



УКРАЇНА

(19) UA (11) 84752 (13) C2

(51) МПК (2006)

G09B 23/28 (2006.01)

G01N 33/49

G01N 21/64

A61B 10/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ РЕАКЦІЇ ЛЕЙКОЦИТОЛІЗУ

1

(21) а200611820

(22) 10.11.2006

(24) 25.11.2008

(46) 25.11.2008, Бюл.№ 22, 2008 р.

(72) ПЕРЕПЕЛИЦЯ МИХАЙЛО ПЕТРОВИЧ, UA,
САСКА ТЕТЯНА МИХАЙЛІВНА, UA, ДЕМ'ЯНЕНКО
СВІТЛАНА МИХАЙЛІВНА, UA, ГЕРАСИМІВ АНД-
РІЙ ІГОРОВИЧ, UA(73) ПРИВАТНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
"МЕДИЧНИЙ КОЛЕДЖ", UA

(56) UA A 55782 15.04.2003

UA A 55845 15.04.2003

UA A 66250 15.04.2004

2

(57) Спосіб моделювання реакції лейкоцитолізу, що включає інкубацію суспензії ізольованих лейкоцитів у цитотоксичному середовищі і аналіз діагностичної реакції у вигляді лізису лейкоцитів у полі зору люмінесцентного мікроскопа, який відрізняється тим, що ізольовані лейкоцити периферійної крові людини інкубують із несумісною за критерієм групспецифічності стандартною діагностичною сироваткою однієї з груп крові, причому лейкоцити А (II) групи інкубують із сироваткою I або III групи крові, лейкоцити В (III) групи інкубують із сироваткою I або II групи, а лейкоцити АВ (IV) групи інкубують із сироваткою I, II або III групи крові.

Винахід стосується медицини, зокрема методів клініко-лабораторного аналізу, і може бути використана в клініко-лабораторній практиці для визначення мембранорезистентності імунних клітин, зокрема лейкоцитів, під впливом різних чинників.

Відомий спосіб моделювання реакції лейкоцитолізу, який включає інкубацію суспензії ізольованих лейкоцитів у цитотоксичному середовищі і аналіз цитолітичної реакції у полі зору люмінесцентного мікроскопу [1]. За відомим способом, попередньо інкубовані з цитолітичним (цитотоксичним) чинником ізольовані лейкоцити на предметному склі фарбують флюорохромним барвником, після чого досліджують у полі зору люмінесцентного мікроскопу та аналізують характер лейкоцитолізу за ознаками набрякання клітин, пошкодження клітинної оболонки, зміною форми клітин як у цілому, так і її окремих елементів, зокрема, ядра і цитоплазми.

Недоліком відомого способу є недостатня точність та інформативність, оскільки цитолітичну дію у кожному окремому випадку ініціюють різним за походженням цитотоксичним чинником, що унеможливорює стандартизацію умов лабораторної постановки цитолітичного діагностичного тесту, а отже співставлення результатів діагностичної ре-

акції, індукованої різними цитотоксичними факторами. Ще одним суттєвим недоліком, що впливає як наслідок недостатньої стандартизації лейкоцитолізу, слід визнати неможливість виявлення дії чинників, спрямованих на стабілізацію клітинних мембран, що обмежує сферу застосування відомого способу.

В основу винаходу поставлено завдання вдосконалити відомий спосіб, в якому шляхом застосування інгредієнтом діагностичної реакції стандартизованого лейкоцитотоксичного чинника забезпечують умови для підвищення точності та інформативності способу.

При вирішенні поставленого завдання було взято до уваги те, що на поверхні мембран лейкоцитів зосереджені групспецифічні антигени як HLA-, так і АВ0-системи [2, 3]. Антигени системи АВ0 містяться головним чином на мембранах еритроцитів. І хоч саме проти цих антигенів у стандартних групспецифічних сироватках, призначених для діагностичного визначення групи крові, містяться відповідні у груповому відношенні антитіла, згадані сироватки містять групові антитіла й проти відповідних антигенів лейкоцитів. Індукція лейкоцитолізу стандартною групспецифічною сироваткою призводитиме до лейкоцитолізу, який відо-

(13) C2

(11) 84752

(19) UA

бражає мембранну резистентність власне клітин - лейкоцитів, на фоні якої чітко проявлятиметься мембранопротекторний вплив різних чинників фізичної і біоорганічної природи, що сприятиме розширенню сфери застосування відомого способу.

Поставлене завдання вирішують тим, що у відомому способі моделювання реакції лейкоцитолізу, який включає інкубацію суспензії ізольованих лейкоцитів у цитотоксичному середовищі і аналіз діагностичної реакції у полі зору люмінесцентного мікроскопу, відповідно до винаходу ізольовані лейкоцити периферійної крові людини інкубують із несумісною за критерієм групспецифічності стандартною діагностичною сироваткою, причому лейкоцити А (II) групи інкубують із сироваткою I або III груп крові, лейкоцити В (III) групи інкубують із сироваткою I або II груп, а лейкоцити АВ (IV) групи інкубують із сироваткою I, II або III груп крові.

Перелік фігур

Фіг.1. Мікрофото. Реакція лейкоцитолізу при взаємодії ізольованих лейкоцитів донора з несумісною за критерієм групспецифічності діагностичною сироваткою. Акридин оранжевий 1:10000. Люмінесцентна мікроскопія. Об. 20х ок. 15х

Фіг.2. Мікрофото. Реакція взаємодії ізольованих лейкоцитів донора з однією стандартною діагностичною сироваткою. Акридин оранжевий 1:10000. Люмінесцентна мікроскопія. Об. 20х ок. 15х

Спосіб здійснюють наступним чином. На предметне скло наносять 20мкл суспензії лейкоцитів в ізотонічному розчині натрію хлориду і змішують з аналогічним об'ємом діагностичної групспецифічної сироватки таким чином, щоб у мікропрепараті були сформовані умови для розвитку імунотоксичного - лейкоцитолітичного процесу. Для цього лейкоцити змішують із стандартними групспецифічними сироватками за однією з наступних схем: лейкоцити А (II) групи інкубують із

сироваткою I або III груп крові, лейкоцити В (III) групи інкубують із сироваткою I або II груп, а лейкоцити АВ (IV) групи інкубують із сироваткою I, II або III груп крові. До суміші на предметному склі додають 20мкл флуорохромного барвника, наприклад, акридину оранжевого в розведенні 1:10000, накривають скельцем і витримують у затемненому місці при 18-22°C впродовж 60хв, після чого в полі зору люмінесцентного мікроскопу аналізують характер лейкоцитолітичного процесу.

Приклад 1. Для моделювання реакції лейкоцитолізу з гарантованою можливістю надійного і точного відтворення лейкоцитолітичного процесу на 2 предметних скла нанесли по 20мкл суспензії лейкоцитів здорової дорослої людини А (II) групи в ізотонічному розчині натрію хлориду та змішали з рівним об'ємом несумісної у груповому відношенні стандартної групспецифічної сироватки: до пробі лейкоцитів в одному мікропрепараті внесли сироватку I групи, а до лейкоцитів в іншому мікропрепараті – сироватку III групи крові. До кожного з мікропрепаратів внесли по 20мкл розчину акридину оранжевого в розведенні 1:10000, накрили скельцем і витримували впродовж 60хв при 20°C у затемненому місці. Мікропрепарати досліджували в полі зору люмінесцентного мікроскопу, відзначаючи характер лейкоцитолітичного процесу. В результаті, в обох мікропрепаратах (мав місце помітний лейкоцитоліз, оскільки там відбулася імунотоксична взаємодія адсорбованих на мембранах лейкоцитів групспецифічних антигенів – аглітиногенів А II групи з відповідними групспецифічними антитілами (аглітинінами α), що містяться у сироватках I і III груп.

Приклад 2. За наведеною методикою провели постановку реакцій лейкоцитолізу ізольованих лейкоцитів у 37 здорових дорослих людей, результати якої наведені у таблиці.

Таблиця

Результати взаємодії ізольованих лейкоцитів крові донорів з стандартними групспецифічними діагностичними сироватками за наявності (+) чи відсутності (-) лейкоцитолізу

Лейкоцити за групою ознакою	n	Стандартні групспецифічні сироватки		
			poz)	III (a)
A (II)	14	+	-	+
B (III)	13	+	+	-
AB(IV)	10	+	+	+

В усіх наведених (помічених знаком +) реакціях мав місце типовий цитолітичний процес, а саме лейкоцитоліз, сталий за якісними проявами і кількісними параметрами. При цьому спостерігали імунотоксичне набрякання клітин, фрагментація ядер нейтрофілів, порушення цілісності зовнішньої клітинної мембрани, розтікання цитоплазми (Фіг.1), тоді як в контрольних препаратах (помічені знаком -) з використанням імунотоксично сумісних групспецифічних стандартних сироваток лейкоцити зберігали притаманну їм форму і характер люмінесцентного світіння (Фіг.2). Характерною для запропонованого способу є відсутність суттєвих відмінностей якісних проявів та інтенсивності лізису

лейкоцитів, отриманих для дослідження від різних здорових дорослих людей, що надає запропонованому способу високого рівня відтворності, а отже точності дослідження.

Отже, запропонований спосіб забезпечує вищий, ніж за способом - V і прототипом, рівень точності та інформативності, що сприятиме розширенню сфери застосування і впровадженню способу в клініко-лабораторну практику.

Джерела інформації, які слід взяти до уваги:

1. Пат. 55782 А, Україна. Богуславець О.Т., Дем'яненко В.В., Федорців О.Є. Спосіб визначення цитоактивних властивостей речовини в тестовій пробі in vitro.

2. Nadir R. Farid, Laura Sampson, Elke P. Noel, John M. Barnard, Robert Mandeville, Bodil Larsen, and William H. Marshall. A Study of Human Leukocyte D Locus Related Antigens in Graves' Disease. J Clin Invest. 1979 January; 3(1): 108-113.

3. Bucin D., Johansson S., Malm T., Jogi P., Johansson J., Westrin P., Lindberg L.O., Olsson A.K.,

Gelberg J., Peres V., Harling S., Bennhagen R., Kornhall B., Ekmehag B., i Kurkus J, Otto G. Heart transplantation across the antibodies against HLA and ABO. Transpl Int. 2006 Mar; 19(3):239-44/ PMID: 16441774 [PubMed – indexed for MEDLINE].

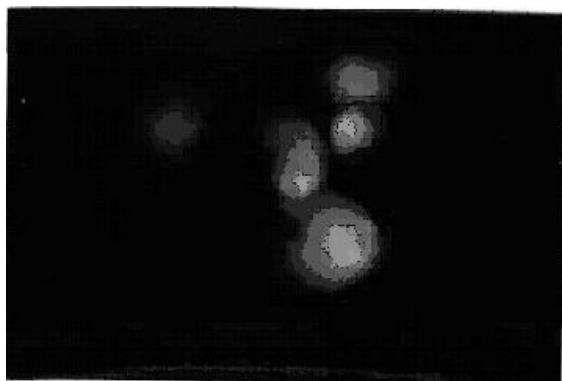


Fig. 1

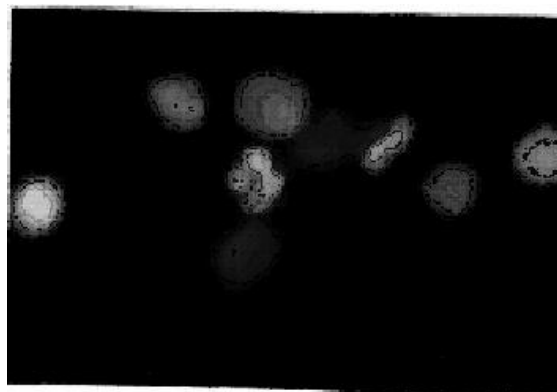


Fig. 2