



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **105223** (13) **U**
(51) МПК (2016.01)
A61K 33/00
A61P 37/00
G01N 33/50 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2015 08422</p> <p>(22) Дата подання заявки: 27.08.2015</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.03.2016</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.03.2016, Бюл.№ 5</p>	<p>(72) Винахідник(и): Ульянов Вадим Олексійович (UA), Велічко Людмила Миколаївна (UA), Богданова Олександра Вікторівна (UA), Макарова Марія Борисівна (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ОЧНИХ ХВОРОБ І ТКАНИННОЇ ТЕРАПІЇ ІМ. В.П. ФІЛАТОВА НАМН УКРАЇНИ", Французький б-р, 40/51, м. Одеса, 65061 (UA)</p>
---	--

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ РЕЦЕПТОРМОДИФІКУЮЧОГО ВПЛИВУ НАНОЧАСТОК СРІБЛА НА МАРКЕРИ АКТИВАЦІЇ ЛІМФОЇДНИХ КЛІТИН

(57) Реферат:

Спосіб визначення рецептормодифікуючого впливу наночастинок срібла на лімфоїдні клітини за допомогою імуногістохімічного методу з використанням комплексу пероксидаза-антипероксидаза, за яким одночасно здійснюють культивування клітин молекул CD 7, CD 25, CD 45 із наночастиками срібла і контрольне культивування цих клітин із фізіологічним розчином, визначають експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів і, якщо їх різниця становить 10 %, то визначається імуноотропний вплив на імунокомпетентні клітини.

UA 105223 U

Корисна модель належить до медицини, конкретно до клінічної імунології, його призначено для використання в різних галузях практичної медицини з метою вирішення питань призначення адекватної імунотерапії (біотерапії).

5 В даний час вірусні ураження поверхні очного яблука часто набувають характеру хронічного процесу. Використання традиційних медикаментозних засобів не завжди призводить до лікування хворого та попередження рецидивів захворювання [Дрожжина Г.И., Гайдамака Т.Б. Особенности клинического течения и лечения кератита, вызванного вирусом Herpes // Офтальмол. журн. - 2014. - № 2. - С. 21-24]. Це визначає актуальність пошуку нових підходів до терапії вірусної патології, причому для розробки оптимальних поєднань лікувальних факторів
10 важливо використовувати не емпіричні підходи до вирішення даного завдання, а використовувати нові теоретичні розробки, отримані в результаті вивчення молекулярних механізмів імунної відповіді.

У сучасній літературі велика увага приділяється вивченню механізмів дії і клінічним аспектам застосування наночасток срібла при різній патології. Величина наночасток вимірюється в нанометрах (мілімікронах), дані частинки мають особливі властивості, оскільки при таких масштабах головну роль відіграють взаємодія атомів всередині матерії і квантово-механічні характеристики електронів і фотонів. Інші якості наноматеріалів, порівняно з великими об'єктами, пов'язані зі зростанням в них частки поверхні до його маси [Пасечникова Н.В., Мальцев Э.В., Мороз О.А. Нанотехнологии, наномедицина, наноофтальмология (Сообщение 1) // Офтальмол. журн. - 2009. - № 5. - С 69-76]. Нанорозміри частинок дозволяють їм проходити через гематоенцефалічний бар'єр, проникати всередину клітин та їх ядер. Було показано, що наночастки срібла з розмірами менше 100 нм виявляють здатність генерувати активні форми кисню. Наночастки проникаючи крізь клітинну мембрану накопичуються в клітині, викликаючи зміну її функцій. В організмі людини наночастки срібла можуть призводити до цілого спектра
20 відповідей імунної системи [Пасечникова Н.В., Мальцев Э.В., Мороз О.А. Нанотехнологии, наномедицина, наноофтальмология (Сообщение 2) // Офтальмол. журн. - 2009. - № 6. - С. 83-89].

Для клінічної медицини важливим є вивчення впливу наночасток срібла на рецепторний апарат імунокомпетентних клітин. Але, на жаль, механізми дії наночасток срібла на показники клітинного та гуморального імунітету, а також маркери активації лімфоцитів залишаються не визначеними.
30

Розробка методики оцінки впливу наночасток срібла на імунну систему і маркери активації лімфоцитів за допомогою імуногістохімічного ПАП-методу має реальні підстави для впровадження в клінічну практику, але до цього часу була не розроблена. Слід вважати перспективним обґрунтування застосування наночасток срібла для імуномодуляції при вірусних захворюваннях рогівки.
35

Метою нашої розробки став новий спосіб вивчення імунокоригуючого впливу наночасток срібла при вірусних захворюваннях рогівки.

Сьогодні відомим методом проведення імунологічних досліджень є імуноцитологічний метод, запропонований Д.Ф. Глузманом (2003). Цей метод полягає у ідентифікації лімфоїдних клітин за допомогою гістохімії і включає такі етапи.
40

1. Отримання діагностичного матеріалу - 3 мл крові.

2. Проведення центрифугування з метою очищення від сторонніх речовин, протягом 15 хвилин при 2500 об/хвил.

45 3. Відмивання осаду, що містить лімфоконцентрат, у фізіологічному розчині терміном 10 хвилин при 1200 об/хвил.

4. Приготування мазків з отриманого концентрату лейкоцитарних клітин.

5. Культивування із частками наносрібла - за методом паралельних проб і контрольне культивування із фізіологічним розчином протягом 1 години.

50 6. Просушування мазків протягом 2 годин при кімнатній температурі, їх фіксація у парах 10 % нейтрального формаліну (термін 3 хвилини).

7. Промивання у забуференому фізіологічному розчині (ЗФР) протягом 5 хвилин, інгібування ендогенної пероксидази за допомогою обробки 10 % розчином H_2O_2 (10 хвилин).

8. Розташування у вологій камері, нанесення 20 мкл первинних мкАТ на 2 години так, щоб реагент був рівномірно розподілений по всій площі зони реакції.
55

9. Промивання у ЗФР (5 хвилин) та нанесення 20 мкл кролячої сироватки проти імуноглобулінів миші на 1 годину.

10. Промивання у ЗФР (5 хвилин) та нанесення 20 мкл ПАП-комплексу на 1 годину.

60 11. Обробка 3,3-діамінобензідіном тетрахлоріда (10 хвилин) та фарбування 1 % розчином метилового зеленого.

12. Підрахування результатів, яке полягає у визначенні процентної кількості прореагувавших клітин (продукт реакції зафарбований коричневим кольором, знаходиться у місті локалізації антигену) на 100 вільних лімфоцитів.

5 В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб визначення рецептормодифікуючого впливу наночастинок срібла на маркери активації лімфоїдних клітин шляхом попередньої культивування клітин із наночастинами срібла, за рахунок чого стає можливим визначення змін у стані рецепторного апарату лімфоцитів, що дозволить виявити наявність рецептормодифікуючого впливу наночастинок срібла на молекулярні маркери лімфоїдних клітин.

10 Поставлена задача вирішується тим, що у способі дослідження рецептормодифікуючого впливу наночастинок срібла на маркери активації лімфоїдних клітин стосовно корисної моделі за методом паралельних проб здійснюють контрольну культивування лімфоцитів із частками наносрібла і контрольне культивування із фізіологічним розчином протягом 1 години, визначають рівні експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів і, якщо їх різниця становить 10 % і більше роблять висновок про рецептормодифікуючий вплив наночастинок срібла на молекулярні маркери лімфоїдних клітин хворих (імунотропну дію наночастинок срібла) і про доцільність використання препаратів, які містять наночастки срібла.

Причинно-наслідкові зв'язки:

1. Здійснюють культивування лімфоцитів з фізіологічним розчином і з наночастинами срібла - за рахунок цього стає можливим визначення рівнів експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів із наночастинами срібла і з фізіологічним розчином

2. Визначення рівнів експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів із наночастинами срібла і з фізіологічним розчином, за рахунок чого визначають різницю рівнів експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів, що дозволить виявити наявність модифікуючого впливу на лімфоцити хворих.

25 Експериментальні дослідження були проведені у ДУ "Інститут очних хвороб і тканинної терапії імені ім. В.П. Філатова НАМН України". Дослідження здійснені у хворих на вірусний кератит. Ми вивчали вплив наночастинок срібла на фагоцитарну активність нейтрофільних гранулоцитів та на такі субпопуляції маркерів ранньої та пізньої активації імунокомпетентних клітин, як:

30 CD 7 - трансмембранний глікопротеїд I типу, найбільш ранній маркер Т-клітин, експресований на Т-клітинах-попередниках. Маркер поліпотентних стовбурових клітин, більшості тимоцитів і Т-лімфоцитів периферичної крові. Експресія спостерігається на більшості НК клітин, пре-В-лімфоцитах, та слабо виражена на моноцитах.

35 CD 16 - низькоафінний рецептор агрегованого IgG, маркер НК клітин, гранулоцитів, макрофагів, та невеликої субпопуляції Т-клітин.

CD 25 - трансмембранний глікопротеїд I типу, рецептор ИЛ-2. Експресований на активованих Т- і В-лімфоцитах, моноцитах, макрофагах.

40 CD 38 - трансмембранний глікопротеїд II типу, експресований на плазматичних клітинах, лінійно-комітованих гемопоетичних клітинах-попередниках, активованих Т- і В-клітинах, НК клітинах.

CD 45 - трансмембранний глікопротеїд I типу, загально лейкоцитарний антиген, найбільший рівень експресії спостерігається на лімфоцитах.

45 CD 54 - трансмембранний глікопротеїд I типу, міжклітинна молекула адгезії. Високий рівень експресії ідентифіковано на ендотеліальних клітинах, активованих Т- і В-лімфоцитах, тимоцитах, моноцитах, фібробластах, епітеліальних та дендритних клітинах.

CD 95 - трансмембранний глікопротеїд I типу, опосередковує сигнал, що ініціює апоптоз. CD 95 (Fas-антиген) експресують активовані Т- і В-лімфоцити, а також клітини Березовського-Штеренберга і Ходжкіна.

50 CD 150 - трансмембранний глікопротеїд I типу, експресований на незрілих тимоцитах, субпопуляції CD45RO CD45RA Т-лімфоцитів, В-лімоцитах термінальних центрів та мантийної зони лімфатичних вузлів, дендритних та ендотеліальних клітинах.

55 Шляхом вивчення експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів з фізіологічним розчином і з наночастинами срібла, визначалось підвищення рівня експресії маркерів активації, за рахунок чого стало можливим визначення змін у стані рецепторного апарату лімфоцитів, так збільшення рівня експресії на 10 % дозволяє виявити наявність модифікуючого впливу на функціональну активність імунокомпетентних клітин і визначення імунотропного впливу на імунокомпетентні клітини.

Методика проведення дослідження впливу наночастинок срібла на фагоцитарну активність нейтрофільних гранулоцитів та маркери активації лімфоцитів (CD 7, CD 5, CD 25, CD 38, CD 45,

CD 54, CD 95, CD 150) за допомогою непрямого імуноцитохімічного ПАП-методу з використанням моноклональних антитіл достатньо проста та включає такі етапи.

1. Отримання діагностичного матеріалу - 3 мл крові

2. Проведення центрифугування з метою очищення від сторонніх речовин, протягом 15 хвилин при 2500 об/хвил.

3. Відмивання осаду, що містить лімфоконцентрат, у фізіологічному розчині терміном 10 хвилин при 1200 об/хвил.

4. Культивування із наночастками срібла - за методом паралельних проб і контрольне культивування із фізіологічним розчином протягом 1 години.

5. Приготування мазків з отриманого концентрату лейкоцитарних клітин.

6. Просушування мазків протягом 2 годин при кімнатній температурі, їх фіксація у парах 10 % нейтрального формаліну (термін 3 хвилини).

7. Промивання у забуференому фізіологічному розчині (ЗФР) протягом 5 хвилин, інгібування ендогенної пероксидази за допомогою обробки 10 % розчином H_2O_2 (10 хвилин).

8. Розташування у вологій камері, нанесення 20 мкл первинних мкАТ на 2 години так, щоб реагент був рівномірно розподілений по всій площі зони реакції.

9. Промивання у ЗФР (5 хвилин) та нанесення 20 мкл кролячої сироватки проти імуноглобулінів миші на 1 годину.

10. Промивання у ЗФР (5 хвилин) та нанесення 20 мкл ПАП-комплексу на 1 годину.

11. Обробка 3,3-діамінобензидином тетрахлоридом (10 хвилин) та дофарбування 1 % розчином метилового зеленого.

12. Підрахування результатів, яке полягає у визначенні процентної кількості прореагувавших клітин (продукт реакції зафарбований коричневим кольором, знаходиться у місці локалізації антигену) на 100 вільних лімфоцитів.

Різниця між двома методами у введенні нами етапу культивування клітин з наночастками срібла (етап 4). Оцінка імуномодифікуючих можливостей як маркерів активації лімфоїдних клітин, так і всієї імунної системи у процесі культивування з препаратом дозволяє чітко визначити всі етапи дії наночасток срібла.

Отримані результати, що до експресії лімфоїдних клітин під впливом наночасток срібла, дозволили визначити суттєві відмінності у функціональному стані рецепторного апарата імунокомпетентних клітин. Вищезазначені результати представлені у таблиці.

Таблиця

Рівень експресії маркерів активації лімфоцитів і фагоцитарної активності нейтрофілів у хворих на вірусний кератит до і після культивування з наночастками срібла ($M \pm SD$), %

Маркери активації лімфоцитів	Групи дослідження		p
	до культивування з наночастками (n=23)	після культивування з наночастками срібла (n=23)	
CD 5+	26,8±4,6	25,4±4,8	> 0,05
CD 7+	21,1±2,8	26,9±3,8	< 0,05
CD 25+	19,4±4,1	26,3±4,5	< 0,05
CD 38+	26,0±5,2	27,5±7,6	> 0,05
CD 45+	22,7±5,4	30,5±4,7	< 0,05
CD 54+	34,4±6,1	36,7±5,2	> 0,05
CD 95+	27,5±6,5	25,1±5,3	> 0,05
CD 150+	21,5±4,9	22,8±4,7	> 0,05
Фагоцитарна активність нейтрофілів	59,3±7,5	80,2±9,4	< 0,01

Примітки: n - кількість хворих;

p - рівень значущості відмінностей за критерієм Ньюмена-Кейлса.

Результати, отримані при вивченні зміни рівня експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів периферичної крові у хворих з вірусною патологією рогики після культивування лімфоцитів з наночастинками срібла, виявили достовірні відмінності по ряду показників (Таблиця 1). Так, при культивуванні лімфоцитів з наночастинками срібла рівень експресії CD 7 достовірно збільшився з 21,4±2,8 % до 26,9±3,8 %, ($p < 0,05$); CD 25 - з 19,4±4,1 % до 26,3±4,5 %, ($p < 0,05$); CD 45 - з 22,7±5,4 % до 30,5±4,7 %, ($p < 0,05$); фагоцитарна активність нейтрофілів з

59,3±7,5 % до 80,2±9,4 %, ($p<0,01$). Вивчення впливу наночастинок срібла на рівень експресії молекулярного маркера аутоімунного процесу CD 5 і молекулярного маркера апоптозу CD 95 показало, що наночастки срібла значимо не змінювали їх значення. Рівень експресії на лімфоцитах периферичної крові маркерів активації лімфоцитів CD 38, CD 54 та CD 150 після культивування лімфоцитів з наночастинками срібла також значимо не змінювався.

Значна перевага запропонованого способу полягає:

- 1) точність та інформативність;
- 2) підбір найбільш ефективної біотерапії

10 Висновок. Розроблена в лабораторії імунології ДУ "Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України" методика вивчення впливу наночастинок срібла на молекулярний профіль лімфоцитів периферичної крові може бути використана в клінічній практиці для індивідуального підбору біотерапії.

15 Проведені дослідження з вивчення впливу *in vitro* наночастинок срібла на рівень експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів периферичної крові хворих на вірусні кератитами показали достовірне збільшення рівня експресії CD 7, CD 25, CD 45 та фагоцитарної активності нейтрофілів.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

20 Спосіб визначення рецептормодифікуючого впливу наночастинок срібла на лімфоїдні клітини за допомогою імуногістохімічного методу з використанням комплексу пероксидаза-антипероксидаза, за яким одночасно здійснюють культивування клітин молекул CD 7, CD 25, CD 45 із наночастинками срібла і контрольне культивування цих клітин із фізіологічним розчином, визначають експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів і, якщо їх різниця становить
25 10 %, то визначається імуноотропний вплив на імунокомпетентні клітини.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

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

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