



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 70522

(13) U

(51) МПК

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2011 15520**

(22) Дата подання заявки: **28.12.2011**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **11.06.2012**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **11.06.2012, Бюл.№ 11**

(72) Винахідник(и):

**П'ятницький Юрій Сергійович (UA),
Дем'яненко Василь Васильович (UA)**

(73) Власник(и):

**ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ
МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я.
ГОРБАЧЕВСЬКОГО,
Майдан Волі, 1, м. Тернопіль, 46001 (UA)**

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ІМУННОЇ ТОЛЕРАНТНОСТІ ЛЕЙКОЦИТІВ ДОНОРА ДО АНТИГЕНУ КРІОЛІОФІЛІЗОВАНОЇ КСЕНОГЕННОЇ ШКІРИ (СВИНІ)

(57) Реферат:

Спосіб оцінки імунної толерантності лейкоцитів донора до антигену кріоліофілізованої ксеногенної шкіри (свині) включає відтворення взаємодії клітинних і гуморальних інгредієнтів реакції *in vitro*. Згідно зі способом, кріоліофілізовану ксеногенну шкіру (свині) попередньо подрібнюють, інкубують в ізотонічному розчині хлориду натрію, змішують з агаровим гелем і вносять в лунку на предметному склі, а в другу лунку вносять одну краплю розплавленого інтактного агарового гелю, на поверхню якого після застигання вносять суспензію забарвлених флуорохромом лейкоцитів організму-реципієнта таким чином, що між лунками утворюють заповнений агаровим гелем місток, мікропрепарат покривають скельцем і реєструють характер взаємодії інгредієнтів.

UA 70522 U

Корисна модель належить до медицини, зокрема імунології, і може бути використана в клінічній медицині, зокрема в трансплантології, алергології та комбустіології як тест-реакція для оцінки рівня імунологічної сумісності тканин із прогностичною метою.

Відомий спосіб оцінки імунної толерантності лейкоцитів донора до антигену кріоліофілізованої ксеногенної шкіри (свині), що включає відтворення взаємодії клітинних і гуморальних інгредієнтів реакції *in vitro* [1]. За відомим способом, на предметному склі змішують вказані клітинні і гуморальні інгредієнти, інкубують при 18-22 °С упродовж 1 год., спостерігають результат взаємодії за інтенсивністю лізису попередньо флуорохромованих лейкоцитів у полі зору люмінесцентного мікроскопа, за показником якої роблять висновок про імунну толерантність лейкоцитів до взятого в дослідження антигену ксеногенної шкіри.

Недоліком відомого способу є недостатній рівень методичності, точності та інформативності, що впливає з обмеженого часу спостереження (1 год.) за цитергічною клітинно-гуморальною реакцією імунологічного конфлікту, неврахуванням реакції хемотаксису лейкоцитів внаслідок перемішування інгредієнтів ще до початку спостереження за процесом їх взаємодії в реакції. Вказаний недолік є тим суттєвішим, що, як відомо, клітинні реакції імунологічного конфлікту зазвичай тривають принаймні 24 год.

В основу корисної моделі поставлено задачу вдосконалити відомий спосіб, в якому шляхом зміни технології перебігу імунодіагностичної реакції, спрямованої на зміну умов взаємодії клітинних і гуморальних інгредієнтів у напрямку виявлення активності внутрішньоклітинних механізмів хемотаксису імунних лейкоцитів і відтворення характеру лейкоцитолізу у динамічному довготривалому процесі взаємодії інгредієнтів імунодіагностичної реакції досягають підвищення методичності, точності та інформативності.

При вирішенні технічної задачі було взято до уваги те, що реакція хемотаксису імунних клітин виявляється при рознесенні у просторі, зокрема у двовимірному просторі на поверхні предметного скла, макромолекул імунного подразника, наприклад, антигену, і імуноактивних клітин, наприклад, лейкоцитів [2, 3]. Вказана реакція взаємодії, якій, власне, передує хемотаксис лейкоцитів, певною мірою залежить від в'язкості поверхні, на якій здійснюється взаємодія інгредієнтів імунної реакції. Необхідний рівень в'язкості такої поверхні зазвичай досягають застосуванням агарового гелю. Крім того, при рознесенні у просторі на поверхні предметного скла інгредієнтів реакції із залишенням вільним від інгредієнтів стандартизованого за розмірами агарового містка легко відтворюються умови для спостереження за хемотаксисом лейкоцитів та можливості повнішої оцінки його параметрів.

Виходячи з наведеного, у відомому способі оцінки імунної толерантності лейкоцитів донора до антигену кріоліофілізованої ксеногенної шкіри (свині), що включає відтворення взаємодії клітинних і гуморальних інгредієнтів реакції *in vitro*, відповідно до корисної моделі кріоліофілізовану ксеногенну шкіру (свині) попередньо подрібнюють до розміру мікрочасточок принаймні не більше 100 мкм, інкубують в ізотонічному розчині хлориду натрію впродовж 30 хв. у співвідношенні 1:4, змішують у рівних об'ємах з агаровим гелем і вносять у вигляді краплі в лунку на предметному склі, а в розташовану на відстані 10 мм від неї другу лунку вносять одну краплю розплавленого інтактного агарового гелю, на поверхню якого після застигання вносять 20 мкл суспензії забарвлених флуорохромом лейкоцитів організму-реципієнта таким чином, що між лунками утворюють стандартних розмірів заповнений агаровим гелем місток, мікропрепарат покривають скельцем і реєструють характер взаємодії інгредієнтів - лейкоцитів і антигену кріоліофілізованої ксеногенної шкіри у полі зору люмінесцентного мікроскопа в динамічному режимі впродовж 24 год., а прогностичний висновок формують за показниками реакції взаємодії вказаних інгредієнтів, зокрема у вигляді хемотаксису і лізису лейкоцитів.

Перелік фігур.

Фіг. 1. Схема постановки імунодіагностичної проби на предметному склі:

1 - лунка, заповнена агаровим гелем з антигеном кріоліофілізованої шкіри свині;

2 - предметне скло з лунками;

3 - лунка з агаровим гелем і нашарованими лейкоцитами;

4 - агаровий місток;

5 - скельце.

Фіг. 2. Виражена цитодеструкція у вигляді лейкоцитолізу як прояв низького рівня імунної толерантності лейкоцитів до антигену кріоліофілізованої ксеногенної шкіри. Цитолюмінесцентний аналіз. ЛЮОМ Р8:Об. x9; ок. x15.

Спосіб здійснюють наступним чином. Кріоліофілізовану ксеногенну шкіру (свині) попередньо подрібнюють до розміру мікрочасточок принаймні не більше 100 мкм, інкубують в ізотонічному розчині хлориду натрію впродовж 30 хв. у співвідношенні 1:4, змішують у рівних об'ємах з агаровим гелем і вносять у вигляді краплі в лунку 1 (фіг. 1) на предметному склі 2, а в

розташовану на відстані 10 мм від неї другу лунку 3 вносять одну краплю розплавленого інтактного агарового гелю, на поверхню якого після застигання вносять 20 мкл суспензії забарвлених флуорохромом лейкоцитів організму-реципієнта. При цьому між двома лунками утворюють стандартних розмірів заповнений агаровим гелем місток 4, на поверхні якого здійснюють спостереження і реєстрацію реакції взаємодії між інгредієнтами імунної реакції. Далі мікропрепарат покривають скельцем 5 і реєструють характер взаємодії інгредієнтів, а саме лейкоцитів і антигену кріоліофілізованої ксеногенної шкіри у полі зору люмінесцентного мікроскопа в динамічному режимі впродовж 24 год. Висновок щодо імунної толерантності лейкоцитів до антигену ксеногенної шкіри формулюють за показниками реакції взаємодії вказаних інгредієнтів, зокрема хемотаксису, цигодеструкції у вигляді лізису лейкоцитів та характеру їх люмінесцентного світіння.

Приклад 1. Попередньо подрібнили кріоліофілізовану ксеногенну шкіру (свині) до розмірів мікрочасточок, що не перевищували 100 мкм, занурили їх в ізотонічний розчин хлориду натрію на 30 хв., довели у співвідношенні до 1:4, відцентрифугували при $1000 \text{ об} \cdot \text{хв}^{-1}$ впродовж 20 хв., а надосад змішали у рівних об'ємах з агаровим гелем. Останній мікропіпеткою внесли у вигляді краплі в одну із лунок, як позначено на фіг. 1. До іншої лунки на предметному склі внесли одну краплю розплавленого інтактного агарового гелю, на поверхню якого після застигання нашарували 20 мкл суспензії попередньо забарвлених флуорохромом акридином оранжевим (1:5000) лейкоцитів організму-реципієнта. Інгредієнти реакції на предметному склі накрили скельцем і витримували при 20 °C упродовж 24 год. з одночасною реєстрацією процесу плівковою фотокамерою за допомогою фотокамери при відкритому об'єктиві. Висновок щодо імунної толерантності лейкоцитів до антигену ксеногенної шкіри формулювали за динамікою зміни параметрів люмінесценції клітин і за характерними розмітими слідами на плівці як відображення руху лейкоцитів у процесі хемотаксису і лейкоцитолізу.

Приклад 2. За запропонованим способом проведено дослідження імунної толерантності лейкоцитів 8 донорів із антигеном 24 зразків кріоліофілізованої шкіри. Результати дослідження наведено в таблиці.

Таблиця

Характеристика імунотолерантності лейкоцитів донорів до антигену різних зразків кріоліофілізованої ксеношкіри свині в реакції *in vitro*

Базисні імунодіагностичні реакції	Ступені імунотолерантності лейкоцитів до антигену ксеношкіри			Р
	Високий n=17 (70,8 %)	Середній n=5 (20,8 %)	Низький n=2 (8,4 %)	
Лейкоцитоліз, у.о.	1,8±0,3	2,7±0,3	3,8±0,5	1,2 <0,05 1,3 <0,05 2,3 >0,05
Хемотаксис, у.о.	1,9±0,3	2,9±0,4	3,9±0,5	1,2 <0,05 1,3 <0,05 2,3 <0,05.

Із наведених у таблиці даних видно, що в 17 випадках із 24 встановлено високий рівень імунної толерантності лейкоцитів до антигену ксеношкіри, що становило $(70,8 \pm 9,3) \%$. З іншого боку, це дістало вираження у пониженому лейкоцитолізі ($1,8 \pm 0,3$) і хемотаксисі, порівняно із середнім та низьким рівнями імунотолерантності лейкоцитів ($P < 0,05$).

Отже, запропонований спосіб забезпечує вищий, ніж за способом-аналогом, рівень методичного забезпечення, а також точності та інформативності дослідження, і може знайти застосування при вирішенні значного кола завдань у сфері оцінки та корекції імунологічного конфлікту як на рівні ізольованих тканин, так і цілісного організму.

Джерела інформації, які слід взяти до уваги:

1. Бігуняк В.В., Дем'яненко В.В., Кліщ І.М., П'ятницький Ю.С. Подрібнений субстрат кріоконсервованої ксеношкіри: новий технологічний етап системної тканинної терапії / Здобутки клінічної та експериментальної медицини. Збірник матеріалів конф. 4 червня 2009 року. Тернопіль, ТДМУ, Укрмедкнига, 2009. - С. 52-53.

2. Дем'яненко В.В., Гуда Н.В., Бакалюс Р.М., Богун М.І. Про перспективи подальшого вдосконалення лейкоцитарних діагностичних реакцій. Інфекційні хвороби: досягнення і

проблеми в діагностиці та терапії. Матеріали VIII з'їзду інфекціоністів України (6-8 жовтня 2010 року, м. Вінниця). - Тернопіль: ТДМУ "Укрмедкнига", 2010. - С. 361.

3. Дем'яненко В.В., Гуда Н.В., Волков Р.К. Люмінесцентна мікроскопія: методологія морфологічних досліджень нової доби / Збірник тез науково-практ. конф. // Прикладні аспекти морфології. Івано-Франківськ, 2010. - С. 48-51.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 10 Спосіб оцінки імунної толерантності лейкоцитів донора до антигену кріоліофілізованої ксеногенної шкіри (свині), що включає відтворення взаємодії клітинних і гуморальних інгредієнтів реакції *in vitro*, який **відрізняється** тим, що кріоліофілізовану ксеногенну шкіру (свині) попередньо подрібнюють до розміру мікрочасточок принаймні не більше 100 мкм, інкубують в ізотонічному розчині хлориду натрію впродовж 30 хв. у співвідношенні 1:4, змішують у рівних об'ємах з агаровим гелем і вносять у вигляді краплі в лунку на предметному склі, а в розташовану на відстані 10 мм від неї другу лунку вносять одну краплю розплавленого інтактного агарового гелю, на поверхню якого після застигання вносять 20 мкл суспензії забарвлених флуорохромом лейкоцитів організму-реципієнта таким чином, що між лунками утворюють стандартних розмірів заповнений агаровим гелем місток, мікропрепарат покривають скельцем і реєструють характер взаємодії інгредієнтів, а саме лейкоцитів і антигену кріоліофілізованої ксеногенної шкіри, у полі зору люмінесцентного мікроскопа в динамічному режимі впродовж 24 год., а прогностичний висновок формують за показниками реакції взаємодії вказаних інгредієнтів, зокрема у вигляді хемотаксису і лізису лейкоцитів.

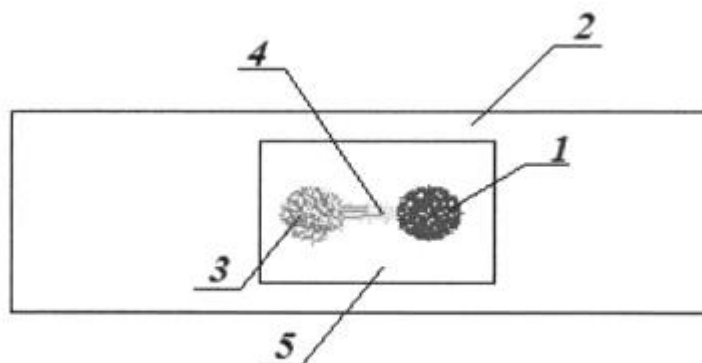


Fig. 1

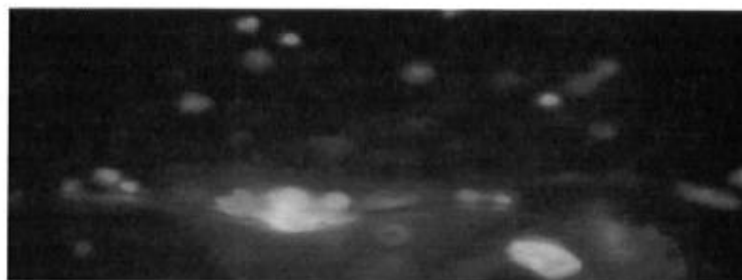


Fig. 2

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

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

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