



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **69524** (13) **U**  
(51) МПК (2012.01)  
**A61B 8/00**

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: <b>u 2011 15218</b>	(72) Винахідник(и): <b>Виговська Оксана Валентинівна (UA), Крамарьов Сергій Олександрович (UA), Тарадій Нелля Миколаївна (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>22.12.2011</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>25.04.2012</b>	(73) Власник(и): <b>НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, бул. Шевченка, 13, м. Київ-4, 01601, Україна (UA)</b>
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.04.2012, Бюл.№ 8</b>	

## (54) СПОСІБ ОЦІНКИ СТАНУ АПОПТОЗУ ПРИ ІНФЕКЦІЙНОМУ МОНОНУКЛЕОЗІ ЕПШТЕЙНА-БАРР ВІРУСНОЇ ЕТІОЛОГІЇ У ДІТЕЙ

### (57) Реферат:

Спосіб оцінки стану апоптозу при інфекційному мононуклеозі Епштейна-Барр вірусної етіології у дітей передбачає визначення рівня експресії CD95 в крові. Додатково досліджують експресію в імункомпетентних клітинах інших маркерів апоптозу, таких як -Fas/Apo-1, Bcl-2, Вах, INF $\gamma$ , TNF $\alpha$ , анексин V і при наявності їх оцінюють стан апоптозу.

UA 69524 U



Корисна модель, що заявляється, належить до медицини, а саме до педіатрії, і може бути використана для оцінки стану апоптозу при інфекційному мононуклеозі Епштейна-Барра вірусної етіології у дітей.

Апоптоз представляє собою форму загибелі клітини, яка виявляється за допомогою морфологічної ідентифікації: конденсації хроматину, зменшення розміру клітини, фрагментації ядра та цитоплазми, утворення апоптотичних тілець [1]. Апоптоз має налагоджений біохімічний і клітинний механізм розвитку. В даний час інтенсивно вивчається роль апоптозу у регуляції імунної відповіді, розвитку імунodefіцитних станів і імунопатології. Особливий інтерес представляє участь апоптозу в патогенезі інфекційних захворювань, так як їх збудники мають різноманітний вплив на програмовану загибель клітин - стимулюючи або пригнічуючи. Встановлено, що ряд вірусів захищають від апоптозу інфіковані клітини, одночасно підсилюючи апоптоз незаражених клітин, в чому можна запідозрити важливий механізм вірус індукованої імуносупресії. До таких вірусів, що має двоякий вплив на апоптоз клітин імунної системи, належить і вірус Епштейна-Барра (ВЕБ) - збудник інфекційного мононуклеозу (ІМ).

Імунокомпетентні клітини (ІКК), як і клітини інших тканин, яким властива довічна фізіологічна регенерація, в диференціюванні набувають програму на апоптоз. Лімфоцитам властивий апоптоз, що перевищує інші клітини, оскільки вони повинні ділитися при лімфопоезі і на периферії при ініціації імунної відповіді [12].

Виділяють сполуки, що сприяють виживанню клітини - антиапоптотичні молекули (Bcl-2, Bcl-xl, Bag-1, Bіk) і призводять до загибелі клітини - проапоптотичні молекули (Bax, Bak, Bad, Bid) [5,12]. Ген Bcl-2 кодує синтез білка мембраноасоційованого Bcl-2, розташованого на мітохондріальній та перинуклеарній мембранах [7], роль якого полягає у підтримці процесів клітинного виживання і проліферації. Bax і Bad - білки, які здатні формувати гетеродімери з Bcl-2 та Bcl-xl внаслідок їх високої амінокислотної гомології. Зв'язування цих білків скасовує антиапоптотичні властивості Bcl-2 та Bcl-xl. Баланс про- і антиапоптотичних молекул визначає розвиток або запобігання загибелі клітини [5].

ВЕБ може викликати апоптоз у клітинах дихального епітелію [3,5,6,7] і при цьому процес апоптозу може активуватися через TNF $\alpha$  (фактор некрозу пухлини  $\alpha$ ) - апоптозіндукуючий ліганд (TRAIL), який призводить до селективного знищення інфікованих вірусом клітин [8,4]. TNF $\alpha$  представляє собою розчинний цитокін, що синтезується активованими Т-лімфоцитами і макрофагами у відповідь на запалення та інфекцію. TNF $\alpha$  стимулює адгезію нейтрофілів на ендотеліальних клітинах і їх екстравазацію - міграцію до вогнища запалення із судинного русла (сприяючи розпушуванню міжклітинного матриксу), сприяє активації нейтрофілів, посилюючи фагоцитоз та продукцію супероксидних радикалів, а також експресію рецепторів комплементу на нейтрофілах, індукує експресію додаткових Fas-рецепторів на Т-лімфоцитах, HLA-DR експресію і високоафінного рецептора інтерлейкіну 2 (IL-2). Т-клітини під дією TNF $\alpha$  прискорюють проліферацію у відповідь на IL-2, а також збільшують IL-2-залежний синтез інтерферону- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ). TNF $\alpha$  діє переважно на початкових етапах запального процесу. Для його завершення необхідний TGF- $\beta$ . Синтез TNF $\alpha$  згасає вже через кілька годин після активації. TNF $\alpha$  надає сильну протизапальну і катоболітичну дію, має антимікробну і протипухлинну активність; взаємодіє з мембранним рецептором Fas родини (P55).

Роль апоптозу при ВЕБ- інфекції пов'язана з обмеженням масштабів інфекції, включаючи запалення і є спільною клітинною відповіддю. Макрофагальні клітини, які фагоцитували апоптотичні клітини, набувають при цьому протизапальні властивості. У таких макрофагах підвищується експресія TGF- $\beta$  і PGE2, зменшується продукція інтерлейкіну 8 (IL-8), TNF $\alpha$ , інтерлейкіну 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Макрофаги, які фагоцитували апоптотичні клітини, здатні інгібувати проліферацію Т-лімфоцитів, на відміну від макрофагів фагоцитуючих некротичну клітину [10]. Останнім часом приділяється велика увага вивченню біологічної активності білків, що належать до родини аннексинів. Аннексин V належить до родини Ca<sup>2+</sup> - і фосфоліпідзв'язуючих білків, блокуючих фосфоліпазу А. У механізмі дії аннексину V велике значення має його властивість зв'язуватися з негативно зарядженими фосфоліпідами, в тому числі з фосфатидилсеріном (ФС), експозиція якого на клітинній мембрані є однією з ранніх ознак апоптозу [4]. Аннексин V, як і інші аннексини, не виділяється з нормальних клітин; джерелом позаклітинного аннексину V є апоптотичні і зруйновані клітини [3,2]. У дослідженнях було показано, що Bcl-2 прямо або опосередковано перешкоджає вивільненню цитохрому С. Транслокація гена Bcl-2, що призводить до його гіперекспресії, характерна для В-клітинної лімфоми, деяких форм раку та резистентності до хіміотерапії. Протизапальна і зберігаюча функція білка Bcl-2 полягає в захисті ендотеліальних клітин шляхом інгібування ядерного чинника NF- $\kappa$ B і зниження вироблення прозапальних генів [9,10]. Проапоптотичний білок Bax, переміщаючись з цитоплазми на поверхню мітохондрій, інактивує

антиапоптозні білки, що призводить до утворення пор в мітохондріях і виходу цитохрому С та інших проапоптозних молекул з міжмолекулярного простору. Проапоптозні члени Bcl-2 також збільшують проникність мітохондріальної мембрани, що призводить до потрапляння проапоптозних білків в цитоплазму. Подібно іншим членам родини, Вах складається з константних доменів Bcl-2 гомологів 1 (BH1) і 2 (BH2), що зумовлює їх гомо- або гетеродимеризацію з Bcl-2. Незважаючи на те, що Вах сам по собі не викликає апоптоз, збільшення рівня Вах прискорює розвиток апоптозу після сигналів смерті, таких як цитокінова депривація або взаємодія Fas з Fas-лігандом. Виникнення апоптозу визначається співвідношенням гомодимера Вах та Вах/Bcl-2 гетеродимерів. Коли Bcl-2 у надлишку апоптоз інгібується. Однак, якщо рівень Вах збільшується у відповідь на сигнал смерті, це сприяє клітинній смерті.

Т-лімфоцити, що перебувають у стані спокою, характеризуються відносно високим рівнем експресії антиапоптозних білка Bcl-2 і низькою експресією молекул Fas і рецепторів до TNF. Якщо ІКК активується, то чутливість до апоптозу зростає в десятки разів, при цьому в цитоплазмі Т-лімфоцитів різко знижується експресія білка Bcl-2, а на мембрані з'являється значна кількість молекул Fas і TNF $\alpha$  [12].

Дані про утворення аннексину V, Fas/Apo1, Вах, Bcl-2, інтрацелюлярних INF $\gamma$  і TNF $\alpha$  при інфекційному мононуклеозі Епштейна-Барр вірусної етіології нечисленні і суперечливі.

Інфекційний мононуклеоз (ІМ) - це антропонозна вірусна інфекція з повітряно-крапельним механізмом передачі збудника, що характеризується лихоманкою, інтоксикацією, генералізованою лімфаденопатією, збільшенням печінки і селезінки. Важливою особливістю ВЕБ є вибіркове інфікування В-лімфоцитів через специфічний рецептор CD21 (CR2). При цьому знижується здатність В-клітин до загибелі через апоптоз. У той же час ВЕБ (і його поверхневий глікопротеїн gp 350) при гострому ІМ викликає посилення експресії Fas (CD95) на CD4 + і CD8 + Т-лімфоцитах і Fas-ліганда (FasL) на В-лімфоцитах і моноцитах-макрофагах, що веде до Fas - опосередкованого апоптозу Т-клітин. Велика частина (до 80 % vs 10 % у донорів) мононуклеарів крові хворих гострим ІМ гине через 48-72 години культивування, при цьому апоптозу піддаються CD4 + і CD8 + Т-лімфоцити фенотипу Т-клітин пам'яті (CD45RO +). Апоптоз активованих ВЕБ Т-лімфоцитів може лежати в основі транзиторної імуносупресії, що спостерігається при гострому ІМ.

Довгий час В-лімфоцити вважалися єдиною мішенню ВЕБ в організмі хворого. Однак пізніше встановлено, що інфікуються також клітини епітелію носоглотки і нейтрофіли. Останні, будучи інфікованими, піддаються загибелі через Fas-залежний апоптоз. Можливе інфікування Т-лімфоцитів, а також фолікулярних дендритних клітин, які мають на поверхні рецептор CD21. Зв'язуючись з поверхнею моноцитів і нейтрофілів, ВЕБ індукуює в них синтез хемотаксичних факторів, у тому числі IL-8 і макрофагальний запальний протеїн-1 (MIP-1 alpha). У гостру фазу хвороби в крові у хворих зростають рівні цитокінів IL-1alpha, IL-2, IL-6 і IFN-gamma. Інфіковані ВЕБ клітини мигдаликів посилено синтезують IL-1beta, IL-6 і TNF-alpha. Крім IL-1alpha і IL-1beta, ВЕБ індукуює в нейтрофілах синтез рецепторного антагоніста IL-1 (IL-1Ra), інгібуючи IL-1-залежні механізми клітинного імунітету. За деякими даними, ВЕБ кодує вірусний білок, гомологічний IL-1Ra і володіє його функціями. Джерелом IL-6, зокрема, можуть бути В-лімфоцити, адсорбовані ВЕБ в ініціальну фазу інфекції.

Відомий спосіб оцінки стану апоптозу при інфекційному мононуклеозі ВЕБ етіології вибраний нами як прототип передбачає оцінку співвідношення показників активації та апоптозу в імунній системі дітей, хворих гострим ІМ із різним ступенем тяжкості клінічних проявів інфекції (15).

Однак недоліками даного способу є те, що стан апоптозу оцінювався лише дослідженням обмеженої кількості маркерів, визначався лише рівень експресії CD95<sup>+</sup> клітин та визначалася готовність лімфоцитів до спонтанного апоптозу in vitro.

Задачею корисної моделі, що вирішується, є оцінка стану апоптозу шляхом дослідження експресії в імунокомпетентних клітинах маркерів апоптозу: Fas/Apo-1, Bcl-2, Вах, INF $\gamma$ , TNF $\alpha$ , аннексин V.

Технічним результатом є зменшення ризику виникнення ускладнень та покращення ефективності лікування.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі, який передбачає визначення рівня експресії CD95 в крові, згідно з корисною моделлю, додатково досліджують експресію в імунокомпетентних клітинах інших маркерів апоптозу, таких як - Fas/Apo-1, Bcl-2, Вах, INF $\gamma$ , TNF $\alpha$ , аннексин V і при наявності їх оцінюють стан апоптозу.

Спосіб здійснюється наступним чином:

В дослідження було включено 15 дітей, хворих на ІМ ВЕБ, які перебували на стаціонарному лікуванні в КМДКІЛ з 2008 року по 2010 рік у віці від 1 до 18 років. Діагноз встановлювали на

основі клінічних ознак захворювання, лабораторних даних на присутність циркулюючих АТ і корпускулярних Аг, імунофлюоресцентного дослідження. Групу порівняння склали 25 практично здорових дітей-спортсменів віком від 7 до 14 років, які були обстежені у відповідності з міжнародним етичним протоколом.

5 Лімфоцити виділяли з стабілізованої ЕДТА (50 ммоль/10 мл) венозної крові розведеною 1: 2 середовищем RPMI 1640 (Sigma, США) з додаванням 10 % інактивованої фетальної телячої сироватки (GidcoBRL, Англія) в градієнті щільності фіколл - верографину ("Pharmacia", щільність 1,077), що втричі відмивали розчином PBS (pH 7,2; "Flow Labs", Великобританія). Життєздатність клітин становила 95-98 %. Фіксацію препаратів проводили на предметних  
10 скельцях в маркованих лунках (1 × 106 клітин в 1 мл) протягом 3 хвилин в парах 10 % нейтрального формаліну. Перед фарбуванням мазки двічі промивали у PBS (pH7, 2). Маркери апоптозу досліджували в поєднанні з маркерами диференціювання CD4, CD8, CD25, CD20. На фіксовані клітини наносили по 20 мкл моноклональних антитіл, мічених FITC або Cy5, до CD4 або CD8, CD25, CD20 (HBLЦ "МедБіоСпектр", Москва, ОНЦ РАМН) в оптимальній концентрації (≤ 0.5 мкг), інкубували 15-30 хв. при 40 С в темряві, двічі промивали PBS. Маркери апоптозу Вах, Bcl-2, iNOs, Fas / Apo, інтрацелюлярний INFγ, TNFα, аннексин V виявляли за допомогою моноклональних антитіл (PharMingen, США), кон'югованих з флуоресцентними мітками різного спектру світіння (FITC/519 - зелений, PE/578- жовтий, Cy5/667- червоний, PerCP/678 - темно-червоний). Після фарбування поверхневих антигенів препарати пермеабілізували в 20 мкл розчину Cytofix / Cytoperm (BDTMPHosFlow) протягом 10-20 хв. при 40° С, двічі промивали у розчині Perm / Wash (BDTMPHosFlow). Потім забарвлювала клітини АТ до рецепторів INFγ і TNFα, кон'югованими з FITC, згідно з індивідуальним для кожного маркера протоколом (BD Transduction Laboratories, PharmingenTM, США). Вах досліджували непрямим імунофлюоресцентним методом із застосуванням очищених мишачих моноклональних антитіл проти людського Вах (PharmingenTM, США) у кінцевій концентрації 5 мкг / мл на 106ІКК. Зв'язавшись первинні антитіла візуалізували за допомогою вторинних АТ, мічених PerCP (exc488/532, em-тах 678). Вторинні АТ - кролячі антимишачі IgG1, кон'юговані з PerCP (PharmingenTM, США) - світяться в червоній частині спектра. Bcl-2 виявляли після фіксації розчином 1 % сапоніну в PBS і пермеабілізації в 20 мкл Cytofix / Cytoperm (BDTMPHosFlow) 10 хв. при 4° С, двічі промивали PBS і фарбували моноклональними антитілами, міченими PE (Pharmingen, США) 30 хвилин при 40° С в темряві. Світіння враховували в жовтому спектрі (Lazer 514 nm, фільтр BP 560-615). iNOs визначали за допомогою моноклональних антитіл, кон'югованих з FITC, відповідно до протоколу BD Transduction Laboratories (PharmingenTM, США). Фарбували препарати, за допомогою набору PharmingenTM (США) для виявлення аннексину V / пропідія йодиду відповідно до протоколу фірми Pharmingen. Ядра лімфоцитів фарбували Hoetch (Sigma) в синій колір. Результати враховували на двох конфокальних лазерних скануючих мікроскопах: Axioskop-2 LSM 5 PASCAL і AxioCam HRO LSM PASCAL 510 META (Carl ZEISS) з гелій-неоновим і аргоновим лазерами (Lazer 488 nm, фільтр BP 505-530; Lazer 514 nm, фільтр BP 560-615, Lazer 543 nm, фільтр LP650). Об'єктив-100 / 1,4 160/017, окуляр 10, масляна іммерсія. Отримані зображення сканували та оброблялися за допомогою комп'ютерної програми LSV510.

Статистичну обробку результатів проводили методами описової статистики і кореляційного аналізу.

45 Дослідження маркерів апоптозу при ІМ ВЕБ етіології в гострому періоді захворювання показало високу ступінь їх експресії. Всі досліджувані маркери апоптозу: Fas/Apo-1, Bcl-2, Вах, INFγ, TNFα, аннексин V перевищували контрольні значення: рівень Fas / Apo-1 перевищував контрольне значення в 2,9 рази; рівень Bcl-2 був підвищений у 2,3 рази; рівень Вах - в 3,2 рази; рівень INFγ - в 3,1 разів; рівень TNFα - у 3 рази; рівень аннексину V (Ann V) - в 2,5 рази (p <0,05), дані відображено в таблиці.

50

Таблиця

## Експресія маркерів апоптозу ІКК при ІМ ВЕБ етіології у дітей

Групи	Fas/Apo-1	Bcl-2	Bax	INF $\gamma$	TNF $\alpha$	AnnV
Група порівняння (n=25)	1,18 $\pm$ 0,09	0,96 $\pm$ 0,08	1,14 $\pm$ 0,11	1,29 $\pm$ 0,10	1,15 $\pm$ 0,12	0,45 $\pm$ 0,04
Інфекційний мононуклеоз (n=15)	3,37 $\pm$ 0,18*	2,24 $\pm$ 0,14*	3,63 $\pm$ 0,29*	4,00 $\pm$ 0,24*	3,40 $\pm$ 0,17*	1,11 $\pm$ 0,07*
* Достовірне розходження з групою порівняння (p < 0, 05); статистична обробка проведена з розрахунком коефіцієнта Ст'юдента.						

Спосіб був апробований на базі кафедри дитячих інфекційних хвороб Національного медичного університету імені О.О. Богомольця. Отриманий позитивний результат дозволяє

5

рекомендувати його для широкого впровадження в клінічну медицину.

Джерела інформації:

1. Ярилин А.А. Апоптоз и его место в иммунных процессах // Иммунология, 1996. - №6. - С. 10-15.

2. Петрищев Н. Н., Васина Л. В. Аннекси А5 и дисфункция эндотелия // Учёные записки Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. академика И. П. Павлова, 2004. - Т. XI. - № 3. Приложение. С. 45-47.

10

3. Kotelkin A, Prikhod'ko EA, Cohen J, Collins PL, Bukreyev A Respiratory syncytial virus infection sensitizes cells to apoptosis mediated by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. J Virol 2003, 77(17):9156-9172.

4. Clarke P, Meintzer SM, Gibson S et al. Reovirus-induced apoptosis is mediated by TRAIL. J Virol 2000, 74(17):8135-8139.

15

5. Barber GN Host defense, viruses and apoptosis. Cell Death Differ 2001, 8(2):113-126.

6. Yamada K, Elliott WM, Brattsand R et al. Molecular mechanisms of decreased steroid responsiveness induced by latent adenoviral infection in allergic lung inflammation. J Allergy Clin Immunol 2002, 109(1):35-42

20

7. Azevedo AM, Durigon EL, Okasima V et al. Detection of influenza, parainfluenza, adenovirus and respiratory syncytial virus during asthma attacks in children older than 2 years old. Allergol Immunopathol (Madr) 2003, 31(6):311-317.

8. Yamada K, Elliott WM, Hayashi S et al. Latent adenoviral infection modifies the steroid response in allergic lung inflammation. J Allergy Clin Immunol 2000, 106(5):844-851.

25

9. Lyles DS Cytopathogenesis and inhibition of host gene expression by RNA viruses. Microbiol Moř Biol Rev 2000, 64(4):709-724.

10. Strasser A., Harris A. W., Huang D. C S. et al. Bcl-2 and Fas/APO-1 regulates distinct pathways to lymphocyte apoptosis // Eur. Moř. Biol. Organ. J. 1995. Vol. 14. P. 6136-47.

30

11. Kiener P. A., Davis P. M., Starling G. C et al. Differential induction of apoptosis by Fas-Fas-ligand interactions in human monocytes and macrophages // J. Exp. Med. 1997. Vol. 185. P. 1511-1516.

12. Gao HX, Campbell SR, Burkly L. Et al. TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) induces inflammatory and proliferative effects in human kidney cells // Cytokine.-2009. - V.I 14, №2-P. 113-120.

35

13. Harry GJ, Lefebvre d'Hellencourt C, McPherson CA, Funk JA, Aoyama M, Wine RN. Tumor necrosis factor p55 and p75 receptors are involved in chemical-induced apoptosis of dentate granule neurons // J Neurochem.-2008. -V.106,№ 1.-P.281-298.

14. Cui LY, Liu SL, Ding Y, Huang DS et al. IL-1 $\beta$  sensitizes rat intervertebral disc cells to Fas ligand mediated apoptosis in vitro // Acta Pharmacol Sin.-2007. - V.28, № 10. - P. 1671-1676.

40

15. Г. Ф. Железникова, Л. И. Васякина, Н. Е. Монахова, М. А. Павленко, Е. В. Новожилова, Н. А. Попова, О. В. Родионова Апоптоз и иммунный ответ у детей с острым инфекционным мононуклеозом //Иммунопатология. Аллергология. Инфектология, 2000. - 4: - 87-94.

# ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб оцінки стану апоптозу при інфекційному мононуклеозі Епштейна-Барр вірусної етіології у дітей, що включає визначення рівня експресії CD95 в крові, який **відрізняється** тим, що додатково досліджують експресію в імунокомпетентних клітинах інших маркерів апоптозу, таких як -Fas/Apo-1, Bcl-2, Bax, INF $\gamma$ , TNF $\alpha$ , анексин V і при наявності їх оцінюють стан апоптозу.

---

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

---

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