



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **72776** (13) **U**  
(51) МПК (2012.01)  
**G01N 21/00**

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: <b>u 2012 02401</b>	(72) Винахідник(и): <b>Камишний Олександр Михайлович (UA), Топол Інна Олександрівна (UA), Деген Анна Сергіївна (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>29.02.2012</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>27.08.2012</b>	(73) Власник(и): <b>ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ,</b> пр. Маяковського, 26, м. Запоріжжя, 69035, Україна (UA), <b>Камишний Олександр Михайлович,</b> вул. Запорізька, 11, кв. 32, м. Запоріжжя, 69026 (UA), <b>Топол Інна Олександрівна,</b> вул. Паторжинського, 2-в, м. Запоріжжя, 69081 (UA), <b>Деген Анна Сергіївна,</b> вул. Зернова, 30-а, кв. 18, м. Запоріжжя, 69121 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>27.08.2012, Бюл.№ 16</b>	

## (54) СПОСІБ ІДЕНТИФІКАЦІЇ Т-ХЕЛПЕРІВ 17 ТИПУ (Th17)

### (57) Реферат:

Спосіб ідентифікації Т-хелперів 17 типу (Th 7) шляхом підготовки гістологічних препаратів і проведення мікроскопічного дослідження з використанням специфічного маркера. Крім того, імунофлюоресцентну реакцію проводять з використанням маркера до ядерного orphan-рецептора ROR $\gamma$ t, додатково визначають морфометричні й денситометричні показники, зокрема площу імунопозитивних клітин, інтегровану оптичну щільність (Integrated Density) і середнє значення сірого (Mean Gray Value), а також розраховують коректний показник клітинної флюоресценції за формулою:

$CTCF = \text{Integrated Density} - (\text{Area of selected cell} * \text{Mean fluorescence of background readings})$ ,

де CTCF - коректний показник клітинної флюоресценції (corrected total cell fluorescence),

Area of selected cell - площа виділених клітин,

Mean fluorescence of background readings - середній показник флюоресценції фону.

UA 72776 U



Корисна модель стосується медицини, зокрема експериментальної медицини, патологічної фізіології, ендокринології, імуноморфології, і може бути використана для вивчення функціонального стану лімфоїдної тканини в умовах норми та при патологічних станах.

Основними ефекторами розвитку запальних та автоімунних захворювань є представники однієї з субпопуляцій Т-лімфоцитів хелперів - Т-хелпери 17 типу. Незважаючи на велику кількість молекул, що експресуються Th7-клітинами і претендують на роль їх маркерів, мабуть, найнадійнішими є транскрипційні фактори, пов'язані з ядерним orphan-рецептором (Retinoic acid-related orphan receptors, RORs). Одну з ізоформ ROR $\gamma$ -ROR $\gamma$ t - вперше виявлено в тимусі, вони отримали назву TOR (thymus orphan receptor). Однак надалі експресію ROR $\gamma$ t виявлено й у периферичних органах імунної системи: селезінці, лімфатичних вузлах тощо.

Існують лектингістохімічні та імунофлюоресцентні способи виявлення лімфоцитів у гістологічних препаратах за наявності рецепторів до лектинів і протеїнів, але вони недостатньо специфічні, що зумовило необхідність розробки нових способів.

Найближчим за технічною суттю та результатом, що досягається, є спосіб, що полягає у виявленні лімфоцитів шляхом підготовки гістологічного препарату і проведенні лектингістохімічного дослідження з використанням специфічного маркера - лектину кори бузини чорної [Волошин М. А., Куц О. Г. Пат. № 13282, UA, МПК 2006 G01N21/00].

Спільні суттєві ознаки прототипу й корисної моделі, що заявляється:

- підготовка гістологічних препаратів;

- здійснення мікроскопічного дослідження з використанням специфічного маркера.

Цей спосіб є недостатньо ефективним, оскільки не дозволяє високоспецифічно виявляти Т-хелпери 17 типу (Th 7) в гістологічних зрізах кишковоасоційованої лімфоїдної тканини (КАЛТ).

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу ідентифікації Т-хелперів 17 типу (Th 7) шляхом використання моноклонального антитіла до транскрипційного фактора ROR $\gamma$ t як найбільш специфічного маркера, що дозволить підвищити ефективність специфічного виявлення цих клітин і здійснювати кількісне визначення експресії ROR $\gamma$ t.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі, який включає підготовку гістологічних препаратів і проведення мікроскопічного дослідження з використанням специфічного маркера, новим є те, що імунофлюоресцентну реакцію проводять з використанням маркера до ядерного orphan-рецептора ROR $\gamma$ t, додатково визначають морфометричні й денситометричні показники, зокрема площу імунопозитивних клітин, інтегровану оптичну щільність (Integrated Density) і середнє значення сірого (Mean Gray Value), а також розраховують коректний показник клітинної флюоресценції за формулою:

$CTCF = \text{Integrated Density} - (\text{Area of selected cell} * \text{Mean fluorescence of background readings})$ ,

де CTCF - коректний показник клітинної флюоресценції (corrected total cell fluorescence),

Area of selected cell - площа виділених клітин,

Mean fluorescence of background readings - середній показник флюоресценції фону.

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

Постановка імунофлюоресцентної реакції з ROR $\gamma$ t для виявлення Th 7 у гістологічних препаратах дозволить зменшити помилки при підрахунку цих клітин у гістологічних препаратах та оцінити ступінь активності спадкового та набутого імунітету в умовах норми та при патологічних станах, оскільки транскрипційний фактор ROR $\gamma$ t є високоспецифічним маркером для Th 7-клітин. До переваг імунофлюоресцентного визначення Th 7 належить наступне: гістологічні зрізи фіксують на скельцях з адгезивним покриттям, що запобігає їх спонтанній руйнації, після цього дослідник не лімітується у жорстких часових умовах здійснення дослідження; для проведення методики можна використовувати флуоресцентні мікроскопи та моноклональні антитіла різних виробників; якість реакції також значно підвищується за рахунок застосування вторинних антитіл; як систему аналізу зображення можна використовувати різні доступні ліцензовані системи, окремі з них (програма аналізу ImageJ, NIH, USA) є безкоштовними. За допомогою програми ImageJ можна як в автоматичному, так і в мануальному режимі розрізняти окремі імунопозитивні лімфоцити. Результати дослідження документують у вигляді фотографій. Головною перевагою імунофлюоресцентного дослідження є можливість отримати унікальну характеристику кожного окремого лімфоциту з позицій його морфології та функцій. Методика дозволяє пов'язати інтенсивність експресії будь-якого лімфоцитарного рецептора з такими морфометричними показниками, як площа, діаметр, периметр лімфоциту тощо.

Запропонований спосіб дозволяє високоспецифічно диференціювати Th 7 від інших клітин у гістологічних препаратах і кількісно визначати експресію ROR $\gamma$ t, враховуючи коректний показник клітинної флюоресценції імунопозитивних клітин.

Ця специфічна імуофлюоресцентна реакція дозволить аналізувати функціональний стан Т-лімфоцитів і здійснювати кількісний аналіз прозапальних Th17-клітин у центральних і периферичних органах імунної системи. Кількісне визначення концентрації білка ROR $\gamma$ t в лімфоїдних клітинах дозволяє з високим ступенем специфічності ідентифікувати Th 7 у гістологічних зрізах.

Отже, сукупність зазначених позитивних моментів дозволить підвищити ефективність виявлення Th17-клітин у гістологічних зрізах КАЛТ і підвищити якість оцінки функціонального стану імунної системи в умовах стресу та при розвитку автоімунної патології.

Спосіб здійснюють таким чином.

Для здійснення дослідження на ротаційному мікротомі MICROM HR-360 (Microm, Німеччина) робили 5-мікронні серійні зрізи з різних ділянок клубової кишки щурів, фіксованої за Буеном, які потім депарафінували в ксилолі, проводили регідратацію в низхідних концентраціях етанолу (100 %, 96 %, 70 %), відмивали у фізіологічному розчині або 0,1 М фосфатному буфері (pH =7,4) і фарбували моноклональними антитілами.

Досліджено 3 морфологічні зони згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів: лімфоїдні фолікули, міжвузликову й підепітеліальну, а також між- і внутрішньоепітеліальні лімфоцити та лімфоцити в підслизовій основі кишки.

Клітинний антигенний маркер ROR $\gamma$ t виявляли непрямим імуофлюоресцентним методом за допомогою первинних кролячих моноклональних антитіл до ROR $\gamma$ t щурів виробництва Santa Cruz Biotechnology (США), з якими гістологічні зрізи інкубували протягом 18 годин у вологій камері при T = 4 °C. Після відмивання надлишку первинних антитіл в 0,1 М фосфатному буфері зрізи інкубували 60 хвилин (T = 37 °C) з вторинними антитілами в розведенні 1:64. Як вторинні антитіла використовували козячі антитіла до повної молекули IgG кролика, кон'югованих з FITC (Sigma Chemical, США). Після інкубації зрізи промивали 0,1 М фосфатним буфером і занурювали в суміш гліцерину й фосфатного буфера (1:9) для подальшої люмінесцентної мікроскопії.

Оброблені гістологічні зрізи вивчали за допомогою комп'ютерної програми ImageJ (Image Processing and Data Analysis in Java), спеціально розробленої для аналізу медичних і біологічних зображень (розробник - National Institutes of Health, США). Зображення, отримане на мікроскопі PrimoStar (ZEISS, Німеччина) в ультрафіолетовому спектрі з довжиною хвилі 390 нм, за допомогою високочутливої камери AxioCam 5c (ZEISS, Німеччина) негайно вводять у комп'ютер. При цьому ефект "вигорання" препарату, пов'язаний з поступовим руйнуванням молекули FITC під впливом тривалого ультрафіолетового опромінення, виключено.

При цьому в ручному режимі визначали області зі статистично значущою флюоресценцією, характерною для лімфоїдних клітин, що експресують ROR $\gamma$ t. Обчислювали морфометричні й денситометричні показники, зокрема площу імунопозитивних клітин, інтегровану оптичну щільність (Integrated Density) й середнє значення сірого (Mean Gray Value), розраховували коректний показник клітинної флюоресценції за формулою:

CTCF=Integrated Density - (Area of selected cell \* Mean fluorescence of background readings),  
де CTCF - коректний показник клітинної флюоресценції (corrected total cell fluorescence),  
Area of selected cell - площа виділених клітин,  
Mean fluorescence of background readings - середній показник флюоресценції фону.

Приклад

Після фіксації шматочків клубової кишки щурів у розчині Буена їх зневоднюють у висхідній батареї спиртів, отримують парафінові зрізи 5-6 мкм завтовшки та виготовляють гістологічні препарати. Клітинний антигенний маркер ROR $\gamma$ t виявляли непрямим імуофлюоресцентним методом за допомогою первинних кролячих моноклональних антитіл до ROR $\gamma$ t щурів виробництва Santa Cruz Biotechnology (США), з якими гістологічні зрізи інкубували протягом 18 годин у вологій камері при T = 4 °C. Після відмивання надлишку первинних антитіл в 0,1 М фосфатному буфері зрізи інкубували 60 хвилин (T = 37 °C) з вторинними антитілами в розведенні 1:64. Як вторинні антитіла використовували козячі антитіла до повної молекули IgG кролика, кон'югованих з FITC (Sigma Chemical, США). Після інкубації зрізи промивали 0,1 М фосфатним буфером і занурювали в суміш гліцерину й фосфатного буфера (1:9) для подальшої люмінесцентної мікроскопії. Для ідентифікованих ROR $\gamma$ t - імунопозитивних клітин лімфоїдних клітин - з використанням комп'ютерної програми ImageJ обчислювали морфометричні й денситометричні показники: площу імунопозитивних клітин, інтегровану оптичну щільність (Integrated Density) і середнє значення сірого (Mean Gray Value), а також розраховували коректний показник клітинної флюоресценції за формулою:

CTCF=Integrated Density - (Area of selected cell \* Mean fluorescence of background readings),

де CTCF - коректний показник клітинної флюоресценції (corrected total cell fluorescence), Area of selected cell - площа виділених клітин, Mean fluorescence of background readings - середній показник флюоресценції фону.

У результаті класифікаційного аналізу ідентифікували ROR $\gamma$ t - імунопозитивні лімфобласти площею (Area) > = 30,0 мкм<sup>2</sup>; ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> великі лімфоцити 30,0 > Area > = 16,0; ROR $\gamma$ t середні лімфоцити 16,0 > Area > = 11,0; ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> малі лімфоцити 11,0 > Area > = 5,0. Це дозволило обчислити абсолютну (кількість клітин на 1 мм<sup>2</sup> площі кишки) і відносну (%) щільність розподілу різних ROR $\gamma$ t-імунопозитивних лімфоцитів різних класів у досліджуваних зонах згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів.

При експериментальному цукровому діабеті та в умовах соціального стресу ROR $\gamma$ t-імунопозитивні лімфоцити спостерігають в лімфоїдних вузликах, міжвузликовій і підепітеліальній зоні, а також у підслизовій основі кишки.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб ідентифікації Т-хелперів 17 типу (Th 7) шляхом підготовки гістологічних препаратів і проведення мікроскопічного дослідження з використанням специфічного маркера, який **відрізняється** тим, що імунофлюоресцентну реакцію проводять з використанням маркера до ядерного orphan-рецептора ROR $\gamma$ t, додатково визначають морфометричні й денситометричні показники, зокрема площу імунопозитивних клітин, інтегровану оптичну щільність (Integrated Density) і середнє значення сірого (Mean Gray Value), а також розраховують коректний показник клітинної флюоресценції за формулою:

CTCF = Integrated Density - (Area of selected cell \* Mean fluorescence of background readings),  
де CTCF - коректний показник клітинної флюоресценції (corrected total cell fluorescence),  
Area of selected cell - площа виділених клітин,  
Mean fluorescence of background readings - середній показник флюоресценції фону.

---

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