



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **57841** (13) **U**
(51) МПК (2011.01)
A61B 10/00
G01N 33/49 (2011.01)
G01N 21/64 (2011.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ЦИРКУЛЮЮЧИХ ЕНДОТЕЛІАЛЬНИХ КЛІТИН У ПЛАЗМІ КРОВІ

1

(21) u201011243
(22) 20.09.2010
(24) 10.03.2011
(46) 10.03.2011, Бюл.№ 5, 2011 р.
(72) СУСЛА ОЛЕКСАНДР БОГДАНОВИЧ, МИСУЛА
ІГОР РОМАНОВИЧ
(73) ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

2

(57) Спосіб визначення вмісту циркулюючих ендотеліальних клітин у плазмі крові, що полягає в отриманні суспензії ендотеліоцитів у аутологічній цитратній плазмі з наступним підрахунком їх у камері Горяєва під мікроскопом, який **відрізняється** тим, що клітини у мікропрепараті визначають люмінесцентно-мікроскопічним методом на принципових засадах поляризованої флуоресценції.

Корисна модель стосується медицини, зокрема лабораторної діагностики, і може бути використана в медичній практиці як інформативний цитодіагностичний тест.

Відомий спосіб визначення вмісту циркулюючих ендотеліальних клітин у плазмі крові, що полягає в отриманні суспензії ендотеліоцитів у аутологічній цитратній плазмі з наступним підрахунком їх у камері Горяєва під мікроскопом [1]. За відомим способом, ендотеліальні клітини реєструють за допомогою світлооптичної мікроскопії з фазовим контрастуванням їх у полі зору.

Недоліком відомого способу є недостатній рівень Інформативності, що впливає з обмежених можливостей метода фазового контрасту при виявленні незафарбованих клітин. Зазначений недолік обмежує візуальність досліджуваних клітин за умов, детермінованих патологічним процесом.

В основу корисної моделі поставлено завдання вдосконалити відомий спосіб, в якому шляхом застосування точнішого, ніж за прототипом, способу виявлення ендотеліальних клітин у мікропрепараті, спрямованого на підвищення рівня контрастності, досягають підвищення точності та інформативності.

При вирішенні технічного завдання було взято до уваги те, що підвищенню рівня контрастності мікрооб'єкту, зокрема клітин, сприяє технічний прийом, оснований на явищі люмінесценції. Вказаний ефект проявляється при дослідженні живої структури з властивостями рідких кристалів, наприклад, таких, що містять ліпіди, циклічні амінокислоти, ефіри холестерину, нуклеїнові кислоти тощо [2]. Саме тому використання явища поляри-

зації флуоресценції для посилення контрасту живих клітин у мікропрепараті, у тому числі ендотеліоцитів, є адекватним і достатньо коректним. До того ж, відпадає необхідність застосування будь-яких барвників, оскільки зображення досліджуваних клітин характеризується відповідним кольором флуоресценції. Власне, останнє й забезпечує Інформативно важливий феномен посиленого контрасту.

Поставлене завдання вирішують тим, що у відомому способі визначення вмісту циркулюючих ендотеліальних клітин у плазмі крові, що полягає в отриманні суспензії ендотеліоцитів у аутологічній цитратній плазмі з наступним підрахунком їх у камері Горяєва під мікроскопом, відповідно до корисної моделі клітини у мікропрепараті визначають люмінесцентно-мікроскопічним методом на принципових засадах поляризованої флуоресценції.

Перелік фігур.

Фіг.1. Ендотеліальні клітини під фазово-контрастним мікроскопом. Об. $\times 40$; ок. $\times 10$.

Фіг.2. Поляризована флуоресценція ендотеліоцитів. Об. $\times 40$; ок. $\times 10$.

Спосіб здійснюють наступним чином. Кров із ліктьової вени забирають вранці натще у кількості 3-5мл і змішують із розчином 3,8% натрію цитрату в співвідношенні 1:9. Суміш центрифугують упродовж 10-20хв. зі швидкістю 1200-1500об/хв., після чого 1 мл збагаченої на тромбоцити плазми змішують із 0,2мл аденозиндифосфату або його натрієвої солі в концентрації 1мг/мл. Суміш струшують і повторно центрифугують у попередньому режимі для видалення агрегатів тромбоцитів. Супернатант переносять у іншу пробірку і центрифугують.

(13) **U**
(11) **57841**
(19) **UA**

гують упродовж 15-20хв. зі швидкістю 3000-3500об/хв для осадження ендотеліальних клітин. Потім надосадову плазму видаляють, а отриманий осад суспендують у 0,1мл 0,9% розчину натрію хлориду і перемішують. Ендотеліальні клітини підраховують у 2-х сітках камери Горяєва у полі зору мікроскопа за методом поляризованої флуоресценції, а кількість ендотеліоцитів виражають їх вмістом віл крові.

Приклад 1.

Кров із ліктьової вени в кількості 4,5мл внесли у пластикову пробірку, що містила 0,5мл 3,8% розчину натрію цитрату. Суміш центрифугували 20хв. зі швидкістю 1500об/хв., після чого 1мл плазми змішали з 0,2мл натрієвої солі аденозиндифосфату в концентрації 1мг/мл, струшували впродовж 10хв. і повторно центрифугували в попередньому режимі. Супернатант перенесли в іншу пробірку і центрифугували впродовж 20хв. зі швидкістю 3000об/хв, після чого надосадову плазму видаляли, а отриманий осад суспендували в 0,1мл 0,9% розчину натрію хлориду і перемішували скляною паличкою. Вміст ендотеліоцитів у вигляді полігональної форми клітин з яскрозеленим світінням визначали за методом поляризованої флуоресценції і підраховували у 2-х сітках камери Горяєва, а результат виражали кількістю клітин з розрахунку на 1л крові.



Фіг. 1

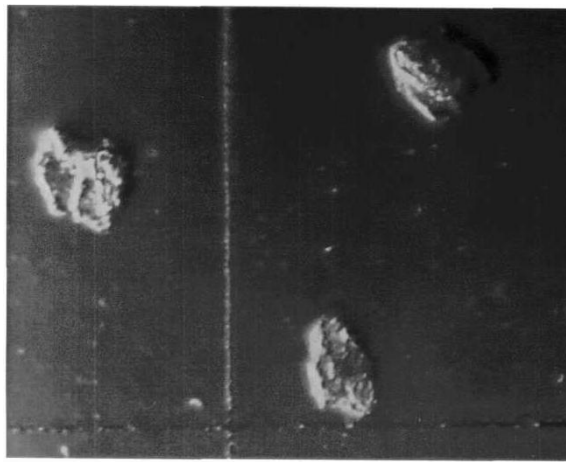
Приклад 2.

За наведеним способом визначали вміст ендотеліальних клітин у 23 хворих із термінальною нирковою недостатністю, які перебували на хронічному гемодіалізі. Завдяки запропонованому способу визначення клітин було методично зручним, а результати високоточні, тоді як за відомим способом вказаний аналіз вимагав значних затрат часу, відрізнявся складністю і не забезпечував необхідного рівня точності.

Таким чином, запропонований спосіб забезпечує точніше, а отже інформативніше, порівняно із способом-прототипом, визначення вмісту ендотеліальних клітин у плазмі крові, може бути використаний в медичній практиці для об'єктивної оцінки функціональної активності ендотелію в нормі і патології.

Джерела інформації, які слід взяти до уваги:

1. Hladovec J. Circulating endothelial cells in acute myocardial infarction and angina pectoris / J. Hladovec, I. Prerovsky, V. Stance [et al.] // *Klin. Wochenshr.* - 1978. - Vol.56. - P.1033-1036.
2. Ridler P.J. Polarized fluorescence studies of electrically oriented DNA-dye solutions / Peter J. Ridler and Barry R. Jennings // *International Journal of Biological Macromolecules.* - 1980. - Vol.2, №5. - P.313-317.



Фіг. 2