



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **72144** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
A61B 5/00
A61K 39/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 00610	(72) Винахідник(и): Кайдашев Ігор Петрович (UA), Куценко Неля Леонідівна (UA), Весніна Людмила Едуардівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 19.01.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.08.2012	(73) Власник(и): ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД УКРАЇНИ "УКРАЇНСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ", вул. Шевченка, 23, м. Полтава, 36024, Україна (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.08.2012, Бюл.№ 15	

(54) СПОСІБ ІНДУКЦІЇ АПОПТОЗУ МОНОНУКЛЕАРНИХ КЛІТИН

(57) Реферат:

Спосіб індукції апоптозу мононуклеарних клітин включає їх виділення, індукцію апоптозу та його оцінку. Як індуктор використовується активатор ППАР-γ рецепторів піоглітазон.

U
72144
UA

Корисна модель стосується галузей біології та медицини та може бути використана для індукції апоптозу клітин імунної системи при патологіях, що супроводжуються запальним процесом.

Доведена роль апоптозу у розвитку багатьох патологічних процесів та станів, таких, як злоякісні новоутворення, синдром набутого імунodefіциту, деякі нейродегенеративні та аутоімунні захворювання, інфекційні процеси та ін. (Кайдашев І. П. Апоптоз - как общебиологический процесс // Проблемы экологии и медицины. - 1998 - Т. 2, № 5. - С. 9-13; Ярилин А. А. Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и при патологии // Актуальные проблемы патофизиологии. Под ред. Б. Б. Мороза. - М.: Медицина, 2001. - С. 13-56.). Отже, беззаперечним напрямком в сучасній імунології є застосування чинників, які б стимулювали індукцію апоптозу імунокомпетентних клітин, активація яких призводить до розвитку запальних процесів.

З літературних джерел відомо, що ППАР- α та ППАР- γ здійснюють негативний регуляторний вплив на перебіг запального процесу та впливають на функціонування Т лімфоцитів, моноцитів/макрофагів, дендритних клітин та тучних клітин [Clark R.B., Bishop-Bailey D., Estrada-Hernandez T., Hla T., Puddington L., Padula S.I. The nuclear receptor PPAR gamma and immunoregulation: PPAR gamma mediates inhibition of helper T cell responses // J. Immunol. - 2000. - Vol. 164. - P. 1364-1371.; Moore K. J., Rosen E. D., Fitzgerald M. L., Randow F., Andersson L. P., Altshuler D., Milstone D. S., Mortensen R. M., Spiegelman B. M., Freeman M. W. The role of PPAR gamma in macrophage differentiation and cholesterol uptake // Nat. Med. - 2001. - Vol. 7. - P. 41-47.]. Така протизапальна функційна активність ППАР- γ сьогодні привертає увагу науковців різних галузей медицини.

Відомі способи індукції апоптозу лімфоцитів за допомогою глюкокортикостероїдів (Бойчук С. В., Мустафин І. Г., Фассахов Р. С., Терещенко Д. В. Спонтанный и глюкокортикоид - индуцированный апоптоз лимфоцитов больных atopической бронхиальной астмой: роль митохондрий и CD95 (APO-1) // Аллергология. - 2002. - №1. - С. 13-20.), моноклональних антитіл BION-1, які призводять до блокування продукції лімфоцитами запальних цитокінів IL-5, GM-CSF і TL-3 (Ramshaw H. S., Woodcock J. M., Bagley C. J., McClure B.J., Hercus T. R., Lopez A. F. New approaches in the treatment of asthma // Immunol. Cell Biol. - 2001. - Vol. 79, № 2. - P. 154-159.), моноклональними антитілами до HLA-A, -B, -C, HLA-DR та CD95 молекул (Мамонтова Т. В., Кайдашев І. П. Состояние CD95-, MHC-I- и MHC-II-опосредованного апоптоза у больных atopической бронхиальной астмой // Иммунология. - 2004. - № 4. - С. 198-201.).

Найбільш близьким до способу по технічному результату та функціональному призначенню є спосіб корекції апоптозу мононуклеарних клітин периферійної крові шляхом використання селективного блокатора H_3 -гістамінових рецепторів тіопераміду, який прийнято за прототип (Пат. UA №35668 U, МПК 51 A61K 38/00, A61B 10/00, опубл. Бюл. № 18, 2008).

Для здійснення цього способу використовували мононуклеари периферійної крові (МНПК) людей. Суспензії клітин готували шляхом виділення мононуклеарів з периферійної венозної крові центрифугуванням в одноступеневому градієнті щільності фікол-верографіні. Для стимуляції апоптозу використовували селективний блокатор H_3 -гістамінових рецепторів тіоперамід, який вносили у середовище культивування в концентраціях 1 mM, 10 mM та 100 mM в двох паралелях та інкубували протягом 24, 48 та 72 год.

З метою комплексної оцінки процесів апоптозу використовували метод проточної лазерної цитофлюориметрії з використанням анексину V-FITC та пропідіум йодиду (PI).

Загальними ознаками способу, що заявляється, і найближчого аналога є:

- 1) виділення мононуклеарних клітин периферійної крові;
- 2) індукція апоптозу мононуклеарних клітин периферійної крові;
- 3) оцінка апоптозу.

Недоліком відомого способу є відсутність можливості доведення залучення ППАР- γ в регулюванні процесів апоптозу імунокомпетентних клітин.

В основу корисної моделі поставлено задачу створити такий спосіб індукції апоптозу мононуклеарних клітин периферійної крові шляхом удосконалення відомого, який дозволяє стимулювати апоптоз імунокомпетентних клітин активатором ППАР- γ рецепторів піоглітазоном, доводить залучення ППАР- γ в регулюванні процесів апоптозу мононуклеарних клітин, забезпечує достовірну оцінку процесів апоптозу лімфоцитів методом проточної цитофлюориметрії з метою модулювання функціонального стану імунної системи людини.

Поставлена задача вирішується шляхом створення способу індукції апоптозу мононуклеарних клітин, що включає їх виділення, індукцію апоптозу та його оцінку, який відрізняється тим, що як індуктори використовується активатор ППАР- γ рецепторів піоглітазон.

Запропонований спосіб дозволяє індукувати апоптоз через активацію ППАР- γ та надає можливість вивчити участь ППАР- γ рецепторів в регуляції функціональної активності мононуклеарних клітин периферійної крові, які реалізують свої ефекти в процесах запалення, онкогенезі, тощо.

5 Заявлений спосіб виконується наступним чином:

Індукція апоптозу здійснюється *in vitro* з попереднім виділенням мононуклеарів периферійної крові людини та подальшою комплексною оцінкою апоптозу цитофлюориметричним методом. Цитофлюориметричний аналіз здійснюють з використанням флюорисцентних барвників анексину V-FITC (AnV) та пропідіуму йодиду (PI).

10 Дію агоніста ППАР- γ визначали шляхом застосування гідрохлориду піоглітазону (PIO) в концентраціях 10, 30 та 100 μM , який попередньо був розчинений в диметилсульфоксиді (DMSO). Для дослідження використовували суспензію мононуклеарів периферійної крові (МНПК), яку отримували з периферійної крові в асептичних умовах за стандартною методикою [Лимфоциты: методы: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Клауса. - М.: Мир, 1990. - 395с] шляхом
15 центрифугування на градієнті густини фікол-верографіну (густина 1,077 г/мл) із наступним відмиванням стерильним фосфатно-сольовим буфером (ФСБ) та подальшим ресуспендуванням до концентрації 2×10^6 клітин в 1 мл в середовищі RPM1-1640 з глютаміном (Sigma, США) з 10 % інактивованою телячою сироваткою („Bio Mark Inc", Львів Україна), 100 мкг/мл гентаміцину сульфату (ГНЦЛС, Україна) при 37 °C в присутності PIO, або DMSO, або
20 ФСБ в контрольних групах. Суспензії свіжовиділених МНПК та через 18 год. інкубації двічі відмивали для подальшого визначення апоптозу.

Апоптоз МНПК оцінювали методом проточної лазерної цитофлюориметрії з використанням AnV-FITC та PI (виробництва Caltag, США).

25 Статистичну обробку результатів досліджень проводили, використовуючи пакет програми STATISTICA 6.0 (StatSoft, США) з розрахунком вибіркового середнього, вибіркового стандартного відхилення, вірогідності отриманих результатів Т-тестом для парнозв'язаних величин (t). Дані наведені у вигляді вибіркового середнього (M), вибіркового стандартного відхилення (STD). Критичний рівень значимості під час перевірки статистичних гіпотез в данному дослідженні приймали за 0,05.

30 Під час дослідження змін показників під впливом агоніста ППАР- γ -піоглітазону - були враховані зміни в контрольних пробах. Статистична обробка результатів показала, що в контрольній пробі після 18 год. інкубації в поживному середовищі та в присутності DMSO (розчинник піоглітазону) спостерігались зміни кількості AnV^+PI^+ клітин в суспензії МНПК. Під впливом DMSO відмічена індукція процесів апоптозу, порівнюючи з показниками в контрольній
35 пробі. Аналізуючи рівні апоптозу серед МНПК під впливом активатора ППАР- γ , що відображає кількість AnV^+PI^+ клітин в суспензії, відмічено дозозалежне зменшення апоптотичних клітин. При цьому максимальні вірогідні зміни спостерігались під впливом піоглітазону в дозі 100 μM (вдвічі зменшення кількості AnV^+PI^+ клітин).

40 Отримані результати дозволяють довести, що активація ППАР- γ задіяна в регуляції апоптотичних процесів МНПК, що відкриває нам ще один шлях для дослідження складних механізмів програмованої загибелі імуноткомпетентних клітин та нових можливостей терапевтичних втручань.

Таблиця

Вплив піоглітазону на процеси апоптозу МНПК

	Свіжовиділені МНПК	Контроль 18 год. інкубації	Контроль DMSO	Піоглітазон 10 μM	Піоглітазон 30 μM	Піоглітазон 100 μM
Кількість AnV^+PI^+ клітин	14,8 $\pm$ 2,5	3,9 $\pm$ 2,5#	6,8 $\pm$ 3,9#	5,6 $\pm$ 2,9	4,5 $\pm$ 4,2	3,7 $\pm$ 2,2*

45 Примітка:

- вірогідність відмін в порівнянні з показниками в суспензії свіжовиділених МНПК;

* - вірогідність відмін в порівнянні з показниками контрольних проб (DMSO).

50

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб індукції апоптозу мононуклеарних клітин, що включає їх виділення, індукцію апоптозу та його оцінку, який **відрізняється** тим, що як індуктори використовується активатор ППАР-γ рецепторів піоглітазон.

5

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

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

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