



УКРАЇНА

(19) UA (11) 66974 (13) U  
(51) МПК (2011.01)  
G01N 33/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

### (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЦИРКУЛЮЮЧИХ ДЕСКВАМОВАНИХ ЕНДОТЕЛІОЦИТІВ КРОВІ

1

(21) u201108653

(22) 11.07.2011

(24) 25.01.2012

(46) 25.01.2012, Бюл.№ 2, 2012 р.

(72) ГРИГОРОВА ІРИНА АНАТОЛІЇВНА, ГЕЛЕТКА  
ОЛЕКСАНДР ОЛЕКСАНДРОВИЧ, СТЕПАНЕНКО  
ОЛЕКСАНДР ЮРІЙОВИЧ(73) ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ  
УНІВЕРСИТЕТ(57) Спосіб визначення циркулюючих десквамова-  
них ендотеліоцитів крові, в якому відбирають кров  
з ліктьової вени, додають стабілізатор, кров  
центрифугують, змішують з осаджувачем тромбо-  
цитів, одержану суміш перемішують, знову

2

центрифугують для осадження ендотеліальних клітин, надосадкову плазму обережно видаляють, а отриманий осад суспендують в розчині NaCl і перемішують, готовою суспензією заповнюють камеру Горяєва, підраховують кількість клітин ендотелію в 2 сітках камери методом фазово-контрастної мікроскопії, який відрізняється тим, що додатково за допомогою мікрофотонасадки та фазово-контрастного об'єктиву отримують цифрові зображення, в яких засобами комп'ютерної програми вимірюють подовжній, поперечний та максимальний розміри, а також площу та периметр окремого десквамованого ендотеліоциту.

Корисна модель належить до медичних технологій, а саме способу визначення вільноциркулюючих ендотеліальних клітин крові.

Останнім часом все частіше увагу дослідників привертає комплекс змін функціонального стану ендотелію при різних захворюваннях. Як маркери активації чи пошкодження ендотелію використовуються такі параметри: фактор Віллебранда, тромбомодулін, ангіотензинконвертази тощо. Визначення цих факторів в плазмі крові не є рутинним і вимагає використання спеціальних коштовних реагентів. Разом з цим як один з показників враження ендотелію може бути використано визначення вільноциркулюючих чи десквамованих ендотеліальних клітин крові.

Кількість десквамованих ендотеліальних клітин крові визначають за способом Hladovec J. Спосіб оснований на ізоляції клітин ендотелію разом з тромбоцитами з наступним осадженням тромбоцитів за допомогою аденозиндифосфату (АДФ) або аденозиндифосфату (АДФ-Na) [Hladovec J. Circulating endothelial cells as a sign of vessel wall lesions / J. Hladovec // Physiol. Bohemoslov. - 1978. - Vol. 27, № 2. - P. 140 - 144].

Даний спосіб визначення циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів крові є найбільш близьким до того, що заявляється, за технічною суттю та результатом, який може бути досягнутим, тому його вибрано за прототип.

Основним недоліком способу-прототипу є його недостатня точність, обумовлена суб'єктивністю дослідника, який під великим збільшенням мікроскопу оцінює характер клітин крові. Суб'єктивна оцінка може спричинити порушення відтворюваності результатів наукових та клінічних досліджень.

У зв'язку з вищевикладеним, в основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу визначення циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів крові шляхом забезпечення об'єктивної та адекватної оцінки.

Задачу, яку поставлено в основу корисної моделі, вирішують тим, що у відомому способі визначення циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів крові, в якому відбирають кров з ліктьової вени, додають стабілізатор, кров центрифугують, змішують з осаджувачем тромбоцитів, одержану суміш перемішують, знову центрифугують для осадження ендотеліальних клітин, на досадкову плазму обережно видаляють, а отриманий осад суспендують в розчині NaCl і перемішують, готовою суспензією заповнюють камеру Горяєва, підраховують кількість клітин ендотелію в 2 сітках камери методом фазово-контрастної мікроскопії, згідно з корисною моделлю, додатково за допомогою мікрофотонасадки та фазово-контрастного об'єктиву отримують цифрові зображення, в яких засобами комп'ютерної програми вимірюють подовжній, поперечний та максимальний розміри, а

UA (19) 66974 (11) (13) U

також площу та периметр окремого десквамованого ендотеліоциту.

Технічний ефект корисної моделі полягає в тому, що запропонований спосіб дає можливість лікарям провести найточніші вимірювання всіх необхідних показників для морфометричної характеристики вільноциркулюючих ендотеліальних клітин крові, що сприяє відтворюваності результатів та підвищує точність клінічного діагнозу.

Спосіб виконують наступним чином: відбирають кров з ліктьової вени в кількості 5 мл. Як стабілізатор додають 3,8 % лимоннокислий натрій у співвідношенні 1:9. Для отримання збагаченої на тромбоцити плазми відразу після забору кров центрифугують 10 хвилин при 200 g. Потім 1 мл плазми змішують з 0,4 мл АДФ та АДФ-Na. Отриману суміш механічно перемішують впродовж 10 хвилин обережним струшуванням пробірок, після чого знову центрифугують при 200 g протягом 15 хвилин для осадження ендотеліальних клітин. Далі на досадову плазму обережно видаляють, а отриманий осад суспендують в 0,1 мл 0,9 % розчину NaCl і перемішують скляною паличкою. Готовою суспензією заповнюють камеру Горяєва. Кількість клітин ендотелію підраховують в 2 сітках камери методом фазово-контрастної мікроскопії. Враховуючи співвідношення між кількістю клітин в сітці і об'ємом камери Горяєва, об'єму отриманої суспензії і об'єму плазми, при підрахуванні кількості ендотеліальних клітин результат множать на  $10^4/\text{л}$ .

Цитологічний контроль досліджуваної клітинної популяції здійснюють імуноцитохімічно за допомогою стрептавідин-біотинного методу. Суспензію клітин наносять на предметні скельця та інкубують з моноклональними антитілами до антигену CD-31.

Поле зору фотографують за допомогою мікрофотонасадки DCM-130 і фазово-контрастного об'єктиву 40x. Фотографію поля зору розміром  $640 \times 480$  пікселів і роздільною здатністю 96 dpi з десквамованими клітинами піддають морфологічній обробці в програмі ImegeTool v3.0 for Windows з визначенням подовжного, поперечного та максимального розмірів, площі та периметру в пікселях (в програмі реалізована функція переведення кількості пікселів в мікрони) для окремого десквамованого епітеліоциту.

Ефективність способу ілюструє наступний приклад.

Задачею дослідження було встановлення взаємозв'язку між кількістю циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів (ЦДЕ) венозної крові, їх морфологічними характеристиками і клітинними показниками ліпідного обміну у хворих у ранньому відновному періоді півкульного ішемічного інсульту у порівнянні з контрольною групою.

Для оцінки клітинних показників ліпідного обміну використаний гістохімічний метод визначення процентного вмісту ліпідвмісних нейтрофілів крові. Нейтрофіли забарвлювали суданом чорним В за Байліффом і Кімброу. Середній гістохімічний кое-

фіцієнт розраховувався за формулою Г. Астальді і Л. Верга. Також оцінювалася кількість нейтрофілів з виходом ліпідних комплексів за межі клітини без видимого супутнього ушкодження мембранної стінки.

Визначення кількості ЦДЕ проводилося за методом J. Hladovec (1978). Підрахунок числа ЦДЕ проводили методом фазово-контрастної мікроскопії в двох сітках камери Горяєва. Розрахунок кількості ЦДЕ виконували за формулою.

Група хворих складала 17 чоловіків у ранньому відновному періоді півкульного ішемічного інсульту. Середній вік склав 45,2 року. Група контролю складалася з 12 осіб чоловічої статі у віці від 32 до 57 років, середній вік 41,6 року.

Середня величина гістохімічного коефіцієнта в групі хворих складала  $2,09 \pm 0,15$  і вірогідно не відрізнялася від такої в контрольній групі  $2,13 \pm 0,21$ . При цьому кількість нейтрофілів з виходом ліпідних комплексів за межі клітини у хворих складала  $14 \pm 5,3$ , а в контрольній групі  $8 \pm 3,7$  на 100 клітин.

Виявлене незначне зниження здатності нейтрофілів до накопичення ліпідних комплексів у групі хворих, які перенесли півкульний ішемічний інсульт; підвищення, у порівнянні з контрольною групою, кількості нейтрофілів з виходом ліпідних комплексів за межі клітини, що можна розцінювати як великий ступінь напруженості клітинної ланки ліпідного обміну, у порівнянні з контролем.

Кількість десквамованих ендотеліоцитів у групі хворих складала  $(21 \pm 7,1) \times 10^6$  на літр крові, а в контрольній групі  $(19,2 \pm 10,3) \times 10^6$ , відповідно. У групі хворих відзначалося незначне збільшення середнього показника площі й одного з додаткових розмірів десквамованих клітин:  $27353 \pm 9745$  площа,  $231 \pm 43,7$  додатковий розмір у контрольній групі;  $33051 \pm 10173$  площа,  $357 \pm 62,1$  додатковий розмір (в умовних точках) у групі хворих.

Спільна оцінка кількості циркулюючих клітин у літрі крові і морфологічних показників площі й одного з розмірів десквамованих ендотеліоцитів може служити показником ступеня залучення судинної стінки і її ендотеліального шару в групі хворих і свідчить про ендотеліальну дисфункцію.

Таким чином, у групі хворих у ранньому відновному періоді півкульного ішемічного інсульту просліджується позитивний взаємозв'язок між морфологічними показниками (площа і додатковий розмір) ЦДЕ, ступенем порушення фагоцитарної ланки імунітету і наявністю взаємозв'язку між середнім гістохімічним коефіцієнтом і кількістю ЦДЕ в літрі крові.

Розроблена методика для дослідження вільноциркулюючих ендотеліальних клітин в крові дозволяє одержати точні результати дослідження завдяки забезпеченню можливості проведення розрахунку всіх необхідних показників. Завдяки цьому способу відкриваються нові, широкі можливості оцінки ендотеліальної дисфункції при різних захворюваннях. Крім того, результати дослідів можуть бути багаторазово відтворені.

