



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **94103**

(13) **U**

(51) МПК

G01N 33/48 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 05840**

(22) Дата подання заявки: **29.05.2014**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **27.10.2014**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **27.10.2014, Бюл.№ 20**

(72) Винахідник(и):

**Шитіков Дмитро В'ячеславович (UA),
Пішель Ірина Миколаївна (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ
ГЕРОНТОЛОГІЇ ІМ. Д.Ф. ЧЕБОТАРЬОВА
НАМН УКРАЇНИ",
вул. Вишгородська, 67, м. Київ, 04114 (UA)**

(54) СПОСІБ КОРЕКЦІЇ ВІКОВИХ ЗМІН ІМУННОЇ СИСТЕМИ ТВАРИН

(57) Реферат:

Спосіб корекції вікових змін імунної системи тварин здійснюється завдяки корекції вікових змін у Т-лімфоцитах, при якій проводять заміну in vitro адгерентних клітин селезінки реципієнта адгерентними клітинами селезінки молодих інтактних тварин.

UA 94103 U

Корисна модель належить до експериментальної медицини, зокрема, до імунології, і може використовуватись для відновлення зниженого функціонального стану імунної системи тварин старших вікових груп.

Для оцінки та порівняння ефективності відновлення функціональних параметрів імунної системи використовується модель заміни клітин лімфоїдної ніші Т-лімфоцитів селезінки. Вікова дисфункція функціональних показників імунної системи знижує ефективність вакцинації, погіршує перебіг інфекційних захворювань, знижує захист проти патогенів та пухлин. За науковими дослідженнями вікова дисфункція імунної системи відбувається головним чином за рахунок порушень у функціонуванні Т-лімфоцитів. Заміна клітин периферичної лімфоїдної ніші Т-лімфоцитів має на меті відновлення функціональних показників та субпопуляційного складу Т-лімфоцитів периферичних лімфоїдних органів, що представляє можливість відновлення зниженого функціонального стану імунної системи.

Відомий спосіб використання спеціально розробленого засобу для потенціювання імунної відповіді, "Immunopotentiating composition and process for producing same", патент Канада № 2786891. В даному випадку реципієнту вводиться засіб, що викликає стимуляцію клітин імунної системи і сприяє посиленню їх активності. Недоліком даного способу є використання неочищених речовин мікробного походження, які можуть викликати алергічні реакції і можуть призвести до непередбачуваних наслідків.

Найближчим прототипом є використання для відновлення вікових змін імунної системи препарату "Трансфер-фактор", "Способ снижения биологического возраста - омоложения организма", патент РФ № 2007125208. В запропонованому способі реципієнт отримує препарат "Трансфер-фактор" з метою зниження біологічного віку та корекції негативних вікових змін у фізіологічних показниках. Недоліком цього способу є не специфічність дії препарату, а також відсутність даних про механізм дії препарату та довгострокові ефекти від його прийому.

В основу даної корисної моделі поставлена задача розробити спосіб корекції вікових змін імунної системи тварин за рахунок підвищення функціональних властивостей Т-лімфоцитів за допомогою переселення периферичної лімфоїдної ніші старих тварин клітинами молодих тварин. Це дозволить регенерувати функціональні показники Т-лімфоцитів, вікова дисфункція яких призводить до порушень в роботі імунної системи.

Спосіб здійснюється наступним чином.

Використовують тварин 2 вікових груп: старих та молодих мишей лінії CBA/Ca. Надалі проводять аналіз впливу клітин мікрооточення Т-лімфоцитів селезінки молодих або старих тварин на функціональні показники відповіді Т-лімфоцитів старих тварин, а саме проліферативний відгук та молекулярні механізми активації Т-лімфоцитів в умовах *in vitro*. Для цього проводять сумісне культивування *in vitro* Т-лімфоцитів селезінки тварин різних експериментальних груп з цільною популяцією клітин лімфоїдної ніші селезінки тварин їхньої ж експериментальної групи або молодих інтактних тварин.

Для аналізу проліферативного відгуку та молекулярних механізмів активації Т-лімфоцитів селезінку виймають та поміщають у 1 мл повного стерильного середовища RPMI-1640. Для цього селезінку розділяють на дві рівні половини, котрі гомогенізують, а отримані суспензії спленоцитів використовують для виділення клітин ніші селезінки з цільною популяцією адгерентних клітин селезінки та виділення Т-лімфоцитів.

Виділення Т-клітин проводять з суспензії спленоцитів, отриманої після гомогенізації першої половини селезінки, за допомогою очистки Т-клітин у колонках з нейлоною ватою за методикою, наданою виробником, Polyscience Inc., США. Кількість отриманих клітин підраховують у камері Горяєва з використанням розчину Тюрка.

Другу половину селезінки гомогенізують у 1 мл середовища RPMI-1640 без ембріональної телячої сироватки. Далі спленоцити відмивають від їх середовища та доводять їх концентрацію до $20 \cdot 10^6$ /мл за допомогою повного середовища RPMI-1640 з 10 % ембріональної телячої сироватки. $10 \cdot 10^6$ спленоцитів у об'ємі 500 μ л нашаровують на пластик ємності, де у подальшому проводять сумісну культивування з Т-клітинами. Суспензію спленоцитів інкубують протягом 2 годин при 37° С у середовищі RPMI-1640 з 10 % ембріональною телячою сироваткою щоб сприяти прилипанню клітин лімфоїдної ніші селезінки. Клітини, що не прилипли до пластику відбирають, а пробірку промивають 2-ма промивками RPMI-1640.

У пробірці, куди були нанесені адгерентні клітини селезінки, вносять $2 \cdot 10^6$ Т-лімфоцитів. Потім у середовище додають фітогемаглютинін (ФГА), мітоген Т-клітин, 20 мкг/мл, Sigma-Aldrich GmbH, що активує проліферативну відповідь Т-лімфоцитів. Культивування проводять протягом 72 годин при температурі 37 °С у повному середовищі RPMI-1640, що містить: 10 % ембріональної телячої сироватки, HEPES, 2-меркаптоетанол, 100 од/мл бензилпеніциліну та 0,1 мг/мл

стрептоміцину. Індекс стимуляції, що відповідає інтенсивності проліферації лімфоцитів, вимірюють колориметрично за допомогою спектрофотометра.

Аналіз впливу популяції клітин лімфоїдної ніші селезінки на молекулярні механізми активації Т-лімфоцитів проводять аналогічно. Виділення популяції адгерентних клітин селезінки для даного аналізу проводять за методикою, наведеною вище. Далі у пробірки, де були виділені адгерентні клітини селезінки, вносять $5 \cdot 10^6$ Т-лімфоцитів з подальшим додаванням ФГА 20 мкг/мл, Sigma-Aldrich GmbH, що активує проліферативну відповідь Т-лімфоцитів. Культивування відбувається у повному середовищі RPMI-1640, що містить 10 % ембріональної телячої сироватки, HEPES, 2-меркаптоетанол, 100 од/мл бензилпеніциліну та 0,1 мг/мл стрептоміцину протягом 2 або 18 годин при температурі 37 °С, після чого клітини лізують. Т-клітини після стимуляції відмивають від культурального середовища 2-ма відмивками у фізіологічному розчині, після чого клітини інкубують у спеціальному лізисному буфері, 150 mM NaCl, 20 mM Tris, 10 % гліцеролу, 1 % Triton X-100, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 1mM PMSF, протягом 30 хвилин на льоду. Після цього зразки центрифугують при 12000 g протягом 12 хв. Отримані лізати зберігають при -20° С до визначення концентрації білку та подальшого аналізу. Визначення концентрації білку проводять за допомогою колориметричного методу з використанням пірогалолу червоного, ТОВ НВП "Філісіт-Діагностика". Перед нанесенням білків на гель проводять денатурацію білкового екстракту у буфері Лемлі за загальноприйнятою методикою.

Розділення білків з даних екстрактів проводять за допомогою ID електрофорезу у 10 % денатуруючих поліакриламідному гелі за стандартною методикою. Далі проводять електроперенос білків з гелю на PVDF-мембрани, Carl Roth GmbH. Аналіз змін у молекулярних механізмах активації Т-лімфоцитів проводять за допомогою імуноблотингу.

Вміст сигнальних білків визначають з використанням антитіл до наступних білків: NFkB p65, Ikbα, caspase 3, Santa Cruz, США, та β-Actin, Abeam, Великобританія. У якості вторинних АТ використовують поліклональні антитіла до кролячих імуноглобулінів, кон'юговані з пероксидазою хрину, Abeam. Реєстрацію вмісту цільових білків проводять за допомогою хемілюмінесцентної реакції за стандартною методикою. На мембрани наносять розчин ECL, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5, 0,4 mM Coumaric acid, 2,5 mM Luminol, 0,02 % перекису водню. Люмінесценцію виявляють з допомогою рентгенівських плівок AGFA, Бельгія, за стандартною методикою.

Оцінювання інтенсивності засвічення бендів на плівці проводять денситометрично з використанням програми Gel Analyzer 2010. Нормалізацію денситограми проводять по відношенню до інтенсивності бенду референтного білка, за який використовується β-Actin, у контрольному зразку, котрими були лізати стимульованих Т-лімфоцитів селезінки від молодих ізохронних парабіонтів.

Таблиця 1

Показник	Адгерентні клітини селезінки тварин своєї ж експериментальної групи		Адгерентні клітини селезінки молодих інтактних тварин	
	Т-клітини молодих тварин	Т-клітини старих тварин	Т-клітини молодих тварин	Т-клітини старих тварин
Проліферативний відгук Т-лімфоцитів при їх сумісній культивуванні з адгерентними клітинами	4,4±0,31 (n=9)	3,07±0,26* (n=10)	2,84±0,23 (n=7)	3,74±0,17* (n=8)
Експресія RelA після 2 годин стимуляції, %	86,9±4,14 (n=6)	14,4±0,1 * (n=3)	84,9±3,45 (n=6)	181,8±66* (n=4)
Відносна експресія каспази р 20 після 2 годин стимуляції, %	86,9±4,14 (n=6)	41,7±0,1 * (n=3)	88,2±9,47 (n=7)	41,7±3,4* (n=4)
Відносна експресія RelA після 18 годин стимуляції, %	93,77±4,26 (n=6)	91,43±0,1 (n=3)	84±2,8 (n=6)	73,9±0,1 (n=3)
Відносна експресія каспази р 20 лізаті після 18 годин стимуляції, %	90,16±5,68 (n=4)	54,31±0,1* (n=3)	77,6±10,8 (n=4)	58,7±18,31 (n=4)

Примітки:

* - P < 0,05 - по відношенню до Т-лімфоцитів молодих тварин

У випадку культивування *in vitro* Т-клітин селезінки та адгерентних клітин селезінки старих тварин у присутності ФГА у дозі 20 мкг/мл відмічався знижений проліферативний відгук, зниження експресії білків NFκB p65, активованої форми каспази 3 p20, та підвищення експресії інгібіторного білка ІκВ α , що вказує на наявність вікових змін у функціонуванні Т-лімфоцитів.

5 При культивуванні *in vitro* Т-лімфоцитів селезінки старих тварин з адгерентними клітинами селезінки молодих інтактних тварин у присутності ФГА у відповідній дозі відбувається підвищення проліферативного відгуку Т-лімфоцитів та нормалізація експресії ключових молекул, що грають роль у активації Т-лімфоцитів, зокрема білків NFκB p65 на ранніх строках активації, 2 години стимуляції, та каспази 3 p20 на більш пізніх строках активації, 18 годин стимуляції, що вказує на корекцію вікових змін у функціонуванні Т-лімфоцитів. Дані наведено у табл. 1.

Запропонований спосіб надасть можливість корекції вікових порушень функціональних властивостей Т-лімфоцитів та може бути використаний для боротьби з онкологічними, серцево-судинними захворюваннями та інфекційною патологією у старших вікових груп.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб корекції вікових змін імунної системи тварин, що включає корекцію вікових змін у Т-лімфоцитах, який **відрізняється** тим, що для корекції вікових змін Т-лімфоцитів проводиться заміна *in vitro* адгерентних клітин селезінки реципієнта адгерентними клітинами селезінки молодих інтактних тварин.

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

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