



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **15079** (13) **U**
(51) МПК (2006)
G01N 33/48
G01N 33/53

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ІМУНОГЕННОСТІ ЕРИТРОЦИТІВ

1

(21) u200511737

(22) 09.12.2005

(24) 15.06.2006

(46) 15.06.2006, Бюл. № 6, 2006 р.

(72) Гольцев Анатолій Миколайович, Горська Аліна Юріївна, Грищенко Валентин Іванович, Луценко Олена Дмитрівна, Дубрава Тетяна Георгіївна, Останков Максим Вадимович, Гольцев Кирил Анатолійович

2

(73) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(57) Спосіб визначення імуногенності еритроцитів, що включає трансплантацію клітин тваринам з наступним їх аналізом, який **відрізняється** тим, що після трансплантації здійснюють декапітацію тварин, забір крові, виділяють еритроцити і за допомогою прямої реакції Кумбса проводять розрахунок інтегрального показника - потенціалу імуногенності еритроцитів.

Корисна модель належить до експериментальної медицини і може бути використана для вивчення ступеня зміни імуногенності еритроцитів після дії різних фізико-хімічних факторів.

В теперішній час невідомі способи визначення імуногенності еритроцитів.

Найбільш близьким до заявленого є спосіб визначення імуногенності шкіри. Відповідно до способу шматки шкіри знімають зі спини миші-донора і консервують при -196°C з застосуванням кріопротектора ПЕО-400. Деконсервовані та нативні ало-трансплантати пересаджують на спину миші-реципієнта та протягом трьох тижнів спостерігають за їхнім станом, включаючи час виживання. У залежності від терміну життя, а також початку відторгнення трансплантата оцінюють ступінь імуногенності алогенного шматка шкіри [1]. Недоліком цього способу є те, що він суб'єктивний, оскільки в даному випадку проводиться тільки візуальна оцінка стану трансплантата без аналізу специфічних імунологічних показників, що характеризують його імуногенність.

Задачею корисної моделі є створення такого способу, який за рахунок використання інтегрального показника, дозволяв би давати об'єктивну оцінку імуногенності еритроцитів.

Ця задача вирішується тим, що в способі, що включає трансплантацію клітин тваринам з наступним їх аналізом, відповідно до корисної моделі, після трансплантації здійснюють декапітацію тварин, забір крові, виділяють еритроцити і за допо-

могою прямої реакції Кумбса [2] проводять розрахунок інтегрального показника - потенціалу імуногенності еритроцитів (ПІЕ).

Використання ПІЕ дозволяє давати об'єктивну оцінку імуногенності еритроцитів за рахунок того, що він враховує сукупність таких показників, як титр антитіл, інтенсивність реакції (кількість агрегатів у суспензії), кількість еритроцитів в агрегатах, відсоток тварин з тим чи іншим титром антитіл (АТ).

Спосіб здійснюють таким чином.

Тваринам інтраперитонеально вводять еритроцити, на 13 добу здійснюють декапітацію, забір крові. Виділяють еритроцити і ставлять пряму реакцію Кумбса, за допомогою якої визначають титр антиеритроцитарних АТ, інтенсивність реакції, кількість еритроцитів в агрегатах, відсоток тварин з тим чи іншим титром АТ. Після цього з метою об'єктивізації отриманих даних розраховують інтегральний показник ПІЕ. Розрахунок ПІЕ проводять таким чином:

I. Титр антитіл: кожне наступне розведення збільшується на 10 балів, а саме: 1:2 - 10 балів, 1:4 - 20 балів і т.д. 1:256 - 80 балів.

II. Інтенсивність реакції (кількість агрегатів у суспензії):

+ - 10 балів; ++ - 20 балів і т.д.

+(+) - 15 балів; ++(+) - 25 балів і т.д.

III. Кількість еритроцитів в агрегатах:

3 - 10 балів; 4 - 20 балів і т.д. 10 - 80 балів

4 - 5 - 25 балів і т.д.

(13) **U**
(11) **15079**
(19) **UA**

IV. Тварини з тим чи іншим титром АТ (коефіцієнт) 1:2 - 1; 1:4 - 1,2 і т.д. 1:128 - 2,2. (наприклад, 50 тварин з титром 1:4=50·1,2=60 балів)

Приклад. Експерименти виконували на мишах-самках лінії С57BL. Тварини було розділено на 6 груп: 1-й групі вводили нативні сингенні еритроцити, попередньо відмиті 3 рази при 3000 об/хв протягом 5хв за загальноприйнятою методикою [3]; 2-й групі вводили сингенні еритроцити, попередньо прогріті при температурі 49,5°C протягом 30хв [4]; 3-й групі вводили еритроцити, кріоконсервовані під захистом 30%-го ПЕО-1500, без відмивання від кріопротектора після розморожування [5]; 4-й групі вводили еритроцити, кріоконсервовані під захистом 30%-го гліцерину, з трьохкратним відмиванням від кріопротектора після розморожування [3]. Тваринам 5- і 6-ї груп вводили сингенні еритроцити, що не піддавали заморожуванню, але експонували, відповідно, з кріопротектором ПЕО-1500 протягом 40хв при 0°C та гліцериним протягом 20хв при кімнатній температурі (подібно процедури

перед заморожуванням). Ці групи було використано як контроль можливої модифікації імуногенної активності еритроцитів під впливом тільки кріопротекторів.

Еритромасу заморожували в поліетиленових ампулах Corning Incorporated (США) загальним обсягом 1,8 М. Заморожування суспензії клітин здійснювали до температури -196°C шляхом одномоментного швидкого занурення ампул у рідкий азот. Відтавання проводили на водяній бані при температурі 42-44°C з постійним колюванням ампули до зникнення льоду.

Еритроцити вводили однократно внутрішньочеревинно в кількості $3 \cdot 10^9$ /на мишу в об'ємі 0,5 М.

Контроль за утворенням протиеритроцитарних аутоантитіл здійснювали за допомогою прямої реакції Кумбса на 13-у добу після введення еритроцитів. На підставі отриманих результатів розраховували ПІЕ.

Результати виконаних досліджень представлені в таблиці.

Таблиця

Порівняльний аналіз утворення протиеритроцитарних аутоантитіл у реципієнтів після введення сингенних еритроцитів

Групи (введення сингенних еритроцитів)	Підгрупи	Титр антитіл (розведення сироватки)	Вираженість реакції	Кількість еритроцитів в агрегаті	Відсоток тварин	ПІЕ
Нативні	1 n=15	0	-	-	-	-
Прогріті до t=49,5	1 2 3 n=23	1:16 1:32 1:128	++(+) ++ ++	4-5 3-4 6-7	73,9 13,0 13,1	475,2
Кріоконсервовані під захистом ПЕО-1500	1 2 3 n=24	0 1:2 1:8	+ ++	3-4 6-7	50 29,8 20,2	183,3
Кріоконсервовані під захистом гліцерину	1 2 3 n=27	0 1:4 1:8	- ++ +	- 4 7	51,8 23,3 25,9	209,2
Експоновані з ПЕО-1500	1 2 n=13	0 1:2	- +(-)	- 3-4	92,3 7,7	37,7
Експоновані з гліцериним	1 2 n=19	0 1:2	- +(-)	- 3-4	89,5 10,5	50,5

Примітка: n - загальна кількість тварин у групі.

З таблиці видно, що характер прояву імуногенних властивостей еритроцитів істотно залежить від того, яку попередню «передобробку» вони пройшли. Так, максимальний потенціал імуногенності був відзначений у прогрітих еритроцитів (479,2 бали). Приблизно в 2,3 рази цей показник був меншим у еритроцитах, кріоконсервованих під захистом гліцерину (209,2 бали) і трохи нижче у тих, які у минулому були заморожені під захистом ПЕО-1500 (183,3 бали), тобто незважаючи на зна-

чно менший, у порівнянні з групою 2, показник імуногенності, Кріоконсервовані сингенні еритроцити все ж таки мають імуногенну активність. Очевидно, що активність такого роду є наслідком зміни якісних характеристик мембранних структур еритроцитів після різних фізико-хімічних факторів, які можна об'єктивно оцінювати за допомогою запропонованого інтегрального показника ПІЕ.

Джерела інформації:

1. Калмыков К.К., Лобасенко Н.П., Тупчиенко

Г.С. Влияние низкотемпературной консервации на иммуногенные и антигенные свойства аллотрансплантатов кожи // Криобиология и криомедицина. - 1976. - №2. - С. 84-86.

2. Эфуни С.С. Этиология и патогенез аутоиммунных заболеваний // Гематология и трансфузиология. - 1993. - №4. - С.32-37.

3. Аграненко В.А., Федорова Л.И. Замороженная кровь и ее клиническое применение. - М.: Медицина, 1983. - С. 20-25.

4. Труфакин В.А., Лозовой Л.П. Влияние соматотропного гормона на аутоиммунные реакции, индуцированные у мышей разных генотипов сингенными прогретыми эритроцитами // Бюл. эксперим. биологии. - 1977.-№3. - С.305-308.

5. Бабийчук Л.А., Землянских Н.Г. Оптимизация и преимущества безотмывочного метода криоконсервирования эритроцитов с ПЭО-1500 // Пробл. криобиологии. - 2001. - №1. - С. 35-37