

Винахід стосується медицини, а саме імунології, і може застосовуватись для визначення цитотоксичної активності природних кілерних клітин (ПКК) з метою оцінки функціонального стану імунної системи людини.

Спосіб визначення активності ПКК необхідний для виявлення або моніторингу порушень ПКК - одного з основних показників природної резистентності організму людини при різних патологіях.

Відомі способи визначення активності ПКК полягають в одержанні ПКК та дослідженні їх цитотоксичної активності проти пухлинних клітин K-562 із застосуванням цитофлуориметричного методу (Пат. №2109288 RU, МПК G01N33/52. Способ определения естественной киллерной активности лимфоцитов человека в условиях гипербарии, 1998; Аточина О.В., Неустроев А.П. Изучение активности естественных киллеров периферической крови человека радиоиммунным методом и с помощью проточной цитофлуориметрии // Цитология. - 1995. - Т.37, № 9/10. - С. 853-858).

Однак, ці способи не є оптимальними та зручними в роботі, не дозволяють тривалий час зберігати проби.

Також відомий і спосіб визначення активності ПКК, що полягає у традиційному виділенні цих клітин, інкубації їх з культурою клітин-мішеней K-562. Культура клітин K-562 окремо обробляється флуорохромом 3,3'-

diotadecyloxycarbocyanine perchlorate (DIO), розчиненим в диметил сульфоксиді (10^6 3mM DIO), який дає зелене забарвлення. В живильне середовище для інкубації клітин-мішеней і ПКК додають другий флуорохром пропідій йодид, який проникає тільки у мертві клітини і дає червоне світіння. Проводять інкубацію клітин-мішеней K-562 і ПКК протягом 2 год. Після закінчення реакції проби аналізують на проточному цитофлуориметрі (FACScan, Becton Dickinson), визначаючи кількість живих та мертвих клітин-мішеней і вираховують індекс цитотоксичності, який і є показником цитотоксичної активності ПКК (Chang L., Gusewitch G. A, Chritton D.B.W. at all. Rapid Flow cytometric assay for the assessment of natural killer cell activity // J. Immunol. Method. - 1993. - Vol.166. - P.45-54).

Однак, цей спосіб є малодоступним через застосування дорогого реактиву (DIO), неможливості застосовувати його для фіксованих клітин та необхідності проведення цитофлуориметрії проб відразу після постановки реакції. Разом з тим, такі проби не можуть довго зберігатись, оскільки знижується їх інтенсивність флуоресценції та життєздатність клітин-мішеней.

В основу даного винаходу поставлена задача розробити такий спосіб визначення цитотоксичної активності ПКК, в якому обробка клітин-мішеней K-562 здійснюється флуорохромом флуоресцеїнізотіоціанатом (FITC) при певних умовах, що дозволяє зберігати проби у фіксованому стані без зниження інтенсивності флуоресценції та життєздатності клітин-мішеней.

Поставлена задача досягається тим, що у способі визначення активності природних кілерних клітин, що включає виділення природних кілерних клітин, інкубацію їх з культурою клітин-мішеней K-562 та обробку цих клітин флуорохромом з доданням до живильного середовища пропідію йодиду та подальшим аналізом проб на проточному цитофлуориметрі, згідно винаходу, в якості флуорохромом використовують флуоресцеїнізотіоціанат у дозі 0,45-0,55мкг/мл, а досліджувані проби фіксують за допомогою 70% етилового спирту.

До такого рішення автори прийшли після проведення серії контрольних експериментів з виявлення можливості тривалого збереження проб та ефективності зв'язування флуорохромів з цитоплазматичними білками фіксованих клітин. Виявлено, що FITC дає достатню інтенсивність флуоресценції для фіксованих клітин K-562. Підібрана концентрація 0,45-0,55мкг/мл є оптимальною, нетоксичною для клітин-мішеней та не впливає на їх життєздатність. Менша ж доза знижує інтенсивність флуоресценції, а більша погіршує життєздатність клітин або негативно впливає на якість та чутливість аналізу на проточному цитофлуориметрі. Фіксація клітин 70% етиловим спиртом дозволяє зберігати їх без втрати інтенсивності флуоресценції протягом 4 тижнів за температури 4°C. Запропонований авторами флуорохром є доступним як за ціною, так і наявністю в продажу та дозволяє зберігати проби протягом 4 тижнів без зниження інтенсивності флуоресценції.

Спосіб здійснюється таким чином.

Виділення ПКК проводили традиційним методом. Для визначення активності ПКК користувались методом з використанням 2-ох флуорохромів: FITC ("Sigma", США), яким мітяться клітини-мішені та пропідій йодид ("Sigma", США), який забарвлює мертві клітини. Як мішені для ПКК використовували клітини мієлолейкозу людини K-562, які культивували *in vitro* в повному живильному середовищі RPMI-1640 за температури 37°C шляхом періодичного пасажу у поновлене повне живильне середовище. До клітин-мішеней був доданий розчин флуорохрома FITC в кінцевому розведенні 0,5мкг/мл. Після цього клітини інкубували протягом 1 год у термостаті за температури 37°C. Робочий розчин пропідію йодиду був доданий до повного живильного середовища в кінцевій концентрації 0,5мкг/мл. Лімфоцити та клітини-мішені K-562 були змішані у співвідношенні 20:1. Проби були поставлені у триплетах. Для утворення кон'югатів пробірки центрифугували при 1500об/хв. протягом 7хв. за кімнатної температури та витримували протягом 10хв. в термостаті за температури 37°C і обережно ресуспендували. Проби інкубували протягом 4 годин за температури 37°C в атмосфері 5% CO₂. Помічені флуорохромом FITC контрольні клітини-мішені інкубували в концентрації $1 \cdot 10^5$ /мл робочого середовища, що містив пропідій йодид для перевірки на наявність спонтанного їх цитолізу в культурі.

Після закінчення інкубації в пробірки додавали розчин Генкса і центрифугували протягом 7хв при 1500об/хв. Осад на дні пробірки ресуспендували в 0,1мл розчині Генкса з EDTA. Для фіксації клітин використовували етиловий спирт 70°. Перед проведенням проточної цитофлуориметрії клітини відмивали розчином Генкса і до осадку додавали 1 мл цього розчину.

Цитофлуориметричний аналіз проводили за допомогою приладу FACStar ("Becton Dickinson", США), обладнаний аргонним лазером за довжини хвилі 488нм. Інтенсивність флуоресценції від двох флуорохромів реєстрували, використовуючи квадрантичну систему dot/plot. Цитотоксичну активність ПКК визначали як різницю числа мертвих клітин-мішеней K-562 у дослідній та контрольній пробах, виражену у відсотках від числа цих клітин в дослідній пробі.

Приклад.

У пацієнта проводять забір периферичної крові, виділяють ПКК та інкубують їх у живильному середовищі, який містить пропідій йодид, з попередньо обробленими флуорохромом FITC у дозі 0,5мкг/мл клітинами-мішенями K-562. Після сумісної інкубації ПКК і клітин-мішеней проби фіксують 70% етиловим спиртом. Проби зберігають протягом 4 тижнів за температури 4°C та в подальшому аналізують за допомогою проточної цитофлуориметрії. Після фіксації та зберігання проби не втратили інтенсивності флуоресценції. Це дало змогу достовірно оцінити функціональний стан імунної системи пацієнта.

Таким чином, спосіб простий у виконанні, доступний, безпечний, дає змогу фіксувати клітини та зберігати їх протягом 4 тижнів без зниження якості та чутливості аналізу за допомогою проточної цитофлуориметрії.