



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 55845

(13) A

(51) 7 A61B10/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ПАТОІМУННОГО КОМПОНЕНТУ ДЕГЕНЕРАТИВНОГО ПРОЦЕСУ В СИСТЕМІ СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ

1

2

(21) 2002075571

(22) 08 07 2002

(24) 15 04 2003

(46) 15 04 2003, Бюл. № 4, 2003 р.

(72) Процайло Михайло Дмитрович, Дем'яненко Василь Васильович

(73) ТЕРНОПІЛЬСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

(57) Спосіб визначення патоімунного компонента дегенеративного процесу в системі сполучної тканини, шляхом виявлення сироваткових протисполучнотканинних аутоантител у параспецифічних

імунодіагностичних реакціях *in vitro* з ксеногенним біоорганічним субстратом, який відрізняється тим, що сироваткові аутоантитела визначають за рівнем цитотоксичної дії на клітини імункомпетентної системи в реакції лейкоцитолізу, яку ініціюють інкубацією ізольованих лейкоцитів в присутності біогенного препарату алфлутопу і досліджують у полі зору люмінесцентного мікроскопа, а результат оцінюють на основі порівняння реакцій у контрольному і дослідному препаратах

Винахід стосується медицини, зокрема клінічної імунології і біофізики, і може бути використаний для лабораторної імунодіагностики патологічних процесів в організмі на рівні клітинно-гуморальних реакцій імункомпетентної системи для уточнення діагнозу, оцінки ефективності лікування і профілактики захворювань з патогенетично вагомих імунопатологічних компонентом.

Відомий спосіб визначення патоімунного компонента дегенеративного процесу в системі сполучної тканини шляхом виявлення сироваткових протисполучнотканинних аутоантител у параспецифічних імунодіагностичних реакціях *in vitro* з ксеногенним біоорганічним субстратом [1]. За відомим способом визначають сироваткові антитела до біогенного стандартизованого препарату, наприклад, румалому, шляхом осадження комплексу антиген-антитіло в присутності солей кадмію з наступною кількісною оцінкою утвореного преципиту турбідиметричним методом, а за показником вмісту сироваткових протирумалонових антител роблять висновок про інтенсивність імунопатологічного - аутоімунного деструктивного процесу в системі сполучної тканини.

Недоліком відомого способу є недостатній рівень методичного забезпечення, який полягає у необхідності виконання складної методики отримання, суспензії лімфоцитів шляхом центрифугування венозної крові в градієнті густини фіколівографіні 1,077 г/см³, наступним одномоментним відмиванням і ресуспендуванням у ізотонічному розчині натрію хлориду для проведення подаль-

ших етапів діагностичного дослідження. До недоліків відомого способу слід віднести також недостатній рівень клініко-лабораторної інформативності, оскільки відомості про рівень оптичної густини, а отже концентрацію антител до елементів сполучної тканини у параспецифічній тестовій пробі є недостатньо інформативними.

При розгляді технічного завдання була взята до уваги здатність лейкоцитів як клітин імункомпетентної системи, що несуть генетичну інформацію про антигенну структуру тканин власного організму, відповідним чином реагувати як на змінену патологічним процесом власну сполучну тканину, так і на молекулярні компоненти гетерогенної тканини, зокрема, у вигляді біоорганічного субстрату біогенного препарату, наприклад, алфлутопу [2]. Попередніми дослідженнями було встановлено, що в присутності сироваткових протисполучнотканинних аутоантител алфлутоп індукуює *in vitro* цитодеструкцію лейкоцитів у вигляді реакції лейкоцитолізу, яку з високою інформативністю дораджують методом люмінесцентної мікроскопії.

В основу винаходу поставлене завдання вдосконалити відомий спосіб, в якому шляхом введення в діагностичну імунну реакцію більш чутливого й організованого в структурно-біологічному аспекті імунологічного тест-об'єкту досягають підвищення технологічності та клініко-лабораторної інформативності діагностичного дослідження.

Поставлене завдання вирішують тим, що у відомому способі визначення патоімунного компонента дегенеративного процесу в системі сполуч-

(13) A

(11) 55845

(19) UA

ної тканини шляхом виявлення сироваткових протисполучнотканинних аутоантитіл у параспецифічних імунодіагностичних реакціях *in vitro* з ксеногенним біоорганічним субстратом відповідно до винаходу сироваткові аутоантитіла визначають за рівнем цитотоксичної дії на клітини імунокомпетентної системи в реакції лейкоцитолізу, яку ініціюють інкубацією ізольованих лейкоцитів в присутності біогенного препарату алфлутопу і досліджують у полі зору люмінесцентного мікроскопу, а результат оцінюють на основі порівняння реакцій у контрольному і дослідному препаратах

Спосіб здійснюють таким чином

У стерильну мікропробірку набирають 0,2-0,4мл крові, стабілізованої 2% розчином натрію цитрату у співвідношенні 4:1. Після 45 хвилинної спонтанної седиментації лейкоцитів мірною піпеткою набирають завис лейкоцитів в аутологічній плазмі крові в об'ємі 20-40мкл, наносять по одній пробі на два краї предметного скла (контроль і дослід) і до однієї з них - дослідної - вносять рівний об'єм препарату алфлутопа і інкубують впродовж 45-60хв при 37°C в умовах вологості камери, наприклад, у чашці Петрі, після чого в обидва мікропрепарати - контрольний і дослідний - вносять по 20мкл розчину флюорохрому АО в розведенні 1:10000 (рН 6,5), накривають скельцями, ще витримують впродовж 30хв при 37°C, після чого досліджують у полі зору люмінесцентного мікроскопу, реєструють яскравість люмінесценції, визначають характер цитолізу та процентний вміст у мікропрепараті пошкоджених клітин. Висновок про рівень імунодеструктивних процесів в аутологічній сполучній тканині роблять на основі порівняння результатів реакції лейкоцитолізу в контрольному і дослідному мікропрепаратах

Приклад 1. Хлопчик П., 13 років, перебував на стаціонарному лікуванні з приводу остеохондропатії хребта (хвороба Шойерман-Мау). Ожиріння II-III ст. Хронічний холецисто-холангіт, в'ялий перебіг фази загострення. Гіперплазія щитовидної залози I ст., Дизметаболічна нефропатія, Остеопенічний

синдром

В зв'язку з недостатньою інформативністю показників периферичної крові і необхідністю встановити рівень збурення патоімунного компоненту дегенеративного процесу в системі сполучної тканини у хворого провели дослідження крові на вміст сироваткових протисполучнотканинних аутоантитіл за запропонованим способом у параспецифічній імунодіагностичній реакції *in vitro* з препаратом біогенним препаратом алфлутопом. Для цього у стерильну мікропробірку внесли 0,4мл крові, стабілізованої 2% розчином натрію цитрату у співвідношенні 4:1 і витримували при кімнатній температурі впродовж 45хв для спонтанної седиментації лейкоцитів. За допомогою мікропіпетки по 20мкл завису лейкоцитів в аутоплазмі нанесли на два краї предметного скла (контроль і дослід), після чого до дослідної проби внесли рівний 20мкл препарату алфлутопа, залишаючи інтактною контрольну пробу. Мікропрепарат інкубували впродовж 60хв при 37°C в умовах вологості камери в чашці Петрі, після чого до контрольної і дослідної проб внесли по 20мкл розчину флюорохрому АО в розведенні 1:10000 (рН 6,5), накрили скельцями і після 30 хвилинної витримки в термостаті при 37°C досліджували у полі зору люмінесцентного мікроскопу з реєстрацією характеру люмінесценції, реакції цитолізу і процентного вмісту пошкоджених клітин. Рівень імунодеструктивних процесів в сполучній тканині визначали шляхом порівняння результатів реакції лейкоцитолізу в контрольному і дослідному мікропрепаратах

Приклад 2. Запропонованим способом проведена оцінка рівня і значущості деструктивного компоненту в формуванні патологічного ураження органів опорно-рухового апарату у 138 хворих з дегенеративними процесами в тканинах опорно-рухової системи, шляхом співставлення отриманих результатів з показниками вмісту антитіл проти алфлутопу у 32 здорових дітей аналогічного віку (табл.)

Таблиця

Показник	Здорові діти n=32		Хворі на остеохондропатію n=138	
	абс	%	абс	%
Індекс патоімунної деструкції сполучної тканини за рівнем реакції лейкоцитолізу, у о	1,03±0,01	100	1,94±0,03	188

Наведені у таблиці дані вказують на те, що зростання рівня патоімунних дегенеративних процесів у сполучній тканині у хворих дітей відповідає посиленню ініційованого алфлутопом лейкоцитолітичного компоненту в тестових пробах, що знайшло відображення у збільшенні діагностичного індексу патоімунної деструкції сполучної тканини. Так, у хворих дітей з остеохондропатіями значення індексу, порівняно із здоровими дітьми, зросло на 88%

Таким чином, запропонований спосіб забезпечує більш високий, ніж за способом-прототипом, рівень клініко-діагностичної інформативності об-

стеження хворих з хронічним деструктивним патоімунним процесом сполучнотканинних компонентів і може бути застосований в широкий медичний практиці

Джерела інформації, які слід взяти до уваги

1. Бененсон Е.В., Мамасаидов А.Т., Цай Е.Г. Антигеноспецифическая В-клеточная активация при ревматоидном артрите и остеоартрозе// Ревматология -1992 -№1 -С 18-22

2. Алфлутоп. Антиревматическое средство с противоаипуридазным действием. КО Биотехнос АО, Бухарест-Румыния. Инструкция к применению

