

Изобретение ороется к медицине и биологии клетки и может быть использовано в иммунологии при изучении функциональной активности лимфоцитов и определении общего иммунного статуса организма.

Известен способ регистрации пролиферирующей активности лимфоцитов в реакции бласттрансформации (Чернушенко Е.Ф., Когосова Л.С. Иммунологические исследования в клинике. - Киев: Здоров'я, 1978. -160 с), который заключается в том, что после культивирования с митогеном пролиферирующие лимфоциты учитывают микроскопически по количеству образованных ими бластов или бластоподобных форм.

Основным и существенным недостатком этого способа является то, что при регистрации результатов учитываются только бластные формы лимфоцитов, отличающиеся от лимфоцитарных клеток большими размерами, а лимфоциты на ранних стадиях пролиферации не поддаются учету из-за равных размеров. Кроме того, эти результаты недостаточно специфичны. Это обусловлено тем, что отличающиеся по величине бластные клетки зачастую путают с другими клетками, больших по сравнению с обычными лимфоцитами размеров, например моноцитами. Перечисленные недостатки значительно понижают точность результатов.

Наиболее близким по совокупности существенных признаков к заявляемому техническому решению является способ регистрации пролиферирующей активности лимфоцитов при помощи радиоактивной регистрации пролиферирующей активности лимфоцитов при помощи радиоактивной метки, когда к культивируемому в питательной среде (без тимидина) с митогеном лимфоцитам добавляют специальную метку -азотистое основание, меченное изотопом (как правило H^3 -тимидин). В процессе культивирования метка включается в ДНК пролиферирующих клеток. После отмывания меченные H -тимидином пролиферирующие лимфоциты увеличивают радиоактивность лимфоцитарной взвеси, которую определяют с помощью сцинтилляционного счетчика. Таким образом, о пролиферирующей активности лимфоцитов косвенно судят либо по индексу стимуляции (ИС)

$$(ИС = \frac{\text{имп/мин стимулированных митогеном лимфоцитов}}{\text{имп/мин нестимулированных митогеном лимфоцитов}}),$$

либо просто по имп/мин стимулированных лимфоцитов.

Существенным недостатком данного способа, помимо необходимости работы с радиоактивным материалом, является неудовлетворяющая задача исследования специфичность и точность измерения. Даже по данным автора при наличии высококачественного оборудования ошибка измерения составляет 16-18%. В значительной степени к неспецифическим результатам приводит и невозможность дифференцированного контроля излучающих клеток. Кроме того, на специфичность результатов оказывает влияние наличие фона, качество отмывки, возможное присутствие примесей, что в конечном итоге значительно сказывается на точности результатов.

Задача, которую решает изобретение, состоит в повышении специфичности результатов и точности регистрации пролиферирующей активности лимфоцитов, что является очень важным моментом при характеристике иммунного статуса организма.

Указанный технический результат достигается тем, что в среду культивирования (без тимидина) лимфоцитов с митогеном в качестве специфической* метки вносят производное азотистого основания 5-бром-2'-дезоксисуридин (БДУ), который включается в синтез ДНК пролиферирующих клеток. Для выявления меченных БДУ лимфоцитов их исследуют в иммуноферментном анализе, используя моноклональные антитела к БДУ, в результате чего ядра пролиферирующих лимфоцитов окрашиваются в коричневый цвет. Эти лимфоциты независимо от размеров легко регистрируются под микроскопом. Высокая степень специфичности и точности данного способа достигается 1) возможностью количественного учета непосредственно самих лимфоцитов; 2) четкой визуальной дифференцировкой клеток по окраске ядра; 3) возможностью регистрации пролиферирующих лимфоцитов на всех стадиях пролиферации; 4) конкретным контролем всех исследуемых клеток под микроскопом.

Способ осуществляется следующим образом.

Пробы крови по 5 мл, взятые в узкие пробирки с 0,2 мл гепарина и 2 мл 1 %-ного раствора желатины отстаивают в течение 2 ч при 20°C. Образовавшийся слой лимфоцитов оттягивают пипеткой и ресуспендируют в 2-3 мл среды Игла. Культуру центрифугируют при 400 g в течение 20 мин. Осадок ресуспендируют в 5 мл среды Игла, содержащей 15-20% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 200 ед/мл пенициллина и 100 ед/мл стрептомицина. В пробирки с культурой вносят по 20 мкг/мл фитогемагглютинаина и инкубируют их при 37°C в течение 3 сут в вертикальном положении.

За сутки до конца инкубации в пробирки с инкубационной смесью вносят 1 % 5-бром-2'-дезоксисуридина (БДУ) в качестве специфической метки.

Через 3 сут культивирования культуральную жидкость удаляют, а осадок лимфоцитов ресуспендируют, дважды отмывают, концентрируют в двух каплях раствора Хенкса.

Одну каплю суспензии лимфоцитов вносят в лунку предметного стекла с обозначенными лунками. Излишки суспензии отбирают. Препарат высушивают на воздухе, наносят на него каплю метанола и снова высушивают.

Высушенный препарат обрабатывают 4 М HCl при 37°C (водяная баня) в течение 30 мин, после чего промывают в двух сменах фосфатно-солевого буфера (ФСБ-Т), содержащего 0,15 М NaCl; 0,02 М фосфаты; 5% ЭТС или 1 % бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 0,05% твина-20; pH раствора 7,4.

Наносят на препарат каплю ФСБ-Т с удвоенным содержанием ЭТС или БСА и инкубируют его во влажной камере 20 мин при 20°C, после чего удаляют ФСБ-Т встряхиванием, а излишки жидкости по краям препарата - фильтровальной бумагой.

Наносят на препарат каплю 1 % раствора (на ФСБ-Т) мышиных моноклональных антител к БДУ и инкубируют его во влажной камере 1 ч при 37°C, после чего препарат промывают в 4-х сменах ФСБ-Т по 1-2 мин. Остатки жидкости удаляют фильтровальной бумагой.

Наносят на препарат каплю 1 % раствора (на ФСБ-Т) кроличьих специфических антител к

иммуноглобулинам мыши и снова повторяют процесс инкубации и промывания.

Наносят на препарат каплю 1% раствора (на ФСБ-Т) мышинного моноклонального комплекса пероксидаза-антипероксидаза, повторяя процесс инкубации в предыдущем режиме. Промывают препарат в 8 сменах ФСБ-Т, удаляя остатки жидкости фильтровальной бумагой.

На следующем этапе на препарат наносят каплю 1% раствора 3,3'-диаминобензидина (ДАБ; на ФСБ без твина и ЭТС), содержащего 1:1000 перекиси водорода. Препарат инкубируют при 20°C в течение 5-10 мин, контролируя развитие окраски под микроскопом. Реакцию останавливают промыванием препарата в дистиллированной воде.

Результаты учитывают, просматривая препараты под микроскопом. Пролиферирующие лимфоциты имеют коричневые ядра. Ядра непролиферирующих клеток прозрачны. Отрицательным контролем служат клетки, которые не инкубировались с БДУ.

О пролиферирующей активности лимфоцитов судят по индексу пролиферации (ИПЛ).

$$\text{ИПЛ} = \frac{\text{к-во окрашенных лимфоцитов}}{\text{общее к-во лимфоцитов}}$$

Для определения ИПЛ подсчитывают не менее 100 клеток.

В таблице приведены данные, иллюстрирующие уровень пролиферирующей активности лимфоцитов периферической крови у лиц с различной патологией.

Предлагаемый способ отличается высокой степенью точности и специфичности за счет количественного учета пролиферирующих лимфоцитов, их строгой дифференцировки, возможности регистрации клеток на всех стадиях пролиферации. Применение данного способа не требует дорогостоящего и сложного оборудования, а использование предметных стекол с обозначенными лунками при постановке иммуноферментативной реакции сводит до минимума затраты ценных реактивов и препаратов. Кроме того, отсутствие радиоактивных материалов при использовании данного способа практически полностью делает его безопасным и безвредным для лабораторного персонала.

Группа обследованных лиц	ИПЛ	Количество наблюдений
1 – Реципиенты почечных трансплантатов, принимавшие иммунодепрессивные средства	0,38±0,08	18
2 – Лица, постоянно проживающие на территории, подвергшейся радиационному воздействию	0,54±0,10	26
3 – Лица с остро протекающим инфекционным процессом	0,81±0,06	14