



УКРАЇНА

(19) UA (11) 58203 (13) U
(51) МПК
G01N 33/53 (2011.01)
G01N 33/577 (2011.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ СТАНУ ІМУНОКОМПЕТЕНТНОЇ СФЕРИ ОРГАНІЗМУ

1

(21) u201009694

(22) 03.08.2010

(24) 11.04.2011

(46) 11.04.2011, Бюл.№ 7, 2011 р.

(72) ГОЛЬЦЕВ АНАТОЛІЙ МИКОЛАЙОВИЧ, ЛУЦЕНКО ОЛЕНА ДМИТРІВНА, ДУБРАВА ТЕТЯНА ГЕОРГІВНА, САФРАНЧУК ОЛЬГА ВОЛОДИМИРІВНА, ПОРОЖАН ЄВГЕНІЯ ОЛЕКСАНДРІВНА, БОНДАРОВИЧ МИКОЛА ОЛЕКСАНДРОВИЧ, ДІМІТРОВ ОЛЕКСІЙ ЮРІЙОВИЧ, ЧЕЛОМБИТЬКО ОЛЬГА ВАСИЛІВНА, ОСТАНКОВ МАКСИМ ВАДИМОВИЧ, РАССОХА ІРИНА ВІКТОРІВНА, СІРОУС МАРИНА АНАТОЛІВНА

2

(73) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(57) Спосіб оцінки стану імунокомпетентної сфери організму, що включає визначення методом проточної цитофлюориметрії середньої інтенсивності флюоресценції (СІФ) та кількості світних клітин з визначеним фенотипом, який **відрізняється** тим, що на основі цих показників розраховують сумарний показник світіння (СПС) абсолютної кількості світних клітин (АКСК) в органі або периферичній крові за формулою: $СПС = АКСК \times СІФ$ і, порівнюючи цей показник з прийнятим за норму, роблять висновок про стан імунокомпетентної сфери організму.

Корисна модель належить до галузі експериментальної медицини і може бути використана при розробці методів впливу на імунний статус.

Відомий спосіб оцінки стану імунокомпетентної сфери організму методом полімеразної ланцюгової реакції, який ґрунтується на виявленні нуклеїнових кислот [1].

Відомий спосіб оцінки стану імунокомпетентної сфери організму методом імуноферментного аналізу, в основі якого лежить принцип взаємодії імуносорбента - антигена з антитілами, які необхідно виявити [2].

Відомий спосіб оцінки стану імунокомпетентної сфери організму методом імуноблотингу, який дозволяє виявляти антигени й антитіла [3].

Відомий спосіб оцінки стану імунокомпетентної сфери організму, в основі якого лежить здатність комплекменту, багатофункціонального білкового фактора сироватки теплокровних тварин, зв'язуватися з комплексом антиген-антитіло [4].

Відомий спосіб оцінки стану імунокомпетентної сфери організму за допомогою реакції непрямой гемоглютинації, яка заснована на здатності еритроцитів, на поверхні яких попередньо адсорбовані антигени або антитіла, аглютинуватися в присутності гомологічних сироваток або відповідних антигенів [5].

Загальним недоліком усіх цих способів є те, що жоден з них не може самостійно бути викорис-

таний для об'єктивної оцінки стану імунокомпетентної сфери організму. Щоб одержати повну характеристику про стан імунокомпетентної сфери організму необхідно застосовувати кілька способів, що робить оцінку стану імунокомпетентної сфери досить трудомісткою, складною і дорогою.

Найближчим до заявленого є спосіб оцінки стану імунокомпетентної сфери організму методом проточної цитофлюориметрії [6]. Спосіб полягає в наступному. У тварин беруть зразки крові, вносять відповідну кількість моноклональних антитіл (МАТ) та інкубують впродовж 20 хвилин. До кожного зразка додають по 1мл лізуюче-фіксуючого розчину і витримують 15 хвилин при кімнатній температурі. Далі центрифугують, надосадову рідину відбирають, а клітинний осад розводять у 0,5мл ізотонічного розчину. Аналіз флюоресценції здійснюють на проточному лазерному цитофлюориметрі Facs Calibur з використанням програмного забезпечення Cell Quest. Реєструють середню інтенсивність флюоресценції (СІФ) та відсоток світних клітин з визначеним фенотипом. На підставі порівняння кожного з цих показників з нормою роблять висновок щодо стану імунокомпетентної сфери організму.

Основним недоліком цього способу є його не-об'єктивність. Це пояснюється тим, що окремі показники не можуть дати повну інформацію, що відображує функціональний потенціал всього ор-

(13) U
(11) 58203
(19) UA

гана або периферичної крові. Тому складно комплексно оцінити стан імункомпетентної сфери, яка є показником імунного статусу організму. Крім того, може виникнути ситуація, коли один з показників відповідає нормальним значенням, а інший істотно відрізняється від норми. Тоді потрібні додаткові методи дослідження.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалити відомий спосіб оцінки стану імункомпетентної сфери організму шляхом введення інтегрального показника, і таким чином підвищити його об'єктивність.

Ця задача вирішується тим, що, у способі оцінки стану імункомпетентної сфери, який включає визначення методом проточної цитофлюориметрії СІФ та кількості світних клітин з визначенням фенотипом, відповідно до корисної моделі, на основі цих показників розраховують сумарний показник світіння (СПС) абсолютної кількості світних клітин (АКСК) в органі або периферичній крові за формулою:

$СПС = АКСК \times СІФ$, і, порівнюючи цей показник з прийнятим за норму, роблять висновок про стан імункомпетентної сфери.

Спосіб, що заявляється, забезпечує можливість об'єктивної оцінки функціонального стану імункомпетентної сфери всього органа або периферичної крові по одному інтегральному показнику і не вимагає використання додаткових методів дослідження для характеристики імунного статусу.

Спосіб здійснюють таким чином:

В органі або периферичній крові методом проточної цитофлюориметрії визначають СІФ та відсоток клітин з визначеним фенотипом і перераховують на АКСК. Інтегральний показник розраховують за формулою: $СПС = АКСК \times СІФ$. СПС порівнюють зі значеннями, прийнятими за норму й оцінюють стан імункомпетентної сфери.

Спосіб пояснюється наступними прикладами.

Приклад 1.

Стан імункомпетентної сфери оцінювали у здорових лабораторних білих пацюків і тварин з експериментальним алергічним енцефаломієлітом (ЕАЕ). Для цього досліджували клітинну суспензію тимуса пацюків у нормі та при патології. Методом проточної цитофлюориметрії визначали клітини з фенотипом CD3, використовуючи МАТ до цього маркера. Після інкубації клітин тимуса з МАТ протягом 30 хвилин при 37°C, їх відмивали в 100мкл середовища Хенкса. До осаду додавали 500мкл середовища Хенкса. Клітини аналізували на проточному цитофлюориметрі з використанням програми Cell Quest. Реєстрували СІФ та відсоток світних клітин з маркером CD3 (Табл. 1). Отримані результати показників тварин з ЕАЕ достовірно не відрізнялись від здорових. Але при даній патології це неможливо. Після перерахування відсотка клітин тимуса здорових тварин на АКСК і помноження на показник СІФ ($28,26 \times 273 = 7714,98$) був отриманий СПС. Аналогічним чином розраховували СПС для клітин тимуса пацюків з ЕАЕ ($33,19 \times 281 = 9326,39$), який виявився на 20,9% вище у порівнянні зі здоровими. На підставі цього

був зроблений висновок щодо скомпрометованого стану імункомпетентної сфери у пацюків з ЕАЕ.

Приклад 2.

У мишей викликали розвиток реакції трансплант проти хазяїна (РТПХ). Оцінювали стан імункомпетентної сфери у здорових тварин і з РТПХ. Для цього визначали вміст Т-регуляторних клітин з фенотипом $CD4^+CD25^+$ у селезінці на проточному цитофлюориметрі FACS Calibur, використовуючи МАТ за протоколом, подібно прикладу 1. Реєстрували СІФ та відсоток світних клітин, з подвійним маркером (Табл.2). Отримані результати відсотка клітин були перераховані на АКСК. Було відмічено зниження АКСК і підвищення СІФ у тварин з РТПХ у порівнянні з аналогічними показниками здорових мишей, на основі чого неможливо зробити висновок про стан імункомпетентної сфери. Розраховували СПС. У тварин з РТПХ $СПС = 17,67 \times 141 = 2491,47$, що на 14% нижче, ніж у здорових тварин - $СПС = 24,36 \times 119 = 2898,84$. Це об'єктивно свідчило про розвиток патологічного процесу, порушення функціонального стану імункомпетентної сфери та відповідало дійсності.

Приклад 3.

У периферичній крові здорових білих пацюків лінії Wistar і тварин з ішемічним інсультом (ІІ) визначали клітини з фенотипом CD4. Для цього у тварин брали зразки крові, додавали МАТ до CD4, після 30 хвилин інкубації відмивали в 100 мкл середовища Хенкса, доливали 1 мл лізіруюче-фіксуєчого розчину і витримували 15 хвилин при кімнатній температурі. Далі центрифугували, надосадову рідину відбирали, а клітинний осад розводили у 0,5мл ізотонічного розчину. Клітини аналізували на проточному цитофлюориметрі з використанням програми Cell Quest. Реєстрували СІФ та відсоток світних клітин з фенотипом CD4, які перераховували на АКСК (Табл. 3). У тварин з ІІ ці показники не істотно відрізнялись від аналогічних у здорових тварин, що свідчило про відсутність патології, тобто не відповідало дійсності. Об'єктивний висновок про порушення стану імункомпетентної сфери у тварин з ІІ був зроблений після розрахунку СПС. Він на 7,1% нижче, ніж у здорових тварин, що підтвердило наявність патологічного процесу.

Приклад 4.

Оцінку зміни стану імункомпетентної сфери мишей з цукровим діабетом (ЦД) проводили до і після лікування стовбуровими клітинами кісткового мозку і порівнювали отримані результати з показниками здорових тварин. Для цього виділяли селезінку, отримували клітинну суспензію і досліджували популяцію $CD8^+$ клітин. Після інкубації з МАТ до CD8 протягом 30 хвилин при 37°C клітини відмивали в 100мкл середовища Хенкса. Потім додавали 1мл лізіруюче-фіксуєчого розчину і витримували 15 хвилин при кімнатній температурі. Після цього центрифугували, надосадову рідину відбирали, а клітинний осад розводили у 0,5мл ізотонічного розчину. Клітини аналізували на проточному цитофлюориметрі з використанням програми Cell Quest. Реєстрували СІФ та відсоток світних клітин з маркером CD8, який був перерахований на АКСК (Табл. 4). При патології АКСК збільшувалося, а

після лікування несуттєво знижувалося, протилежним чином змінювався СІФ. З цих даних важко об'єктивно оцінити ефективність застосованої терапії. Був знайдений СПС, який свідчив про те, що стан імунотропної сфери істотно змінився при ЦЦ, що відповідало дійсності, а застосована терапія стовбуровими клітинами кісткового мозку покращила цей стан.

Отже, інтегральний показник СПС у порівнянні з окремими показниками СІФ та АКСК враховує функціональні зміни, що відбуваються в органі або периферичній крові, об'єктивно відображуючи стан імунотропної сфери, а отже імунний статус організму.

Таблиця 1

Показники CD3 ⁺ клітин в тимусі здорових пацієнтів і при ЕАЕ		
	Здорові тварини	Тварини з ЕАЕ
АКСК	28,26±1,41	33,19±3,52
СІФ	273±13,65	281±9,1
СПС	7714,98±19,24	9326,39±32,03

Таблиця 2

Показники CD4⁺CD25⁺ клітин у селезінці здорових мишей і при РТПХ

	Здорові тварини	Тварини з РТПХ
АКСК	24,36±2,1	17,67±2,5
СІФ	119±11,4	141±10,2
СПС	2898,84±23,9	2491,47±25,5

Таблиця 3

Показники CD4⁺ клітин у периферичній крові здорових пацієнтів і при ІІ

	Здорові тварини	Тварини з ІІ
АКСК	99,66±13,7	94,63±9,8
СІФ	227±21,6	222±19,4
СПС	22622,82±295,9	21007,86±190,1

Таблиця 4

Показники CD8⁺ клітин у селезінці здорових пацієнтів і при ЦД

	Здорові тварини	Тварини з ЦД до лікування	Тварини з ЦД після лікування
АКСК	16,59±3,1	42,54±5,3	36,09±4,2
СІФ	156±13,7	112±11,8	119,58±14,5
СПС	2588,04±42,5	4764,48±62,5	4315,64±60,9

Джерела інформації:

1. Hashimoto M., Hirota K., Yoshitomi H. et al. Complement drives Th17 cell differentiation and triggers autoimmune arthritis. // J Exp Med. - 2010 - 207 (6) - P.1135-1143.

2. Frey O., Meisel J., Hutloff A. et al. Inducible costimulator (ICOS) blockade inhibits accumulation of polyfunctional T helper 17 cells and mitigates autoimmune arthritis. // Ann Rheum Dis. - 2010 - 69 (8) - P.1495-1501.

3. Terjung B., Sohne J., Lechtenberg B. et al. p-ANCA in autoimmune liver disorders recognise human beta-tubulin isotype 5 and cross-react with microbial protein FtsZ. // Gut. - 2010 - 59 (6) - P.808-816.

4. Кишкун А.А. Современные методы диагностики и оценки эффективности лечения инфекции, вызванной Helicobacter pylori // Клиническая Лабораторная Диагностика - 2002. - №8. - с.41-46.

5. Sari C, Ertug S., Karadam S.Y. et al. The comparative evaluation of Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Indirect Hemagglutination Test (IHA) and Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) in the diagnosis of cystic echinococcosis. // Turkiye Parazitoloj Derg. - 2009 - 33 (1) - P.73-76.

6. Wolff A.S., Oftedal B.E., Kisand K. et al. Flow cytometry study of blood cell subtypes reflects autoimmune and inflammatory processes in autoimmune polyendocrine syndrome type I. // Scand J Immunol. - 2010 - 71 (6) - P.459-467.