



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **107059** (13) **C2**
(51) МПК (2014.01)
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 1/00
G01N 1/30 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2013 15129**
(22) Дата подання заявки: **24.12.2013**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.11.2014**
(41) Публікація відомостей про заявку: **10.04.2014, Бюл.№ 7**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.11.2014, Бюл.№ 21**

(72) Винахідник(и):
Григорова Наталя Володимирівна (UA)
(73) Власник(и):
ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД "ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ" МІНІСТЕРСТВА ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ,
вул. Жуковського, 66, м. Запоріжжя, 69600 (UA)
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
UA 40468 A, 16.07.2001.
UA 62672 A, 15.12.2003.
UA 10851 A, 25.12.96.
DE 19641088 C1, 16.07.1998.
MD 2667 B1, 31.01.2005.
GB 2270562 A, 16.03.1994.
Determination of immune status to measles, rubella, and varicella-zoster viruses among medical students: assessment of historical information/ Murray D.L., Lynch M.A.// Am J Public Health.- 1988.- V.78.- N 7.-P.836-838.
Seasonal reproduction in the mare: possible role of plasma leptin, body weight and immune status/ Ferreira-Dias G1, Claudino F, Carvalho H, Agricola R, Alpoim-Moreira J, Robalo Silva J.// Domest Anim Endocrinol. – 2005. – V.29, N1. – P.203-213.
Le Lumomagneson: marqueur fluorescent de l'os/ Coutellier L.// Experientia.- 1973.- Vol.29.- P.192-193.
Григорова Н.В. Вміст магнію в клітинах тимуса і лімфоцитах крові тварин при різному ступені тяжкості алоксанового діабету/ Н.В.Григорова, М.А.Кузьміна// MODERN DIRECTIONS OF THEORETICAL AND APPLIED RESEARCHES. 18-30 March 2014. Биология – 6. Физиология растений, животных и человека. [Інтерне-публікація] URL: <http://www.sworld.com.ua/konfer34/588.pdf> (Знайдено 17.07.2014).3 арк.

UA 107059 C2

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ІМУННОГО СТАТУСУ

(57) Реферат:

Спосіб дослідження імунного статусу передбачає наступні етапи: на предметному склі, вкритому шаром яєчного білка, готують мазок крові, підсушують його на повітрі, промивають дистильованою водою, забарвлюють спиртовим розчином люмомагнезону, обробляють розчином NaOH, підсушують на повітрі та досліджують під люмінесцентним мікроскопом, вимірюють в умовних одиницях інтенсивність рожевого забарвлення цитоплазми лімфоцитів і за цим показником визначають імунний статус.

Спосіб належить до галузі біології та медицини, а саме до клінічних лабораторних методів дослідження імунного статусу та стосується способів цитохімічного визначення магнію в лімфоцитах крові.

Відомий спосіб визначення імунного статусу (Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля; пер. с нем. - М.: Медицина, 1987. - 338 с.; С. 269-272), що включає забір 10 мл венозної крові, по 5 мл у кожну з центрифужних пробірок з гепарином та без нього для отримання плазми та сироватки крові відповідно, визначення кількості лейкоцитів у камері Горяєва, виділення лімфоцитів на градієнт верографін-фікола, постановку реакції розеткоутворення з еритроцитами барана, підготовку мазків і їх мікроскопічне дослідження, підрахунок кількості розеткоутворюючих лімфоцитів під повітряною імерсією і визначення імунного статусу за кількістю розеток.

Недоліком цього способу є необхідність значного об'єму крові для аналізу, його складність і трудомісткість, неможливість масового тестування людей.

Ознаками, спільними з рішенням, що заявляється, є забір крові, приготування мазка, його мікроскопічне дослідження та визначення імунного статусу за станом лімфоцитів крові.

Відомий інший спосіб визначення імунного статусу (Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля; пер. с нем. - М.: Мир, 1979. - 518 с.; С. 487-497), що включає забір 5 мл венозної крові; постановку спонтанної та стимульованої реакції бластної трансформації лімфоцитів (РБТЛ), для чого культуральною сумішшю розводять лімфоцити, відмиті фосфатно-сольовим буфером, виділяють лімфоцити на градієнт верографін-фікола, підраховують кількість моноклеарних клітин у камері Горяєва для приготування суспензії з концентрацією 0,1-1,0 млн./мл, культуру клітин розподіляють на 3 зразки (контрольний і 2 дослідних), до дослідних зразків додають мітогени (фітогемагглютинін, конканавалін) та витримують зразки в термостаті протягом 72 год. при 37 °С; центрифугування зразків; вилучення з них супернатанту; ресуспендування осадів та готування мазків; підсушування їх на повітрі; промивання дистильованою водою; забарвлення мазків барвником Гімза; диференціювання розчином підкисленої соляної кислоти; промивання у 3 порціях дистильованої води; підсушування на повітрі; нанесення на кожний мазок по краплині імерсійної олії; мікроскопічне дослідження мазків; визначення відсотку бласттрансформованих лімфоцитів у контрольному та дослідних зразках, порівняння показників і визначення за отриманими даними імунного статусу.

Недоліком цього способу є необхідність значного об'єму досліджуваної крові, складність, трудомісткість, неможливість масового тестування людей.

Ознаками, спільними з рішенням, що заявляється, є забір крові, приготування мазка, підсушування його на повітрі, промивання дистильованою водою, забарвлення, диференціювання, підсушування на повітрі, нанесення на мазок краплі імерсійної олії, мікроскопічне дослідження мазка та визначення імунного статусу за станом лімфоцитів крові.

В основу винаходу поставлено задачу розробити спосіб визначення імунного статусу, який шляхом використання для аналізу капілярної або венозної крові та цитохімічного визначення магнію в лімфоцитах, дозволяє зменшити об'єм крові, необхідної для дослідження, знизити травматичність способу і вартість обстеження, підвищити його експресність, отримати стабільні та добре порівняльні результати, застосовувати його для масового тестування.

Суттєвими ознаками способу є: підготовка предметного скла (нанесення на нього шару яєчного білка), забір капілярної або венозної крові, приготування мазка, підсушування його на повітрі, промивання дистильованою водою, зафарбовування 0,05 % спиртовим розчином люмомагнезону, диференціювання забарвленого мазка 0,1 н розчином NaOH, підсушування на повітрі, нанесення на мазок краплі імерсійної олії і дослідження його під люмінесцентним мікроскопом (світлофільтри ФС-1 і ЖС-18), вимірювання інтенсивності рожевого забарвлення цитоплазми лімфоцитів за допомогою мікрофлуориметра в умовних одиницях (ум. од.), визначення за цим показником імунного статусу.

Відмінними від прототипу ознаками є: підготовка предметного скла (нанесення на нього шару яєчного білка); використання для дослідження капілярної або венозної крові; зафарбовування мазка 0,05 % спиртовим розчином люмомагнезону, диференціювання його 0,1 н розчином NaOH, проведення мікроскопічного дослідження за допомогою люмінесцентного мікроскопа, вимірювання інтенсивності флуоресценції цитоплазми лімфоцитів та визначення за цим показником імунного статусу.

Відомо, що лімфоцити крові беруть участь у фагоцитарних реакціях в організмі та є складовою ланки клітинного імунітету, а іони магнію задіяні практично у всіх обмінних процесах у клітинах, зміцнюють ліпопротеїнові мембрани, підвищують активність лімфоцитів та беруть участь в імунних реакціях в організмі.

Запропоноване визначення магнію в лімфоцитах крові за допомогою високоселективної цитохімічної реакції люмомагнезону об'єктивно відображує вміст внутрішньоклітинного магнію і завдяки цьому, враховуючи роль магнію у функціонуванні лімфоцитів, дозволяє визначати імунний статус організму.

Спосіб здійснюють таким чином: на предметне скло наносять скляною паличкою шар яєчного білка та підсушують його; проводять забір капілярної або венозної крові (це дозволяє отримати ідентичні в обох випадках результати та вибирати вид забору крові і тому зменшує травматичність способу); готують мазок; підсушують його на повітрі; промивають дистильованою водою протягом 5 хв., зафарбовують мазок 0,05 % спиртовим розчином люмомагнезону протягом 5-10 хв.; диференціюють забарвлений мазок 0,1 н розчином NaOH протягом 1 хв., підсушують на повітрі, наносять на мазок краплю імерсійної олії і досліджують його під люмінесцентним мікроскопом (світлофільтри ФС-1 і ЖС-18), вимірюють в умовних одиницях (ум. од.) інтенсивність рожевого забарвлення цитоплазми лімфоцитів (утворення координаційного комплексу - хелату люмомагнезону з магнієм) за допомогою мікрофлуориметра і за цим показником визначають імунний статус.

Приклад 1. У практично здорових людей (донорів) проводили забір крові з пальця. Краплю крові наносили на предметне скло, вкрите тонким шаром яєчного білка. Готували мазки, підсушували на повітрі, витримували протягом 5 хв. у дистильованій воді. На мазки наносили 0,05 % спиртовий розчин люмомагнезону, через 5-10 хв. мазок промивали 0,1 н розчином NaOH протягом 1 хв., підсушували на повітрі. Потім на мазки наносили 1 краплю імерсійної олії і розглядали їх під люмінесцентним мікроскопом (світлофільтри ФС-1 і ЖС-18). Цитохімічну реакцію люмомагнезону виявляли за рожевим забарвленням цитоплазми лімфоцитів і за допомогою мікрофлуориметра вимірювали інтенсивність флуоресценції клітин в ум. од.

У практично здорових людей (донорів, $n=20$) інтенсивність флуоресценції лімфоцитів складала $117 \pm 10,0$ ум. од., а їх імунний статус відповідав нормі, що було підтверджено імунологічними методами.

Приклад 2. Мазки крові людей, хворих на хронічний алкоголізм, які перебували на диспансерному обліку в обласному клінічному наркологічному диспансері ($n=20$), обробляли, як зазначено в прикладі 1. Інтенсивність флуоресценції клітин була знижена та дорівнювала $83 \pm 6,7$ ум. од. ($p < 0,001$). Наявність стану імунодефіциту в цієї групи хворих була підтверджена імунологічними методами.

Приклад 3. Мазки крові людей, хворих на цукровий діабет, які перебували на диспансерному обліку в ендокринологічних відділеннях обласної і міських лікарень ($n=20$), обробляли, як зазначено в прикладі 1. Інтенсивність флуоресценції клітин була нижче, ніж у практично здорових людей і складала $75 \pm 5,0$ ум. од. ($p < 0,001$). Наявність стану імунодефіциту в цій групі хворих була підтверджена імунологічними методами.

Приклад 4. Мазки крові людей з ВІЛ-інфекцією, які перебували на диспансерному обліку в обласному центрі СНІД, також обробляли, як у випадку 1. Спостерігалось зниження інтенсивності флуоресценції клітин, яка дорівнювала $67 \pm 4,2$ ум. од. ($p < 0,001$). Наявність стану імунодефіциту в цій групі хворих була підтверджена імунологічними методами.

Приклад 5. Для підтвердження змін імунного статусу було також проведено дослідження впливу гострого стресу на здорових осіб (донорів), яких було розподілено на дві групи, по 10 осіб у кожній. Перша група зазнавала впливу одноразового фізичного навантаження за пробами Кевдіна та Котова-Дьоміна. Друга група зазнавала впливу гострої гіподинамії, тобто вела малорухомий спосіб життя протягом 10 год. У першому випадку в порівнянні з нормою спостерігалось збільшення інтенсивності флуоресценції клітин, яка дорівнювала $158 \pm 14,2$ ум. од. ($p < 0,05$), у другому випадку вона становила $150 \pm 11,7$ ум. од. ($p < 0,05$), що відображувало функціональні зміни в організмі на фоні гострого стресу. У цих групах обстежених осіб після усунення стресогенних чинників показники імунного статусу через певний час поверталися до норми.

Заявлений спосіб може використовуватись як діагностичний тест на імунодефіцит.

Таким чином, спосіб, що заявляється, дозволяє виявляти стан передхвороби та доклінічні форми імунодефіциту, прогнозувати наявність аутоімунних захворювань, що відкриває можливості для їх ранньої профілактики та контролю ефективності терапії. Спосіб може використовуватися для масового обстеження на профілактичних оглядах.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб визначення імунного статусу, що включає забір крові, приготування мазка, підсушування його на повітрі, промивання дистильованою водою, забарвлення, диференціювання,

- 5 підсушування на повітрі, нанесення на мазок краплі імерсійної олії, мікроскопічне дослідження та визначення імунного статусу за станом лімфоцитів крові, який **відрізняється** тим, що використовують капілярну або венозну кров, яку наносять на предметне скло, попередньо вкрите шаром яєчного білка; забарвлюють мазок спиртовим розчином люмомагнетону, диференціюють його розчином NaOH, а мікроскопічне дослідження проводять за допомогою люмінесцентного мікроскопа, вимірюють інтенсивність флуоресценції цитоплазми лімфоцитів і за цим показником визначають імунний статус.

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

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