



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **45028** (13) **U**  
(51) МПК (2009)  
**A61B 5/04**  
**G01N 33/483**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) СПОСІБ ІДЕНТИФІКАЦІЇ КЛІТИН КУПФЕРА ЛЮМІНЕСЦЕНТНИМ МЕТОДОМ ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ НАНОЧАСТИНОК НАПІВМАГНІТНОГО НАПІВПРОВІДНИКА**

1

2

(21) u200904530

(22) 07.05.2009

(24) 26.10.2009

(46) 26.10.2009, Бюл. № 20, 2009 р.

(72) САВЧУК АНДРІЙ ЙОСИПОВИЧ, ФЕДІВ ВОЛОДИМИР ІВАНОВИЧ, ДАВИДЕНКО ІГОР СВЯТОСЛАВОВИЧ, САВЧУК ТЕТЯНА АНДРІЇВНА

(73) БУКОВИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ МОЗ УКРАЇНИ

(57) Спосіб ідентифікації клітин Купфера люмінесцентним методом шляхом реєстрації люмінесцен-

тного сигналу біосенсорів у тканині, який **відрізняється** тим, що як біосенсор використовують синтезовані біосенсорні системи - наночастинка напівмагнітного напівпровідника  $Cd_{1-x}Mn_xS$  - цетилтриметиламоній бромід, які наносять на досліджувані зрізи тканини, після чого реєструють люмінесцентний сигнал адсорбованого біосенсора при опроміненні в діапазоні 400-440 нм із селективним виявленням клітин Купфера.

Корисна модель відноситься до галузі фізики напівпровідників і наноструктур та медицини, а саме до фізики напівпровідників і наноструктур, гістології, цитології, ембріології, патологічної анатомії, судової медицини та може бути використана для морфологічної оцінки функціонального стану печінки на основі об'єктивної оцінки люмінесцентної візуалізації клітин Купфера як в нормі, так і при патології.

Аналогом корисної моделі є імуногістохімічний метод виявлення клітин Купфера в печінці з використанням Макрофагального маркера (Novocastra 2005 Product Range, P.93-94). Опис методики. На парафіновому зрізі біологічної тканини ставлять імуногістохімічну реакцію з моноклональними антитілами клону LN-5 (макрофагальний маркер), до яких приєднують вторинні антитіла, які мають ферментну або біотинову мітку (на вибір дослідника), що дозволяє специфічно забарвленням (залежно від мітки) візуалізувати цитоплазму макрофагів та гістіоцитів, зокрема, клітин Купфера.

Недоліком аналога є багатоетапність виконання та висока вартість.

Прототипом корисної моделі є імуногістохімічний метод виявлення клітин Купфера в печінці з використанням маркера CD68 з люмінесцентними мітками (2005/2006 Catalog Dako Cytomation P/210). Як мітки використовують органічні фотолюмінесцентні барвники.

Недоліками прототипу є:

- високовартісна методика досліджень з використанням двох типів антитіл та органічного фотолюмінесцентного барвника;

- багатоступеневість обробки зрізів;

- незначна фотостабільність;

- вузький спектр збудження;

- відсутність можливості регулювати спектр випромінювання;

- зміна фотолюмінесцентних властивостей барвника внаслідок близькості розташування молекул барвника між собою, що може призводити до зменшення люмінесцентного сигналу.

Нами пропонується рішення, що усуває зазначені недоліки.

В основу корисної моделі поставлене завдання удосконалити спосіб ідентифікації клітин Купфера люмінесцентним методом із допомогою селективного адсорбування наносенсорної системи на базі напівпровідникової наночастинки до адсорбуючих молекул досліджуваних структур, що забезпечує підвищення фотостабільності, спрощення в роботі та зменшення фінансових затрат.

Поставлене завдання вирішується тим, що в спосіб візуалізації клітин печінки люмінесцентним методом шляхом реєстрації люмінесцентного сигналу від наносенсорів у тканині, згідно з корисною моделлю як наносенсор використовують синтезовані біосенсорні системи - наночастинка напівмагнітного напівпровідника  $Cd_{1-x}Mn_xS$  - цетилтриметиламоній бромід, - які наносять на досліджувані

(13) **U**

(11) **45028**

(19) **UA**

зрізи тканини, після чого реєструють люмінесцентний сигнал адсорбованого біосенсора при опроміненні в діапазоні 400-440 нм із селективним виявленням клітин Купфера.

Спільними ознаками прототипу та способу, що заявляється, є візуалізація досліджуваних структур люмінесцентним методом. Корисна модель відрізняється від прототипу тим, що джерелом

люмінесцентного сигналу є на-ночастинки напівмагнітного напівпровідника  $Cd_{1-x}Mn_xS$ , які наділені функціональними перевагами, спрощується методика обробки зрізів, зменшуються фінансові затрати.

Порівняння способу, що заявляється, та способу-прототипу, подано у таблиці.

Таблиця

Ознака	Спосіб ідентифікації клітин Купфера (прототип)	Спосіб ідентифікації клітин Купфера (спосіб, що заявляється)
Сенсорний матеріал	Два типи антитіл та люмінесцентна мітка	Один тип наносенсора
Нанесення сенсорного матеріала	багатоступеневе	одноступеневе
Тип джерела люмінесцентного сигналу	Органічна молекула	Трьохкомпонентна напівпровідникова наночастинка
Характеристики люмінесцентного сигналу		
а) спектр збудження	вузький	широкий
б) фотостабільність	слабка	значна
в) можливість регулювати емісійним спектром	відсутня	складом, розмірами наночастинок

Теоретичне підґрунтя для використання способу.

Неорганічні наночастинки є важливими складовими для утворення різноманітних функціональних надструктур. Розміри їх можуть складати від одиниць до сотень нанометрів. Вони наділені багатьма специфічними оптичними й електронними властивостями, які залежать від їх розмірів, форми, складу та мають передбачуваний характер [В.А.Олейников, А.В.Суханова, И.Р.Набиев Флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы в биологии и медицине / ж. Российские нанотехнологии.- Т. 2, №1-2.- 2007.- С.160-173; Aihua Fu, Weiwei Gu, Carolyn Larabell and A Paul Alivisatos Semiconductor nanocrystals for biological imaging / Current Opinion in Neurobiology. - 2005. -V.15.- p.568-575].

Розміри субклітинних структур співрозмірні з розмірами наночастинок, що спонукає до використання їх як нанозондів, які дозволяють проводити дослідження на клітинному рівні.

Одним із чутливих методів дослідження біологічних об'єктів є флуоресцентний аналіз. [Alexander P. Demchenko Introduction to Fluorescence Sensing / Springer. 2009.-586p.]. Дослідження показали, що напівпровідникові квантові точки мають значні переваги над стандартними фарбуючими речовинами: збуджуються широким спектром довжин хвиль, що дозволяє при одному джерелі збудження отримувати різні спектри випромінювання; наділені значною фотостабільністю; їх спектри випромінювання, які регулюються розміром і складом наночастинок, є вузькими та симетричними; мають мінімальну інтерференцію від натуральних автофлуоресцентних частинок [Robert E.Bailey, Andrew M.Smith, Shuming Nie Quantum dots in biology and medicine / Physica E.- 2004. - V.25.- p.1-12; Alivisatos P. The use of

nanocrystals in biological detection / Nature Biotechnology .-2004.-V.22.-p.47-52].

Використання напівпровідникових наночастинок у візуалізації біологічних об'єктів має обмеження, що пов'язано з отриманням біосумісних нанокристалів. Зокрема, різка зміна умов часто призводить до деградації та дезактивації чутливих біологічних компонентів, і обмінні реакції на поверхні наночастинок часто утруднюють формування стабільних біокон'югатів, змінюють хімічний та фізичний стан поверхневих атомів наночастинок, що в багатьох випадках зменшує квантовий вихід люмінесценції наночастинок, а також призводить до перетворень, які сприяють їх агрегації та осадженню [Eugenii Katz and Itamar Willner Integrated Nanoparticle-Biomolecule Hybrid Systems: Synthesis, Properties, and Applications Angew. Chem. Int. Ed. 2004, 43, 6042-6108; Christof M. Niemeyer Nanoparticles, Proteins, and Nucleic Acids: Biotechnology Meets Materials Science / Angew. Chem. Int. Ed. 2001, 40, 4128 - 4158].

Спосіб, що заявляється, здійснюється наступним чином.

Метод обробки тканин перед нанесенням біосенсорів полягає у наступному. Застосований спосіб обробки тканини, який мінімально змінює її хімічні та структурні властивості, зокрема, дозволяє зберегти придатними для виявлення більшість антигенів [Эллиниди В.Н., Анисеева Н.В., Максимова Н.А. Практическая иммуногистоцитохимия (методические рекомендации). -СПб. - 2002. - 38с] і сульфгідрильних груп білкових молекул з можливістю їх тривалої консервації у парафінових блоках. Основні принципи зазначеного способу обробки тканини полягають у:

1) фіксації тканини у забуференому (pH=7,0) фосфатним буфером за Ліллі 10%-му розчині формаліну впродовж 22 годин (триваліший час обро-

бки у формаліні призводить до артефактів структури більшості антигенів),

2) прискороному зневодненні у висхідній батареї спиртів,

3) просочуванні у парафіні при температурі 58°C (вищі значення температури можуть викликати небажані зміни структури антигенів). Гістологічні зрізи 5мм завтовшки отримували за допомогою санного мікротому MC-2.

Нанесення біосенсорів на гістологічний зріз проводять наступним чином. Гістологічний зріз повністю покривають колоїдом із наночастинок. Тривалість експозиції в межах 5-10хв. Після експозиції гістологічний зріз промивають дистильованою водою, просушують.

Фотолюмінесцентні дослідження оброблених гістологічних зрізів виконують з використанням мікроскопа ЛЮМАМ-Р-8, цифрової фотокамери Olympus C740UZ, люмінесцентного об'єктиву Л40<sup>x</sup>.

Приклад практичного використання способу.

З використанням способу, який заявляється як корисна модель, було проведено дослідження гістологічних препаратів печінки померлих плодів та померлих новонароджених. Зелене світіння повністю відповідало локалізації та формі клітинам

печінки, які за морфологічними ознаками ідентифіковані як гепатоцити і еритроцити. Спектральний діапазон зображення знаходився в області зеленого кольору (біля 500нм).

Спостерігалось також яскраве червоне світіння об'єктів. З урахуванням їх локалізації (стінка синусоїдів), розмірів, кількості у одиниці площі зрізу, поліморфізму контурів дані об'єкти відповідають клітинам Купфера (зірчастим ретикулоендотеліоцитам) та їх відросткам.

Для усунення суб'єктивності в оцінці кольору забарвлення здійснено спектральний комп'ютерний аналіз ділянок зображення у системи RGB.

Ідентифікацію клітин Купфера здійснювали з урахуванням сучасних уявлень про будову печінки [Серов В.В., Лапиш К. Морфологическая диагностика заболеваний печени / АМН СССР.- М. Медицина, 1989, 336с]. Для порівняння використовували гістологічні зрізи печінки досліджені методами вибраними в якості аналога і прототипу.

Технічний результат: використання способу, що заявляється, дозволяє здійснити морфологічну оцінку стану печінки по кількості та розташуванні клітин Купфера.