



УКРАЇНА

(19) UA (11) 60629 (13) A

(51) 7 A61B5/00, A61K39/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДВИДАЄТЬСЯ ПІД
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ
ВЛАСНИКА
ПАТЕНТУ

(54) СПОСІБ ІНДУКЦІЇ АПОПТОЗУ МОНОНУКЛЕАРНИХ КЛІТИН ПЕРИФЕРІЙНОЇ КРОВІ

1

2

(21) 2003010400

(22) 16 01 2003

(24) 15 10 2003

(46) 15 10 2003, Бюл. № 10, 2003 р.

(72) Мамонтова Тетяна Василівна, Кайдашев Ігор Петрович, Куценко Неля Леонідівна, Кривонос Тетяна Василівна

(73) Мамонтова Тетяна Василівна, Кайдашев Ігор Петрович, Куценко Неля Леонідівна, Кривонос Тетяна Василівна

(57) Спосіб індукції апоптозу мононуклеарних клітин периферійної крові, що включає їх виділення, активацію апоптозу та його оцінку, який відрізняється тим, що активацію апоптозу мононуклеарних клітин здійснюють моноклональними антитілами до HLA - A, B, C, HLA - DR та CD95 молекул, а рівень апоптозу оцінюють застосовуючи забарвлення флуоресцентним та цитологічним барвниками

Запропонований винахід відноситься до галузі біології і медицини і може бути використаний для індукції апоптозу клітин імунної системи

Апоптоз це процес, який є різновидом клітинної смерті, і необхідний для підтримання гомеостазу організму, а також обумовлює його нормальне функціонування. При atopічних захворюваннях спостерігається інпбування апоптозу лімфоцитів, що може бути однією з причин для протікання хронічного запалення в дихальних шляхах у хворих з atopічною бронхіальною астмою [Vignola AM, Chiappara G, Gagliardo R, Gjornmark M, Merendino A, Siena L, Bousquet J, Bonsignore G Apoptosis and airway inflammation in asthma // Apoptosis 2000 Nov;5(5) 473-85]. В той же час відомо, що при atopічних захворюваннях відбувається активація Th2-клітин і підвищена продукція цитокінів IL-4, IL-5, IL-13, IL-5 сприяє дозріванню еозинофілів і їх активації. IL-4/IL-13 індукують В-клітини до синтезу IgE. Звідси, з імунологічних позицій причиною, якщо не головною, то досить суттєвою, є підвищена активність Th2-клітин. Отже, є беззаперечним, що одним із напрямків в імунomodуляції цих процесів є застосування чинників, які б стимулювали індукцію апоптозу імунотетентних клітин, активація яких призводить до розвитку запальних процесів.

Відомі способи індукції апоптозу лімфоцитів за допомогою глюкокортикостероїдів [Бойчук С В, Мустафін І Г, Фассахов Р С, Терещенко Д В. Спонтанний і глюкокортикоид - индуцированный апоптоз лимфоцитов больных atopической бронхальной астмой: роль митохондрий и CD95 (APO-

1) // Аллергология - 2002 - № 1 С 13-20], моноклональних антитіл BION-1, які призводять до блокування продукції лімфоцитами запальних цитокінів IL-5, GM-CSF і IL-3 [Ramshaw HS, Woodcock JM, Bagley CJ, McClure BJ, Hercus TR, Lopez AF. New approaches in the treatment of asthma // Immunol Cell Biol 2001 Apr; 79(2) 154-8].

Найбільш близьким до запропонованого є спосіб індукції апоптозу лімфоцитів з використанням специфічної імунотерапії [Порядин Г В, Салмаси Ж М, Макаров А И. Апоптоз лимфоцитов - один из механизмов специфической иммунотерапии atopических заболеваний // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины - 1998 - Т 125 - № 4 - С 434-436], за допомогою якого запускається процес апоптозу лімфоцитів, що призводить через деякий час до пригнічення реакції на антиген і зниження синтезу IgE.

Для здійснення цього способу використовували лімфоцити периферійної крові 12 хворих atopічною формою бронхіальної астми в стадії ремісії, які проходили прискорений курс CIT в Інституті імунології Мінздраву Росії. Вивчення поверхневих маркерів та морфології клітин крові проводили двічі: до початку курсу CIT і відразу після його закінчення.

Мононуклеарні клітини виділяли з периферійної венозної крові центрифугуванням в одноступеневому градієнті щільності фікол-верографіну. Кількість клітин, експресуючих відповідні мембранні антигени, визначали методом непрямой імунofлуорисценції з використанням мишачих моноклональних антитіл та Fab-фрагментів козя-

(13) A

(11) 60629

(19) UA

чих муноглобулінів проти антитіл миші, мічених ізотіоціанатом флуорисцену. Препарат мікроскопіювали у водному імерсійному середовищі. Проводили кількісну оцінку основних популяцій та субпопуляцій лімфоцитів CD3⁺ (Т-лімфоцити), CD4⁺ (хелперно-індукторні Т-клітини), CD8⁺ (супресорно-цитотоксичні Т-лімфоцити), CD72⁺ (В-лімфоцити), кількість лімфоцитів з ранніми ознаками активації CD25⁺ (рецептор для інтерлейкіну-2), CD71⁺ (рецептор для трансферину) та CD23⁺ (низькоафінний рецептор для Fc-фрагменту IgE, маркер активації В-лімфоцитів). Визначали кількість лімфоцитів з пізніми ознаками активації - HLA-DR⁺ - клітини, а також клітин, "готових" до апоптозу (по експресії CD95), кількість яких збільшувалася після прийому СІТ. Оцінювали наявність і специфічність флуоресценції не менше, ніж у 200 клітин. В кожному дослідженні проводили контроль життєздатності клітин з трипановим синім (не менше 98%) і неспецифічного зв'язування міченої сироватки (не більше 4%).

Мазки крові готували за загальноприйнятою методикою, фіксували метанолом, фарбували по Романовському - Гімза. Лімфоцити в апоптозі характеризувались фрагментацією ядра.

Однак відомий спосіб має ряд недоліків.

1 Дослідження апоптозу мононуклеарів периферійної крові хворих проводились під час стадії ремісії, що не дозволяє встановити вплив даного способу індукції на пригнічення запальних процесів шляхом апоптозу в період загострення.

2 Застосування антигенів (білкових носіїв) при СІТ терапії для індукції Т-залежної відповіді має певні особливості. Рівень імунної відповіді на білковий носій детермінований в кожного індивіда ігеноми. Повторне використання одного носія призведе як до підвищення чутливості, так і до супресії імунної відповіді. А отже ми не можемо говорити про однозначну спрямованість дії СІТ на процеси апоптозу.

3 Експресія CD95 не є обов'язковим критерієм запуску процесів апоптозу, а виявляє лише готовність клітин до прийняття сигналу через Fas рецептор.

4 Для вивчення морфологічних ознак апоптозу був використаний лише один метод.

В основу винаходу поставлене завдання створити спосіб індукції апоптозу мононуклеарних клітин периферійної крові, шляхом удосконалення відомого, який дозволяє здійснювати спрямовану індукцію апоптозу мононуклеарних клітин периферійної крові та комплексно оцінювати апоптоз.

Поставлене завдання вирішують створенням способу індукції апоптозу мононуклеарних клітин периферійної крові, який згідно винаходу відрізняється тим, що активацію апоптозу мононуклеарних клітин здійснюють моноклональними антитілами до HLA-A,B,C, HLA-DR та CD95 молекул, та включає їх виділення, активацію апоптозу, а комплексну оцінку апоптозу проводять застосовуючи забарвлення флуоресцентним та цитологічним барвниками.

Перевагами способу, що заявляється є

1 Дозволяє індукувати апоптоз мононуклеарних клітин периферійної крові на початкових етапах в період загострення захворювання,

2 Спосіб надає можливість реєструвати участь в трансдукції апоптотичного сигналу не тільки CD95, але і про молекул МНС I і II класу, що надає нові можливості у розкритті в механізмі апоптозу,

3 Імуностимулюючі властивості моноклональних антитіл та селективність індукованої ними імуностимуляції роблять їх безумовно привабливими для індукції апоптозу мононуклеарних клітин периферійної крові,

4 Комплексна оцінка процесів апоптозу із застосуванням специфічних морфологічних методів дослідження апоптозу (фарбування Hoechst 33342 та за Май-Грюнвальд-Романовським-Гімза) забезпечує надійність візуальної оцінки процесу.

Спосіб виконують наступним чином.

Дослідження проведено у 15 хворих на atopічну алергію, віком від 16 до 20 років з встановленим позитивним шкірною пробі на аероалергени ("Імунолог", м. Вінниця). За 72 години до забору крові хворі припиняли приймати метилксантини та антигістамінні препарати. До контрольної групи входило 15 здорових донорів, віком від 16 до 40 років, з негативною шкірною пробі на аероалергени.

Для виявлення апоптозу МНПК у пацієнтів бралась венозна кров натщесерце. 10 мл гепаринізованої крові змішували з фосфатносолевим буфером (ФСБ) в пропорції 1:1, потім обережно нашаровували на градієнт густини фіколу і верографіну (1,077 г/мл) і центрифугували (1500 об/хв, 30 хв). Потім суспензію мононуклеарів двічі відмивали в ФСБ і визначали кількість клітин. В кожній серії дослідів проводили контроль життєздатності клітин з трипановим синім (не менше 98%). МНПК 1 - 2×10^6 клітин/мл культивували в середовищі 199 (інститут поліомієліта і вірусних енцефалитів, РАМН, Москва) з 10% сироватки та гентаміну сульфат (м. Харків, ОАО "Фармацевтична фірма "Здоров'є").

Для стимуляції апоптозу були використані моноклональні антитіла (мкАТ) анти - HLA — A,B,C, анти - HLA - DR та CD95 (Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Кавецького НАН України, Київ). мкАТ вносили у середовище культивування у дозі 10 μ г на 10^6 клітин. Клітинну суспензію культивували в трьох серіях: 1 серія - 10 % ембріональної сироватки телят, 2 серія - з 10% аутологічної сироватки, 3 серія - до МНПК донорів додавали 10 % сироватки хворих на атонію, 4 серія - до МНПК хворих на атонію додавали 10% сироватки донорів. Культивування здійснювали 24 год при 37°C.

З метою комплексної оцінки процесів апоптозу були використані забарвлення за методом Май-Грюнвальд-Романовський-Гімза (цитологічний барвник) та Hoechst 33342 (флуоресцентний барвник). Підраховували МНПК, які мали морфологічні ознаки ранньої стадії апоптозу: конденсація та фрагментація хроматину, наявність апоптотичних тілець. Флуоресценцію реєстрували за допомогою мікроскопа Люма Р-8 (Ломо, Росія).

В експериментальних дослідженнях нами було встановлено, що у хворих на атонію мононуклеари периферійної крові мають підвищену чутливість до апоптозу, індукованого зв'язуванням CD95

(Fas/APO-1), HLA-I та HLA-DR молекул. Така підвищена чутливість визначається як клітинними факторами, так і дією сироваточних факторів. Зокрема, доведено, що зв'язування і блокада клітинних рецепторів МНПК хворих на atopію анти-HLA-A,B,C, анти-HLA-DR та CD95 мкАТ може приводити до генерації трансмембранного сигналу, що безпосередньо контролює клітинний ріст і приводить до апоптозу. Результати дослідження залежать також і від внесеної в культуру сироватки. Сироватка крові хворих на atopію здатна інгібувати апоптоз МНПК донорів, індукований зв'язуванням перелічених молекул (табл. 1).

Таблиця 1

Морфологічне визначення апоптозу (конденсація хроматину) мононуклеарів периферійної крові (МНПК) хворих atopічною алергією: спонтанний (контроль) МНС I -, МНС II - і CD95 - індукований (фарбування Hoechst 33342)

Умови культивування МНПК	Культивування в присутності мкАТ			
	Спонтанний (контроль)	Анти-HLA-A,B,C мкАТ	Анти-HLA-DR мкАТ	CD95 мкАТ
10% сироватки ембріонів телят	8,9±2,02	12,2±3,0 ₁ *	14,0±2,86 _*	12,4±2,2 ₂ *
10% аутологічної сироватки	11,2±6,76	12,1±5,3 ₆	11,4±4,71	8,9±2,99
10% сироватки донора	10,4±6,5	19,1±2,7 _*	22,7±10,4 ₉ *	20,4±11,7 _*

Примітка: * $p < 0,05$, порівняння між контрольною серією та серією із додаванням антитіл.

В ході експерименту було встановлено, що

мононуклеари периферійної крові донорів виявляють резистентність до апоптозу індукованого зв'язуванням молекул HLA-DR та підвищену чутливість до апоптозу індукованого зв'язуванням молекул HLA-A, B, C та CD95. Сироваточні фактори крові хворих atopічною алергією блокують стимуляцію HLA-A, B, C- і CD95-індукованого апоптозу мононуклеарів периферійної крові донорів.

Таблиця 2

Морфологічне визначення апоптозу (конденсація хроматину) мононуклеарів периферійної крові (МНПК) донорів: спонтанний (контроль) МНС I -, МНС II - і CD95 - індукований (фарбування Hoechst 33342)

Умови культивування МНПК	Культивування в присутності мкАТ			
	Спонтанний (контроль)	Анти-HLA-A,B,C мкАТ	Анти-HLA-DR мкАТ	CD95 мкАТ
10% сироватки ембріонів телят	7,5±2,67	7,7±2,36	7,3±2,89	8,2±2,09
10% аутологічної сироватки	6,9±2,42	8,9±1,52*	4,2±0,91*	9,6±2,5*
10% сироватки хворих на atopічну алергію	6,4 ± 2,41	6,3 ± 0,82	5,9±3,21	4,0±2,94

Примітка: * $p < 0,05$, порівняння між контрольною серією та серією із додаванням антитіл.

Результати досліджень проведені запропонованим методом дозволяють зробити висновок про високу ефективність використаних моноклональних антитіл в індукції процесів апоптозу мононуклеарних клітин периферійної крові під час стадії загострення у хворих на atopічну алергію.