



УКРАЇНА

(19) UA (11) 63632 (13) U
(51) МПК
G01N 33/52 (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЦИТОТОКСИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПОЛІМОРФНОЯДЕРНИХ НЕЙТРОФІЛІВ ПІСЛЯ РАДІОЙОДОТЕРАПІЇ ХВОРИХ НА РАК ЩИТОВИДНОЇ ЗАЛОЗИ

1

(21) u201104808

(22) 18.04.2011

(24) 10.10.2011

(46) 10.10.2011, Бюл.№ 19, 2011 р.

(72) ЗАХАРЧЕНКО ТАМАРА ФЕДОРІВНА

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ЕНДОКРИНОЛОГІЇ ТА ОБМІНУ РЕЧОВИН ІМ. В. П. КОМІСАРЕНКА НАМН УКРАЇНИ"

(57) Спосіб визначення цитотоксичної активності поліморфноядерних нейтрофілів після радіойодотерапії хворих на рак щитовидної залози, що включає проведення інкубації лейкоцитів периферичної крові з еритроцитарними клітинами-мішенями і оцінку реакції лізису еритроцитів з використанням реактиву, який посилює оптичну щільність проб, з подальшим спектрофотометричним визначенням кількості гемоглобіну, який вивільнився в процесі інкубації, який **відрізняється**

2

тим, що спочатку виділяють поліморфноядерні нейтрофіли з периферичної крові донорів та хворих на рак щитовидної залози напередодні та після радіойодотерапії, інкубують з ксеногенними еритроцитами в присутності мітогену, потім клітини відмивають і до осаду додають лізуючий розчин та реактив метол і при виявленні істотного збільшення активності поліморфноядерних нейтрофілів крові проти ксеногенних еритроцитів у "повному" живильному середовищі з мітогеном ліпополісахаридом роблять висновок про чутливість способу та ефективність визначення, а при виявленні значного відхилення цитотоксичної активності поліморфноядерних нейтрофілів у хворих на рак щитовидної залози після опромінення йодом-131 від вихідного значення та від показника у донорів роблять висновок про порушення цитотоксичної активності цих гранулоцитів.

Корисна модель належить до медицини, а саме ендокринології, онкології та імунології, і може застосовуватись для визначення цитотоксичної активності поліморфноядерних нейтрофілів (ПЯН) з метою оцінки функціонального стану імунної системи людини.

Спосіб необхідний для виявлення або моніторингу порушень неспецифічного захисту ПЯН як важливого компонента протипатогенного та протипухлинного імунітету у онкохворих, а також для виявлення наслідків впливу радіації на організм.

Відомі способи визначення функції ПЯН [1, 2, 3] та спосіб визначення бактерицидної активності та індексу завершеності фагоцитозу ПЯН у дітей, хворих на рак щитовидної залози (РЩЗ) [4]. Слід зауважити, що ці способи визначають метаболічну активність, яка характеризує готовність до здійснення різних функцій ПЯН, та фагоцитоз ПЯН як складову протипатогенного імунітету. Однак вони не визначають екстраклітинну активність ПЯН, яка дає можливість оцінити результат взаємодії ПЯН з чужорідною клітиною-мішенню і яка може мати цінне інформативне значення для діагностики стану неспецифічного захисту онкохворих, в тому числі і хворих на РЩЗ після радіойодотерапії

(РІТ).

Відомі способи визначення стимульованої та спонтанної цитотоксичної активності ПЯН проти різних ало- та ксеногенних клітин-мішеней як трансформованих, так і нормальних (К-562, MOLT-4, еритроцити, фібробласти та ін.) з використанням радіометричного (^{51}Cr , ^3H -уридин та ін.) методу оцінки результатів дослідження [5, 6, 7].

Однак ці способи є неоптимальними та незручними для клінічної практики, тому що вони затратні та громіздкі, мають ряд недоліків.

Одним з недоліків деяких наведених вище способів є використання як клітин-мішеней пухлинних клітинних ліній (К-562, MOLT-4 та ін.), які є гетерогенні, здатні змінюватись в процесі культивування. До того ж вони, як трансформовані клітини, можуть впливати на ПЯН, вивільнюючи продукти своєї життєдіяльності (цитокіни тощо), та проявляти цитотоксичність, спрямовану проти ПЯН, що може спотворювати істинність значення.

Іншим недоліком усіх цих способів є застосування радіоактивного методу оцінки реакції, що спричиняє опромінення клітин та змінює результати вимірювання завдяки можливому значному спонтанному виходу ізотопу з клітин та включенню

(13) U

(11) 63632

(19) UA

його іншими клітинами. Окрім цього, виконання методики потребує необхідності дотримуватись специфічних умов техніки безпеки для дослідника та навколишнього середовища, що збільшує її затратність.

Відомий спосіб нерадіометричного визначення цитотоксичної активності ПЯН із застосуванням вимірювання вивільненого гемоглобіну з алогенних еритроцитарних клітин-мішеней, які, як відомо, є інертними клітинами [8]. Проте, у цьому способі проводилось визначення цитотоксичної активності ПЯН щурів. Оцінку лізису еритроцитів проводили фотоелектроколориметрично, визначаючи кількість гемоглобіну у супернатанті, тобто ту кількість гемоглобіну, який вивільнився з лізованих лейкоцитами еритроцитів.

Відомий спосіб нерадіометричного визначення цитотоксичної активності клітин із застосуванням спектрофотометрії та визначення вивільненого з клітин-мішеней гемоглобіну із застосуванням реактиву метолу для підвищення оптичної щільності вимірювальних проб [9]. Даний спосіб є чутливим, але в ньому проводиться визначення цитотоксичної активності інших ефektorів вродженого імунітету НК-клітин, а не ПЯН, з використанням ксеногенних клітин-мішеней (еритроцити барана, курей та ін.).

Також відомий і спосіб експериментального нерадіометричного визначення клітинно-опосередкованої цитотоксичності лейкоцитів, прийнятий за прототип, що полягає в інкубації лейкоцитів з клітинами-мішенями (алогенні еритроцити) та оцінці реакції, яку проводять з використанням тетраметилбензидину (ТМБ) та подальшим визначенням гемоглобіну, що вивільнився в процесі лізису еритроцитів [10]. Однак у прототипі визначається цитотоксична активність загальної популяції сенсibilізованих лейкоцитів, до складу яких входять лімфоцити, моноцити та ін., а не цитотоксична активність ПЯН, що не дозволяє конкретизувати визначення. Крім того, застосовується високотоксичний канцероген - ТМБ, що обмежує використання цього способу в клінічній лабораторії.

В основу даної корисної моделі поставлена задача вдосконалити спосіб визначення цитотоксичної активності поліморфноядерних нейтрофілів після радіойодотерапії хворих на рак щитовидної залози шляхом дослідження мітоген-індукованої цитотоксичної активності цих клітин проти ксеногенних еритроцитарних клітин-мішеней та спектрофотометричної оцінки реакції із застосуванням безпечнішого, дешевшого та доступного реактиву, що дозволить використовувати спосіб в клінічній лабораторії та підвищить точність, інформативність та ефективність визначення цитотоксичної активності ПЯН.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі, що включає проведення інкубації лейкоцитів периферичної крові з еритроцитарними клітинами-мішенями і оцінку реакції лізису еритроцитів з використанням реактиву, який посилює оптичну щільність проб, з подальшим спектрофотометричним визначенням кількості гемоглобіну, який вивільнився в процесі інкубації, згідно з да-

ною корисною моделлю, спочатку виділяють поліморфноядерні нейтрофіли з периферичної крові донорів та хворих на рак щитовидної залози напередодні та після радіойодотерапії, інкубують з ксеногенними еритроцитами в присутності мітогену, потім клітини відмивають і до осаду додають лізуючий розчин та реактив метол і при виявленні істотного збільшення активності поліморфноядерних нейтрофілів крові проти ксеногенних еритроцитів у "повному" живильному середовищі з мітогеном ліпополісахаридом роблять висновок про чутливість способу та ефективність визначення, а при виявленні значного відхилення цитотоксичної активності поліморфноядерних нейтрофілів у хворих на рак щитовидної залози після опромінення йодом-131 від вихідного значення та від показника у донорів роблять висновок про порушення цитотоксичної активності цих гранулоцитів.

Таке рішення було прийняте після проведення серії експериментальних досліджень з підбору ксеногенних клітин-мішеней (еритроцити мишей лінії СВА, щурів лінії Wistar), мітогенів - ліпополісахарид (ЛПС), конканавалін-А (Кон-А), та їхніх концентрацій для визначення мітоген-опосередкованої цитотоксичної активності ПЯН у донорів та у хворих на ДРЩЗ. Так, наприклад, встановлено, що у хворих на ДРЩЗ після РІТ спонтанна активність ПЯН проти еритроцитів мишей лінії СВА складає $(17,4 \pm 2,3) \%$, індукована ЛПС - $(27,1 \pm 3,3) \%$, індукована Кон-А - $(28,8 \pm 2,8) \%$, а проти еритроцитів щурів лінії Wistar становить $(20,4 \pm 3,2) \%$, індукована ЛПС - $(24,5 \pm 2,3) \%$, індукована Кон-А - $(35,3 \pm 3,6) \%$. Це свідчить, що еритроцити мишей лінії СВА та щурів лінії Wistar є чутливими мішенями для визначення стимульованої цитотоксичної активності ПЯН периферичної крові людини.

Відомо, що взаємодія ПЯН з еритроцитами в присутності ЛПС відбувається за допомогою рецепторів CD 14, які індукують активність ПЯН, та молекул адгезії CD11b/CD18, які забезпечують тісний контакт між клітинами та подальшу активацію ПЯН [11]. Мітоген Кон-А посилює міжклітинну взаємодію та сприяє цитолізу [5]. Лізис клітин-мішеней ПЯН здійснюють за участі активних форм кисню. В серії досліджень, проведених авторкою, з'ясовано, що ЛПС є оптимальним стимулятором цитотоксичності, оскільки, на відміну від Кон-А, не дає гемоглутинації під час інкубації клітин, яка може зменшувати точність спектрофотометричного вимірювання результатів. Також встановлено, що ЛПС ефективно індукує реакцію ПЯН проти еритроцитарних клітин-мішеней в концентрації 10-100 мкг/мл.

Все це дало змогу отримати результати, які показали, що у групі донорів (середній вік $(30,9 \pm 1,7)$ року) ЛПС-індукована активність ПЯН проти еритроцитів мишей становить $(47,6 \pm 2,7) \%$. Це достовірно вище в 1,4 разу ($P < 0,01$), ніж активність ПЯН без стимуляції ($(33,0 \pm 1,7) \%$), що свідчить про високу здатність цих гранулоцитів відповідати на даний мітоген. У групі прооперованих хворих на ДРЩЗ без віддалених метастазів відповідного віку ЛПС-індукована цитотоксична активність ПЯН напередодні РІТ знижувалася на 21 %

($P < 0,01$) відносно донорів і становила $(37,5 \pm 1,9)$ %. Через 6 днів після РІТ показник активності ПЯН у них підвищувався на 33 % ($P < 0,001$) у порівнянні з вихідним значенням і становив $(55,8 \pm 2,2)$ %. Через місяць після РІТ активність ПЯН істотно не змінювалася, а через 6 місяців вона знижувалася на 32 % ($P < 0,05$) і становила $(25,6 \pm 2,9)$ %. Це свідчить про порушення функції ПЯН у хворих на ДРЩЗ до та після РІТ.

Спосіб здійснюється таким чином.

Хворому на ДРЩЗ напередодні РІТ та через 6 днів, 1 місяць, 6 місяців після сеансу РІТ, а також у групі донорів визначають цитотоксичну активність ПЯН. Для цього з периферичної крові виділяють ПЯН, застосовуючи градієнт щільності Histopaque-1077 ("Sigma", США) для відокремлення лімфоцитів від лейкоцитів, та Histopaque-1119 ("Sigma", США) для одержання безпосередньо ПЯН. Клітинний осад з ПЯН доводять до концентрації $2 \cdot 10^5$ /мл, змішують з еритроцитами мишей (ксеногенні клітини-мішені) у співвідношенні 20:1, додають мітоген ліпополісахарид із *E. coli* O11:B4 ("Difco", США) в концентрації 100 мкг/мл, який індукує реакцію, і інкубують клітини впродовж 18 год. за температури 37°C , 100 % вологості в атмосфері 5 % CO_2 в лунках імунологічного планшета в "повному" живильному середовищі RPMI-1640 ("Sigma", США). Після цього відмивають та витримують 30-60 хв. за температури 4°C . Супернатанти видаляють, а до осаду додають лізуючий розчин (1,0 мл дистильованої води, 0,5 мл приготовленого ех темпоге водного 1 % розчину метолу (метилпараамінофенолсульфат, "Fluka", США) та 0,5 мл 3 % розчину перекису водню), який в присутності гемоглобіну дає рожеве забарвлення. Через 20 хв. на спектрофотометрі СФ-46 визначають оптичну щільність досліджуваних проб за довжини хвилі 490 нм та вираховують індекс цитотоксичності (ІЦ). І при зміні ІЦ ПЯН у хворих на ДРЩЗ відносно донорів роблять висновок про порушення цього показника ще до РІТ, а при зміні ІЦ ПЯН після РІТ, у порівнянні з їхнім вихідним значенням, - про вплив йоду-131 на ПЯН.

Приклад 1. Пацієнтка Ж.Ю. 1978 року народження, діагноз неінкапсульована папілярна карцинома правої долі щитовидної залози, стадія рТ1N1Mх, метастази в лімфовузлах ший. Після оперативного лікування отримала сеанс ^{131}I -терапії. Активність лікувальної дози йоду-131 становила 3815 МБк. Активність ПЯН у периферичній крові хворої визначалась за розробленим способом. В результаті було виявлено, що напередодні РІТ ЛПС-індукована цитотоксична активність ПЯН у хворої складала 40,8 %, що є нижчою на 14 %, ніж середній показник в групі донорів - $(47,6 \pm 2,7)$ %. Через 6 днів після РІТ індекс цитотоксичної активності ПЯН у хворої становив 53,9 %, тобто збільшився у 1,3 разу в порівнянні з вихідним значенням (40,8 %). Через місяць після РІТ ІЦ ПЯН у хворої понизився в 1,28 разу і склав 42,2 %, що практично не відрізняється від вихідного рівня, але не досягає ІЦ цих клітин у донорів. Це свідчить про порушення функції ПЯН-показника неспецифічної резистентності організму.

Приклад 2. Пацієнтка К.О. 1983 року наро-

дження, діагноз частково інкапсульована папілярна карцинома щитовидної залози, стадія рТ1NхMх. Після оперативного лікування отримала сеанс ^{131}I -терапії. Активність лікувальної дози йоду-131 становила 3815 МБк. Активність ПЯН у периферичній крові хворої визначалась за розробленим способом. В результаті було встановлено, що напередодні РІТ ЛПС-індукована цитотоксична активність ПЯН у хворої складала 38,0 %, що є нижчою на 20 %, ніж середній показник в групі донорів - $(47,6 \pm 2,7)$ %. Через 6 днів після РІТ індекс цитотоксичної активності ПЯН у хворої становив 58,3 %, тобто збільшився у 1,5 разу в порівнянні з вихідним значенням (38,0 %). Через 6 місяців після РІТ показник активності ПЯН у хворої складав 20,7 %, що є значно нижчим від вихідного показника та від показника у донорів (в 1,84 разу та 2,3 разу відповідно).

Отже, виявлена стимуляція активності ПЯН у ранній період після РІТ у хворих на ДРЩЗ може супроводжуватися збільшенням утворення активних форм кисню, інших біологічно активних речовин, які можуть стимулювати мутагенез, пригнічувати функцію лімфоцитів, сприяти розвитку аутоімунного процесу в організмі. Зниження функції ПЯН як ефекторних клітин вродженого імунітету у віддалений період (через 6 місяців) у хворих на ДРЩЗ може бути наслідком впливу РІТ на дозрівання кістковомозкових попередників ПЯН, які є надзвичайно чутливими до опромінення. Все це може призвести до подальшого розвитку інфекційних ускладнень, виникнення рецидиву.

Таким чином, даний спосіб є чутливим, точним, інформативним та ефективним, що дає можливість визначити порушення функції ПЯН до та в динаміці після РІТ у хворих на ДРЩЗ, яке виражається в гіперактивації ПЯН у ранній період після опромінення та в розвитку недостатності неспецифічного захисту організму у віддалений період, що обґрунтовує доцільність застосування методів імюнокорекції в комплексному лікуванні цих хворих з метою покращення якості їхнього життя.

Спосіб є відтворюваним, малозатратним, придатним для клінічної практики, що дозволяє рекомендувати його для впровадження в закладах ендокринологічного, онкологічного та імунологічного профілю.

Джерела інформації:

1. Пат. № 2366953, RU, МПК G01N 33/487 (2006.01), G01N 33/53 (2006.01); опубл. 10.09.2009.

2. Пат. № 2249215, RU, МПК 7 G01N 33/52; опубл. 27.03.2005.

3. Пат. № 54840 А, UA, МПК (2006), A61B 10/00, A61B 5/145, G01N 33/49; опубл. 17.03.2003, Бюл. № 3.

4. Ткаченко Г.І. Показники імунітету дітей, хворих на рак щитовидної залози в динаміці комплексної терапії // Український радіологічний журнал. - 1996. - № 4. - С. 346-348.

5. Cortens M. The detection and identification of subpopulations of circulating human lymphocytes, monocytes and neutrophils capable of effecting a mitogen-induced cell-mediated cytotoxic reaction towards erythrocytes of various species / M. Cortens,

S. Sklar, M. Richter // Immunology. - 1980. - N 41. - P. 623-634;

6. Naturally-occurring cellular cytotoxicity mediated by neutrophil polymorphonuclears: requirements for the target cell lysis / F. Dallegri, G. Frumento, A. Ballestrero [et al.] // J Clin Lab Immunol, - 1984. - 15, N 1. - P.35-37;

7. Кулаков В.В. Изучение функциональной активности нейтрофилов периферической крови больных раком легких /В.В. Кулаков, М.В. Киселевский, Б.В. Пинегин // Иммунология. - 1997. - № 5. - С. 56-58.

8. Цитотоксическое действие полиморфноядерных лейкоцитов на опухолевые и нормальные клетки in vitro и in vivo / М.М. Поцелуева, А.В. Пус-

товидко, Е.В. Ковалева [и др.] // Цитология. - 2005. - 47, № 1. - С. 57-63.

9. Круглова И.Ф. Естественные киллеры и методы их исследования /И.Ф. Круглова // Лабораторная диагностика. - 1998. - № 2. - С. 32-36).

10. Прототип. Fischer U. In vitro cell-mediated cytotoxicity against allogeneic erythrocytes in ginbuna crucian carp and goldfish using a non-radioactive assay / U. Fischer, M. Ototake, I. Nakanishi // Dev. Comp. Immunol. - 1998. - 22, N 2. - P. 195-206.

11. Lipopolysaccharide-coated erythrocytes activate human neutrophils via CD 14 while subsequent binding is through CD11b/CD18 / A. Troelstra, L.A. de Graaf-Mitenburg, T. van Bommel [et al.] // J. Immunol. - 1999. - 162, N 7. - P. 4220-4225.