашивания и соответствующей микроскопической оценки, позволяющей определять и понимать признаки, демонстрирующие взаимосвязь между необходимой информацией о структурах, он должен обеспечивать правильное необходимое окрашивание для различения структур в ткани и клетках.

#### Краткое описание чертежей

- Фиг. 1 - способы анализа состава красителя для тканей и клеток из *Paraver rhoeas*;
- фиг. 2 - стадии получения состава из *Paraver rhoeas*;
- фиг. 3 - способы получения предшественника из *Paraver rhoeas*;
- фиг. 4 - химическая цис-транс-структура биофлавоноида *Paraver rhoeas*;
- фиг. 5 - название молекулы и биохимическая конфигурация;
- фиг. 6 - профиль окрашивания состава из *Paraver rhoeas*;
- фиг. 7 - стадии способа окрашивания составом из *Paraver rhoeas*;
- фиг. 8 - варианты окрашивания и дифференциация;
- фиг. 9 - типы красителя для клеток и тканей из *Paraver rhoeas* с учетом профиля окрашивания;
- фиг. 10 - пример получения состава из *Paraver rhoeas*;
- фиг. 11 - состав из *Paraver rhoeas* позволяет специфически выделять ядра клеток в ткани легкого;
- фиг. 12 - состав из *Paraver rhoeas* позволяет специфически выделять ядра клеток в ткани легкого;
- фиг. 13 - состав из *Paraver rhoeas* с эозином позволяет выявлять ядра клеток и детали ткани в ткани легкого;
- фиг. 14 - состав из *Paraver rhoeas* с эозином позволяет выявлять ядра клеток и детали ткани в ткани легкого;
- фиг. 15 - состав красителя из *Paraver rhoeas* позволяет выявлять структурные особенности грибов;
- фиг. 16 - пропорциональные спиральные тубулярные структуры в лепестке *Paraver rhoeas*;
- фиг. 17 - цистернальные структуры в лепестках *Paraver rhoeas*, выявленные с помощью атомно-

силовой микроскопии;

фиг. 18 - анализ ЯМР молекулы, полученной из *Papaver rhoeas*.

### Термины и определения

I. Настоящее изобретение относится к красителю для ядер клеток в биологических образцах, описывают новый краситель для клеток и тканей (состав для текстурированной окраски клеток из *Papaver rhoeas*). Обнаружено, что этот краситель содержит новые активные биофлавоноиды.

II. Термины используют для лучшего описания настоящего изобретения, для практического осуществления и для удобного его объяснения.

III. Если в настоящем описании встречается какая-либо новая терминология, объясняют свойства нового термина и тщательно и подробно описывают его.

IV. Термины можно выражать в единственном или множественном числе. Значения не ограничены значениями, представленными в качестве примера.

V. Термин "производное" рассматривают в терминах количества молекул, включая 1, 2, возможно 3, и это количество можно снижать до 4 или менее или повышать его в конкретных вариантах осуществления.

VI. Термин "синергическая молекула" рассматривают в значении количества молекул, включая 1, 2, 3, и это количество можно повышать до 4 или более и в конкретных целях по изобретению.

VII. Как правило, водопроводную воду в качестве растворителя для промывки в способах окрашивания используют очень экономно. Фактически, в рамках изобретения термин "вода" включает варианты, такие как дистиллированная или деионизированная вода, а также, в частности, водопроводная вода.

VIII. "Биологический образец" получают из прокариот, *kökel* архей или эукариот (например, насекомых, простейших, птиц, рыб, пресмыкающихся). Или из млекопитающих (например, крыс, мышей, коров, собак, осла, морской свинки или кролика), или приматов (например, шимпанзе или человека). Биологические ткани или жидкости можно получать *in vivo* или *in vitro*. Такие образцы, физиологические жидкости (такие как кровь, плазма крови, сыворотка или моча) включают клетки, органеллы клеток, выделенные органы, биологические образцы, хотя ткани и фракции могут содержать все или часть из них. Биологические образцы также выделяют из части биологического образца. Белковые биологические образцы могут содержать углеводы и нуклеиновые кислоты.

IX. Цитологические или биологические образцы, ткани и биологические жидкости, не ограниченные образцами, подлежат оценке по изобретению. Смывы из полостей тела, смывы с глаз, кожный барьер, щечные слюнные железы, кровь и влагалищные железы, костный мозг, моча, предэякулят, выделения из сосков, сперма, молоко, мокрота, слизь, плевральный выпот, выпот в малом тазу, синовиальная жидкость, асцитная жидкость, мазок из шейки матки, мазок из прямой кишки, аспират, пункционный биоптат, жидкости, полученные при хирургической операции или аутопсии, образцы ткани, плазма, сыворотка, спинно-мозговая жидкость, лимфа, пот, слезы, мокрота, слюна, опухоли, жидкости, органы и культуры линий клеток и тканей *in vitro*, подверженные забору для цитологического анализа. Биологические образцы клеток и тканей можно использовать в окрашивании после фиксации и заключения в парафин. Этот препарат помещают на предметное стекло для исследования. Образцы можно использовать для окрашивания на грибы, паразитов и микроорганизмов. Технические различия в получении биологического образца для стадии его окрашивания не накладывают какое-либо ограничение на изобретение.

X. Раствор красителя хранят при комнатной температуре с использованием жидкости, такой как вода или химические растворители, в растворителе. Вода (приблизительно 50 об.% или более) содержит жидкость или полиолы, содержащие один или несколько низших алканолов и воду. Варьируется в зависимости от модификаций. Растворителями, подлежащими использованию, являются этанол, дистиллированная вода, метанол, проточная вода, этиленгликоль, пропиленгликоль, метанол и формальдегид.

XI. С помощью термина описывают антиоксидантную способность молекул в отношении высшего оксида, и молекула находится в среде, предотвращающей окисление других молекул.

XII. Можно добавлять молекулу низшего алканола; ОН-группу, алкильную группу (метильная группа, этильная группа, n-содержащая является алкильной группой из 1-5 атомов углерода), пропильную группу (изопропильную группу, n-бутильную группу, бутильную группу, трет-бутильную группу, n-группу, изопентильную группу, неопентильную группу или пентильную группу) и низший (алканами являются метанол, этанол и изопропанол).

XIII. Термин относится к вторичным окислительным молекулам, обладающим более высоким окислительно-восстановительным потенциалом, чем у другой молекулы. Можно использовать различные химические окислители для различных составов. Соли йода и йодат калия, йодат натрия, оксид цинка, перманганатную соль или перманганат калия, перйодат натрия, перйодат калия и пероксиды, пероксид водорода, перйодат, гипохлорит кальция, *klogamit*, хлорная известь, йодат натрия, оксид цинка, йод, гипохлорит натрия, гидрохлорид и гидроксид бария.

XIV. Протрава может связываться с катионными комплексирующимися молекулами красителя, являющимися металлами. С помощью новых молекул можно определять ДНК внутри клеток, миелин, эластин и волокна коллагена полосок мышц и митохондрии, что также связано с синергическим действием

молекулы. Можно упомянуть следующие примеры протрав: сульфат алюминия, сульфат алюминия-калия, сульфат алюминия-аммония, хлорид алюминия, железо, вольфрам, цирконий, висмут, молибден, фосфомолибденовую кислоту или молибденовую кислоту, ванадий (ванадат) алюминия или алюмоаммониевые квасцы, сульфат алюминия, алюмокалиевые квасцы, ацетат алюминия, хлорид кальция, нитрат алюминия, железо, сульфат аммония, сульфат железа(II), ферроцианид калия, феррицианид калия, хлорид железа(III), ацетат меди, железоммачные квасцы, алюминий, нитрат висмута, молибденовую кислоту и фосфомолибденовую кислоту. Протрава с различными металлами будет приводить к различному окрашиванию. Например, алюминий, фиолетово-синий; железо, сине-черный; хром, сине-черный; медь, сине-зеленый; никель, фиолетовый; олово, красный; свинец, темно-коричневый; осмий, зелено-коричневый.

XV. Смесь состава красителя получают, добавляя кислоту к клеткам из биологического образца, что повышает специфичность окрашивания ядра. С этой целью можно использовать уксусную кислоту, салициловую кислоту, лимонную кислоту, соляную кислоту, серную кислоту, насыщенную этаноловую муравьиную кислоту, аскорбиновую кислоту.

XVI. Термин "антиоксиданты" используют в смысле стабилизации, способствующей поддержанию оптимальной длительности окисления и повышающей срок годности. Стабилизатором является глицерин, хлоралгидрат, диэтиленгликоль, йодид калия, этиленгликоль.

XVII. "Молекула" является органической молекулой, которая может соединяться в различных точках присоединения с другими молекулами и образовывать сложные структуры. Можно конкретно получать новую композицию и молекулярную структуру с разнообразными комбинированными композициями молекул красителя. Различные молекулярные структуры и синтезированные структуры, присоединенные к этим молекулам, с различными свойствами могут образовывать указанные производные. Некоторыми примерами этих полисахаридов являются следующие. Рассматривают амилозу или циклодекстрин и многие альдозные кольца, моносахариды, глюкозу, фруктозу и галактозу, дисахариды (сахарозу), другие связывающие молекулы, содержащие простые эфиры, такие как мальтоза и лактоза, дендримеры, нанотрубочки, каликсарены, валиномицин и нигерицин.

XVIII. На всем протяжении описания и формулы изобретения термин используют в конкретных выражениях. Термин "приблизительно" означает, что конкретное значение не ограничено точным значением, а модифицировано термином. Если не указано иначе, это применимо в настоящем описании к молекулярной массе, условиям реакции и ингредиентам, например в формуле изобретения всем числам, выражающим количества признаков, следует понимать, что в каждом случае оно модифицировано термином. Таким образом, если не указано иначе, можно подробно описывать в следующем описании, где, по меньшей мере, количество значимых цифр для каждого числового параметра, заданного желаемыми свойствами и их указанными числовыми параметрами.

XIX. Термин "алкил" означает разветвленные, неразветвленные алкильные группы (например, метил, этил, пропил, бутил, пентил, гексил, гептил, октил, нонил, децил и т.д.), относится к насыщенным алифатическим группам, включая неразветвленные алкильные группы (изопропил, трет-бутил, изобутил и т.д.), неразветвленный или разветвленный алкиловый остов с 6 или менее атомами углерода (например, C<sub>1-6</sub>, в случае C<sub>3-6</sub>-разветвленной цепи, неразветвленной цепи), остов (например, C<sub>1-4</sub>-неразветвленная цепь или 4 или менее атомов углерода в случае C<sub>3-4</sub>-разветвленной цепи). Термин "C<sub>1-6</sub>"-алкил относится к алкильным группам, содержащим 1-6 атомов углерода. В рамках изобретения термин "C<sub>1-4</sub>"-алкил означает алкильные группы, содержащие 1-4 атома углерода. Кроме того, термин "алкил", включая "замещенные алкилы" и "замещенные алкилы" последней половины замещенного углеводородного остова, означает алкил, содержащий заместители, которыми замещают водород на одном или нескольких атомах углерода. Такие заместители включают, например, C<sub>1-4</sub>-алкил, C<sub>1-4</sub>-алкоксигруппу, аминогруппу (C<sub>1-4</sub>, включая алкиламиногруппу и C<sub>1-4</sub>-диалкиламиногруппу), циклоалкил и (фенил, включая нафтил) арилы, гидроксил, цианогруппу, галоген или нитрогруппу. Также показаны арильные, алкильные и циклоалкильные заместители, как описано выше.

XX. Термин "алкоксигруппа" относится к атому кислорода, ковалентно связанному с замещенной и незамещенной алкильной, алкенильной и алкинильной группами. Неограничивающие примеры алкоксигрупп включают метоксигруппу, этоксигруппу, изопропоксигруппу, пропоксигруппу, бутоксигруппу, пентоксигруппу. В некоторых вариантах осуществления они включают неразветвленные или разветвленные алкоксигруппы из четырех или менее атомов углерода, разветвленный остов (например, C<sub>1-4</sub>-неразветвленную, C<sub>3-4</sub>-разветвленную цепь). В рамках изобретения "C<sub>1-4</sub>"-алкил относится к алкильным группам, содержащим 1-4 атома углерода.

XXI. В рамках изобретения термин "амин" или "аминогруппа" означает структуру, в которой по меньшей мере один атом углерода или измененный атом азота ковалентно связан с гетероатомом. Алкильные группы могут находиться в остове из 4 или менее атомов углерода (например, C<sub>1-4</sub>-неразветвленная, C<sub>3-4</sub>-разветвленная цепь), C<sub>1-4</sub>-алкиламиногруппа, азот является по меньшей мере одним дополнительным C<sub>1-4</sub>-соединением с алкильной группой, означает, что группы и соединения C<sub>1-4</sub>-алкиламиногруппа, азот связан по меньшей мере с двумя дополнительными C<sub>1-4</sub>алкильными группами и относится к группам и соединениям.

XXII. Термин "арил" включает, например, бензол, фенил, пиррол, фуран, тиофен, группы, содержащие тиазол с 0-4 гетероатомами, например, относится к 5- и 6-членным однокольцевым ароматическим группам изотиазолу, имидазолу, триазолу, тетразолу, пиразолу, оксазолу, изоксазолу, пиридину, пиразину, пиридазину, пиримидину и т.п. Кроме того, термин "арил" относится к полициклическим арильным группам, например трициклическим, бициклическим, например нафталину, бензоксазолу, бензобисоксазолу, бензотиазолу, бензимидазолу, бензотиофену, метилendioксифенилу, хинолину, изохинолину, такие группы также включают индол, бензофуран, пурин, бензофуран, включает деазапуриновую структуру или с гетероатомами в индолизине. halk - эти арильные группы, "арильные гетероциклические", "гетероарильные" или "гетероароматические" также можно выражать следующим образом. Ароматическое кольцо, как описано выше, такое как обнаруживают в одном или нескольких положений кольца с такими заместителями, C<sub>1-4</sub>-алкил, C<sub>1-4</sub>-алкоксигруппа, (C<sub>1-4</sub>-алкиламиногруппа и C<sub>1-4</sub>, включая диалкиламиногруппу) аминогруппа, гидроксигруппа, цианогруппа, галоген или нитрогруппа. Арильные группы также могут являться конденсированными, полициклическими (например, тетралин), которые создают достаточно неароматический алициклический или köprülenebilir. гетероарил, включают, например, гетероциклические кольца Lazarus, включают оксиран, dithiet to, пирролин, пиррол, фуран, дигидрофуран, дигидротииофен, тиофен, пиразол, имидазол, оксазол, тиазол, изотиазол, 12,2,3-триазол, 1, 2, 4 включают ненасыщенные циклические соединения, триазол, дитиазол, тетразол, пиридин, пиран, пиримидин, пиран, thiаруг клапан, диазин, тиазин, диоксин, триазин и тетрацен.

XXIII. Термин "антитело" специфически связывается с конкретным пространственным и полярным, таким образом, что он дополнительно относится к молекуле иммуноглобулина, определяемой как комплементарная организация. Антитело может являться моноклональным или поликлональным и его получают посредством сбора секретируемого белка из гибридных клеток (моноклональное) или сбора сыворотки хозяина (поликлональное). Антитело является полным иммуноглобулином или может содержать его фрагмент, например IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3, ıgm.çeşitl классы и изотипы, функциональные фрагменты антител, включая, часть, способную сохранять связывание с аффинностью, схожей с полноразмерным антителом (например, Fab, Fv и F(ab'). Sub.2 или Fab').

XXIV. Термин "связывающее средство" относится к молекуле, способной связываться с одной или несколькими мишенями в биологическом образце. Связывающие средства можно соединять уникальным способом. Подходящие связывающие средства включают природные или модифицированные пептиды, белки (например, антитела, аффитела или аптамеры), нуклеиновые кислоты (например, полинуклеотиды, ДНК, РНК или аптамеры); полисахариды (например, лектины, сахара), липиды, ферменты, субстраты ферментов или ингибиторы, лиганды, рецепторы, антигены или гаптены. Подходящее связывающее средство для образца, подлежащего анализу, которое можно выбирать и определять в зависимости от текущей цели.

XXV. Подходящее связывающее средство для образца, подлежащего анализу, которое можно выбирать и определять в зависимости от текущей мишени. Например, мишень может включать лиганд в образце, и связывающее средство может включать рецептор, или мишень может включать рецептор, и связывающее средство может включать лиганд. Аналогично, мишень может включать антиген и антитело или его связывающий фрагмент, или наоборот, или может содержать антитела. В некоторых вариантах осуществления мишень может включать нуклеиновую кислоту, и связывающее средство может включать комплементарную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления и мишень, и связывающее средство могут включать белки, способные связываться друг с другом.

XXVI. Любое изменение новой функциональности и молекулярных продуктов печи не будет ограничивать настоящее изобретение, и их считают возможными по настоящему изобретению.

#### **Подробное описание изобретения**

В настоящем описании представлен новый краситель для ядер клеток, полученный из экстракта *Paraver rhoeas*. Этот новый гистологический краситель содержит очень активный и функциональный биофлавоноид. Состав *Paraver rhoeas* демонстрирует характеристики образцов клеток и тканей как новый ядерный краситель, демонстрирующий биологические характеристики различных профилей, примененных в гистопатологии, цитологии и микробиологии (фиг. 11, 12).

Свойства ядра клетки патологии оценивают в целях диагностики и, в частности, для определения злокачественных или метастазирующих клеток, однако отделение от диагностики, способствующее нахождению патологических результатов или нормальных результатов, в частности, в послеоперационных образцах и биоптатах, тонкоигольном биоптате, мазках, смывах, а также образцах, полученных инвазивными или неинвазивными способами, будут использовать для исследования препаратов, полученных посредством аутопсии.

*Paraver rhoeas* растет в природе самопроизвольно, и его легко получать для получения красителя для получения состава для окрашивания ядер тканей и клеток. Состав красителя состоит из молекулы для выделения ядра клетчатки. Молекулы анализируют и обрабатывают в других представленных и проиллюстрированных лабораторных исследованиях.

Протраву (металл) включают для обеспечения достаточного и стабильного окрашивания и добавляют кислоту. Состав из *Paraver rhoeas* демонстрировал устойчивые свойства окрашивания с четкой

морфологией клеток и в сжатой форме. В частности, при комбинировании с эозиновым красителем состав из *Paraver rhoeas* окрашивает ткани и клетки, слои тканей, мембраны, мышечную ткань, внутриядерные или внутрицитоплазматические структуры и позволяет окрашивать мелкие детали (фиг. 13, 14).

При увеличенном сроке хранения раствор красителя окисляется естественным путем или химически (113, 114). Оптимальная эффективность и степень использования окислителя будут предотвращать образование продукта избыточного окисления (115, 116).

Колебания концентрации красителя мешают стабильности окрашивания (117). Это время необходимо изменять, при этом необходимо корректировать нанесение красителя. Интенсивность окрашивания оценивают визуально. Специалист в этой области оценивает окрашивание и корректирует интенсивность окрашивания до достижения желаемого качества окрашивания.

Флавоноиды, в основном, содержат два ароматических кольца. Каждое из этих колец образует по меньшей мере одну гидроксильную группу и 6-гетероциклическое кольцо с мостиком из трех атомов углерода. Подгруппы флавоноидов сформированы по гетероциклическому кольцу, соединенному с ароматическим кольцом в зависимости от характеристик степени окисления или функциональных групп и гетероциклической структуры и связанной фракции.

В этой молекуле используют связывающие средства для соединения с различными группами и атомами, являющимися природными или модифицированными пептидами, белками (например, антителами или аптамерами), нуклеиновыми кислотами (например, полинуклеотидами, ДНК, РНК или аптамерами), полисахаридами (например, лектинами, сахарами), липидами, ферментами, субстратами или ингибиторами ферментов, лигандами, рецепторами, антигенами или гаптенами. Аналогично, присоединенная целевая группа может являться антигеном и антителом или фрагментом антитела. *Paraver rhoeas* в этом составе направленно воздействует на нуклеиновую кислоту.

*Paraver rhoeas* относится к микроскопическим, молекулярным исследованиям и исследованиям посредством атомно-силовой микроскопии (фиг. 1). Для молекулярного анализа профильтрованный раствор экстракта сушат посредством инкубации при половине скорости в горячем этаноле. Сухой образец измельчают в порошок три раза, а затем подвергают воздействию метаноловой бани в течение 1 ч. И снова жидкую фракцию выпаривают в течение ночи в инкубаторе при 30-60°C и сушат. 1 г полученного порошка растворяют в 100 см<sup>3</sup> этанола и адсорбируют на планшете из волокна. Конкретно наблюдают, что розовый планшет с 1% раствора аммония синее. Этот синий краситель растворяют в уксусной кислоте. Жидкую фракцию удаляют. И оставшийся сухой порошок подготавливают для анализа (фиг. 2, 3).

При молекулярном анализе выявляли характеристики биофлавоноида (фиг. 18), структурное биохимическое название 5-гидрокси-2-(3-(тетрагидро-6-((тетрагидро-3,4,5-тригидрокси-6-метил-2Н-пиран-2-илокси)метил)-2Н-пиран-2,3,4,5-тетраол)-4-метоксифенил)-7-метокси-4Н-хромен-4-он.

Он имеет характерную биохимическую конфигурацию биофлавоноидов (фиг. 4, 5).

Состав из *Paraver rhoeas* и эозин (118) можно использовать в виде комбинации. Молекула и ее производные синергические биофлавоноиды и новая молекула окрашивают слои ткани, мембраны, мышечные клетки, позволяя определять детали внутрицитоплазматических и внутриядерных структур, а также муцин и глиальные волокна.

Состав красителя можно модифицировать для использования *uygun deęer* состава, включающий протраву, растворитель, кислоту, окислитель или окислитель и консерванты (119).

Как правило, кислоту используют для корректировки pH раствора, и она может поддерживать более долговечный состав красителя, обеспечивать более селективное окрашивание клеток и предотвращать избыточное окисление. Таким образом, кислота предотвращает образование осадка. Можно выбирать автоматизированные или ручные способы окрашивания.

Стабилизирующая добавка предотвращает сверхбыстрое окисление и обеспечивает больший срок годности, в основном, посредством оптимизации. С этой целью используют амилозу, циклодекстрин, криптанты, криптофицин, кавитанд, краун-эфир, каликсарен, валиномицин, циклодекстрин или нигерицин.

Жидкий растворитель растворим в воде, присоединяет другие антиоксиданты. Например, *n*-пропил, *n*-октил, *n*-додецил, *n*-алкилгаллаты можно восстанавливать, такой как сорбит и маннит являются сахаром; бензоаты и гидроксibenзоаты; сульфиты и пиросульфиты; лимонная кислота, винная кислота, молочная кислота, эриторбиновая кислота, аскорбиновая кислота, мочевиная кислота, дубильная кислота и основные соли (соли  $Mg^{2+}$ ,  $NH_4$  sup.+,  $Na$ .sup.+ $K$ .sup.+ и  $Ca^{2+}$ ); добавляют ЭДТА и хлоралгидрат.

Для состава из *Paraver rhoeas* можно использовать один или несколько растворителей. Он может содержать воду, низший алканол, такой как этанол, полиол. Примеры полиолов включают глицерин, этиленгликоль, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и полипропиленгликоль.

Формалин является подходящим фиксатором для образцов тканей и клеток. Парафиновую тканевую кассету используют для получения заполненных и заключенных образцов, а затем их замораживают. Фиксированную ткань с парафином нарезают на срезы с помощью микротомы и помещают на предметные стекла. Затем препараты помещают в печь для расплавления избытка парафина и выплавляют оставшийся воск. Необходимо в полной мере осуществлять депарафинизацию ксилолом и толуолом.

Замороженные образцы ткани можно использовать в виде срезов при окрашивании. Замороженный



тканевой срезу в течение короткого периода времени держат в 10% формалине. Способ окрашивания, время и последовательность могут варьироваться в зависимости от способа составления и других условий. Также используют дополнительное окрашивание цитоплазмы эозином Y, оранжевым G, светло-зеленым SF, желтовато-коричневым Бисмарк, прочным зеленым FCF, O-6, EA25, EA36, EA50 и EA65 (122).

Состав красителя можно модифицировать в следующих составах красителя, таких как гематоксилин по Гиллу, гематоксилин Андерсона, способом де Грута, по Бейкеру, Bennett, гематоксилин Бемера, Bosma, гематоксилин Балларда, по Карацци от Coca Cola, по Debi, гематоксилин Делафильда, по Дювалю, гематоксилин Эрлиха, по Фридлендеру, Gadsdo Gage, Galigh is, по Гарви, по Грэму, по Митчеллу, гематоксилин Майера, по Массону, по Мартинонни, по Манну, по Мэллори, McLachlan, йод Lillie, по Ли, по Лонуа, по Ланжерону, Krutsay, по Кляйненбергу, Horneyold, по Хаугену, по Гамильтону, гематоксилин Гарриса, Гарриса-Пауэра, по Хаугену, по Мольнару, Paramiltiades', Pusey, по Равитцу, по Reddy и Sasser, по Шморлю, Sliders', по Унна, по Уотсону, по Вейгерту, по Райту и Андерсону и протравленный железом гематоксилин Андерсона, Cretin, по Форе, по Гольдману, по Ганзену, по Гейденгайну Janssen, по Кефаласу, включая Krajina, the krutsay, по Манну, Lillie, Lillie и Earle, по Массону, More & Bassal, по Мюррею, Paquin и Goddard, по Pero, по Розас, Seidel Thomas', по Вейгерту, по Ясвоину или протравленный висмутом гематоксилин Roach & Smith is. протравленный медью гематоксилин Бенсли, названный по Куку и Форе. Протравленный молибденом гематоксилин. Можно рассматривать протравленный ванадием гематоксилин Hedenham Smith, протравленный цирконием гематоксилин и McNulty & Smith (123).

Можно комбинировать другие красители, такие как акридиновые красители, антрахиноновый краситель, арилметановые красители, азокрасители, диазониновые красители, можно комбинировать такие красители, как нитрокрасители (в конкретных автоматизированных способах применения), фталоцианиновые красители, хинониминные красители, тетразолиевые красители, тиазоловые красители, ксантен. Образцы краски для гистологического окрашивания, уксусная кислота, кислотный желтый, 1 сульфонат кислого гудрона, 22 blue 93, кислый фуксин, кислотный зеленый, кислотный, кислотный, 1 зеленый 5, кислотный красный, кислотный оранжевый 10, кислотный красный 4, кислотный красный 26, кислотный, кислотный, кислотный красный 29, кислотный красный 44, кислотный красный 51, кислотный красный 66, кислотный красный 73, кислотный красный 87, кислотный красный 91, кислотный красный 92, кислотный красный 94, 101 красный 103, acid rosea the acid Rubin, кислотный фиолетовый 19, кислотный, кислотный, 1 кислотный желтый, 9 кислотный желтый, 23 кислотный желтый, 24 кислотный желтый, 36 желтый, желтый 73, кислотный желтый S, кислотный желтый T, акридин, акрифлавин, альциановый синий, альциановый желтый, растворимый в спирте эозин, ализарин, ализариновый синий, ализариновый синий 2RC, ализарин-кармин, ализарин-цианин BBS ализарин-цианин R, ализариновый красный S, ализарин-пурпурин, оксид алюминия, амидочерный 10B, красный аминафтол, амидочерный, анилиновый синий WS, мов, антраценовый Let G azoe blue SWR, антраценовый синий SWX, аурамин 0, азо-эозин, азокармин B, азокармин G, азоевый диазокраситель 5, азоевый диазокраситель 48, азофлосин, синий азокраситель, темно-синий, азури B, азури C, основной синий 8, the basic foundation, 9 основной синий, 12 blue foundation, 15 blue foundation, 17 blue foundation, 20 blue foundation, 26 blue brown one, basically you Fusch, basic, 4 основной красный, 5 основной красный, 2 основной зеленый, оранжевый 14, основной зеленый 5, basic essentials, 9 красно-фиолетовый 2, основной фиолетовый 4, основной фиолетовый 10, основной фиолетовый 14, basic essentials, 1 желтый желтый 2, Бибрих R, коричневый Бисмарк Y, Brazil, Brazil, shiny Croc, юриллиантовый кристаллический алый 6R, Бибрих Скарлет, кальциевый красный, кармин, карминовую кислоту, кармуазин 6, целестиновый синий B, китайский синий, хлорановый прочный красный 5B, красный, целестиновый синий, голубой Чикаго 4B, хромовый фиолетовый CG, 2 хромотроп, chromox until cyanine R, конго-коринф, конго красный, синий для хлопка, красный для хлопка, кроциновый красный 3D, Crocker's red Moon, sketch, кристаллический Понсо 6R, кристаллический красный, кристаллический фиолетовый, красновато-фиолетовый, бриллиантовый зеленый B, прямой синий 14, прямой синий 58, конго красный Крокера 28, конго красный, 10 конго красный, 7 прямой желтый, 81 конго красный, 80 красный, синий 4 диоразол, синий 8G, эозин желтоватый, эозин Y, эозин B, синеватый эозин, эозин, диоразол, эри гранатовый B, эриохром к цианину R, эритрозин B, этилэозин, этиловый зеленый, этиловый фиолетовый, синий Эванса, прочный синий B, прочный зеленый FCF, прочный красный B, прочный желтый, прочный желтый экстра, прочный желтый G, масляный черный HB, флуоресцеин, пищевой зеленый 3, galleon, галламиновый синий, генциан-виолет, желтый, лиссаминовый прочный желтый 1, INT, кермес, кермесовая кислота, ядерный прочный красный, Лас, лаккаевая кислота, фиолетовый LAUTH, светло-зеленый, ингарин, 1 blue to root, quickly rub the BBL, швейцарский синий, фиолетовый Хоффмана, гидразиновый желтый, имперский красный, лиссаминовый зеленый SF, прочный синий люксол, маджента 0, маджента II, маджента II, маджента III, малахитовый зеленый, манчестерский коричневый, желтый Марциуса, лиловый, мов, мербромин, меркурохром, метаниловый желтый, метиленовый синий метилен азури B, метиленовый синий C, метиленовый синий, метиленовый зеленый, метиловый синий, метиловый зеленый, метил-фиолетовый, метил-фиолетовый 2B, метил-фиолетовый 10B, валочный желтый 3G, синяя протрава 3, синяя протрава 10, синяя протрава 14, синяя протрава 23, синяя протрава 32, 4 натуральная красная протрава, синяя протрава 45, 11 красная протрава, 3 25 красно-

фиолетовый, пурпурно-фиолетовый 39, нафталиновый синий, черный, нафтоловый синий, черный, нафтоловый зеленый В, нафтоловый желтый S, 1 натуральный черный, натуральный красный, натуральный красный 3, natural scenic 28 натуральный красный, 25 натуральный красный, 24 натуральный красный, 16 натуральный красный, 8 красный, желтый 6, NBT, нейтральный красный, get new фуксин, ниагарский синий 3В, темно-синий, нильский голубой, нильский голубой а, нильский голубой сульфат, нильский красный, нитро ВТ, тетразолиевый голубой, ядерный прочный красный, масляный красный О, оранжевый G, orcein, парарозанилин, фиолетовый Перкина, флоксин В, пикриновая кислота, Понсо 2R, Понсо 6R, Понсо В, Понсо de you xylem, Понсо S, Ponta небесно-голубой 5В, бледно-желтый, primula to, пурпурин, пиронин В, G пиронин Y, родамин В, розанилин, пиронин, OR, красный R в красном, шарлах R, шеллак, сириус красный F3В, сириус красный 4В, сафранин, Bengal, шафрановый розовый, сириус синий выше F3, солохром к цианиновому R-растворимому синему, растворитель; 3 растворитель черный, 38 растворитель синий, 23 растворитель красный, 24 растворитель красный, 27 растворитель красный, 45 красный, желтый 94, спирторастворимый эозин, судановый III, судановый IV, судановый черный В, судановый красный ВК, сернистый желтый S, швейцарский синий, тартразин, S тиюфлавин Т, tion, blue, толудиновый красный толуол, tropaeolum G, триафлавин, тиюфлавин, уранин, трипановый синий, виктория голубой 4, виктория голубой В, виктория голубой R, виктория зеленый В, вода или водорастворимый эозин синий, red woodsta, ксилидин Понсо, эозин желтоватый и их комбинации (123-128).

В гистологии двумя наиболее распространенными металлами для протравы в качестве синергической молекулы являются алюминий и железо(III). Протравные красители образуют хелаты с ковалентным или координационным комплексом. Поливалентный ион металла протравы и молекула красителя образуют координационные комплексы. Образование хелатов приводит к образованию "лака", определяемого как поливалентные комплексы краситель-протрава. Эта молекула имеет несколько точек присоединения, и это приводит к тому, что образующиеся комплексы отличаются по своему разнообразию и функциональности.

Изменение уровня pH состава приводит к очень резкому и значительному изменению цвета. Внезапное изменение цвета объясняют изменением положений делокализованных электронов и более низкими энергетическими уровнями с электронами металлов. Металлы имеют относительно низкие энергетические уровни по сравнению с комплексной молекулярной структурой, т.е. в растворе энергетический уровень внезапно снижается при добавлении металла.

В структуре оснований ДНК и локализуется позади фосфата дезоксирибозы повышен, тимин, цитозин, гуанин и аденин в форме спиральной структуры комплементарным образом с картированием. Фосфатные группы очень важны для гистологического окрашивания. Примешивание протравы к красителю, фосфат в ДНК будет образовывать хелаты.

Электроны, необходимые для образования координационной связи, происходят из протравных красителей, связанных с кислородом фосфата. ДНК и белки содержат гидроксильные и карбоксильные группы, как и ядерный хроматин, включающий белковые компоненты и комплексы ДНК. Таким образом, даже после удаления красителя из ядерной ДНК компоненты остаются видимыми.

Неправильно фиксированные ткани нельзя оптимально окрасить. Способы быстрой обработки влияют на качество окрашивания. При использовании 10% нейтрального забуференного формалина в течение нескольких часов фиксация белков будет неправильной. Этанол является стабилизатором и дегидратирующим средством. Фиксации раствором формалина достаточно для этой цели. Если используют только этанол, на хрупких и деформированных срезах наблюдают тканевые артефакты.

При прогрессивном способе окрашивания можно не осуществлять дифференциацию в отличие от регрессивного способа. Фоновое окрашивание помимо окрашивания ядер клеток также может быть в разной степени желательным. В случае раствора для прогрессивного окрашивания наблюдают незначительное фоновое окрашивание без муцина или его отсутствие.

Однако более высокая концентрация красителя (1,5-2,0 г/л) с добавлением кислоты также обеспечивает четкое окрашивание фона. Регрессивное окрашивание (в частности, при концентрации красителя 5 г/л в указанном выше составе), по-видимому, приводит к более выраженному окрашиванию. После регрессивного окрашивания дифференциация обеспечивает четкий внешний вид ядерной морфологии. Состав для регрессивного окрашивания может являться предпочтительным в крупных лабораториях и больницах.

Алюминий аммония и калия в отдельности или алюминий с растворителем демонстрирует низкие уровни pH, однако, если буферная емкость очень ограничена, pH, в конечном итоге, будет повышаться. Однако доведение до pH кислого красителя состава, раствор щелочи в контакте с жидкостью в течение короткого периода времени не будет влиять на pH жидкости. Срок годности раствора красителя относится к протраве или красителю обратно на перенос количества щелочной жидкости. Таким образом, краситель начинает снижать активность. Первым признаком деградации является изменение цвета раствора красителя с яркого красно-фиолетового на непрозрачный красно-вишневый. Активация посредством добавления кислого красителя в раствор красителя меньше включенное количество. С этой целью 25% уксусной кислоты, 0,1% лимонной или 0,5% соляной кислоты, а также винной кислоты, молочной кислоты, эриторбиновой кислоты, аскорбиновой кислоты, мочевиной кислоты, дубильной кислоты необходимо оп-

ределять с использованием 1 л раствора, это является необходимым количеством контроля pH. Для контроля pH также можно выбирать другие кислоты. pH раствора должен составлять приблизительно 2,5. Однако можно осуществлять модификации pH 1-4 в зависимости от состава (фиг. 6).

Добавление сильной кислоты будет приводить к растворению кальция, хранящегося в тканях, и в окрашиваемой ткани накопление кальция является важным для диагностики, если (например, рак молочной железы) это может вводить в заблуждение при диагностике. Таким образом, следует избегать очень низких значений pH, к которым приводят сильные кислоты. Следует ожидать, что при добавлении таких кислот, как уксусная и лимонная кислота, будут получать состав, содержащий кислоту, приводящий к более четкому и значительному окрашиванию ядра. Другими словами, можно достигать окрашивания ядер с использованием прогрессивного идеального состава, содержащего слабую кислоту. И наоборот, кислота, не содержащая состав, демонстрирует лучшее окрашивание фона и менее четкий вид ядра. Регрессивное добавление кислоты в состав будет вносить вклад в окрашивание, но обеспечивает четкость в достижении кислого pH раствора красителя, повышенный уровень и будет повышать срок годности красителя.

Стадии способов окрашивания включают 1) депарафинизацию, 2) регидратацию (с использованием спирта), 3) промывку водой, 4) нанесение состава из Paraver rhoeas, 5) промывку водой, 6) дифференциацию, 7) промывку водой, 8) синее окрашивание, 9) промывку водой, 10) промывку спиртом, 11) обработку эозином, 12) дегидратацию (с использованием спирта), 13) промывку водой (или ксилолом) (фиг. 7).

Используют то же время окрашивания, что и в случае других красителей, и его можно корректировать в зависимости от соотношений в составе в диапазоне от 30 до 1 или 2 мин (131-133). Очень короткое время инкубации приводит к неполному и неустойчивому окрашиванию. Неудачи в получении подходящих препаратов можно скорректировать посредством перемешивания. С помощью кислоты можно удалять артефакты на препаратах. Однако это может снижать эффективность комплекса протравного красителя. 15 с перемешивания (встряхивания) с красителем снижают общее время окрашивания. Без перемешивания длительность окрашивания должна быть большей.

Для окрашивания достаточно 5 мин. Корректируя время, корректируют качество прогрессивного окрашивания. В идеале время окрашивания составляет 5-10 мин. Прогрессивное окрашивание сначала быстро начинают, и оно более независимое в плане времени и позже ограничивает само себя до точки равновесия. В случае регрессивного способа достаточно 5-10 мин. И избыток красителя удаляют кислым спиртом.

С этой целью используют дифференциацию этанолом, варьируя концентрации кислого этанола. Образец смесь 70% этанола (стандартный кислый спирт) и 5% соляной кислоты используют в течение 30-45 с. Разведение сильного кислого красителя необходимо для полного удаления папки-планшета. В настоящем изобретении вместо этанола можно использовать 70% дистиллированную воду. С помощью воды можно разводить кислоту, и дифференциация может приводить к оптимальному окрашиванию. Однако при использовании воды вместо спирта могут иметь место нарушения окрашивания. Можно выбирать n-изопропанол.

Исходным цветом кислой среды на препаратах ткани является яркий красно-фиолетовый цвет. Он не является постоянным цветом и должен перейти в устойчивый синий цвет. Красная фаза окрашивания вымывается под покровным стеклом. Синяя фаза устойчива к растворителям, нерастворима и обеспечивается водой и слабыми растворителями, устойчивое превращение обеспечивают посредством коррекции pH. Водопроводная вода или другие щелочные растворы обеспечивают синее окрашивание. Воды, а также других щелочных растворов, таких как 0,1-1% раствор карбоната лития, 0,5% ацетат натрия, 2% бикарбонат натрия и раствора Скотта вместо водопроводной воды, может быть достаточно для синего окрашивания ядер (фиг. 8).

Хлор в воде может вызывать выцветание красителя на препаратах и может полностью устранять окрашивание и отбеливание. В случае использования хлорированной воды промывка водопроводной водой должна устранять секреты, или следует использовать нехлорированную воду. Высокий pH может ингибировать последующее окрашивание эозином, если для синего окрашивания используют сильную щелочь. Дифференциацию можно поддерживать с использованием растворителей, обеспечивая контроль pH, с помощью фиксаторов, окислителей и других красителей.

Избыток красителя можно снижать с использованием протравы. Конкурирует за связывание с тканью, проникает больше протравных красителей, содержащихся в растворе, и медленно отделяет краситель от ткани. Возможно полное удаление при использовании этого способа в отношении окрашиваемых препаратов. Созревание будет повышать эффективность раствора красителя. Созревания можно достигать посредством естественного процесса окисления, который является более надежным и долговечным. Будет полезной колба большого размера, свободно закрытая ватой, что делает возможным проникновение воздуха сверху. Колбу необходимо помещать в теплое, темное и проветриваемое место для медленного окисления.

В химическом созревании используют химические окислители, что обеспечивает более быстрое и эффективное созревание. Кипячение ускоряет процесс, после кипячения йодат натрия, гипохлорит кальция, пероксид водорода, USP, перманганат калия, феррицианид калия, йодид натрия, оксид цинка можно

использовать в качестве химического окислителя помимо перйодата калия и гипохлорита натрия.

При комбинировании с солью алюминия, такой как сульфат алюминия-калия, раствор является бледным (незрелым) непрозрачным прозрачным фиолетовым и при окислении он становится ярко-фиолетовым (зрелым). Их также можно комбинировать с солями железа. Они, как правило, имеют очень темный фиолетовый цвет. В зависимости от используемого соединения в качестве окислителя можно использовать щавелевую кислоту, буру, феррицианид, перманганат калия.

Основной протравой для окрашивания может являться раствор сульфата алюминия или сульфат алюминия-калия, сульфат алюминия-аммония, сульфат алюминия-натрия, ацетат алюминия и нитрат алюминия. 5 г/л порошка красителя подлежат использованию в качестве водного растворителя, следует использовать дистиллированную воду. Соотношение протравы и красителя является приблизительно 10-кратным или меньшим. При избыточном и непрерывном окислении образуется осадок. Этот осадок также содержит протраву, как правило, неактивные производные, полученные посредством окисления. Состав красителя периодически фильтруют.

Жидкий состав из Paraver rhoeas, получаемый из экстракта, является темно-красным, и его обрабатывают различными способами. Измельченный в порошок продукт подходит для коммерческой продажи (особенно в терминах простоты транспортировки), и его готовит техник-лаборант в больницах и лабораториях. Тестируемые растворы легко транспортировать, т.к. их легко упаковывать, или можно доставлять в соответствующую больницу в темных контейнерах.

При реакции уксусной кислоты с корой ядерного хроматина получают более устойчивое и четкое изображение ядра. Состав красителя с алюминиевой протравой имеет кислый pH (pH от -3,3 до -2,5). Эффективность окрашивания структур может снижаться, если контейнеры с красителем перемещали при многочисленных промывках при окрашивании. Добавление нового раствора будет усиливать покрытие. Есть менее эффективные производные, образующиеся в растворе после окисления, приводящие к образованию некоторого осадка. Жидкий состав можно хранить в бочке или контейнере, покрытым тонким слоем масла для предотвращения аэробного окисления.

Эозин Y или другие красители можно использовать в качестве контркрасителя для цитоплазмы. В этом случае применимы общие принципы, но результатом является субъективная оценка. Контрастный краситель идеален не только потому что он хорошо выделяет синие компоненты кора вне ядра, но также должен позволять четко отличать ткани друг от друга (фиг. 14), должен позволять отличать от образца коллагена новую мышечную ткань. Эозин Y, как правило, растворим в 95% этаноле, таким образом, если препарат пластинки CAs с закрытым, если спирт оставляют на слишком большой период времени в ту boyanmisla будет становится бесцветным. Если оставляют в 95% этаноле на слишком большой период времени, таким образом, можно получать окрашенную ЕО бесцветную ткань, оно составляет менее чем 100% этанола по разрешению Eop, но здесь тоже краситель удаляют из ткани. Для избежания этой проблемы после быстрого погружения эозинофильных препаратов 7-10 раз необходимо промывать 95% этанолом остаток или форму. Красное окрашивание эозином создает подходящий контраст для синего ядра. Эозин Y, как правило, имеет немного желтовато-оранжевый цвет, но уксусная кислота делает его более красным.

Интенсивность красного окрашивания важна для различения структур вне ядра. Неправильное окрашивание вызывает слабое окрашивание, с другой стороны, слишком много красителя вне ядра затрудняет различение структур ткани. Докрашивание эозином при комбинировании дает коллагену бледно-розовый цвет, мышечной ткани темно-розовый, ацидофильной цитоплазме красный, базофильной цитоплазме фиолетовый, ядру темный фиолетово-синий, эритроциты окрашиваются красным. Эозин необходимо наносить на препараты приблизительно через 1 мин после окрашивания составом Paraver rhoeas.

Затем необходимо вымывать большую часть эозинового красителя (129, 130). Предпочтительно с этой целью выбирают концентрацию 50, 75 и 95% серии растворов этилового спирта.

Преращение окрашивания является важным критерием, но то, когда его лучше осуществлять, оценивают визуально по интенсивности цвета и контрасту. Опыт в получении стандартов и контроле качества окрашивания приводит к улучшению эффективности окрашивания (134-138).

Состав из Paraver rhoeas используют для окрашивания биологических образцов не принадлежащих человеку тканей. Например, детально окрашивают дрожжи в образце (фиг. 15).

И снова при световой и атомно-силовой микроскопии наблюдали цистернальную структуру, расположенную в идеальном порядке, заполненную жидкостью, образуемую исключительными пропорциональными спиральными трубками (фиг. 16, 17).

#### Примеры

Пример 1. Получение предшественника. Замороженные, свежие или высушенные лепестки Paraver rhoeas используют в получении экстрагируемого красителя (фиг. 9). Листья фрагментируют, добавляют дистиллированную воду, а затем позволяют отстаиваться в течение ночи, затем прессуют для экстракции жидкого красителя, получают предшественник. Сначала красители являются фиолетовыми, красными, фиолетово-красными, красно-фиолетовыми и красновато-синими. После фильтрации раствор является таким, что соотношение формалина, этанола, метанола составляет 1/10, включают растворитель, такой как другой простой эфир и сушат при высокой температуре в инкубаторе при 30-60°C. Высушенный сы-

рой материал снова обрабатывали метанолом и отделяли осадок. Этот осадок используют для получения порошкообразного сырья. Этот осадок добавляют в холодный или кипящий этиловый спирт (1 г красителя/100 этилового спирта) и растворяют. Эту жидкую смесь (холодную или при температуре кипения) добавляют к 1000 мл деионизированной воды.

Пример 2. Для молекулярного анализа раствор экстракта фильтровали, обрабатывали этанолом и высушивали в инкубаторе. Сухой образец распыляли, а затем три раза пропускали через метаноловую баню, помещали в инкубатор на ночь при 30-60°C и выпаривали жидкую фракцию. 1 г полученного порошка растворяют в 100 см<sup>3</sup> этанола и абсорбируют на волокнах на планшете. Наблюдают синее окрашивание розовых планшетов при использовании 1% раствора аммония. Этот синий краситель растворяют в уксусной кислоте. Удаляли жидкую фракцию для анализа оставшегося сухого порошка.

Пример 3. Химический окислитель использовали в композиции этой новой молекулы частично или полностью. Производные молекулы будут образовываться в результате окисления. Однако также могут образовываться менее активные комплексы. Молярное соотношение окислителя и молекулы составляет от 4:1 до 1:1. Краситель в растворителе содержит множество протрав (протраву на основе алюминия, железа, висмута, меди, молибдена, хрома, ванадия и циркония) (120, 121). Молярное соотношение молекулы и протравы составляет 2:1 и 1:100, это соотношение отличается в зависимости от составов, например, оно изменяется с 1:20 на 1:5. Состав также может содержать кислоту, такую как уксусная кислота. Конечный протравный краситель и раствор растворителя (например, AlCl<sub>3</sub> 80%. 10-50 г/л) имеет кислый pH. Посредством добавления кислоты в состав регулируют специфичность окрашивания ядер и повышают срок годности. Синее окрашивание позволяет выделять форму ядра клетки. Добавление уксусной кислоты в состав красителя делает цвет ярким коричневатого-фиолетовым (фиг. 10).

Пример 4. Хотя идеальный pH состава составляет 2,5, он варьируется от 1 до 4. В некоторых конкретных вариантах осуществления окислителем является йодат натрия в композиции, сульфат алюминия в качестве протравы, хлорид алюминия, антиоксиданты в виде β-циклодекстрина, от 60 до 90% воды в качестве растворителя, можно использовать от 10 до 40% этиленгликоля в смеси. Можно использовать п-пропилгаллат, гидрохинон и один или несколько водорастворимых антиоксидантов.

Пример 5. Окрашивание осуществляют прогрессивным или регрессивным образом. Биологические образцы помещают на микроскопические стекла. Способ также можно использовать для цитологических образцов, помещенных на микроскопические стекла. Для докраски выбирают эозин.

Пример 6. Стабилизаторы предотвращают избыточное окисление, испарение и, в конечном итоге, осаждение. Состав красителя получают с использованием количества растворителя и устанавливают соотношение краситель/растворитель 1-20 г/л. Для растворов для прогрессивного окрашивания используют минимум 1 г красителя на 1 л, и краситель для регрессивного окрашивания содержит по меньшей мере 5 г/л растворителя. Если количество протравы остается постоянным, менее концентрированный краситель в растворе позволяет осуществлять более селективное окрашивание ядра клетки. Например, для достижения оптимальной селективности добавляют 5 мл 10% раствора красителя и повышенное количество более 10% спиртового раствора красителя.

Пример 7. Если концентрация является более низкой и соотношение протравных красителей/красителя в растворе является высоким, остается в растворе и небольшое количество красителя и прикреплается к ткани. Добавление кислоты, такой как 0,1% или 2% уксусная кислота, лимонная кислота, повышает срок годности.

Пример 8. Очень низкий уровень pH раствора важен для диагностики, т.к. кальцификаты в ткани также могут растворяться. Таким образом, диагностика может приводить к ошибкам и исключению раствора с сильными кислотами. Увеличивающиеся концентрации 0,2 мл ледяной уксусной кислоты можно тестировать посредством добавления 0,1 мл HCl. Используя 5 г красителя и 50 г протравы (сульфат алюминия) получают состав для регрессивного окрашивания (соотношение 1/10), используя 1 г красителя и 50 г протравы (сульфат алюминия) получают состав для прогрессивного окрашивания (соотношение 1/50) (фиг. 9).

Пример 9. 1000 мл деионизированной воды в точке кипения помещают в большую колбу. Она включает 50 г сульфата аммония, смеси позволяют охладиться. 4 г сухого порошка помещают в колбу, перемешивают с 0,4 г йодида натрия, растворяют в 50 мл холодной воды. Добавляют 100 см<sup>3</sup> этиленгликоля, смешивают с ним и добавляют 10 см<sup>3</sup> уксусной кислоты (pH составляет от 2,7 до 3,1). Стоковые растворы смешивают друг с другом. Краситель готов к использованию. Время нанесения красителя необходимо оптимизировать в ходе исследования.

Пример 10. Также возможны модификации. Добавление кислоты к 100 г бескислотного состава для регрессивного окрашивания, где 5 г красителя протравного красителя состава с. В этом случае соотношение составляет 1/20 (5 г красителя+100 г сульфата алюминия). 1-2 г для состава для прогрессивного окрашивания на 1 л и 5-6 г состава для регрессивного и промежуточного окрашивания содержит 3-4 г красителя. Получение красителя и нанесение должны быть понятны специалисту в этой области. Изменяя содержание красителя можно корректировать качество получаемого красителя.

Пример 11. Полученный порошок является кирпично-красновато-фиолетово-коричневым и растворим в этаноле и менее растворим в воде (100 см<sup>3</sup> воды, но 1 г красителя, растворяющий 100 г этилового

спирта, 35-50 г растворяет удаляемый краситель). Глицерин можно включать в качестве антиоксиданта, он предотвращает избыточное окисление состава, а также предотвращает развитие грибов. Любое противомикробное средство, такой как Proclin 300®, азид натрия, Proclin 150®, противомикробное средство, такое как Proclin 200® и 950®, добавляют для ингибирования роста микроорганизмов в диапазоне pH (например) 2,0-5 к раствору в количестве приблизительно 0,04% Proclin 300® (Sigma Aldrich, St Louis, MO) (фиг. 10).

#### Ссылки

1. Quebe Trim, Canada plant diseases Name City, Canada. 288 pp. 197
2. Alex, JF, in cayouette, R., Mulligan, D, Ottawa, Ont., Canada. 132 pp. Canada's Common and botanical names of weeds. Agric.1980.
3. L. H. Bailey, Bailey, E. z.hortus. 3. revision. MacMillan, New York, NY, USA. 1290, p. 1976
4. Scogg who, H. J., Canada flora. Nat. Muse. Nat. Sci. (Ottawa) Yay. Bot. 7 (1) -7 (4). 1711, p. 1979
5. Van Wijk, HL plant names dictionary. Martinus Nijhoff, The Hague, The Netherlands. 1444, p. 1911
6. Victor M. Flore Laurentienn to 1. 2nd edition. Univ., Montreal, Que., Canada. 952 pp., 1964
7. Inodc Taxonomic Code database (version 8) Notes: Papaver rhoeas: 1996
8. Plants Database, database Earned (version 4.0.4): National Plant Data Center, NRCS, USDA. Baton Rouge, LA 70874-4490 ABD.1996
9. Plants Database, database Earned (version 5.1.1):: National Plant Data Center, NRCS, USDA. Baton Rouge, LA 70874-4490 USA. 2000
10. John Kartesz Notes: North America Project (BONAP), University of North Carolina Reference Biota: Papaver rhoeas
11. Chevallier. A. The Encyclopedia of Medicinal Plants

Dorling Kindersley. London 1996 ISBN 9-780751-303148

12. Bown. D. Encyclopedia of Herbs and use. Dorling Kindersley, London. 1995 ISBN 0-7513-020-31

13. Papaver rhoeas L. behavioral and pharmaco-toxicological studies in rats. Soulim NEW R Younos, Jarmo the C-Idriss S, D Khaoluk F Bouse, Laila C. Journal of Ethnopharmacology, 74 (3): 265-74 2001

14. Papaver rhoeas Effects mouse Hedayat Sahraei year in the acquisition and morphine examining welded on conditioned place preference expression, Ethnopharmacology Volume 103 Sayedeh Maedeh Fatimid B, Shahrokh Pasha of-RADC, Zehra Faghih-Monzav of Seyyed Hossein Salimi and Muhammad Kamalinejad Magazine, Issue 3, Pages 420-424 February 20, 2006,

15. Ali Pourmotabbed, Baharak Rostami, the Gille Manouchehr of Gille Pirzadeh-Jahromi B, Hedayat Sahara, Hasan Ghoshoonib, Homeir to Zardooz and Ethnopharmacology Volume 95 Muhammad Kamalinejad Magazine, Issues 2-3, Pages 431-435

16. Facciola. S. Cornucopia - A Source Book of Edible Plants. Kampong Publications 1990 ISBN 0-9628087-0-9 2004

17. Chiej. R.şifal Plants R. Encyclopedia. MacDonald ISBN 0-356-10541.1984 1984.

18. F. Chittenden. ST Dictionary of Plants plus Supplement. 1956 Oxford University Press 1951

19. Hedrick. UP Sturtevant the world of edible plants. Dover Publications ISBN 0-486-20459-621. 1972

20. de Groot, H Rauan, Fundam reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids Clin Pharmacol 1998; 12: 249-55.

21. E. Hamlyn Edible plants. ISBN 0-600-37216-2, 1981

22. Formica JV, quercetin and related bioflavonoids Regelson W. Review of the biology. Food Chem Toxicol 33: 1061-1080. 1995

23. Computational and Theoretical Chemistry, a quantum mechanical approach to Mina Ghiasi, Afsaneh Azadnia to, Masoud Arabiehb, Mansour Zahedib Volume 996, routine and resist oxidation (vitamin P) Pages 28-36 The protective effect of:

24. Frieseneck B, Tsai AG, inflammation, edema and cellular basis for the Intagliet Daflo K. 500 mg activity. Int J Clin Exp Microcirc 15 (Suppl): 17-21. 2012 1995
25. Clinical Nutrition flavonoids American Society: action and potential applications<sup>1,2,3</sup> possible mechanisms Robert J Nijveldt, Els van Nood, Danny AK van Hoorn, Petra G Boelens, classy van Norra and Paul AM van Leeuwen in a review in 2001
26. Robak J Gryglews the RJ. Flavonoids bioactivity. Pol J Pharmacol; 48: 555-64. 1996
27. DOI: 10.1007 in the book/978-3-642-22144-6\_53: Natural Products: Phytochemistry, Botany and alkaloids, phenolics and terpenes Metabolism Section: 54, Publisher: Springer Berlin Heidelberg, Editors: Kishan Gopal Ramawat, Jean-Michel MERILLON, pp.1647-1682 Need-to-know news and monitoring for UB faculty and staff
28. UB Reporter This article is from the archives. Ellen Goldbou contributing Editor By: ARCHIVE genetically engineered microorganisms into tiny factories Published in 2007
29. UNODC Szendre K. Pages: 51-54 Creation Date: K. opium Szendre Faculty of Pharmacy, Laboratory Pharmacognostical, Szeged, Hungary porphyrox a method to isolate 1968
30. Merck, E., Ann. Pharmacy, 21201, Physical Sciences, 18, 379, 1839 Annual Progress Report. 1847
31. Hesse, O., Liebig Ann. Chem. 153, 47, 1870.
32. akshit, N. J. Chem. Soc. (London) 115 (1), 455, 1919.
33. Rajagopol, S., Current Science. 12, 24, J. Org. Chem. 10, 175, 1945.
34. Fulton, C., E/CN.7/117, 1948; Narcotics IV, No. 1, 15, Bulletin on 1952. 1948
35. Klayman, DL Thesis, Rutgers University, 1956
36. van Acker SA, Tromp MN, Haenen GR, van der Vijgh WJ, Bast A. Flavonoids as free radical nitric oxide cleaner. Biochem Biophys Res Commun 214: 755-9 1995
37. Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Hoult JR, flavonoids and phenolic dietary supplements mammalian 5-lipoxygenase and Sikoloksijenaz Halliwell B. Prevention. With antioxidant



activity and to iron ion-reducing ability relationship. *Biochem Pharmacol* 1991; 42: 1673-1681 1991

38. Epidermal cyclooxygenase and lipoxygenase obtained with flavonoids and bioflavonoids naturally occurring effects of the guinea pig. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1998; 58: 17-24).. 1998

39. An update: alliwell B how to characterize an antioxidant. *Biochem Soc Symp* 61: 73-101 1995

40. KorkinAfanas'ev IB LG. Flavonoids, antioxidants and chelating properties. *Adv Pharmacol* 38: 151-63. 1997

41. Sanhueza Garrido J Valdes J Campos R, Valenzuela in ischemia-reperfusion rat kidney been stressed xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase Changes: some inhibitory effect of flavonoid. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 78: 211-8.1992

42. Robak J Gryglews the RJ. Flavonoids bioactivity. *Pol J Pharmacol* 48: 555-64. Kim HP, Mani I, Iversen L, Ziboh VA. 1996

43. Huk I Nanobash Brovkovich V VJ, et al. Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and nitric oxide in ischemia-reperfusion increases the concentration of damage: an experimental study. *Br J Surg*; 85: 1080-5. 1998

44. Shutenko Z, Henry Y Pinard M, et al. Global ischemia and reperfusion in rat brain during electron paramagnetic resonance determined by the level of nitric oxide in vivo antioxidant effect of quercetin. *Biochem Pharmacol* 57: 199-208. 1999

45. van Acker SA, Tromp MN, Haenen GR, van der Vijgh WJ, Bast A. Flavonoids as free radical nitric oxide cleaner. *Biochem Biophys Res Commun*; 214: 755-9. 1995

46. Chang WS, Lee YJ, Lu FJ, Chiang HC. Xanthine oxidase inhibitory effects of flavonoid. *Anticancer Res*, 13: 2165-70. 1993

47. Lion M, Ono Y, Kai S, as well as milk xanthine oxidation of flavonoids on cytochrome c reduction by xanthine oxidase Fukumoto M. Effects. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 32: 635-42. 1986

48. Calo on Ying Li M, et al. Xanthine oxidase and

structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of superoxide scavenging. *J Nat Prod* 61: 71-6 1998

49. Frieseneck B, Tsai AG, Allegra C Intagliet micronized purified flavonoid fraction of the implementation of K. orally, ischemia-reperfusion injury, leukocyte adhesion suppresses hamster in vivo observations in the folds. *Int J Clin Exp Microcirc* 14: 50-5. 1994

50. Frieseneck B, Tsai AG, Allegra C Intagliet micronized purified flavonoid fraction of the implementation of K. orally, ischemia-reperfusion injury, leukocyte adhesion suppresses hamster in vivo observations in the folds. *Int J Clin Exp Microcirc* 14: 50-5. 1994

51. Ferrandiz ML Gil B, Sanz MJ, et al. Bakuchiol Effect on leukocyte functions and some inflammatory responses in mice. *J. Pharm Pharmacol* 48: 975-80. 1996

52. Bennett JP Gomperts BD, Wollenweber of natural flavonoids is without mast cells and neutrophils secreted E. preventive effects. *Arzneimittelforschung* 31: 433-7.1981

53. Frieseneck B, Tsai AG, inflammation, edema and cellular basis for the Intagliet Daflo K. 500 mg activity. *Int J Clin Exp Microcirc*; 15 (Suppl): 17-21. 1995

54. Middleton EJ, immune and inflammatory Kandaswa my C. Effect of flavonoids on cell functions. *Biochem Pharmacol* 43: 1167-1179. 1992

55. Ferrandiz ML, Alcaraz MJ. Anti-inflammatory flavonoids activity and arachidonic acid metabolism inhibition. *Agents Actions*, 32: 283-8. 1991

56. Kerry NL Abbey phenolic compounds derived from fragmented red wine and red wine, in vitro, inhibit oxidation of low density lipoprotein. *Atherosclerosis*, 135: 93-102 1997

57. Shoskes. Bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal damage Effect: a new class of renoprotective agents. *1 Transplantation* 66: 147-52. 1998

58. Dehmlow C Erhard J, de Groot H. Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. *Hepatology*, 23: 749-54. 1999

59. Shoskes. Bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal damage Effect: a new class of renoprotective agents. Transplantation 66: 147-52. 1998
60. Ferrandiz ML, Alcaraz MJ. Anti-inflammatory flavonoids activity and arachidonic acid metabolism inhibition. Agents Actions, 32: 283-8. 1991
61. Ferrandiz ML, Nair AG, Alcaraz MJ. Spanish and Indian medicinal herbs Inhibition of sheep platelet arachidonate metabolism by flavonoids. Pharmazie, 45: 206-8. 1990
62. Formica JV, quercetin and related bioflavonoids Regelson W. Review of the biology. Food Chem Toxicol 33: 1061-1080 1995
63. Remacle-Volo Damas J Bourdon V G, which are inhibitors of prostaglandin biosynthesis Lecomte, J. Pro-inflammatory flavonoids. Prostaglandins Med Leukot; 19: 11-24 1985
64. Hollman PC, Katan MB. Absorption of dietary flavonoids man, metabolism and health effects. Biomed Pharmacother 51: 305-10 1997
65. Hollman PC, Katan MB. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. Food Chem Toxicol 37: 937-42. 1999
66. Hegarty VM, May HM, Khaw KT. Tea drinking and bone mineral density in older women. Am J Clin Nutr 71: 1003-7 2000
67. Hollman PC JM Van Trijp Buys financing MN, et al. Antioxidant flavonoid quercetin from various foods in humans relative bioavailability. FEBS Lett 418: 152-6. 1997
68. Hollman PC, Gaag M, Mengelers MJ, van Trijp JM, de Vries JH, Katan MB. Absorption and distribution kinetics of the dietary antioxidant quercetin man. Free Radic Biol Med 21: 703-7. 1996
69. Hollman PC, van Trijp JM, Mengelers MJ, de Vries JH, Katan MB. Adam dietary antioxidant flavonoids quercetin bioavailability., Cancer Lett, 114: 139-40. 1997
70. Manach C Morand C Demign C from Texier O Regerat K, rutin and Quercetin Remesy C bioavailability in rats. FEBS Lett 409: 12-6. 1997

71. Hollman PC JM Van Trijp Buys financing MN, et al. Antioxidant flavonoid quercetin from various foods in humans relative bioavailability. FEBS Lett 418: 152-6, 1997
72. Young JF Nielsen, SA is Haraldsdot J et al. Urinary excretion of quercetin and antioxidative status of the effect of fruit juice intake on biomarkers. Am J Clin Nutr 69: 87-94. 1999
73. Moroney MA, Alcaraz MJ, Forder RA, Carey F Hoult JR. An anti-inflammatory and related flavonoid aglycone glycoside flavonoids neutrophil 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitory selectivity. J. Pharm Pharmacol 40: 787-92..1988
74. Formica JV, quercetin and related bioflavonoids Regelson W. Review of the biology. Food Chem Toxicol, 33: 1061-1080 1995
75. Skibol CF, Smith MT. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. Free Radic Biol Med; 29: 375-83. 2000
76. A Modern Herbal.Pengu. Penguin ISBN 0-14-046-440-9 1984
77. Mabey. R. Free Food. Collins 1974 ISBN 0-00-219060-5
78. Okushi K, Matsumoto N, Nanjo K Kohrin T Suzuki M, Hara Y. Absorption of tea catechins into rat portal vein. Biol Pharm Bull; 19: 326-9 1996
79. Plakas SM, Lee TC, Wolke RE. Rainbow trout (*Salmo gairdneri*), the flavonol, quercetin fed absence of overt toxicity. Food Chem Toxicol, 23: 1077-1080 1985
80. Ertrurk E Hatcher JF weevil AM. Carcinogenesis and bracken fern Proc quercetin.fed; 43: 2344 (Abstr). 1984
81. B. Starvic food mutagenic flavonoids. Fed Proc; 43: 2344 (Abstr). 1984
82. Hertog MG, Hollman PC, Katan MB, potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands Kromhout D. Intake. Nutr Cancer 20: 21-9 1993
83. MG Hertog Aravanis Kromhout D C, et al. Flavonoid intake and coronary heart disease in seven countries study and long-term risk of cancer. Arch Intern Med 155: 381-6 1995
84. Loft S, Poulsen HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. J Mol Med 1996; 74: 297-312. (Published erratum

appears in J Mol Med; 75: 67-8). 1997

85. Pryor, WA. Cigarette smoke radicals and chemical carcinogens role of free radicals. Environmental Health Perspect 1997; 105 (Suppl): 875-82. 1997

86. P Deneo Boffet Stefani ED-Pellegrini, H., et al. Dietary antioxidants and lung cancer risk: a case-control study in Uruguay. Nutr Cancer 1999; 34: 100-10 1999

87. Wang HK, Xia Yin Yang ZY, Natschi SL, Lee KH. Flavonoids and antitumor, the discovery of analogues as anti-HIV agents and recent advances for improvement. Adv Exp Med Biol; 439: 191-225. 1998

88. Kaul TN, Middleton E Jr, Ogre PL. The antiviral effect of flavonoids on human viruses. J Med Virol, 15: 71-9. 1985

89. Bae EA, Han MJ, Lee M, Kim DH. Rotavirus infectivity in vitro inhibitory effect of some flavonoids. Biol Pharm Bull; 23: 1122-4. 2000

90. Ng TB, Huang B, Fong WP, Yeung HW. HIV reverse transcriptase inhibitors with special emphasis on the immune anti-human immunodeficiency virus (anti-HIV) natural products. Life Sci, 61: 933-49 1997

91. Vlietinck AJ, De Bruyne T, Apers S, Pieters LA. Plant-derived human immunodeficiency virus (HIV) infection of the lead compound for chemotherapy. Planta Med 64: 97-109.

92. Hoult JR, Moroney MA, lipoxygenase and cyclooxygenase Paya M. Actions of flavonoids and coumarins. Methods Enzymol, 234: 443-54.

93. Tordera Ferrandiz ML Alcaraz MJ ME. Rat neutrophils degranulation and anti-inflammatory effects of flavonoids on the release of arachidonic acid. Z. Naturforsch [C]; 49: 235-40. 1994

94. Knektar P Järvinen R Seppänen R, et al. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant. Am J Epidemiol 146: 223-30 1997

95. Oikawa T Shimamura M, Ashino, H, et al. Staurosporine, angiogenesis inhibition is a powerful inhibitor of protein kinase. J Antibiot (Tokyo) 45: 1155-1160. 1992

96. Pepper MS Fotsis T Aktas E, et al. Flavonoids, cell proliferation and in vitro angiogenesis inhibitors are derived from the diet. *Cancer Res* 57: 2916-21. 1997
97. Fan TP, Jaggar R check Bicknell R vasculature: angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting of gene therapy. *Trends Pharmacol Sci* 16: 57-66. 1995
98. Pepper MS Fotsis T Aktas E, et al. Flavonoids, cell proliferation and in vitro angiogenesis inhibitors are derived from the diet. *Cancer Res*; 57: 2916-21 1997Kağıt DH. Natural products as angiogenesis inhibitors. *Planta Med* 64: 686-95. 1998
99. Paper DH. Natural products as angiogenesis inhibitors. *Planta Med* 64: 686-95. 1998
101. in the RJ.Gryglews Korbut R Robak J antithrombotic mechanism of flavonoids on Swies, J.. *Biochem Pharmacol*; 36: 317-22. 1987
101. Alcaraz MJ, Ferrandiz ML. Replacement of arachidonic metabolism by flavonoids. *J Ethnopharmacol*, 21: 209-29 1987
102. Tzeng SH, Ko WC, Ko FN, Teng CM. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Thromb Res*; 64: 91-100. 1991
103. Landolfi R, Mower RL, platelet function, and eicosanoids are by Steiner M. Modification of bioflavonoids. Structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol*; 33: 1525-1530 1984
104. Van Wauwe cyclooxygenase and lipoxxygenase activity in human platelets J pristine antioxidants Goossens, J. Effects: comparison with indomethacin and EDY to. *Prostaglandins*, 26: 725-30. 1983
105. JM ORGOGOZO Dartigues JF Lafont S, et al.yaşl wine consumption and dementia: a prospective community study in the Bordeaux region., 153: 185 1983
106. Commenges D Scotet V Renaud S, Jacq of-Gadda H, Barberg is Dartigues JF-Gateau PE. Flavonoid intake and risk of dementia. *Eur J Epidemiol*, 16: 357-63. 2000
107. Arai Y, Watanabe S, kimire M, Shimoda K, Mochizuki R, Japanese women and quercetin intake and plasma flavones by the

inverse correlation between the concentration of LDL cholesterol, flavones and isoflavones Kinan N. Dietary intakes. J Nutr 130: 2243 to 50.109, 2000

108. Lek. 46 (12): 856-60 [Experimental study of possible hypolipemic effect of resveratrol found in red wine and flavonoids in terms of]. Kollár P1, Kotolová H, J Necas, P. Karpíšek M Bartosíková L Karesová, 2000

109. Young JF Nielsen, SA is Haraldsdot J et al. Urinary excretion of quercetin and antioxidative status of the effect of fruit juice intake on biomarkers. Am J Clin Nutr 69: 87-94.1999

110. Lou FQ, Zhang MF, XG Liu Zhang JM, Yuan WL. A study on the prevention of atherosclerosis tea pigments. Chin Med J (Engl); 102: 579-83 1989

111. Mr. Osman, Maalej N, Shanmuganayaga D Folts JD. Grape juice but not orange or grapefruit juice inhibits platelet activity in dogs and monkeys. J Nutr, 128: 2307-12, 1998

112. Clinical Nutrition flavonoids 2001 by American Society of action and potential applications1,2,3 possible mechanisms Robert J Nijveldt, Els van Nood, Danny AK van Hoorn, Petra G Boelens, classy van Norra and Paul AM van Leeuwen a comment

113. Baker, John R., biological Microtechnology, Methuen, London, England Policy. 1958

114. Bosma, without toxic chemicals useful Robin hematoxylin. Histologically, 18 V, No. 1, January 1988

115. from Flow, D., Harris hematoxylin histological, V.21, No.2 oxidant new 1991

116. Horob RW and Kiernan JA, Connor Biological Dyes, 10th ed. BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK, 2002

117. Böhm, A. & Opel, A., Manuel de technical microscopiqu Ed. 4 1907

118. Molnar, LN, Mayer's hematoxylin-eosin method modification. Histologically, there are 6, Number 4, October, 1976

119. Lange, NA, Handbook of Chemistry, Lange, Revised 10th ed., McGraw-Hill.

120. Clarke, G. and Dodds, HM, Lugol's hematoxylin.Sta

Technology, v 58, No. 4, p. 232 1983

121. McNulty, JM, Kambo is, MJ and Smith, AA, Barrett's esophagus diagnosis of an improved zirconyl hematoxylin use of paint. J. Cell. Mol. Med., A. 8, No. 3, p. 382. 2004

122. Lillie, RD Histopathologic techniques and practical histochemistry Ed.2 Blakiston, New York, USA, (1954)

123. (Bryan is done by Llewellyn source for histotechnologists) online (<http://stainsfile.info>)

124. Pusey modified Mayer's hematoxylin, Journal Histologically, v.2 A, No.2, p.54, Cute Garvey, Mayer hematoxylin stain Modification, histological Journal, v.14, No.3, p.163, 1979

125. Roach, JB and Allen, A. Bismuth hematoxylin arginine residues. Biotechnical & Histochemistry, V.72, N° 1, p. 49, 1997

126. Smith, AE, a vanadate hematoxylin for basic proteins. Biotechnical and Histochemistry, c. 70, n° 5, p. 5. 1995

127. Smith, A. acidic mucin, zirconyl hematoxylin staining. Histochemistry and cytochemistry, v. 47, pp Magazine. 1645, 1999

128. Cotter, Journal of Pathology and Bacteriology histological purposes, v. 16, p increased SG about double staining 390-398.1912

129. Bancroft, JD and Stevens A. Theory and practice of histological techniques, Ed. 2 Churchill Livingstone, Edinburgh and London, England. 1982

130. Hine, Ian F Block with hematoxylin and eosin staining of mammalian tissues. Stain Technology, v 56, p 119 1981

131. Bolles Lee, a.. Gatenby, JB and Beams, HW Microtomist Edited by the maturity-Mecum. 11th ed., Churchill, London, UK, 1950

132. Horob RW and Kiernan JA, Connor Biological Dyes, 10th ed. BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK 2002

133. F. A. Putt Histopathological Staining Methods John Wiley & Sons, New York, NY FA Manual, USA. Tissue sections

134. Harris hematoxylin modification with a double nitrocellulose and paraffin embedded. Histologically, there are 5, No. 1, January, 1975

135. Culling CFA, histopathological techniques, 2nd ed CFA Handbook. Butterworths, London, 1963

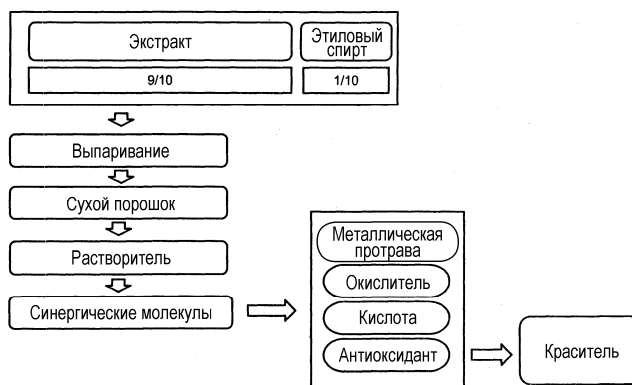
136. Demonstration techniques.Histolojik Cook, H C. Butterworths, London, England, 1974

137. Drury, R.A.B. and Wallington, EA Carleton's histological technique, Ed. 5 Oxford University Press, Oxford, 1980

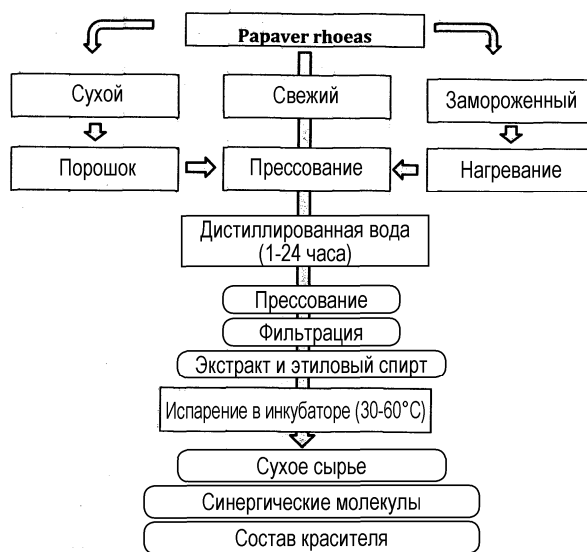
138. Mallory, FB & Wright, JH Pathological technique, Ed.3 WB Saunders, Philadelphia, USA. 1904



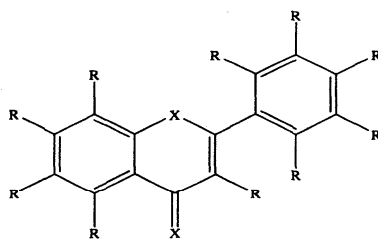
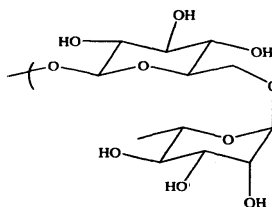




Фиг. 2

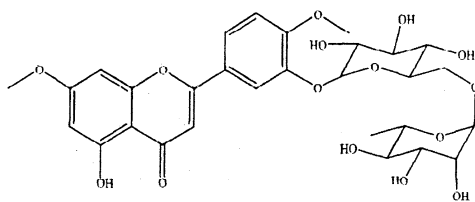
Получение предшественника состава из *Papaver rhoeas*

Фиг. 3

Предшественник состава красителя из *Papaver rhoeas* $X=N, O, S, C$  $R=H, OH, NH_2, Cl, Br, I, F, O-CH_3$ , (любой алифатический комплекс)

Фиг. 4

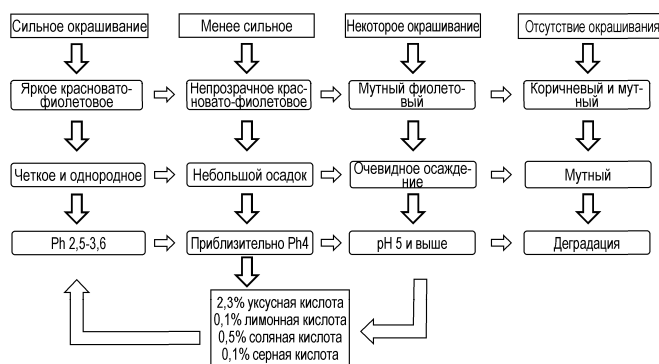
цис-транс-Конфигурация молекулы из *Papaver rhoeas*



5 - гидроксн-2-(3 - (тетрагндро-6 - ((тетрагндро-3,4,5-трнгндроксн-6-метнл-2н-пнран-2-нлоксн) метнл) - 2н-пнран-2,3,4,5-тетраол)-4-метоксн-феннл)-7-метоксн-4н-хромен-4-он

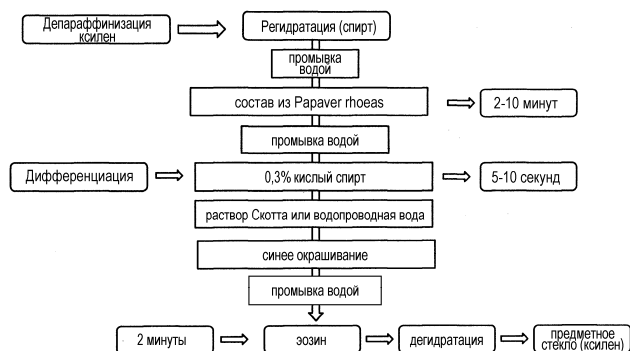
Фнг. 5

Назнвнне н конфнгурацня молекулы нз Paraver rhoeas



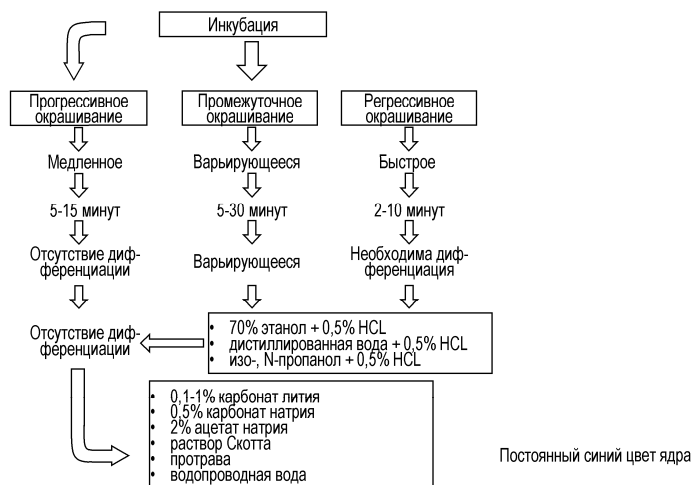
Фнг. 6

Степнн окраснвання составом нз Paraver rhoeas



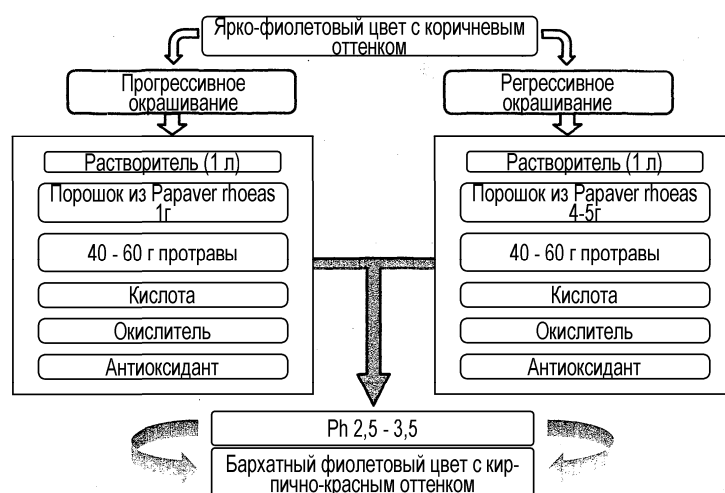
Фнг. 7

Методологня окраснвання составом нз Paraver rhoeas



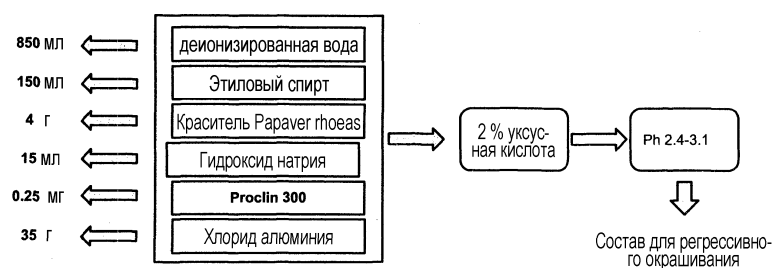
Фнг. 8

Днфференцнация состава нз Paraver rhoeas



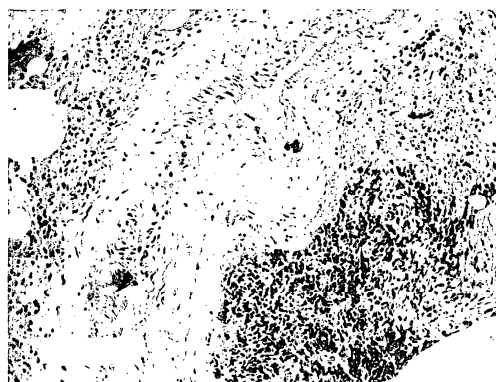
Фиг. 9

Профиль окрашивания составом из Paraver rhoeas

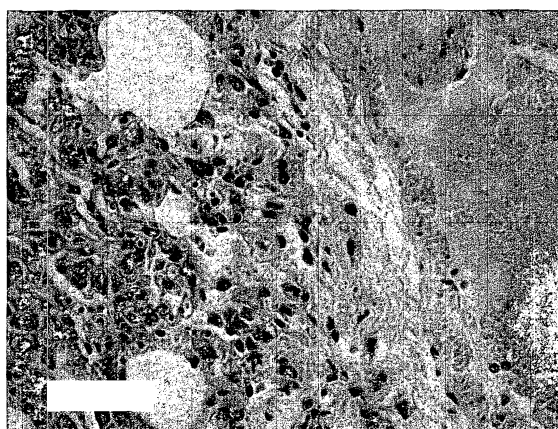


Фиг. 10

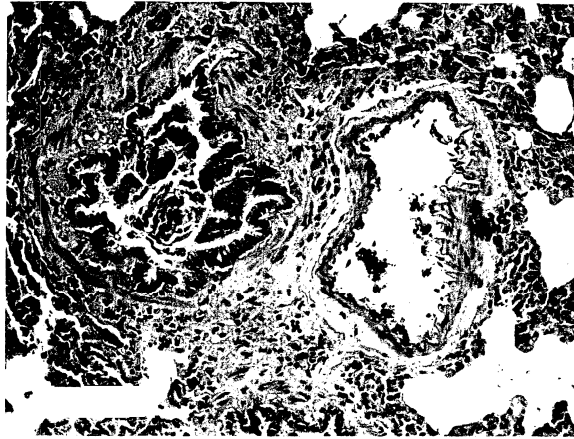
Состав красителя из клеточной ткани из Paraver rhoeas



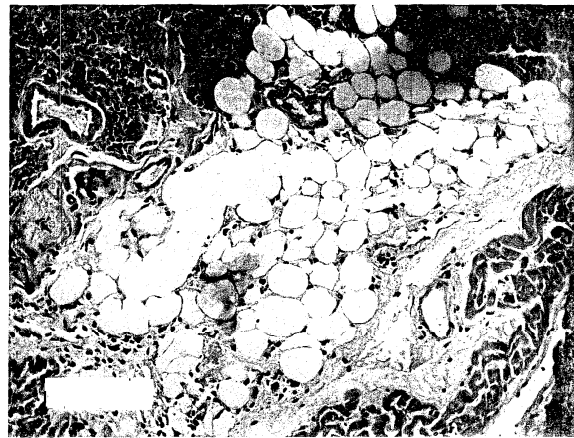
Фиг. 11



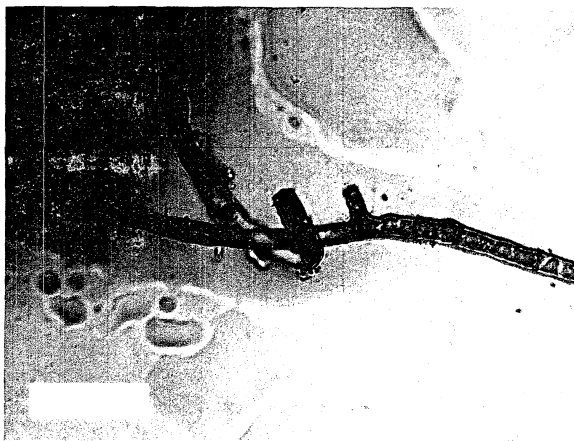
Фиг. 12



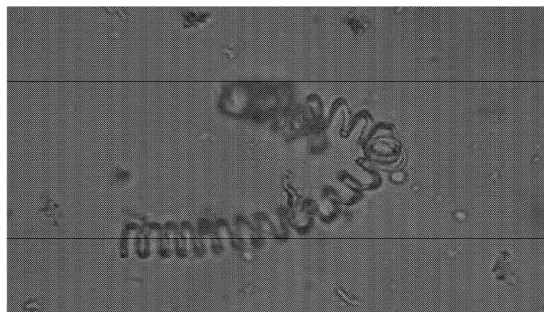
Фиг. 13



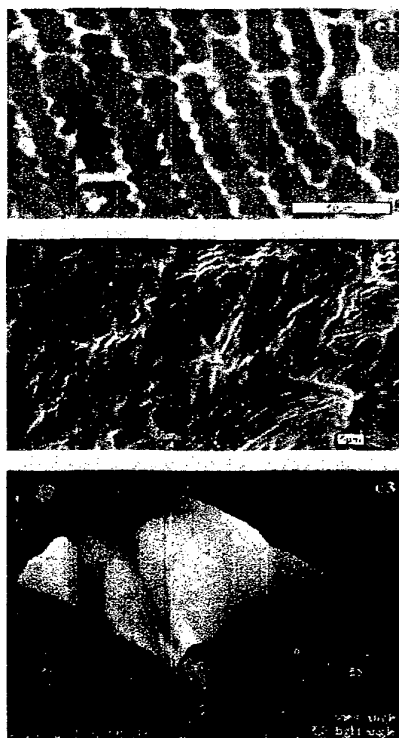
Фиг. 14



Фиг. 15

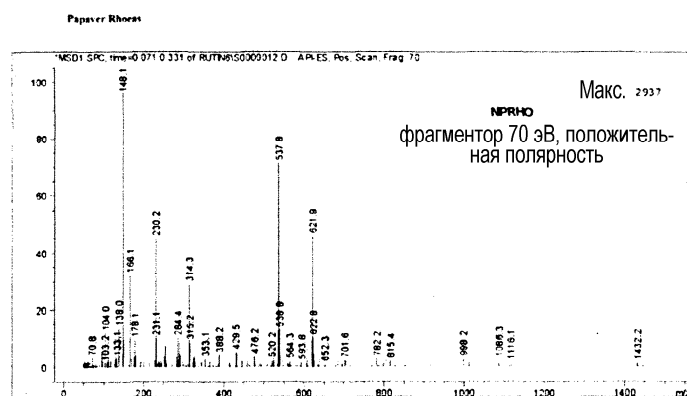


Фиг. 16



Фиг. 17

Атомно-силовая микроскопия цистернальных структур в лепестках с водным содержимым



Фиг. 18

Результаты ЯМР



Евразийская патентная организация, ЕАПВ  
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2