



УКРАЇНА

(19) UA (11) 43662 (13) A

(51) 7 G01N33/53

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВІНАХІДвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ОЦІНКИ ПОШКОДЖЕНЬ МОНОЦИТІВ ТА АЛЬВЕОЛЯРНИХ МАКРОФАГІВ

(21) 2001042899

(22) 27 04 2001

(24) 17 12 2001

(46) 17 12 2001, Бюл. № 11, 2001 р.

(72) Гоц Тетяна Юріївна

(73) ГОЦ ТЕТЯНА ЮРІЇВНА

(57) Спосіб оцінки пошкоджень моноцитів та альвеолярних макрофагів шляхом дослідження крові або бронхоальвеолярної рідини та виз-

начення їх функціональної активності, який відрізняється тим, що альвеолярні макрофаги або моноцити периферичної крові культивують в рідині з додаванням бичачого альбуміну та антибіотиків протягом семи днів при температурі 37°C, після чого клітини центрифугують, додають моноклональні антитіла і після завершення інкубації підраховують клітини та оцінюють рівень пошкодження моноцитів та альвеолярних макрофагів

Вінахід, що заявляється, стосується медицини, точніше внутрішніх хвороб, та призначений для діагностики та лікування захворювань з втягуванням макрофагального ланцюга резистентності організму

Макрофаги та моноцити є клітинними факторами природної резистентності організму і проявляють активність у всіх тканинах, органах і порожнинах, можуть виходити на поверхню слизових оболонок і там здійснювати захисну функцію (1) Альвеолярні макрофаги (AM) представляють собою гетерогенну популяцію клітин, в якій розрізняють кілька фенотипів (2) Субпопуляції альвеолярних макрофагів характеризуються за наявністю відповідних маркерів на їх поверхні Крім того, AM - це гетерогенна популяція фагоцитів, які являються клітинами на різних стадіях активації та диференцировки (3) Ці клітини здібні змінювати належність до відповідного фенотипу, який регулює їх функціональні властивості за рахунок мембранних антигенів (4) Модуляція мембранних антигенів, ймовірно, допомагає AM ефективно регулювати фагоцитуючу активність в легенях

Критеріями функціональної активності макрофагів можуть бути фагоцитарна активність та бактерицидні властивості, здібність до розпластання, агрегації, контактуванню з лімфоцитами Для дослідження впливу різних факторів на функціональну активність макрофагів їх культивують з лімфокинами, інтерферонами, гормонами тимусу та іншими біологічно активними речовинами (5)

Найбільш близьким прототипом ми вважаємо мікроскопічний спосіб визначення фагоцитарної

активності макрофагів, який передбачає вивчення фарбованих препаратів клітин в прохідному світлі за допомогою світлового або люмінесцентного мікроскопу Але недоліками цього методу є його суб'єктивність, що пов'язано з помилками стандартизації, неврахуванням гетерогенності популяцій моноцитів та макрофагів, а також великим впливом на показники різноманітних умов культивування клітин (5)

Задача, яка вирішується способом, що заявляється, полягає у підвищенні ефективності діагностики та лікування внутрішніх захворювань з урахуванням пошкоджень макрофагального ланцюга імунітету

Технічний результат полягає в тому, що досягається більш патогенетично зумовлена об'єктивна діагностика ушкоджень макрофагів, що дає змогу своєчасно призначити адекватне лікування

Задача вирішується тим, що альвеолярні макрофаги або моноцити периферичної крові культивують в рідині RPMI-1640 із додаванням 10% інактивованого бичачого альбуміну і антибіотиків (50 У/мл пеніциліну, 50 мкг/мл гентаміцину і 50 мкг/мл стрептомицину) Підрахунок клітин проводився за допомогою лічильника клітин

$2 \cdot 10^6$  клітин поміщали в пластикові шестилункові планшети для культивування тканин і ставили на дві години у водяний інкубатор при температурі 37°C Клітини, які не адгезувалися, аспірувалися, а планшети промивалися з використанням PBS, після чого добавлялося середовище для тривалої інкубації адгезованих макрофагів Середовище, у якому культивувалися AM, змінюва-

лося кожні два дні разом з досліджуваними препаратами

Після семи днів культивування клітин центрифугували на мікроцентрифузі з максимальною швидкістю 12000 x g протягом 20 сек. Середовище, в якому культивувались клітини, вилучалося, а клітинний осад ( $0,5 \cdot 10^6$  клітин) ресуспендували в 500 мкл фосфатного буферу з додаванням 3,5% розчину бичачого сировоткового альбуміну. Моноклональні антитіла до RFD1 поверхневим антигенам (IgM миші) та RFD7 (IgG1 миші) додавали відповідно в розведенні 1:200. Отримані зразки інкубували 30 хв при кімнатній температурі. Процес інкубації закінчували центрифугуванням і аспірацією надосадної рідини. Клітинний осад промивали 3 рази розчином фосфатного буфера. Осад знову суспендували у фосфатному буфері з додаванням бичачого сировоткового альбуміну. Флюоресцюючий антимишиний IgM та антимишиний IgM помічений R-фикоеритрином були додані відповідно в розчині 1:100 та інкубувалися 30 хв при кімнатній температурі. Після закінчення інкубації клітинний осад тричі промивали з використанням фосфатного буфера. Клітини суспендували в 1% розчині формальдегіду в фосфатному буфері та зберігали при 4°C до проведення цитометричного аналізу.

Флоуцитометричний аналіз проводили за допомогою FACScan флоуметру з використанням програмного забезпечення 30.

Приклади. Вплив інтерферону-гамма та дексаметазону на розподілення макрофагів людини

Умови культивування	RFD1+	RFD7+	RFD1+/RFD7+
Моноцити крові	6%	10%	58%
Моноцити + ІФ-γ	67%	-	8%
Моноцити + Дек	2%	60%	15%
Альвеолярні макрофаги	8%	12%	64%
AM + ІФ-γ	48%	4%	39%
AM + Дек	3%	57%	

Таким чином даний спосіб оцінки пошкодження моноцитів та альвеолярних макрофагів може використовуватись для клінічної оцінки показ-

ників неспецифічної резистентності організму, а також для визначення різноманітного впливу ендогенних та екзогенних факторів на стан загальної резистентності організму. Виражене пригнічення неспецифічної резистентності організму має місце при алергічних захворюваннях, особливо під час їх загострення (бронхіальна астма, астматичний бронхіт), при дефіциті харчування, в період адаптації організму до нових кліматичних умов, а також при несприятливих умовах навколишнього середовища (радіація, хімічні агенти та інші фактори).

При порівнянні з прототипом даний спосіб оцінки пошкодження моноцитів та альвеолярних макрофагів дозволяє проводити дослідження в динаміці, яка дає можливість побачити зміни резистентності під впливом лікування, що проводиться, або іншої дії. Крім того, деякі лікарські препарати, які широко використовуються для лікування різних хвороб (антибіотики, кортикостероїди, імунодепресанти), можуть змінювати неспецифічну резистентність, у зв'язку з чим ці засоби необхідно назначати суворо за показниками, під контролем стану резистентності хворих.

#### Література

1 Войтенко Б.О., Окулов В.Б. Основные характеристики макрофага (M) как клетки-эффектора // Вестн Рос АМН - 1995 - N 4 - С 59-64

2 Poulter L.W., Rook G.A., Steele J. et al. Influence of 1,25-(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> and gamma interferon on the phenotype of human peripheral blood monocyte-derived macrophages // Infect Immunol - 1987 - Vol 55 - P 2017-2020

3 Semenzato G. Immunology of interstitial lung diseases: cellular events taking place in the lung of sarcoidosis, hypersensitivity pneumonitis and HIV infection // Eur Respir J - 1991 - Vol 4 - P 94-102

4 Spiteri M.A., Clarke S.W., Poulter L.W. Alveolar macrophages that suppress T-cell response may be crucial to the pathogenic outcome of pulmonary sarcoidosis // Eur Respir J - 1992 - Vol 5 - P 394-403

5 Пастер Е.У., Овод В.В., Позур В.К. и соавт. Иммунология. Практикум - К. Выща шк. Изд-во при Киев ун-те, 1989 - 304 с.

Тираж 50 екз

Відкрите акціонерне товариство «Патент»

Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101

(03122) 3 – 72 – 89 (03122) 2 – 57 – 03

