



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **114100** (13) **U**
(51) МПК (2016.01)
G01N 1/00
G01N 1/30 (2006.01)
G01N 21/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2016 09777	(72) Винахідник(и): Желавський Микола Миколайович (UA)
(22) Дата подання заявки: 22.09.2016	(73) Власник(и): Желавський Микола Миколайович,
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 27.02.2017	вул. Драй-Хмари, 44, кв. 67, м. Кам'янець-Подільський, Хмельницька обл., 32300 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 27.02.2017, Бюл.№ 4	

(54) СПОСІБ ЦИТОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ АПОПТОЗУ КЛІТИН РЕПРОДУКТИВНОЇ СИСТЕМИ ТВАРИН

(57) Реферат:

Спосіб цитологічної діагностики апоптозу клітин репродуктивної системи тварин включає проведення цитологічного дослідження епітеліоцитів та нейтрофільних клітин. Мікропрепарати готують з піхви кішок і сук, та проводять комбіноване послідовне фарбування із використанням 0,5 % розчину сафраніну (5-7 с) з подальшим дофарбовуванням фіксатором-фарбником еозин-метиленовим синім за Май-Грюнвальдом (5-7 с). Критеріями діагностики субклінічної піометри у кішок і сук є зміни кількості нейтрофільних гранулоцитів із цитологічними змінами в ядрі, цитоплазмі та цейозисом мембрани.

UA 114100 U

Корисна модель належить до галузі ветеринарної медицини, а саме до ветеринарного акушерства і може використовуватись для цитологічної діагностики апоптозу епітеліоцитів та імунокомпетентних клітин репродуктивної системи собак і кішок.

Відомі генетично запрограмовані процеси старіння та загибелі клітин (апоптоз). Цей феномен фізіологічної регуляції гомеостазу відбувається постійно в організмі усіх живих істот, який регулюється та контролюється цілою низкою факторів. У процесі апоптозу відбувається складний біологічний процес заміни та елімінації клітин, які завершили свій життєвий цикл, а також клітин, що зазнали ушкодження і мутації. Дослідження апоптозу надзвичайно важливе у ранній діагностиці цілої низки патологій. Сучасна клінічна імунологія щорічно поповнюється новими методами, що потребують від науковців розширення знань цієї галузі та новітнього технологічного переозброєння спеціалізованих лабораторій [1].

Відомий в клінічній імунології спосіб імуногістохімічного дослідження із використанням пропідійодиту [2]. Цей спосіб дає змогу чітко виявити метаморфозні зміни у мембранах клітин на ранніх стадіях старіння клітини.

Недоліком цього способу є неможливість оцінити апоптозні у ядрі та цитоплазмі клітин.

У лабораторній практиці широко використовуються способи оцінювання апоптозу клітин. Відомий спосіб флуоресцентної мікроскопії з використанням фарбника Hoest 33342, що здатний зв'язуватися з ДНК [3].

Недоліком способу є те, що для його виконання слід використовувати тільки щойно відібрані клітинні аспірати.

Аналогом до заявленого способу є цитологічний спосіб [4], який оснований на застосуванні світлової мікроскопії мікропрепаратів, який серед усіх інших відрізняється доступністю та технологічністю. Для проведення методу використовують мікропрепарати, які забарвлюють за методом Романовського-Гімзи і мікроскопічно ідентифікують епітеліальні клітини.

Недолік цього способу полягає в тому, що дослідник не може провести диференціацію цитологічних змін в епітеліальних клітинах геніталій в різні періоди статевого циклу, а також не можливо чітко визначити апоптоз та функціональний стан імунокомпетентних клітин.

Задача корисної моделі полягає в удосконаленні цитологічного способу візуалізації апоптозу епітеліоцитів і нейтрофільних гранулоцитів та інших імунокомпетентних клітин слизової оболонки піхви кішок і сук, визначення інформативності параметрів клітинних факторів локального імунітету органів розмноження тварин в різні періоди їх відтворюваної здатності, обґрунтування діагностичних критеріїв патогенезу піометри та метапластичних процесів в геніталіях.

Поставлена задача вирішується тим, що проведення цитологічної візуалізації змін, характерних для апоптозу клітин здійснюється із застосуванням спеціальної технології виготовлення мікропрепаратів, визначення апоптозних змін в епітеліоцитах та фагоцитах. Це є основою при оцінюванні клітинного імунного гомеостазу, а також при визначенні стану локального імунітету органів розмноження тварин та вдосконаленні способу виготовлення мікропрепарату.

Спосіб здійснюється за наступною схемою: діагностичний матеріал отримують шляхом відбору зі слизової піхви за допомогою шітки для цитології, змоченої 15 М фосфатним буфером ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{KH}_2\text{PO}_4$; pH 7,2). Далі готували мазки, які фіксували метанолом та фарбували 0,5 % розчином сафраніну (5-7 с), а далі дофарбовували фіксатором-фарбником еозин-метиленовим синім за Май-Грюнвальдом (5-7 с).

Оцінювання інтенсивності апоптозу епітеліальних та імунокомпетентних клітин проводили мікроскопічним методом шляхом визначення цитологічних змін в ядрі (пікноз, рексис, вакуолізація, фрагментація), цитоплазмі (вакуолізація та токсична зернистість), в процесі їх цитолізу (розпаду клітини), зменшення їх цитометричних розмірів (зморщення) та цейозисом мембрани. Критеріями діагностики субклінічної піометри у кішок і сук є визначення кількісних показників та цитологічних змін, характерних для апоптозу нейтрофільних гранулоцитів.

Джерела інформації:

1. Яблонський В.А. Апоптоз імунокомпетентних клітин крові корів у період лактації /В.А. Яблонський, М.М. Желавський //Науковий вісник Національного аграрного університету. - 2008. - Вип. 126. - С. 233-236.

2. A rapid detection method for apoptosis and necrosis measurement using the Cellometer imaging cytometry /L.L. Chan, N. Lai, E. Wang [et al.] //Apoptosis. - 2011. - Dec. 16 (12). - P. 1295-1398.

3. MLK3-MKK3/6-P38MAPK cascades following N-methyl-D-aspartate receptor activation contributes to amyloid- β peptide-induced apoptosis in SH-SY5Y cells /F. Zhou, Y. Xu, X.Y. Hou //J. Neurosci. Res. - 2014. - Jan. 31 - Vol. 10. - P. 1002-1017.

4. Пат. 2304773 Российская Федерация, МПК⁷ G01N33/48 Способ цитологической диагностики послеродовой патологии у коров /Животягина Е.В., Семенов О.В.; заявитель и патентообладатель: Животягина Е.В., Семенов О.В. - № 2304773; заявл. 9.12.2004; опубл. 20.05.2006, Бюл. № 21.

5

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб цитологічної діагностики апоптозу клітин репродуктивної системи тварин, що включає проведення цитологічного дослідження епітеліоцитів та нейтрофільних клітин, який
10 **відрізняється** тим, що готують мікропрепарати з піхви кішок і сук, та проводять комбіноване послідовне фарбування із використанням 0,5 % розчину сафраніну (5-7 с) з подальшим дофарбовуванням фіксатором-фарбником еозин-метиленовим синім за Май-Грюнвальдом (5-7 с).
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що критеріями діагностики субклінічної піометри у
15 кішок і сук є зміни кількості нейтрофільних гранулоцитів із цитологічними змінами в ядрі, цитоплазмі та цейозисом мембрани.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

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

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