



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **112852**

(13) **U**

(51) МПК

**C12N 5/02** (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2016 08216**

(22) Дата подання заявки: **25.07.2016**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **26.12.2016**

(46) Публікація відомостей **26.12.2016, Бюл.№ 24**  
про видачу патенту:

(72) Винахідник(и):

**Смілянська Майя Володимирівна (UA),  
Перемот Світлана Дмитрівна (UA),  
Кашпур Наталія Валеріївна (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ  
МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ІМ. І.І.  
МЕЧНИКОВА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ  
МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ",  
вул. Пушкінська, 14, м. Харків, 61057 (UA)**

## (54) СПОСІБ ЗБІЛЬШЕННЯ КРАТНОСТІ ВІРУСНИХ АНТИГЕНІВ/ДНК В ЛІМФОЦИТАХ КРОВІ

(57) Реферат:

Спосіб збільшення кратності вірусних антигенів/ДНК в лімфоцитах крові шляхом використання в реакціях імунофлуоресценції та проточної цитофлуорометрії нового культурального середовища та спеціальної обробки клітин з метою підвищення їх проліферації та збільшення кількості вірусних антигенів та ДНК. При цьому використовують модифіковане середовище, яке містить: фітогемаглютинін (ФГА) - 40 мкг/мл, інсулін - 40-200 ОД/л, аргінін - 20-40 мг/л, а також каталазу - 1 мг/л та сахарозу - 20-60 мМ, стрептоміцину сульфат - 0,35 мг та натрієву сіль бензилпеніциліну - 350000 ОД/мл.

**UA 112852 U**



Корисна модель належить до медицини і ветеринарії, а саме вірусології, імунології та біотехнології, і може бути використана при діагностиці вірусних захворювань. Культивування культур лімфоцитів в збагаченому неметаболізуючим дисахаридом, ростовими факторами та ФГА-П середовищі дозволяє прискорити вихід вірусного антигену/ДНК, що підвищує якість лабораторної діагностики вірусних інфекцій методами флуоресціюючих антитіл та проточної цитофлуориметрії.

Вірусні інфекції становлять понад 90 % всієї зареєстрованої інфекційної патології. У системі протиепідемічних та лікувально-профілактичних заходів при вірусних захворюваннях основну роль відіграє лабораторна діагностика.

Для репродукції вірусу необхідним є певний стан клітинного транскрипційного апарата. Наприклад, для транскрипції ДНК-вірусів необхідні не тільки клітинна РНК-полімераза II та інші основні компоненти транскрипційного апарата, а й різні активатори, зокрема фактори транскрипції, склад яких різниться в клітинах різних тканин. У деяких заражених клітинах не відбувається репродукції герпесвірусів, і ці віруси зберігаються у латентному стані. Репродукція вірусу простого герпесу, що знаходиться у латентному стані в нейронах гангліїв, починається лише за умови впливу зовнішніх факторів (таких, як лихоманка, пошкодження шкіри, психічна травма), що ініціюють транскрипцію надраних вірусних генів. В В-лімфоцитах, заражених вірусом Епштейна-Барр, спочатку синтезується білок, який стимулює проліферацію клітин. Інший вірусний білок блокує активацію лімфоцитів і репродукцію вірусу, що запускаються системою внутрішньоклітинної передачі сигналу за участі тирозинкінази сімейства Src. Так, деякі аденовіруси та герпесвіруси кодують білки, аналогічні клітинному білку BC 12, який пригнічує апоптоз лімфоцитів.

Репродукція більшості вірусів супроводжується пригніченням синтезу клітинних ДНК, РНК і білків. Це необхідно для того, щоб запобігти або обмежити синтез інтерферону і забезпечити власну репродукцію вірусів перш, ніж в організмі розвинеться повноцінна імунна відповідь.

В даний час розроблені технології культивування більшості клітин *in vitro*. Запропоновано ростові живильні середовища з використанням різних факторів: епідермального фактора росту, фактора росту тромбоцитів, фактора росту кератиноцитів і т. п. До характеристик, що сприяють розмноженню клітин, належать їх низька щільність, висока концентрація  $Ca^{2+}$ , присутність ростових факторів. Вперше про успішне культивування лейкоцитів, що не діляться *in vitro*, повідомив радянський біолог Г.К. Хрущов (1935 р.). У 1958 р. Ноуелл (P. Nowell) запропонував використовувати для стимуляції ділення лейкоцитів речовину, отриману з бобових рослин - фітогемаглютинін (ФГА). Відомий також мікрометод культивування лімфоцитів цільної крові для хромосомного аналізу по Аракакі. Принцип цього методу полягає у наступному: у культурі периферичної крові з фітогемаглютиніном (ФГА - очищений мітоген бобів) лімфоцити вступають в мітотичний цикл щодоби. Через 72 години досягається максимальне число мітозів.

Також відомі наступні способи: «Способ получения питательной среды для культивирования лимфоцитов крови человека» (RU 2084523); «Способ получения питательной среды "лимфокар" для культивирования лимфоцитов периферической крови человека и животных» (RU 2236457).

Ці винаходи належать до біотехнології і стосуються способів отримання живильних середовищ для культивування лімфоцитів крові людини в діагностичних дослідженнях хромосомних аномалій. Живильні середовища для культивування лімфоцитів крові людини містять: живильне середовище RPM1-1640 з HEPES-буфером, сироватку крові великої рогатої худоби, розчин L-глутаміну з антибіотиками, фітогемаглютинін, піруват натрію та ін. Ці середовища забезпечують культивування лімфоцитів крові людини з мітотичним індексом не нижче 30, стабільні протягом тривалого терміну, зручні для використання в медичній практиці в будь-яких умовах, в т. ч. і польових.

Також є «Способ получения вакцины, способ получения свободной от клеток вакцины, способ культивирования клеток, питательная среда» (RU 2126269). Цей винахід належить до нового культивування моношару клітин і до нової композиції, використаної в цьому способі. Для здійснення даного способу необхідно використання збагаченого культурального середовища (на противагу мінімальному середовищу) і додавання до даного збагаченого середовища оптимізованої концентрації ліпиду. Відповідно до даного винаходу використання нового культурального середовища, що включає середовище SRFE-2, доповнене соєвим ліпідом в концентрації приблизно 0,02-0,4 г/мл, забезпечує можливість значно збільшити щільність моношарової клітинної культури. В свою чергу, збільшення щільності моношарової клітинної культури дозволяє збільшити ефективність продукування вірусних антигенів (АГ) для виготовлення противірусної вакцини.

Відомо, що дисахариди, включаючи лактозу, целюлозу і мальтозу, наприклад, сприяють підвищенню кінцевого виходу VZV, проте краще використовувати сахарозу. Такі моносахариди як фруктоза і рибоза не збільшують вихід VZV (рибоза може виявитися навіть токсичною). Було встановлено, що дисахариди, концентруючись в лізосомах зростаючих клітин, сприяють набухання цих лізосом з утворенням вакуолей (De Courcy і Storrie, Exp. Cell. Res. (1991). Дія цього дисахариду на вихід VZV може бути обумовлена ослабленням лізосомного руйнування VZV. Крім додавання дисахаридів, мабуть, продуктивний ефект може дати додавання три- і тетрасахаридів, оскільки, як було зазначено Cohn і Ehrenreich (J. Exp. Med. 129, 201-222 (1969), додавання цих вищих сахаридів або сахарози до макрофагів для підживлення викликає ідентичну вакуолізацію.

Найбільш близьким до запропонованого є «Спосіб визначення вірусного навантаження» № 97513(UA), винахідникам якого є Волянський А.Ю., Смілянська М.В., Перемот С.Д., Кашпур Н.В. та Овчаренко С.В. Суттєвими ознаками запропонованого рішення є взяття крові (з антикоагулянтом (гепарин, 20 од/мл) у пацієнта з дотриманням запобіжних заходів, на знежирених предметних скельцях готують адгезивні відбитки, які потім висушують на повітрі, фіксують в суміші етилового спирту і ацетону у співвідношенні 1:1, проводять забарвлення препаратів для непрямой імуофлуоресценції з використанням специфічних сироваток і антивидових імуноглобулінів, мічених флуоресцин-ізотіоціанатом (ФІТЦ), визначають інтенсивність флуоресценції (ІФ) за допомогою люмінесцентного мікроскопа.

Ознаками, спільними з корисною моделлю, що заявляється, є збір крові, вилучення лімфоцитів із крові, забарвлення препаратів для непрямой імуофлуоресценції з використанням специфічних сироваток і антивидових імуноглобулінів, мічених ФІТЦ.

Основним недоліком даного способу є порівняно низька чутливість способу (при визначенні латентних вірусів, які знаходяться не в стані репродукції) та неможливість вплинути на життєздатність та термін використання досліджуваних клітин.

В основу запропонованої корисної моделі поставлена задача удосконалити спосіб виявлення вірусів в інфекційному матеріалі від хворих людей і тварин шляхом використання в реакції імуофлуоресценції нового культурального середовища та спеціальної обробки клітин з метою підвищення їх проліферації та збільшення визначених вірусних антигенів та ДНК.

Суть способу полягає в наступному: культивування лейкоцитів здійснюють за модифікованою і вдосконаленою методикою. 10 мл венозної крові, взятої стерильно в пробірку з гепарином (1 мл ампульованого гепарину розводять в 20 разів розчином Хенкса), розміщують на 30-40 хв. у холодильнику. Потім, в умовах стерильності в кров додають 0,7-1 мл 10 % розчину желатину для прискорення осадження еритроцитів. Після відстоювання крові плазму відсмоктують і поміщають в стерильну колбу. До плазми додають модифіковане середовище 199 або середовище Ігла з розрахунку 1,5 мл середовища на 1 мл плазми. Модифіковане середовище містить: ФГА - 40 мкг/мл, інсулін - 40-200 ЕД/л, аргінін - 20-40 мг/л, а також каталазу - 1 мг/л та сахарозу - 20-60 мМ, стрептоміцину сульфат - 0,35 мг та натрієву сіль бензилпеніциліну - 350000 ЕД/мл.

Виконується спосіб за етапами:

1. Після ретельного очищення шкіри пацієнта 70 % етиловим спиртом з ліктьової вени набирають 10 мл крові в стерильний шприц.

2. Кров вводять в стерильну пробірку, що містить 0,5 мг розведеного в 20 разів гепарину, через пробку, в яку додатково введена голка для проходження повітря. Приготовлена таким чином кров може зберігатися в холодильнику до 3 діб.

3. Потім в умовах стерильності в кров додають 0,7-1 мл 10 % розчину желатину для прискорення осадження еритроцитів.

4. Після відстоювання крові плазму відсмоктують і поміщають в стерильну колбу.

5. До плазми додають модифіковане середовище 199 або середовище Ігла з розрахунку 1,5 мл середовища на 1 мл плазми. Модифіковане середовище містить: ФГА - 40 мкг/мл, інсулін - 40-200 ЕД/л, аргінін - 20-40 мг/л, а також каталазу - 1 мг/л та сахарозу - 20-60 мМ, стрептоміцину сульфат - 0,35 мг та натрієву сіль бензилпеніциліну - 350000 ЕД/мл.

6. Флакон герметично закривають, енергійно струшують і поміщають у термостат при 37 °С на 24-48 годин, струшуючи в один і той же час.

7. Для аналізу методами прямої імуофлуоресценції та проточної цитофлуориметрії клітини в культуральному середовищі центрифугують в пробірках 10 хвилин при 1200 об./хв., надосадок видаляють.

8. Осад ресуспендують у фосфатному буфері Дульбеко об'ємом 200 мкл. До осаду у вигляді клітин додають моноклональні антитіла CD49f (Stem Cell Technologies, Канада) і поміщають на 30 хв. в холодильник при +(2-4) °С.

9. Після контакту з антитілами частину клітин досліджують за допомогою флуоресцентного мікроскопа з підрахунком інтенсивності флуоресценції (ІФ). Іншу частину клітин аналізують за методом проточної цитофлуориметрії FacsCalibur (Becton Dickinson).

Відмінними від прототипу ознаками є додавання до плазми модифікованого середовища 199 або середовище Ігла з розрахунку 1,5 мл середовища на 1 мл плазми, яке містить: ФГА - 40 мкг/мл, інсулін - 40-200 ЕД/л, аргінін - 20-40мг/л, а також каталазу - 1 мг/л та сахарозу - 20-60 мМ, стрептоміцину сульфат - 0,35 мг та натрієву сіль бензилпеніциліну -350000 ЕД/мл, а також інкубація у термостаті при 37 °С протягом 24-48 годин.

Таким чином, запропонований спосіб дозволяє прискорити вихід вірусного антигену/ДНК шляхом культивування культур лімфоцитів в збагаченому неметаболізуючим дисахаридом, ростовими факторами та ФГА-П середовищі.

Приклад 1. Порівняння кількості вірусного навантаження у пацієнтів з персистуючою герпесвірусною інфекцією запропонованим способом, визначених за допомогою методу флуоресціюючих антитіл (МФА) та полімеразно ланцюгової реакції (ПЛР), з використанням стандартного середовища та модифікованого.

Таблиця

Визначення вірусного навантаження у пацієнтів з персистуючою герпесвірусною інфекцією запропонованим способом з використанням МФА та ПЛР

Герпес віруси	Ступінь вірусного навантаження			
	МФА (F, УОФ)		ПЛР (МО/мл)	
	Стандартний метод	Запропонований метод	Стандартний метод	Запропонований метод
CMV	2,73	4,45	880.000	970.580
EBV	1,57	3,26	400.000	550.000
HHV6	1,08	2,98	150	245

Детекція вірусних АГ та ДНК з використанням модифікованого середовища покращує показники вірусного навантаження в умовних одиницях флуоресценції (УОФ) та МО/мл (див. таблицю).

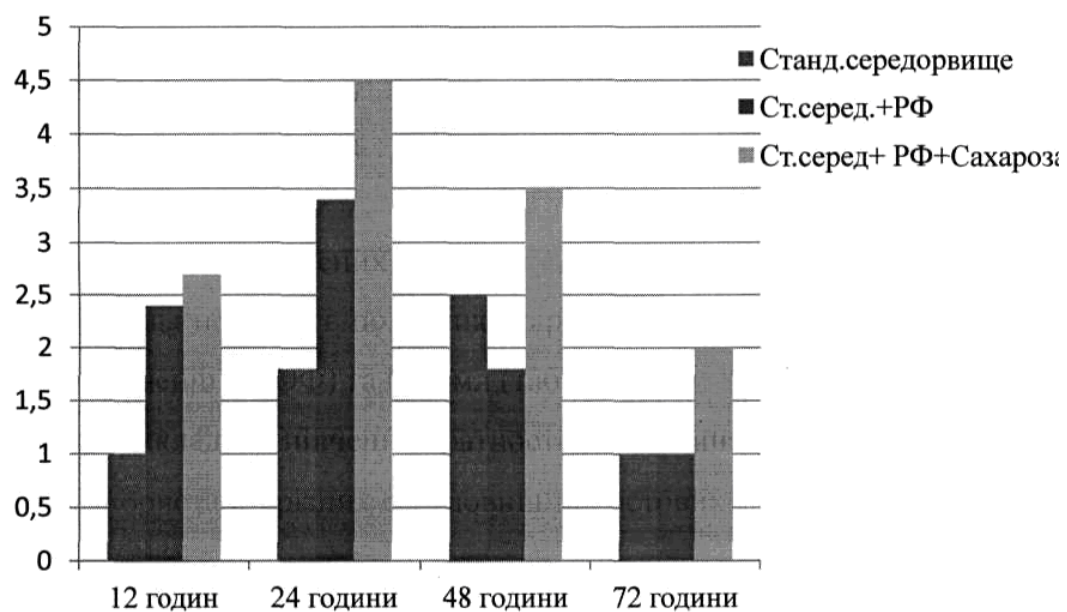
Приклад 2. Вивчення кратності збільшення виявлення АГ герпесвірусів при використанні різних середовищ та ростових факторів (РФ).

Встановлено, що після 12 годин інкубації кратність виявлення АГ/ДНК вірусів герпесу зростає майже в 2,5 разу, а після 24 годин інкубації - в 3,5-4,5 разу. Запропоноване середовище забезпечує збільшення виходу вірусних антигенів в 1,5-2 рази після 48-72 годин інкубації (див. діаграму). Таким чином, оптимальним часом інкубації лімфоцитів в модифікованому середовищі є 24 години.

Аналіз експериментальних даних показав, що запропонований спосіб, на відміну від відомих аналогів, включає середовище з поліпшеними ростовими властивостями для культивування лімфоцитів крові людини, що звільняє від необхідності створення асептичних умов для культивування лімфоцитів крові, стабілізує середовище при зберіганні, прискорює та збільшує вихід вірусного антигену та ДНК, і тим самим підвищує якість лабораторної діагностики вірусних інфекцій методами флуоресціюючих антитіл та проточної цитофлуориметрії.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб збільшення кратності вірусних антигенів/ДНК в лімфоцитах крові, що здійснюють шляхом використання в реакціях імунофлуоресценції та проточної цитофлуориметрії культурального середовища та спеціальної обробки клітин з метою підвищення їх проліферації та збільшення кількості вірусних антигенів та ДНК, який **відрізняється** тим, що використовують модифіковане середовище, яке містить: фітогемаглютинін (ФГА) - 40 мкг/мл, інсулін - 40-200 ОД/л, аргінін - 20-40 мг/л, а також каталазу - 1 мг/л та сахарозу - 20-60 мМ, стрептоміцину сульфат - 0,35 мг та натрієву сіль бензилпеніциліну - 350000 ОД/мл.



Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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