



УКРАЇНА

(19) UA (11) 56474 (13) A  
(51) 7 G01N33/50МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДВидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУ ПРОДУКЦІЇ ІНТЕРЛЕЙКІНА-2 ТА ЕКСПРЕСІЇ РЕЦЕПТОРІВ ДО ІНТЕРЛЕЙКІНА-2, ЩО АСОЦІЙОВАНІ З HLA-АНТИГЕНАМИ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ НИРКОВУ НЕДОСТАТНІСТЬ

1

2

(21) 2002064746

(22) 10 06 2002

(24) 15 05 2003

(46) 15 05 2003, Бюл. №5, 2003 р.

(72) Драннік Георгій Миколайович, Порошина Тетяна Вікторівна, Дриянська Вікторія Євгенівна, Калініна Наталя Альбертівна, Луньова Ганна Геннадівна

(73) ІНСТИТУТ УРОЛОГІЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

(57) Спосіб прогнозу продукції інтерлейкіна-2 та експресії рецепторів до інтерлейкіна-2, що асоці-

йовані з HLA-антигенами у хворих на хронічну ниркову недостатність, який включає визначення HLA-антигенів на мононуклеарах периферичної крові, який відрізняється тим, що визначають HLA-DR2-антиген у фенотипі хворих на хронічну ниркову недостатність, присутність якого свідчить про високий рівень продукції інтерлейкіна-2 та експресії рецепторів до інтерлейкіна-2, що є ознакою підвищеного ризику розвитку гострої реакції відторгнення алотрансплантованої нирки

Винахід відноситься до медицини, а саме до клінічної імунології, і може бути використаний для лабораторного прогнозу рівня продукції інтерлейкіна-2 (ІЛ-2) та експресії рецепторів до інтерлейкіна-2 у хворих на хронічну ниркову недостатність, які є потенційними реципієнтами трансплантата аlogenної нирки

Незважаючи на те, що наукові досягнення в галузі генетики імунної відповіді вже мають відображення у практиці, насамперед при інфекційних хворобах, дослідження цього питання знаходяться у фазі розробки. Розуміння під таким кутом зору взаємозв'язку між HLA-фенотипом суб'єкта і схильністю до синтезу імунокомпетентними клітинами цитокінів має не тільки теоретичне значення, але може бути практично доцільним, оскільки є підставою для прогнозу перебігу клінічного процесу та призначення терапевтичних препаратів

За останні роки отримані дані про те, що ІЛ-2, який продукується Т-хелперами 1 типу, належить головна роль в клітинних імунних реакціях на алотрансплантований орган, насамперед при гострій реакції відторгнення аlogenної нирки. Відомо, що ІЛ-2 контролює процеси проліферації, диференціації та функціональну активність Т-, В- та ПК-клітин, а порушення експресії рецепторів до ІЛ-2 призводять до дефектів їх функціонування. Ступінь гістосумісності між донором та реципієнтом під час алотрансплантації нирки визначається на підставі тканинного типування та виявлення HLA-

фенотипів донора та реципієнта. На сьогодні у більшості країн типування засновано на ідентифікації антигенів сублокусів HLA-A, -B, -C та DR. Це свідчить про те, що не тільки виживання трансплантатів, але й виживання реципієнтів залежить від сумісності за HLA-антигеном між реципієнтом та донором [1].

Такі теоретичні аспекти можуть скласти основу для прогнозу рівня продукції інтерлейкіна-2 та експресії рецепторів до інтерлейкіна-2 мононуклеарами периферичної крові на підставі визначення антигенів системи HLA у хворих на хронічну ниркову недостатність.

Відомий спосіб визначення взаємозв'язку між параметрами імунного статусу та HLA-фенотипів у здорових донорів бурятської та російської національності [2], який взято за прототип, де встановлений зв'язок високого рівня продукції ІЛ-2 з В7 у HLA-фенотипі здорових осіб російської національності.

Недоліком способу є те, що відсутні дані про існування асоційованого зв'язку HLA-антигенів з рівнем експресії рецепторів до ІЛ-2, та не відомо, чи існує така залежність у хворих на хронічну ниркову недостатність.

В основу винаходу поставлена задача удосконалення способу прогнозу продукції інтерлейкіна-2 та експресії рецепторів до інтерлейкіна-2, що асоційовані з HLA-антигенами у хворих на хронічну ниркову недостатність, які є потенційними реципі-

(13) A

(11) 56474

(19) UA

ентами алогенної нирки, шляхом виявлення конкретних антигенів HLA-системи, що дозволить прогнозувати високий ризик негативних ускладнень у післяопераційному періоді, насамперед, високий ризик гострої реакції відторгнення трансплантату алогенної нирки

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб прогнозу продукції інтерлейкіну-2 та експресії рецепторів до інтерлейкіну-2, що асоційовані з HLA-антигенами у хворих на хронічну ниркову недостатність, який включає визначення HLA-антигенів на мононуклеарах периферійної крові, згідно з винаходом визначають HLA-DR2-антиген у фенотипі хворих на хронічну ниркову недостатність, присутність якого свідчить про високий рівень продукції інтерлейкіну-2 та експресії рецепторів до інтерлейкіну-2, що є ознакою підвищеного ризику розвитку гострої реакції відторгнення ало-трансплантованої нирки

Спосіб прогнозу продукції інтерлейкіну-2 та експресії рецепторів до інтерлейкіну-2, що асоційовані з HLA-антигенами у хворих на хронічну ниркову недостатність виконують таким чином

Периферійну кров хворого, стабілізовану гепарином, розводять фізіологічним розчином у співвідношенні 1 : 2 В центрифужні пробірки вносять 2 - 3мл розчину суміші поліглюкіну з верографіном і на нього пастерівською піпеткою нашаровують 1 - 2мл розведеної крові Пробірки з кров'ю центрифугують при 1500зв/хв 25 - 30хв Кільце клітин, яке створюється на кордоні двох середовищ, збирають піпеткою та переносять в суху пробірку, в яку додають 1 - 2мл фізіологічного розчину та центрифугують при 1500зв/хв 10хв Цю процедуру повторюють двічі Клітини після відмивання доводять фізіологічним розчином до концентрації 1000 - 2000 в мм<sup>3</sup>

Комплемент отримують із суміші сироваток крові 5 - 7 кроликів таким чином з сонної артерії тварин у центрифужні пробірки забирають 20 - 40мл крові Після створення згустку сироватку відділяють та відділені зразки центрифугують при 3000 - 5000зв/хв 20хв Отримані сироватки змішують та розливають по 0,4 - 0,8мл в поліетиленові пробірки та зберігають при t -20°C

Хід реакції анти-HLA-сироватки до HLA-антигенів локусів -A, -B, -C, -DR розкапують у лунки планшетів Тerasaki під вазелинове масло та витримують при t -20°C Перед визначенням HLA-антигенів, планшети Тerasaki з сироватками залишають в умовах кімнатної температури В кожну лунку камери під вазелинове масло та сироватку вводять 0,001мл суспензії лімфоцитів Реагенти змішують покачуванням камери 2 - 3хвилини, потім камери залишають в термостаті при t 37°C на 60 хвилин Після цього в кожну лунку вносять по 0,005мл комплекменту, змішують покачуванням камери протягом 2 - 3хв та знову інкубують в термостаті при t 37°C 60 хвилин 3 лунок камери тонкою піпеткою або легким струсом камери видаляють вазелинове масло та вносять в кожну лунку по 0,001мл розчину трипанової синьки Камери інкубують в термостаті при t 37°C протягом 5хв, струшуванням видаляють краску та проводять підрахування результатів за допомогою мікроскопі (збільшення 9 x 10, 10 x 15)

Антигени локусу HLA-DR визначають у пролонгованому тесті комплемент залежної лімфоцитотоксичності з попереднім збагаченням взвеси мононуклеарів В-лімфоцитами на колонках з нейлонової вати

Результати реакції облічують шляхом підрахунку відсотку "мертвих" (профарбованих) лімфоцитів в кожній лунці

0 - 15% "мертвих" - негативний результат,

16 - 20% "мертвих" - слабо позитивний результат (+),

21 - 50% "мертвих" - позитивний результат (++),

51 - 75% "мертвих" - виражений позитивний (+++),

76 - 100% "мертвих" - різко позитивний (++++)

HLA-фенотип визначають на основі результатів мікроскопії змісту лунок з позитивною реакцією з сироватками

Практичне застосування способу, що пропонується, проведене при обстеженні 43 хворих на хронічну ниркову недостатність, які знаходились на лікуванні у відділі трансплантації нирки Інституту урології та нефрології АМН України - Інститут урології АМНУ

Наводимо приклади взаємозв'язку рівня продукції ІЛ-2 з HLA-фенотипом

Приклад 1 Розподіл хворих на хронічну ниркову недостатність по групах в залежності від рівня продукції ІЛ-2

1 група - хворі, у яких рівень продукції ІЛ-2 був вищий за норму (n = 14),

2 група - хворі, у яких рівень продукції ІЛ-2 - менший за норму (n = 20)

Середні значення продукції ІЛ-2 в 1 та 2 групах, абсолютна (n) та відносна (%) кількість хворих з антигенами A2, DR2, DR7 в фенотипі, наведені у таблиці 1 Частота присутності інших HLA-антигенів була малою і для подальшого аналізу не використовувалась При застосуванні запропонованого способу індивідуальний аналіз частоти присутності HLA-антигенів у фенотипах показав, що у хворих 1 групи, де ІЛ-2 продукує здібність лімфоцитів периферійної крові була вище за норму, найбільш часто виявлялися антигени гістосумісності HLA-A2 (50%), - HLA-DR7 (50%), - HLA-DR2 (83%)

Таблиця 1

Частота HLA-антигенів у хворих на хронічну ниркову недостатність в залежності від рівня продукції ІЛ-2

ІЛ-2 (Од Акт) 1 гр	HLA-антиген	n (+АГ)	(%) (+АГ)	ІЛ-2 (Од Акт) 2гр	n (-АГ)	(%) (-АГ)
19,4±1,3	A2	7	50*	4,2±1,2	5	25
	DR2	12	83*		4	20
	DR7	6	50*		5	25

Примітка, 1) \* різниця достовірна (P < 0,05) в порівнянні даних присутності одного АГ у хворих 1 та 2 груп

2) n (+АГ) та n (-АГ) - абсолютна (n) та віднос-

на (%) кількість хворих 1 та 2 груп відповідно з присутністю та відсутністю даного HLA-антигену

Аналіз даних, що отримані в групі хворих з низькою продукцією ІЛ-2 мононуклеарами периферійної крові свідчить, що HLA-DR2 антиген також був присутній у виборці, але у меншій кількості хворих. Відрізнялась також частота присутності в фенотипі хворих - HLA-A2 антигенів (25%) та DR7-антигенів (25%)

Приклад 2 Розподіл хворих на хронічну ниркову недостатність по групах в залежності від рівня експресії ІЛ-2Р

3 група - хворі, у яких рівень експресії ІЛ-2Р був вищим за норму ( $n = 20$ ),

4 група - хворі, у яких рівень експресії ІЛ-2Р меншим за норму ( $n = 10$ )

Середні значення експресії рецепторів до ІЛ-2 у хворих третьої та четвертої груп, абсолютна ( $n$ ) та відносна (%) кількість хворих в цих групах з антигенами A2, DR2, DR7 в фенотипі, наведено у таблиці 2

Аналіз отриманих даних при застосуванні запропонованого способу показав, що в групі хворих, де напередодні алотрансплантації кількість ІЛ-2Р-позитивних клітин була вищою за норму, у фенотипі хворих на хронічну ниркову недостатність HLA-антигени зустрічались з частотою A2 - 50%, DR7 - 45%, DR 2 - 83%. У фенотипі хворих 4 групи, що мали низьку кількість ІЛ-2Р-позитивних клітин, HLA -A2, -DR2 та -DR7-антигени були присутні з меншою частотою, тобто антиген HLA-DR2 був прийнятний у хворих на хронічну ниркову недостатність з високим рівнем експресії рецепторів до ІЛ-2 частіше інших

Таблиця 2

Частота HLA-антигенів у хворих на хронічну ниркову недостатність в залежності від рівня ІЛ-2Р+ клітин

ІЛ-2Р+ (%) 3 гр	HLA- антиген	n (+АГ)	(%) (+АГ)	ІЛ-2Р+ (%) 4гр	n (-АГ)	(%) (-АГ)
21,3±2,7	A2	10	50*	4,14±0,9	1	10
	DR2	18	83*		4	40
	DR7	9	45		4	40

Примітка 1) \* різниця достовірна ( $P < 0,05$ ) в порівнянні даних 3 та 4 груп 2)  $n$  (+АГ) та  $n$  (-АГ) - абсолютна ( $n$ ) та відносна (%) кількість хворих 1 та 2 груп відповідно з присутністю та відсутністю даного HLA-антигена

В 3 групі хворих, де напередодні алотрансплантації кількість ІЛ-2Р-позитивних клітин була вищою за норму, у фенотипі хворих на хронічну ниркову недостатність HLA-антигени зустрічались

з частотою A2 - 50%, DR7 - 45%, DR 2 - 83%. У фенотипі хворих 4 групи, що мали низьку кількість ІЛ-2Р-позитивних клітин, HLA -A2, -DR2 та -DR7-антигени були присутні з меншою частотою, тобто антиген HLA-DR2 був присутній у хворих на хронічну ниркову недостатність з високим рівнем експресії рецепторів до ІЛ-2 частіше інших

Порівняння даних взаємозв'язку антигенів системи HLA з показниками експресії та продукції ІЛ-2 показало, що високий рівень параметрів, які досліджуються, маркується антигенами HLA-A2, -DR7, -DR2

Приклад 3 Хворі на хронічну ниркову недостатність (10 осіб), у яких одночасно на рівні високої продукції ІЛ-2 визначали високий зміст ІЛ-2Р-позитивних клітин. В цієї групі при застосуванні запропонованого способу виявили у 9 з 10 хворих в HLA-фенотипі присутній антиген HLA-DR2, тобто у 90% хворих

Таким чином, отримані результати дозволили визначити генетичну схильність частини хворих на хронічну ниркову недостатність до високих показників ІЛ-2-залежної ланки імунітету. Значною мірою ця залежність пов'язана з HLA-DR-2 антигеном, тому що він визначався у 90% хворих з високим рівнем продукції та експресії ІЛ-2 клітинами периферійної крові та у 83% хворих з високим рівнем одного з показників, які досліджували

На підставі вищесказаного можна зробити такі висновки

- встановлено зв'язок між особливостями продукції та експресії ІЛ-2 та HLA-фенотипом, що свідчить про присутність HLA-генетичного контролю імунного статусу у хворих на хронічну ниркову недостатність

- присутність у фенотипі хворих на хронічну ниркову недостатність одночасно HLA-DR2 та HLA-A2 антигенів асоційовано з високим рівнем продукції та експресії ІЛ-2, що є ознакою підвищеного ризику розвитку гострої реакції відторгнення алотрансплантованої нирки. Запропонований спосіб дозволяє без додаткових витрат використовувати імуногенетичну (HLA-фенотип) характеристику пацієнта для прогнозу рівня продукції та експресії ІЛ-2

Джерела інформації, прийняті до уваги при експертизі

1 Возианов А.Ф., Бутенко А.К., Зак К.П. Цитокіни. Биологическое и противоопухолевое свойства. - Киев: Наукова думка, 1998. - 312 с.

2 Алексеев Л.П., Яздовский В.В., Хаитов Р.М. Межэтнические различия в генетическом контроле иммунного статуса человека // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. - 2000. - Т. 86, №3. - С. 280 - 284.