



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **85720** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
G01N 21/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 07666	(72) Винахідник(и): Куц Оксана Георгіївна (UA), Волошин Микола Анатолійович (UA), Васильчук Наталія Григорівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 17.06.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.11.2013	(73) Власник(и): ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, пр. Маяковського, 26, м. Запоріжжя, 69035 (UA), Куц Оксана Георгіївна, вул. Товариська, 43, кв. 42, м. Запоріжжя, 69121 (UA), Волошин Микола Анатолійович, вул. Дзержинського, 104, кв. 57, м. Запоріжжя, 69095 (UA), Васильчук Наталія Григорівна, вул. Маяковського, 20, к. 133, м. Запоріжжя, 69035 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.11.2013, Бюл.№ 22	

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ АНТИГЕНПРЕЗЕТУЮЧИХ КЛІТИН В ПАРАКОРТИКАЛЬНІЙ ЗОНІ ЛІМФАТИЧНОГО ВУЗЛА

(57) Реферат:

Спосіб виявлення антигенпрезентуючих клітин в паракортикальній зоні лімфатичного вузла здійснюється шляхом препарування лімфатичного вузла, підготовки гістологічних препаратів та мікроскопії. Проводять лектингістохімічне дослідження з лектином виноградного слимака.

UA 85720 U

Корисна модель належить до медицини, а саме гістології, анатомії, імунології, і може бути використана для виявлення антигенпрезентуючих клітин в гістологічних препаратах.

На сьогодні встановлено існування шести типів антигенпрезентуючих клітин у клітинному складі лімфатичного вузла, які відрізняються топографією, антигенним фенотипом і функціональними властивостями. Тому виникає необхідність дослідження окремих типів антигенпрезентуючих клітин в структурі лімфатичного вузла для розуміння формування різних видів імунної відповіді в периферичних лімфоїдних органах, а саме одного із типів антигенпрезентуючих клітин в паракортикальній тимусзалежній зоні лімфатичного вузла.

Найбільш близьким за технічною суттю та результатом, що досягається, є спосіб, який полягає у виявленні антигенпрезентуючих клітин паракортикальної зони лімфатичного вузла в гістологічних заморожених препаратах гістохімічним методом Вахштейна-Мейзеля, який полягає у препаруванні вузла, фіксації даного органа фізичним способом - у рідкому азоті, підготовці гістологічних препаратів на мікротомі із замороженням, інкубації отриманих зрізів з ферментом АТФ-азою, реакцією продуктів інкубації з нітратом свинцю, проявом продуктів реакції сульфідом амонію, зануренням препарату у гліцерин-желатин, мікроскопією (Lennert K., Kaiserling E., Muller-Hermelink H.K. T-associated plasma cells // Lancet. - 1975. - № i. - P. 1031-1032.

Спільною суттєвою ознакою прототипу і корисної моделі, що заявляється, є така:

- препарування лімфатичного вузла;
- підготовка гістологічних препаратів;
- мікроскопія.

Цей спосіб є недостатньо ефективним, тому що він обмежує можливості виявлення антигенпрезентуючих клітин на заморожених гістологічних зрізах, так як нарізається обмежена кількість гістологічних зрізів з одного органа внаслідок великої товщини зрізів, більше 10 мкм; необхідна підтримка постійного температурного режиму в лабораторії для постановки гістохімічної реакції із застосуванням ферменту АТФ-ази; використовується для візуалізації гістохімічної реакції токсичний сульфід амонію, крім того виникає потреба в значних матеріальних витратах - наявність рідкого азоту для фіксації біологічного матеріалу, багатогодинна робота мікротому із замороженням.

Тому виникла необхідність у розробці нового способу по виявленню антигенпрезентуючих клітин в паракортикальній тимусзалежній зоні лімфатичного вузла.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу виявлення антигенпрезентуючих клітин в паракортикальній зоні лімфатичного вузла в гістологічних препаратах шляхом використання методу лектинової гістохімії з лектином виноградного слимака, що забезпечить підвищення ефективності високоспецифічного виявлення цих клітин.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі, який полягає у препаруванні лімфатичного вузла, підготовці гістологічних препаратів, мікроскопії, новим є те, що проводять лектингістохімічне дослідження з лектином виноградного слимака.

Застосовується хімічна фіксація біологічного матеріалу, виготовлення парафінових зрізів і постановка лектингістохімічної реакції з лектином виноградного слимака.

Як ми доводимо, достовірність методу підтверджується внаслідок збігу топографії і морфології антигенпрезентуючих клітин в тимусзалежній зоні лімфатичного вузла при застосуванні гістохімічного методу Вахштейна-Мейзеля по виявленню АТФ-ази в цитоплазмі антигенпрезентуючих клітин і лектингістохімічного методу по виявленню нашарувань часточок бензидину на поверхні цитоплазматичної мембрани антигенпрезентуючих клітин після інкубації гістологічних зрізів в кон'югаті лектин виноградного слимака - пероксидаза хрому. Антигенпрезентуючі клітини розташовуються в тимусзалежній паракортикальній зоні лімфатичного вузла, на межі коркового і мозкового шарів, утворюючи ланцюжок клітин в один ряд. Частіше клітини розташовуються навколо просвіту судин, утворюючи осередки з трьох клітин. Клітини розташовуються одна від одної на відстані 20-25 мкм. Клітини контактують між собою за рахунок відростків пальцеподібної форми, яких налічується від 4 до 7, довжиною до 15 мкм. Клітини мають неправильну форму. Розміри соми клітин - 25-35 мкм. В тілі клітин контурується ядро неправильної форми.

Постановка лектингістохімічної реакції з лектином виноградного слимака для виявлення антигенпрезентуючих клітин в паракортикальній зоні лімфатичного вузла в парафінових гістологічних препаратах дозволить збільшити потік досліджуваного матеріалу за рахунок економії часу, зменшення матеріальних і енергетичних затрат на виконання поставленої задачі, що дозволить підвищити інформативність стосовно морфо-функціонального стану антигенпрезентуючих клітин і зменшить помилки при підрахунку цих клітин в гістологічних препаратах, так як виникає можливість аналізувати серійні гістологічні зрізи товщиною в 5 мкм,

на відміну від заморожених зрізів товщиною 10 і більше мкм, що особливо актуально при дослідженні антигенпрезентуючих клітин, лінійні параметри яких сягають 60 мкм і більше.

Запропонований спосіб дозволяє високоспецифічно диференціювати антигенпрезентуючі клітин в тимусзалежній паракортикальній зоні лімфатичного вузла. Новий спосіб дозволяє на більш тривалий строк заархівувати дослідний матеріал у формі парафінових блоків і парафінових гістологічних зрізів, дозволяє збільшити об'єм досліджуваного матеріалу, знизити матеріальні витрати на отримання результатів дослідження і тим самим підвищити достовірність виявлення та ідентифікації антигенпрезентуючих клітин в тимусзалежній паракортикальній зоні лімфатичного вузла.

Таким чином, сукупність вищезазначених позитивних моментів дозволить підвищити ефективність виявлення антигенпрезентуючих клітин в гістологічних парафінових препаратах і більш досконало вивчати будову лімфоїдної тканини.

Спосіб здійснюють таким чином.

Проводять препаровку лімфатичного вузла. Для лектингістохімічного дослідження тканину фіксують хімічним способом в розчині Буєна. Шматочки зневоднюють в висхідній батареї спиртів, починаючи з 40 %. Проводять заливку шматочків тканини у парафін. Отримують парафінові зрізи товщиною 5 мкм на ротаційному мікротомі. Підготовлюють гістологічні зрізи, проводять блокування ендогенної пероксидази. Гістохімічне визначення рецепторів до лектину виноградного слимака проводять з використанням прямої реакції з кон'югатом - лектин і пероксидаза хрому. Рецептори до лектину виявляють по відкладанню часточок бензидину на поверхні цитоплазматичної мембрани клітин. Зрізи дегідратують і занурюють у канадський бальзам. Мікроскопують. Морфометричне дослідження тіла клітин, ядра, відростків проводять за допомогою окуляр-мікрометра при імерсійному збільшенні мікроскопу.

Приклад. Після фіксації шматочків медіастинального лімфатичного вузла щурів в рідині Буєна, їх зневоднюють у висхідній батареї спиртів, отримують парафінові зрізи товщиною 5 мкм та виготовляють гістологічні препарати. Лектингістохімічне визначення рецепторів до лектину виноградного слимака проводять з використанням прямої реакції з кон'югатом лектину виноградного слимака і пероксидази хрому. Рецептори до лектину виявляють по відкладанню часточок бензидину на поверхні цитоплазматичної мембрани. Антигенпрезентуючі клітини розмірами до 25 мкм, неправильної форми, темно-коричневого кольору мають світле ядро пелюсткоподібної форми, а також звивисті відростки довжиною до 15-20 мкм. Антигенпрезентуючі клітини розташовуються в паракортикальній Т-залежній зоні однорядним ланцюжком. Інтенсивність бензидинових відкладень на поверхні цитоплазматичної мембрани вказує на морфо-функціональний стан антигенпрезентуючих клітин.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб виявлення антигенпрезентуючих клітин в паракортикальній зоні лімфатичного вузла, що здійснюється шляхом препарування лімфатичного вузла, підготовки гістологічних препаратів та мікроскопії, який **відрізняється** тим, що проводять лектингістохімічне дослідження з лектином виноградного слимака.

Комп'ютерна верстка М. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601