



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **21789** (13) **U**  
(51) МПК (2006)  
**G01N 33/15**  
**G01N 33/04** (2007.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

### (54) СПОСІБ ВИДІЛЕННЯ ІМУНОКОМПЕТЕНТНИХ КЛІТИН МОЛОЗИВА

1

2

(21) u200601896

(22) 22.02.2006

(24) 10.04.2007

(46) 10.04.2007, Бюл. № 4, 2007 р.

(72) Квачов Володимир Григорович, Коваленко В'ячеслав Леонідович, Бочаров Олександр Анатолієвич

(73) ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ  
УКРАЇНСЬКОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК

(57) Спосіб виділення імунокомпетентних клітин  
молозива, що включає видалення жиру, розділен-

ня клітин на градієнти щільності і отримання суспензії імунокомпетентних клітин, який **відрізняється** тим, що одразу після отримання молозиво розводять 0,1 М фосфатним буфером рН 7,4 у співвідношенні 1:3 з додаванням інгібітору контрикалу в дозі 50 одиниць на кожні 10 мл молозива, а після розділення клітин осмотичний та онкотичний баланс нормалізують розведенням суспензії клітин в сироватці великої рогатої худоби.

Галузь техніки до якої відноситься винахід:  
медична, ветеринарна імунологія.

Спосіб включає проведення наступних операцій:

- розведення, нейтралізація колостральних протеаз та стабілізація проб молозива;
- знежирення та отримання суспензії клітинних елементів молозива;
- виділення імунокомпетентних клітин на градієнті щільності фіколу та верографіну при питомій щільності 1,077;
- отримання суспензії імунокомпетентних клітин.

Відомо технічне рішення [1] спосіб виділення та отримання соматичних, в тому числі імунокомпетентних клітин молозива і молока, який базується на знежиренні і наступному центрифугуванні досліджуваного матеріалу. Але це рішення не забезпечує достатньої життєздатності клітин молозива і молока в суспензії в зв'язку з агресивним впливом ензимів молозива і дисбалансом осмотичного тиску.

Прототипом технічного рішення є спосіб виділення імунокомпетентних клітин молозива і молока тварин, який включає знежирення, центрифугування, розділення та очистку суспензій клітин для цитологічного аналізу [2]. Але спосіб-прототип не зменшує агресивного впливу ферментів молозива на функцію і структуру імунокомпетентних клітин, не відновлює осмо-онкотичну рівновагу в суспензії перед отриманням цитологічних препаратів. Пе-

релічені недоліки значно знижують точність і повноту виділення імунокомпетентних клітин молозива.

Технічною задачею корисної моделі є створення ефективного способу виділення імунокомпетентних клітин молозива, який дозволяє забезпечити високу життєздатність клітин, що виділяються з молозива, підвищити на цій базі точність оцінки клітин, зменшити технічні помилки при їх підрахунку та ідентифікації, забезпечити отримання високоякісних суспензій імунокомпетентних клітин для подальших імунологічних досліджень.

Вирішення поставленої задачі шляхом запропонованого „Способу...” дозволяє на новому більш досконалому технологічному (методологічному) рівні вирішити економічно та соціально важливе завдання - отримання імунокомпетентних клітин молозива для розробки ефективних методів захисту новонародженого молодняка.

При здійсненні запропонованої корисної моделі („Способу...”) завдяки його суттєвим ознакам вперше можна досягти якісно нового технічного результату, з такими новими властивостями:

- Розведення молозива одразу після отримання 0,1М фосфатним буфером у співвідношенні 1:3 зменшує ензиматичну напругу (концентрацію ферментів) в молозиві і, таким чином, покращує збереження життєздатних клітин, які не ушкоджуються цими ензимами.

- Розведення молозива одразу після отриман-

(19) **UA** (11) **21789** (13) **U**

ня 0,1М фосфатним буфером при pH7,4 забезпечує фізіологічний характер середовища щодо кислотно-лужного балансу, що складає фізіологічний оптимум для імунокомпетентних клітин і сприяє їх високій життєздатності.

- Додавання інгібітора ензимів контрикала в дозі 50 од. на кожні 10см<sup>3</sup> молозива ефективно зменшує ензиматичну активність гідролітичних ферментів молозива, що сприяє зменшенню пошкоджуючого впливу ферментів на імунокомпетентні клітини і підвищенню їх життєздатності.

- Розведення після розділення клітин виділеної суспензії сироваткою великої рогатої худоби нормалізує осмотичний та онкотичний баланс в суспензії і забезпечує підвищення життєздатності клітин.

Загалом наведені суттєві ознаки корисної моделі забезпечують досягнення її мети: отримання суспензій імунокомпетентних клітин молозива з більш високою життєздатністю клітин, покращеними можливостями ідентифікації клітин на основі збереження їх структури та функцій.

Спосіб виділення імунокомпетентних клітин молозива включає проведення наступних операцій: розведення, нейтралізація колостральних протеаз та стабілізація проб молозива; знежирення та отримання суспензії клітинних елементів молозива; виділення імунокомпетентних клітин на градієнті щільності фіколу та верографіну при питомій щільності 1, 077; отримання суспензії імунокомпетентних клітин.

Від лактуючих корів в перші 72 години після отелення відбирають зразки молозива об'ємом по 50-100мл і розводять холодним поживним середовищем RPMI 1640, Ігла, середовищем 199 або 0,15М фосфатним буфером pH7,4 з додаванням інгібіторів протеаз (наприклад, 50од. контрикалу на кожні 10мл молозива). Отриманий матеріал доставляють в лабораторію при температурі +4°C на протязі до 2 годин. Зразки знежирюють триразовим послідовним центрифугуванням при 400g і переносять в інші флакони, які повторно центрифугують, а з осаду готують суспензії клітин молозива для подальших досліджень. Для збереженості функціональних та структурних характеристик контролюють температуру (близько +4°C), фізіологічну осмотичність суспензії, точне втримування відповідного показника pH 7,35 та онкотичну рівновагу. Відмиті шляхом подвійного центрифугування клітини нашаровують на градієнт фіколу з верографіном і після центрифугування відбирають лейкоцитарний шар. Відібрані клітини вносять в 1мл сироватки ВРХ, ретельно ресуспендують та готують мазки на предметних скельцях подібно до мазків крові.

Проведення досліджень за запропонованим методом дозволяє максимально точно ідентифікувати та визначати кількісний склад імунокомпетентних клітин в молозиві. Існуючі в результатах досліджень різних авторів певні невідповідності в типізації лімфоїдних клітин та мононуклеарних фагоцитів молозива в значній мірі пов'язані з пе-

ретримкою цих клітин в ферментативно агресивному середовищі, що закономірно приводить до змін в найбільш вразливому мембранорецепторному апараті імунокомпетентних клітин та впливає на їх структурний малюнок. Значно змінює морфологію і утруднює ідентифікацію клітин незбалансованість середовища за осмотичністю та онкотичним тиском. Наявність в таких некоректно підготовлених пробах «перетравлених і мовчазних» мононуклеарних фагоцитів та лімфоцитів призвела до поширення помилкового погляду на такі клітини як на колостральних «пасажирів».

Використання запропонованого методу дозволяє уникнути зазначених недоліків, забезпечує високу життєздатність імунокомпетентних клітин в суспензіях (до 85-88%) із збереженням повноцінного морфологічного малюнку в мазках. Все це забезпечує впевнену цитологічну ідентифікацію і точність отриманих результатів.

Особливостями запропонованого способу є:

- Оптимізація параметрів виділення та розведення імунокомпетентних клітин молозива;
- врахування значення ензиматичного аутолізу та включення операції
- зменшення ферментативного тиску на імунокомпетентні клітини у зразках молозива;
- визначення та застосування оптимальних онкотичних та осмотичних умов при виділенні клітин молозива та приготуванні суспензії імунокомпетентних клітин.

#### Література

1. Карташова В.М., Касянчук В.В. Уровень соматических клеток в молоке коров, больных лейкозом // Ветеринария. - 1991. - №11. - С.43-44.
2. Lee C.S., McCauley I., Hartmann P.E. Light and electron microscopy of cells in pig colostrums, milk and involution secretion // Acta Anatomica (Basel). - 1983. - 116(2). - P.126-135.
3. Jensen D.L., Eberhart R.J., Macrophages in Bovine Milk // American Journal of Veterinary Research. 1985. - v.36. - N 5. - P.619-624.
4. Tuboly S., Berhath S., Glavits R. Intestinal Absorption of Colostrum Lymphoid Cells in Newborn Pigs // Veterinary Immunology and Immunopathology. 1988. - v.20. - P.75-85.
5. Salmon H. The mammary gland and neonate mucosal immunity // Vet.Immunol. Immunopathol. - 1999. - Dec 15. - 72. - (1-2). - P.143-155.
6. Salmon H. Mammary gland immunology and neonate protection in pigs. Homing of lymphocytes into the MG // Adv.Exp.Med.Biol. - 2000. - 480. - P.279-286.
7. Вирусологическая. Ред. Б.Филдс и Д.Найл. М., «Мир». - 1989. - т.2. - С.30-31.
8. Ульянов А.Г., Карпуть И.М. Цитологический состав молозива коров и его влияние на лейкопоз у новорожденных телят // В сб.: «Ветеринарная наука - производству». Межведомств. темат. сборник. 1983. Минск., вып. 21. - С.69-71.
9. Кононский А.И. Гистохимия. К., «Вища школа». - 1976. - С.261-263.

