



УКРАЇНА

(19) UA (11) 34634 (13) A

(51) 6 A61K39/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДвидається під
відповідальністю
власника
патенту(54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ АУТОІМУННИХ ЗАХВОРЮВАНЬ
ГОЛОВНОГО МОЗКУ ТА НИРОК У ЛЮДЕЙ

(21) 98105308

(22) 08.10.1998

(24) 15.03.2001

(46) 15.03.2001, Бюл. № 2, 2001 р.

(72) Куценко Лариса Олександрівна, Кайдашев
Ігор Петрович, Дранник Георгій Миколаєвич,
Фадєєва Аліна Степанівна(73) УКРАЇНСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА
АКАДЕМІЯ

(57) Спосіб виготовлення тест-систем для діагностики аутоімунних захворювань головного мозку та нирок у людей, який включає виділення антигенів з тканин мозку та нирок людей, одержання формалінованих еритроцитів, їх сенсибілізацію тканинним антигеном та стабілізацію в консервувальному розчині, який відрізняється тим, що екстракцію антигенів проводять при температурі 4°C і фіксованому значенні pH середовища.

Винахід стосується галузей біології, медицини та може бути використаний для діагностики і контролю ефективності лікування найпоширеніших аутоімунних захворювань. Найбільш поширеними захворюваннями з доказаною аутоімунною природою є розсіяний склероз та хронічний гломерулонефрит.

Імунні процеси мають значення при атрофії мозку різного ґенозу, зокрема, при хворобі Альцгеймера [Fillit H., Laine V., Reisberg B. et al. // Senile demencie of Alzheimer type /Ed.Hutton J.T. - Liss, New York. -1985. - P. 307-318; McRae-Dequeurse A., Booy S., Haglid K. et. al.//Neurology. -1976. - 26. - P. 1054-1059].

У хворих на шизофренію виявляється цілий комплекс аутоантитіл до різноманітних нейроантигенів тимуса, які мають загальні детермінанти з структурами мозку [Ganquill R., Rubin B.S., Kelley R.H. et. al. //Ann. N.Y. Acad. Sci. -1987. - 496. - P. 676-685].

Подальше вивчення ролі антитіл до нейрональних структур, нейротрансмітерів і їх рецепторів, які виявляються при багатьох неврологічних і психологічних захворюваннях, дозволить визнати їх участь в пато- і сантогенетичних механізмах при різних нозологічних формах патології ЦНС.

Проведення клініко-імунологічних обстежень з визначенням наявності антитіл до нейрональних структур і нейроендотелію доцільно для визначення факторів ризику з метою профілактики та ранньої діагностики захворювань, а також для оцінки ефективності лікування.

Групою авторів були розроблені еритроцитарні імунореагенти для діагностики аутоімунних пошкоджень підшлункової залози [К.В. Ким,

П.Н. Дерябин, Б.В. Каральник. Эритроцитарные иммуно-реагенты для диагностики аутоиммунных повреждений поджелудочной железы //Лабораторное дело. -1991.-N11.-С. 44-48].

За допомогою реакції нейтралізації антитіл з одержаним діагностиком можна з високою специфічністю визначити панкреатичні антигени

Прототипом винаходу є виділення антигенів методом Dexter, Gaynes та Bridges в модифікації Fortaender [Руководство по иммунологии //Под ред проф О.Е. Вязова, проф. Ш.Х. Ходжаева. М.: Медицина - 1973. - 390 с.].

Тканину подрібнювали на дрібні кусочки та відмивали дистильованою водою. Відмиті кусочки використовували для приготування гомогенату, із якого готували 10% розчин його в 1,8% розчині хлористого натрію з додаванням 0,25% фенолу. Гомогенат екстрагували на протязі 48 годин при температурі 37°C, часто перемішували. Після центрифугування для видалення великих тканинних частинок, для осадження побічних білків до екстракту додавали крижану оцтову кислоту. Осаджені білки виділяли шляхом центрифугування. Надосадову прозору рідину змивували з рівною кількістю насиченого розчину сульфату амонію та залишали на 25 годин при температурі 0°C. При таких умовах випала в осад достатня кількість білку. Надосадну рідину зливали, а осад розчиняли в дистильованій воді. Для видалення солей сульфату амонію розчин діалізували протягом 48 годин проти проточної води. Потім розчин розбавляли дистильованою водою так, щоб вміст азоту за мікрометодом Кельдаль складав 15-20 мг%.

(19) UA (11) 34634 (13) A

Однак, цей метод має низку недоліків - руйнація деяких тканинних антигенів шляхом протеолізу, колювання рН під час екстракції.

В основу винаходу поставлене завдання створити спосіб виготовлення тест-систем для діагностики аутоімунних захворювань головного мозку та нирок у людей шляхом вибору температурного режиму та концентрації розчину (рН середовища), який дозволяє запобігти руйнації антигенів під час екстракції та стандартизації умов екстракції, що дозволить забезпечити високу ефективність діагностики аутоімунних захворювань головного мозку та нирок. Поставлена задача вирішується тим, що в запропонованому способі виготовлення тест-систем для діагностики аутоімунних захворювань головного мозку та нирок у людей, який включає виділення антигенів з тканини мозку та нирок людей, одержання формалінованих еритроцитів, їх сенсibilізацію тканинним антигеном та стабілізацію тканинним антигеном та стабілізацію в консервуючому розчині, згідно винаходу, екстракцію антигенів проводять при температурі 4°C і в забуференому фізіологічному розчині при фіксованому значенні рН середовища.

Спосіб здійснюється наступним чином. Наважку подрібненої тканини мозку (нирок) промивали водопровідною водою протягом трьох годин. Після закінчення промивання промивна вода була прозора та не містила в своєму складі білку (проба на білок за допомогою сульфосаліцилової кислоти була негативною). Готували 10% гомогенат тканини з екстракційним розчином (забуферений фізіологічний розчин), залишали у холодильнику при температурі $+4^{\circ}\text{C}$ на 24 години при періодичному перемішуванні. Відстояний верхній шар рідини зливали з осаду та центрифугували. До освітленого центрифугату додавали такий же об'єм крижаної оцтової кислоти. Після центрифугування центрифугат змішували з рівним об'ємом насиченого розчину сульфату амонію і витримували в холодильнику при температурі 0°C протягом 40 годин. Суміш центрифугували. Осад добре перемішували з забуференим фізіологічним розчином та знову центрифугували. Центрифугат переносили в діалізний мішок, герметизували і ставили на діаліз проти проточної води на 2 години. Потім діалізний мішок переносили в забуферений фізіологічний розчин і продовжували діаліз при температурі $+4^{\circ}\text{C}$ протягом 68 годин. Розчинений осад знімали з діалізу, переносили у стерильні пеніцилінові флакони, закривали гумовими пробками, після визначення вмісту білку за ГОСТ 13496 4-74, зберігали у замороженому вигляді при температурі -20°C протягом 1 місяця.

Другий етап роботи заключався в приготуванні формалінованих еритроцитів, їх сенсibilізація, стабілізація, консервація та одержання імунної сироватки. До цитратної крові людини 1(0) резус негативний додавали забуференого фізіологічного розчину з рН 7,2. Перемішували обережно до утворення зависі еритроцитів. До зависі додавали 50% нейтрального формаліну. Одержану суміш розливали в дві конічні колби та прогрівали на водяній бані при температурі 37°C протягом 2-х годин при постійному перемішуванні. За цей час еритроцити змінили колір з червоного на темно-шоколадний. Після прогрівання еритроцитів цент-

рифугували 10 хвилин при 1000 об/хв. Надосадну рідину зливали і проводили процедуру відмивання забуференим фізіологічним розчином. Відмивання повторювали два рази. Відмиті еритроцити поміщали в холодильник при температурі $+4^{\circ}\text{C}$ на 48 годин.

Після цього надосадну рідину зливали, до осаду додавали забуферений фізіологічний розчин і поміщали на дві доби в холодильник при температурі $+4^{\circ}\text{C}$. Після цього формаліновані еритроцити придатні для сенсibilізації антигеном.

Для сенсibilізації еритроцитів готували розчин антигену в забуференому фізіологічному розчині концентрацією 20 мг/л.

З приготовлених раніше формалінованих еритроцитів зливали надосадну рідину, осад еритроцитів старанно перемішували скляною паличкою та додавали сюди ж розчин антигену в співвідношенні 1 : 20.

Суспензію еритроцитів поміщали на водяну баню при 37°C на 2 години, періодично розмішуючи шляхом обертання склянки. Потім зависі еритроцитів центрифугували протягом 10 хвилин при 1000 об/хв, надосадну рідину зливали, додавали забуференого фізіологічного розчину. Процедuru відмивання повторювали 2 рази.

Після відмивання сенсibilізованих антигеном еритроцитів надосадну рідину зливали, до осаду еритроцитів додавали консервуючий розчин з розрахунку 19 об'ємних частин на 1 об'ємну частину сенсibilізованих еритроцитів.

Консервуючий розчин містить в собі 0,05 г азида натрію та 0,1 г альбуміну биків ліофілізованого (приведені наважки розчиняють в 100 мл забуференого фізіологічного розчину).

Консервовані сенсibilізовані еритроцити розливали на 10 мл у стерильні пеніцилінові флакони. Закривали стерильними гумовими пробками та закривували алюмінієвою фольгою. Зберігали в холодильнику при температурі $+4^{\circ}\text{C}$ у вигляді 5% зависі. Якість та чутливість отриманого діагностикума перевіряли реакцією з гіперімунною сироваткою.

Для одержання імунної сироватки проводили імунізацію кроля породи срібляста шиншилла масою 3 кг, який знаходився на стандартному віварійному раціоні.

Імунізацію проводили гомогенатом тканини головного мозку молодих людей, які загинули від травм в віці 18-35 років.

Для одержання гомогенату 0,6 г тканини мозку розтирали в фарфоровій ступці з 0,6 мл дистильованої води та 0,6 мл ад'юванта Фрейнда. Інтенсивно перемішували до одержання однорідної розовато-білої суміші. 1 мл одержаної суміші вводили внутрішньовідношкірно в подушечки всіх кінцівок кроля. Через два тижні після першої імунізації проводили другу. Для цього брали наважку тканини мозку 0,8 мг і розтирали в фарфоровій ступці з 0,8 мл дистильованої води. Після одержання гомогенату приливали 0,8 мл ад'юванта Фрейнда та перемішували. 1,8 мл суміші вводили внутрішньовідношкірно в область обох лопаток, попередньо звільнивши місце проколу від шерсті. Аналогічно через кожних два тижні проводили третю та четверту імунізацію. Через два тижні після останньої (четвертої) імунізації у кроля із вушної вени брали кров, із якої одержували сироватку шляхом цент-

рифугування протягом 10 хвилин при 1500 об/хв. Сироватку використовували для постановки реакції непрямой аглютинації. В гнізда планшета для імунологічних реакцій, починаючи з номера 2, розливали розчин натрію хлориду по 0,05 мл. В гнізда номерів 1 та 2 наливали 0,05 мл імунної сироватки. Розчин натрію хлориду та сироватки старанно перемішували, відбирали 0,05 мл суміші, переносили в гніздо 3 і т.д. до гнізда 12. Таким чином одержували наступні розведення:

| № гнізда | Розведення |
|----------|------------|
| 1 | Сироватка |
| 2 | 1:1 |
| 3 | 1:2 |
| 4 | 1:4 |
| 5 | 1:8 |

Продовження

| | |
|----|--------|
| 6 | 1:16 |
| 7 | 1:32 |
| 8 | 1:64 |
| 9 | 1:128 |
| 10 | 1:256 |
| 11 | 1:512 |
| 12 | 1:1024 |

В два вільні гнізда планшета наливали 0,05 мл розчину натрію хлориду. Потім у всі гнізда приливали 0,05 мл однорідної суспензії діагностичного еритроцитарного. Вміст гнізд перемішували і залишали в термостаті при температурі 37°C на одну годину. Після закінчення терміну інкубації фіксували результат реакції. Титр аглютинації повинен бути не менше 1:256.

Тираж 50 екз.

Відкрите акціонерне товариство «Патент»
Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101
(03122) 3 - 72 - 89 (03122) 2 - 57 - 03

