



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **101112** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
A61B 5/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2015 02369	(72) Винахідник(и): Остапенко Ольга Валеріївна (UA), Чайковський Юрій Богданович (UA)
(22) Дата подання заявки: 17.03.2015	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, бул. Шевченка, 13, м. Київ-4, 01601 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.08.2015	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.08.2015, Бюл.№ 16	

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ПАТОЛОГІЧНИХ ЗМІН ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ПРИ ВРОДЖЕНОМУ ГІПОТИРЕОЗІ

(57) Реферат:

Спосіб діагностики патологічних змін підшлункової залози при вродженому гіпотиреозі передбачає проведення лектикогістохімічних досліджень. Визначають вуглеводну специфічність екзокринної та ендокринної частин підшлункової залози, апікальної та базальної частин ациноцитів, кровоносних капілярів (WGA - β -NAcDGlc, NacNeu; PNA - β -D-Gal; LCA - α -D-Man). Виявляють експонування вуглеводних детермінант β -NAcDGlc, NacNeu, β -D-Gal, α -D-Man у гіпотиреоїдних тварин у віковому аспекті. Порівнюють з контролем і при зміні показників діагностують патологічні зміни підшлункової залози при вродженому гіпотиреозі.

UA 101112 U

Корисна модель що заявляється, належить до медицини, а саме до фармакотерапії захворювань травної системи, і може використовуватись для ранньої діагностики патологічних змін підшлункової залози при вродженому гіпотиреозі.

Одним з інформативних методів, що дозволяють проводити ідентифікацію глікокон'югатів клітин і тканин, є лектиногістохімія. Лектини - це білки рослинного та тваринного походження, які зв'язують специфічні вуглеводні групи без зміни їх ковалентної структури. Лектини та їх рецептори забезпечують міжклітинні, клітинно-матриксні взаємодії, регулюють процеси проліферації, диференціювання та апоптозу клітин. Визначаючи рівень експресії рецепторів до ендогенних лектинів, можна судити про функціональний стан клітини і органу в цілому, тому що глікокон'югати є основними компонентами зовнішньої поверхні живої клітини. Відомо, що в процесі функціонування органу синтез і накопичення різних глікокон'югатів у клітинних і неклітинних структурах тканин змінюється. Порушення глікозилювання клітинної мембрани впливає на склад і характер розподілу рецепторів до лектинів [1, 2, 3].

Дані спеціальної літератури з питань розподілу рецепторів до лектинів в підшлунковій залозі (у постнатальному періоді) у нормі і при патологічних змінах відсутні. Метою роботи є дослідження розподілу рецепторів лектинів у підшлунковій залозі щурів з вродженим гіпотиреозом.

Найбільш близьким за технічним вирішенням до способу, що заявляється, є спосіб діагностики за допомогою фізіологічних методів, який виступає як прототип (2). Дослідження за допомогою біохімічних показників проводиться на пізніх етапах захворювання.

Однак цей засіб має недоліки: застосовується лише при наявності явних ознак патологічних змін, на початкових етапах захворювання мала чутливість.

Задача корисної моделі, що заявляється, полягає в розробці способу, який передбачає застосування лектиногістохімічного методу, що дозволить провести діагностику вродженого гіпотиреозу і розпочати фармакотерапію даного стану.

Технічний результат, який досягається, полягає у покращенні діагностики змін підшлункової залози при вродженому гіпотиреозі.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі, який передбачає проведення лектиногістохімічного дослідження, згідно з корисною моделлю, визначають вуглеводну специфічність екзокринної та ендокринної частин підшлункової залози, апікальної та базальної частин ациноцитів, кровоносних капілярів (WGA - β -NacDGlc, NacNeu; PNA - β -D-Gal; LCA- α -D-Man); виявляють експонування вуглеводних детермінант β -NacDGlc, NacNeu, β -D-Gal, α -D-Man у гіпотиреодних тварин у віковому аспекті, порівнюють з контролем і при зміні показників діагностують патологічні зміни підшлункової залози при вродженому гіпотиреозі.

Матеріалом для дослідження були фрагменти підшлункової залози щурів лінії Вістар. Тварини з вродженим гіпотиреозом (ВГТ) були розподілені на чотири вікові групи (7 діб; 1,5 місяця; 3-4 місяці; 1 рік). Вроджений гіпотиреоз моделювали шляхом пригнічення функції щитоподібної залози самок тиреостатиком - мерказолілом (20 мг/кг). Після народження тварини отримували препарат з молоком матері, а надалі - при самостійному харчуванні.

На серійних парафінових зрізах проводили гістохімічне визначення рецепторів до лектинів за методикою А.Д. Луцика [4]. Обробку зрізів проводили за допомогою кон'югату лектину зав'язей пшениці (WGA), арахісу (PNA), сочевиці (LCA). Для візуалізації результатів реакції застосовували діамінобензидин. Оцінювання вуглеводних компонентів глікопротеїнових рецепторів проводили за наявності коричневого (чорного) осаду у місцях зв'язування лектину напівкількісним методом з використанням лектинів різної вуглеводної специфічності. Інтенсивність реакції оцінювалася в балах: (0) - відсутність реакції, (+) - слабка реакція, (++) - помірна реакція, (+++) - сильна реакція.

Утримання і догляд за експериментальними тваринами здійснювався з дотриманням принципів "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей" [5].

Підбір панелі лектинів був здійснений з урахуванням їх відмінностей в вуглеводній специфічності, з метою більш точної і повної ідентифікації вуглеводних компонентів глікопротеїнових рецепторів. Характеристика специфічності використаних у дослідженні лектинів вказана в таблиці.

Таблиця

Характеристика вуглеводної специфічності лектинів, застосованих у дослідженні

Назва лектину	Вуглеводна специфічність	
Лектин зав'язей пшениці (WGA)	N-ацетилнейрамінова (сіалова) кислота та меншою мірою N-ацетил-D-глюкозамін	β -NAcDGlc, NacNeu
Лектин арахісу (PNA)	β -D-галактоза	β -D-Gal
Лектин сочевиці (LCA)	α -D-маноза	α -D-Man

WGA - лектин зав'язей пшениці

- 5 На ранніх термінах вродженого гіпотиреозу (7 діб) зазначається експресія рецепторів лектину зародків пшениці (WGA) у всіх структурних компонентах підшлункової залози. Однак основна маса глікорецепторів накопичується в базальній частині секреторних клітин, в апікальній частині і ендотелії їх залишається невелика кількість. У тварин з вродженим гіпотиреозом у віці 1,5 місяця кількість глікополімерів з вуглеводної детермінантою сіалової кислоти і N-ацетил-D-глюкозаміну в структурах підшлункової залози зменшується.
- 10 Спостерігається слабка лектин-рецепторна реакція як в апікальній, так і базальній частинах ациноцитів, дуже слабка реакція в клітинах острівців Лангергансу, а в ендотелії реакція відсутня. З віком відзначається збільшення лектин-позитивних структур. Структурні компоненти підшлункової залози тварин 3-ї групи (3-4 м ВГТ) характеризуються різним ступенем спорідненості до лектинів зародків пшениці. Найбільша спорідненість відзначається в базальній частині секреторних клітин, у порівнянні з апікальною частиною. У той же час лектин WGA не взаємодіє з ендотелієм капілярів.
- 15

- На більш пізніх термінах експерименту (1 рік) WGA-позитивних біополімерів у вивчених структурах підшлункової залози менше, ніж на ранніх термінах (7 діб). Ациноцити містять різну кількість лектин-позитивних структур: апікальна частина секреторних клітин містить малу кількість рецепторів, сліди бензидинової мітки присутні в острівцях Лангергансу, в той час як базальна частина секреторних клітин досить багата біополімерами з вуглеводної детермінантою сіалової кислоти і N-ацетил-D-глюкозаміну.
- 20

PNA - лектин арахісу

- 25 На тлі вродженого гіпотиреозу зміни рецепторів лектину PNA були більш вираженими у порівнянні з перерозподілом N-ацетил-D-глюкозамінів і сіалової кислоти. Було відмічено наявність деяких відмінностей у зв'язуванні лектину PNA з ендотелієм, апікальною та бальною частинами ациноцитів, а також острівців Лангергансу.

- У гіпотиреоїдних тварин (7 діб ВГТ) експонування вуглеводних детермінант D-галактози (рецептори лектину PNA) відзначається лише в секреторних екзокриноцитах. При наростанні терміну патологічного впливу (1,5 м ВГТ) лектин арахісу (PNA) виявляє високу спорідненість до екзокринних секреторних клітин, а також пов'язується з ендотелієм і клітинами ендокриноцитами. У статевозрілих тварин (3-4 м ВГТ) найбільшу кількість рецепторів до лектину арахісу (PNA) визначається в базальній частині екзокринних секреторних клітин, у той час як ендотелій капілярів і ендокриноцити були позбавлені β -D-галактози (PNA), що може вказувати на відсутність даного глікополімеру або його маскування іншими глікополімерами. Розвиток пошкоджень підшлункової залози, викликаний вродженим гіпотиреозом (1 рік ВГТ), супроводжується аналогічним з попереднім терміном розташуванням лектинів у структурах органу. Так в складі органу виявляються вуглеводні детермінанти галактозоспецифічного лектину арахісу в екзокринній частині підшлункової залози. Ендотелій капілярів не змінює свій вуглеводний профіль.
- 30
- 35
- 40

LCA - лектин сочевиці

- Екзокриноцити на всіх досліджуваних термінах (7 діб, 1,5 місяця, 3-4 місяці, 1 рік) містять рецептори до LCA, але в різній кількості, про що свідчить різний ступінь інтенсивності фарбування. На всіх термінах експерименту характерним є гетерогенне фарбування екзокринної частини підшлункової залози, в базальній частині сконцентровано максимальну кількість глікокон'югатів, що взаємодіють з LCA, в той час як апікальна частина містить меншу кількість рецепторів α -D-манози.
- 45

- Рецептори до LCA не виявляються в ендотелії капілярів у тварин у віці 7 діб, 1,5 місяця і 3-4 місяці, а на більш пізніх термінах (1 рік) виявляється слабка реакція на лектин сочевиці.
- 50

Експонування вуглеводних детермінант α -D-манози у гіпотиреоїдних тварин на різних термінах експерименту в ендокринній частині органу має слабку реакцію. Слід зазначити, що

локалізація рецепторів до WGA і рецепторів до LCA мають схожу локалізацію. Схожу селективність WGA і LCA, можливо, пояснити тим, що ці два лектини вступають у взаємодію з вуглеводними залишками у складі корої частини N-гліканів [4].

Найбільша спорідненість до глікокон'югатів лектинів (WGA, PNA, LCA) відзначається в секреторних екзокриноцитах (базальна частина), а найменше в ендотелії капілярів та острівцях Лангергансу.

З лінійки лектинів, які були використані в дослідженні, найбільшою спорідненістю характеризується лектин арахісу (PNA), що може свідчити про гіпотиреоїд-індуковане накопичення вуглеводних детермінант β -D-Gal в екзокринних клітинах підшлункової залози.

На базі кафедри гістології та ембріології та Інституту проблем патології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця був апробований спосіб, що заявляється. Отримані позитивні результати дозволяють рекомендувати його для впровадження в практичну медицину.

Список використаної літератури

1. Антонюк В.О. Лектини та їх сировинні джерела / В.О. Антонюк. - Львів, 2005. - 554 с.
2. Волошин Н.А. Лектины животного и растительного происхождения: роль в процессах морфогенеза / Н.А. Волошин, Е.А. Григорьева / Н.А. Волошин // Журнал АМН України. - 2005. - Т. 11, № 2. - С. 223-237.
3. Leitner M. Lectin binding patterns in normal canine endometrium and in bitches with pyometra and cystic endometrial hyperplasia / M. Leitner, J.E. Aurich, G. Galabova, C. Aurich and I. Walter // Histol Histopathol. - 2003. - V. 18. - P. 787-795.
4. Луцик А.Д. Лектины в гистохимии / А.Д. Луцик, Е.С. Детюк, М.Д. Луцик. - Львов: Вища школа, 1989. - 140 с.
5. European convention for the protection of vertebral animal used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. - Strasbourg, 1986. - 52 p.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб діагностики патологічних змін підшлункової залози при вродженому гіпотиреозі, що передбачає проведення лектикогістохімічних досліджень, який **відрізняється** тим, що визначають вуглеводну специфічність екзокринної та ендокринної частин підшлункової залози, апікальної та базальної частин ациноцитів, кровоносних капілярів (WGA - β -NacDGlc, NacNeu; PNA - β -D-Gal; LCA - α -D-Man); виявляють експонування вуглеводних детермінант β -NacDGlc, NacNeu, β -D-Gal, α -D-Man у гіпотиреоїдних тварин у віковому аспекті, порівнюють з контролем і при зміні показників діагностують патологічні зміни підшлункової залози при вродженому гіпотиреозі.

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

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