



УКРАЇНА

(19) UA (11) 58992 (13) A

(51) 7 A61B17/00

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

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА

1

2

(21) 2002129635

(22) 03 12 2002

(24) 15 08 2003

(46) 15 08 2003, Бюл. № 8, 2003 р.

(72) Герасименко Наталія Дмитрівна, Кайдашев Ігор Петрович, Расін Михайло Сахнович, Дігтяр Наталія Іванівна, Рябенко Вікторія Вікторівна, Шинкевич Вікторія Ігорівна

(73) Герасименко Наталія Дмитрівна, Кайдашев Ігор Петрович, Расін Михайло Сахнович, Дігтяр Наталія Іванівна, Рябенко Вікторія Вікторівна, Шинкевич Вікторія Ігорівна

(57) Спосіб оцінки функціонального стану слизової оболонки шлунка, що включає біопсію слизової оболонки гастродуоденальної зони, виготовлення із матеріалу зрізів, обробку зрізів антитілами до імунокомпетентних клітин, візуалізацію реакції антиген - антитіло та оцінку кількості і якості цих клітин, який відрізняється тим, що біоптат ретельно відмивають від шару слизового секрету у фізіологічному розчині дворазово, а як первинні антитіла використовують CD4, CD8, CD11

Винахід відноситься до галузей біології та медицини і може бути використаний для оцінки функціонального стану слизової оболонки шлунка у нормі та у хворих з гастродуоденальною патологією для уточнення діагностики, обґрунтування та моніторингу терапії.

Відомі такі способи оцінки функціонального стану слизової оболонки шлунка дослідження рівня *slgA* в шлунковому соку [Динамика и корреляционная взаимосвязь показателей местного и неспецифического иммунитета у больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки / Крутиков С. Н., Ицкова Е. И., Куница В. Н., Скрипка В. И., Польская Л. В., Полищук Т. В. // Гастроэнтерология - Мировой сборник - Вып. 30 - Днепропетровск, 2000 - С. 234-239], визначення питомої ваги лімфоцитів, плазматичних клітин, нейтрофілів і еозинофілів у запальному інфільтраті власної пластинки слизової оболонки гастродуоденальної зони [Структурно-функциональное состояние слизистой оболочки гастродуоденальной зоны и иммунный статус больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки с сочетанной патологией органов пищеварения / Степанова Е. В., Шамшонкова Т. П., Майнова Т. В., Беспалова Е. В., Гончар Г. В. // Гастроэнтерология - Мировой сборник - Вып. 30 - Днепропетровск, 2000 - С. 99-107].

Найближчим способом до заявляемого є спосіб оцінки функціонального стану слизової оболонки порожнини рота за допомогою маркерів CD3, CD4, CD8, CD20, CD16, CD14 та HLA-DR [Пат. 2001096503 Україна, МПК 7 A61 C 17 00

Спосіб оцінки функціонального стану слизової оболонки порожнини рота Пат. 2001096503 Україна, МПК 7 A61 C 17 00 / Кайдашев І. П., Каченко П. І., Куредова В. Д., Карасюнок О. О., Шинкевич В. І., Баштовенко О. А. (Україна), №41428 Заявл. 24.09.2001. Опубл. 10.06.2002 - Зб.]

Для його здійснення отримують біоптат слизової оболонки порожнини рота, з матеріалу виготовляють криостатні зрізи і фіксують в льодяному ацетоні. За допомогою антитіл до фенотипових антигенів імуноцитів, визначають або ідентифікують клітини, використовуючи імуногістохімічний аналіз. Визначають CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD20⁺, CD16⁺, CD14⁺ HLA-DR⁺ клітини, які присутні в слизовій оболонці порожнини рота. Метод включає три реакції, сутність яких полягає у взаємодії клітинних антигенів із специфічними антитілами та проявку цієї реакції. Для методу використовують другий шар антитіл, мічених біотином. В результаті третьої реакції взаємодіють біотин із стрептавідин-пероксидазою. Візуалізація проводиться з використанням діамінобензидину солянокислого. Кінцевим продуктом гістохімічної реакції є нерозчинний пігмент коричневого кольору, що випадає в місці знаходження антигену. Позитивно забарвлені клітини підраховують, характеризують їх локалізацію.

Недоліками даного способу є:

1. Неможливість використання методу імуногістохімічного аналізу для виявлення імуноцитів слизової оболонки шлунка в зв'язку з наявністю секрету на її поверхні.

(13) A
58992
(11)
UA
(19)

2 Недостатня інформативність щодо характеристики імуніцитів слизової оболонки шлунка, зумовлена наступними обставинами. Як відомо з літературних даних, внутрієпітеліальні лімфоцити слизової оболонки шлунка представлені $CD4^+$ клітинами, $CD8^+$ Т-лімфоцитами-кіллерами, а також $CD11^+$ антиген презентуючими клітинами, що визначає значну роль саме цих клітин в роботі імуніологічного апарату [Дранник Г. Н. Клиническая иммунология и аллергология -Одесса «Астро-Принт» -1999 -603 с., Хаитов Р. М. Физиология иммунной системы. Российский физиологический журнал им. Сеченова -2000 -Т 86, №3 -С 252-267], а їх виявлення є дуже важливим. В основу винаходу поставлено задачу створити спосіб оцінки функціонального стану слизової оболонки шлунка, який виявляє імуніцити, представлені у слизовій оболонці гастродуоденальної зони шлунку.

Поставлену задачу вирішують шляхом створення способу дослідження функціонального стану слизової оболонки шлунка, що включає біопсію слизової оболонки гастродуоденальної зони, виготовлення із матеріалу зрізів, обробку зрізів первинними моноклональними антитілами до імунікомпетентних клітин, візуалізацію реакції антиген-антитіло, та оцінку кількості і якості цих клітин, який, згідно винаходу, відрізняється тим, що біоптат ретельно відмивають від шару слизового секрету у фізіологічному розчині дворазове, а в якості первинних антитіл використовують $CD4$, $CD8$, $CD11$.

Спосіб оцінки здійснюється наступним шляхом

1 Матеріал для дослідження одержують під час проведення фіброгастро-дуоденоскопії хворому, шляхом взяття біоптату слизової оболонки гастродуоденальної зони (може бути використаний також післяопераційний матеріал)

2 Біоптати ретельно та обережно відмивають від шару слизового секрету у двох змивах охолодженого фізіологічного розчину. Терміново, з метою уникнення руйнування клітинних антигенів, матеріал біопсії заморожують зануренням в рідкий азот.

3 Отримують криостатні зрізи товщиною 5-7 мкм, та фіксують їх в охолодженому ацетоні.

4 Зрізи обробляють первинними моноклональними антитілами $CD4$, $CD8$, $CD11$.

5 Наступним етапом виявляють первинні моноклональні антитіла або візуалізують реакцію антиген-антитіло за допомогою хромотропа.

6 Проводять дозобарвлення зрізів гематоксиліном для визначення локалізації позитивних клітин відносно епітелію та власної пластинки слизової оболонки шлунку, а також для виявлення особливостей чи

змін гістологічної будови слизової оболонки, з огляду на важливість стану мікрооточення імуніцитів.

7 Оцінюють кількість, якість та місце знаходження $CD4^+$, $CD8^+$, $CD11^+$ клітин, локалізацію відносно шарів епітеліоцитів та сококалізацію, особливості будови, інші характеристики.

Приклад використання 1

Досліджували біоптат слизової оболонки шлунка при виразковій хворобі дванадцятипалої кишки у стадії загострення, за допомогою непрямого біотин - екстравідін - пероксидазного методу [Дж. Полак, С. Ван Норден, Введение в иммуноцитохимию. Современные методы и проблемы // Перевод с англ. Глуховой М. А., под ред. Хрущева Н. Г. -М. «Мир» -1987 -74с.] В якості первинних антитіл використовували моноклональні мишачі антитіла. Друга реакція полягала у зв'язуванні первинних моноклональних антитіл антитілами міченими біотином. Екстравідін використовувався у якості третього шару і виявляв біотинильовану мітку. Візуалізація реакції проводилася за допомогою діамінобензидину солянокислого.

Приклад використання 2

Проведено дослідження післяопераційного біоптату слизової оболонки шлунка, з приводу виразкової хвороби шлунка, непрямим імуніферментним методом [Дж. Полак, С. Ван Норден, Введение в иммуноцитохимию].

Современные методы и проблемы /У Перевод с англ. Глуховой М. А., под ред. Хрущева Н. Г. -М. «Мир» -1987 -74с.] В якості первинних моноклональних антитіл використовували $CD4$, $CD8$, $CD11$ моноклональні мишачі антитіла. Другим шаром служили антитіла кози до IgG миші, мічені пероксидазою хріна (anti IgG-HRP). Візуалізацію проводили за допомогою 3-аміно-9-етилкарбазола (Sigma, USA). Продукт реакції мав червоне забарвлення.

Було виявлено характерні зміни імуніологічного апарату слизової оболонки шлунку.

Приклад використання 3

Проведено дослідження біоптату слизової оболонки шлунка здорового індивідуума за допомогою прямого імуніфлуоресцентного методу. В якості первинних моноклональних антитіл використовували $CD4$, $CD8$, $CD11$ моноклональні антитіла, мічені флуорецеїнізотіоціанатом (ФІТЦ). Забарвлений зріз оцінювали під мікроскопом з ультрафіолетовою оптикою, при цьому в місцях зв'язування антитіл спостерігали зелену флуоресценцію.

Приклад використання 4

Досліджували біоптат слизової оболонки антрального відділу шлунка при виразковій хворобі дванадцятипалої кишки у стадії ремісії за допомогою непрямого імуніфлуоресцентного методу. В якості первинних моноклональних антитіл використовували $CD4$, $CD8$, $CD11$ мишачі моноклональні антитіла. Другий шар антитіл був представлений антитілами кози до первинних специфічних антитіл і мічений ФІТЦ. Забарвлений зріз оцінювали під мікроскопом з ультрафіолетовою оптикою, при цьому в місцях зв'язування антитіл спостерігали зелену флуоресценцію.

Представлені результати досліджень, проведених запропонованим методом, дозволяють зробити висновок про високу інформативність аналізу функціонального стану слизової оболонки гастродуоденальної зони, який дозволяє оцінити роль імунних механізмів у патогенезі захворювань слизової оболонки шлунка та дванадцятипалої кишки.

