ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ
(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ

(19) BY (11) 2743
(13) C1
(51)[6] G 01N 33/566

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПАТЕНТНЫЙ
КОМИТЕТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

(54) **СПОСОБ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ**

(21) Номер заявки: 960210
(22) 1996.04.26
(46) 1999.03.30

(71) Заявитель: Белорусский научно-исследовательский институт радиационной медицины МЗ РБ (BY)
(72) Авторы: Доценко Э.А., Новиков Д.К., Доценко М.Л., Жаворонок С.В. (BY)
(73) Патентообладатель: Белорусский научно-исследовательский институт радиационной медицины МЗ РБ (BY)

(57)
Способ оценки функциональной активности лимфоцитов периферической крови, включающий стимуляцию культуры лейкоцитов митогеном и определение количества лимфоцитов, несущих специфические рецепторы в реакции розеткообразования в контрольной и опытной культурах, **отличающийся** тем, что стимуляцию осуществляют фитогемагглютинином не менее 16 часов, а затем определяют количество лимфоцитов, несущих рецепторы к интерлейкину 2 с помощью частиц, нагруженных рекомбинантным интерлейкином 2, и при соотношении между опытом и контролем более 15% определяют нормальную функциональную активность лимфоцитов.

(56)
1. Новиков Д.К., Новикова В.И. Клеточные методы иммунодиагностики.-Минск.: Беларусь, 1979.-С. 110-114.
2. Manual of clinical laboratory Immunology/Ed. N.R. Rose, H. Friedman, J.L. Fahey.-Washington, 1986.-P. 1002.

Изобретение относится к медицине, в частности, к иммунологии и может быть использовано для оценки функциональной активности лимфоцитов при изучении иммунного статуса человека.

Оценку функциональных свойств лимфоцитов проводят при их культивировании, изучая бластрансформацию под влиянием митогенов - фитогемагглютинина (ФГА). О функциональной активности лимфоцитов судят по числу бластных клеток, обнаруживаемых после 5 суток культивирования в присутствии ФГА [2].

Наиболее близким решением, выбранным в качестве прототипа, является способ морфологического учета реакции бластной трансформации. Лимфоциты здорового организма в присутствии специфического антигена в культуре клеток в течение не менее, чем 5 суток, переходят в бластные формы, которые регистрируются при специальном окрашивании в световом микроскопе [1].

Описанный способ имеет следующие недостатки:

1) требования дорогостоящего оборудования, высококвалифицированного персонала, абсолютной стерильности;

2) обязательное использование дорогостоящих, высококачественных сред для культивирования, сохраняющие жизнеспособность лимфоцитов не менее 5-7 суток;

3) значительная вариация результатов, которая связана с длительностью инкубирования культуры лимфоцитов и значительной долей субъективизма при морфологическом учете бластных форм;

BY 2743 C1

4) сроки культивирования составляют 5 суток и более, что существенно снижает диагностическое значение теста для конкретных пациентов;

5) трудоемкость морфологического учета бластных форм.

Общими с прототипом признаками являются:

1) техника культивирования лейкоцитов периферической крови (забор крови, митоген, постановка опытной и контрольной культур и т.д.)

2) морфологический учет результатов реакции;

3) вынесение суждения о сенсибилизации по разнице между результатами между опытной и контрольной культурами.

Задачей изобретения является сокращение времени проведения реакции. Поставленная задача достигается следующим образом.

Заявляемый способ основан на оценке ранних активационных маркеров (рецепторы к интерлейкину2) в краткосрочной культуре лимфоцитов.

Для этого венозную кровь с антикоагулянтом (гепарин - 20 Ед/мл) отстаивают при 37°С и плазму со взвешенными лейкоцитами разводят средой 199 (гентамицин 1 мг/мл) в соотношении 1:5 (концентрация лейкоцитов 1-2*10^6/мл). Разведенную средой 199 плазму с лейкоцитами объемом 1,0-2,0 мл на одну культуру (из расчета 2.0±0.5 млн. лейкоцитов) вводят в стерильные пенициллиновые флаконы, в опытную культуру вносят ФГА (заранее оттитровывается субагглютинирующая доза), газовую среду насыщают углекислотой; флаконы герметически закупоривают и ставят в термостат при 37°С не менее чем на 16 часов. Затем отмывают забуференным физиологическим раствором и оценивают способность к розеткообразованию с частицами, несущими ИЛ2. Диагностикум для определения лимфоцитов, несущих рецепторы к интерлейкину2 готовят следующим образом: эритроциты быка тщательно отмывают забуференным физиологическим раствором до исчезновения в супернатанте следов белка. 1 мл эритроцитов, упакованных центрифугированием (1000 об/мин., 15 мин.) смешивают с 2,5 % раствором глютарового альдегида в общем объеме 20 мл. Инкубируют 24 часа при 4°С с периодическим встряхиванием и отмывают от глютарового альдегида. Препарат рекомбинантного интерлейкина 2 (рИЛ2) разводят в 1,0 мл дистиллированной воды и добавляют к осадку эритроцитов, после чего ресуспендируют и инкубируют 24 часа на холоде. Непрореагировавшие альдегидные группировки блокируют 0,1 % раствором человеческого сывороточного альбумина. Хранят в осажденном состоянии в присутствии 0,1 % азида натрия; срок хранения препарата без потери активности - 6 месяцев.

Число лимфоцитов в аликвотах культуры клеток доводят до концентрации 2-3*10^6/мл; диагностикум - до 50-75*10^6 частиц/мл. В лунку планшеты для иммунологических исследований вносят по 100 мкл лимфовзвеси и диагностикума, инкубируют 30 мин. при 37°С, после чего центрифугируют при 150g. Супернатант удаляют, осадок ресуспендируют в 50 мкл 0.05 % раствора глютарового альдегида. После высушивания и фиксации мазка этиловым спиртом, его прокрашивают азур-эозином. Используя увеличение 7ð90 и масляную иммерсию оценивают процент розеткообразующих клеток на 200 лимфоцитов.

Пример. Больной Т., 5 лет. Клинический диагноз: Хронический обструктивный бронхит, рецидивирующее течение, ДН1.

Венозную кровь с гепарином (10 Ед/мл) отстаивают при 37°С и плазму со взвешенными лейкоцитами разводят средой 199 (гентамицин 1 мг/мл) в соотношении 1:5 (концентрация лейкоцитов составила 1*10^6/мл). Плазму с лейкоцитами объемом по 2,0 мл вносят в 2 стерильных пенициллиновых флакона, в один из которых добавляют ФГА (15 мкг/мл), газовую среду насыщают углекислотой; флаконы герметически закупоривают и ставят в термостат при 37°С на 16 часов. Затем отмывают забуференным физиологическим раствором (2.0 мл на 1 культуру, 2-ды), осадок разводят в 0.3 мл забуференного физиологического раствора (число лимфоцитов 3*10^6/мл); диагностикум для определения лимфоцитов, несущих рецепторы к интерлейкину2 - приготовленный как описано выше - разводят до 75*10^6 частиц/мл. В лунку планшеты для иммунологических исследований вносят по 100 мкл лимфовзвеси и диагностикума, инкубируют 30 мин. при 37°С, после чего центрифугируют при 150g. Супернатант удаляют, осадок ресуспендируют в 50 мкл 0.05 % раствора глютарового альдегида. После высушивания и фиксации мазка этиловым спиртом, его прокрашивают азур-эозином. Используя увеличение 7ð90 и масляную иммерсию, оценивают процент розеткообразующих клеток на 200 лимфоцитов: в контрольной культуре он составил 11 %, в стимулированной митогеном - 19 %. Разница между опытной и контрольной культурами - 8 %, из чего выносят суждение о функциональной недостаточности лимфоцитов.

Таким образом, предложенный способ позволяет оценивать функциональную активность лимфоцитов; его преимущества перед традиционными:

1) укорочение сроков культивирования в 8 раз и повышение за счет этого точности реакции, т.к. исключается влияние вариаций качественного и количественного состава среды культивирования;

2) более низкие требования к качеству оборудования, квалификации персонала, стерильности;

3) лучшая воспроизводимость результатов;

4) простота учета результатов;

5) широкие возможности, по сравнению с реакцией бластной трансформации лимфоцитов, применения в рутинной клинико-лабораторной практике.

Государственный патентный комитет Республики Беларусь.
220072, г. Минск, проспект Ф. Скорины, 66.