



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **71303** (13) **U**  
(51) МПК (2012.01)  
**G01N 21/00**

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: <b>u 2011 15342</b>	(72) Винахідник(и): <b>Колесник Юрій Михайлович (UA), Абрамов Андрій Володимирович (UA), Ганчева Ольга Вікторівна (UA), Іваненко Тарас Васильович (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>26.12.2011</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>10.07.2012</b>	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.07.2012, Бюл.№ 13</b>	(73) Власник(и): <b>ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, пр. Маяковського, 26, м. Запоріжжя, 69035 (UA)</b>

## (54) СПОСІБ КОМПЛЕКСНОЇ ОЦІНКИ АПОПТОЗУ ЕНДОКРИНОЦИТІВ ПАНКРЕАТИЧНИХ ОСТРІВЦІВ

### (57) Реферат:

Спосіб комплексної оцінки апоптозу ендокриноцитів панкреатичних острівців шляхом проведення імуноморфологічного дослідження, виявлення p53- і Bcl-2-імунопозитивних клітин та розрахування відсоткової частини p53- і Bcl-2-імунопозитивних клітин. На паралельних серійних зрізах гістологічного матеріалу підшлункової залози виявляють кількість бета-ендокриноцитів. Визначають відсоток p53- та Bcl-2-імунопозитивних клітин серед інсулінпозитивних ендокриноцитів, розраховують індекс апоптозу (IA) за формулою:  $IA = (N_{p53}/N_{ins} \times 100 \%) / (N_{Bcl}/N_{ins} \times 100 \%)$  і, якщо індекс апоптозу є більше 2, вважають, що апоптотичні процеси активуються, а при зниженні менше 2 - що вони затухають.

UA 71303 U



Корисна модель стосується медицини, а саме нормальної і патологічної фізіології, патологічної анатомії та біохімії, і може бути застосована в клінічній лабораторній діагностиці біоптатів підшлункової залози.

Проблема комплексної оцінки апоптозу ендокриноцитів панкреатичних островців є актуальною для експериментальної та клінічної медицини. Комплексна оцінка апоптозу ендокриноцитів підшлункової залози необхідна не тільки для діагностики таких важких захворювань, як цукровий діабет 1 та 2 типів, інсулінома, метаболічний Х-синдром, але і для визначення ступеня тяжкості захворювання, методу лікування та прогнозування перебігу хвороби. На жаль, на цей час немає достатньо ефективного, доступного, інформативного та універсального методу комплексної оцінки апоптозу ендокриноцитів підшлункової залози. Тому розробка нової методики оцінки апоптозу ендокриноцитів підшлункової залози є актуальним питанням сучасної медицини і викликає необхідність приділити увагу розробці такого способу.

Найбільш близьким за технічною суттю та результатами, що досягаються, є спосіб, який полягає у визначенні ступеня експресії про- (p53) та антиапоптотичних (Bcl-2) протеїнів в тканинах [Капланов К.Д., Писарев В.Б., Корнева Е.П., Орлов В.А., Гайворонская И.В., Гемджян Э.Г., Воробьев И.А. Экспрессия белков p53 и Bcl-2 при лимфогранулематозе, как предиктор эффективности химиотерапии первой линии // Успехи современного естествознания.-2004. - № 3 - С. 71-72]. Для цього проводять імуноморфологічне дослідження експресії протеїнів p53 та Bcl-2 діагностичними клітинами при лімфогранулематозі в групах хворих із різною відповіддю на схеми хіміотерапії першої лінії.

Прототип та спосіб, що пропонується, мають такі спільні суттєві ознаки:

- застосування імуноморфологічного методу;
- визначення p53-імунопозитивних клітин;
- визначення Bcl-2-імунопозитивних клітин;
- розрахування відсоткової частини p53- та Bcl-2-імунопозитивних клітин.

Але спосіб-прототип є недостатньо ефективним, тому що відсутня специфічна ідентифікація клітин, в яких визначають маркери p53 та Bcl-2, розраховується не коефіцієнт, а тільки відсоток p53- та Bcl-2-імунопозитивних клітин.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу комплексної оцінки апоптозу ендокриноцитів панкреатичних островців шляхом розрахування індексу апоптозу (IA) серед специфічно ідентифікованих бета-клітин підшлункової залози за відсотковою чисельністю серед них p53 та Bcl-2-імунопозитивних клітин, що забезпечить підвищення чутливості, якості визначення апоптозу, розширення діапазону досліджуваних об'єктів та кількісної оцінки IA на одиницю площі гістологічного матеріалу.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі, який включає імуноморфологічне дослідження p53 й Bcl-2-імунопозитивних клітин та розрахування відсоткової частини p53- і Bcl-2-імунопозитивних клітин, новим є те, що на паралельних серійних зрізах гістологічного матеріалу підшлункової залози виявляють кількість бета-ендокриноцитів, визначають відсоток p53- та Bcl-2-імунопозитивних клітин серед інсулін-позитивних ендокриноцитів й розраховують індекс апоптозу (IA) за формулою:  $IA = (N_{p53}/N_{ins} \times 100 \%) / (N_{Bcl-2}/N_{ins} \times 100 \%)$ , де  $N_{p53}$  - чисельність p53-імунореактивних ендокриноцитів;  $N_{Bcl-2}$  - чисельність Bcl-2-імунореактивних ендокриноцитів;  $N_{ins}$  - чисельність інсулін-імунопозитивних ендокриноцитів. В нормі у експериментальних тварин IA становить 2, при його підвищенні більше 2 слід казати про перевагу апоптотичних процесів, а при зниженні менше 2 - про затухання процесу апоптозу.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються, та технічним результатом полягає у такому:

- паралельна специфічна ідентифікація інсулін синтезуючих клітин в гістологічних зрізах підшлункової залози дозволяє чітко ідентифікувати p53 та Bcl-2-імунопозитивні клітини;
- розрахування IA здійснюється на одиницю площі тканини та кількість бета-клітин панкреатичних островців;
- виключається врахування не ендокринних клітин, які теж можуть експресувати протеїни p53 та Bcl-2;
- IA визначається тільки в клітинах, які двічі імунопозитивні, а саме інсулін-p53 та інсулін-Bcl-2;
- розрахування IA дозволяє отримати цілісну оцінку репаративних процесів в підшлунковій залозі при запальовальній або аутоімунній деструкції.

Спосіб здійснюють таким чином:

Негайно після одномоментної декапітації тварин під наркозом (етамінал натрію 40 мг/кг внутрішньочеревинно) підшлункову залозу витягали й розміщували у фіксатор Буену на 20 год. при кімнатній температурі.

Після 2-годинного відмивання пікринової кислоти в проточній холодній воді підшлункову залозу проводили у висхідних концентраціях етанолу від 50 % до 100 %, розчинах етанол/ксилол, ксилол, ксилол/ парапласт (MkCormick, США) (T=+37 °C), на 1 год. поміщали в рідкий парапласт (MkCormick, США) (T=+56 °C) і потім розміщували в парапластові блоки. Для гістологічного дослідження з біологічного матеріалу підшлункової залози на ротаційному мікромомі MICROM HR-325 (Microm, Німеччина) виготовляли серійні 5 мкм зрізи.

Після 10-денної інкубації зрізів у термостаті при (T=+37 °C) їх депарафінували в ксилолі, проводили регідратацію в спадних концентраціях етанолу (96 %, 90 %, 70 %, 50 %) і тричі по 10 хв відмивали в 0,1 М фосфатному буфері (р 7.2).

Регідровані зрізи підшлункової залози інкубували із первинними мишачими антитілами Monoclonal Anti Bcl-2, (SIGMA, USA) (для визначення антиапоптотичної активності) та Anti-Rabbit IgG (SIGMA, USA) для визначення проапоптотичної активності Anti p53 rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, USA) в розведенні 1:1000 в 0,1 М фосфатному буфері (pH 7.2) протягом 15 годин при T=+4 °C. Після дворазового по 10 хв відмивання надлишку первинних антитіл в 0,1 М у фосфатному буфері, зрізи для виявлення p53- та Bcl-2-позитивних клітин інкубували 60 хв (T=+37 °C) із вторинними мишачими антитілами - Anti-Mouse Ig (SIGMA, USA), у розведенні 1:64 в 0,1 М фосфатному буфері (pH 7.2), а зрізи для виявлення інсулінпозитивних клітин - інкубували 60 хвилин (T=+37 °C) із вторинними козячими антитілами, кон'югованими із FITC (Peninsula Laboratories Inc., USA), у розведенні 1:100 в 0,1 М фосфатному буфері (pH 7.2). По закінченню інкубації зрізи промивали 0,1 М фосфатним буфером два рази по 10 хв і розміщували в суміш гліцерину й фосфатного буфера (9:1) для наступної флуоресцентної мікроскопії.

Зображення, одержуване на мікроскопі AXIOSKOP (Zeiss, Німеччина) із широкоапертурним об'єктивом AxioFluar 40x/1.30 (Zeiss, Німеччина) за допомогою високоемісійного світлофільтра 38HE (Zeiss, Німеччина) через високочутливу відеокамеру COHU 4922 (COHU Inc., США) вводилося в комп'ютерну систему цифрового аналізу зображення VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина). При цьому виключався ефект "вигорання" препарату під впливом ультрафіолетового опромінення. Вводили й враховували тільки ті ділянки підшлункової залози, які містили острівці, не дивлячись на наявність або відсутність флуоресціюючих клітин.

На серійних зрізах підшлункової залози підраховували кількість p-53, Bcl-2-позитивних клітин та інсулінпозитивних ендокриноцитів.

Надалі обчислювали індекс апоптозу (IA) ендокриноцитів підшлункової залози за формулою:

$$IA = (N_{p53}/N_{ins} \times 100 \%) / (N_{Bcl-2}/N_{ins} \times 100 \%),$$

де  $N_{p53}$  - чисельність p53-імунореактивних ендокриноцитів;

$N_{Bcl-2}$  - чисельність Bcl-2-імунореактивних ендокриноцитів;

$N_{ins}$  - чисельність інсулін-імунопозитивних ендокриноцитів.

Якщо індекс апоптозу (IA) був вищим за 2, то вважали, що переважають процеси апоптозу, а при зниженні менше 2 - що вони затухають.

Приклад

Для визначення індексу апоптозу при експериментальному цукровому діабеті щурам самцям лінії Вістар в кількості 15 тварин одноразово, внутрішньочеревинно вводили стрептозотин в дозі 45 мг/кг ваги тварини розведеного ex tempore в 1 мл 0,1 М цитратного буферу pH 4,5. На 28 день протікання патологічного процесу тварин декапітували під етаміналовим наркозом та проводили виділення біологічного матеріалу підшлункової залози за віщеозначеною методикою. Результати експерименту приведено у таблиці.

Таблиця

Експериментальна група	$N_{ins}$ чисельність інсулін-імунопозитивних ендокриноцитів	$N_{Bcl-2}$ Чисельність Bcl-2-імунореактивних ендокриноцитів	$N_{p53}$ Чисельність p53-імунореактивних ендокриноцитів	Індекс апоптозу IA
контроль	52±4	6+1	12±2	2
експериментальний цукровий діабет	12±1	1+0,1	3±0,5	4,5

Як показано в таблиці, розвиток аутоімунної деструкції при цукровому діабеті призводить не тільки до зниження кількості інсуліноцитів внаслідок їх загибелі, спостерігається зниження

проліферативної активності та активація апоптозу ендокриноцитів із суттєвим збільшенням індексу апоптозу (IA) більше 4.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб комплексної оцінки апоптозу ендокриноцитів панкреатичних ostrivciv шляхом проведення імуноморфологічного дослідження, виявлення p53- і Bcl-2-імунопозитивних клітин та розрахування відсоткової частини p53- і Bcl-2-імунопозитивних клітин, який **відрізняється**
- 10 тим, що на паралельних серійних зрізах гістологічного матеріалу підшлункової залози виявляють кількість бета-ендокриноцитів, визначають відсоток p53- та Bcl-2-імунопозитивних клітин серед інсулінпозитивних ендокриноцитів, розраховують індекс апоптозу (IA) за формулою:  $IA = (N_{p53}/N_{ins} \times 100 \%) / (N_{Bcl-2}/N_{ins} \times 100 \%)$ , де  $N_{p53}$  - чисельність p53-імунореактивних ендокриноцитів;  $N_{Bcl-2}$  - чисельність Bcl-2-імунореактивних ендокриноцитів;  $N_{ins}$  - чисельність інсулін-імунопозитивних ендокриноцитів, і, якщо індекс апоптозу є більше 2, вважають, що
- 15 апоптотичні процеси активуються, а при зниженні менше 2 - що вони затухають.

---

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

---

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