



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 119206

(13) U

(51) МПК

G01N 33/50 (2006.01)

C12N 5/078 (2010.01)

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2017 04780**

(22) Дата подання заявки: **17.05.2017**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **11.09.2017**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **11.09.2017, Бюл.№ 17**

(72) Винахідник(и):

**Лісяний Микола Іванович (UA),  
Потапова Антоніна Ігнатіївна (UA),  
Гнедкова Ірина Олександрівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ІНСТИТУТ НЕЙРОХІРУРГІЇ ІМ. А.П.  
РОМОДАНОВА НАМН УКРАЇНИ,  
вул. Платона Майбороди, 32, м. Київ, 04050  
(UA)**

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ЛАНОК ІМУННОЇ СИСТЕМИ

### (57) Реферат:

Спосіб визначення активності ланок імунної системи, що є імунологічним методом визначення стимуляції чи гальмування імунної системи або її окремих ланок, при якому після проведення стимуляції імунних клітин крові в РБТЛ з мітогенами визначають стан окремих клітинних ланок імунітету у хворого і, за зростанням або зменшення кількості певних субпопуляцій лімфоцитів за допомогою моноклональних антитіл в порівнянні з відповідними показниками здорових осіб: зразок периферійної крові, взятої із вени, розділяють на 2 частини: першу частину в об'ємі 200,0 мкл інкубують в стерильному поживному середовищі в об'ємі 1,0 мл з додаванням Т клітинного міогену фітогемаглютиніну протягом 48 годин в термостаті, в іншій частині периферійної крові в об'ємі 100,0 мкл визначають кількість основних субпопуляцій лімфоцитів за допомогою панелі моноклональних антитіл (CD 3, 4, 8, 16, 20) до певних кластерів диференціювання лімфоцитів, це будуть контрольні значення рівня певних субпопуляцій, які визначають кількісну характеристику тої чи іншої ланки імунітету. Після 48-ї інкубації зразка крові з міогеном визначають повторно рівень цих субпопуляцій лімфоцитів за допомогою вказаних раніше моноклональних антитіл. Отримані результати порівнюють з даними контрольного дослідження крові і визначають, як змінився рівень тої чи іншої субпопуляції, чи є активація, чи, навпаки, гальмування певної ланки імунної відповіді при дії стимуляторів проліферації.

UA 119206 U



Корисна модель належить до медицини, а саме імунології, і направлена на встановлення порушень в певних ланках клітинного чи гуморального імунітету, а саме в Т хелперній, Т цитотоксичній, В клітинній та натурально кілерній ланках імунітету при різних видах імунопатології та онкології.

Основним методом визначення стану клітин імунної системи (прототип) на сьогодні є метод визначення кількості різних субпопуляцій лімфоцитів та лейкоцитів в периферійній крові за допомогою моноклональних антитіл до цих клітин імунітету, таких як CD-3, CD-4, CD-8, CD-16, CD-20 та інших антитіл [1]. Активність імунних клітин визначається в тестах проліферації їх під дією певних мітогенів та в реакції фагоцитозу нейтрофільними клітинами.

Недоліком даного методу є те, що він лише констатує зниження кількості клітин чи зниження їх функції і не дає відповіді на питання про характер та природу цього гальмування, що важливо для визначення механізмів порушень і використання терапії для направленої імунокорекції.

Задачею корисної моделі є розробка способу кількісного та якісного визначення активності ланок імунної системи.

Поставлена задача вирішується тим, що після проведення стимуляції імунних клітин крові в РБТЛ з мітогенами, визначають стан окремих клітинних ланок імунітету у хворого і, за зростанням або зменшенням кількості певних субпопуляцій лімфоцитів за допомогою моноклональних антитіл в порівнянні з відповідними показниками здорових осіб, а саме - зразок периферійної крові, взятої із вени, розділяють на 2 частини: першу частину в об'ємі 200,0 мкл інкубують в стерильному живильному середовищі в об'ємі 1,0 мл з додаванням Т клітинного міогену фітогемаглютиніну протягом 48 годин в термостаті, в іншій частині периферійної крові в об'ємі 100,0 мкл визначають кількість основних субпопуляцій лімфоцитів за допомогою панелі моноклональних антитіл (CD 3,4,8,16,20) до певних кластерів диференціювання лімфоцитів, це будуть контрольні значення рівня певних субпопуляцій, які визначають кількісну характеристику тої чи іншої ланки імунітету, після 48-ї інкубації зразка крові з міогеном визначають повторно рівень цих субпопуляцій лімфоцитів за допомогою вказаних раніше моноклональних антитіл, отримані результати порівнюють з даними контрольного дослідження крові і визначають, як змінився рівень тої чи іншої субпопуляції, чи є активація, чи, навпаки, гальмування певної ланки імунної відповіді при дії стимуляторів проліферації.

А саме - після проведення стимуляції імунних клітин крові в РБТЛ з мітогенами, визначають стан окремих клітинних ланок імунітету у хворого і, за зростанням або зменшенням кількості певних субпопуляцій лімфоцитів за допомогою моноклональних антитіл в порівнянні з відповідними показниками здорових осіб.

Спосіб виконується наступним чином.

Зразок периферійної крові, взятої із вени, розділяється на 2 частини: перша частина в об'ємі 200,0 мкл інкубується в стерильному живильному середовищі в об'ємі 1,0 мл з додаванням Т клітинного міогену фітогемаглютиніну протягом 48 годин в термостаті. В іншій частині периферійної крові в об'ємі 100,0 мкл визначаємо кількість основних субпопуляцій лімфоцитів за допомогою панелі моноклональних антитіл (CD 3, 4,8,16,20) до певних кластерів диференціювання лімфоцитів. Це будуть контрольні значення рівня певних субпопуляцій, які визначають кількісну характеристику тої чи іншої ланки імунітету. Після 48-ї інкубації зразка крові з міогеном визначаємо повторно рівень цих субпопуляцій лімфоцитів за допомогою вказаних раніше моноклональних антитіл. Отримані результати порівнюємо з даними контрольного дослідження крові і визначаємо, як змінився рівень тої чи іншої субпопуляції, чи є активація, чи, навпаки, гальмування певної ланки імунної відповіді при дії стимуляторів проліферації.

Як приклади використання вказаного методу, в таблиці 1 наведені дані про стимуляцію проліферації певних субпопуляцій лімфоцитів при дії мітогену ФГА, де видно, що цей міоген активує проліферацію (збільшує кількість клітин) практично всіх субпопуляцій лімфоцитів здорових осіб, у яких немає ознак імунної недостатності. В той же час, як видно із даних таблиці, різні ланки імунітету не однозначно реагують на стимуляцію мітогенами.

Таблиця 1

Стан активації ланок імунітету після виконання вказаного способу

	Кількість субпопуляцій лімфоцитів у відсотках				
	CD-3	CD-4	CD-8	CD-16	CD-20
До виконання способу діагностики n=19	25,3±3,21	20,1±3,72	12,6±3,8	49,5±15,1	8,0±2,8
Після виконання n=19	55,3±16,2*	43,7±15,7*	45,3±22,1*	57,2±1,37	41,9±11,5*

\* - вірогідні відмінності до та після реакції (P<0,05)

Так, кількість субпопуляцій CD-3 та CD-4 у здорових людей збільшується у 2 рази, тоді к CD-8 клітини збільшилися у 4 рази, тобто є ознаки переважної активації цитотоксичної CD-8 ланки імунітету. Подібна картина мала місце і при дослідженні В клітинної ланки імунітету. Ланка натуральних кілерів (CD-16<sup>+</sup>клітини) практично не змінювалась при активації міогенами.

В той же час інша картина спостерігається при визначенні активності різних ланок імунітету у хворих, наприклад, при пухлинах головного мозку або при розсіяному склерозі.

В таблиці 2 наведені дані кількісного складу субпопуляцій лімфоцитів, які відповідають за ту чи іншу ланку імунітету при деяких видах патології людини.

Таблиця 2

Вміст різних субпопуляцій лімфоцитів крові різних груп хворих після РБТЛ

	Кількість субпопуляцій лімфоцитів у відсотках				
	CD-3	CD-4	CD-8	CD-16	CD-20
Контрольна група n=9	55,3±16,0	41,7±1,5	45,3±12,1	57,2±13,7	41,9±11,5
Злоякісні пухлини головного мозку n=6	63,8±8,2	45,7±9,0	30,4±12,6	38,2±9,0	62,4±18,4
Розсіяний склероз n=8	69,8±9,6	62,4±14,6	48,7±8,2	51,2±1,2	42,6±15,0

Так, видно, що при злоякісних пухлинах головного мозку, має місце гальмування активації цитотоксичної (CD-8) натурально-кілерної ланки імунітету, що вказує на необхідність направленої корекції цієї ланки, тоді як В клітинна ланка активована і кількість цих клітин зросла в крові у 1,5 рази. При аутоімунній патології головного мозку спостерігається інша картина, а саме спостерігається збільшення CD-4 субпопуляції лімфоцитів у 1,5 разу на фоні стабільного рівня інших субпопуляцій, що свідчить про переважну активацію у цих хворих Т клітинної CD-4 ланки імунітету.

У порівнянні із прототипом, запропонований спосіб має ряд переваг:

- визначення одразу клітин, які відповідають за різні ланки імунітету, а саме Т хелперної ланки (CD-4 лімфоцити), Т цитотоксичної ланки (CD-8 лімфоцити), натурально-кілерної (CD-16 лімфоцити), В лімфоцитарної ланки (CD-20 лімфоцити) (4 ланки);

- можливість на основі результатів визначення робити висновок про стан не лише всієї імунної системи, а про певні її ланки. Так, можливо, що може мати місце збільшення кількості всіх субпопуляцій лімфоцитів, що говорить про повноцінну здатність до активації всіх ланок імунітету, а також, можливо, збільшення одної чи двох субпопуляцій, наприклад CD-8, CD-16 клітин на фоні гальмування рівня CD-3 та CD-20 лімфоцитів, що вказує на імуносупресію цих двох ланок імунітету. Можливо також збільшення кількості CD-20 лімфоцитів на фоні зменшення рівня CD-3, 4, 8 клітин, що вказує на гальмування Т клітинної ланки імунітету;

- диференційоване визначення здатності до активації певних ланок імунітету дозволяє робити висновок як про можливі причини гіперактивації, так і гальмування імунних процесів

залежно від патології, що значно поглиблює розуміння механізмів імунних порушень та їх корекції.

Джерела інформації:

1. Фримель Г. Иммунологические методы. - М.: Медицина, 1984. - 302 с.
- 5 2. Велиштай Н.Ф. Трансформация лимфоцитов. Трансформация лимфоцитов человеческой крови, стимулированных антигеном / Б. Блюм, Ф. Гайде. "Методы изучения in vitro клеточного иммунитета". - М. - Медицина. - 1974. - С. 185-197.
3. Копелян Н.И., Григорьева М.П. Разработка микромодификации культивирования клеток крови человека // Бюл.экспер.биологии и медицины. - 1972. - № 8. - С. 119-122.
- 10 4. Голубева Н.Н. Методика определения лимфостимулирующей активности фитогемагглютина / В.И. Орехович. "Современные методы в биохимии". - М.: Медицина. - 1977. - С. 257-262.
5. Ковальчук Л.В., Гашковская Л.В., Хорякова Н.Р. Система цитокинов, комплемента и современных методы анализа. - М.: Медицина. - 2001. - 156 с.
- 15 6. Пинегин Б.В. Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы / Б.В. Пинегин, А.А. Яринин, А.В. Симонова и др. Метод рекомендации. - М., 2001. - 52 с.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

20 Спосіб визначення активності ланок імунної системи, що включає імунологічний метод визначення стимуляції чи гальмування імунної системи або її окремих ланок, який **відрізняється** тим, що після проведення стимуляції імунних клітин крові в РБТЛ з мітогенами визначають стан окремих клітинних ланок імунітету у хворого і, за зростанням або зменшенням

25 кількості певних субпопуляцій лімфоцитів за допомогою моноклональних антитіл в порівнянні з відповідними показниками здорових осіб, а саме - зразок периферійної крові, взятої із вени, розділяють на 2 частини: першу частину в об'ємі 200,0 мкл інкубують в стерильному живильному середовищі в об'ємі 1,0 мл з додаванням Т клітинного міогену фитогемагглютиніну протягом 48 годин в термостаті, в іншій частині периферійної крові в об'ємі 100,0 мкл

30 визначають кількість основних субпопуляцій лімфоцитів за допомогою панелі моноклональних антитіл (CD 3, 4, 8, 16, 20) до певних кластерів диференціювання лімфоцитів, це будуть контрольні значення рівня певних субпопуляцій, які визначають кількісну характеристику тої чи іншої ланки імунітету, після 48-ї інкубації зразка крові з міогеном визначають повторно рівень цих субпопуляцій лімфоцитів за допомогою вказаних раніше моноклональних антитіл, отримані

35 результати порівнюють з даними контрольного дослідження крові і визначають, як змінився рівень тої чи іншої субпопуляції, чи є активація, чи, навпаки, гальмування певної ланки імунної відповіді при дії стимуляторів проліферації.

---

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

---

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601