



УКРАЇНА

(19) UA (11) 62663 (13) U
(51) МПК
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВОВАНИХ Т-ХЕЛПЕРІВ В ОРГАНІЗМІ ЛЮДИНИ

1

2

(21) u201101308

(22) 07.02.2011

(24) 12.09.2011

(46) 12.09.2011, Бюл. № 17, 2011 р.

(72) ФРОЛОВА ЛІДІЯ ОЛЕКСАНДРІВНА, ФРОЛОВ ОЛЕКСАНДР КИРИЛОВИЧ, КОПІЙКА ВІРА ВІКТОРІВНА, ФЕДOTOB ЄВГЕН РУДОЛЬФОВИЧ, ЛИТВИНЕНКО РАЇСА ОЛЕКСАНДРІВНА

(73) ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД "ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ" МІНІСТЕРСТВА ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

(57) Спосіб визначення активованих Т-хелперів в організмі людини, який включає забір крові з вени з антикоагулянтом; виділення з неї лімфоцитів; постановку реакції розеткоутворення шляхом додавання до лімфоцитів еритроцитів барана, які кон'юговані з моноклональними антитілами проти CD4 структури Т-хелперів, з центрифугуванням суміші клітин та тепловою і холодовою інкубаціями; приготування препаратів шляхом видалення надосаду, фіксації клітин глютаровим альдегідом,

нанесення суспензії клітин на предметне скло, фарбування за Романовським-Гімза; мікроскопування під світловим мікроскопом; визначення кількості Т-хелперів за наявністю розеткоутворюючих клітин, який **відрізняється** тим, що постановку реакції розеткоутворення здійснюють на розчині сироваткового білка в середовищі 199 з безпосереднім центрифугуванням отриманої суміші клітин після змішування лімфоцитів з еритроцитарним діагностиком; приготування препаратів здійснюють шляхом фіксації осаду клітин 0,6 % розчином глютарового альдегіду на середовищі 199 з рН 7,2, з наступним видаленням надосаду, відмиванням осаду клітин розчином сироваткового білка на дистильованій воді, фіксацією за допомогою метанолу, інкубацією у фосфатному буфері при рН 6,8 та додатковим диференціюванням фарбованих препаратів; активовані Т-хелпери визначають за кількістю лімфоцитів, що приєднали 8 і більше еритроцитів барана.

Спосіб належить до біології та медицини, а саме до імунологічних методів оцінки стану імунітету за активністю Т-хелперів в організмі людини.

Відомий спосіб визначення активності Т-хелперів за рівнем люмінесценції лімфоцитів, мічених моноклональними антитілами проти мембранної структури Т-хелперів кластера диференціювання 4 (CD4) [Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині Беркало Л. В., Бобович О. В., Бобров Н. О. та ін.; під ред. Кайдашева І. П. -Полтава: Полімет, 2003. -320 с., С. 48 - 52], який включає забір крові з вени з антикоагулянтом; виділення з неї Т-лімфоцитів; фенотипування шляхом обробки їх моноклональними антитілами проти CD4 структури Т-хелперів, відмивки забуференим фізіологічним розчином (ЗФР), обробки антитілами кози, які мічені флуорохромом флуоресцеїн ізотіоціонату (ФІТЦ) проти мишиних імуноглобулінів, відмивки ЗФР; приготування тимчасових препаратів лімфоцитів шляхом розміщення їх у лунках стрічки Parafilm-M на предметному склі, накривання покривним склом, окантовки парафіном; мікроскопування за допомогою

люмінесцентного мікроскопа, визначення в 100 лімфоцитах ступеня люмінесценції (слабкий, середній, сильний) та визначення активності Т-хелперів за часткою клітин із сильним ступенем люмінесценції.

Спільними із запропонованими ознаками є:

- забір крові з вени з антикоагулянтом;
- виділення з крові лімфоцитів;
- обробка моноклональними антитілами проти CD4 структури Т-хелперів;
- приготування препаратів лімфоцитів;
- мікроскопування;
- визначення активності Т-хелперів.

Недоліком способу є недостатня точність виявлення активованих лімфоцитів.

Причинами, що перешкоджають досягненню результату є:

- складна, з великою собівартістю та важко контролювана за умовами процедура визначення активності Т-хелперів;
- визначення ступеня люмінесценції оком вкрай суб'єктивне, метод дає значне напруження

(13) U

(11) 62663

(19) UA

на систему зору (потрібно розрізнити клітини, які люмінесціюють, на темному фоні);

- багатоетапність методу: інкубація з моноклональними антитілами, інкубація з антисироваткою кози, міченою флуорохромом ФІТЦ, відмивка від реагентів;

- отримання тимчасових препаратів, що не дозволяє відкласти їх аналіз;

- необхідність використання люмінесцентного мікроскопа.

Відомий спосіб визначення CD4⁺ субпопуляції Т-лімфоцитів (Т-хелперів) в організмі людини (П.Р. Новиков, О. К. Новиков. Сравнительная характеристика современных методов иммунофенотипирования // Иммунопатология. - 2000. - № 1. - С. 4-9.), який включає: забір крові з вени з антикоагулянтном; виділення з неї лімфоцитів; постановку реакції розеткоутворення з еритроцитами барана, які кон'юговані з моноклональними антитілами проти CD4 структури Т-хелперів (еритроцитарний діагностикум "A_hth-CD4") з тепловою інкубацією, центрифугуванням суміші клітин та з наступною холодовою інкубацією; приготування препаратів шляхом видалення надосадової рідини, фіксації осаду 0,12 % розчином глютарового альдегіду в кількості 0,025 мл та його перемішування, експозиції протягом 5 хв. при кімнатній температурі, повторного перемішування суспензії клітин, нанесення її на предметне скло, висушування та фіксації етанолом протягом 10 хв., фарбування за Романовським-Гімза; мікроскопування під світловим мікроскопом 200 лімфоцитів, визначення Т-хелперів, якими є лімфоцити, що приєднали 3 і більше еритроцитів барана.

Спільними із запропонованим рішенням ознаками є:

- забір крові з вени з антикоагулянтном;
- виділення з неї лімфоцитів;
- постановка реакції розеткоутворення шляхом додавання до лімфоцитів еритроцитів барана, які кон'юговані з моноклональними антитілами проти CD4 структури Т-хелперів (еритроцитарний діагностикум "A_hth-CD4") з наступним центрифугуванням суміші клітин та тепловою і холодовою інкубаціями;

- приготування препаратів шляхом видалення надосаду, фіксації клітин глютаровим альдегідом, нанесення суспензії клітин на предметне скло; фарбування за Романовським-Гімза;

- мікроскопування під світловим мікроскопом;
- визначення кількості Т-хелперів.

Недоліками способу є: недостатня точність виявлення загальної кількості CD4⁺ клітин (Т-хелперів), спосіб не дозволяє виявляти активовані Т-хелпери.

Причинами, що перешкоджають досягненню результатів, є:

- фіксація осаду клітин 0,025мл 0,12 % розчином глютарового альдегіду з перемішуванням клітин призводить до руйнування частини "розеток", а взаємодія ліганду CD4 на Т-хелперах і моноклонального антитіла до CD4 на еритроцитах барана є не ковалентною, а електростатичною, тому це не дозволяє реєструвати всі потенційні CD4⁺ клітини;

- врахування всіх лімфоцитів, які приєднали 3 і більше еритроцитів барана з еритроцитарного діагностикуму "A_hth-CD4", до яких входять як неактивовані тривалоциркулюючі клітини пам'яті, так і активовані Т-хелпери, які утворені в імуногенезних реакціях лімфоцитів на час обстеження.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб визначення активованих Т-хелперів в організмі людини, який шляхом постановки реакції розеткоутворення з еритроцитарним діагностикумом "A_hth-CD4", фіксації глютаровим альдегідом у концентрації, що дозволяє зберігати утворені розетки та відмивки клітин білковим розчином; приготування препаратів клітин крові, визначення серед розеткоутворюючих клітин тих, що приєднали 8 та більше еритроцитів барана, дозволяє точніше визначати стан імунітету та проводити експрес-діагностику його функціонального рівня.

Суттєвими ознаками способу є:

- забір крові з вени з антикоагулянтном;
- виділення з неї лімфоцитів;
- постановка реакції розеткоутворення шляхом додавання до суспензії лімфоцитів еритроцитарного діагностикуму "Анти-CD4" на розчині сироваткового білка в середовищі 199, центрифугування отриманої суміші клітин та інкубації осаду в термостаті та в холодильнику;

- приготування препаратів шляхом фіксації осаду клітин 0,6 % розчином глютарового альдегіду на середовищі 199 при рН 7.2, видалення надосаду, його відмивання розчином сироваткового білка на дистильованій воді, нанесення суспензії клітин на предметне скло, їх фіксації метанолом, інкубації препарату у фосфатному буфері при рН 6,8, фарбування препарату розчином Романовського-Гімза, диференціювання препаратів;

- мікроскопування препарату під світловим мікроскопом;

- визначення розеткоутворюючих клітин Т-хелперів, до яких відносять ті, що приєднали 3 і більше еритроцитів барана;

- визначення серед них активованих Т-хелперів за кількістю лімфоцитів, що приєднали 8 і більше еритроцитів барана.

Відмінними від прототипу ознаками є:

- постановка реакції розеткоутворення на розчині сироваткового білка в середовищі 199 з безпосереднім центрифугуванням отриманої суміші клітин після змішування лімфоцитів з еритроцитарним діагностикумом;

- приготування препаратів шляхом фіксації осаду клітин 0,6 % розчином глютарового альдегіду на середовищі 199 при рН 7.2 з подальшим видаленням надосаду та його відмиванням розчином сироваткового білка на дистильованій воді, фіксації за допомогою метанолу, інкубації препарату у фосфатному буфері при рН 6,8, диференціювання зафарбованих препаратів;

- визначення серед них активованих Т-хелперів за кількістю лімфоцитів, що приєднали 8 і більше еритроцитів барана.

Спосіб здійснюють таким чином: виконують забір не менше 2 мл крові з вени з антикоагулянтном, наприклад з гепарином у кількості 0,02 мг/мл,

виділяють з неї лімфоцити, здійснюють постановку реакції розеткоутворення, для чого готують суспензію лімфоцитів з концентрацією клітин 2 млн/мл в середовищі 199 з 15-20% розчином ембріональної телячої сироватки, до отриманої суспензії у кількості не менше 0,050 мл додають рівну кількість 0,5 % суспензії еритроцитарного діагностикуму «Ahth-CD4», отриману суспензію клітин центрифугують протягом 5-5,5 хв. при 1000 об/хв, інкубують осад 25-27 хв. у термостаті при $T+37,5^{\circ}\text{C}$ протягом 60-65 хв. та потім у холодильнику при $T+4^{\circ}-6^{\circ}\text{C}$; готують препарати шляхом фіксації осаду клітин 0,6 % розчином глютарового альдегіду у середовищі 199 при pH 7.2, яке забезпечують додаванням концентрованого розчину харчової соди, з витриманням протягом 7-10 хв. при кімнатній температурі, видалення надосаду та відмивання його 15-20 % розчином сироваткового білка на дистильованій воді, перемішування осаду без утворення піни, нанесення суспензії клітин на предметне скло, прискореного висушування суспензії клітин, наприклад, тепловентилятором, фіксації клітин метанолом протягом 3-5 хв., інкубації у фосфатному буфері при pH 6,8-6,9 протягом 2-3 хв., фарбування 10 % розчином Романовського-Гімза на фосфатному буфері (pH 6,8) протягом 4-6 хв., диференціювання препаратів у підкисленій воді (1 крапля концентрованої соляної кислоти на 300 мл дистильованої води) протягом 1-2 с з наступним триразовим промиванням препарату в дистильованій воді; мікроскопують під світловим мікроскопом не менше 200 лімфоцитів; визначають розеткоутворюючі клітини, до яких відносять ті, що приєднали 3 і більше еритроцитів барана, з них визначають активовані, до яких відносять такі, що приєднали 8 і більше еритроцитів барана.

Імунологічне обґрунтування способу.

Згідно з стереотипною реакцією імуногенезу на антигенне або мітогенне подразнення лімфоцит проходить такі стадії:

- розпізнавання подразника;
- активація клітини;
- баластна трансформація;
- серія мітотичних поділів;
- диференціювання;
- міграція;
- імунна відповідь.

При активації лімфоциту стимулюється білок-синтетична система клітини, в результаті на її мембрані підвищується щільність рецепторів та інших структур, серед яких і CD4 структури, якщо лімфоцит належить до Т-хелперів. Внаслідок цього активований Т-хелпер має здатність всією поверхнею адсорбувати еритроцити барана, кон'юговані з моноклональними антитілами (МКАТ) до CD структур з утворенням фігур повних, часто багатоядерних, розеток. На мембранах неактивованих

Т-хелперів CD4 представлені в меншій щільності, тому вони здатні утворювати неповні розетки, які характеризуються приєднанням від 3 до 7 еритроцитів барана. Це підтверджує запропоноване положення, що CD4^{+} лімфоцити, які приєднали 8 і більше еритроцитів барана, належать до активованих.

Приклад виконання способу.

Імунологічне обстеження проводили у 20 жінок, хворих на гіпертонічну хворобу II стадії, до та після курсу патогенетичної терапії. Для цього здійснювали забір 10 мл крові з вени з антикоагулянтом - гепарином у кількості 0,02 мг/мл, виділяли з неї лімфоцити, які використовували для проведення порівняльних досліджень за запропонованим способом і способами непрямой люмінесценції із застосуванням моноклональних антитіл проти CD4^{+} (аналог) та розеткового з еритроцитарним діагностикумом "Ahth-CD4" (прототип).

Для виконання дослідження за запропонованим способом здійснювали постановку реакції розеткоутворення, для чого готували суспензію лімфоцитів з концентрацією клітин 2 млн/мл у середовищі 199 з 20 % розчином ембріональної телячої сироватки, до 0,050 мл отриманої суспензії додавали рівну кількість (0,050 мл) 0,5 % суспензії еритроцитарного діагностикуму "Ahth-CD4", здійснювали центрифугування отриманої суспензії клітин протягом 5 хв. при 1000 об/хв., інкубацію осаду протягом 25 хв. в термостаті при $T+37^{\circ}\text{C}$ та протягом 60 хв. у холодильнику при $T+6^{\circ}\text{C}$; готували препарати шляхом фіксації осаду клітин 0,6 % розчином глютарового альдегіду на середовищі 199 при pH 7.2, яке забезпечували додаванням концентрованого розчину харчової соди, при кімнатній температурі з витриманням протягом 10 хв., здійснювали видалення надосаду та відмивали осад 20 % розчином сироваткового білка на дистильованій воді, перемішували осад без утворення піни, наносили суспензію клітин на предметне скло, здійснювали прискорене висушування суспензії клітин тепловентилятором, фіксували клітини метанолом протягом 5 хв; інкубували у фосфатному буфері при pH 6,8 протягом 2 хв., фарбували препарати 10 % розчином Романовського-Гімза на фосфатному буфері (pH 6,8) протягом 6 хв., диференціювали препарати у підкисленій воді (1 крапля концентрованої соляної кислоти на 300 мл дистильованої води) протягом 2 с з наступним триразовим промиванням препарату в дистильованій воді; мікроскопували під світловим мікроскопом не менше 200 лімфоцитів, серед яких визначали розеткоутворюючі, до яких відносили ті, що приєднали 3 і більше еритроцитів барана, з них визначали активовані, до яких відносили такі, що приєднали 8 і більше еритроцитів барана. Дані наведені в таблиці.

Таблиця

Визначення субпопуляції Т-хелперів крові людини

№ з/п	Спосіб визначення Т-хелперів	Протестована субпопуляція	Кількість визначених лімфоцитів, %	
			До терапії	Після терапії
1	Непряма люмінесценція із застосуванням моноклональних проти CD4 ⁺ - аналог	Т-хелпери, всі	31,6±2,2	33,4±2,4
		в т. ч. активовані	6,5±1,0	7,0±1,1
2	Розетковий з еритроцитарним діагностиком " Ahth-CD4" - прототип	Т-хелпери, всі	29,5±3,1	27,5±2,6
3	Запропонований спосіб	Т-хелпери, всі	40,0±2,1	35,2±1,7*
		в т. ч. активовані	19,4±1,4	13,3±1,1*

Примітка:

* - відмінності показників достовірні до і після терапії, $p < 0,05$.

Як видно із таблиці, достовірна динаміка кількості Т-хелперів та їх активованої фракції виявлено лише за запропонованим способом. Виявлене зниження загальної кількості Т-хелперів та їх активованої фракції до і після патогенетичної терапії обумовлено ефективністю проведеного лікування.

Таким чином, запропонований спосіб визначення активованих Т-хелперів в організмі людини дозволяє оперативно та достовірно, з більшою точністю проводити імунологічний аналіз стану імунітету людини.