

(19) **KG** (11) **217** (13) **C2**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
ПРИ ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)

(51)⁶ **G01N 33/53**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ **к патенту Кыргызской Республики**

(21) 960546.1

(22) 03.09.1996

(31) 94008170

(32) 18.03.1994

(33) RU

(86) PCT/RU 95/00046 (16.03.1995)

(46) 01.10.1997, Бюл. №1, 1998

(71)(73) Головистиков И.Н. (RU), Качарава Л.Я. (GE)

(72) Головистиков И.Н. (RU), Качарава Л.Я. (GE), Алиханов Х.А. (RU)

(56) J. Exp. Medicine, 1976, v. 143, №5, p. 1100-1110

(54) Способ определения супрессорного звена иммунного статуса человека

(57) Способ определения супрессорного звена иммунного статуса человека относится к области медицины и включает сбор периферической крови, получение суспензии МНК, деление их на 2 равные части, культивирование МНК без активатора супрессоров и второй - с активатором супрессоров - ТБГ, отмывание МНК от среды культивирования и блокировку пролиферации, добавление в каждую из частей МНК свежевыделенных МНК здорового донора, стимулированных ФГА для получения тест-культур, культивирование их, последующую оценку пролиферации и определение величины супрессии по соотношению, уровней пролиферации в тест-культурах. 2 пр.

Изобретение относится к области медицины. Более точно оно касается методов диагностической оценки активности Т-супрессоров, а именно к способу определения супрессорного звена иммунного статуса человека и к средствам реализации этих способов.

Известен препарат бета-1-гликопротеин плацентарного происхождения, являющийся аналогом трофобластического бета-1-гликопротеина (ТБГ), который применяют в качестве стимулятора роста и пролиферации гематopoэтических кроветворных клеток (Патент США, №5169835, кл. А61К 35/50, 1989).

Однако известный препарат не используют для определения супрессорного звена иммунного статуса человека.

Известно применение ТБГ в диагностике и прогнозе течения беременности (Сотникова Л.Г. и др. "Роль бета-1-гликопротеина трофобласта в диагностике и прогнозе

течения беременности". Методические рекомендации. - М., 1984 г). Однако этой работе не раскрыты возможности использования ТБГ для определения супрессорного звена иммунного статуса человека.

Известен способ определения супрессорного звена иммунного статуса человека, включающий сбор периферической крови, получения суспензии чистых лимфоцитов для культивирования тест-культур с активатором супрессии и без него и дальнейшей оценке уровней пролиферации (см. Button R.W. Inhibitory and stimulatory effects of concanavalin A on the response of mouse spleen cells suspensions to antigen. J. Exp. Med., v. 138, p. 1496-1505, 1973). Однако известный способ требует использования в качестве активатора супрессии дефицитного и дорогостоящего импортного препарата - конканавалина А.

Известен способ определения супрессорного звена иммунного статуса человека, включающий сбор периферической крови, получение суспензии моноклеарных клеток (МНК), деление их на равные части, культивирование МНК первой из частей без активатора супрессоров, а второй - с активатором супрессоров, отмывание МНК от среды культивирования и блокировку пролиферации, добавление в каждую из частей МНК свежeweделенной МНК здорового донора, стимулирование фитогемагглютинином в равных соотношениях для получения тест-культур, культивирование их, последующую оценку пролиферации тест-культур и определение величины супрессии по отношению уровней пролиферации тест-культур и определение величины супрессии по соотношению уровней пролиферации в тест-культурах (см. Bv Lien Shov, Stanley A.Schwartz and Robert A.Good, Suppressor cell activity after concanavalin A treatment of lymphocytes from normal donors. J. Exp.Med., 1976, v. 143, №5. p. 1100-1110).

Однако и этот известный способ требует использования дефицитного дорогостоящего импортного продукта - конканавалина А.

Техническим результатом изобретения является удешевление процесса определения супрессорной активности иммунного статуса человека путем использования недефицитного препарата, обладающего иммунокорригирующими свойствами и не вызывающего аллергических реакций.

Эта задача решается тем, что в качестве средства для определения супрессорного звена иммунного статуса человека применяют бета-1-гликопротеин (ТБГ), а в способе определения супрессорного звена иммунного статуса человека, включающем сбор периферической крови, получение суспензии МНК, деление их на две равные части, культивирование МНК первой из частей без активатора супрессоров, а второй - с активатором супрессоров, отмывание МНК от среды культивирования, блокировку пролиферации, добавление в каждую из частей МНК свежeweделенных МНК здорового донора, стимулированных фитогемагглютинином в равных соотношениях для получения тест-культур, культивирование их, по следующую оценку пролиферации тест-культур и определение величины супрессии по соотношению уровней пролиферации в тест-культурах, согласно изобретению в качестве активатора супрессоров используют трофобластический бета-1-гликопротеин (ТБГ), который используют в дозах от 3 до 120 мкг на 1 мл суспензии МНК.

Суспензия МНК может быть приготовлена из клеток, полученных в результате деления в одноступенчатом градиенте фиколл-урограф, при этом культивирование МНК осуществляют 48 ч. Блокировку пролиферации можно осуществлять путем обработки МНК митомином С, а культивирование каждой из тест-культур проводить в течение 72ч.

Сравнение предлагаемых изобретений с известными позволяет утверждать о соответствии критерию "новизна", а отсутствие в аналогах отличительных признаков говорит о соответствии критерию "изобретательский уровень".

Экспериментальным и клиническим путем установлены новые свойства ТБГ как активатора супрессоров, пригодного для определения супрессорного звена иммунного статуса человека.

На первом этапе суспензию МНК готовят из клеток, полученных в результате разделения в одноступенчатом градиенте фиколл-уротраст (метод Воушп).

Периферическую кровь берут у диагностируемого больного путем венепункции и в одно и тоже время помещают в пробирки с раствором гепарина из расчета 1 мл крови -20-30 единиц гепарина. Далее кровь разводят раствором Хэнкса в соотношении 1:2 без Са и Mg и наслаивают на градиент фиколл-уротраст (плотность 1.078).

Затем производят центрифугирование в режиме 400g в течение 30 мин. Взвесь МНК из интерфазы переносят в центрифужную пробирку, добавляют раствор Хэнкса без Са и Mg и производят 3 последовательных центрифугирования по 10 мин для отмывания клеток от раствора фиколл-уротраст. После 3-го центрифугирования осадок МНК ресуспензируют в 1 мл среды 199 и подсчитывают количество моноклеарных клеток (МНК) с помощью камеры Горяева.

На втором этапе МНК делят на 2 равные части, первую из которых культивируют без активатора супрессоров, вторую - с активатором супрессоров, в качестве которого используют трофобластический бета-1-гликопротеин (ТБГ).

МНК культивируют в пенициллиновых флаконах, закрытых резиновыми пробками № 14.5 при температуре 37 °С. Среда культивирования RPMI-1640 с добавлением 20 % сыворотки IY (AB) группы и глутамина 300 мг.

В каждом флаконе культивируют 5×10^5 клеток в 2.0 мл полной среды.

В культуре для индукции супрессоров добавляют ТБГ в дозах 3-120 мкг.

Культивирование клеток осуществляют 48 ч. После этого МНК отмывают от среды культивирования и осуществляют блокировку пролиферации путем обработки митомиценом С - 40 мкг/мл в течение 30 мин при 37 °С. Затем отмывают средой 199 с 5 % сыворотки IY (AB) (охлажденной) трижды. Осадок клеток ресуспензируют, подсчитывают количество ядросодержащих клеток, определяют процент жизнеспособности клеток с помощью 0.1 % трипанового синего раствора и разводят до необходимой концентрации. При этом все операции делают отдельно с контрольными клетками и со стимулированными ТБГ, а для отмывания клеток используют силиконовую посуду.

На следующем этапе в каждую из частей контрольных и стимулированных ТБГ лимфоцитов добавляют свежевыделенные лимфоциты здорового донора, стимулированные фитогемаг-глютинином (ФГА), которые служат отвечающими тест-клетками в равных соотношениях ($0.5 \times 10^5 : 0.5 \times 10^5$ клеток/мл) для получения тест-культур. Культивирование их проводят в течение 72 ч. После этого с помощью Н-тимидина оценивают пролиферацию тест-культур и о величине супрессии судят по степени снижения пролиферации в них. Индекс супрессии (ИС) определяют по формуле:

$$\text{ИС} = \left(1 - \frac{\text{число имп/мин в тест - культуре, стимул ТБГ}}{\text{число имп/мин в тест - культуре без ТБГ}} \times 100\%\right)$$

Для оценки супрессорного звена здорового человека были проведены диагностические исследования по ранее известной методике (см. Bv Lien Shov, Stanley A. Schwarts and Robert A. Good, Supressor cell activity after concanavalin A treatment of lymphocytes from normal donors. J.Exp. Med., 1976, v. 143, №5, p. 1100-1110) и предлагаемому способу на группе здоровых лиц - 100 человек. На основании полученных результатов норма активности Т-супрессоров при индукции конканавалином А составляет 56.8 % +4 %, а по предлагаемому способу - 63.4 % +4.7 %.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1.

Больной В. 30 лет, поступил в клинику с диагнозом рассеянный склероз - цереброспинальная форма, находясь в стадии обострения процесса. Активность Т-супрессоров периферической крови при индукции конканавалином А - 15 %, определенная по ранее известной методике определения супрессорного звена иммунного статуса человека. Одновременно по изобретенной методике определяли активность Т-

супрессоров периферической крови этого же больного при индукции ТБГ, которая составила 17 %.

Пример 2.

Больная С., 40 лет, поступила в клинику с диагнозом рассеянный склероз - цереброспинальная форма, находясь в стадии обострения. Активность Т-супрессоров периферической крови при индукции конканавалином А - 16 % при известном способе диагностики. Одновременно по изобретенной методике определяли активность Т-супрессоров этой же больной при индукции ТБГ, которая составила 19 %.

Проведена диагностика 150 больных с рассеянным склерозом и ревматоидным артритом. Отмечено, что активность Т-супрессоров при определении изобретенным этим способом соответствует известному способу определения.

Таким образом, доказана высокая эффективность препарата ТБГ в качестве средства для определения супрессорного звена иммунного статуса человека.

Изложенные преимущества предлагаемого способа определения супрессорного звена иммунного статуса человека и средств для его осуществления обеспечивают им возможности широкого применения, как в научных исследованиях, так и в практической деятельности.

Причем следует указать, что использование конканавалина А для лечения вышеуказанных заболеваний противопоказано из-за его токсичности, в то время как ТБГ, вырабатываемый трофобластом человека, не обладает токсичностью и не вызывает аллергической реакции. Это делает возможным его использование также и в качестве лечебного препарата.

Формула изобретения

1. Способ определения супрессорного звена иммунного статуса человека, включающий сбор периферической крови, получение суспензии мононуклеарных клеток (МНК), деление их на две равные части, культивирование МНК первой из частей без активатора супрессоров, а второй - с активатором супрессоров, отмывание МНК от среды культивирования, блокировку пролиферации, добавление в каждую из частей МНК свежeweделенных МНК здорового донора, стимулированных фитогемагглютинином в равных соотношениях для получения тест-культур, культивирование их, последующую оценку пролиферации тест-культур и определение величины супрессии по соотношению уровней пролиферации в тест-культурах, отличающийся тем, что в качестве активатора супрессоров используют трофобластический бета-1-гликопротеин в дозе 3-120 мкг/мл суспензии МНК.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что суспензию МНК готовят из клеток, полученных в результате разделения в одноступенчатом градиенте фико-л-уротраст.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что культивирование МНК осуществляют 48 ч.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что блокировку пролиферации осуществляют митомицином С.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что культивирование каждой тест-культуры проводят в течение 72 ч.

Ответственный за выпуск

Ногай С.А.

Кыргызпатент, 720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41, факс: (312) 68 17 03