



УКРАЇНА

(19) UA (11) 63006 (13) U
(51) МПК
G01N 33/487 (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ РІВНЯ АНТИТІЛ ДО НАТИВНОЇ ДНК ЕКСПРЕС-МЕТОДОМ

1

(21) u201102080

(22) 22.02.2011

(24) 26.09.2011

(46) 26.09.2011, Бюл.№ 18, 2011 р.

(72) ГОРБЕНКО НАТАЛІЯ ІВАНІВНА, КОЗАР ВАЛЕНТИНА ВІКТОРІВНА, ІВАНОВА ОЛЬГА ВОЛОДИМИРІВНА

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ ЕНДОКРИННОЇ ПАТОЛОГІЇ ІМ. В.Я. ДАНИ-

2

ЛЕВСЬКОГО АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ"

(57) Спосіб визначення рівня антитіл до нативної ДНК експрес-методом, який характеризується тим, що визначення проводять в плазмі крові за допомогою діагностикуму, який готують з карбоксильованого полістирольного латексу із розміром частинок 0,77 - 0,83 мкм.

Корисна модель належить до області біомедичних технологій, а саме визначення антитіл до нативної ДНК в біологічній рідині, і може бути використана для діагностики патологічних станів, які супроводжуються зростанням титрів аутоантитіл у людини та тварин.

Відомо, що в організмі людини і тварин поряд з природними (натуральними) антитілами існують також природні аутоантитіла, які є важливими регуляторами фізіологічних процесів в організмі. Тому їх відносять до природних регуляторних аутоантитіл, які специфічно зв'язуються зі своїми антигенами-мішенями. В нормальних умовах аутоантитіла продукуються щоденно на протязі всього життя людини, і в крові здорового організму присутні в суворо визначених концентраціях [2]. До такого типу антитіл відносять антитіла до ДНК, поява яких обумовлена відмиранням клітин і надходженням в кров фрагментів ядерної ДНК [4].

Якщо ж продукція аутоантитіл (ауто-АТ) виходить за фізіологічні межі (тобто, коли їх стає занадто багато чи занадто мало) і зміни зберігаються місяцями - це може стати причиною хвороби. Вкрай важливо, що стійкі зміни в репертуарах ауто-АТ виникають на початку розвитку захворювання, тобто в період доклінічних порушень, які можуть бути усунуті [3]. У осіб з тими чи іншими метаболічними порушеннями, які супроводжують різні захворювання, як правило, виявляють значні довготривалі і надто специфічні кількісні зміни складу циркулюючих природних ауто-АТ [7].

Зростання рівня антитіл до ДНК має важливе діагностичне і прогностичне значення при аутоімунних захворюваннях (системний червоний вовчак,

ревматоїдний артрит, системна склеродермія, аутоімунний тиреоїдит, цукровий діабет 1 типу та ін.), васкулітах, хронічних обструктивних захворюваннях легень, гломерулонефриті, псоріазі, імунній дисрегуляції центральної нервової системи, акушерських ускладненнях тощо [8,19].

На сьогодні для визначення рівня ауто-АТ до нативної ДНК в сироватці крові, в основному, використовують метод імуноферментного аналізу, але для його проведення витрачається декілька годин і необхідне спеціальне обладнання. До того ж, визначення даного аналіту саме в сироватці крові може призвести до гіподіагностики, а отже і зниження діагностичної значимості отриманих результатів.

Задача корисної моделі - розробка чутливого специфічного економічного експрес-способу визначення рівня антитіл до нативної ДНК.

Поставлена задача вирішується тим, що визначення рівня ауто-АТ до нативної ДНК проводять в плазмі крові за допомогою діагностикуму, який готують з карбоксильованого полістирольного латексу із розміром частинок 0,77-0,83 мкм.

Технічний результат - здешевлення та скорочення часу визначення рівня ауто-АТ до нативної ДНК, що дозволяє оперативно отримувати інформацію і забезпечує своєчасність та ефективність лікувальних та профілактичних заходів.

За основу було взято метод Plotz С. та Singer J. [6]. Для здійснення способу, що заявляється, готують латексний діагностикум, як мікросфер використовують карбоксильовані полістирольні латексні частинки з розміром 0,77-0,83 мкм. Сенсibiliзацію латексних частин проводять розведеною у

(19) UA (11) 63006 (13) U

воді нативною ДНК («Sigma», USA) методом адсорбції. Кількість ДНК, яку використовують для сенсифікації латексу, залежить від концентрації, що визначають експериментально. Інкують суміш 2 години при 37 °С, після чого суспензію відмивають розчином гліцинового буферу і доводять концентрацію до 0,5 % - 0,8 % по сухому залишку латекса за допомогою гліцинового буфера, рН 8,2. Гліциновий буфер готують шляхом доведення 0,1 М розчину гліцину до рН 8,2 1М розчином NaOH та додаванням 8,5 г натрію хлориду на 1 л. Приготовлений діагностикум може зберігатися протягом 1 року при температурі 4 °С.

З отриманим діагностикумом ставлять реакцію аглютинації латексу. Як негативний контроль застосовують гліциновий буфер. Перед початком процедури усі реагенти необхідно прогріти до кімнатної температури. Латексний реагент старанно перемішати. Для визначення рівня антитіл до нативної ДНК в плазмі крові нанести на скляну пластинку чи лунки тестового слайду по 20 мкл реагенту, потім в кожну лунку внести по 20 мкл нерозведеної плазми крові, перемішати скляною чи пластиковою паличкою, рівномірно розподіляючи суміш по всій поверхні лунки. Проінкубувати 2 хвилини, повільно похитуючи скло чи слайд, після чого одразу ж провести облік результатів. Відсутність аглютинації вказує на негативний результат (відсутність антитіл). Якщо досліджувана плазма дала позитивну реакцію, вона підлягає додатковому дослідженню з використанням титрування. Для цього проводять двократні розведення (в 2, 4, 8, 16, 32 і т.д. разів) досліджуваної проби гліциновим буфером. Останнє розведення, яке призвело до розвитку аглютинації, є титром плазми крові, на основі якого судять про титр антитіл до нативної ДНК. Цей тест дозволяє оперативно одержати інформацію - час проведення аналізу складає 2-3 хвилини.

Приклад

Досліджували плазму крові інтактних та оварієктомованих щурів самиць (через 10 тижнів після операції). Показано, що інтактні тварини мали в середньому титр антитіл до нативної ДНК 26,3 (min 16÷max 32), тоді як у оварієктомованих щурів відповідно 64,0 (min 64÷max 64) ($p < 0,05$). Релевантність розробленого методу підтверджується тим, що отримані значення нормальних рівнів аутоантитіл співпадають з даними літератури. Прийнято вважати, що в нормі рівень антитіл та аутоантитіл не перевищує титр 1:16-1:32 [1].

За умов дефіциту естрогенів, внаслідок активації процесів апоптозу [5], в кровоток надходить надлишок фосфоліпідних компонентів мембран, фрагментів ядерної ДНК відмираючих клітин, про що свідчить зростання рівня аутоантитіл та аутоімунної патології в період постменопаузи. Таким чином, зафіксоване нами зростання антитіл до нативної ДНК у оварієктомованих щурів свідчить про адекватність та чутливість приготовленого діагностикуму.

Таким чином, розроблений спосіб є адекватним до поставленого завдання і здатен виявляти аутоантитіла до ДНК, що підтверджує його специфічність і достатню чутливість.

Джерела інформації:

1. Прикладная иммунология /Под ред. А.А. Сохина, Е.Ф. Чернушенко. - К. : Здоров'я, 1984. - 320 с.)
2. Cohen I.R., Young D.B. Autoimmunity, microbial immunity and immunological homusculus // Immunol. Today. - 1991. -N. 12. - P. 105-110.
3. Darzynkiewicz Z., Zhao H. Detection of DNA strand breaks in apoptotic cells by flow- and image-cytometry // Methods. Mol. Biol. - 2011. -Vol. 682, N. 1. - P. 91-101.
4. Gameiro C, Romao F. Changes in the immune system during menopause and aging // Front. Biosci. - 2010. - N. 2. - P. 299-303.
5. Howell A., Howell S.J., Clarke R., Anderson E. Where do selective estrogen receptor modulators (SERMs) and aromatase inhibitors (AIs) now fit into breast cancer treatment algorithms? // J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. - 2001. - Vol. 79,N. 1-5.-P. 227-237.
6. Plotz C, Singer J. The Latex - Fixation Test. II. Results in Rheumatoid Arthritis // Am. J. Med. -1956. -- V. 21, N 8. - P. 893-897.
7. Sebastian W., Roy A., Kini U., Mullick S. Correlation of antinuclear antibody immunofluorescence patterns with immune profile using line immunoassay in the Indian scenario // Indian. J. Pathol. Microbiol. - 2010. - Vol. 53,N. 3.- P. 427-432.
8. Seitz M. Which Clinical Symptoms Suggest Distinct Autoantibody Measurements? // Praxis.- 2010 - Vol. 99, N. 23. - P. 1429-1434.
9. Zhang B, Angelidou A, Alysandratos KD, Vasiadi M, Francis K, Asadi S, Theoharides A, Sideri K, Lykouras L, Kalogeromitros D, Theoharides TC. Mitochondrial DNA and anti-mitochondrial antibodies in serum of autistic children // J. Neuroinflammation. - 2010. - Vol. 7, N. 1. - P. 80-84.