

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель Министра

\_\_\_\_\_ Р.А. Часнойть  
18 сентября 2006 г.  
Регистрационный № 184-1205

**МЕТОД ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ Т-СИСТЕМЫ ИММУНИТЕТА  
У БОЛЬНЫХ ГЕПАТИТОМ С И МИКСТ-ГЕПАТИТОМ В+С  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНДЕКСОВ АКТИВАЦИИ  
И АПОПТОЗА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Научно-исследовательский институт  
эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф., чл.-кор. НАН Беларуси, Л.П. Титов, канд.  
мед. наук В.В. Тарасюк, канд. мед. наук Д.А. Черношей, канд. мед. наук Л.С.  
Жмуровская

Минск 2007

Инструкция предназначена для использования метода диагностики состояния Т-системы иммунитета с целью объективной оценки иммунного статуса больных гепатитом С (ГС) и микст-гепатитом В+С (МГВС) *in vitro*, в частности повышения информативности иммунофенотипирования иммунокомпетентных клеток (ИКК) с применением моноклональных антител и последующего назначения им адекватной иммунотерапии. Предложенный метод (расчет индексов активации и апоптоза) позволяет выявить повреждения молекулярно-клеточных механизмов функционирования Т-системы иммунитета для мониторинга и прогноза течения заболевания, а также контроля проводимой терапии. Метод диагностики обладает более высокой информативностью в сравнении с обычными фенотипическими параметрами иммунного статуса, прост в исполнении, не требует больших материальных и временных затрат по сравнению с известным способом.

Инструкция предназначена для клинических иммунологов, врачей-лаборантов, врачей-инфекционистов и терапевтов областных и республиканских клинических центров.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

### ***Оборудование:***

- 1) ламинарный бокс;
- 2) бытовой холодильник;
- 3) проточный цитофлюориметр или люминесцентный микроскоп;
- 4) микроскоп световой;
- 5) центрифуга лабораторная;
- 6) вортекс (механическая мешалка) для пробирок и планшетов;
- 7) дозаторы пипеточные одноканальные автоматические для объемов 0,5-20 мкм, 200 мкм, 1000 мкм и 5000 мкм;
- 8) сменные наконечники для дозаторов;
- 9) пробирки центрифужные;
- 10) пробирки одноразовые для проточного цитометра;
- 11) камера Горяева;
- 12) штативы для пробирок.

### ***Реактивы:***

- 1) гепарин или ЭДТА;
- 2) градиент плотности (плотность 1,077 г/л);
- 3) лизирующий раствор для эритроцитов;
- 4) трипановый синий;
- 5) полная питательная среда (ППС): RPMI-1640 с 10% термоинактивированной эмбриональной телячьей сывороткой, L-глутамином (0,3 мг/мл), гентамицином (50 мкг/мл) и NEPES (20 ммоль);
- 6) моноклональные антитела к CD-антигенам лимфоцитов человека, конъюгированные или неконъюгированные с флуоресцентной меткой: CD11b, CD25, CD95 и HLA-DR. Для неконъюгированных моноклональных

антител дополнительно используются связывающие антимышьиные поликлональные антитела, меченные флуоресцентной меткой;

7) растворы: забуференный фосфатно-солевой буфер (ФСБ), 3%-я уксусная кислота, 1,0%-й раствор параформальдегида, раствор Хенкса.

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Диагностика состояния клеток Т-системы иммунитета у больных как ГС и МГВС, так и с любой патологией, связанной с нарушениями состояния Т-системы иммунитета.

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Нет.

### **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА**

*I этап. Определение уровня экспрессии CD11b, CD25, HLA-DR и CD95 антигенов на лимфоцитах периферической крови путем иммунофенотипирования лимфоцитов*

Для постановки иммунофенотипирования лимфоцитов используются мононуклеары периферической крови (МПК), выделенные методом градиентного центрифугирования, или гепаринизированная цельная кровь (20 ЕД гепарина на 1 мл крови). Уровень экспрессии CD11b, CD25, HLA-DR, CD95 на МПК или лимфоцитах цельной крови определяется в реакции иммунофлюоресценции с помощью соответствующих моноклональных антител согласно инструкции производителя моноклональных антител. Общепринятая процедура постановки реакции иммунофлюоресценции при использовании меченных флуоресцеина изотиоцианатом моноклональных антител, изготовленных рядом известных производителей, подробно описана в научной литературе.

*II этап. Расчет индексов*

Используя полученные значения экспрессии CD11b, CD25, HLA-DR и CD95 антигенов на лимфоцитах периферической крови, проводится расчет соотношений (индексов) процентного количества клеток, экспрессирующих маркеры адгезии (CD11b), ранней (CD25) и поздней активации (HLA-DR), апоптоза (CD95):

- 1) индексы активации
  - CD11b<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>;
  - CD11b<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>;
  - CD25<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>;
- 2) индексы апоптоза
  - CD95<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>;
  - CD95<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>;
  - CD95<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>.

*III этап. Анализ и интерпретация полученных результатов*

Полученные данные сравнивают с известными для каждого соотношения нормами, которые определяются каждой лабораторией

индивидуально. Значения рассчитанных индексов в контрольной группе соответствуют нормальной функциональной активности ИКК.

CD11b<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>- и CD11b<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>-индексы характеризуют степень активации ИКК, в то же время CD25<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> — процессы ранней и поздней активации в качестве маркера состояния функционального резерва ИКК. Увеличение значений CD11b<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> и уменьшение соотношения CD25<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> свидетельствует о нарушении активации ИКК периферической крови, обусловленном снижением функциональной активности клеток иммунной системы и формированием состояния анергии за счет истощения их функционального резерва.

При увеличении индексов апоптоза говорят об иммунодефицитном состоянии Т-системы иммунитета. В основе формирования данного состояния лежит отсутствие должного иммунного ответа, что во многом обусловлено не только интенсивной стимуляцией лимфоцитов, но и увеличением их готовности к процессам апоптоза. Повышенная экспрессия маркеров активации и апоптоза на ИКК является возможным признаком патогенетически важного дефекта иммунного ответа и отражает процессы избыточной и неэффективной поликлональной стимуляции лимфоцитов периферической крови, что ассоциируются с неблагоприятным исходом заболевания (хронизацией). Развитие негативной и/или «неправильной» активации ИКК определяет клиническое течение гепатитов.

Предложенные индексы, выявляющие наличие или отсутствие иммунодефицитного состояния иммунной системы, позволяют получить новую информацию о функциональном состоянии клеток Т-системы иммунитета, а также оценить вклад каждого этапа активации (процессы ранней и поздней активации, межклеточной адгезии) в исход развития клеточного иммунного ответа (развитие адекватного иммунного ответа или апоптоза ИКК).

При использовании данного метода для оценки состояния Т-системы иммунитета у больных ГС и МГВС (таблица 1) установлено значительное увеличение индексов апоптоза и активации (CD11b<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> и CD11b<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>) по сравнению с таковыми в контрольной группе ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует о снижении адгезивной и активационной способности Т-лимфоцитов на фоне их повышенной готовности к процессам апоптоза, приводя к иммунодефицитному состоянию иммунной системы, лежащему в основе вирусспецифической анергии при данной патологии. Снижение индекса CD25<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>, особенно у больных хроническим ГС (ХГС) ( $p < 0,05$ ), свидетельствует о снижении количества клеток, экспрессирующих ранние маркеры активации, и указывает на истощение функционального резерва иммунного ответа. Следовательно, расчет индексов выявил молекулярно-клеточные повреждения функционального состояния Т-системы иммунитета при ГС и МГВС. Метод обладает более высокой информативностью в сравнении с обычными параметрами иммунного статуса.

Значения индексов активации и апоптоза при ГС и МГВС

Индексы	Контрольная группа (n=25)		Группы больных					
			ОГС (n=38)		ХГС (n=42)		МГВС (n=24)	
	М±m	ДИ	М±m	ДИ	М±m	ДИ	М±m	ДИ
CD11b <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup>	1,04±0,3	0,98-1,10	1,89±0,33	1,21-2,42	2,36±0,36*	1,61-3,04	2,03±0,21*	1,70-2,54
CD11b <sup>+</sup> /HLA-DR <sup>+</sup>	0,94±0,18	0,80-1,08	1,61±0,22*	1,15-2,07	1,48±0,11*	1,24-1,69	1,43±0,20	1,00-1,77
CD25 <sup>+</sup> /HLA-DR <sup>+</sup>	1,05±0,08	0,88-1,22	1,00±0,12	0,76-1,25	0,81±0,06*	0,70-0,92	0,82±0,09	0,63-1,01
CD95 <sup>+</sup> /CD11b <sup>+</sup>	2,08±0,08	1,91-2,25	2,17±0,22	1,73-2,60	2,76±0,33*	2,09-3,36	2,29±0,24	1,83-2,82
CD95 <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup>	2,14±0,31	2,03-2,25	4,24±0,58*	3,07-5,35	6,23±0,92*	4,40-8,06	4,38±0,53*	3,31-5,44
CD95 <sup>+</sup> /HLA-DR <sup>+</sup>	1,93±0,22	1,81-2,06	3,15±0,32*	2,51-3,80	3,64±0,38*	2,95-4,39	3,12±0,56*	1,99-4,25

Примечания: М±m – значения средней арифметической и ее стандартной ошибки;

ДИ – доверительный интервал при 95% достоверности;

\* достоверность различий по сравнению с контролем, p<0,05.

Кроме того, данный метод позволяет прогнозировать исход заболевания. Так, значение индекса  $CD95^+/CD25^+$  у больных ХГС значительно превышало таковой у больных острым ГС и МГВС ( $p < 0,05$ ), что указывает на взаимосвязь хронического течения заболевания (ХГС) и степень нарушения состояния Т-системы иммунитета (высокие значения индекса апоптоза). При анализе  $CD95^+/HLA-DR^+$  и  $CD95^+/CD11b^+$  индексов такая зависимость была незначительной ( $p > 0,05$ ).

Увеличение индексов апоптоза и активации у больных ГС и МГВС также ассоциировалось с тяжестью или клинико-биохимической активностью заболевания, что позволяет использовать их для прогноза течения патологии. Так, нарушение состояния Т-системы иммунитета (высокие значения индексов) чаще наблюдалось у больных острым ГС с легкой формой тяжести (кроме  $CD95^+/CD11b^+$ ), а у больных хроническим ГС и МГВС – с высокой активностью и тяжелой формой болезни соответственно. Следует отметить, что  $CD95^+/CD25^+$ -индекс характеризовался более высокой диагностической и прогностической значимостью для прогноза (диагностики) тяжести или клинико-биохимической активности заболевания по сравнению с другими рассчитываемыми индексами («cut-off point» равен 2,99 при чувствительности – 0,75 и специфичности – 0,59, прогностическая ценность положительного и отрицательного результатов – 58 и 38%).

Расчетные индексы также могут быть использованы для оценки эффективности проводимой терапии больных ВГ. Так, проводимая комбинированная терапия у больных ХГС способствовала восстановлению функционального состояния клеток Т-системы иммунитета (нормализация значений индексов апоптоза), что ассоциировалось со снижением вирусной нагрузки и клиническим улучшением состояния больных.

#### **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

1. Кровь для исследования хранить не более 6 ч при  $t = +20...+25^{\circ}\text{C}$ .
2. Длительная инкубация клеток в лизирующем растворе может вызывать разрушение лейкоцитов от осмотического шока, такие образцы для анализа непригодны.
3. Каждой лаборатории необходимо набрать группу доноров или группу практически здоровых лиц для определения нормальных показателей индексов апоптоза в своем регионе, а также в зависимости от особенностей применяемых реактивов (моноклональных антител) в данной лаборатории.
4. При цитометрии образцов необходимо следить за чистотой выделения лимфоцитарного окна.