



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2008110448/15, 18.03.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.03.2008

(45) Опубликовано: 10.10.2009 Бюл. № 28

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: МЕНЬШИКОВ В.В. Руководство по
клинической лабораторной диагностике. -
М.: Медицина, 1987, с.280. SU 1730595 A1,
30.04.1992. SU 1554592 A1, 15.01.1991. SU
1837227 A1, 30.08.1993. RU 2315312 C2,
20.01.2008.

Адрес для переписки:
672090, г.Чита, ул. Горького, 39а, Читинская
медакадемия, патентный отдел

(72) Автор(ы):

Белокриницкая Татьяна Евгеньевна (RU),
Витковский Юрий Антонович (RU),
Ахметова Елена Сергеевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное образовательное
учреждение высшего профессионального
образования Читинская государственная
медицинская академия Федерального
агентства по здравоохранению и
социальному развитию (RU)

**(54) СПОСОБ ПОДГОТОВКИ ПРОБЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА**

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, в
частности к иммунологии, и может быть
использовано при оценке состояния иммунной
системы женщин с пролиферативными
заболеваниями эндометрия путем исследования
содержания цитокинов в аспиратах из полости
матки. Для осуществления способа подготовки
пробы биологического материала для
иммуноферментного анализа с помощью

пластикового катетера производят забор
аспирата из полости матки. К аспирату
добавляют фосфатный буфер (рН 7,4) и
неполярный детергент в соотношении 100:1,
выдерживают в течение 1 ч при температуре 20-
30°С, центрифугируют 3-5 мин со
скоростью 3000 об/мин. Надосадочную
жидкость забирают для последующего
анализа. 3 табл.

Изобретение относится к медицине, в частности к иммунологии, и может быть использовано для оценки состояния иммунной системы женщин с пролиферативными заболеваниями эндометрия путем исследования содержания цитокинов в аспиратах из полости матки.

Цитокины представляют собой группу полипептидных медиаторов, часто гликозилированных, с молекулярной массой от 8 до 80 кД. Цитокины участвуют в формировании и регуляции защитных реакций организма и его гомеостаза. Изучение и оценка уровней цитокинов позволяет получить информацию о функциональной активности различных типов иммунокомпетентных клеток; о тяжести патологического процесса, о стадии развития ряда заболеваний [1].

Содержание цитокинов определяют с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) и в основном измеряют их уровни в естественных жидкостях: периферической крови, моче, слезной жидкости, жидкости десневых карманов, бронхоальвеолярном лаваже, эякуляте, смывах из полостей, спинномозговой или синовиальной жидкости и др. Определение цитокинов в биологических материалах, отличных по консистенции от жидкостей (например, в биоптатах тканей, аспиратах, выдыхаемом воздухе), вызывает определенные трудности, в связи с необходимостью подготовки проб для исследования.

Известен способ подготовки пробы биологической ткани для ИК-спектроскопии [2]. Биоптат ткани предстательной железы обрабатывают гексаметилдисилазаном на кипящей водяной бане в течение 1-2 ч с последующим высушиванием и спектроскопическим анализом.

Однако способ трудоемкий, требует взятие биоптата и не может быть использован для подготовки проб аспирата из полости матки.

Известен способ подготовки пробы периферической крови для ИФА, взятый в качестве прототипа [3]. В стерильных условиях производят забор 5 мл периферической крови из локтевой вены. В пробирку с кровью добавляют антикоагулянт (гепарин) из расчета: на 1 мл крови - 5 Ед. гепарина. Гепарин тщательно перемешивают с кровью. Пробу центрифугируют в течение 5 мин со скоростью 3000 об/мин. После этого, дозатором забирают 0,1 мл надосадочной жидкости и помещают в лунку планшета для определения содержания цитокинов с помощью ИФА. Исследование проводят по стандартной методике в соответствии с протоколом фирмы-производителя.

Однако данный способ подготовки пробы неприемлем для исследования аспирата из полости матки, т.к. аспират представляет собой неоднородную взвесь, состоящую из свернувшейся крови, секрета желез эндометрия и элементов эндометриальной ткани достаточно плотной консистенции, а для проведения ИФА требуется гомогенная жидкость.

Для повышения эффективности способа к 1 мл аспирата из полости матки добавляют 1,0 мл фосфатного буфера (рН 7,4) и 0,1 мл неполярного детергента (например, Твин-60 или Тритон X), выдерживают в течение 1 ч при температуре 20-30°C, центрифугируют 3-5 мин со скоростью 3000 об/мин и надосадочную жидкость забирают для последующего анализа.

Способ осуществляют следующим образом.

Производят забор аспиратов из полости матки с помощью одноразовых пластиковых катетеров. 1,0 мл аспирата помещают в пластиковую пробирку объемом 2,0 мл и добавляют 1,0 мл фосфатного буфера (рН 7,4) и 0,1 мл неполярного детергента (например, Твин-60 или Тритон X), тщательно встряхивают и выдерживают 1 ч при температуре 20-30°C. Затем пробирку с пробой

центрифугируют 3-5 мин. со скоростью 3000 об/мин. Дозатором забирают 0,1 мл светлой гомогенной надосадочной жидкости и помещают в лунку планшета для последующего ИФА. Исследование концентрации цитокинов производят согласно протоколу фирмы-производителя набора реагентов. Оптическую плотность определяют с помощью фотометра при длине волны 450 нм, проводят компьютерную обработку, результаты выражают в пикограммах на миллилитр (pg/ml).

Параметры способа определены опытным путем.

Оптимальное время взаимодействия пробы с детергентом - 1 ч. Если выдержать пробирку менее часа, то тканевой компонент оседает лишь частично и жидкой части экстракта выделится мало. Если дольше, то присоединяется угроза развития микроорганизмов в аспириате, что в последующем кардинально изменит пробу (табл.1).

Время экстракции (мин)	Концентрация ИЛ-1β (пкг/мл)	Результат
10	5	Недостаточно времени для экстракции
20	8	
30	10	
40	12	
50	20	
60	30	Оптимальный результат (выбираем меньшее время)
70	30	
80	30	
90	25	Угроза развития микрофлоры и изменения пробы
100	20	

Температура 20°C наиболее оптимальна для проведения экстракции и исследования концентрации цитокинов (табл.2).

Т°C	Концентрация ИЛ-1β (пкг/мл)	Результат
10	15	Оптимальное время (выбираем меньшее)
15	20	
20	35	
25	35	
30	35	
35	30	
40	10	

Пробу центрифугируют 3-5 мин со скоростью 3000 об/мин. Это наиболее оптимальные время и скорость центрифугирования, которые обеспечивают исчезновение мутности (экстинции - E) и, следовательно, выделение светлого гомогенного экстракта в аспириате из полости матки (нефелометрия) (табл.3).

Скорость центрифугирования (об/мин)	Время центрифугирования (мин)	E (мутность) (%)	Результат
1000	0	100	Мутность сохранена
	1	90	
	2	80	
	3	75	
	4	60	
	5	55	

5	1500	0	100	Мутность сохраняется
		1	80	
		2	75	
		3	55	
		4	35	
		5	20	
10	3000	0	100	Мутность исчезла
		1	40	
		2	20	
		3	0	
		4	0	
		5	0	

15 *Пример 1. Больная С., 45 лет. Дс: простая гиперплазия эндометрия. Для определения степени прогрессии неопластического процесса эндометрия предложено исследовать содержание цитокинов в полости матки.*

20 *Для этого произведен забор аспирата из полости матки с помощью одноразового катетера. 1,0 мл аспирата поместили в пластиковую пробирку объемом 2,0 мл. В пробирку добавили 1 мл фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 0,1 мл неполярного детергента - Тритон Х и тщательно перемешали содержимое. Пробу оставляют при температуре 23°C на 1 час. Через 1 ч пробу отцентрифугировали со скоростью 3000 об/мин в течение 3 мин. Дозатором забрали надосадочную жидкость и 0,1 мл несли в иммунологический планшет. Исследование содержания ИЛ-1β*

25 *провели методом иммуноферментного анализа в соответствии с протоколом фирмы-производителя набора реагентов («Вектор-Бест», г.Новосибирск) с помощью стандартного «ридера» при длине волны 450 нм («ASYS Hitech GmbH», Австрия). Содержание ИЛ-1β составило 235,7 пкг/мл, что свидетельствует о доброкачественном течении гиперпластического процесса.*

30 *Пример 2. Больная А., 40 лет, с Дс: атипичная гиперплазия эндометрия.*

Забор аспирата и подготовку пробы произвели вышеописанным способом. В качестве неполярного детергента использовали Твин-60. Методом ИФА провели определение содержания фактора некроза опухолей. Концентрация ФНОα составила 878,5 пкг/мл, что свидетельствует о высоком риске развития

35 *злокачественного процесса.*

Пример 3. Больная А., 49 лет, с Дс: умереннодифференцированная аденокарцинома?

Провели определение содержания цитокинов в аспирате из полости матки в соответствии с примером 2. Концентрация ФНОα составила 2241,4 пкг/мл, что

40 *свидетельствует о вероятном течении злокачественного процесса в эндометрии.*

С помощью данного способа проведено исследование цитокинов в аспиратах из полости матки у 80 больных с пролиферативными заболеваниями эндометрия. Воспроизводимость способа составила 95%.

Список литературы

45 *1. Заридзе Д.Т. Канцерогенез, - М.: Медицина, 2004. - 580 с.*

2. Патент РФ 2018829 МПК G01N 33/48 Способ диагностики заболеваний предстательной железы.

50 *3. Меньшиков В.В. Руководство по клинической лабораторной диагностике. - М.: Медицина, 1982. - 420 с.*

Формула изобретения

Способ подготовки пробы биологического материала для иммуноферментного

анализа, включающий забор материала и центрифугирование, отличающийся тем, что в качестве биологического материала берут аспират из полости матки, добавляют к нему фосфатный буфер (рН 7,4) и неполярный детергент в соотношении 100:1, выдерживают при температуре 20-30°C в течение 1 ч, центрифугируют 3-5 мин при скорости 3000 об./мин и надосадочную жидкость отбирают для последующего анализа.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50