



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **119915**

(13) **U**

(51) МПК

C12N 15/10 (2006.01)

C12Q 1/06 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2017 04759**

(22) Дата подання заявки: **17.05.2017**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.10.2017**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.10.2017, Бюл.№ 19**

(72) Винахідник(и):

Желавський Микола Миколайович (UA)

(73) Власник(и):

**Желавський Микола Миколайович,
вул. Драй-Хмари, 44, кв. 67, м. Кам'янець-
Подільський, Хмельницька обл., 32300 (UA)**

**(54) СПОСІБ ЦИТОЛОГІЧНОЇ ВІЗУАЛІЗАЦІЇ ТА ОЦІНЮВАННЯ НЕЙТРОФІЛЬНИХ
ЕКСТРАЦЕЛЮЛЯРНИХ ПАСТОК СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ СТАТЕВИХ ОРГАНІВ ТВАРИН**

(57) Реферат:

Спосіб цитологічної візуалізації та оцінювання нейтрофільних екстрацелюлярних пасток слизової оболонки статевих органів тварин, в якому двоетапно проводять фарбування мікропрепаратами: спочатку 10 %-им розчином малахітового зеленого (2-3 хв.) з подальшим дофарбовуванням фарбником-фіксатором еозинметиленовим синім за Май-Грюнвальдом (20-30 с).

UA 119915 U

Корисна модель належить до галузі ветеринарної медицини, а саме до ветеринарного акушерства і клінічної імунології і може використовуватись для цитологічної візуалізації та оцінювання параметрів локального імунного захисту репродуктивної системи тварин.

Система фагоцитарного захисту формує клітинну ланку неспецифічного імунітету. З часу відкриття феномену фагоцитозу пройшло майже століття, проте вітчизняними та закордонними дослідниками досі продовжується активний пошук сучасних інформативних способів оцінювання функціональної активності імунокомпетентних клітин [1].

Фагоцитарна реакція реалізується в організмі спеціалізованими імунокомпетентними клітинами (мікро- та макрофагами), що є однією із основ підтримання гомеостазу. Активовані фагоцити здатні здійснювати клілінг патогенних об'єктів шляхом активного їх поглинання та перетравлювання, а також із залученням механізмів позаклітинного (екстрацелюлярного) захисту: екскреції активних форм Оксигену, медіаторів, цитокінів та інших біологічно активних сполук [1, 2, 3]. Останнім часом вчених різних країн світу привернуло вивчення феномену, пов'язаного із здатністю фагоцитів формувати специфічні екстрацелюлярні структури - захисні пастки [1, 2, 4, 5].

У лабораторній практиці дослідників для індикації екстрацелюлярних пасток нейтрофілів використовується відомий спосіб мікроскопічного флуоресцентного дослідження із використанням спеціального фарбника - акридинового помаранчевого. Цей спосіб дає змогу чітко візуалізувати нейтрофільні позаклітинні пастки у вигляді специфічних флуоресцентних утворень [5]. Недоліком способу є неповне оцінювання функціональної активності фагоцитів, необхідний рівень технічного оснащення спеціалізованих лабораторій та наявність реактивів.

У клінічній імунології також використовують спосіб оцінювання екстрацелюлярного формування нейтрофільних пасток за допомогою скануючої електронної мікроскопії [6]. Спосіб дає можливість виявляти поверхневу структуру фагоцитів та їх пасток у тримірному зображенні. Недоліком способу є багатоетапне приготування мікропрепаратів, а також наявність дорогого обладнання в спеціалізованій лабораторії, а також відповідну підготовку персоналу.

Найближчим аналогом до запропонованого способу вибраний відомий спосіб [7], що базується на проведенні світлової мікроскопії цитологічних мікропрепаратів задля виявлення позаклітинних (екстрацелюлярних) нейтрофільних пасток. Порівняно з аналогом, що розглянуто, цей спосіб включає фарбування препаратів комбінованим фарбуванням препарату Sytox Green (для індикації позаклітинних волокон ДНК та ядер клітин) та синьою Еванса (для фонового фарбування нативного препарату). Цей спосіб дозволяє достатньо ефективно виявити і дослідити екстрацелюлярні захисні пастки у нейтрофільних гранулоцитах. Проте, недоліком цього способу є те, що дослідник не має можливості визначити точні цитологічні зміни у самій фагоцитарній клітині, так і самих пасток, що надзвичайно важливо у оцінюванні основних параметрів фагоцитозу [1, 3].

В основу корисної моделі поставлена задача полягає в удосконаленні цитологічного способу візуалізації за допомогою світлової мікроскопії, оцінювання здатності фагоцитів формувати екстрацелюлярні захисні пастки.

Технічний результат, що досягається при вирішенні задачі, що полягає у підвищенні інформативності при оцінюванні показників локального імунного захисту органів розмноження тварин, що є надзвичайно важливим елементом в діагностиці патології репродуктивної системи тварин, а також при проведенні ефективних терапевтичних заходів.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб ґрунтується на проведенні цитологічного дослідження мікропрепарату з проведенням двоетапного спеціального фарбування.

Суть заявленого способу полягає у візуалізації нейтрофільних екстрацелюлярних пасток, а також виявлення специфічних цитологічних змін у фагоцитах.

Новим в технічному рішенні способу є: 1) вдосконалення способу фарбування мікропрепарату та цитологічна візуалізація екстрацелюлярного формування нейтрофільних пасток в мікропрепаратах слизових оболонок органів розмноження тварин; 2) розроблення інформативних діагностичних критеріїв оцінювання екстрацелюлярної активності формування захисних пасток.

Постановку досліду проводять за такою схемою: діагностичний матеріал отримують з слизової піхви, відібраного за допомогою шітки для цитології, попередньо змоченою 15 М фосфатним буфером ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} + \text{KH}_2\text{PO}_4$; pH 7,2). Готують мазок. Мікропрепарат фіксують метанолом (5-7 с) та фарбують 10 %-м забуференим фосфатним розчином малахітовим зеленим (pH 7,2) при експозиції 2-3 хв. Далі мікропрепарат промивають фосфатним буфером і фарбують фарбником-фіксатором еозинметиленовим синім за Май-Грюнвальдом (20-30 с).

Мікроскопічне оцінювання мікропрепаратів проводять за допомогою світлового мікроскопа (збільшення * 200 разів). Екстрацелюлярні захисні пастки нейтрофільних гранулоцитів візуалізуються у вигляді специфічних утворень на периферії фагоцитарної клітини.

У мікропрепаратах виявляють цитологічні зміни в нейтрофільних гранулоцитах та оцінюють

5 інтенсивність формування позаклітинних пасток, що виражається за такими показниками, як:

Індекс активації пасткоформування (ІАП, формула 1):

$ІАП = Нф_{пп} / Нф_{заг}, (1),$

де $Нф_{пп}$ - кількість нейтрофільних гранулоцитів у мікропрепараті слизової оболонки з позаклітинними пастками (в розрахунку на 300 клітин);

10 $Нф_{заг}$ - загальна кількість нейтрофільних гранулоцитів слизової оболонки.

Цитологічна інтенсивність пасткоформування визначається за IV ступенями активності:

0 - ступінь пасткоформування нейтрофілів (0 ст $Нф_{пп}$) - характеризується повною відсутністю захисних пасток нейтрофільних гранулоцитів;

1 - ступінь пасткоформування нейтрофілів (I ст $Нф_{пп}$) - візуалізуються нейтрофільні гранулоцити з неповним комплексом пасткоутворення;

15 II ступінь пасткоформування нейтрофілів (II ст $Нф_{пп}$) - характеризується наявністю нейтрофільних гранулоцитів в мікропрепаратах з добре вираженим частковим комплексом пасткоутворення;

20 III ступінь пасткоформування нейтрофілів (III ст $Нф_{пп}$) - характеризується наявністю нейтрофільних гранулоцитів в мікропрепаратах з повним комплексом пасткоутворення (з ознаками часткової адгезії фагоцитозу захоплених мікроорганізмів);

IV ступінь пасткоформування нейтрофілів (IV ст $Нф_{пп}$) - характеризується наявністю нейтрофільних гранулоцитів з повним сформованим комплексом пасткоутворення (з ознаками повної адгезії та фагоцитозу захоплених мікроорганізмів).

25 Цитологічний індекс пасткоутворення (ЦЛІП) визначали за формулою (2):

$ЦЛІП = ((I \text{ ст. } Нф_{пп} \cdot 1) + (II \text{ ст. } Нф_{пп} \cdot 2) + (III \text{ ст. } Нф_{пп} \cdot 3) + (IV \text{ ст. } Нф_{пп} \cdot 4)) / Нф_{заг}, (2)$

де $Нф_{пп}$ - кількість (%) нейтрофільних гранулоцитів, що проявили активність в пасткоутворенні (I. II. III та IV ступінь активності);

$Нф_{заг}$ - загальна кількість (%) нейтрофільних гранулоцитів в мікропрепаратах.

30 Індекс пасткової адгезії (ІПА, формула 3),

$ІПА = Ад \text{ м.о.} / Нф, (3)$

де Ад м.о. - кількість мікроорганізмів, що були адгезовані і фагоцитовані нейтрофільними гранулоцитами, які проявили активність в пасткоутворенні;

35 $Нф$ - загальна кількість нейтрофільних гранулоцитів, що проявили активність в пасткоутворенні.

Індекс пасткової декомпозиції (ІПД, формула 4).

$ІПД = Нф_{зп} / Нф_{пп}, (4)$

де $Нф_{зп}$ - кількість нейтрофільних гранулоцитів із зруйнованими (декомпозованими) пастками;

40 $Нф_{пп}$ - загальна кількість нейтрофільних гранулоцитів, що проявили активність в пасткоутворенні.

Джерела інформації:

1. Clinical immunology of the dog and cat /Michael. J Day Manson. Second Edition Publishing The Veterinary Press. 2012. P. 449.

45 2. Zhelavskiy M., Shunin I. Cell factors' condition of local immunity of vaginas mucosa in cats //Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S.Z. Gzhytskyj. 2016. N. 1. Vol. 18. P. 32-36.

3. Спосіб оцінювання локального імунітету статевих органів у тварин: пат. 109040 Україна. № u201601190; винахідники та власники Желавський Микола Миколайович, Шунін Ігор Микитович; заявл. 11.02.2016; опубл. 10.08.2016, Бюл. № 15.

50 4. Schulz C, Massberg S. Demystifying the prothrombotic role of NETs //Blood. 2017. 129:925-926.

5. Влияние прогестерона на фагоцитарную, кислородзависимую бактерицидную функции нейтрофилов и их способность образовывать внеклеточные ловушки //И.И. Долгушин и др. //Иммунология. № 5. 2012. С. 243-245.

6. Зак К.П. Роль нейтрофильных лейкоцитов в патогенезе сахарного диабета 1-го типа у человека (аналитический обзор с включением собственных данных) //Международный эндокринологический журнал. № 2(74). 2016. 130-139.

7. Спосіб обнаружения нейтрофильных внеклеточных ловушек в мукозальных секретах: пат. № 2463349 Российская Федерация; изобретатели Долгушин Илья Ильич, Андреева Юлия

Сергеевна, Савочкина Альбина Юрьевна Патентообладатель(и): Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Челябинская гос. мед. академия" заявл. 26.01.2009; опубл. 10.08.2010.

5

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб цитологічної візуалізації та оцінювання нейтрофільних екстрацелюлярних пасток слизової оболонки статевих органів тварин, який **відрізняється** тим, що проводять двоетапно фарбування мікропрепаратами: спочатку 10 %-им розчином малахітового зеленого (2-3 хв.) з подальшим дофарбовуванням фарбником-фіксатором еозин метиленовим синім за Май-Грюнвальдом (20-30 с).
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що у мікропрепаратах виявляють цитологічні зміни в нейтрофільних гранулоцитах і визначають інтенсивність формування позаклітинних пасток, що виражається за такими показниками, як: індекс активації пасткоформування (ІАП), цитологічний індекс пасткоутворення (ЦЛІП), індекс пасткової адгезії (ІПА) та індекс пасткової декомпозиції (ІПД).

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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