



УКРАЇНА

(19) UA (11) 42404 (13) U  
(51) МПК (2009)  
A61B 5/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЕПІДЕРМАЛЬНИХ АНТИГЕНІВ

1

2

(21) u200811874

(22) 06.10.2008

(24) 10.07.2009

(46) 10.07.2009, Бюл.№ 13, 2009 р.

(72) СИНИЦІН БОРИС ФЕДОРОВИЧ, НЕМТИНОВА ЄЛЛІАНА БОРИСІВНА

(73) СИНИЦІН БОРИС ФЕДОРОВИЧ, НЕМТИНОВА ЄЛЛІАНА БОРИСІВНА

(57) Спосіб визначення епідермальних антигенів, який включає одержання антитіл шляхом імунізації

тварин субстратами, який **відрізняється** тим, що використовують як субстрат псоріатичні лусочки, які гомогенізують шляхом розтирання, потім відмивають нерозчинні фракції від розчинних, далі відокремлюють антитіла та молекулярні структури за допомогою детергента, потім відмивають нерозчинну частину гомогенату і впливають пепсином з наступним додаванням панкреатину, використовують отриману надосадову рідину для дослідження.

Корисна модель відноситься до медицини, а точніше до імунології і може бути використаний для визначення епідермальних антигенів при псоріазі, сонячному дерматиті або при інших видах шкірної патології.

За прототип обраний спосіб визначення епідермальних антигенів [Juhin L., Juhin L., Scheynius A., Klaresog L. Immunohistochemical reactivity of monoclonal antibodies generated after immunization of mice with cells from a psoriatic lesion. // Acta dermatovenerol.- 1989.- Vol. 69, N2.- P.93-100.], який полягає в імунізації мишей епідермальними клітинами, взятими з вогнища псоріатичного запалення, одержання зростаючих клонів гібридом - продуцентів моноклональних антитіл, які мітяться барвником, а потім ними роблять специфічне фарбування гістологічних зрізів і за фарбуванням визначають тканинні специфічні антигени при порівнянні з пофарбованими зрізами здорової шкіри та шкіри, взятої з вогнищ запалення при інших видах шкірних захворювань.

Ознаками, які збігаються з вихідними ознаками запропонованого способу, є: одержання антитіл шляхом імунізації тварин субстратами.

Технічним результатом корисної моделі є підвищення точності визначення епідермальних антигенів.

Причинами, які не дозволяють досягти очікуваний технічний результат, є неможливість визначення епідермальних псоріатичних антигенів цитоскелету, які приховані антитілами та іншими міжмолекулярними взаємодіями в тканинах, а використання як об'єкт дослідження епідермісу до

його відторгнення не дозволяє визначити асоційовані із псоріазом та іншими видами патології епідермальні антигени.

В основу корисної моделі поставлена задача вдосконалення способу визначення епідермальних антигенів шляхом використання як об'єкт дослідження псоріатичних лусочок, які механічно гомогенізують з наступним відділенням розчинних антигенів і відкриттям антигенних детермінант, що дозволяє визначити приховані антигени.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі визначення епідермальних антигенів, який включає одержання антитіл шляхом імунізації тварин субстратами, відповідно до корисної моделі, використовують в якості субстрату псоріатичні лусочки, які гомогенізують шляхом розтирання, потім відмивають нерозчинні фракції від розчинних, далі відокремлюють антитіла та молекулярні структури за допомогою детергенту, потім відмивають нерозчинну частину гомогенату і впливають пепсином з наступним додаванням панкреатину, використовують отриману надосадову рідину для дослідження.

Між сукупністю істотних ознак запропонованого способу та очікуваним технічним результатом, що може бути досягнутий, виявляється наступний причинно-наслідковий зв'язок: використання для імунізації тварин нерозчинної частини гомогенатів псоріатичних лусочок дозволяє одержати антиепідермальні антитіла, гомогенізація і відмивання від розчинних білків нерозчинних фракцій псоріатичних лусочок ізотонічним розчином NaCl дозволяє відокремити баластові антигени, які потрапляють у

(13) U  
42404  
(11)  
UA (19)

вогнище запалення з ексудатом із крові, солюбілізація детергентом імуноглобулінів з наступним їхнім відділенням від нерозчинних фракцій псоріатичних лусочок дозволяє відкрити приховані антигенами антигени, а наступне переварювання пепсином і ферментами панкреатину веде до розкриття антигенних детермінант, прихованих молекулярними структурами і переводу епідермальних антигенів у розчинний стан, що дозволяє преципітувати їхніми антитілами, а за преципітатом визначати тканинні антигени, що дозволяє досягти очікуваний технічний результат; без використання перерахованих вище ознак технічний результат недосяжний.

Спосіб полягає в наступному.

Сумішшю нерозчинної частини гомогенатів псоріатичних лусочок і повного ад'юванта Фрейнда імунізують кролів до появи антитіл, преципітуючих антигени псоріатичних лусочок. 500мг псоріатичних лусочок змішують із 5 мол ізотонічного розчину натрію хлориду, гомогенізують розтиранням, центрифугують при 3000о/хв 20хв, осад відмивають шляхом ресуспендування і центрифугування, до осаду доливають до 5 мол 1%-й детергент, інкубують дві доби, знову центрифугують, осад відмивають шляхом ресуспендування і центрифугування ізотонічним розчином натрію хлориду, до осаду доливають 5 мол ізотонічний розчин натрію хлориду та розчиняють у цій суміші одну таблетку ацидин-пепсину, суміш інкубують добу при 37°С, інактивують кислотою порошком гідрокарбонату натрію, у суміші розчиняють одну таблетку панкреатину та інкубують протягом 7 діб при щодобовому заморожуванні і відтаюванні, після чого в ній визначають епідермальні антигени в реакції імунопреципітації за Оухтерлоні за допомогою кролячих антипсоріатичних сироваток.

Запропонований спосіб ілюструється наступним прикладом його використання.

Приклад використання способу ілюстрований наступним графічним матеріалом.

На Фіг.1 показана преципітація епідермальних антигенів антипсоріатичною сироваткою в розчинній частині гомогенатів епідермісу, що відривається у вогнищі псоріатичного запалення і рогового шару епідермісу, що відривається з здорових людей, у частині, що витягається з нерозчинної фракції гомогенатів детергентом, і в частині витягається після детергенту ацидин-пепсином і панкреатином.

На Фіг.2 показана преципітація епідермальних антигенів антипсоріатичною сироваткою в розчинній частині гомогенатів епідермісу, що відривається в області сонячного опіку та рогового шару епідермісу, що відривається з здорових людей, у частині, що витягається з нерозчинної фракції гомогенатів детергентом, і в частині витягається після детергенту ацидин-пепсином і панкреатином.

На Фіг.1 позначено наступне: А - лунка з антипсоріатичною сироваткою; 1 - лунка з розчинною частиною гомогенату рогового шару нормального епідермісу, 2 - лунка з антигенами витягаються детергентом з нерозчинної частини рогового шару нормального епідермісу, 3 - лунка з антигенами, що витягаються після детергенту ацидин-

пепсином і панкреатином з нерозчинної частини рогового шару нормального епідермісу; 4 - лунка з розчинною частиною гомогенату рогового шару нормального епідермісу, 5 - лунка з антигенами, що витягаються детергентом з нерозчинної частини гомогенатів псоріатичних лусочок, 6 - лунка з антигенами, що витягаються після детергенту ацидин-пепсином і панкреатином з нерозчинної частини гомогенатів псоріатичних лусочок.

На Фіг.2 позначено наступне: А - лунка з антипсоріатичною сироваткою; 1 - лунка з розчинною частиною гомогенату рогового шару нормального епідермісу; 2 - лунка з антигенами витягаються детергентом з нерозчинної частини рогового шару нормального епідермісу; 3 - лунка з антигенами, що витягаються після детергенту ацидин-пепсином і панкреатином з нерозчинної частини рогового шару нормального епідермісу; 4 - лунка з розчинною частиною гомогенату рогового шару нормального епідермісу; 5 - лунка з антигенами, що витягаються детергентом з нерозчинної частини гомогенатів лусочок з області сонячного опіку; 6 - лунка з антигенами, що витягаються після детергенту ацидин-пепсином і панкреатином з нерозчинної частини лусочок з області сонячного опіку.

Були проведені дослідження сквамозних елементів, що відриваються в області псоріатичного запалення у 5 хворих на псоріаз.

Об'єкт порівняння - роговий шар епідермісу, що знімається з п'яток 5-ти здорових людей.

Інший об'єкт порівняння - сквамозні елементи з області сонячного опіку у 5 здорових людей.

Результати досліджень, представлені на Фіг.1. У розчинних фракціях рогового шару нормального епідермісу антигени преципітуються з утворенням однієї лінії преципітації між лунками А і 1, А і 4. У фракціях, що витягаються детергентом, лінії преципітації не утворюються між лунками А і 2. У фракціях з антигенами, що витягаються після детергенту ацидин-пепсином і панкреатином з нерозчинної частини рогового шару нормального епідермісу, лінії преципітації не утворюються між лунками А і 3. У фракції, що витягається з нерозчинної частини гомогенатів псоріатичних лусочок детергентом, утворюються 2-3 лінії преципітації між лунками А і 5. Одна з них зливається з лінією преципітації антигенів, утвореною в зоні преципітації розчинних антигенів рогового шару нормального епідермісу між лунками А і 4, ця ж лінія зливається з лінією преципітації, утвореної в зоні преципітації антигенів, що витягаються після детергенту ацидин-пепсином і панкреатином з нерозчинної частини гомогенатів псоріатичних лусочок між лунками А і 5. Отже, показано, що умовою для формування імунного нагляду при псоріазі є поява в цитоскелеті псоріатичного епідермісу антигенів розчинної частини рогового шару нормального епідермісу, що володіють природної аутоантигенністю.

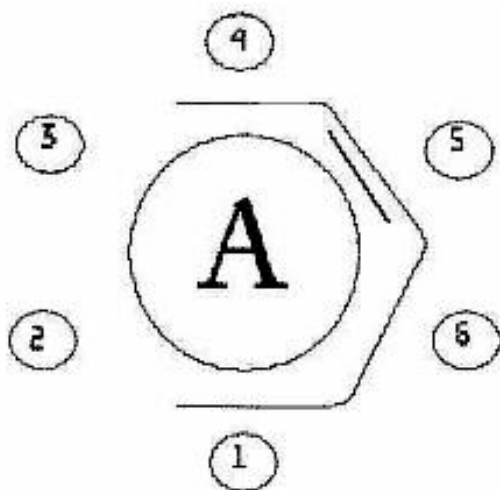
Результати досліджень, представлені на Фіг.2.

У розчинних фракціях рогового шару нормального епідермісу антигени преципітуються з утворенням однієї лінії преципітації між лунками А і 1, А і 4. У фракціях, що витягаються детергентом, лінії преципітації не утворюються між лунками А і 2. У фракціях з антигенами, що витягаються після

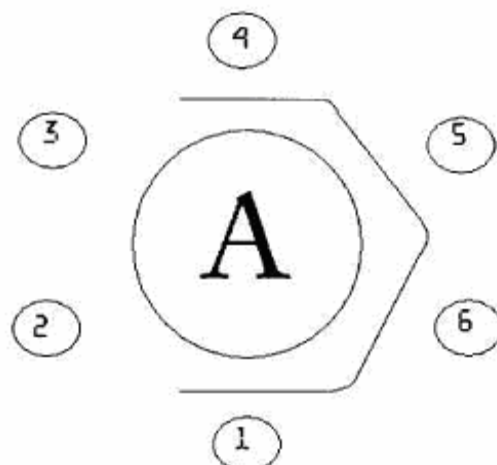
детергенту ацидин-пепсином і панкреатином з нерозчинної частини рогового шару нормального епідермісу, лінії преципітації не утворюються між лунками А і 3. У фракції, що витягається з нерозчинної частини гомогенатів лусочок області сонячного опіку детергентом, утворюється 1 лінія преципітації між лунками А і 5. Вона зливається з лінією преципітації антигенів, утвореної в зоні преципітації розчинних антигенів рогового шару нормального епідермісу між лунками А і 4, ця ж лінія зливається з лінією преципітації, утвореної в зоні преципітації антигенів, що витягаються після детергенту ацидин-пепсином і панкреатином з нероз-

чинної частини гомогенатів лусочок області сонячного опіку між лунками А і 6. Отже, в області сонячного опіку умови для формування ефективного імунного нагляду аналогічні таким при псоріазі.

За допомогою запропонованого способу в цитоскелеті епідермісу відривається при псоріазі і сонячному опіку, визначаються антигени, невизначувані в цитоскелеті епідермісу здорових людей. Обумовлені антигени можуть бути критерієм при оцінці формування умов для ефективного функціонування імунного нагляду при псоріазі та при інших патологічних станах.



Фіг. 1



Фіг. 2