



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 75057

(13) U

(51) МПК

G01N 33/48 (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2012 03371**

(22) Дата подання заявки: **21.03.2012**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **26.11.2012**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **26.11.2012, Бюл.№ 22**

(72) Винахідник(и):

**Любич Лариса Дмитрівна (UA),  
Лісяний Микола Іванович (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ  
НЕЙРОХІРУРГІЇ ІМ. АКАД. А.П.  
РОМОДАНОВА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ  
МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ",  
вул. Платона Майбороди, 32, м. Київ, 04050  
(UA)**

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ СЕНСИБІЛІЗАЦІЇ ДО НЕЙРОСПЕЦИФІЧНИХ БІЛКІВ (НСБ) ПРИ НЕЙРОТРАНСПЛАНТАЦІЇ АЛОГЕННИХ ПРОГЕНІТОРНИХ НЕЙРОКЛІТИН ФЕТАЛЬНОГО МОЗКУ

### (57) Реферат:

Спосіб визначення сенсibilізації до нейроспецифічних білків (НСБ) при нейротрансплантації алогенних прогеніторних нейроклітин фетального мозку шляхом імунологічного дослідження. Через визначений термін після трансплантації (1 місяць) у реципієнтів забирають венозну периферичну кров, отримують сироватку крові, у якій досліджують вміст аутоантитіл до нейроспецифічних білків, а саме основного білка мієліну (ОБМ), білка S-100 та нейронспецифічної енолази (NSE) твердофазним імуноферментним методом за допомогою розробленої тест-системи для проведення імуноферментного аналізу антитіл до НСБ і специфічних антивидових кон'югатів вторинних антитіл.

UA 75057 U



Корисна модель належить до медицини, а саме імунології та трансплантології, і може бути використана у медицині для скринінгу гуморальних аутоімунних реакцій до нейроантигенів у реципієнтів нейротрансплантату алогенних прогеніторних нейроклітин, що необхідно для прогнозування імунообумовлених ускладнень при лікуванні захворювань центральної нервової системи (ЦНС) за допомогою нейротрансплантації алогенних прогеніторних нейроклітин

фетального мозку у віддалений термін після трансплантації.

Сучасна стратегія трансплантації нейрогенних стовбурових клітин (НСК) та нейрогенних прогеніторних клітин (НКП) для заміщення втрачених або порушених функцій ЦНС потребує тривалого виживання пересаджених клітин та інтеграції з системою реципієнта, а також відсутності несприятливих побічних наслідків. Необхідно враховувати роль імунної системи як безпосередньо в процесі втручання при трансплантації, так і у відповідь на пересаджувані клітини. Можливою здатністю алогенних НСК і НКП викликати імунну активацію у віддаленому періоді після трансплантації не можна нехтувати: НСК людини розпізнаються і викликають імунну відповідь в ало- і ксеногенних системах *ex vivo*, тобто вони мають імунологічний потенціал, рівень якого є достатнім для активації периферичних лімфоцитів реципієнта [1]. Разом з тим, залишається невирішеною проблема антигенних властивостей НСК та НКП *in vivo*. Одним з шляхів вирішення проблеми є оцінка нейроспецифічних імунних реакцій при нейротрансплантації алогенних фетальних НКП.

У теперішній час запропоновані і використовуються різні способи дослідження нейроспецифічних імунних реакцій. Як правило, ці способи передбачають застосування імуноферментних методів дослідження, загальний принцип яких полягає в тому, що матеріалом для дослідження є біологічні рідини, які тестують на наявність антитіл (антигенів). Принцип твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА) полягає в тому, що антитіла тестованого зразка взаємодіють з іммобілізованим на твердій фазі антигеном, потім фіксують на собі антивидові антитіла (вторинні), кон'юговані з ферментом пероксидазою хрину. Кількість зв'язаного кон'югата виявляється за допомогою хромогенного субстрату, причому інтенсивність забарвлення, що розвивається, пропорційна кількості антитіл у зразках.

Прототипом способу, що заявляється, вибрано дослідження Пічура Л.Д. і Цимбалюка В.І. (2007) [2]. Автори досліджували наявність аутоімунітету до нейробілків у хворих після лікування органічних уражень центральної нервової системи з використанням алогенних ембріональних нейроклітин шляхом ін'єкційного ендолюмбального введення хворому. Для цього хворих до лікування обстежували з метою виявлення ознак аутоімунітету до нейробілків. За наявності таких ознак одноразово внутрішньовенно вводили алогенні ембріональні клітини печінки. Після повторного імунологічного обстеження, у разі відсутності ознак аутоімунітету до нейробілків, трансплантували алогенні ембріональні нейроклітини у вигляді клітинної суспензії. Цей спосіб, спрямований на скринінг хворих з органічними ураженнями ЦНС перед запланованим введенням алогенних НКП на наявність аутоімунних реакцій до нейроантигенів, є адекватним, сучасним і доступним. До недоліків цього способу можна віднести наступне: 1) він не враховує можливість розвитку нейроаутоімунних реакцій у віддаленому періоді після трансплантації; 2) він описаний для одного способу введення трансплантованих клітин; 3) він описаний для одного біологічного виду (людини) і обмежує широке застосування цього способу для експериментальних досліджень на тваринах.

Задачею запропонованої корисної моделі є визначення гуморальних аутоімунних реакцій до нейроантигенів у реципієнтів нейротрансплантату алогенних прогеніторних нейроклітин фетального мозку, яке б адекватно відображало розвиток гуморальної аутоімунної відповіді, що відбувається при алогенній нейротрансплантації в організмі реципієнта (експериментальних тварин, людини) при різних способах введення трансплантованих клітин, а також відносна економічність, малозатратність і широкодоступність.

Поставлена задача вирішується тим, що через визначений термін після трансплантації (1 місяць) у реципієнтів нейротрансплантату алогенних прогеніторних нейроклітин забирають венозну периферичну кров, отримують сироватку крові, у сироватці периферичної крові досліджують вміст аутоантитіл до нейроспецифічних білків, а саме основного білка мієліну (ОБМ), білка S-100 та нейронспецифічної енолази (NSE) твердофазним імуноферментним методом за допомогою розробленої тест-системи для проведення імуноферментного аналізу антитіл до НСБ і специфічних антивидових кон'югатів вторинних антитіл.

А саме, у реципієнта нейротрансплантації алогенних прогеніторних нейроклітин через визначений термін після нейротрансплантації (1 місяць) забирають венозну периферичну кров, отримують сироватку крові та проводять імуноферментний аналіз (ІФА) із визначенням вмісту у сироватці крові антитіл до НСБ, а саме основного білка мієліну (ОБМ), білка S-100 та нейронспецифічної енолази (NSE), із використанням розробленої тест-системи для проведення

ІФА антитіл до НСБ і специфічних антивидових кон'югатів вторинних антитіл. Принцип дослідження сенсibilізації до нейроспецифічних білків (НСБ) при нейротрансплантації алогенних прогеніторних нейроклітин (НКП) фетального мозку базується на тому, що алогенні донорські фетальні НКП (Е13-15) після введення реципієнту індують гуморальну аутоімунну відповідь до нейроспецифічних антигенів [3-6].

Корисна модель, що пропонується, дозволяє удосконалити існуючий прототип. Використання розробленої тест-системи визначення вмісту антитіл до НСБ надає можливість адекватної реєстрації специфічної аутоімунної відповіді до нейроантигенів - ОБМ, S-100, NSE, - що є маркерами нейронів та гліальних клітин, та проводити моніторинг динаміки рівня гуморальної аутоімунної відповіді у реципієнтів алогенних прогеніторних нейроклітин у різні терміни після нейротрансплантації. Спосіб дозволяє оцінити вказані показники при різних видах трансплантації (внутрішньомозкове, внутрішньоочеревинне та інші способи введення прогеніторних нейроклітин). Використання специфічних антивидових кон'югатів вторинних антитіл (проти імуноглобулінів класу G щура, миші, кроля, людини) дозволяє провести діагностику аутоімунної відповіді до нейроантигенів та оцінити ризик імунообумовлених ускладнень в експерименті на тваринах та у людей при лікуванні неврологічних захворювань методом нейротрансплантації прогеніторних нейроклітин фетального мозку. Використання сироватки крові як матеріалу для дослідження робить пропонований спосіб відносно економічним і широкодоступним.

Спосіб виконується наступним чином. У реципієнта нейротрансплантації алогенних прогеніторних нейроклітин через визначений термін після нейротрансплантації (1 місяць) забирають венозну периферичну кров, отримують сироватку крові та проводять ІФА із визначенням вмісту антитіл до НСБ у сироватці крові. Підготовка планшетів і сорбція антигену (НСБ). Антиген іммобілізують на твердій фазі (планшетах) в концентрації 10 мкг/мл; в кожну лунку планшета вносять по 100 мкл розчину антигену. Сорбція антигена триває 18-20 год. при 4 °C і проводиться: ОБМ - у цитратно-фосфатному буфері 0,1 М, рН 6,0; S-100 і NSE - у карбонатно-бікарбонатному буфері 0,1 М з рН 9,6. Видалення антигену, що не зв'язався, а також розведення всіх реагентів і наступне видалення компонентів, що не зв'язалися, проводять тричі з використанням фосфатного буферу 0,01 М, рН 7,4 з додаванням 0,05 % твіна-20. Для заповнення місць, що не зв'язалися, з метою блокування подальшого неспецифічного зв'язування сайтів, в лунки вносять 1 % БСА. Підготовка дослідних і контрольних сироваток. Досліджувані і контрольні зразки розводять у 100 разів, для чого у комірки допоміжного планшета вносять по 1 мл фосфатного буферу 0,01 М, рН 7,4 і додають по 10 мкл суцільної сироватки, ретельно перемішують.

Приготування розчину кон'югату.

Кон'югат антивидових імуноглобулінів з пероксидазою розводять фосфатним буфером 0,01 М, рН 7,4 у співвідношенні 1:20. Приготування субстратного розчину. 80 мг аміносаліцилової кислоти розчиняють при 70 °C у 100 мл води. Безпосередньо перед використанням рН розчину доводять до 6,0 1 М розчином їдкого натру NaOH. На кожні 9 мл отриманого розчину додають 1 мл 0,05 % розчину перексиду водню H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Проведення ІФА.

1. Досліджувані та контрольні зразки сироватки вносять у розведенні 1:100 по 100 мкл у комірки планшета із сорбованим антигеном. Інкують 2 год при 37 °C або 24 год при 4 °C.

2. Тричі відмивають фосфатним буфером.

3. Вносять по 100 мкл розчину кон'югату антивидових імуноглобулінів з пероксидазою в робочому розведенні. Кон'югат інкують протягом 1 год при 37 °C.

4. Тричі відмивають фосфатним буфером.

5. В кожну комірку планшета вносять по 100 мкл ферментного субстрату (0,08 % розчин 5-аміносаліцилової кислоти з 0,05 % перексиду водню). Інкують 40 хв. при 20 °C.

6. Зупиняють реакцію додаванням 100 мкл стоп-реагенту (1 М NaOH).

7. Рівень аутоантитіл визначають методом спектрофотометрії в аналізаторі імуноферментному, вимірюючи оптичну густину при довжині хвилі 450 нм.

Оцінка результатів.

Розраховують значення оптичної густини в комірках із дослідними і контрольними зразками і виражають в умовних одиницях У.О. (У.О.=оптична густина проби × ступінь розведення досліджуваного зразка).

При застосуванні описаного способу визначення рівня аутоантитіл до ОБМ, S-100 та NSE в сироватках крові мишей-реципієнтів C57BL/6 з внутрішньомозковим (n=15) та внутрішньоочеревинним (n=15) введенням алогенних фетальних НКП (Е13-15) мишей-донорів СВА, а також контрольних груп мишей (інтактні C57BL/6 (n=15)) встановлено достовірне

підвищення рівня аутоантитіл до нейроантігенів у тварин з внутрішньомозковим алотрансплантатом фетальних НКП (E13-15), яке досягає найбільшого рівня у віддалений період на 37-у добу після трансплантації, що дозволяє припускати, що поряд з антитілами до алоантігенів в реакціях імунного відторгнення можуть брати участь також аутоантитіла до нейроантігенів, які виявляються в різні терміни після алотрансплантації [3, 4]. Показано, що на відміну від тварин з внутрішньомозковим алотрансплантатом фетальних НКП (E13-15), у тварин з внутрішньомозковим сингенним трансплантатом фетальних НКП (E13-15) не зареєстрована гуморальна аутоімунна відповідь до нейроспецифічних антигенів [5]. Запропонованим способом також досліджено рівень аутоантитіл до НСБ після алогенної внутрішньомозкової трансплантації НКП у кролів [6].

Спосіб, що пропонується, має переваги перед прототипом, бо використання пропонованого способу визначення сенсibilізації до нейроспецифічних білків (НСБ) в нейрохірургії дозволить провести діагностику аутоімунної відповіді до нейроантігенів та оцінити ризик імунообумовлених ускладнень у віддалений термін після нейротрансплантації прогеніторних нейроклітин фетального мозку при захворюваннях ЦНС.

В порівнянні із прототипом запропонований спосіб має ряд переваг:

- дозволяє оцінити можливість розвитку нейроаутоімунних реакцій у віддаленому періоді після трансплантації;
- дозволяє проводити скринінг при різних способах введення трансплантованих клітин;
- розширює застосування цього способу для експериментальних досліджень на тваринах (щури, миші, кролі).

Література:

1. Ubiali F., Nava S., Nessi V. et al. Allorecognition of human neural stem cells by peripheral blood lymphocytes despite low expression of MHC molecules: role of TGF-beta in modulating proliferation. *Int.Immunol.* 2007; 19(9): 1063-1074.

2. Пічкур Л.Д., Цимбалюк В.І. Спосіб лікування органічних уражень центральної нервової системи з використанням алогенних ембріональних нейроклітин // Патент на корисну модель UA № 22507 U. - 25.04.2007. - Бюл. № 5.

3. Лісяний М.Л., Любич Л.Д. Особливості розвитку імунної відповіді на внутрішньомозкове введення алогенних фетальних нейроклітин в експерименті // Імунологія та алергологія. - 2009. - №4. - С. 99-109.

4. Лісяний М.Л., Любич Л.Д. Динаміка імунної відповіді на ало- та тканинні антигени фетальних нейроклітин в експерименті // Імунологія та алергологія. - 2010. - № 3, 4. - С. 104-111.

5. Любич Л.Д. Визначення антитілоутворення до нейроспецифічних білків (НСБ) при внутрішньомозковому введенні сингенних та алогенних фетальних нейроклітин-прекурсорів (НКП) // Імунологія та алергологія. Наукаіпрактика. - 2011. - № 2. - С. 97-102.

6. Лісяний М.Л., Любич Л.Д., Черченко А.П., Верхоглядів Ю.П. Дослідження рівня аутоантитіл до нейроспецифічних білків у кролів після алогенної внутрішньомозкової трансплантації ембріональних клітин-попередників нервової системи // Фізіологічний журнал. - 2006. - Т. 52, № 3. - С. 64-69.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення сенсibilізації до нейроспецифічних білків (НСБ) при нейротрансплантації алогенних прогеніторних нейроклітин фетального мозку, що включає імунологічне дослідження, який **відрізняється** тим, що через визначений термін після трансплантації (1 місяць) у реципієнтів нейротрансплантату алогенних прогеніторних нейроклітин забирають венозну периферичну кров, отримують сироватку крові, у сироватці периферичної крові досліджують вміст аутоантитіл до нейроспецифічних білків, а саме основного білка мієліну (ОБМ), білка S-100 та нейронспецифічної енолази (NSE) твердофазним імуоферментним методом за допомогою розробленої тест-системи для проведення імуоферментного аналізу антитіл до НСБ і специфічних антивидових кон'югатів вторинних антитіл.

---

Комп'ютерна верстка В. Мацело

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601