



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **108110** (13) **U**  
(51) МПК (2016.01)  
**A61D 99/00**  
**G01N 33/53** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>u 2015 07876</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Влізло Василь Васильович (UA),</b> <b>Кушкевич Мар'яна Василівна (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>07.08.2015</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>11.07.2016</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН НААН,</b> <b>вул. В. Стуса, 38, м. Львів-34, 79034 (UA)</b>
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>11.07.2016, Бюл.№ 13</b>	

**(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ ТКАНИННОЇ ЛОКАЛІЗАЦІЇ КЛІТИННОГО ПРІОНА**

**(57) Реферат:**

Спосіб виявлення тканинної локалізації клітинного пріона включає проведення імуногістохімічного дослідження, мікроскопію тканини з виявленням забарвленого клітинного пріона. Для встановлення попередника патологічного пріона у здоровому організмі використовують специфічні антитіла

UA 108110 U



Корисна модель належить до біології, біохімії, імунології, гістології, зокрема до способів виявлення локалізації (рівня експресії) протеїнів на гістологічних препаратах різних тканин, використовуючи імунологічну взаємодію.

Відома методика Prionics-Check WESTERN на основі вестерн блот аналізу (Neil Burnette W. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioindicated protein A / W. Neil Burnette // Analytical Biochemistry. - 1981. - N 112(2). - P. 195-203), за допомогою якої визначають рівень експресії молекулярних ізоформ клітинного пріона. Недоліком є те, що він трудомісткий, кошторисний, вимагає особливих навичок і вмінь від фахівця.

Також відома методика на основі дот-блот аналізу (Патент України № 56820, МПК G01N 33/68 (2006.01), C12S 3/00 (2006.01), опубл. 25.01.2011, Бюл. № 2) для визначення вмісту клітинного пріона (PrP<sup>C</sup>), яка є досить простою у виконанні, проте у результаті отримують загальний вміст клітинного пріона, не розділеного на фракції молекулярних ізоформ.

Найближчим аналогом є спосіб виявлення патологічного пріона PrP<sup>Sc</sup> імуногістохімічним способом (Патент України №3945, МПК A61D 99/00 (2006.01), опубл. 25.07.2008, Бюл. № 14), який дозволяє встановлювати локалізацію патологічного пріона в ураженому довгастому мозку за умов пріонної інфекції.

За допомогою заявленого способу можна виявляти локалізацію клітинного пріона, який є попередником інфекційного та експресується у більшості тканин здорового організму.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити метод, який би дозволяв виявляти локалізацію клітинного пріона безпосередньо на гістологічному зрізі тканин. Крім того, використання імунологічної взаємодії (АГ-АТ) робить його точним, а наявність хромогену дає кольорове забарвлення та дозволяє побачити під мікроскопом локуси досліджуваного протеїну у структурах тканини. Також можливе визначення вмісту клітинного пріона, використовуючи програму ВідеоТест 5.0 ([www.videotest.ru](http://www.videotest.ru)).

Відомий спосіб (Патент України № 33945, МПК A61D 99/00 (2006.01) Спосіб виявлення патологічного пріона PrP<sup>Sc</sup> імуногістохімічним методом / Ложкіна О.В., Калиновська І.Г., Андрієнко О.В., Риженко Г.Ф. (Україна); заявник та патентовласник IBM НААН - № u200714939; заявл. 28.12.2007, опубл. 25.07.2008, Бюл. № 14), в якому є ряд суттєвих ознак спільних із заявленим: виготовлення гістологічних препаратів і використання деяких подібних реактивів під час виконання імуногістохімічної методики. Однак, суттєвих ознак не достатньо для одержання технічного результату.

Корисна модель може бути використана в біологічній, гістологічній лабораторії та діагностичних центрах.

Для здійснення заявленого способу необхідно:

1. Провести фіксування тканини, її промивання, зневоднення та формування парафінових блоків, використовуючи стандартну методику (Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / В.В. Влізло, Р.С. Федорук. І.Б Ратич та ін. - Львів: Сполом, 2012. - 764 с).

2. Зрізи, товщиною 7 мкм, нарізати на мікротомі. Прогріти за температури 52 °С упродовж 12 год., після чого депарафінувати у ксилолі та зневоднити в етанолі. Активувати антиген у середовищі 10 мМ цитратного буфера, рН 6,0. Блокувати ендogenous лужну фосфатазу 0,3 н розчином HCl.

3. Зрізи промити у забуференому фізрозчині з Твіном, рН 7,6 (0,05 М Tris, 150 мМ NaCl, 0,05 % Tween 20, H<sub>2</sub>O). У подальшому їх інкубувати з моноклональними первинними антитілами (Antibody mAB6H4; Prionics, Швейцарія) за +4 °С упродовж 12 год.

4. Використати набір реактивів для імуногістохімії, який містить полімер-імуноглобуліновий комплекс, полімер-ензимний комплекс, субстратний буфер та хромоген. Після промивання зрізи фарбувати гематоксиліном Майєра та помістити у заключне середовище.

5. Провести гістологічне дослідження під мікроскопом. Виготовити контрольні зразки, зафарбовані лише гематоксиліном.

6. Визначити кількість клітинного пріона на гістопрепаратах методом оцифрування фотографій тканин однакового збільшення, використовуючи програму ВідеоТест 5.0 ([www.videotest.ru](http://www.videotest.ru)).

Для тестування ефективності використання методу імуногістохімічного виявлення тканинної локалізації клітинного пріона (PrP<sup>C</sup>) було проведено дослідження порожньої кишки щурів різного віку. Встановили, що вона мала типову структуру слизової, підслизової, м'язової та серозної оболонок (фіг. 1-3). На основі результатів імуногістохімічного аналізу порожньої кишки одномісячних щурів клітинний пріон виявлено у складі плазматичних клітин і лімфоцитів у

власній пластинці ворсинки (фіг. 1б-г, а-контроль. 1-слизова оболонка, 2-власна пластинка, 3-келихоподібні клітини, 4-епітеліоцити, 5-крипта, 6-клітинний пріон).

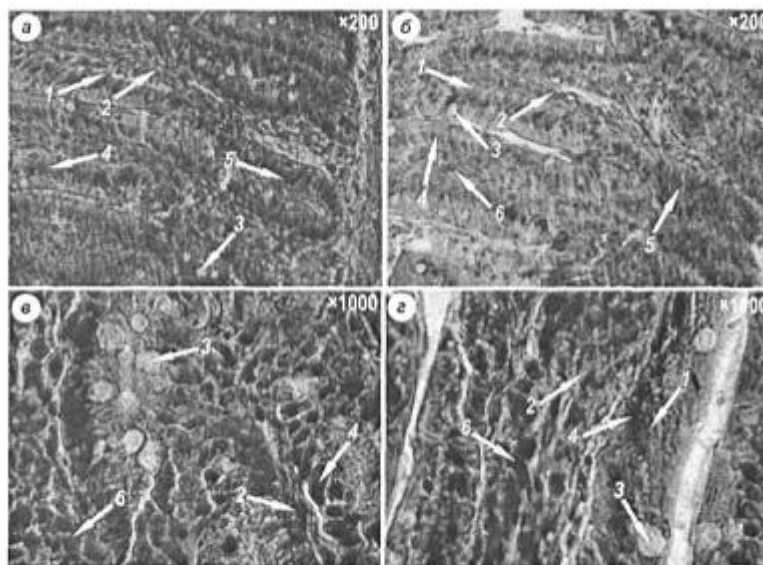
У порожній кишці тварин віком шість місяців локалізація PrP<sup>C</sup> дещо змінювалася. Зокрема, він установлений у лімфоцитах не лише у власній пластинці ворсинки, але й у криптах, а також у підслизовій оболонці кишки (фіг. 2б,в, а- контроль). Крім того, незначний вміст PrP<sup>C</sup> показано в облямовці епітеліоцитів (фіг. 2г).

Під час аналізу гістопрепаратів порожньої кишки щурів віком тридцять місяців спостерігали вікові зміни структури. Зокрема, ворсинки мали гребенеподібну форму, на їх поверхні помітні незрілі (необлямовані) епітеліоцити. Крипти були видовжені та містили меншу кількість келихоподібних екзокриноцитів та клітин Панета, порівняно зі шестимісячними тваринами (фіг. 3а). Локалізація PrP<sup>C</sup> за цих умов також дещо змінювалася. PrP<sup>C</sup> виявлено у лімфоцитах, які розташовані у власній пластинці ворсинок. Проте у криптах його вміст є незначним, а в облямовці ендокриноцитів клітинного пріона не виявлено (фіг. 3).

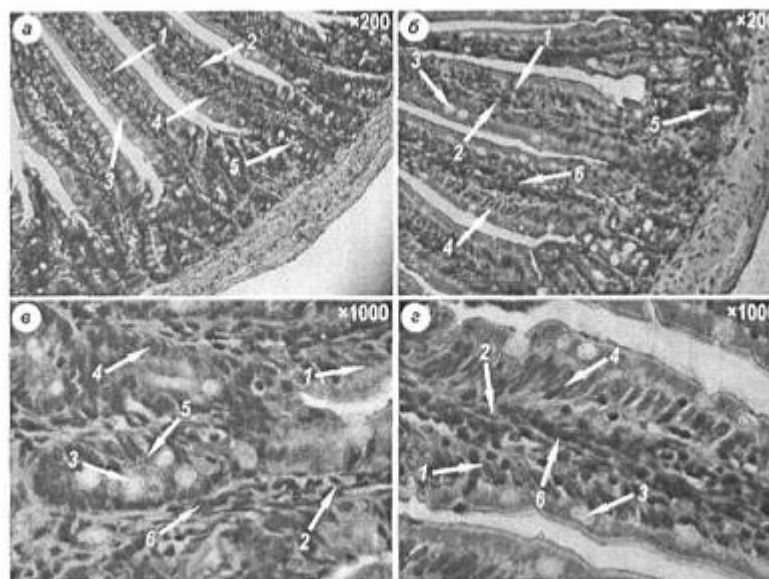
Кількісні дані встановлено у результаті оцифрування фотографій тканини за однакового збільшення мікроскопа. У порожній кишці молодих тварин уміст PrP<sup>C</sup> становив  $187,9 \pm 9,44$  ум. од. (пікселів на дюйм квадратний), проте у зрілих тварин зростав на 58,6 %, порівняно з молодими, тоді як у старих - знижувався на 43,2 %, порівняно зі зрілими

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

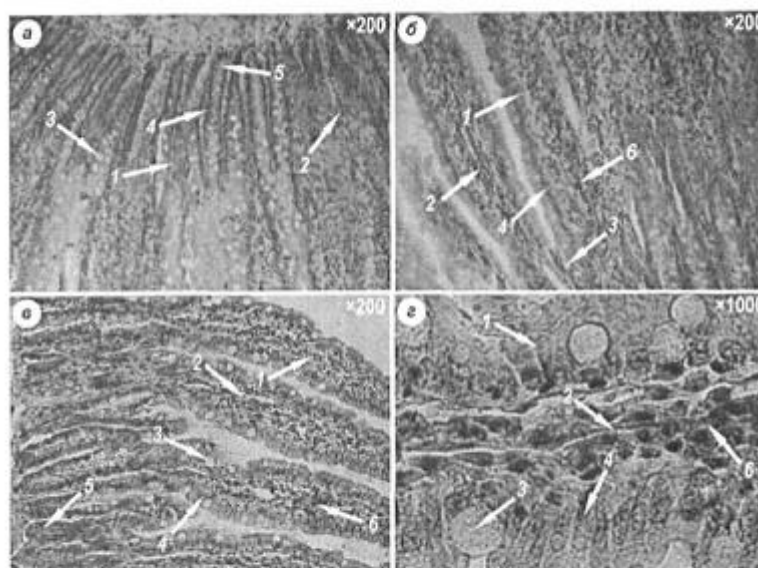
Спосіб виявлення тканинної локалізації клітинного пріона, який включає проведення імуногістохімічного дослідження, мікроскопію тканини з виявленням забарвленого клітинного пріона, який **відрізняється** тим, що використовують специфічні антитіла для встановлення попередника патологічного пріона у здоровому організмі.



фіг. 1



фiг.2



фiг.3

---

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

---

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