

ІНФОРМАЦІЯ

**про медико-біологічне нововведення,
яке рекомендоване для впровадження**

КПКВ, ШИФР, № ДЕРЖРЕЄСТРАЦІЇ, НАЗВА НДР ТА ТЕРМІНИ ВИКОНАННЯ:
6561020, А.06.01, 0106U000487. “Вивчити роль порушень цитокінової регуляції у розвитку вторинних імунодефіцитних станів при різних клінічних формах туберкульозу легень“ 2006.01 – 2008.12.

НАЗВА НОВОВВЕДЕННЯ: Спосіб визначення цитокінсекретуючої функції адгерентних нейтрофільних гранулоцитів периферичної крові *in vitro*.

АНОТАЦІЯ.

До впровадження пропонується спосіб визначення цитокінсекретуючої функції адгерентних нейтрофільних гранулоцитів периферичної крові *in vitro*, який полягає в тому, що шляхом виділення чистої популяції нейтрофільних гранулоцитів, попередній активації нейтрофільних гранулоцитів периферичної крові шляхом адгезії клітин до скла та інкубації у поживному середовищі 199 протягом 4 годин, досягається скорочення терміну та зменшення вартості дослідження.

Для здійснення способу 2 мл венозної крові нашаровують на градієнт фікол-верографіну щільністю 1,090 г/см³. Обережно збирають плазму крові та нашаровують її на фікол-верографін щільністю 1,078 г/см³. Протягом 30 хв. при осаджують клітини у центрифугу при 5⁰ С. Збирають супернатант, відмивають клітини середовищем 199 протягом 10 хв. при 1500 об./хв., знову збирають супернатант, залишаючи нейтрофільні гранулоцити, що знаходяться на дні пробірки у 1 мл поживного середовища 199. Підраховують кількість нейтрофільних гранулоцитів у камері Горяєва, доводять концентрацію клітин до 1 млн/мл поживним середовищем 199 та поміщають по 0,25 мл клітин в лунку предметного скельця діаметром 1,5 см, попередньо нанесеною за допомогою парафільму. Через 15 хв. після початку інкубації скла з лункою при 37⁰ С у вологій камері його тричі промивають у забуференому фізіологічному розчині з рН = 7,2, звільнюючи від клітин, що не мають здатності до адгезії. Таким чином, отримують моношар адгерентних нейтрофілоцитів. Додають в лунку з клітинами 0,25 мл поживного середовища 199 та проводять інкубацію при 37⁰ С у вологій камері протягом 4-х годин.

Після її закінчення поживне середовище обережно зливають у центрифужну пробірку, центрифугують при 1000 об./хв. 10 хв. для осадження нейтрофілів, які могли залишитися у середовищі і в подальшому впливати на кінцевий результат

вимірювання вмісту цитокінів. Збирають супернатант та проводять методику визначення вмісту цитокінів з використанням комерційних тест-систем. Загальний термін дослідження складає 4,5 год.

Відомо, що виділення лейкоцитів з периферичної крові на градієнті щільності призводить до їх активації, про що свідчить посилення експресії молекул адгезії CD 11b та CD 16 (див. Watson F, Robinson J.J., Edwards S.W. Neutrophil function in whole blood and after purification: changes in receptor expression, oxidase activity and responsiveness to cytokines // Biosci Rep. – 1992. – Vol. 12, N 2. – P. 123 – 133). Також відомо, що адгезія нейтрофілів до ендотеліальних клітин є необхідною умовою для подальшого виконання клітинами своїх функцій і є важливим фактором їх функціональної активації. Ця властивість застосовується при проведенні методик з вивчення різноманітних функцій фагоцитуючих клітин. Звичайно використовується скляний чи пластиковий не силіконований посуд. При інкубації нейтрофілів на склі (пластику) відбувається адгезія нейтрофільних гранулоцитів до цих матеріалів. Тому була застосована ця методика, яка дозволила додатково активувати нейтрофіли після виділення їх на градієнті щільності і, таким чином, отримати матеріал для визначення вмісту цитокінів, що виділили клітини в інкубаційне середовище.

Даний спосіб може бути застосований у здорових осіб та хворих для оцінки рівня секреції нейтрофільними гранулоцитами цитокінів при різних патологічних процесах, його змін в процесі лікування, вивчення впливу лікарських препаратів в пробах *in vitro* на інтенсивність синтезу цитокінів з метою з'ясування можливості використання цих препаратів для корекції виявлених порушень.

Апробація запропонованого способу проведена у лабораторії імунології ДУ "Національний інститут фтизіатрії і пульмонології імені Ф. Г. Яновського Академії медичних наук України".

На "Спосіб визначення цитокінсекретуючої функції адгерентних нейтрофільних гранулоцитів периферичної крові *in vitro*" отримано деклараційний патент України № 24278 від 08.02.2007 р. на корисну модель.

ПОКАЗАННЯ ДО ЗАСТОСУВАННЯ: необхідність визначення порушень функціональної активності нейтрофільних гранулоцитів периферичної крові, а саме їх цитокінсекретуючої функції.

ПЕРЕЛІК НЕОБХІДНОГО ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВПРОВАДЖЕННЯ НОВОВВЕДЕННЯ: холодильник, мікроскоп, центрифуга, термостат, мікростриповий фотометр, варіаційні піпетори, камери Горяєва.

ПОСЛУГИ РОЗРОБНИКІВ ДЛЯ ОВОЛОДІННЯ НОВОВВЕДЕННЯМ: курси інформації та стажування.

УСТАНОВА РОЗРОБНИК, АДРЕСА І РЕКВІЗИТИ: ДУ “Національний інститут фтизіатрії і пульмонології імені Ф. Г. Яновського Академії медичних наук України”, 03680, м. Київ, вул. М. Амосова, 10, тел. 275-04-02, факс (044) 275-21-18.

ПРИЗВИЩЕ, ІМ'Я ТА ПО БАТЬКОВІ АВТОРІВ-РОЗРОБНИКІВ: Кадан Л. П., Чернушенко К. Ф., Підгайна О. А., Панасюкова О. Р., Петішкіна В. М., Циганкова Л. М.

КОНТАКТНИЙ ТЕЛЕФОН: (044) 275-42-22

ВІДПОВІДАЛЬНИЙ ЗА ВПРОВАДЖЕННЯ. Кадан Людмила Павлівна.

ВИСНОВОК ВЧЕНОЇ РАДИ ІНСТИТУТУ (теоретична і практична значимість нововведення, шляхи й обсяги впровадження).

Нововведення є результатом виконання фундаментальної НДР. Відомо, що важлива роль у патогенезі туберкульозу належить імунологічним механізмам, які обумовлюють характер захворювання та особливості його клінічного перебігу. Контроль над МБТ здійснюється широким спектром імунокомпетентних клітин та цитокінів, що вони продукують. Цитокіни регулюють силу, тривалість імунної відповіді та запального процесу, забезпечуючи міжклітинну взаємодію, позитивну, негативну імунорегуляцію і є факторами росту, диференціювання лімфоїдних та інших клітин. Накопичилося достатньо фактів, які свідчать про те, що патологічні відхилення в реакціях імунітету та у зв'язку з цим особливості патогенезу багатьох захворювань можуть бути пов'язані значною мірою з порушеннями у продукції цитокінів. В даний час слід вважати встановленим факт участі нейтрофільних гранулоцитів в регуляції цитокінового каскаду. Активовані нейтрофіли секретують широкий спектр цитокінів і можуть, таким чином, не тільки впливати на активність інших імунокомпетентних клітин, але і регулювати імунну відповідь. У зв'язку з цим представляється доцільним досліджувати здатність нейтрофілів до продукції цитокінів у хворих на туберкульоз легень.

Застосування нововведення дозволяє значно зменшити час (з 20,5 до 4,5 годин) дослідження та його вартість за рахунок використання поживного середовища 199. Новий метод дослідження цитокінсекретуючої функції адгерентних нейтрофільних гранулоцитів може бути впроваджений шляхом проведення курсів інформації та стажування.

Національний інститут фтизіатрії і пульмонології імені Ф.Г. Яновського

Нововведення може бути рекомендовано до застосування в лабораторіях імунології наукових та лікувальних установ.

ДАНА РОЗРОБКА ГРИФУ СЕКРЕТНОСТІ НЕ МАЄ.

Директор ДУ “Національний інститут
фтизіатрії і пульмонології імені Ф. Г. Яновського
Академії медичних наук України”
академік АМН України,
д-р мед. наук, професор

Ю. І. Фещенко

Керівник теми:

Завідувач лабораторії імунології
член-кор. АМН України, д-р мед. наук, професор

К. Ф. Чернушенко

2008.11.17