



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **66695** (13) **U**
(51) МПК (2011.01)
G01N 1/00
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 21/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ІДЕНТИФІКАЦІЇ Т-ФОЛІКУЛЯРНИХ ХЕЛПЕРІВ (Tfh)

1

2

(21) u201108542

(22) 07.07.2011

(24) 10.01.2012

(46) 10.01.2012, Бюл. № 1, 2012 р.

(72) КАМИШНИЙ ОЛЕКСАНДР МИХАЙЛОВИЧ,
ГРИНЕВИЧ ІННА ВОЛОДИМИРІВНА

(73) ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ, КАМИШНИЙ ОЛЕКСАНДР МИ-
ХАЙЛОВИЧ, ГРИНЕВИЧ ІННА ВОЛОДИМИРІВНА

(57) Спосіб ідентифікації Т-фолікулярних хелперів (Tfh), що включає підготовку гістологічних препаратів і проведення мікроскопічного дослідження з використанням специфічного маркера, який **відрізняється** тим, що проводять імунофлюоресцентну реакцію з використанням специфічного маркера ICOS.

Корисна модель належить до медицини, а саме експериментальної медицини, патологічної фізіології, ендокринології, імуноморфології і може бути використана для вивчення функціонального стану лімфоїдної тканини при цукровому діабеті та інших аутоімуних хворобах.

Існують деякі лектингістохімічні та імунофлюоресцентні способи виявлення лімфоцитів у гістологічних препаратах за наявності рецепторів до лектинів та протеїнів, але вони недостатньо специфічні, що викликало необхідність у розробці нових способів.

Найбільш близьким за технічною суттю та результатом, що досягається, є спосіб, який полягає у виявленні В-лімфоцитів шляхом підготовки гістологічного препарату і проведення лектингістохімічного дослідження з використанням специфічного маркера - лектину кори бузини чорної [Волошин М. А., Куц О. Г. Пат. № 13282, UA, МПК 2006 G01N 21/00].

Спільними суттєвими ознаками аналога і корисної моделі, що заявляється, є такі:

- підготовка гістологічних препаратів;
- проведення мікроскопічного дослідження з використанням специфічного маркера.

Цей спосіб є недостатньо ефективним тому, що не дозволяє високоспецифічно виявляти Т-фолікулярні хелпери (Tfh) в гістологічних зрізах селезінки.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу виявлення Tfh в гістологічних зрізах селезінки шляхом використання моно-

клонального антитіла ICOS, як специфічного маркера, що дозволить підвищити ефективність специфічного виявлення цих клітин.

Поставлена задача вирішується тим, що у спосіб, який включає підготовку гістологічних препаратів і проведення мікроскопічного дослідження з використанням специфічного маркера новим є те, що проводять імунофлюоресцентну реакцію з використанням специфічного маркера ICOS.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються, та технічним результатом полягає у такому.

Постановка імунофлюоресцентної реакції з ICOS для виявлення Tfh в гістологічних препаратах дозволить зменшити помилки при підрахунку цих клітин в гістологічних препаратах та оцінити ступінь активності цукрового діабету тому, що індуцибельний коstimулятор ICOS є високоспецифічним маркером для Tfh.

Запропонований спосіб дозволяє високоспецифічно диференціювати Tfh від інших клітин у гістологічних препаратах.

Ця специфічна імунофлюоресцентна реакція дозволить аналізувати функціональний стан Т-лімфоцитів в тканинах органів. Щільність рецепторів на поверхні цитоплазматичної мембрани клітин до індуцибельного коstimулятора ICOS дозволяє з високим ступенем специфічності ідентифікувати Tfh у гістологічних зрізах.

Таким чином, сукупність вищезазначених позитивних моментів дозволить підвищити ефектив-

(13) **U**
(11) **66695**
(19) **UA**

ність виявлення Tfh в гістологічних зрізах селезінки і підвищити якість оцінки активності цукрового діабету.

Спосіб здійснюють таким чином.

Для виявлення поверхневих антигенних детермінант лімфоїдних клітин і кількісної їх оцінки застосовували імунофлюоресцентний метод їх ідентифікації в серійних гістологічних зрізах селезінки, фіксованого в 70 % етанолі з додаванням 0,1 % розчину формаліну.

На ротаційному мікроскопі готували серійні зрізи з різних ділянок селезінки товщиною 5 мкм, які потім депарафінували в ксилолі, проводили регідратацію в низхідних концентраціях етанолу (96 %, 70 %) і тричі по 10 хвилин відмивали в 0,1 М фосфатному буфері (pH = 7,4).

Досліджені 3 морфологічні зони селезінки - лімфоїдний фолікул, періартеріальна лімфоїдна муфта та маргінальна зона. Дослідженню піддавали випадково відібрані зрізи з різних частин селезінки.

Клітинний антигенний маркер ICOS виявляли прямим імунофлюоресцентним методом за допомогою кролячих поліклональних антитіл до ICOS, кон'югованих з флюоресцеїном ізотіоціанатом (FITC). Як первинні антитіла використовували кролячі IgG1 до ICOS щура виробництва Santa Cruz Biothec (США), з якими гістологічні зрізи інкубували протягом 18 годин у вологій камері при $T = 4^{\circ}\text{C}$. Після відмивання надлишку первинних антитіл в 0,1 М фосфатному буфері, зрізи інкубували 60 хвилин ($T = 37^{\circ}\text{C}$) з вторинними антитілами в розведенні 1:64. Як вторинні антитіла використовували антитіла до IgG кролика-FITC (Sigma Chemical, США). Після інкубації зрізи промивали 0,1 М фосфатним буфером і укладали в суміш гліцерину і фосфатного буфера (9:1) для подальшої люмінесцентної мікроскопії.

Оброблені гістологічні зрізи вивчали на комп'ютерній системі цифрового аналізу зображення VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина). Зображення, що отримується на мікроскопі AXIOSKOP (ZEISS, Німеччина) в ультрафіолетовому спектрі збудження 390 нм, за допомогою високочутливої відеокамери COHU-4722 (COHU Inc., США) негайно вводилося в комп'ютерну систему цифрового аналізу зображення VIDAS-386. При цьому виключався ефект "вигорання" препарату, пов'язаний з поступовим руйнуванням молекули FITC під впливом тривалого ультрафіолетового опромінення. Введений відеокадр з імунофлюоресценцією оцифровується за денситометричною шкалою з 256 градаціями сірого кольору. У скануючому режимі вводили всі поля зору з кожної з досліджуваних зон селезінки.

Аналіз відеокадрів проводився в автоматичному режимі за допомогою пакета прикладних програм VIDAS-2.5 (Kontron Elektronik, Німеччина). При цьому в автоматичному режимі визначалися області зі статистично значущою флюоресценцією,

характерною для лімфоїдних клітин, активованих ICOS. Обчислювалася площа лімфоїдних клітин, оцінювалася інтенсивність флюоресценції ідентифікованих імунопозитивних клітин і неспецифічна флюоресценція препарату (так званий "фон"). На підставі цих показників обчислювалася інтенсивність експресії відповідних поверхневих антигенів. Отримані дані зіставлялися з результатами класифікаційного аналізу лімфоїдної популяції, що дозволяло ідентифікувати приналежність імунопозитивних лімфоцитів одному з основних класів клітин лімфоїдної популяції селезінки. Це дозволило обчислити абсолютну (кількість клітин на 1 мм площі селезінки) і відносну (%) щільність розподілу різних ICOS позитивних лімфоцитів в досліджуваних зонах селезінки.

Приклад.

Після фіксації шматочків селезінки щурів в 70% етанолі з додаванням 0,1 % розчину формаліну, їх зневоднюють у висхідній батареї спиртів, отримують парафінові зрізи товщиною 5-6 мкм та виготовляють гістологічні препарати. Клітинний антигенний маркер ICOS виявляли прямим імунофлюоресцентним методом за допомогою кролячих поліклональних антитіл до ICOS, кон'югованих з флюоресцеїном ізотіоціанатом (FITC). Як первинні антитіла використовували кролячі IgG1 до ICOS щура виробництва Santa Cruz Biothec (США). Після відмивання надлишку первинних антитіл в 0,1 М фосфатному буфері, зрізи інкубували 60 хвилин ($T = 37^{\circ}\text{C}$) з вторинними антитілами в розведенні 1:64. Як вторинні антитіла використовували антитіла до IgG кролика-FITC (Sigma Chemical, США). Після інкубації зрізи промивали 0,1 М фосфатним буфером і укладали в суміш гліцерину і фосфатного буфера (9:1) для подальшого люмінесцентного режиму визначали області зі статистично значущою флюоресценцією, характерною для лімфоїдних клітин, імунопозитивних до ICOS. Для них обчислювалася площа, оцінювалася інтенсивність флюоресценції ідентифікованих імунопозитивних клітин і неспецифічна флюоресценція препарату (так званий "фон"). Отримані дані зіставлялися з результатами класифікаційного аналізу, що дозволяло ідентифікувати приналежність імунопозитивних клітин одному з основних класів клітин селезінки. В результаті класифікаційного аналізу ідентифікували ICOS - імунопозитивні лімфобласти площею (Area) $> = 30,0 \text{ мкм}^2$; ICOS⁺ великі лімфоцити $30,0 > \text{Area} > = 16,0$; ICOS⁺ середні лімфоцити $16,0 > \text{Area} > = 11,0$; ICOS⁺ малі лімфоцити $11,0 > \text{Area} > = 5,0$. Це дозволило обчислити абсолютну (кількість клітин на 1 мм² площі селезінки) і відносну (%) щільність розподілу різних ICOS-імунопозитивних лімфоцитів різних класів у досліджуваних зонах селезінки.

При цукровому діабеті ICOS-імунопозитивні лімфоцити спостерігаються в лімфоїдному фолікулі, періартеріальній муфті та маргінальній зоні селезінки.

