

**ОПИСАНИЕ
ИЗОБРЕТЕНИЯ
К ПАТЕНТУ**
(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(19) **ВУ** (11) **6551**

(13) **С1**

(51)⁷ **G 01N 33/48**

(54) **СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА АПОПТОТИЧЕСКИ
ИЗМЕНЕННЫХ КЛЕТОК В ТКАНИ**

(21) Номер заявки: а 20000006

(22) 2000.01.04

(46) 2004.09.30

(71) Заявитель: Учреждение образования
"Гомельский государственный ме-
дицинский университет" (ВУ)

(72) Автор: Туманов Эдуард Викторович (ВУ)

(73) Патентообладатель: Учреждение обра-
зования "Гомельский государственный
медицинский университет" (ВУ)

(57)

Способ определения количества апоптотически измененных клеток в ткани, включающий гистохимическую обработку гистологических срезов изучаемой ткани, **отличающийся** тем, что взвешивают образец исследуемой ткани или измеряют его объем, выделяют клеточные ядра из образца, окрашивают полученную ядерную суспензию красителем, выявляющим концевые разрывы ДНК, после чего производят подсчет количества апоптотически измененных ядер, которое соответствует количеству апоптотически измененных клеток в изучаемом образце, и производят пересчет полученных данных на единицу массы или объема изучаемого образца.

(56)

Коршунов А.Г. и др. Архив патологии. - 1998. - Т. 60. - № 3. - С. 23-27.

Цыпленкова В.Г. и др. Архив патологии. - 1998. - Т. 60. - № 6. - С. 13-18.

Nusse M. et. al. Methods in Cell Biology. - 1994. - V. 42. - P. 149-158.

Никонова М.Ф. и др. Иммунология. - 1999. - № 2. - С. 20-23.

Изобретение относится к медицине и может быть использовано в патологической анатомии, гистологии, иммунологии и в других областях клинической медицины, а также в практической и экспериментальной биологии.

Известен способ определения количества апоптотически измененных клеток в ткани путем окрашивания изучаемого пула клеток специальными красителями с подсчетом количества клеток подвергшихся апоптозу, проточной цитофлуориметрией [1].

Недостатком данного способа является то, что он применим только для исследования свободно расположенных клеток, например клеток крови.

Наиболее близким к предлагаемому способу определения количества апоптотически измененных клеток в ткани является способ, согласно которому гистологические срезы изучаемой ткани подвергают специальной гистохимической обработке [2; 3] - прототип.

Недостатками прототипа являются:

относительно высокая стоимость

трудоемкость

BY 6551 C1

недостаточная достоверность
субъективность.

Задача, на решение которой направлено предполагаемое изобретение, заключается в создании высоко достоверного и воспроизводимого способа определения количества апоптотически измененных клеток в любых тканях организма.

Задача решается за счет того, что наряду с гистохимической обработкой гистологических срезов изучаемой ткани первоначально взвешивают образец исследуемой ткани или измеряют его объем, выделяют ядра из образца, затем окрашивают полученную ядерную суспензию красителями, окрашивающими концевые разрывы ДНК, после чего производят подсчет количества апоптотически измененных клеточных ядер, которое соответствует количеству апоптотически измененных клеток в изучаемом образце ткани, при этом производят перерасчет полученных данных на единицу объема или массы изучаемого образца ткани.

Пример.

Согласно протоколу № 21 от 2.10.1999 проведены исследования, заключающиеся в том, что кусочек миокарда, выбранный для исследования, предварительно измерили и установили его объем. Ядра извлекали детергентным способом. Для этого измельченную ткань помещали в охлажденный буфер А, содержащий 30 мМ трис НСl с рН 8,0 и 0,25 мМ сахарозу, 10 мМ СаСl₂ и 5 мМ 2-меркаптоэтанола. Ткань измельчали в гомогенизаторе в буфере А.

Гомогенизат фильтровали, затем центрифугировали при 1500 g в течение 10 минут. Осадок дважды промывали в буфере В, содержащем 0,1 % тритон Х-100 в буфере А и переносили в физиологический раствор.

Для окрашивания ДНК к осадку ядер в физиологическом растворе добавляли в равном количестве раствор, содержащий 0,5 % пропидиума иодита на физиологическом растворе, забуференном фосфатом с рН 7,4, и содержащий 0,1 % тритона Х-100 и 0,1 % цитрата натрия.

Подсчет апоптотически измененных ядер, т.е. подвергшихся окраске, осуществляли проточной цитофлюориметрией.

Полученное количество апоптотически измененных ядер пересчитали на 1 мм³ миокарда.

Предлагаемый способ определения количества апоптотически измененных клеток в ткани обеспечивает высокую степень достоверности при работе с любыми видами тканей организма, легко воспроизводится, обладает относительно низкой себестоимостью.

Источники информации:

1. Никонова М.Ф., Литвина М.М., Варфоломеев М.И. и др. Апоптоз и пролиферация как альтеративные формы ответа Т-лимфоцитов на стимуляцию // Иммунология. - 1999. - № 2. - 20-23.

2. Коршунов А.Г., Сычева Р.В., Голанов А.В. Иммуногистохимическое изучение апоптоза в глиобластомах головного мозга // Архив патологии. - 1998. - № 3. - С. 23-27. - прототип.

3. Ципленкова В.Г., Бескровнова Н.Н. Морфология миокарда при синдроме Вольфа-Паркинсона-Уайта // Архив патологии. - 1998. - № 6. - С. 13-18. - прототип.