



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **75059**

(13) **U**

(51) МПК

G01N 33/48 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2012 03373**

(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 ДОСЛІДЖЕННЯ АЛОЦИТОТОКСИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ІМУНОКОМПЕТЕНТНИХ КЛІТИН

(57) Реферат:

Спосіб дослідження алоцитотоксичної активності імунокомпетентних клітин належить до медицини, а саме імунології та трансплантології, і може бути використаний у медицині для скринінгу клітинних імунних реакцій до алоантигенів у реципієнтів нейротрансплантата алогенних прогеніторних нейроклітин.

UA 75059 U

Корисна модель до медицини, а саме імунології та трансплантології, і може бути використана у медицині для скринінгу клітинних імунних реакцій до алоантигенів у реципієнтів нейротрансплантата алогенних прогеніторних нейроклітин, що необхідно для прогнозування імунообумовлених ускладнень при лікуванні захворювань центральної нервової системи (ЦНС) за допомогою нейротрансплантації алогенних прогеніторних нейроклітин фетального мозку.

Сучасні технології лікування захворювань ЦНС із застосуванням трансплантації нейрогенних стовбурових клітин (НСК) та нейрогенних прогеніторних клітин (НКП) потребують тривалого виживання пересаджених клітин та інтеграції з системою реципієнта, а також врахування реакції імунної системи у відповідь на пересаджувані клітини. Встановлено, що НСК 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 оцінки імунної активації після трансплантації алогенних НКП. Одним з шляхів вирішення проблеми є дослідження алоспецифічних клітинних імунних реакцій при нейротрансплантації алогенних фетальних НКП.

У теперішній час запропоновані і використовуються неізотопні колориметричні методи оцінки цитотоксичної дії на клітини, такі як МТТ-колориметричний тест [8, 12] та тест з нейтральним червоним [3], які є не менш чутливими, ніж класичні ізотопні методи [7]. Колориметричний метод із застосуванням МТТ (3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,6-дифенілтетразоліум бромід) був запропонований Mossmann T. [11] для визначення проліферації та життєздатності клітин. Метод засновано на тому, що мітохондріальні ферменти у життєздатних клітинах, в яких збережена мітохондріальна активність, перетворюють доданий в культуру клітин субстрат - МТТ-тетразолієву сіль жовтого кольору у кристалічний МТТ-формазан пурпурного кольору. Пізніше МТТ-метод знайшов своє застосування в експерименті *in vitro* для оцінки цитотоксичної активності макрофагів, цитотоксичних лімфоцитів та ЛАК-клітин [2, 6, 9, 10], а також клітинної та лікарської цитотоксичності [4, 5].

Прототипом способу, що заявляється, вибрано дослідження Шпакової А.П. та ін. (2000) [8], в якому розроблено МТТ-колориметричний метод визначення цитотоксичної активності природних кілерних клітин. Автори досліджували цитотоксичну активність природних кілерів людини. Як клітини-ефектори використовували свіжовиділені мононуклеари периферичної крові людини, як клітини-мішені використовували клітини 2-ї та 3-ї доби культивування еритромієлоїдної лейкемічної лінії людини K-562, чутливої до дії природних кілерів. Цей спосіб, спрямований на діагностику функціональної активності природних кілерів та скринінг хворих з порушеннями системи природної цитотоксичності, є адекватним, сучасним і доступним.

До недоліків цього способу можна віднести наступне: 1) він описаний для одного виду клітин-ефекторів - природних кілерів, що входять у пул свіжовиділених мононуклеарів периферичної крові людини; 2) він потребує для постановки наявність еритромієлоїдної лейкемічної лінії людини K-562, яку необхідно тривало підтримувати *in vitro*; 3) він описаний для одного біологічного виду (людини) і обмежує широке застосування цього способу для експериментальних досліджень на тваринах.

Задачею запропонованої корисної моделі є дослідження специфічної алоцитотоксичної активності імунокомпетентних клітин експериментальних тварин-реципієнтів в алогенній системі, яке б адекватно відображало динаміку розвитку імунної відповіді на алоантигени донорів, що відбувається при алогенній нейротрансплантації в організмі реципієнта.

Поставлена задача вирішується тим, що через визначений термін після трансплантації (6, 12, 18 та 37 діб) у мишей-реципієнтів нейротрансплантата алогенних прогеніторних нейроклітин та у мишей донорської лінії забирають лімфовузли ($n=6$ від кожної тварини), готують суспензії лімфоцитів за допомогою механічної гомогенізації тканини лімфовузлів у середовищі RPMI, що містить 5 % ембріональної телячої сироватки, фільтрують через капроновий фільтр, двічі відмивають середовищем RPMI, що містить 5 % ембріональної телячої сироватки, шляхом центрифугування протягом 5 хв. при 1500 об./хв. на настільній центрифугі, підраховують кількість клітин у камері Горяєва з 3% розчином оцтової кислоти та кількість життєздатних клітин з 0,2% розчином трипанового синього і доводять кількість клітин у суспензії до необхідної концентрації ($1,25 \times 10^7$ - для клітин-ефекторів; $0,25 \times 10^7$ - для клітин-мішеней), як клітини-ефектори використовують лімфоцити лімфовузлів мишей-реципієнтів (однієї лінії, наприклад, C57BL/6), які клітини-мішені використовують лімфоцити лімфовузлів мишей-донорів (іншої лінії, наприклад, СВА), із приготованими клітинними суспензіями клітин-ефекторів та клітин-мішеней (співвідношення ефектор-мішень складає 5:1) проводять цитотоксичний тест і вираховують цитотоксичний індекс.

Корисна модель, що пропонується, дозволяє удосконалити існуючий прототип. Використання розробленого способу дослідження алоцитотоксичної активності імункомпетентних клітин надає можливість адекватної реєстрації клітинної імунної відповіді на алоантигени донорів та проводити моніторинг динаміки рівня алоцитотоксичної 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 запропонованого способу дозволяє провести діагностику цитотоксичної клітинної відповіді до алоантигенів та оцінити ризик імунобумовлених ускладнень в експерименті на тваринах при лікуванні неврологічних захворювань методом нейротрансплантації прогеніторних нейроклітин фетального мозку. Спосіб дозволяє провести скринінг імуносупресивних препаратів з метою оцінки їх можливого застосування для пригнічення алоцитотоксичних імунних реакцій і попередження імунобумовленого відторгнення нейротрансплантата. Пропонований спосіб є відносно економічним і широкодоступним.

Спосіб виконується наступним чином. Як клітини-ефектори використовують лімфоцити лімфовузлів мишей-реципієнтів (однієї лінії, наприклад, C57BL/6); як клітини-мішені використовують лімфоцити лімфовузлів мишей-донорів (іншої лінії, наприклад, CBA). У мишей-реципієнтів нейротрансплантації алогенних прогеніторних нейроклітин через визначений термін після нейротрансплантації (6, 12, 18 та 37 діб) та у мишей донорської лінії забирають лімфовузли (n=6 від кожної тварини), готують суспензії лімфоцитів за допомогою механічної гомогенізації тканини лімфовузлів у середовищі RPMI, що містить 5 % ембріональної телячої сироватки, фільтрують через капроновий фільтр, двічі відмивають середовищем RPMI, що містить 5 % ембріональної телячої сироватки, шляхом центрифугування протягом 5 хв. при 1500 об./хв. на настільній центрифугі, підраховують кількість клітин у камері Горяєва з 3 % розчином оцтової кислоти та кількість життєздатних клітин з 0,2 % розчином трипанового синього і доводять кількість клітин у суспензії до необхідної концентрації ($1,25 \times 10^7$ - для клітин-ефекторів; $0,25 \times 10^7$ - для клітин-мішеней). Із приготованими клітинними суспензіями клітин-ефекторів та клітин-мішеней (співвідношення ефектор-мішень складає 5:1) проводять цитотоксичний тест, як описано у [8], реєструють методом спектрофотометрії в автоматичному аналізаторі, вимірюючи оптичну густину при довжині хвилі 540 нм і вираховують цитотоксичний індекс (ЦІ) за формулою:

$$\text{ЦІ} = 100 - \left(\frac{\text{ОГе} + \text{м} - \text{ОГе}}{\text{ОГм}} \times 100 \right) \%,$$

де

ОГе+м - значення оптичної густини в лунках ефектори+мішені;

ОГе - значення оптичної густини в лунках з ефекторами;

ОГм - значення оптичної густини в лунках з мішенями.

При застосуванні описаного способу дослідження алоцитотоксичної активності імункомпетентних клітин використання відпрацьованих нами концентрацій клітин ($1,25 \times 10^7$ - для клітин-ефекторів; $0,25 \times 10^7$ - для клітин-мішеней) та співвідношення ефектор:мішень 5:1 дозволило виявити відмінності цитотоксичної активності імункомпетентних клітин інтактних та дослідних тварин і простежити динаміку імунної відповіді на алоантигени після внутрішньомозкової та внутрішньоочеревинної трансплантації клітин різних типів. Клітинні алоцитотоксичні імунні реакції генерувались при внутрішньомозковому введенні нейроклітин та клітин лімфовузлів дорослих тварин, і фетальних НКП (Е13-15), наростали з 6-ї по 12-у добу з наступним зниженням на 37-у добу [13]. Після внутрішньоочеревинного введення фетальних НКП (Е13-15) клітинні алоімунні реакції розвивались з 6-ї по 37-у добу з максимальним рівнем на 6-у добу і подальшим зниженням до 37-ї доби [14]. Імуносупресивний препарат сандімун гальмував алоцитотоксичну відповідь на введення алогенних фетальних НКП при використанні триразового введення препарату в дозі 100 мкг [13, 14].

Спосіб, що пропонується, має переваги перед прототипом, бо використання пропованого способу дослідження алоцитотоксичної активності імункомпетентних клітин в медицині дозволить провести діагностику алоцитотоксичної клітинної імунної відповіді у реципієнта нейротрансплантата до алоантигенів донора; оцінити ризик імунобумовлених ускладнень і спрогнозувати можливе відторгнення трансплантату; провести скринінг імуносупресивних препаратів для пригнічення алоцитотоксичних імунних реакцій після нейротрансплантації з метою попередження можливого імунобумовленого відторгнення прогеніторних нейроклітин фетального мозку при захворюваннях ЦНС.

В порівнянні із прототипом, запропонований спосіб має ряд переваг:

- дозволяє оцінити можливість розвитку алоцитотоксичних імунних реакцій після трансплантації;
- дозволяє проводити скринінг при різних способах введення трансплантованих клітин;
- дозволяє проводити скринінг при трансплантації клітин різних типів;
- 5 - розширює застосування цього способу для експериментальних досліджень на тваринах;
- не потребує наявності клітинної лінії, яку необхідно тривало підтримувати *in vitro*, що дозволяє здешевити постановку тесту;
- дозволяє проводити скринінг імуносупресивних препаратів для пригнічення алоцитотоксичних імунних реакцій після нейротрансплантації.

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. Борисевич Н.В., Шман Т.В., Алейникова О.В. Структура первых рецидивов острого лимфобластного лейкоза у детей и оценка результатов их лечения с учетом МТТ-теста // Вопросы гематологии и онкологии и иммунопатологии в педиатрии. - 2004, - Т. 3, № 1. - С. 95-98.
3. Кузюкова Н.А. Оценка активности естественных киллеров колориметрическим методом // Иммунология. - 1991. - № 4. - С. 59-61.
4. Оптимизация критических параметров МТТ-теста для оценки клеточной и лекарственной цитотоксичности / В.С. Черепович, Е.В. Волочник, Е.В. Антоненко, Е.С. Лоткова, Т.В. Романовская, В.В. Гринев // БМЖ. - 2006. - 2(16).
5. Пашкова В.С., Филиппова Л.А., Лавренев А.Л. Способ определения индивидуальной химиочувствительности опухоли у больных *in vitro* // Патент Российской Федерации на изобретение RU 2094802. 1997.10.27.
6. Прогностическое значение определения чувствительности бластных клеток детей с острым лимфобластным лейкозом к химиопрепаратам *in vitro* / С.С. Кузнецова, А.Н. Иншаков, С.А. Маякова, Ю.В. Шишкин, А.Ю. Барышников // Российский биотерапевтический журнал. - 2004. - Т.3., № 1. - С. 61-67.
7. Тейлор П., Томас Д., Миллз К. Культивирование линий и клонов Т-клеток *in vitro* // В.кн. «Лимфоциты. Методы» П/р Дж.Клауса. - М.: Мир. - 1990. - С. 208-229.
8. Шпакова А.П., Павлова К.С., Булычева Т.И. МТТ-колориметрический метод определения цитотоксической активности естественных киллерных клеток // Клин.лаб.диагностика. - 2000. - № 2. - С. 20-23.
9. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia / A.A.Van de Loosdrecht, R.H.J.Beelenb, G.I.Ossenkoppele, M.G.Broekhoven, M.M.Langenhuijsen// *J.Immunol.Meth.* - 1994. - Vol. 174(1-2). - P. 311-320.
10. Cell mediated cytotoxicity against U937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay / A.A.Van de Loosdrecht, E.Nennie, G.I.Ossenkoppele, R.H.Beelen, M.M.Langenhuijsen // *J. Immunol. Meth.* - 1991. - Vol. 141. - P. 15-22.
11. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J.Immunol.Methods.* - 1983. - Vol. 65(1-2). - P. 55-63.
12. Qing-xia Niu, Cheng-yan Zhao, Zhi-an Jing. An evaluation of the colorimetric assays based on enzymatic reactions used in the measurement of human natural cytotoxicity // *J.Immunil.Meth.* - 2001. - Vol. 251(1-2). - P. 11-19.
13. Лісяний М.І., Любич Л.Д. Особливості розвитку імунної відповіді на внутрішньомозкове введення алогенних фетальних нейроклітин в експерименті // Імунологія та алергологія. - 2009. - № 4. - С. 99-109.
14. Лісяний М.І., Любич Л.Д. Динаміка імунної відповіді на ало- та тканинні антигени фетальних нейроклітин в експерименті // Імунологія та алергологія, - 2010. - № 3, 4. - С. 104-111.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- Спосіб дослідження алоцитотоксичної активності імунокомпетентних клітин, що включає імунологічне дослідження, який **відрізняється** тим, що через визначений термін після трансплантації (6, 12, 18 та 37 діб) у мишей-реципієнтів нейротрансплантата алогенних прогеніторних нейроклітин та у мишей донорської лінії забирають лімфовузли (n=6 від кожної тварини), готують суспензії лімфоцитів за допомогою механічної гомогенізації тканини лімфовузлів у середовищі RPMI, що містить 5 % ембріональної телячої сироватки, фільтрують через капроновий фільтр, двічі відмивають середовищем RPMI, що містить 5 % ембріональної

телячої сироватки, шляхом центрифугування протягом 5 хв. при 1500 об./хв. на настільній центрифугі, підраховують кількість клітин у камері Горяєва з 3 % розчином оцтової кислоти та кількість життєздатних клітин з 0,2 % розчином трипанового синього і доводять кількість клітин у суспензії до необхідної концентрації ($1,25 \times 10^7$ - для клітин-ефекторів; $0,25 \times 10^7$ - для клітин-мішеней), як клітини-ефектори використовують лімфоцити лімфовузлів мишей-реципієнтів (однієї лінії, наприклад, C57BL/6), як клітини-мішені використовують лімфоцити лімфовузлів мишей-донорів (іншої лінії, наприклад, CBA), із приготованими клітинними суспензіями клітин-ефекторів та клітин-мішеней (співвідношення ефектор:мішень складає 5:1) проводять цитотоксичний тест і вираховують цитотоксичний індекс.

5

10

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
