



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 127842

(13) C2

(51) МПК

G01N 33/483 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2021 04952**
(22) Дата подання заявки: **02.09.2021**
(24) Дата, з якої є чинними
права інтелектуальної
власності: **18.01.2024**
(41) Публікація відомостей
про заявку: **15.12.2021,**
Бюл.№ 50
(46) Публікація відомостей
про державну
реєстрацію: **17.01.2024,**
Бюл.№ 3

(72) Винахідник(и):
Амінов Руслан Флузович (UA),
Фролов Олександр Кирилович (UA),
Амінова Аліна Сергіївна (UA)
(73) Володілець (володільці):
ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ,
вул. Жуковського, 66, м. Запоріжжя, 69600 (UA)
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 2015/064391 A1, 07.05.2015
UA 21951 U, 10.04.2007
UA 42092 U, 25.06.2009
JP 2017/108660 A, 22.06.2017
EP 1167970 A, 02.01.2002
Nauseef William M. Diagnostic assays for
myeloperoxidase deficiency. Neutrophil Methods and
Protocols. 2007. Vol. 412. P. 525-530. URL:
https://doi.org/10.1007/978-1-59745-467-4_32 (дата
звернення: 12.11.2023)
Nauseef William M. Diagnostic assays for
myeloperoxidase and myeloperoxidase deficiency.
Neutrophil Methods and Protocols. 2014. Vol. 1124. P.
537-546 URL: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-845-4_32 (дата
звернення: 12.11.2023)
West Burton C. et al. Separation and characterization of
human neutrophil granules. The American Journal of
Pathology. 1974. Vol. 77. № 1. P. 41-62 URL:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1910704/>
(дата звернення: 12.11.2023)
RU 2196509 C2, 20.01.2003
UA 102130 U, 26.10.2015

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ МІЄЛОПЕРОКСИДАЗИ НЕЙТРОФІЛІВ У ЛЕЙКОКОНЦЕНТРАТІ**(57) Реферат:**

Винахід належить до способу визначення активності мієлопероксидази нейтрофілів у лейкоконцентраті, що включає підготовку мазків клітин крові, послідовне інкубування мазків у буферно-інкубаційних сумішах, їх промивання, висушування та додаткове фарбування, аналіз клітин крові за кількістю зафарбованих гранул нейтрофілів та розрахунок цитохімічного індексу, при якому попередньо з крові отримують лейкоконцентрат шляхом додавання 10 % розчину желатину, витримують лейкоконцентрат при фізіологічній температурі тіла на водяній бані; здійснюють лізис еритроцитів при додаванні гемолітичної рідини, після чого додають фосфатно-сольовий буфер, центрифугують суміш; виділяють з осаду лейкоконцентрат та визначають життєздатність клітин крові, наносять на пробілковані предметні скельця, а дофарбовування мазків здійснюють розчином Романовського-Гімзи та диференціюють у HCl.

UA 127842 C2

Спосіб належить до біохімії, імунології та експериментальної біології та може бути використаний для дослідження активності мієлопероксидази нейтрофілів.

Відомий спосіб визначення активності мієлопероксидази нейтрофілів [Пат. № 102130 Україна, МПК G01N 33/48; G01N 33/483; G01N 33/50. Спосіб визначення активності мієлопероксидази нейтрофільних гранулоцитів /Гавриленко Т.І.; Рижкова Н.О.; Підгайна О.А.; Торбас О.О.; Бабій Т.В.; Лутай Я.М.; Довгань Н.В.; Степура А.О.; Сопко О.О. /заявка № а201311934. Заявл. 10.10.2013. Опубл. 26.10.2015], що включає інструментальне дослідження периферійної крові, визначення фотометричних характеристик зразка та оцінку діагностичних критеріїв, виділення із досліджуваного зразка крові чистої популяції нейтрофільних гранулоцитів, додавання до зразку розчину солянокислого бензидину з перекисом водню, інкубування протягом 600 с, вимірювання оптичної щільності контрольного та дослідного зразків на імуноферментному аналізаторі та визначення активності мієлопероксидази.

Недоліками цього способу є те, що він складний та потребує багато часу на проведення, використання імуноферментного аналізатора, порушення фізіологічному стану та втрата частини клітин у культурі у результаті виділення на двійному градієнті, відсутність перевірки життєздатності клітин. Це призводить до зниження точності та ефективності результатів визначення мієлопероксидази.

Ознаками, спільними з рішенням, що заявляється, є дослідження клітин крові, виділення із досліджуваного зразка крові лейкоконцентрату, додавання до зразку розчину бензидину з перекисом водню.

Прототипом винаходу є визначення активності мієлопероксидази нейтрофілів [Пат. № 2196509 Росія, МПК А61В 5/145, С12Н 1/28, G01N 33/49. Способ цитохимического определения активности миелопероксидазы в мазках крови животных /Гугушвили Н.Н.; Радуть Н.П. /заявка № 2000109984/13. Заявл. 18.04.2000 Опубл. 20.01.2003.], що включає підготовку мазків крові, приготування двох буферно-інкубаційних сумішей і проведення інкубації мазків крові в темряві з промиванням після кожного етапу інкубації, після чого мазки крові висушують, додатково фарбують 0,5 % розчином нейтрального червоного. Перша буферно-інкубаційна суміш містить мідний купорос, трис-НСІ і дистильовану воду. Друга буферно-інкубаційна суміш містить бензидин, етиловий спирт, трис-НСІ, перекис водню і дистильовану воду. Про активність мієлопероксидази судять за кількістю зафарбованих гранул нейтрофілів.

Недоліком способу є використання предметних скелець, які не пробілковані, що зменшує кількість фіксованих нейтрофілів на склі, та мазків крові з малою кількістю крові, що потребує багато предметних скелець з мазками для аналізу.

Ознаками, спільними з рішенням, що заявляється, є підготовка мазків клітин крові, послідовне інкубування мазків у двох буферно-інкубаційних сумішах, їх промивання, висушування та додаткове фарбування, аналіз клітин крові за кількістю зафарбованих гранул нейтрофілів та розрахунок цитохімічного індексу.

В основу винаходу поставлена задача розробити спосіб визначення активності мієлопероксидази нейтрофілів у лейкоконцентраті, який шляхом додавання желатину до гепаринізованої крові дає змогу отримати чисту життєздатну культуру лейкоцитів, яку потім наносять на пробілковані скельця, для подальшого фарбування та перевірки активації мієлопероксидази нейтрофілів, що дозволяє підвищити швидкість, чутливість і точність способу та використовувати його при дослідженні вродженого імунітету.

Суттєвими ознаками способу є:

- отримання лейкоконцентрату з крові за допомогою додавання до неї 10 % розчину желатину.

- витримування лейкоконцентрату при фізіологічній температурі тіла у водяній бані;

- здійснення лізису еритроцитів при додаванні гемолітичної рідини;

- додавання фосфатно-сольового буферу (ФСБ);

- центрифугування;

- виділення з осаду лейкоконцентрату;

- визначення життєздатності клітин крові;

- нанесення лейкоконцентрату на пробілковані предметні скельця;

- занурення мазків у розчин мідного купоросу;

- занурення мазків у розчин бензидину з додаванням до нього перекису водню;

- дофарбовування мазків розчином фарби Романовського-Гімзи;

- диференціювання мазків у НСІ;

- підрахунок у мазках клітин, які містять у цитоплазмі гранули синьо-коричневого кольору та визначення цитохімічного індексу.

Відмінними від прототипу ознаками є:

- отримання лейкоконцентрату з крові за допомогою додавання до неї 10 % розчину желатину.

- витримування лейкоконцентрату при фізіологічній температурі тіла у водяній бані;

- здійснення лізису еритроцитів при додаванні гемолітичної рідини;

5 - додаванням ФСБ;

- центрифугування;

- виділення з осаду лейкоконцентрату;

- визначення життєздатності клітин крові;

- нанесення лейкоконцентрату на пробілковані предметні скельця;

10 - дофарбовування мазків розчином фарби Романовського-Гімзи;

- диференціювання мазків у HCl.

Виділення лейкоконцентрату за допомогою желатину, який є природною речовиною та не впливає на фізіологічний стан клітин та їх функцію, дозволяє виділити чисту непошкоджену та життєздатну культуру лейкоцитів, на що вказує їх перевірка на життєздатність, а використання

15 пробілкового скла збільшує кількість клітин за рахунок посилення їх фіксації.

Спосіб здійснюють так.

Здійснюють забір крові; стабілізують її 2 % розчином гепарину, до крові додають 10 % розчину желатину, так щоб його кінцева концентрація складала 1 %, витримують кров на водяній бані протягом 15-20 хв при фізіологічній температурі тіла, еритроцити лізують протягом 20 30 с при додаванні 2-3 мл гемолітичної рідини, припиняють гемоліз додаванням 5-6 мл ФСБ, отриману суспензію центрифугують протягом 5-10 хв при 1500 об/хв, збирають осад, визначають життєздатність лейкоцитів, що виділені з суспензії 0,2 % розчином трипанового синього; отримують суспензію клітин з концентрацією 1-2 млн/мл, наносять її на пробілковані предметні скельця, фіксують зразки у суміші 96 % етанолу та формаліну (9:1) протягом 1-3 хв, 25 промивають у 2 порціях ФСБ і знову висушують. Далі мазки занурюють у 0,5 % розчин мідного купоросу на 1-2 хв, промивають у 2 порціях ФСБ; занурюють у розчин бензидину на 1-2 хв з додаванням 3 % перекису водню; промивають у 2 порціях ФСБ. Далі ядра нейтрофілів дофарбовують 15-20 % розчином фарби Романовського-Гімзи. Мазки промивають у 3 порціях ФСБ і диференціюють у 1-2 % HCl. Підрахунок результатів здійснюють за допомогою мікроскопу з використанням імерсійного об'єктиву (100x) із окуляром (7x). Підраховують 200 нейтрофілів і визначають відсоток клітин, які містять у цитоплазмі гранули синьо-коричневого кольору та розраховують цитохімічний індекс. Фарбування за допомогою Романовського-Гімзи покращує чіткість ядра клітин та цитоплазми, що дає змогу якісно оцінювати активність мієлопероксидази в клітинах. Пробілкованість предметного скла плазмою крові збільшує кількість зафіксованих 35 клітин.

Приклад 1

Для дослідження було використано 14 статевозрілих щурів віком 5 місяців. Вони були розподілені на 2 групи порівну. Першу групу становили щури, у яких брали кров за запропонованим методом, другу - за способом-прототипом.

40 У першій групі тварин здійснювали забір крові, стабілізували її 2 % гепарином, до крові додавали 10 % розчин желатину, так щоб його кінцева концентрація дорівнювала 1 %, витримували кров на водяній бані протягом 20 хв при фізіологічній температурі крові тварини, після осідання еритроцитів плазму з лейкоцитами переносили у силіконовану пробірку і центрифугували протягом 10 хв при 1500 об/хв. Надосад відбирали, до осаду з лейкоцитами та 45 домішками еритроцитів додавали на 30 сек 3 мл гемолітичної рідини, припиняли гемоліз додаванням 5-6 мл ФСБ, центрифугували суміш протягом 5 хв при 1500 об/хв, надосад вилучали, а до осаду додавали 0,5 мл середовища 199, у суспензії визначали життєздатність лейкоцитів за допомогою 0,2 % розчину трипанового синього, життєздатність клітин дорівнювала 98 %, готували суспензію клітин з концентрацією 1 млн/мл, наносили суспензію 50 клітин в об'ємі 25 мкл на пробілковані предметні скельця, тобто оброблені 20 % розчином пульмованої плазми крові тієї ж тварини, висушували мазки і фіксували їх протягом 2 хв у суміші 96 % етанолу та формаліну (9:1), промивали мазки у 3 порціях ФСБ і знову висушували. Мазки занурювали у 0,5 % розчин мідного купоросу на 2 хв, знову промивали у 2 порціях ФСБ; 55 занурювали в розчин бензидину на 1 хв; промивали у 2 порціях ФСБ. Далі ядра нейтрофілів дофарбовували 20 % розчином фарби Романовського-Гімзи протягом 20 хв. Мазки промивали у 3 порціях ФСБ і диференціювали у 1 % HCl. Аналіз здійснювали на 200 нейтрофілах розраховуючи відсоток тих клітин, які містили у цитоплазмі гранули синьо-коричневого кольору та визначали їх цитохімічний індекс.

60 У другій групі здійснювали підготовку мазків крові тварин. Потім готували 2 буферно-інкубаційні суміші та послідовно інкубували в них мазки крові тварин у темряві з промиванням

після кожного етапу інкубації. Після чого мазки крові тварин висушували, додатково фарбували 0,5 % розчином нейтрального червоного. Активність мієлопероксидази визначали за кількістю зафарбованих гранул нейтрофілів. Перша буферно-інкубаційна суміш містила мідний купорос, трис-НCl і дистильовану воду. Друга буферно-інкубаційна суміш містила бензидин, етиловий спирт, трис-НCl, перекис водню та дистильовану воду.

У результаті в обох групах виявляли активовані клітини з активною мієлопіроксидазою. При підрахунку клітин у мазку запропонованим методом нараховували понад 200 клітин. Для підтвердження ефективності та точності способів отримані показники порівнювали із реферативними загальноприйнятими значеннями. За запропонованим способом показники цитохімічного індексу та відсоток активованих нейтрофілів знаходилися в межах реферативних значень, а при визначенні способом-прототипом не нараховували більше 50 таких клітин у мазку, що призводить до отримання недостовірних результатів. Також було складно визначити активовані нейтрофіли при фарбуванні за способом прототипом, оскільки клітини фарбувалися у світлий колір.

Приклад 2

У дослідженні були залучені 12 особин молодняку тварин, віком 1 місяць, які були розподілені на 2 рівні групи. Дослідження здійснювали аналогічно прикладу 1. У результаті у способі-прототипі були виявлені аналогічні недоліки: мала кількість клітин у мазках, складність оцінки активності мієлопероксидази через низьку чіткість зображення, що зумовлює зниження точності показників відсотку активованих клітин та цитохімічного індексу, які відрізнялися від реферативних.

Спосіб, що заявляється, дозволяє перевірити активність мієлопероксидази нейтрофілів за рахунок більш високої точності, зручності та проведення експрес-аналізу, порівняно з прототипом.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб визначення активності мієлопероксидази нейтрофілів у лейкоконцентраті, що включає підготовку мазків клітин крові, послідовне інкубування мазків у буферно-інкубаційних сумішах, їх промивання, висушування та додаткове фарбування, аналіз клітин крові за кількістю зафарбованих гранул нейтрофілів та розрахунок цитохімічного індексу, який **відрізняється** тим, що попередньо з крові отримують лейкоконцентрат шляхом додавання 10 % розчину желатину, витримують лейкоконцентрат при фізіологічній температурі тіла на водяній бані; здійснюють лізис еритроцитів при додаванні гемолітичної рідини, після чого додають фосфатно-сольовий буфер, центрифугують суміш; виділяють з осаду лейкоконцентрат та визначають життєздатність клітин крові, наносять на пробілковані предметні скельця, а дофарбовування мазків здійснюють розчином Романовського-Гімзи та диференціюють у НCl.