



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **103483** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
G01N 33/50 (2006.01)
A61P 37/00
A61K 31/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 14003	(72) Винахідник(и): Величко Людмила Миколаївна (UA), Богданова Олександра Вікторівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 26.12.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.12.2015	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ОЧНИХ ХВОРОБ І ТКАНИННОЇ ТЕРАПІЇ ІМ. В.П. ФІЛАТОВА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ", Французький б-р, 49/51, м. Одеса, 65061 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.12.2015, Бюл.№ 24	

(54) СПОСІБ ДОСЛІДЖЕННЯ РЕЦЕПТОРМОДИФІКУЮЧОГО ВПЛИВУ ФАРМАКОЛОГІЧНИХ ІМУНОТРОПНИХ ПРЕПАРАТІВ (АМІКСИН ІС) НА МАРКЕРИ АКТИВАЦІЇ КЛІТИН

(57) Реферат:

Спосіб дослідження рецептормодифікуючого впливу фармакологічних імунотропних препаратів (Аміксин ІС) на лімфоїдні клітини за допомогою імуногістохімічного методу з використанням комплексу пероксидаза-антипероксидаза, за яким одночасно здійснюють культивування клітин молекул CD7, CD25, CD54 із препаратом Аміксин ІС. Контрольне культивування цих клітин із фізіологічним розчином, визначають експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів і, якщо їх різниця становить 10 % і більше з метою імунокорекції хворому, призначають препарат Аміксин ІС.

UA 103483 U

Корисна модель належить до медицини, конкретно до лабораторної імунології, її призначено для використання в різних галузях практичної медицини з метою вирішення питань призначення валідної імунотерапії.

Численні порушення стану імунологічної реактивності організму спостерігаються при різних типах патологічних процесів - вони є проявом дезрегуляції в системах імунологічного захисту. При офтальмопатологічних процесах різного ґенезу (онкологічні, автоімунні, запальні), які розвиваються внаслідок дії патологічних пошкоджуючих факторів, спостерігаються різноманітні порушення, у яких найчастіше провідну роль відіграють імунопатологічні механізми, зокрема специфічні реакції клітинного та гуморального імунітету.

В дійсний час відомо, що активованими імунокомпетентними клітинами продукуються різноманітні цитокини (фактори активації), які сприяють росту та диференціації клітин лімфоїдного ряду. Напруженість цих захисних імунних реакцій зростає за умови вищезазначеної офтальмоімунопатології. Проведення сучасної імунотерапії за допомогою імунотропних препаратів може призводити до імунокорекції. Але в дійсний час механізми дії препарату Аміксин ІС на маркери активації лімфоцитів залишаються ще не визначеними. Слід підкреслити, що вивчення дії препаратів інтерферону, які використовуються для імуномодуляції, на лімфоїдні клітини є дуже важливим, бо у такому разі можливо говорити не про емпіричний, а про індивідуальний підхід до лікування.

Розробка методики оцінки впливу фармакологічних препаратів (на прикладі індуктора інтерферону Аміксину ІС) на 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 препарату Аміксин ІС для імуномодуляції, оскільки індуктори інтерферону є найсучаснішими імунотропними та противірусними препаратами. Однак, при призначенні вищевказаного препарату в клініці, у дійсний час лікар не може передбачати інтенсивність дії препарату.

Метою нашої розробки став новий спосіб вивчення імунокоригуючого впливу препарату Аміксин ІС на маркери активації лімфоцитів при офтальмоонкології. В дійсний час висока специфічність моноклональних антитіл дозволила удосконалити процес діагностики, піднявши його на якісно новий рівень.

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

1. Отримання діагностичного матеріалу.

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. Приготування мазків з отриманого концентрату лейкоцитарних клітин.

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

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

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

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

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

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

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

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб дослідження рецептормодифікуючого впливу фармакологічних імунотропних препаратів (Аміксину ІС) на лімфоїдні клітини за допомогою імуногістохімічного методу з використанням комплексу пероксидаза-антипероксидаза шляхом попередньої культивування клітин з досліджуванним препаратом, за рахунок чого стає можливим визначення змін у стані рецепторного апарату лімфоцитів, що дозволить виявити наявність рецептормодифікуючого впливу на молекулярні маркери лімфоїдних клітин і вирішити питання призначення препарату Аміксин ІС з метою імунокорекції.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі дослідження рецептормодифікуючого впливу фармакологічних імуотропних препаратів (Аміксин ІС) на лімфоїдні клітини за допомогою імуногістохімічного методу з використанням комплексу пероксидаза-антипероксидаза, відповідно до корисної моделі, здійснюється контрольна культивування лімфоцитів з фізіологічним розчином і з препаратом Аміксин ІС, після чого визначають рівні експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів (CD7, CD25, CD54) і якщо різниця становить 10 % і більше то можливо призначення з метою імунокорекції препарату Аміксин ІС.

Причинно-наслідкові зв'язки:

Здійснюють культивування лімфоцитів з фізіологічним розчином і з досліджуваним препаратом, що дозволяє виявити різницю рівня експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів, причому збільшення рівня експресії свідчить про наявність модифікуючого впливу на лімфоцити хворих і доводить про доцільність використання препарату з метою імунокорекції.

Експериментальні дослідження були проведені у ДУ "Інститут очних хвороб і тканинної терапії імені ім. В.П. Філатова НАМН України". Дослідження здійснені у хворих з онкоофтальмологічною патологією. Ми вивчали вплив препарату Аміксин ІС на основні субпопуляції імунокомпетентних клітин CD3 (Т-клітини), CD4 (Т-хелпери-індуктори), CD8 (Т-супресори-цитотоксичні), CD19 (В-клітини), CD16 (натуральні кілери), а також досліджували вміст таких субпопуляцій маркерів ранньої та пізньої активації імунокомпетентних клітин, як:

CD7 - 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 NK клітин, пре-В-лімфоцитах, та слабо виражена на моноцитах.

CD16 - низькоафінний рецептор агрегованого IgG, маркер NK клітин, гранулоцитів, макрофагів, та невеликої субпопуляції Т-клітин.

CD25 - трансмембранний глікопротеїд I типу, рецептор ІЛ-2. Експресований на активованих Т- і В-лімфоцитах, моноцитах, макрофагах.

CD38 - трансмембранний глікопротеїд II типу, експресований на плазматичних клітинах, лінійно-комітованих гемопоетичних клітинах-попередниках, активованих Т- і В-клітинах, NK клітинах.

CD45 - трансмембранний глікопротеїд I типу, загально лейкоцитарний антиген, найбільший рівень експресії спостерігається на лімфоцитах.

CD54 - 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.

CD95 (Fas-антиген) експресують активовані Т- і В-лімфоцити, а також клітини Березовського-Штеренберга і Ходжкіна.

CD150 - трансмембранний глікопротеїд I типу, експресований на незрілих тимоцитах, субпопуляції CD45RO CD45RA Т-лімфоцитів, В-лімфоцитах термінальних центрів та мантийної зони лімфатичних вузлів, дендритних та ендотеліальних клітинах. Шляхом вивчення експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів з фізіологічним розчином і з препаратом Аміксин ІС, 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 лімфоїдних клітин і є підставою для призначення препарату Аміксин ІС з метою імунокорекції.

Опис способу.

Методика проведення дослідження впливу препарату Аміксин ІС на основні показники імунітету (CD3, CD4, CD8, CD19, CD16) та маркери активації лімфоцитів (CD7, CD5, CD25, CD38, CD45, CD54, CD95, CD150) 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 препаратом Аміксин ІС - за методом паралельних проб і контрольне культивування із фізіологічним розчином протягом 1 години.

5. Приготування мазків з отриманого концентрату лейкоцитарних клітин.

6. Просушка 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.

5 9. Промивання у ЗФР (5хвилин) 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.

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

15 Різниця між двома методами - у введенні нами етапу культивування клітин з імуноотропним препаратом Аміксин ІС (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 препарату.

Результати. Отримані результати, щодо експресії лімфоїдних клітин під впливом препарату Аміксин ІС, дозволили визначити, що суттєві відмінності у функціональному стані рецепторного апарату імунокомпетентних клітин. Вищезазначені результати представлені у таблицях 1, 2.

20

Таблиця 1

Динаміка основних показників імунокомпетентних клітин у хворих з офтальмоонкологічною патологією до і після культивування з імуномодулятором Аміксин ІС ($M \pm SD$), %

Показники імунітету	Групи дослідження		p
	до культивування з препаратом (n=30)	після культивування з препаратом (n=30)	
CD3 ⁺	60,0±6,1	62,2±4,3	>0,05
CD4 ⁺	42,4±4,8	44,6±7,3	>0,05
CD8 ⁺	14,5±5,3	16,2±4,1	>0,05
CD19 ⁺	20,3±1,2	21,9±2,9	>0,05
CD16 ⁺	10,2±1,3	15,4±1,1	<0,05

n - кількість хворих;

p - рівень значності відмінностей по критерію Ньюмена-Кейлса

Таблиця 2

Динаміка показників маркерів активації лімфоцитів у хворих з офтальмоонкологічною патологією до і після культивування з імуномодулятором Аміксин ІС ($M \pm SD$), %

Маркери активації лімфоцитів	Групи дослідження		p
	до культивування з препаратом (n=30)	після культивування з препаратом (n=30)	
CD5 ⁺	12,4±5,3	16,1±5,5	>0,05
CD7 ⁺	26,4±2,81	34,1±2,6	< 0,05
CD25 ⁺	19,4±3,2	28,8±3,1	<0,05
CD38 ⁺	26,5±4,2	28,6±3,7	> 0,05
CD45 ⁺	24,3±3,9	30,1±6,3	> 0,05
CD54 ⁺	18,3±5,1	32,7±2,2	<0,05
CD150 ⁺	21,1±7,2	25,8±5,8	>0,05

Примітка:

n - кількість хворих;

p - рівень значності відмінностей по критерію Ньюмена-Кейлса

Для призначення найбільш оптимального лікування, важливим критерієм є вивчення змін функціональної активності імуноотропних клітин при культивуванні з фармакологічними препаратами. У результаті культивування з препаратом - індуктором інтерферону Аміксин ІС - у

25

пацієнтів спостерігається не тільки підвищення кількості натуральних кілерів CD16, а і збільшення експресії молекул CD7, CD25, CD54.

Як видно з таблиці, найбільш значно та вірогідно при культивуванні з препаратом Аміксин ІС зросли середні показники експресії CD7, CD25, CD54 молекул. Кількість даних рецепторів відносять до головних критеріїв, що характеризують високо диференційовані, зрілі та функціонально активні клітини імунної системи. Так CD7 це маркер самого початку Т-клітинного диференціювання (він експресується лімфоїдними клітинами ще до їх міграції у тимус), CD 25 - експресується на активованих Т- і В-лімфоцитах (він є низькоафінним рецептором до інтерлейкіну-2). Експресія трансмембранного глікопротеїду CD54 - спостерігається на активованих Т- і В-лімфоцитах, тимоцитах, моноцитах, фібробластах, епітеліальних та дендритних клітинах і відрізняється у нормально функціонуючих (більш висока експресія) і патологічно уражених клітин (баластних лейкоцитів).

Отже, збільшення експресії CD7, CD25, CD54 молекул у результаті культивування з препаратом Аміксин ІС, свідчить про ефективність дії вищезазначеного індуктора інтерферону при його дії на клітини хворих на офтальмоонкологічну патологію, метод оцінки ефективності фармакологічного впливу на імунокомпетентні клітини може бути рекомендований для використання у лабораторній практиці.

Значна перевага запропонованого способу полягає:

1) точність та інформативність.

2) підбір найбільш ефективної терапії.

Застосування модифікованого ПАП-методу з використанням спеціальної культивації лімфоїдних клітин з препаратом, дозволило визначити вплив на стан імунітету за вмістом маркерів активації імунокомпетентних клітин, імуномодулятора Аміксин ІС. Таким чином, отримані результати імуногістохімічних досліджень довели значну перевагу запропонованого нами методу культивації лімфоїдних клітин з імуномодулятором Аміксин з метою призначення препарату для імунокорекції, а відтак задача, що стояла перед нами в сучасній розробці була вирішена.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб дослідження рецептормодифікуючого впливу фармакологічних імуотропних препаратів (Аміксин ІС) на лімфоїдні клітини за допомогою імуногістохімічного методу з використанням комплексу пероксидаза-антипероксидаза, за яким одночасно здійснюють культивування клітин молекул CD7, CD25, CD54 із препаратом Аміксин ІС і контрольне культивування цих клітин із фізіологічним розчином, визначають експресії молекулярних маркерів активації лімфоцитів і, якщо їх різниця становить 10 % і більше з метою імунокорекції хворому, призначають препарат Аміксин ІС.