



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **71305**

(13) **U**

(51) МПК

**G01N 21/64** (2006.01)

**G01N 33/48** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

(21) Номер заявки: **u 2011 15346**

(22) Дата подання заявки: **26.12.2011**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **10.07.2012**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **10.07.2012, Бюл.№ 13**

(72) Винахідник(и):

**Колесник Юрій Михайлович (UA),  
Абрамов Андрій Володимирович (UA),  
Ганчева Ольга Вікторівна (UA),  
Іваненко Тарас Васильович (UA)**

(73) Власник(и):

**ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ  
УНІВЕРСИТЕТ,  
пр. Маяковського, 26, м. Запоріжжя, 69035  
(UA)**

**(54) СПОСІБ КОМПЛЕКСНОЇ ОЦІНКИ ПРОЛІФЕРАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ ЕНДОКРИНОЦИТІВ ПАНКРЕАТИЧНИХ ОСТРІВЦІВ**

(57) Реферат:

Спосіб комплексної оцінки проліферативної активності ендокриноцитів панкреатичних острівців шляхом проведення імуногістологічного дослідження включає імунофлуоресцентне дослідження із використанням первинних та вторинних моноклональних антитіл, кон'югованих із FITC, та проведення математичного аналізу. Згідно зі способом, тваринам вводять бромдезоксіуридин, на паралельних серійних зрізах гістологічного матеріалу підшлункової залози виявляють кількість бета-ендокриноцитів та кількість проліферуючих клітин, та визначають коефіцієнт проліферативної активності.

**UA 71305 U**



Корисна модель належить до медицини, а саме нормальної і патологічної фізіології, ендокринології, патологічної анатомії й біохімії, та може бути застосована в клінічній лабораторній діагностиці біопатів підшлункової залози.

Проблема комплексної оцінки проліферативної активності ендокриноцитів панкреатичних  
5 острівців є актуальною для експериментальної та клінічної медицини. Комплексна оцінка проліферативної активності ендокриноцитів підшлункової залози необхідна не тільки для діагностики таких важких захворювань, як цукровий діабет 1 та 2 типів, інсулінома, метаболічний X-синдром, але і для визначення ступеня важкості захворювання, методу лікування та прогнозування протікання хвороби, розробки нових методів лікування захворювань  
10 підшлункової залози та методів запобігання деструкції бета-клітин підшлункової залози. На жаль, на цей час немає достатньо ефективного, доступного, інформативного та універсального методу комплексної оцінки проліферативної активності ендокриноцитів підшлункової залози, який би надавав не тільки якісну оцінку поділу клітин, а й кількісну, із розрахунком питомої чисельності клітин на одиницю площі гістологічного матеріалу. Тому розробка нової методики оцінки проліферативної активності ендокриноцитів підшлункової залози є актуальним питанням  
15 сучасної медицини і викликає необхідність приділити увагу розробці такого способу.

Аналогом є розрахунковий метод визначення мітотичного індексу клітин в тканинах (Рубина К.А. Резидентные клетки-предшественники в сердце и регенерация миокарда / Рубина К.А., Мелехова В.С., Парфенова Е.В. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2007.  
20 Т. 2, № 1. - С. 29-35), який полягає у підрахуванні частки проліферуючих клітин відносно або загального пулу клітин, або клітин відповідного типу (нейтрофіли, лімфобласти та ін.).

Спільними суттєвими ознаками аналога і корисної моделі, що заявляється, є такі:

- математичний розрахунок індексу проліферації;
- використання гістологічних препаратів.

25 Цей спосіб не є достатньо ефективним, тому що відсутня специфічна ідентифікація клітин, є трудомістким, має високий відсоток погрішності, відсутня фіксація проліферації за часом.

Найбільш близьким за технічною суттю та результатами, що досягаються, є спосіб, який полягає у підготуванні парафінових блоків, проведенні імуногістохімічного забарвлення препаратів за допомогою первинних антитіл (Monoclonal anti-PCNA, clone p10, виробництва  
30 Sigma chemical, USA) до ядерного антигену проліферуючих клітин, а також вторинних антитіл (Anti-mouse Jg G (Whole molecule), FITC conjugate, виробництва Sigma chemical, USA). Зображення, отримане на флуоресцентному мікроскопі Axioskop, об'єктив 40x (Zeiss, Німеччина) вводили до системи комп'ютерного аналізу зображення. Розраховувалась кількість проліферуючих клітин, площа ядра клітин, що діляться, кількість та концентрація ядерного антигену проліферуючих клітин (Декларційний патент України на винахід № 63732А. Спосіб визначення проліферативної активності пухлин / Паламарчук І.Д., Колесник Ю.М., Абрамов А.В., Сидоренко О.М., Орловський М.О., Колесник О.П. / 7 Опубл. Промислова власність. - 2004. - № 1.). Найближчий аналог та спосіб, що пропонується, мають такі спільні суттєві ознаки:

- застосування імуногістохімічного методу;
- 40 - застосування моноклональних антитіл;
- застосування вторинних антитіл, кон'югованих із FITC;
- проведення кількісного аналізу.

Але найближчий аналог є недостатньо ефективним, тому що використовується тільки в тканинах із високою мітотичною активністю (епітеліальна, лімфоїдна, пухлинна), відсутня  
45 специфічна ідентифікація проліферуючих клітин.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу комплексної оцінки проліферативної активності ендокриноцитів панкреатичних острівців шляхом визначення проліферуючих клітин за накопиченням бромдезоксіуридину (Brd), який є аналогом урацилу та накопичується в клітинах, що готуються до процесу розподілу, що забезпечить підвищення  
50 чутливості, якості визначення проліферативної активності, розширення діапазону досліджуваних об'єктів та кількісної оцінки проліферуючих клітин на одиницю площі гістологічного матеріалу.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі, який включає імунофлуоресцентне дослідження проліферуючих клітин підшлункової залози, із використанням первинних та  
55 вторинних моноклональних антитіл, кон'югованих із FITC та проведення кількісного аналізу, новим є те, що експериментальним тваринам протягом 7 днів вводять бромдезоксіуридин (Brd), на паралельних серійних зрізах гістологічного матеріалу підшлункової залози виявляють кількість бета-ендокриноцитів та кількість проліферуючих клітин, проводять математичний аналіз з визначенням коефіцієнта проліферативної активності (КПА) за тиждень, за формулою:  
60  $KPA = N_{Brd} / N_{ins} \cdot 100\%$ , де  $N_{Brd}$  - чисельність Brd-імунореактивних ендокриноцитів;  $N_{ins}$  -

чисельність інсулін-імунопозитивних ендокриноцитів. В нормі у експериментальних тварин КПА становить 16-19 %, при його зниженні менше 15 % слід сказати про низьку проліферативну активність, а при збільшенні більш 20 % - про високу.

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

- використання бромдезоксидуридину (Brd) дозволяє виявляти проліферативну активність в тканинах з дуже низькою проліферацією;
- попереднє введення Brd експериментальним тваринам (або культурі клітин) протягом 7 днів дозволяє чітко фіксувати проліферативну активність за часом;
- паралельна специфічна ідентифікація інсулін-синтезуючих клітин в гістологічних зрізах підшлункової залози дозволяє чітко ідентифікувати проліферуючі клітини;
- розрахування КПА дозволяє отримати цілісну оцінку репаративних процесів в підшлунковій залозі при запальній або аутоімунній деструкції.

Спосіб здійснюють таким чином:

Для визначення проліферативної активності ендокриноцитів тваринам щодня протягом 7 днів вводили розведений в 0,5 мл бідистильованої води бромдезоксидуридин - Brd (SIGMA, USA) у дозі 40 мг/кг внутрішньочеревинно.

Негайно після одномоментної декапітації тварин під наркозом (етамінал натрію 40 мг/кг внутрішньочеревинно) підшлункову залозу витягали й розміщували у фіксатор Буена 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 з первинними мишачими антитілами до Brd (SIGMA, USA) у розведенні 1:1000 в 0,1 М фосфатному буфері (рН 7.2) протягом 15 годин при T = +4 °C, а паралельний другий зріз із кролячими антитілами до інсуліну (Peninsula Laboratories Inc., USA) у розведенні 1:200 протягом 6 годин при T = +4 °C. Після дворазового по 10 хв відмивання надлишку первинних антитіл в 0,1 М у фосфатному буфері, зрізи для виявлення Brd 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 (рН 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 (рН 7.2). По закінченні 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 38NE (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 островці, не дивлячись на наявність або відсутність флуоресціюючих клітин.

На зрізах підшлункової залози підраховували кількість Brd-позитивних клітин та інсулін позитивних ендокриноцитів.

Надалі обчислювали коефіцієнт проліферативної активності (КПА) ендокриноцитів, який становив відсоток Brd-імунореактивних ендокриноцитів стосовно питомої чисельності інсулін-імунопозитивних ендокриноцитів:

$$КПА = N_{Brd} / N_{ins} \cdot 100\%, \text{ де}$$

$N_{Brd}$  - чисельність Brd-імунореактивних ендокриноцитів;

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

В нормі у експериментальних тварин КПА становить 16-19 %, при його зниженні менше 15 % слід сказати про низьку проліферативну активність, а при збільшенні більше 20 % - про високу.

Приклад

Для визначення змін коефіцієнта проліферативної активності при експериментальному цукровому діабеті щурам самцям лінії Вістар в кількості 15 тварин одноразово, внутрішньочеревинно вводили стрептозотозин в дозі 45 мг/кг ваги тварини, розведеного ex tempore в 1 мл 0,1 М цитратного буферу pH 4,5. На 20-день протікання патологічного процесу тваринам вводили бромдезоксіуридин - Brd (SIGMA, USA) у дозі 40 мг/кг внутрішньочеревинно, протягом 7 днів. Для порівняння в контрольній групі тварин (кількістю 15 щурів) також проводили семиденне введення Brd (SIGMA, USA) у дозі 40 мг/кг внутрішньочеревинно.

Після останнього введення Brd через 12 годин тварин декапітували під етаміналовим наркозом та проводили виділення біологічного матеріалу за вище означеною методикою. Результати експерименту приведено у таблиці.

Таблиця

Експериментальна група	N <sub>ins</sub> чисельність інсулін-імунопозитивних ендокриноцитів	N <sub>Brd</sub> чисельність Brd-імунореактивних ендокриноцитів	коефіцієнт проліферативної активності КПА, %
контроль	52±4	10±1	19
експериментальний цукровий діабет	12±1	3±1	10

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

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб комплексної оцінки проліферативної активності ендокриноцитів панкреатичних ostrivciv шляхом проведення імуногістологічного дослідження, який включає імунофлуоресцентне дослідження із використанням первинних та вторинних моноклональних антитіл, кон'югованих із FITC, та проведення математичного аналізу, який **відрізняється** тим, що експериментальним тваринам протягом 7 днів вводять бромдезоксіуридин (Brd), на паралельних серійних зрізах гістологічного матеріалу підшлункової залози виявляють кількість бета-ендокриноцитів та кількість проліферуючих клітин, та визначають коефіцієнт проліферативної активності за формулою:  $KPA = N_{Brd} / N_{ins} \cdot 100\%$ , де N<sub>Brd</sub> - чисельність Brd-імунореактивних ендокриноцитів; N<sub>ins</sub> - чисельність інсулін-імунопозитивних ендокриноцитів і, якщо КПА складає менше 15 %, то проліферативну активність вважають низькою, а якщо КПА є більшим за 20 %, то констатують високу проліферативну активність.

---

Комп'ютерна верстка В. 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