



УКРАЇНА

(19) UA (11) 16638 (13) U
(51) МПК (2006)
G01N 33/49

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ ОЦІНКИ МАКРОФАГАЛЬНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ МОНОНУКЛЕАРІВ

1

(21) u200602121

(22) 27.02.2006

(24) 15.08.2006

(46) 15.08.2006, Бюл. № 8, 2006 р.

(72) Віщур Олег Іванович, Кандяк Любов Михайлівна, Огородник Наталія Зіновіївна

(73) ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН УААН

(57) 1. Спосіб функціональної оцінки макрофагальної трансформації мононуклеарів, який включає виділення мононуклеарів з гепаринізованої крові досліджуваної тварини, відмивання клітин і культивування їх в поживному середовищі з додаванням препарату крові, антибіотиків, фунгіцидного антистатика на покривних скельцях, в термостаті

2

при t 37 °C з наступним вилученням їх з ємкості із поживним середовищем після інкубування, фіксацією, фарбуванням і мікроскопією одержаних препаратів та визначенням на них кількості трансформованих макрофагів.

2. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що виділення клітин мононуклеарів із крові здійснюють шляхом відстоювання з наступним культивуванням в поживному середовищі, при цьому як препарат крові у ньому використовують відстоюну плазму крові досліджуваної тварини, а інкубування клітин здійснюють на цілих покривних скельцях, занурюючи їх у чашки Петрі з середовищем Хенкса власного приготування.

Корисна модель належить до галузі ветеринарної імунології, зокрема до способів визначення імунологічного статусу тварин, а саме до способів оцінки стану макрофагальної трансформації мононуклеарів у крові досліджуваних тварин. Спосіб може бути використаний в установах ветеринарної медицини та тваринницьких господарствах з різними формами власності для визначення інтенсивності формування системи імунного захисту у тварин.

Відомі способи оцінки імунологічного статусу тварин. [Патенти України №№2419А; 2492А; А.С. СРСР №1378578; 157573].

Відомі способи включають виділення лейкоцитів з крові досліджуваних тварин, культивування їх на предметних та покривних склах, фарбування препаратів та визначення фагоцитарної активності лейкоцитів і додатково за кількістю фармозанпозитивних гранулоцитів.

Недоліком цих способів є їх мала ефективність, недостатня точність оцінки, а також трудомісткість та висока ціна цих препаратів.

Найбільш близьким по суті рішенням до заявленого способу є:

"Методика функціональної оцінки попередників макрофагів (А-клітин)" [Методичні рекомендації по визначенні кількості і функціональної активності імунокомпетентних клітин свиней. Собко А.Й., Квачов В.Г., Український науково-дослідний ветеринарний інститут, Москва, 1987р., 13ст.], яка включає виділення мононуклеарів з гепаринізованої крові досліджуваної тварини, відмивання клітин, культивування їх в поживному середовищі з дода-

ванням препарату крові, антибіотиків фунгіцидного антистатика, середовища 199, на покривних склах в термостаті при температурі 37°C з наступним вилученням їх з ємності з поживним середовищем після інкубування, фіксацією, фарбуванням і мікроскопією одержаних препаратів та визначенням на них кількості трансформованих макрофагів.

Недоліком відомого способу є те, що в результаті тривалого центрифугування, завдяки якому здійснюють відмивання мононуклеарів, відбувається деформація клітин крові, крім цього, використання дорогого середовища 199 для відмивання та культивування клітин крові, а також використання пеніцилінових флаконів з розрізаними на чотири частини покривними скельцями для інкубації є економічно не вигідним, утруднює чистоту та точність способу.

Заявлений нами спосіб усуває недоліки найближчого аналога, забезпечує ефективність, зручність у користуванні та економічність для установ в яких він буде застосовуватись.

В основу корисної моделі поставлено завдання - розробити новий спосіб оцінки макрофагальної трансформації мононуклеарів, зручний у застосуванні, економічно вигідний для установ в яких він буде здійснюватись, який запобігає руйнуванню і деформації клітин крові у процесі його здійснення.

Технічний результат досягають тим, що виділення клітин мононуклеарів здійснюється шляхом відстоювання на холоді з наступним культивуванням у поживному середовищі при цьому в якості препарату крові в поживному середовищі викорис-

(19) UA (11) 16638 (13) U

товують відстояну плазму крові досліджуваної тварини, а інкубування клітин здійснюють на цілих покривних склах, занурюючи їх у чашку Петрі діаметром чотири сантиметри з середовищем Хенкса власного приготування з додаванням антибіотика і фунгіцидного антистатика.

Використання у заявленому способі виділення клітин мононуклеарів відстоюванням в поживному середовищі на холоді з наступним зливанням, замість тривалого центрифугування, в прототипі попереджує деформацію і руйнування відмитих клітин мононуклеарів, що підвищує якість одержуваних препаратів та ефективність способу.

Введення в поживне середовище в якості препарату крові відстояної плазми досліджуваних тварин дає можливість відмовитись від застосування стандартизованої сироватки крові ВРХ, як протектора живих клітин, а заміна дорогого середовища 199 середовищем Хенкса власного приготування суттєво здешевлює витрати на здійснення способу. Використання в якості ємності для інкубування клітин на цілих покривних скельцях чашок Петрі замість пеніцилінових флаконів, в які занурюють четвертинки покривних скельць забезпечує зручність виконання способу, покращує якість препаратів клітин, а відтак, ефективність способу.

Отже, заявлений нами спосіб забезпечує зручне і надійне виготовлення препаратів та об'єктивну і швидко оцінку стану макрофагальної трансформації мононуклеарів.

Виявлене технічне рішення, в якому є ряд суттєвих ознак, спільних із заявленим ["Методика функціональної оцінки попередників макрофагів (А-

клітин)". Собко А.Й., Квачов В.Г., Український науково-дослідний ветеринарний інститут, Москва. 1987р. 13с.]: виділення мононуклеарів з гепаринізованої крові досліджуваної тварини, відмивання клітин, культивування їх в поживному середовищі з додаванням препарату крові, антибіотиків, фунгіцидного антистатика на покривних склах в термостаті при температурі 37°C з наступним вилученням їх з ємності із поживним середовищем після інкубування, фіксацією, фарбуванням і мікроскопією одержаних препаратів та визначенням на них кількості трансформованих макрофагів.

Однак, наявність зазначених спільних з найближчим аналогом ознак недостатня для отримання технічного результату, який забезпечує заявлена корисна модель.

Заявлений спосіб належить до галузі ветеринарної імунології, зокрема до способів визначення імунологічного потенціалу тварин, а саме до способів оцінки стану макрофагальної трансформації мононуклеарів в крові досліджуваних тварин і, може бути використаний у тваринницьких господарствах з різними формами власності та установах ветеринарної медицини для визначення інтенсивності формування системи імунного захисту тварин.

Ефективність заявленого способу і його переваги перед найближчим аналогом підтверджені прикладом конкретного виконання в умовах лабораторії імунології ІБТ УААН.

Схема і результати досліджень наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Схема досліджу

№ п/п	Показники	Способи оцінки	
		Відомий (прототип)	Новий
1	2	3	4
1	Проведено досліджень	Не менше десяти	Не менше десяти
2	Етапи виконання		
2.1	Гепаринізована переферирична кров	+	+
2.2	Виділення мононуклеарів	Центрифугування 2х1500об/хв	відстоювання
2.3	Культивування в поживному середовищі, що містить: - препарат крові - антибіотики - фунгіцидний антистатик - середовище 199 - середовище Хенкса	Стандартизована сироватка ВРХ + + + -	Відстояна плазма крові досліджуваної тварини + + - +
2.4	Культивування в термостаті при t 37°C: - на покривних скельцях - вилучення скельць - промивання - висушування - фіксація - фарбування за Романовським-Гімза - фіксація покривного скельця на предметне скло - мікроскопіювання - одержано якісних препаратів	В пеніцилінових флаконах 1/4 розрізаних + + + + + + + + 9	В чашках Петрі цілих + + + + + + + 10

Наведені дані свідчать про перевагу заявленого способу.