



УКРАЇНА

(19) UA (11) 37906 (13) A

(51) 7 G01N33/53

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ МІТОГЕНІНДУКОВАНОЇ ПРОЛІФЕРАТИВНОЇ ВІДПОВІДІ В-ЛІМФОЦИТІВ НА
ВПЛИВ АКТИВОВАНИХ Т-СУПРЕСОРІВ

(21) 2000042485

(22) 28.04.2000

(24) 15.05.2001

(33) UA

(46) 15.05.2001, Бюл. № 4, 2001 р.

(72) Курченко Олег Володимирович

(73) Національний медичний університет ім. О.О.
Богомольця

(57) Спосіб визначення мітогеніндукованої проліферативної відповіді В-лімфоцитів на вплив активованих Т-супресорів, що передбачає на першому етапі взяття крові, її гепаринізацію, виділення лейкоцитів на градієнті з 16% декстраном, ресуспендування попередньо відмитих лейкоцитів в середовищі для культивування, рознесення суспензії до двох стерильних пробірок, одна з яких дослідна, друга - контрольна, культивування обох проб в термостаті, причому дослідна пробірка для активації Т-супресорів культивується з конканаваліном А, на другому етапі відмивання лейкоцитів з дослідної і контрольної пробірок, їх змішування в рівних пропорціях з лейкоцитами, що досліджуються, інкубування з фітогемаглютиніном, центрифугування для виділення клітин, виготовлення препаратів з осаду, мікроскопіювання з під-

рахунком кількості лімфобластів і порівняння кількості лімфобластів в препаратах з дослідної і контрольної пробірок, який відрізняється тим, що перший етап виконують з кров'ю здорового донора, на другому етапі конканавалін А-активовані Т-супресори здорового донора змішують з виділеними лейкоцитами хворого, що обстежується, і другого здорового донора, після чого операції другого етапу виконують паралельно на обох пробах, при мікроскопіюванні порівнюють кількість бластних клітин в препараті з лейкоцитів хворого, що обстежується, і другого здорового донора, при цьому, при рівній кількості лімфобластів в обох препаратах констатують відсутність порушень у мітогеніндукованій проліферативній відповіді В-лімфоцитів хворого на вплив активованих Т-супресорів, при меншій кількості лімфобластів в препараті лейкоцитів хворого констатують посилення мітогеніндукованої проліферативної відповіді В-лімфоцитів хворого на вплив активованих Т-супресорів, при більшій кількості лімфобластів констатують послаблення мітогеніндукованої проліферативної відповіді В-лімфоцитів хворого на вплив активованих Т-супресорів.

Винахід відноситься до галузі медицини, точніше до імунології, і призначений для визначення мітогеніндукованої проліферативної відповіді В-лімфоцитів на вплив активованих Т-супресорів.

Вивчення регуляції імунологічних процесів в експерименті і в клініці є актуальною задачею сучасної імунології. Явище проліферативної відповіді В-лімфоцитів у культурі, яка індукується мітогенами, давно використовується для визначення функціональної активності імунокомпетентних клітин [1]. Вплив на проліферативну відповідь В-лімфоцитів у культурі, яка індукується мітогенами, з боку таких регуляторних субпопуляцій лімфоцитів, як Т-супресори, вивчається для уточнення патогенезу багатьох аутоімунних, алергічних, онкологічних та інших захворювань [2]. Це дає можливість оцінити ступінь клінічної активності процесу, перебіг захворювання та ефективність лікування.

Відомі методики дозволяють визначити кількість регуляторних лімфоцитів Т-супресорів, а також посилення або послаблення їх функції [3]. Однак при цьому немає можливості з'ясувати наявності або відсутності змін чутливості проліферуючих В-лімфоцитів до впливу Т-супресорів. Наявність даних про зміни чутливості проліферуючих В-лімфоцитів під впливом регуляторних факторів дозволить достовірно оцінити перебіг хвороби та адекватність призначеного лікування.

Відомий спосіб (прототип) визначення мітогеніндукованої проліферативної відповіді В-лімфоцитів на вплив активованих Т-супресорів [4], який складається з двох етапів. На першому етапі шляхом венепункції виконують взяття крові у кількості 5 мл, яку відразу ж переносять до стерильної пробірки з гепарином, виходячи з пропорції 2,5 мг гепарину на 1 мл крові. Для виділення лейкоцитів гепаринізовану кров змішують за умов стерильності з 16% декстраном у співвідношенні 1:9 і інкубу-

(13) A

(11) 37906

(19) UA

ють в термостаті 1 годину при 37°C. Після інкубації шар плазми, який містить лейкоцити, за допомогою стерильної пастерівської піпетки переносять до чистої пробірки, де двічі відмивають середовищем 199 шляхом центрифугування при 1000 обертів на хвилину протягом 10 хвилин. Відмиті лейкоцити ресуспендують у невеликій кількості середовища для культивування (2-3 мл). Визначають кількість клітин в 1 мл суспензії за допомогою камери Горяєва. Отриману клітинну суспензію розводять середовищем для культивування і розносять до двох стерильних пробірок, дослідної і контрольної. В дослідну пробірку вносять 1 мл середовища для культивування з конканаваліном А (Кон А) в концентрації 40 мкг/мл для активації Т-супресорів; в контрольну пробірку - 1 мл середовища для культивування без стимулятора. Культивування проводять в термостаті при 37°C протягом 48 годин.

На другому етапі відмивають лейкоцити з дослідної і контрольної пробірок, для чого їх центрифугують при 1000 обертів на хвилину протягом 10 хвилин, надосадкову рідину зливають, а клітини відмивають середовищем 199. Відмиті лейкоцити змішують в середовищі для культивування з автологічними лейкоцитами у співвідношенні 1:1. До суспензії клітин в дослідній і контрольній пробірках додають неспецифічний стимулятор бластогенеза фітогемаглютинін (ФГА) в стандартній мітогенній концентрації. Наступні 72 години обидві (дослідну і контрольну) пробірки інкубують в термостаті при 37°C. Після інкубації пробірки центрифугують при 1000 обертів на хвилину на протяжні 10 хвилин, надосадкову рідину зливають, а з осаду готують препарати, які забарвлюють за Романовським-Гімза. Мікроскопування препаратів проводять при збільшенні $\times 900$ із застосуванням масляної імерсії. І в препараті з дослідної пробірки, і в препараті з контрольної пробірки підраховують по 300 лімфоїдних клітин і визначають відсоток лімфобластів.

Порівнюючи кількість лімфобластів в препаратах з дослідної і контрольної пробірок, визначають мітогеніндуковану проліферативну відповідь В-лімфоцитів на вплив активованих Т-супресорів. Чим більшою є кількість лімфобластів в препараті з дослідної пробірки, тим меншою є активність Т-супресорів і навпаки.

Недоліком цього способу є неможливість визначення чутливості проліферуючих В-лімфоцитів до регуляторного впливу активованих Т-супресорів у хворих на аутоімунні, алергічні, онкологічні та деякі інші захворювання через відсутність співставлення чутливості В-лімфоцитів хворого і здорового донора до однакового регулюючого фактору з боку активованих Т-супресорів.

Задача, яка вирішується винаходом, полягає в об'єктивізації оцінки чутливості В-лімфоцитів хворого, що обстежується, до нормальних активованих Т-супресорів шляхом співставлення чутливості проліферуючих В-лімфоцитів хворого і проліферуючих В-лімфоцитів здорового донора до впливу активованих Т-супресорів іншого здорового донора.

Технічним результатом винаходу буде забезпечення напівкількісної оцінки ступеня порушення чутливості В-лімфоцитів хворого до нормального регулюючого фактору з боку активованих Т-супре-

сорів здорового донора, що дозволить з більшою точністю контролювати перебіг хвороби та визначити необхідність агресивного лікування із застосуванням цитостатичних препаратів та/або пульс-терапії.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі визначення мітогеніндукованої проліферативної відповіді В-лімфоцитів на вплив активованих Т-супресорів, що передбачає на першому етапі взяття крові, її гепаринізацію, виділення лейкоцитів на градієнті з 16% декстраном, ресуспендування попередньо відмитих лейкоцитів в середовищі для культивування, рознесення суспензії до двох стерильних пробірок, одна з яких дослідна, друга - контрольна, культивування обох проб в термостаті, причому дослідна пробірка для активації Т-супресорів культивується з конканаваліном А, на другому етапі відмивання лейкоцитів з дослідної і контрольної пробірок, їх змішування в рівних пропорціях з лейкоцитами, що досліджуються, інкубування з ФГА, центрифугування для виділення клітин, виготовлення препаратів з осаду, мікроскопіювання з підрахунком кількості лімфобластів і порівняння кількості лімфобластів в препаратах з дослідної і контрольної пробірок, згідно з винаходом, перший етап виконують з кров'ю здорового донора, на другому етапі Кон А-активовані Т-супресори здорового донора змішують з виділеними лейкоцитами хворого, що обстежується, і другого здорового донора, після чого операції другого етапу виконують паралельно в обох пробах, при мікроскопіюванні порівнюють кількість бластних клітин в препараті з лейкоцитів хворого, що обстежується, і другого здорового донору, при цьому при рівній кількості лімфобластів в обох препаратах констатують відсутність порушень у мітогеніндукованій проліферативній відповіді В-лімфоцитів хворого на вплив активованих Т-супресорів, при меншій кількості лімфобластів в препараті лейкоцитів хворого констатують посилення мітогеніндукованої проліферативної відповіді В-лімфоцитів хворого на вплив активованих Т-супресорів, при більшій кількості лімфобластів констатують послаблення мітогеніндукованої проліферативної відповіді В-лімфоцитів хворого на вплив активованих Т-супресорів.

Основною відмінністю запропонованого способу є те, що замість визначення впливу активованих Т-супресорів хворого на аутологічні В-лімфоцити визначається різниця в чутливості В-лімфоцитів хворого, що обстежується, і здорового донора до нормальних активованих Т-супресорів іншого здорового донора, що дає можливість об'єктивізувати отримані результати. Завдяки такому порівнянню вперше можна напівкількісно оцінити стан чутливості В-лімфоцитів хворого до нормальних активованих Т-супресорів, що дозволяє з більшою точністю контролювати перебіг хвороби та визначити необхідність агресивного лікування із застосуванням цитостатичних препаратів та/або пульс-терапії.

Спосіб здійснюють таким чином. На першому етапі від здорового донора шляхом венепункції беруть пробу крові, котру відразу ж переносять до стерильної пробірки з гепарином, виходячи з пропорції 2,5 мг гепарину на 1 мл крові. Гепаринізовану кров змішують, за умови стерильності, з 16%

декстраном у співвідношенні 1:9 і інкубують в термостаті 1 годину при 37°C для розподілу лейкоцитів і еритроцитів. При цьому пробірки витримують протягом 30 хвилин під кутом 45°, а наступні 30 хвилин вертикально. Після інкубації шар плазми, який містить лейкоцити, за допомогою стерильної пастерівської піпетки переносять до чистої пробірки, де двічі відмивають середовищем 199 шляхом центрифугування при 1000 обертів на хвилину протягом 10 хвилин.

Під час цунтрифугування у стерильному посуді готують середовище для культивування. Для цього до середовища 199 додають 10% ембріональної телячої сироватки, інактивованої в термостаті при 56°C протягом 30 хвилин, і антибіотики: пеніцилін (100 ОД/мл) і стрептоміцин (100 мкг/мл).

Відмиті лейкоцити ресуспендують у невеликій кількості середовища для культивування (2-3 мл). Визначають кількість клітин в 1 мл суспензії за допомогою камери Горяєва. Отриману клітинну суспензію розводять середовищем для культивування з метою доведення кількості клітин до 2×10^6 в 1 мл. Розведену суспензію переміщують до двох стерильних пробірок. Ці дві пробірки, кожна з 1 мл суспензії клітин 2×10^6 в 1 мл, помічають як дослідну і контрольну. В дослідну пробірку вносять 1 мл середовища для культивування з Кон А в концентрації 40 мкг/мл для активації Т-супресорів; в контрольну пробірку - 1 мл середовища для культивування без стимулятора.

Дослідну і контрольну пробірки інкубують в термостаті при 37°C протягом 48 годин. Через 48 годин дослідну і контрольну пробірки центрифугують при 1000 обертів на хвилину протягом 10 хвилин, надосадкову рідину зливають, а клітини відмивають середовищем 199.

На другому етапі здійснюють взяття крові від хворого, що обстежується, і від другого здорового донора. Кров, отриману через венепункцію, переносять до стерильних пробірок з гепарином, виходячи з пропорції 2,5 мг гепарину на 1 мл крові. Гепаринізовану кров хворого і другого здорового донора окремо змішують за умов стерильності з 16% декстраном у співвідношенні 1:9 і інкубують в термостаті 1 годину при 37°C для розподілу лейкоцитів і еритроцитів. При цьому пробірки витримують протягом 30 хвилин під кутом 45°, а наступні 30 хвилин вертикально. Після інкубації шар плазми, який містить лейкоцити, за допомогою стерильної пастерівської піпетки переносять до чистої пробірки, де двічі відмивають середовищем 199 шляхом центрифугування при 1000 обертів на хвилину протягом 10 хвилин.

Відмиті лейкоцити ресуспендують у невеликій кількості середовища для культивування (2-3 мл). І для клітин хворого, що обстежується, і для клітин другого здорового донора визначають кількість клітин в 1 мл суспензії за допомогою камери Горяєва. Отримані клітинні суспензії розводять середовищем для культивування з метою доведення кількості клітин до 2×10^6 в 1 мл кожної.

Суспензію оброблених на першому етапі клітин з дослідної та контрольної пробірок змішують з отриманими зразками гепаринізованої крові хворого, що обстежується, і другого здорового донора, у співвідношенні 1:1. При цьому пробірку з активованими Т-супресорами першого здорового донора

і лімфоцитами хворого підписують як дослідну, пробірку з неактивованими Т-супресорами і лімфоцитами хворого, що обстежується, підписують як контроль № 1, пробірку з активованими Т-супресорами першого здорового донора і лімфоцитами другого здорового донора підписують як контроль № 2 і пробірку з неактивованими Т-супресорами першого здорового донора і лімфоцитами другого здорового донора підписують як контроль № 3. В кожну з чотирьох пробірок додають неспецифічний стимулятор бластогенеза ФГА в стандартній мітогенній концентрації. Наступні 72 години всі чотири (дослідна і 3 контрольні) пробірки інкубують в термостаті при 37°C.

Після інкубації пробірки центрифугують при 1000 обертів на хвилину протягом 10 хвилин, надосадкову рідину зливають, а з осаду готують препарати, які забарвлюють за Романовським-Гімза. Проводять мікроскопування препаратів при збільшенні $\times 900$ із застосуванням масляної імерсії. І в препараті з дослідної пробірки, і в препаратах з контрольних пробірок підраховують по 300 лімфоїдних клітин і визначають відсоток лімфобластів. Порівнюють кількість бластних клітин в препараті з лейкоцитів хворого, що обстежується, і другого здорового донора, при цьому при рівній кількості лімфобластів в обох препаратах констатують відсутність порушень у мітогеніндукованій проліферативній відповіді В-лімфоцитів хворого на вплив активованих Т-супресорів, при меншій кількості лімфобластів в препараті лейкоцитів хворого констатують посилення мітогеніндукованої проліферативної відповіді В-лімфоцитів хворого на вплив активованих Т-супресорів, при більшій кількості лімфобластів констатують послаблення мітогеніндукованої проліферативної відповіді В-лімфоцитів хворого на вплив активованих Т-супресорів. Вираженість відмінності в кількості бластних клітин в препаратах з лейкоцитів хворого і другого здорового донора напівкількісно свідчить про ступінь порушень чутливості В-лімфоцитів хворого, що обстежується, до впливу нормальних активованих Т-супресорів.

Приклад конкретного втілення.

Хвора Л., 35 років, поступила до київського міського ревматологічного центру з діагнозом "Системний червоний вовчак II ступеня активності з ураженням нирок, шкіри, плеври і перикарду" (історія хвороби № 8676). Для призначення адекватного лікування було вирішено визначити зміни в чутливості В-лімфоцитів хворої до нормальних активованих Т-супресорів.

Від здорового донора К., 29 років, шляхом венепункції здійснили взяття 5 мл крові, яка була відразу ж перенесена до стерильної пробірки з 12,5 мг гепарину. Гепаринізована кров змішувалась за умов стерильності з 16% декстраном у співвідношенні 1:9 і інкубувалась в термостаті 1 годину при 37°C для розподілу лейкоцитів і еритроцитів. При цьому пробірки витримувались протягом 30 хвилин під кутом 45°, а наступні 30 хвилин вертикально. Після інкубації шар плазми, який містив лейкоцити, за допомогою стерильної пастерівської піпетки перенесли до чистої пробірки, де двічі відмивали середовищем 199 шляхом центрифугування при 1000 обертів на хвилину протягом 10 хвилин.

Під час центрифугування у стерильному посуді готувалося середовище для культивування.

Відмиті лейкоцити ресуспендували у невеликій кількості середовища для культивування (2 мл). Визначали кількість клітин в 1 мл суспензії за допомогою камери Горяєва. Після додавання 3 мл середовища для культивування кількість клітин в суспензії довели до 2×10^6 в 1 мл. Розведену суспензію перемістили до двох стерильних пробірок. Ці дві пробірки, кожна з 1 мл суспензії клітин 2×10^6 в 1 мл, помітили як дослідну і контрольну. В дослідну пробірку внесли 1 мл середовища для культивування з 40 мкг Кон А для активації Т-супресорів; в контрольну пробірку - 1 мл середовища для культивування без стимулятора. Дослідну і контрольну пробірки інкубували в термостаті при 37°C протягом 48 годин. Через 48 годин дослідну і контрольну пробірки центрифугували при 1000 обертів на хвилину протягом 10 хвилин, надсадкову рідину злили, а клітини відмили середовищем.

На другому етапі здійснили взяття крові від хворої Л. і від другого здорового донора П., 31 рік. По 5 мл крові хворої і донора перенесли до стерильних пробірок з 12,5 мг гепарину. Гепаринізовану кров хворої Л. і другого здорового донора змішали за умови стерильності з 16% декстраном у співвідношенні 1:9 і інкубували в термостаті 1 годину при 37°C для розподілу лейкоцитів і еритроцитів. При цьому пробірки витримували протягом 30 хвилин під кутом 45° , а наступні 30 хвилин вертикально. Після інкубації шар плазми, який містив лейкоцити, за допомогою стерильної пастерівської піпетки перенесли до чистої пробірки, де двічі відмили середовищем 199 шляхом центрифугування при 1000 обертів на хвилину протягом 10 хвилин. Відмиті лейкоцити ресуспендували у 2 мл середовища для культивування. В кожній пробірці визначили кількість клітин в 1 мл суспензії шляхом підрахунку в камері Горяєва. До обох пробірок додали середовище, виходячи з пропорції, яка дозволила довести кількість клітин до 2×10^6 в 1 мл кожної суспензії. Суспензію оброблених на першому етапі клітин з дослідної та контрольної пробірок змішали з отриманими зразками гепаринізованої крові хворої Л. і другого здорового донора П. у співвідношенні 1:1. При цьому пробірку з активованими Т-супресорами першого здорового донора К. і лімфоцитами хворої Л. помітили як дослідна, пробірку з неактивованими Т-супресорами і лімфоцитами хворої Л. підписали як контроль № 1, пробірку з активованими Т-супресорами першого здорового донора К. і лімфоцитами другого здорового донора П. підписали як контроль № 2, пробірку з неактивованими Т-супресорами першого здорового донора К. і лімфоцитами другого здорового донора П. підписали як контроль № 3. В кожну з пробірок додали ФГА в концентрації 30 мкг/мл. Наступні 72 години всі чотири (дослідна і 3 контрольні) пробірки інкубували в термостаті при 37°C .

Після інкубації пробірки центрифугували при 1000 обертів на хвилину протягом 10 хвилин, надсадкову рідину злили, а з осаду виготовили препарати, які забарвили за Романовським-Гімза. При мікроскопуванні препаратів при збільшенні $\times 900$ із застосуванням масляної імерсії в кожному було підраховано по 300 лімфоїдних клітин і визначений

відсоток лімфобластів. Було визначено, що відсоток лімфобластів в препараті лімфоцитів хворої Л., які культивувалися з неактивованими Т-супресорами першого здорового донора К. становив 18,5%. Відсоток лімфобластів в препараті лімфоцитів хворої Л., які культивувалися з активованими Т-супресорами першого здорового донора К. становив 18%. Відсоток лімфобластів в препараті лімфоцитів другого здорового донора П., які культивувалися з неактивованими Т-супресорами першого здорового донора К. становив 32%. Відсоток лімфобластів в препараті лімфоцитів другого здорового донора П., які культивувалися з активованими Т-супресорами першого здорового донора К. становив 19%.

Таким чином, кількість лімфобластів в препараті лейкоцитів хворої Л. майже не змінилася під впливом активованих Т-супресорів першого здорового донора, тоді як кількість лімфобластів в препараті лейкоцитів другого здорового донора змінилася під впливом активованих Т-супресорів першого здорового донора суттєво. Було констатовано значне зниження чутливості В-лімфоцитів хворої Л. до впливу нормальних активованих Т-супресорів. За висновками дослідження і інших клінічних і лабораторних даних хворій була призначена пульс-терапія метілпреднізолоном.

Протягом 1999 року на базі лабораторії імунології НДІ нейрохірургії ім. акад. Ромоданова було проведено вивчення чутливості В-лімфоцитів до впливу активованих Т-супресорів 12 хворих на системний червоний вовчак, що перебували на лікуванні в Київському міському ревматологічному центрі. У всіх хворих був виявлений високий ступінь порушення чутливості В-лімфоцитів до впливу активованих Т-супресорів. Використання способу-прототипу не дало б можливості визначити наявність і ступінь порушень чутливості В-лімфоцитів хворих до впливу активованих Т-супресорів. Залежно від ступеня порушень були прийняті індивідуальні рішення при використанні агресивних методик лікування.

Таким чином, завдяки запропонованому способу ми вперше отримуємо інформацію про ступінь чутливості проліферуючих В-лімфоцитів до регуляторного впливу Т-супресорів. Це дає можливість уточнити роль порушень чутливості В-лімфоцитів у патогенезі аутоімунних захворювань, об'єктивно оцінити перебіг хвороби, контролювати ефективність лікування і проводити необхідну корекцію в схемі курації хворого.

Джерела інформації.

1. Дранник Г.Н., Лысенко Г.И., Монтаг Т.С. и др. Изучение функциональной активности неспецифических Т-лимфоцитов-супрессоров у здоровых людей и у больных системной красной волчанкой // Врачебное дело. - 1980. - № 1. - С. 88-90.

2. Fernandez-Gutierrez B., de Miguel S., Morado C. e.a. Defective early T and T-dependent B cell activation in systemic lupus erythematosus // Lupus, 1998. - Vol. 7. - № 5. - p. 314-322.

3. Лимфоциты: Методы. Пер. с англ. / Под ред. Дж. Клауса. - М.: Мир, 1990. - 393 с.

4. Пастер Е.У., Овод В.В., Позур В.К., Вишоть Н.Е. Иммунология. Практикум. - К.: Выща школа, 1989. - 302 с.

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2001 р. Формат 60х84 1/8.
Обсяг _____ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.
(044) 268-25-22
