



УКРАЇНА

(19) UA (11) 67035 (13) U
(51) МПК
G01N 33/34 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДЕТЕКЦІЇ IN VITRO ІНТЕНСИВНОСТІ АНТИТІЛОЗАЛЕЖНОГО КЛІТИННО-ОПОСЕРЕДКОВАНОГО ГЕМОЛІЗУ

1

2

(21) u201109313

(22) 25.07.2011

(24) 25.01.2012

(46) 25.01.2012, Бюл. № 2, 2012 р.

(72) ДИЗИК ГАЛИНА МИХАЙЛІВНА, МИРОНЕНКО ГАЛИНА АНАТОЛІЙВНА, ТИМОШЕНКО УЛЯНА ВАСИЛІВНА, АНОШИНА МІЛІТІНА ЮРІЙВНА, ЛАВРОВСЬКА ЛЮБОВ НИКОДИМІВНА

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ГЕМАТОЛОГІЇ ТА ТРАНСФУЗІОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ"

(57) Спосіб детекції in vitro інтенсивності антитілозалежного клітинно-опосередкованого гемолізу шляхом поєднання сенсифілізованих стандартною сироваткою антирезус людських еритроцитів O(I) групи (клітин-мішеней) та досліджуваних лімфоцитів (клітин-ефекторів), який **відрізняється** тим, що активність цитотоксичного ефекту оцінюють в залежності від рівня вільного гемоглобіну з лізованих клітин-мішеней і збільшують кількість досліджуваного супернатанту в 10 разів.

Спосіб належить до галузі медицини, зокрема до лабораторних досліджень в гематології та трансфузіології. Врахування інтенсивності гемолізу сприяє уточненню діагнозу, а також відображає ефективність лікування хворого та перебіг патологічного процесу.

Визначення інтенсивності клітинно-опосередкованого гемолізу, який реалізується ефекторними лімфоцитами без участі комплекменту (антитілозалежної клітинно-опосередкованої клітинної цитотоксичності - АЗКОІ.), має діагностичне значення на стадії розвитку автоімунного процесу, коли власні еритроцити покриваються антиеритроцитарними антитілами (сенсифілізуються) і стають мішенями цитолізу (гемолізу).

Аналогами запропонованого нами способу є мікротест визначення АЗКОЦ із застосуванням бензидинового методу для детекції рівня вільного гемоглобіну [1], нерадіометричний метод оцінки природної цитотоксичності на еритроцитарні клітини-мішені [2].

Принцип оцінки антитілозалежної клітинної цитотоксичності за виходом гемоглобіну з лізованих еритроцитів полягає в тому, що лімфоцити, виділені із гепаринізованої венозної крові людини, поєднуються з еритроцитами барана, покритими антитілами до них. Сироватку з антитілами до еритроцитів барана отримують після імунізації кроликів 10 % зависю еритроцитів барана. Отриману антисироватку інкубували з клітинами-мішенями, після чого поєднували з лімфоцитами людини і продовжували інкубувати при температу-

рі 37 °С. Гемоліз оцінювали шляхом додавання в проби солянокислого бензидину. Вимірювання інтенсивності забарвлення виконували фотометричним методом при довжині хвилі 610 нм.

Недоліками вищенаведеного способу є: необхідність в еритроцитах барана, необхідність утримувати кроликів і проводити їх імунізацію, нестандартність отриманої сироватки, канцерогенність бензидину [4], нестабільність результатів детекції на спектрофотометрі (величина оптичної щільності зростає протягом 10 хв, після чого зменшується практично до нуля).

Для визначення рівня АЗКОЦ використовується також нерадіометричний метод оцінки природної цитотоксичності на еритроцитарні клітини-мішені [2], принципом якого полягає в сумісній інкубації клітин-ефекторів (очищена завись лімфоцитів крові) та клітин-мішеней (еритроцитів барана, К-562). Оцінка цитотоксичності здійснювалася шляхом визначення рівня вільного гемоглобіну з лізованих клітин-мішеней. З метою збільшення оптичної щільності дослідних проб та підвищення чутливості реакції було використано гемоглобінціанідний, бензидиновий, О-діанізидиновий реактиви.

Недоліками методу є необхідність в еритроцитах барана, утримання кроликів і здійснення їх імунізації, нестандартність отриманої сироватки, складність отримання клітин К-562, канцерогенність бензидину [4], нестабільність неспектрофотометричних результатів детекції у випадку застосування бензидинового реагенту.

(19) UA (11) 67035 (13) U

Найближчим аналогом є спосіб оцінки антитілозалежної цитотоксичності бластних клітин периферичної крові [3].

Принципом даного способу є лізис клітинами-ефекторами крові (бластними формами) клітин-мішеней (донорських еритроцитів 0(I)Rh,⁺ сенсibilізованих імунними антитілами IgG стандартної сироватки антирезус в титрі 1:32), з наступним обліком результатів реакції шляхом підрахунку зруйнованих клітин-мішеней. Недоліками описаного методу є складний та кропіткий підрахунок клітин-мішеней, і, як наслідок - відносно суб'єктивна оцінка цитотоксичного ефекту.

Задачею заявленого нами способу є збільшення точності визначення рівня вільного гемоглобіну за рахунок підвищення стабільності забарвлення продуктів реакції, заміна високотоксичних реактивів на безпечніші та доступніші. Активність цитотоксичного ефекту оцінюють в залежності від рівня вільного гемоглобіну з лізованих клітин-мішеней (сенсibilізованих стандартною сироваткою антирезус людських еритроцитів 0(I) групи) і збільшують кількість досліджуваного супернатанту в 10 разів.

В запропонованому нами способі створюється модель *in vitro*, в якій ефекторами слугують виділені лімфоцити досліджуваної особи, а клітинами-мішенями - еритроцити резус-позитивного донора 0(I)Rh⁺, покриті імунними IgG антитілами анти-D. Лімфоцити виділяють із гепаринізованої периферичної крові в градієнті щільності фікол-урографін 1,078, відмивають, підраховують в камері Горяєва і поєднують з клітинами-мішенями в співвідношенні 10 лімфоцитів на одну мішень. Як клітини-мішені ми використовуємо еритроцити людини 0(I)I⁺ (групи крові 0(I), резус-позитивні). Як імунні антитіла використовуємо сироватку антирезус, стандартизовану за титром і афінністю, в субаглютинаційному розведенні. Таким чином, анти-D(Rh₀) антитіла сироватки поєднуються на мембрані еритроцита з антигеном D(Rh₀), покриваючи його IgG антиероцитарними антитілами, і в той же час не викликаючи небажаної аглютинації. Інкубуємо 18 год. при температурі 37 °С. Визначення вільного гемоглобіну з лізованих клітин-мішеней здійснюється за допомогою гемі-ціанідного методу. Для розширення меж діапазону визначування концентрацій та для підвищення точності вимірювання кількість супернатанту збільшено в 10 разів. Вимірювання оптичної щільності розчину вільного гемоглобіну виконуємо на фотометричному обладнанні при довжині хвилі 540 нм у кварцовій кюветі 10 мм проти холостої проби, за яку використовується дистильована вода.

Приклад виконання заявленого способу.

Хворий П-в, 69р., діагноз: автоімунна гемолітична анемія, Hb81 г/л, ер - 2,06x10¹², ретикулоци-

ти - 35 %, пряма проба Кумбса позитивна (++++), непряма проба Кумбса виявила аутоантитіла (+++). Тобто у хворого в наявності передумови гемолітичного процесу, але залишається невідомим спрямування його - чи прогресує гемоліз, чи регресує.

Визначення активності гемолізу запропованою методикою і порівняння із такою у здорової людини (у наших дослідженнях - донорів крові) дає нам відповідь на поставлене питання.

У донора крові Б-ко, 36 р. взято шляхом венепункції 15 мл крові, з якої виділено лімфоцити, в подальшому, в ході реакції, їх поєднано з еритроцитами інтактного донора 0(I)D⁺, покритими анти-D сироваткою, згідно із запропонованою методикою.

Через 18 год. оптичним методом на спектрофотометрі враховано активність комплементнезалежного гемолізу.

Установлено:

1. У хворого індекс цитотоксичності становить 5,6 %.
2. У донора індекс цитотоксичності становить 0,6 %.

Таким чином, моделювання *in vitro* процесу гемолізу еритроцитів, покритих аутоантитілами, показало суттєві відмінності між гемолітичним процесом у хворого на аутоімунну гемолітичну анемію і таким у здорової людини. В першому випадку має місце гемоліз, активність якого достовірно перевищує в 9,32 раза даний показник у здорової людини. Повторне дослідження даного показника у хворого допоможе оцінити перебіг хвороби і ефективність лікування.

Джерела інформації:

1. Зимин Ю.И. Новый микрометод оценки антителозависимой клеточной цитотоксичности по выходу гемоглобина из лизированных эритроцитов / Зимин Ю.И., Чуканов С.В., Качанов Б.С., Марчук А.И. // Лабораторное дело, 1984. - №9. - С. 556-559.
2. Гордиенко С.М. Нерадиометрические методы оценки естественной цитотоксичности на эритроцитарные клетки-мишени / Гордиенко С.М. // Иммунология.-1984. №1.-С.31-36.
3. С.А.Гусева. Антителозависимая цитотоксичность бластных клеток периферической крови при острых лейкозах / С.А.Гусева, Л.М.Тищенко // Врачебное дело, 1988. - №1. - С. 55-56.
4. Вещества, продукты, производственные процессы и факторы с доказанной для человека канцерогенностью 2.1.4. Бензидин // Перечень веществ, продуктов, производственных процессов, бытовых и природных факторов, канцерогенных для человека, гигиенические нормативы. ГН 1.1.725-98.