



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 100514

(13) U

(51) МПК

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2015 01678**

(22) Дата подання заявки: **26.02.2015**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **27.07.2015**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **27.07.2015, Бюл.№ 14**

(72) Винахідник(и):

Чайковський Юрій Богданович (UA),

Літус Віктор Іванович (UA),

Сокурєнко Людмила Михайлівна (UA)

(73) Власник(и):

НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ

УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ,

бул. Шевченка, 13, м. Київ-4, 01601 (UA)

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ІМУНОТОКСИЧНОЇ ДІЇ РТУТІ (В ЕКСПЕРИМЕНТІ)

(57) Реферат:

Спосіб оцінки імунотоксичної дії ртуті (в експерименті), що передбачає дослідження стану імунокомпетентних клітин, причому внутрішньоочередно вводять хлорид ртуті у дозі $1/100$ ЛД₅₀ на фізіологічному розчині 5 разів на тиждень протягом 2 тижнів, визначають площу лімфоїдних клітин, їхні периметр, максимальний та мінімальний діаметри, коефіцієнт форми, коефіцієнт видовженості, еквівалентний діаметр, а також визначають абсолютну (кількість клітин на мм²) та відносну (у відсотках) щільності розподілу клітин кожного класу у різних морфофункціональних компартментах лімфоїдних органів, порівнюють їх співвідношення до контролю і при зміні показників оцінюють імунотоксичну дію ртуті.

UA 100514 U

Корисна модель, що заявляється, належить до медицини, а саме до імунології, токсикології та професійних патології, фармакології та морфології і може бути використаний для визначення наявності імунотоксичної дії сполук ртуті.

Проблема імунотоксичності важких металів за лишається остаточно невирішеною. У той же час актуальність та значимість її велика, оскільки синдроми інтоксикації, що викликаються речовинами, які негативно впливають на органи імунного захисту, входять в десятку основних видів професійної патології [1, 2].

В основі токсичного процесу, що розвивається, може лежати пошкодження будь-якого структурного елемента органів імунного захисту шляхом модифікації пластичного, енергетичного обмінів, порушення генерації та реакцій імунної відповіді.

В даний час механізми імунотоксичності більшості токсикантів невідомі. Тому токсичні ефекти токсикантів в механізмах взаємодії структур органів імунного захисту потребують уваги клініцистів, імунологів, токсикологів та морфологів.

У літературі описані різні способи моделювання токсичності ртуті, однак вони мають ряд недоліків і не завжди відповідають вимогам до експериментальних моделей імунотоксичності (3, 4).

Відомий спосіб визначення впливу ртуті, суть якого полягає у розробці визначення її токсичної дії [5].

Недоліком цього способу є: обмежений спектр токсичної дії солі ртуті, а саме впливу її на нервову тканину спинного мозку та спинномозкових ганглії, не враховуючи вплив на інші системи організму, які включаються антитоксичну відповідь організму.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб моделювання імунотоксичних ефектів шляхом дослідження крові [6], при якому вивчено вплив хімічних речовин на функціональний стан імунокомпетентних клітин. Недоліком цього способу є переважне застосування показників крові, що не відображає патоморфологічної картини органів імунного захисту.

Задача, яку вирішує спосіб, що заявляється, полягає в підвищенні точності оцінки імунотоксичної дії ртуті за умов субхронічної інтоксикації.

Поставлена задача досягається тим, що у відомому способі, який передбачає дослідження стану імунокомпетентних клітин, згідно корисної моделі внутрішньоочередно вводять хлорид ртуті у дозі $1/100$ ЛД₅₀ на фізіологічному розчині 5 разів на тиждень протягом 2 тижнів, визначають площу лімфоїдних клітин, їхні периметр, максимальний та мінімальний діаметри, коефіцієнт форми, коефіцієнт видовженості, еквівалентний діаметр, а також визначення абсолютної (кількість клітин на мм²) та відносної (у відсотках) щільності розподілу клітин кожного класу у різних морфофункціональних компартментах лімфоїдних органів, порівнюють їх з контролем і при зміні показників оцінюють імунотоксичну дію ртуті.

Основною відмінністю способу, що заявляється, є те, що додатково вводять хлорид ртуті, а потім визначають імунокомпетентні клітини у різних морфофункціональних компартментах лімфоїдних органів. Запропонований засіб виконується наступним чином.

Дослідження проведено на 20 білих статевозрілих щурах обох статей лінії Вістар масою 160-250 гр., утримання та досліди проведені згідно рекомендації ДФЦ. Тварин поділили на 2 групи. Перша група - контроль, друга група отримувала внутрішньоочередно хлорид ртуті на фізіологічному розчині в дозі $1/100$ ЛД₅₀ внутрішньоочередним шляхом у кількості 10 введень або протягом 2 тижнів. Через 2 тижні після закінчення моделювання мікромеркуріалізму забирались, з дотриманням правил біоетики дослідження тимусу, селезінки та підколінних лімфатичних вузлів. Отримані зрізи фіксували в розчині Ліллі з наступною заливкою об'єктів у парафін. Гістологічні зрізи в кількості 30 від кожної піддослідної тварини виготовлялись на мікротомі HM - 360 фірми "Zeiss". Зрізи забарвлювали гематоксиліном і еозином, азур II-еозином, ставили реакцію за Браше. В сканувальному режимі вводили всі поля зору загальноприйнятих морфофункціональних компартментів органів: у тимусі - субкапсулярну, глибоку кіркову зону та мозкову речовину, у селезінці - лімфоїдні вузлики та маргінальну зону білої пульпи, у лімфатичному вузлі - кіркову та мозкову речовину.

Визначення клітинного вмісту паренхіми органів імунного захисту проводили за допомогою комп'ютерної системи цифрового аналізу зображень VIDAS-386. Зображення, отримане в мікроскопі AXIOSCOP, за допомогою високочутливої відеокамери COHU-4722 (COHU Inc, США) вводили в комп'ютерну систему цифрового аналізу зображень VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина) та оцифровували за денситометричною шкалою з 256 градаціями сірого кольору. В сканувальному режимі вводили всі поля зору загальноприйнятих морфофункціональних компартментів органів: у тимусі - субкапсулярну, глибоку кіркову зону та мозкову речовину, у

селезінці - лімфоїдні вузлики та маргінальну зону білої пульпи, у лімфатичному вузлі - кіркову та мозкову речовину.

Статистична обробка результатів проведена з застосуванням методів варіаційної статистики з критеріями Манна-Вітні-Вілкоксона та Ст'юдента. Вивчали наступні показники площу лімфоїдних клітин, їхні периметр, максимальний та мінімальний діаметри, коефіцієнт форми, коефіцієнт видовженості, еквівалентний діаметр. Денситометричними характеристиками лімфоїдних клітин були питома та абсолютна оптичні щільності. Морфометричний аналіз включав також визначення абсолютної (кількість клітин на мм^2) та відносної (у відсотках) щільності розподілу клітин кожного класу у різних морфофункціональних компартментах органів імунного захисту.

Аналіз результатів морфологічного дослідження показав негативний вплив сулеми на органи імунного захисту, особливо - на лімфатичні вузли. Зменшується відносна площа компартментів, де відбувається проліферація та дозрівання лімфоцитів. Хоча зростання відносної маси тимуса і селезінки може говорити про певні компенсаторні процеси. Про це свідчать і дані морфометрії лімфоїдних елементів.

У субкапсулярній зоні підвищувалася щільність усіх форм лімфоїдних елементів, особливо - малих лімфоцитів. Це пояснюється збільшенням проліферативної активності. Щільність малих лімфоцитів з ознаками деструкції збільшувалася, але відсоток їхнього вмісту суттєво не змінювався. Це говорить про те, що інтенсивність процесів дегенерації лишається на рівні контролю. У внутрішній кірковій речовині на тлі зменшення загальної щільності лімфоїдних елементів збільшувалася кількість молодих форм. Скоріше за все, за рахунок їхнього пришвидшеного надходження з субкапсулярної зони. Зменшення кількості зрілих форм клітин можна пояснити їхньою посиленою міграцією в мозкову речовину та за межі органа. Збільшення вмісту великих і середніх лімфоцитів з ознаками деструкції пов'язане з токсичним впливом хлориду ртуті. Тому зменшення кількості середніх лімфоцитів, крім міграції, може бути обумовлено посиленням процесів їхньої дегенерації. У мозковій речовині зменшення вмісту лімфобластів пояснюється їхньою посиленою дегенерацією. Зміни ж кількості великих, середніх і малих лімфоцитів, вірогідно, пов'язані зі зміною процесів проліферації, диференціювання та міграції в умовах інтоксикації хлоридом ртуті.

У селезінці за умов субхронічної інтоксикації хлоридом ртуті посилювалися процеси проліферації - збільшилася щільність клітинних елементів як у лімфоїдних вузликах, так і у маргінальній зоні, що можна розцінити як прояв компенсаторно-адаптаційних процесів.

Таким чином, спосіб, що заявляється, дозволяє оцінити вплив імуноотоксичної дії ртуті, оцінити взаємодію між розподілом клітин кожного класу у різних морфофункціональних компартментах органів імунного захисту, що можна розцінити як прояв складних процесів проліферації, міграції та рециркуляції

На базі кафедри гістології та ембріології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця була проведена оцінка імуноотоксичної дії ртуті на білих статевозрілих щурах обох статей лінії Вістар масою 160-250 гр. Отримані позитивні результати при використанні даного способу дозволяють рекомендувати його для широкого застосування в практичній медицині.

Джерела інформації:

1. Landrigan P. J. Environmental Health / Landrigan P.J., Graham D.G., Thomas R.D. // Issues Environ Health Perspect.-1994. - S. 2, №102. - P. 117-120.

2. Druet P. Metal-induced autoimmunity // Human and Experimental Toxicology.-1995. - Vol. 14, № 1. - P. 120-121.

3. Касохов А.Б. Нарушение иммунобиологической реактивности в условиях загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами // Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 1999. - № 5. - С. 37-41.

4. Дмитруха Н.М. Експериментальне дослідження дії важких металів - свинцю та кадмію на неспецифічну резистентність організму білих щурів. // Тези доп. 2 з'їзду Токсикологів України - К., 2004. - С. 78.

5. Стежка В.А., Дмитруха Н.Н., Покровская Т.Н. и др. Сравнительная оценка иммуноотоксического действия свинца на нейтрофильные лейкоциты и лимфоциты периферической крови крыс в опытах in vivo и in vitro // Сб. Проблемы медицины труда, Киев, 1998. 9 С. 149-159.

6. Патент на корисну модель № 38292 UA, МПК (2006) G01N 33/68 Спосіб оцінки нейротоксичної дії ртуті (в експериментальному дослідженні) / Сокуренько Л.М., заявник та патентовласник Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця. - № u200811939; заявл. 08.10.08; опубл. 25.12.08, Бюл. промислова власність. - № 24. Кн. 1. - С. 5. 88.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб оцінки імунотоксичної дії ртуті (в експерименті), що передбачає дослідження стану імунокомпетентних клітин, який **відрізняється** тим, що внутрішньоочередно вводять хлорид ртуті у дозі $1/100$ ЛД₅₀ на фізіологічному розчині 5 разів на тиждень протягом 2 тижнів, визначають площу лімфоїдних клітин, їхні периметр, максимальний та мінімальний діаметри, коефіцієнт форми, коефіцієнт видовженості, еквівалентний діаметр, а також визначають абсолютну (кількість клітин на мм²) та відносну (у відсотках) щільності розподілу клітин кожного класу у різних морфофункціональних компартментах лімфоїдних органів, порівнюють їх співвідношення до контролю і при зміні показників оцінюють імунотоксичну дію ртуті.

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

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

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