



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **24278** (13) **U**
(51) **МПК (2006)**
A61B 10/02
G01N 33/535

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЦИТОКІНСЕКРЕТУЮЧОЇ ФУНКЦІЇ АДГЕРЕНТНИХ НЕЙТРОФІЛЬНИХ ГРАНУЛОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ IN VITRO

1

(21) u200701290

(22) 08.02.2007

(24) 25.06.2007

(46) 25.06.2007, Бюл. №9, 2007р.

(72) Кадан Людмила Павлівна, Петішкіна Валерія Миколаївна, Підгайна Олена Анатоліївна, Панасюкова Оксана Романівна

(73) ІНСТИТУТ ФТИЗІАТРІЇ І ПУЛЬМОНОЛОГІЇ ІМ. Ф.Г. ЯНОВСЬКОГО АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

2

(57) Спосіб визначення цитокінсекретуючої функції адгерентних нейтрофільних гранулоцитів периферичної крові in vitro, що включає виділення чистої популяції нейтрофільних гранулоцитів з периферичної крові, інкубацію та вимірювання вмісту цитокінів в інкубаційному середовищі методом імуноферментного аналізу, який відрізняється тим, що проводять попередню активацію нейтрофільних гранулоцитів периферичної крові шляхом адгезії клітин до скла, а інкубацію проводять протягом 4 годин у поживному середовищі 199.

Корисна модель відноситься до галузі біології та медицини і може бути використана в експериментальних дослідженнях та клінічній практиці для визначення цитокінсекретуючої функції адгерентних нейтрофільних гранулоцитів периферичної крові in vitro у експериментальних тварин, здорових людей та хворих з різною патологією.

Найбільш близьким до способу, що пропонується, є спосіб визначення цитокінсекретуючої функції нейтрофільних гранулоцитів периферичної крові in vitro [див. Швидченко І.Н., Нестерова І.В., Синельникова Е.Ю. Цитокінсекретующая функция нейтрофильных гранулоцитов // Иммунология. - 2005. - №1. - С.31-34], який полягає у тому, що після забору периферичної крові у пацієнта виділяють популяцію нейтрофільних гранулоцитів на подвійному градієнті фікол-верографіну, інкубують клітини у повному поживному середовищі RPMI ("Difco") в атмосфері з 5% CO₂ при 37°C протягом 20 годин, після чого визначають спонтанну чи індуковану продукцію цитокінів (фактора некрозу пухлин альфа - ФНП α , інтерферону гама - ІНФ γ та інших) в супернатанті методом твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА) з використанням комерційних тест-систем.

Спонтанна продукція цитокінів, що визначається за цим методом складає у здорових осіб: ФНП α -14,98 \pm 5,98пг/мл; ІНФ γ -49,07 \pm 18,38пг/мл.

Але цей метод має ряд недоліків, а саме:

- тривалий час проведення дослідження - 20,5 годин;

- потребує застосування повного поживного середовища (середовище RPMI ("Difco") та особливого устаткування, такого як CO₂-інкубатор, що обмежують широке застосування цього методу в лікувальних закладах та науково-дослідних установах нашої країни.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення способу визначення цитокінсекретуючої функції нейтрофільних гранулоцитів периферичної крові in vitro, в якому завдяки попередній адгезії нейтрофільних гранулоцитів периферичної крові до скла та інкубації у поживному середовищі 199 протягом 4 годин досягається скорочення терміну та зменшення вартості дослідження.

Поставлене завдання вирішується тим, що у способі визначення цитокінсекретуючої функції адгерентних нейтрофільних гранулоцитів периферичної крові in vitro шляхом виділення чистої популяції нейтрофільних гранулоцитів, інкубації та вимірювання вмісту цитокінів в інкубаційному середовищі методом імуноферментного аналізу, згідно корисної моделі, проводять попередню активацію нейтрофільних гранулоцитів периферичної крові шляхом адгезії клітин до скла, а інкубацію проводять протягом 4 годин у поживному середовищі 199.

(13) **U**

(11) **24278**

(19) **UA**

Відомо, що зрілі нейтрофільні гранулоцити належать до високоспеціалізованих клітин. Вони не здатні ділитися, мають готовий набір біологічно активних речовин, зосереджених в гранулах і при стимуляції відразу ж починають проявляти свої потенційні можливості, реалізуючи їх без особливої морфологічної перебудови. Активовані нейтрофільні гранулоцити секретують поряд із різноманітними ферментами широкий спектр цитокінів, за допомогою яких вони здійснюють імунорегулюючий вплив на інші клітини імунної системи. У диференційованих, короткоживучих нейтрофільних гранулоцитах (в крові нейтрофільні гранулоцити перебувають 3,5-7 годин) при активації спостерігаються різноманітні події, пов'язані з експресією генів. Визначені зміни в експресії генів, що кодують чисельні транскрипторні фактори та генів, які відповідають за перебудову хроматину та регуляторів синтезу білку. Вказані події відбуваються переважно протягом першої години після активації клітин [див. Gene expression in mature neutrophils: early responses to inflammatory stimuli / Xueqing Zhang, Yuval Kluger, Yasuhiro Nakayama et al. // Journal of Leukocyte Biology. - 2004. - Vol. 75 - P.358-372]. В межах 2 годин відбуваються зміни в рівнях декілька сотень мРНК, відповідальних за синтез цитокінів, рецепторів, продуктів, що регулюють апоптоз, та мембранних регуляторів транспорту [див. RNA expression patterns change dramatically in human neutrophils exposed to bacteria / V.B. Yerramilli, K. Subrahmanyam, Shigeru Yamaga et al. // Blood. - 2001. - Vol. 97, N.8. - P.2457-2468].

Відомо, що виділення лейкоцитів з периферичної крові на градієнті щільності призводить до їх активації, про що свідчить посилення експресії молекул адгезії CD 11b та CD16 [див. Watson F, Robinson J.J., Edwards S.W. Neutrophil function in whole blood and after purification: changes in receptor expression, oxidase activity and responsiveness to cytokines // Biosci Rep. - 1992. - Vol. 12, N2. - P.123-133]. Також відомо, що адгезія нейтрофілів до ендотеліальних клітин є необхідною умовою для подальшого виконання клітинами своїх функцій і є важливим фактором їх функціональної активації. Ця властивість застосовується при проведенні методик з вивчення різноманітних функцій фагоцитуючих клітин. Звичайно використовується скляний чи пластиковий не силіконований посуд. При інкубації нейтрофілів на склі (пластику) відбувається адгезія нейтрофільних гранулоцитів до цих матеріалів. Тому ми застосовували цю методику, яка дозволила додатково активувати нейтрофіли після виділення їх на градієнті щільності і, таким чином, отримати матеріал для визначення вмісту цитокінів, що виділили клітини в інкубаційне середовище.

Спосіб здійснюють таким чином.

2мл венозної крові нашаровують на градієнт філол-верографіну щільністю $1,090\text{г/см}^3$. Обережно збирають плазму крові та нашаровують її на філол-верографін щільністю $1,078\text{г/см}^3$. Протягом

30хв. при осаджують клітини у центрифугу при 5°C . Збирають супернатант, відмивають клітини середовищем 199 протягом 10хв. при 1500об./хв. , знову збирають супернатант, залишаючи нейтрофільні гранулоцити, що знаходяться на дні пробірки у 1мл поживного середовища 199. Підраховують кількість нейтрофільних гранулоцитів у камері Горяєва, доводять концентрацію клітин до 1млн/мл поживним середовищем 199 та поміщають по 0,25мл клітин в лунку предметного скельця діаметром 1,5см, попередньо нанесеною за допомогою парафілму. Через 15хв. після початку інкубації скла з лункою при 37°C у вологій камері його тричі промивають у забуференому фізіологічному розчині з $\text{pH}=7,2$, звільнюючи від клітин, що не мають здатності до адгезії. Таким чином, отримують моношар адгерентних нейтрофілоцитів. Додають в лунку з клітинами 0,25мл поживного середовища 199 та проводять інкубацію при 37°C у вологій камері протягом 4-х годин.

Після її закінчення поживне середовище обережно зливають у центрифужну пробірку, центрифугують при 1000об./хв. 10хв. для осадження нейтрофілів, які могли залишитися у середовищі і в подальшому впливати на кінцевий результат вимірювання вмісту цитокінів. Збирають супернатант та проводять методику визначення вмісту цитокінів з використанням комерційних тест-систем. Загальний термін дослідження складає 4,5год.

Наводимо конкретні приклади здійснення способу.

Приклад 1. Донор К. 48 років. Проведено визначення вмісту гама інтерферону ($\text{ІНФ}\gamma$) та фактору некрозу пухлин альфа ($\text{ФНП}\alpha$) за способом, що пропонується. Вміст $\text{ІНФ}\gamma$ в супернатанті склав 214пкг/мл (за методикою прототипом 180пкг/мл). Вміст $\text{ФНП}\alpha$ в супернатанті склав $27,0\text{пкг/мл}$ (за методикою прототипом $26,7\text{пкг/мл}$), тобто було отримано практично ідентичні результати вимірювання вмісту цитокінів в супернатанті при інкубації клітин протягом 4 годин та 20 годин.

Приклад 2. Хворий С, 19 років. Проведено визначення вмісту гама інтерферону ($\text{ІНФ}\gamma$) та фактору некрозу пухлин альфа ($\text{ФНП}\alpha$) за способом, що пропонується. Вміст $\text{ІНФ}\gamma$ в супернатанті склав 242пкг/мл (за методикою прототипом 210пкг/мл). Вміст $\text{ФНП}\alpha$ в супернатанті склав 618пкг/мл (за методикою прототипом 690пкг/мл), тобто було отримано практично ідентичні результати вимірювання вмісту цитокінів в супернатанті при інкубації клітин протягом 4 годин та 20 годин.

Всього за способом, що пропонується, обстежено 5 донорів крові та 10 хворих на туберкульоз легень. В Таблиці наведені порівняльні дані вмісту цитокінів в супернатанті, отриманому при інкубації нейтрофільних гранулоцитів протягом 4 та 20 годин у здорових донорів крові та хворих на туберкульоз легень.

Таблиця

Вміст цитокінів у супернатанті, отриманому при інкубації нейтрофільних гранулоцитів протягом 4 та 20 годин у здорових донорів крові та хворих на туберкульоз легень

№	Обстеження особи	ІНФ γ пкг/мл		ФНП α пкг/мл	
		4 год.	20 год.	4 год.	20 год.
1.	Донор З., 21р.	242	240	21,5	27
2.	Донор К., 48р.	214	180	27	26,7
3.	Донор П., 52р.	186	184	32	26,7
4.	Донор П., 33 р.	180	181	13	14
5.	Донор Г., 25р.	188	242	15,7	22
6.	Хворий Ш., 39р.	75	30	58	184
7.	Хворий С., 21р.	240	240	880	512
8.	Хворий Т., 24р.	244	314	648	432
9.	Хворий М., 38р.	192	210	955	1025
10.	Хворий М., 71р.	214	220	775	1130
11.	Хворий Е., 56р.	220	182	590	752
12.	Хворий З., 45р.	394	214	716	700
13.	Хворий Ш., 50р.	206	230	1200	660
14.	Хворий С., 19р.	242	210	618	690
15.	Хворий Г., 18р.	224	224	224	224

Середній вміст ІНФ γ в супернатанті здорових осіб після 4 годинної інкубації склав $202,0 \pm 12,9$ пкг/мл, ФНП α - $21,8 \pm 3,9$ пкг/мл (за методикою прототипом після 20 годин інкубації - $207,4 \pm 23,7$ пкг/мл та $23,3 \pm 2,8$ пкг/мл відповідно). У хворих на туберкульоз легень за методикою, що пропонується, рівень ІНФ γ в супернатанті склав $225,1 \pm 25,7$ пкг/мл, ФНП α - $666,4 \pm 111,2$ пкг/мл (за методикою прототипом після 20 годин інкубації - $203,8 \pm 26,3$ пкг/мл та $630,9 \pm 102,3$ пкг/мл відповідно).

Таким чином, застосування популяції адгерентних нейтрофільних гранулоцитів дозволяє зна-

чно зменшити час (з 20,5 до 4,5 годин) дослідження та його вартість (за рахунок використання поживного середовища 199).

Даний спосіб може бути застосований у здорових осіб та хворих для оцінки рівня секреції нейтрофільними гранулоцитами цитокінів при різних патологічних процесах, його змін в процесі лікування, вивчення впливу лікарських препаратів в пробах *in vitro* на інтенсивність синтезу цитокінів з метою з'ясування можливості використання цих препаратів для корекції виявлених порушень.