

Корисна модель відноситься до галузі медицини та імунології, а зокрема до способів імуномодуляції і може бути використаний в медичних установах для профілактики та імунотерапії туберкульозу.

В цій галузі прийнято використовувати наступні терміни та скорочення:

ДК - дендритні клітини,

ГМ-КСФ - гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор,

In vitro - поза живим організмом,

Алогенні - чужорідні в межах одного виду,

BCG- Bacillus Calmette-Guerin,

MTSA - M. tuberculosis секреторний антиген,

RPMI-1640 - середовище для культивування клітин in vitro.

Відомий спосіб регуляції імунних реакцій шляхом використання дендритних клітин для захисту організму від внутрішньоклітинних інфекцій [McCormick S, Santosuosso M, Zhang XZ, Xing Z. Manipulation of dendritic cells for host defence against intracellular infections. Biochem Soc Trans. 2006 Apr; 34(Pt 2):283-6]. Він передбачає одержання, культивування дендритних клітин та їх сенсibilізацію антигеном з подальшим введенням в організм. Згідно вищезазначеного способу ДК одержують з кісткового мозку in vitro та використовують, як систему презентації антимикробних вакцин з одночасною доставкою гену, який кодує експресію ГМ-КСФ за допомогою вектора переносу з подальшим введенням такої генетично модифікованої вакцини на основі ДК як парентерально, так і через респіраторний тракт.

Недоліками вказаного способу є малоефективне підсилення специфічної імунної відповіді та можливість виникнення негативних імунологічних змін в імунній системі реципієнта після введення в макроорганізм алогенних ДК. А також шкідливі умови праці обслуговуючого персоналу внаслідок використання хвороботворних штамів мікобактерій, а також методична складність створення вектора переносу гена, який кодує експресію ГМ-КСФ та одержання ДК з кісткового мозку.

Найбільш близьке технічне рішення, вибране в якості найближчого аналогу, є спосіб регуляції імунних реакцій на секреторні антигени Mycobacterium tuberculosis (MTSA) дендритними клітинами [Latchumanan VK, Balkhi MY, Sinha A. Regulation of immune responses to Mycobacterium tuberculosis secretory antigens by dendritic cells. Tuberculosis (Edinb). 2005 Sep-Nov; 85(5-6):377-83. Epub 2005 Oct 24]. Спосіб передбачає одержання, культивування ДК і сенсibilізацію антигенами з подальшим введенням в організм, згідно способу, для одержання дендритних клітин з кісткового мозку виділяють їх попередників та культивують для дозрівання та сенсibilізації секреторними антигенами M. tuberculosis з подальшим їх введенням в макроорганізм.

Недоліками цього способу є малоефективне підсилення специфічної імунної відповіді внаслідок використання алогенних ДК та секреторних антигенів M. tuberculosis (MTSA), які не забезпечують залучення всього спектру мікобактеріальних антигенів, а при введенні в організм алогенних ДК можуть виникати негативні імунологічні зміни в імунній системі реципієнта, а також небезпечні умови праці медичного персоналу внаслідок використання патогенного штаму M. Tuberculosis і методична складність одержання ДК з кісткового мозку.

В основу корисної моделі поставлена задача створити спосіб регуляції імунних реакцій, шляхом введення в організм аутологічних ДК сенсibilізованих антигеном. Використання корпускулярного антигена BCG, який не є патогенним для людини, забезпечить залучення всього спектру мікобактеріальних антигенів, що дозволить підсилити специфічну імунну відповідь та надасть можливість виключити ризик зараження обслуговуючого персоналу, а використання аутологічних ДК із мононуклеарів периферійної крові дозволить уникнути негативних імунологічних змін.

Поставлене завдання вирішується тим, що в способі регуляції імунних реакцій, який включає одержання і культивування дендритних клітин, сенсibilізацію антигеном з подальшим введенням в організм, згідно корисної моделі, дендритні клітини одержують з мононуклеарів периферійної крові, які сенсibilізують корпускулярним антигеном - BCG.

Порівняно з найближчим аналогом, запропонований спосіб дозволяє значно підвищити рівень імуноглобулінів класу G та стимулювати клітинну ланку імунітету до мікобактерій за рахунок використання аутологічних ДК та мікобактеріального корпускулярного антигена, що значно підсилює специфічну імунну відповідь.

Можливість здійснення корисної моделі ілюструється таким прикладом, який не обмежує обсяг правової охорони:

Приклад:

Для одержання дендритних клітин, з вушної вени кроля набирали стерильно 6-8мл крові у пробірки з гепарином і виділяли мононуклеари периферичної крові з використанням градієнта фікол-верографіну (зі щільністю 1,077) шляхом диференціювання моноцитів in vitro з використанням факторів росту. Відмиті мононуклеари периферичної крові розводили середовищем для культивування RPMI-1640 з додаванням 1% аутологічної плазми. Культивували отримані мононуклеари периферичної крові 2 години у чашках Петрі при 37°C і 5% CO₂ для забезпечення адгезії моноцитів. Далі до моноцитів, що адгезувались на полістеролі, додавали свіже середовище з аутологічною плазмою та фактором росту - гранулоцитарно-моноцитарним колонієстимулюючим фактором (ГМ-КСФ). На 3-4 добу культивування до попередників ДК знову додавали ГМ-КСФ. На 6 добу культивування дендритні клітини сенсibilізували ліофілізованими мікобактеріями BCG у співвідношенні 1:1 і продовжували культивування аналогічним способом. На 8 добу культивування отримані ДК мали цитоморфологічні ознаки зрілих дендритних клітин. Такі ДК збирали з чашок Петрі, доводили їх концентрацію до 1×10⁶/мл і в об'ємі 1мл вводили внутрішньовенно досліджуванім кролям.

Дія способу, що заявляється, перевірялась на тваринах, які були попередньо імунізовані зрілими ДК сенсibilізованими мікобактеріальним корпускулярним антигеном, після чого тварин імунізували BCG за комбінованою схемою [Патент України №26447, МПК⁸ А61К39/04, 2007].

Оцінку імунологічних показників проводили через 7 днів після закінчення протоколу імунізації за допомогою гетерогенного твердофазного імуноферментного аналізу та реакції гальмування міграції лімфоцитів (РГМЛ).

Кількість специфічних до BCG імуноглобулінів класу G значно підвищилась у тих тварин, яким до імунізації BCG вводили аутологічні ДК, сенсibilізовані відповідним антигеном (оптична густина - 1,0) у порівнянні з тими тваринами, що були лише імунізовані BCG за комбінованою схемою (оптична густина - 0,65). Рівень специфічних антитіл був також вищий у тих тварин, яким до імунізації BCG вводили аутологічні ДК, не сенсibilізовані бактеріальним антигеном (оптична густина дорівнювала 0,75).

Міграцію на рівні 51% спостерігали у лімфоцитів тих кролів, яким до комбінованої схеми імунізації вводили ДК, сенсibilізовані ліофілізованими BCG. Міграцію лімфоцитів до 60% спостерігали у тварин, яким до комбінованої схеми імунізації вводили ДК не сенсibilізовані антигеном. У кролів, яким проводили лише комбіновану схему імунізації і взагалі не вводили ДК, спостерігали до 82% міграції лімфоцитів.

Отже, порівняно з відомими способами регуляції імунних реакцій, введення аутологічних ДК, сенсibilізованих мікобактеріями штаму BCG, призводить до підвищення специфічної імунної відповіді, як клітинної (на 61%), так і гуморальної (на 35%), при цьому негативних імунологічних змін у тварин, після попередньої імунізації аутологічними ДК не спостерігається.

Використання способу регуляції імунних реакцій, що патентується, дозволить забезпечити ефективне підсилення специфічної імунної відповіді на мікобактерії дозволить уникнути негативних імунологічних змін та виключити ризик зараження обслуговуючого персоналу. Спосіб може бути успішно використаний в медицині для профілактики і імунотерапії туберкульозу.