

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(19) ВУ (11) 14883

(13) С1

(46) 2011.10.30

(51) МПК

G 01N 33/50 (2006.01)

(54)

СПОСОБ ОЦЕНКИ NO-ПРОДУЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЛЕЙКОЦИТОВ

(21) Номер заявки: а 20090616

(22) 2009.04.25

(43) 2010.12.30

(71) Заявители: Государственное учреждение "Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека"; Учреждение образования "Гомельский государственный медицинский университет" (ВУ)

(72) Авторы: Гомоляко Андрей Викторович; Новикова Ирина Александровна; Прокопович Александр Семёнович (ВУ)

(73) Патентообладатели: Государственное учреждение "Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека"; Учреждение образования "Гомельский государственный медицинский университет" (ВУ)

(56) ГОЛИКОВ П.П. и др. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2003. - № 4. - С. 11-13.
RU 2033612 С1, 1995.

(57)

Способ оценки NO-продуцирующей активности лейкоцитов, отличающийся тем, что одну часть лейкоцитов периферической крови культивируют в течение 3 часов в питательной среде со стимулятором продукции NO, а вторую часть - без указанного стимулятора, затем определяют уровень продукции NO лейкоцитами, культивируемыми в среде без добавления стимулятора NO_Б, и уровень продукции NO лейкоцитами, культивируемыми в среде со стимулятором NO_С, после чего рассчитывают функциональный NO-продуцирующий резерв ФР_{NO} лейкоцитов по формуле:

$$\text{ФР}_{\text{NO}} = \frac{\text{NO}_{\text{С}}}{\text{NO}_{\text{Б}}},$$

и при значении ФР_{NO} более 1 NO-продуцирующую активность лейкоцитов определяют как неизмененную, а при значении ФР_{NO} 1 или менее - как сниженную.

Изобретение относится к медицине, точнее к клинической лабораторной диагностике, и может быть использовано для оценки функциональной активности лейкоцитов больных хроническими рецидивирующими гнойными инфекциями.

Известен способ определения функциональной активности лейкоцитов периферической крови путем культивирования их в питательных средах 15 часов с последующим определением метаболитов оксида азота (NO) в инкубационной среде. Суть способа заключается в том, что в кровь, взятую из кубитальной вены в объеме 6 мл в пробирку, содержащую гепарин 20 ед/мл, добавляют равный объем 4 % декстрана, смесь отстаивают 40 минут при комнатной температуре, верхний слой с лейкоцитами отбирают и разводят фосфатным буфером с 20 мМ ЭДТА, центрифугируют 10 минут при 200 g, после удаления

надосадочной жидкости эритроциты лизируют в 10 мл 0,15 М раствора хлорида аммония 10 минут при 37 °С, лейкоциты отмывают фосфатным буфером, суспендируют в концентрации 10×10^6 /мл в питательной среде RPMI-1640 с 5 % эмбриональной телячьей сывороткой и в объеме 0,5 мл клеточную суспензию инкубируют 15 часов при 37 °С, после чего в надосадочной жидкости клеточной культуры определяют концентрацию конечных метаболитов оксида азота - нитритов с реактивом Грисса [1] (прототип).

Недостатками прототипа являются:

изолированное определение базальной NO-продукции малоинформативно для оценки функции лейкоцитов у больных, так как каждый раз необходимо сравнение с показателями у здоровых лиц;

длительность культивирования;

отсутствует возможность отдельно оценить степень эндогенной активации лейкоцитов *in vivo* и ответ на активацию *in vitro* вследствие суммирования эффектов эндо- и экзогенных воздействий при культивировании свыше 6 часов.

Задача, на решение которой направлено предлагаемое изобретение, заключается в разработке оперативного и достоверного способа оценки функциональной активности лейкоцитов по способности к продукции NO в культуре.

Задача решается за счет того, что способ оценки NO-продуцирующей активности лейкоцитов заключается в том, что одну часть лейкоцитов периферической крови культивируют в течение 3 часов в питательной среде со стимулятором продукции NO, а вторую часть - без указанного стимулятора, затем определяют уровень продукции NO лейкоцитами, культивируемыми в среде без добавления стимулятора NO_Б, и уровень продукции NO лейкоцитами, культивируемыми в среде со стимулятором NO_С, после чего рассчитывают функциональный NO-продуцирующий резерв ΦP_{NO} лейкоцитов по формуле:

$$\Phi P_{NO} = \frac{NO_C}{NO_B},$$

и при значении ΦP_{NO} более 1 NO-продуцирующую активность лейкоцитов определяют как неизмененную, а при значении ΦP_{NO} 1 или менее - как сниженную.

В соответствии с предлагаемым способом к гепаринизированной венозной крови пациента добавляют равный объем 4 % декстрана, смесь отстаивают 40 минут при комнатной температуре, верхний слой с лейкоцитами отбирают и разводят фосфатным буфером с 20 мМ ЭДТА, центрифугируют 10 минут при 200 g. После удаления надосадочной жидкости эритроциты лизируют дистиллированной водой в течение 1 минуты с последующим восстановлением изотоничности, а лейкоциты дважды отмывают фосфатным буфером и суспендируют в питательной среде RPMI-1640 с антибиотиками (пенициллин 10 ЕД/мл, стрептомицин 10 мкг/мл) до концентрации 5×10^6 клеток/мл. Суспензию лейкоцитов перед культивированием разделяют на две части, в одну из которых добавляют липополисахарид в качестве стимулятора в конечной концентрации 7 мкг/мл. Полученные культуры инкубируют при 37 °С в течение 3 часов, после чего центрифугируют 10 минут при 200 g, в надосадочной жидкости каждой клеточной культуры определяют продукцию оксида азота по накоплению нитритов с реактивом Грисса. По результатам определения оксида азота в супернатантах интактных и стимулированных клеточных культур выполняют расчет функционального NO-продуцирующего резерва лейкоцитов по формуле:

$$\Phi P_{NO} = \frac{NO_C}{NO_B},$$

где ΦP_{NO} - функциональный резерв продукции NO; NO_Б - уровень продукции NO в нестимулированных культурах лейкоцитов; NO_С - уровень продукции NO в стимулированных культурах лейкоцитов, стимулированных липополисахаридом. При значениях $\Phi P_{NO} \leq 1,0$ функциональный NO-продуцирующий резерв лейкоцитов является сниженным.

Разделение суспензии лейкоцитов перед культивированием на две части, одну из которых стимулируют добавлением липополисахарида, и сокращение сроков инкубации до 3-х часов позволяют одновременно определить базальную NO-продукцию по содержанию оксида азота в надосадочной жидкости нестимулированных лейкоцитов, а также уровень стимулированной NO-продукции по содержанию оксида азота в надосадочной жидкости лейкоцитов, стимулированных липополисахаридом. Базальный уровень продукции NO позволяет оценить степень эндогенной активации лейкоцитов в случаях хронических инфекций, бактерионосительства и др., а уровень стимулированной липополисахаридом продукции NO позволяет оценить функциональный NO-продуцирующий резерв лейкоцитов.

Сокращение срока инкубации до 3-х часов позволяет избежать наложения эффектов эндо- и экзогенной стимуляции лейкоцитов. Данный подход обоснован тем, что фермент NO-синтеза (iNOS) в неактивированных лейкоцитах обнаруживается в незначительном количестве или отсутствует, а 6-8 часов после добавления стимулятора необходимы для активации генов, синтеза м-РНК iNOS, и самого фермента. В итоге при длительности культивирования свыше 6 часов эффекты эндогенной стимуляции NO-продукции и добавляемого *in vitro* индуктора накладываются и неразличимы. Кроме того, трехчасовой срок инкубации клеток позволяет получить в инкубационной среде достаточное для корректного определения количество NO без снижения жизнеспособности клеток.

Расчет функционального NO-продуцирующего резерва лейкоцитов необходим, так как он позволяет судить о состоянии компенсации бактерицидной NO-системы лейкоцитов и прогнозировать течение патологического процесса или стойкость ремиссии, во-вторых, $ФP_{NO}$, отражая уровень базальной и стимулированной NO-продукции лейкоцитов каждого конкретного больного, исключает необходимость сравнения данных показателей с соответствующими значениями у здоровых лиц.

Пример 1.

Больная С., 44 года, поступила в отделение иммунопатологии и аллергологии ГУ "РНПЦ РМиЭЧ" с диагнозом хронический рецидивирующий фурункулез, тяжелое течение, стадия ремиссии. Обострения 4-6 раз в год. Выполнено лабораторное обследование, иммунофенотипирование, а также оценка фагоцитарной активности лейкоцитов, было взято 6 мл венозной крови для определения NO-продуцирующей активности лейкоцитов. К гепаринизированной венозной крови пациента был добавлен равный объем 4 % декстрана, смесь отстаивалась 40 минут при комнатной температуре, верхний слой с лейкоцитами был отобран и разведен фосфатным буфером с 20 мМ ЭДТА, центрифугировался 10 минут при 200 g. Эритроциты в осадке были лизированы дистиллированной водой, а лейкоциты отмыты фосфатным буфером, суспендированы в концентрации 5×10^6 /мл в питательной среде. Суспензия клеток была разделена на две части, в одну из которых был добавлен липополисахарид, 7 мкг/мл. Клеточные суспензии инкубировались 3 часа при 37 °С, после чего в надосадочной жидкости с реактивом Грисса была определена концентрация нитритов и произведен расчет функционального NO-продуцирующего резерва лейкоцитов.

Результаты исследований: в иммунограмме фагоцитоз не нарушен, NO_B - 0,38 мМ/л; NO_C - 0,53 мМ/л; $ФP_{NO}$ - 1,39. Заключение: снижение спонтанной и стимулированной продукции NO при сохранении функционального резерва продукции NO. На основании клинических проявлений учетом выявленных нарушений функции лейкоцитов назначена иммуномодулирующая терапия.

Пример 2.

Больная И., 24 года, поступила в отделение иммунопатологии и аллергологии ГУ "РНПЦ РМиЭЧ" с диагнозом хронический рецидивирующий фурункулез, тяжелое течение, стадия обострения. Обострения до 6-8 раз в год. Проведено лабораторное обследование, иммунофенотипирование, а также оценка фагоцитарной активности лейкоцитов. Для

определения NO-продуцирующей активности лейкоцитов было взято 6 мл венозной крови, к которой был добавлен равный объем 4 % декстрана. Смесь отстаивалась 40 минут при комнатной температуре, верхний слой с лейкоцитами был отобран и разведен фосфатным буфером с 20 мМ ЭДТА, центрифугировался 10 минут при 200 g, эритроциты в осадке были лизированы дистиллированной водой, а лейкоциты отмыты фосфатным буфером и суспендированы в питательной среде в концентрации 5×10^6 /мл. Суспензия клеток была разделена на две части, одна из которых была стимулирована добавлением 7 мкг/мл липополисахарида. Клеточные суспензии инкубировались 3 часа при 37 °С, после чего в надосадочной жидкости с реактивом Грисса была определена концентрация нитритов и произведен расчет функционального NO-продуцирующего резерва лейкоцитов.

Результаты исследований: показатели иммунограммы соответствуют стадии течения заболевания. NO_B - 0,65 μ М/л; NO_C - 0,26 μ М/л; $ФР_{NO}$ - 0,40. Заключение: снижение стимулированной продукции и функционального резерва продукции NO. С учетом выявленных изменений проведена терапия с хорошим эффектом.

Примеры наглядно демонстрируют возможность выявления нарушений NO-продукции по $ФР_{NO}$ при данной патологии.

Преимущества предлагаемого способа заключаются в возможности оценки эндогенной активации клеток *in vivo* по базальному уровню продукции NO, при этом данные, полученные у больных, сравниваются с показателями продукции NO лейкоцитами практически здоровых лиц; в возможности определения функционального NO-продуцирующего резерва лейкоцитов; в возможности применять для исследования бессывороточные питательные среды.

Использование предлагаемого способа обеспечивает повышение достоверности диагностики, сокращает время проведения исследования, позволяет в короткие сроки разработать индивидуальную тактику лечения конкретного больного в зависимости от характера нарушений, тем самым способствует ускорению выздоровления больного.

Способ позволяет провести исследование и получить результаты в течение одного рабочего дня без потери жизнеспособности клеток, оценить не только изначальную степень активации лейкоцитов, но и общий резерв системы продукции оксида азота.

Способ может применяться для уточнения патогенетических механизмов развития различных заболеваний и позволяет получать дополнительные данные о состоянии неспецифической иммунологической резистентности у больных.

Источники информации:

1. Голиков П.П. и др. Генерация оксида азота лейкоцитами периферической крови в норме и при патологии // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2003. - № 4. - С. 11-13.