



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: не действует (последнее изменение статуса: 02.07.2021)  
Пошлина: Возможность восстановления: нет.

(21)(22) Заявка: [2013121613/15](#), 07.05.2013(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
07.05.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 07.05.2013

(43) Дата публикации заявки: 20.11.2014 Бюл. № [32](#)(45) Опубликовано: [10.04.2015](#) Бюл. № [10](#)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: КОЛМА S. et al, Low dose gamma-rays activate immune functions via induction of glutathione and delay tumor growth, J. Radiat Res., 2004, v.45(1), p. 33-39.

RU 2372919 C2, 20.11.2009 . US 20050112572 A1, 26.05.2005 . EP 0869809 A1, 14.10.1998 . ODA T. et al Specific efflux of glutathione from the basolateral membrane domain in polarized MDCK cells during ricin-induced apoptosis. J Biochem.1999, 126(4), p.715-21.

Адрес для переписки:

634012, г.Томск, ул. Киевская, 111а, ФГБУ  
"НИИ кардиологии" СО РАМН, Патентовед  
Н.Л. Малюгина

(72) Автор(ы):

Канская Наталья Викторовна (RU),  
Рязанцева Наталья Владимировна (RU),  
Степовая Елена Алексеевна (RU),  
Носарева Ольга Леонидовна (RU),  
Позднякова Ирина Анатольевна (RU),  
Федорова Нина Александровна (RU),  
Твердохлебов Сергей Иванович (RU),  
Канский Александр Викторович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Научно-исследовательский институт кардиологии" Сибирского отделения Российской академии медицинских наук (RU),  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Национальный исследовательский Томский политехнический университет" (RU),  
Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Сибирский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)

## (54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине и может быть использовано для диагностики апоптоза лимфоцитов. Для этого клетки выделяют, инкубируют 48 часов при температуре 37°C и с 5% содержанием CO<sub>2</sub>, с добавлением индуктора апоптоза дексаметазона в концентрации 10<sup>-4</sup> моль/мл. Количественно определяют жизнеспособность лимфоцитов по включению трипанового синего. Обрабатывают клетки 0,5 мМ перекисью водорода. Проводят биохимическое определение концентрации белок-связанного, восстановленного и окисленного глутатионов в лизате лимфоцитов. При росте концентрации белок-связанного глутатиона на 5% и менее, восстановленного глутатиона на 7% и менее и окисленного глутатиона на 18% и более диагностируют апоптоз лимфоцитов. Изобретение позволяет диагностировать апоптоз лимфоцитов путем комплексного определения трех форм глутатиона. 2 табл.

Известны способы диагностики апоптоза лимфоцитов при активации прооксидантной и антиоксидантной активности путем определения роста общего содержания SH-групп белков [Microtubule dynamics and glutathione metabolism in phagocytizing human polymorphonuclear leukocytes / B.R. Burchill, J.M. Oliver, C.V. Pearson et al. // J. of Cell Biology. - 1978. - Vol.76, №2. - P. 439-447.], но данная методика не позволяет оценить уровень восстановленного глутатиона, а следовательно, оценить эффективность диагностики апоптоза. Известен также способ косвенного определения содержания восстановленного глутатиона по активности глутатионпероксидазы [Медицинские лабораторные технологии: В 2-х томах/ Под ред. А.И. Карпищенко - Т. 2 / А.И. Карпищенко. - СПб.: Интермедика. - 1999. - 656 с.], однако активность этого фермента зависит от конформации активного центра фермента. При изменении конформации активного центра фермента его активность меняется, что не позволяет с высокой точностью оценить уровень восстановленного глутатиона, а, следовательно, диагностировать апоптоз. Известен также способ косвенного определения концентрации восстановленного глутатиона по активности глутатионредуктазы [Медицинские лабораторные технологии: В 2-х томах/ Под ред. А.И. Карпищенко - Т. 2 / А.И. Карпищенко. - СПб.: Интермедика. - 1999. - 656 с.],

однако активность этого фермента зависит от конформации активного центра фермента. При изменении конформации активного центра фермента его активность меняется, что не позволяет достоверно в любой ситуации оценить с высокой точностью уровень восстановленного глутатиона, а следовательно, диагностировать апоптоз.

Известен также способ диагностики функционирования лимфоцитов в норме и при апоптозе по содержанию восстановленного глутатиона, предложенный М.Е. Anderson (1985) в модификации S. Kojima et al. (2004) [Low dose gamma-rays activate immune functions via induction of glutathione and delay tumor growth / S. Kojima, K. Nakayama, H. Ishida // J. Radiat. Res. - 2004. - Vol.45, №1. - P. 33-39.], основанный на взаимодействии восстановленного глутатиона (GSH) с 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойной) кислотой (ДТНБ). При этом образуется окисленный глутатион (GSSG), который затем восстанавливается и вновь взаимодействует с ДТНБ. Данный способ является наиболее близким к предлагаемому по технической сущности и достигаемому результату и выбран в качестве прототипа.

Целью предлагаемого изобретения является повышение эффективности и точности способа.

Указанная цель достигается путем выделения клеток, инкубации клеток 48 часов при температуре 37°C и 5% содержании CO<sub>2</sub> с добавлением индуктора апоптоза дексаметазона в концентрации 10<sup>-4</sup> моль/мл, количественным определением жизнеспособности лимфоцитов по включению трипанового синего, обработки клеток 0,5 мМ перекисью водорода и биохимическим определением концентрации белок-связанного, восстановленного и окисленного глутатиона в лизате лимфоцитов. Новым в данном способе является внесение в инкубационную среду 0,5 мМ гидроксида водорода, без которого невозможна стимуляция антиоксидантной активности и последующая диагностика апоптоза.

Следовательно, только комплексная модернизация способа-прототипа позволяет получить желаемый результат. Только комплексное определение трех форм глутатиона позволяет диагностировать апоптоз, а именно диагностировать апоптоз при росте уровня белково-связанного глутатиона на 5% и менее, восстановленного глутатиона на 7% и менее и окисленного глутатиона на 18% и более.

Антиоксидантная система направлена на эффективную нейтрализацию гидроксирадикалов и снижение токсичной для организма гидроперекиси.

Гидроксильный радикал (<sup>•</sup>ОН) участвует в микробицидном и цитотоксическом действии нейтрофилов, моноцитов и Т-лимфоцитов и других клеток [Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньщикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков и соавт. - М.: Слово. -2006. - 556 с.]. Есть два основных механизма синтеза <sup>•</sup>ОН нейтрофилами: первый - образование из пероксида водорода в присутствии металлов переменной валентности в так называемой «реакции Фентона»:

$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + OH^-$  [Луцак В.И. Окислительный стресс и механизмы защиты от него у бактерий / В.И. Луцак // Биохимия. - 2001. - Т. 66, вып. 5. - С.592-609.], второй - в ходе ряда реакций с участием гипохлоритов:

или взаимодействие гипохлорита с ионами Fe<sup>2+</sup> [Spin trapping evidence for myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes // C.L. Ramos, S. Pou, B.E. Britigan et al. // J. Biol. Chem. - 1992. - Vol.267. - P. 8307-8312; Candeias, L.P. Formation of hydroxyl radicals on reaction of hypochlorous acid with ferrocyanide, a model iron (II) complex / L.P. Candeias, M.R.L. Stratford, P. Wardman // Free Radical Res. - 1994. - Vol.20. - P. 241-249.]. Следовательно, если в клетке нет металлов переменной валентности в свободном состоянии, для нее реакция Фентона и подобные реакции не будут опасными.

В клетках предусмотрен ряд защитных реакций по блокированию свободных ионов Fe<sup>2+</sup> и Cu<sup>+</sup>. Например, активированные клетки синтезируют лактоферрин, связывающий свободное железо и переводящий его в каталитически неактивную форму, а также продуцируют высокие концентрации таурина, конъюгирующего с гипохлоритом и защищающего клетку от его токсичных эффектов [Taurine chloramines, a product of activated neutrophils, inhibits in vitro the generation of nitric oxide and other macrophage inflammatory mediators / J. Marcinkiewicz, A. Grabowska, J. Bereta et al. // J. Leukocyte Biol. - 1995. - Vol.58. - P.667-674.].

Образование <sup>•</sup>ОН показано в ходе микросомального окисления, окисления арахидоновой кислоты, в реакциях с флавиновыми ферментами, убихиноном, пероксинитритом. В ряде исследований клеток in vitro получены свидетельства продукции <sup>•</sup>ОН данными клетками [Hydroxylation of salicylate by activated neutrophils / W.B. Davis, B.S. Mohammed, D.C. Mays et al. // Biochem Pharmacol. - 1989. - Vol.38. - P.4013-4019.]. Однако изучение этих реакций зачастую основывалось на использовании ингибиторов и измерении уровня вторичных продуктов. Следовательно, реакции, приписанные <sup>•</sup>ОН, могли быть вызваны другими

оксидантами, в частности  $O_2^{\bullet -}$  или гипохлорной кислотой [Do human neutrophils form hydroxyl radical. Evaluation of an unresolved controversy / M.S. Cohen, B.E. Britigan, D.J. Hassett et al. // *Free Radic Biol Med.* - 1988. - Vol.5. - P.81-90.]. Ряд авторов считает, что in vitro за счет реакции Фентона клетки производят незначительные количества  $\bullet OH$  [Rosen, G.M. Free radicals and phagocytic cells / G.M. Rosen, S. Pou, C.L. Ramos // *FASEB J.* - 1995. - Vol.9. - P.200-211.].

Генерация  $\bullet OH$  стимулированными клетками в очаге воспаления может существенно лимитироваться отсутствием в среде ионов железа. Исследование реакции Фентона в клетках выявило, что блокирование ионов железа лактоферрином ингибирует непосредственно саму реакцию [Rosen, G.M. Free radicals and phagocytic cells / G.M. Rosen, S. Pou, C.L. Ramos // *FASEB J.* - 1995. - Vol.9. - P.200-211.], а утилизация  $H_2O_2$  миелопероксидазой ограничивает реакцию, даже если железо доступно [Winterbourn, C.C. Myeloperoxidase as an effective inhibitor of hydroxyl radical production: Implications for the oxidative reactions of neutrophils / C.C. Winterbourn // *J. Clin. Invest.* - 1986. - Vol.78. - P.545-557.]. Хотя большинство биологических форм железа каталитически неактивно, показана способность клеток к продукции  $\bullet OH$  в присутствии трансферрина, подверженного протеолитической деградации [Phagocyte-derived free radicals stimulated by ingestion of ironrich *Staphylococcus aureus*: Aspin-trapping study / M.S. Cohen, B.E. Britigan, Y.S. Chai et al. // *J. Infect Dis.* - 1991. - Vol.163. - P.819-826.], или железа в составе *Pseudomonas aeruginosa*, содержащего сидерофор пиохелин [Possible role of bacterial siderophores in inflammation-Iron bound to the pseudomonas siderophore pyochelin can function as a hydroxyl radical catalyst / T.J. Coffman, C.D. Cox, B.L. Edeker et al. // *J. Clin. Invest.* - 1990. - Vol.86. - P.1030-1038.]. Однако M.S. Cohen и соавторы обнаружили, что внутриклеточное железо не всегда доступно: в их экспериментах повышенного образования радикала  $\bullet OH$  не отмечалось, даже если клетки поглощали *Staphylococcus aureus*, который был преинкубирован с  $Fe^{2+}$  [Phagocyte-derived free radicals stimulated by ingestion of ironrich *Staphylococcus aureus*: Aspin-trapping study / M.S. Cohen, B.E. Britigan, Y.S. Chai et al. // *J. Infect Dis.* - 1991. - Vol.163. - P.819-826.].

С помощью чувствительных спиновых меток обнаружена наработка гидроксил-радикала клетки in vitro в результате реакции  $HOCl$  и  $O_2^{\bullet -}$ , причем преобразованию в  $\bullet OH$  подверглась очень небольшая часть использованного клетками кислорода [Free hydroxyl radicals are formed on reaction between the neutrophil-derived species superoxide and hypochlorous acid / L.P. Candeiias, K.B. Patel, M.R. L. Stratford et al. // *FEBS Lett.* - 1993. - Vol.333. - P.151-159.]. Вопрос о том, достаточно ли такого количества  $\bullet OH$ , чтобы играть существенную роль в цитотоксичности, до сих пор остается открытым. Здесь необходимо учитывать, что гораздо большей бактерицидной способностью  $\bullet OH$  обладает в присутствии  $Cl$  [Radiation induced generation of chlorine derivatives in  $N_2O$ -saturated phosphate buffered saline: Toxic effects on *Escherichia coli* cells / G. Czapski, S. Goldstein, N. Andom et al. // *Free Radic. Biol. Med.* - 1992. - Vol.12. - P.353-361.], вероятно, вследствие реакции между ними с образованием гипохлорита [Bactericidal potency of hydroxyl radical in physiological environments / R.G. Wolcott, B.S. Franks, D.M. Hannum et al. // *J. Biol. Chem.* - 1994. - Vol.269. - P.9721-9734.].

Гидроксильный радикал представляет собой один из наиболее реакционно-способных окислителей и может взаимодействовать почти с любой молекулой клетки. Он модифицирует дезоксирибозу и азотистые основания ДНК, окисляет молекулы белков, углеводов и липидов. Особенно активно  $\bullet OH$  в ходе реакций перекисного окисления липидов атакует фосфолипиды, содержащие в жирнокислотных радикалах ненасыщенные связи, что ведет к образованию гидроперекисей [Дубинина, Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты / Е.Е. Дубинина. - СПб.: Медицинская пресса, 2006. - 400 с; Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньщикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков и соавт. - М.: Слово. - 2006. - 556 с.]. Основным компонентом антиоксидантной системы является восстановленная форма глутатиона.

Глутатион - трипептид (L-γ-глутамил-L-цистеилглицин) с молекулярной массой 307 Да занимает особое место среди SH-содержащих соединений. Наличие γ-глутамильной связи защищает трипептид от ферментативной деградации. В организме глутатион присутствует в двух формах: окисленной - GSSG и восстановленной - GSH, причем содержание GSH в клетках на несколько порядков выше, чем GSSG [Колесниченко Л.С., 1989; Wu G. et al., 2004; Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н., 2005; Марри Р. и соавт., 2009]. По данным P. Pietarinen-Runtti et al. (2000), концентрация GSH в клетках составляет около 5 нмоль/мг белка. Содержание глутатиона в сыворотке крови здоровых людей незначительно, поэтому клетки основную потребность в GSH обеспечивают путем нематричного синтеза [Wu G. et al., 2004] в ходе двух последовательных реакций, катализируемых γ-глутамилцистеин-синтазой (КФ

6.3.2.2) и глутатион-синтетазой (КФ 6.3.2.3) [Кулинский В.И., 1990; Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н., 2005; Марри Р. и соавт., 2009]. Лимитирующим звеном синтеза является образование  $\gamma$ -глутамилцистеина, зависящее от наличия L-цистеина и его способности окисляться в L-цистин [Зенков Н.К. и соавт., 2001]. В то же время недостаточность глутатион-синтетазы способствует развитию окислительных повреждений в нейтрофилах [Spielberg S.P. et al., 1979].

Глутатион при физиологических значениях pH имеет две анионные карбокси-группы, положительно заряженную аминогруппу и SH-группу цистеинового остатка, которая придает GSH свойства восстановителя и способность быстро обезвреживать свободные радикалы и АФК [Day R.M., 2005; Zhu Y., 2007; Circu C.L. et al., 2009]. Глутатин является типичным тиолом и, участвуя в одноэлектронных восстановительных реакциях, становится GS<sup>\*</sup>, который димеризуется до GSSG, легко реагирующего со свободными SH-группами. Второй тип окислительно-восстановительных превращений с участием GSH - это реакции тиолдисульфидного обмена, которые известны как основной путь образования смешанных дисульфидов глутатиона с белками (белок-SSG) и играют роль в регуляции биологических процессов [Chai Y.C. et al., 1994]. В реакциях третьего типа происходит двухэлектронное окисление глутатиона с образованием интермедиата, который реагирует со второй молекулой GSH (получение GSSG) или иной молекулой (синтез смешанного дисульфида) [Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н., 2005].

GSH является стабилизатором мембран [Биленко М.В., 1989; Uduri V., 1992; Trudel S. et al., 2009]. Он защищает клеточные структуры от высокотоксичного ОЦИ - [Carr A.C., Winterbourn C.C., 1997], при этом GSH превращается в глутатион-сульфонамид и дегидроглутатион [Harwood D.T. et al., 2006]. Связывая NO, глутатион образует токсичные для клетки нитрозильные комплексы. Моно-нитрозоглутатион может активировать апоптоз [Turpaev K.T. et al., 1997].

Не всегда восстановительного потенциала GSH достаточно для полной нейтрализации прооксидантов. Существует мнение, что взаимодействие GSH с органическими радикалами эффективно только в условиях удаления O<sub>2</sub><sup>\*</sup>, поэтому глутатион образует с супероксиддисмутазой своеобразную антиоксидантную систему, ибо в противном случае развиваются реакции образования H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и GS<sup>\*</sup> [Ланкин В.З. и соавт., 1997; Меньщикова Е.Б. и соавт., 2006]. В сочетании с витамином B<sub>12</sub> глутатион, а также N-ацетилцистеин могут потенцировать прооксидантное и цитотоксическое действие на клетку [Соловьева М.Е. и соавт., 2007].

Основной антиоксидантный эффект GSH реализуется посредством участия в работе ферментов. Глутатион выступает донором водорода при восстановлении H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и перекисей липидов глутатион-пероксидазами и глутатион-S-трансферазами (ГТ) [Hirayama K., 1989; Sies H. et al., 1997; Кулинский В.И., 1990; Hayes J.D. et al., 2005; Зенков Н.К. и соавт., 2009; Liu G. et al., 2010]. Высокая активность глутатион-редуктазы и накопление GSH оказывает протекторный эффект в отношении альвеолярных макрофагов, инкубируемых с прооксидантами in vitro [Pietarinen P.K. 1995] и других клеток.

С изменением окислительно-восстановительного баланса сопряжено большое количество реакций, поэтому поддержание оптимального редокс-состояния цитозоля выступает важным условием нормальной жизнедеятельности клеток. Высокая концентрация глутатиона в цитоплазме, его редокс-активность и возможность поддержания в восстановленном состоянии делают систему GSH/GSSG важнейшим внутриклеточным редокс-буфером [Reed M.C. et al., 2008]. Концентрация GSH в клетке в 500-1000 раз превышает уровень НАДФН и других внутриклеточных редокс-систем, поэтому изменения соотношения GSH/GSSG прямо отражают изменения редокс-статуса клетки [Кулинский В.И., 2007; Asian M., Canatan D., 2008; Reed M.C., 2008]. Считают, что буферная емкость системы глутатиона защищает репликативную систему клетки, а дефицит GSH приводит к снижению синтеза ДНК и белков [Poot M., 1991; Ланкин В.З., 1997; Day R.M., Suzuki Y.J., 2005; Liu G. et al., 2010], а затем и к апоптозу. Следовательно, только комплексная оценка всех форм глутатиона позволяет диагностировать апоптоз.

Стимуляцию процессов перекисного окисления в клетках для последующей диагностики апоптоза проводили с помощью 0,5 мМ гидроксида водорода.

Таблица 1				
Параметры системы глутатиона, концентрация активных форм кислорода (Ме (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> )) в клетках при различных условиях культивирования				
	Конечная концентрация H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> в культуральной среде			
	0,3 мМ n=20	0,5 мМ n=20	1 мМ n=20	2 мМ n=20
GSH нмоль/мг белка	1,91 (1,89-1,92)	2,00 (1,5-2,16)	2,00 (1,91-3,19)	1,76 (1,64-1,83)
GSSG нмоль/мг белка	0,14 (0,139-0,142)	0,17 (0,14-0,17)	0,14 (0,11-0,14)	0,15 (0,167-0,306)
Примечание: установлена максимальная концентрация восстановленного и окисленного глутатиона после обработки клеток 0,5 мМ перекиси водорода. Апоптоз не превышал 7%				

Для оценки клеточного ответа на воздействие пероксида водорода в изучаемых концентрациях проводили определение: содержания внутриклеточных активных форм кислорода (АФК) - методом проточной цитофлуориметрии, с помощью красителя с заблокированной флуоресценцией дихлорфлуоресцеина диацетата.

Дихлорфлуоресцеин диацетат, изначально не флуоресцирующий, пассивно проникает внутрь клетки и под действием эстераз переходит в полярное соединение, неспособное диффундировать обратно из клетки. После реакции с  $H_2O_2$  он превращается во флуоресцирующий метаболит. Количество аннексин-положительных клеток оценивается методом проточной цитофлуориметрии по способности аннексина V специфически связываться с фосфатидилсеринем, экспрессированным на внешней стороне цитоплазматической мембраны апоптозных клеток, и количеству пропидий иодид-положительных клеток, оцениваемых по способности пропидия йодида (PI) проникать в поврежденные клетки и интеркалировать с дефрагментированной ДНК при некрозе клетки.

Поддержание внутри клетки содержания на определенном уровне АФК важно для регуляции жизнедеятельности. Активные формы кислорода участвуют в реализации танатогенной программы посредством изменения редокс-регуляции экспрессии генов и проапоптотических белков.

Каждый вновь введенный в формулу изобретения признак выполняет функцию повышения точности и эффективности способа: дополнительная обработка 0,5 мМ гидроксидом водорода с последующим определением белково-связанного, восстановленного и окисленного глутатиона.

Роль антиоксидантной системы клетки заключается в снижении токсического эффекта свободных радикалов, в том числе и гидроперекисей липидов.

Антиоксидантную защиту обеспечивает широкий круг веществ, различных по происхождению, физико-химической природе и механизмам действия. Общим их свойством, по определению J.M. Gutteridge (1992), является способность, присутствуя в низких по сравнению с окисляемым субстратом концентрациях, существенно задерживать или ингибировать его окисление. Постоянное образование прооксидантов должно быть уравновешено их инактивацией, поэтому для поддержания гомеостаза необходима адекватная ситуации непрерывная регенерация антиоксидантной способности клеток [Зенков Н.К. и соавт., 2001; Blokhina O. et al., 2003].

Общепринятой номенклатуры антиоксидантов в настоящее время не существует, хотя ряд авторов [Dimascio P., 1990; Kaira V. et al., 2001; Зайцев В.Г. и соавт., 2003] выделяет два класса: превентивные, снижающие скорость инициации цепной реакции окисления, и гасящие (прерывающие цепь), препятствующие развитию цепной реакции. К превентивным относят каталазу и пероксидазы, разрушающие ROOH, а также агенты, образующие хелатные комплексы с металлами переменной валентности, к прерывающим цепь - фенолы, ароматические амины. В условиях *in vivo* главными гасящими антиоксидантами являются: витамин E, нейтрализующий  $ROO^{\bullet}$  в липидной фазе мембран [Jore D. et al., 1990; Hong J.H. et al., 2004], фермент СОД, улавливающий  $O_2^{\bullet -}$  в водной фазе клетки [Fridovich I., 1989; Dimascio P., 1990; Ciurea D., 1992], и церулоплазмин - белок острой фазы, выполняющий антирадикальную функцию в крови [Maridund S.L., 1987; Atanasiu R-L. et al., 1998].

Более известно деление антиоксидантов на ферменты и соединения неферментативной природы. Последние в определенных концентрациях всегда присутствуют в липидной фазе мембран и водных средах организма и расходуются первыми при устранении проявлений окислительного стресса [Droge W., 2002; Blokhina O., 2003]. Ферменты наиболее активно присоединяются к антиоксидантной защите (АОЗ) после включения механизмов индукции [Луцак В. И., 2001]. При возникновении окислительного стресса (ОС) расход антиоксидантов возрастает и меняется экспрессия генов, кодирующих белковые компоненты АОЗ [Дубинина Е.Е., 2006]. Между ферментами и неферментативными элементами АОЗ существует равновесие, причем последние при ряде патологических состояний организма могут выступать в качестве прооксидантов [Зенков Н.К. и др., 2001].

Главную роль среди неферментативных антиоксидантных систем защиты отводят глутатиону.

Функционирование клеток связано с уровнем белково-связанного глутатиона. Определение белково-связанного глутатиона основано на способности боргидрата натрия ( $NaBH_4$ ) высвободить из связи с белками глутатион, который при взаимодействии с ДТНБ образует окрашенное соединение, а именно тио-2-нитробензойную кислоту, водный раствор которой имеет максимум поглощения при длине волны 412 нм [Burchill, B.R. Microtubule dynamics and glutathione metabolism in phagocytizing human polymorphonuclear leukocytes [Text] / B.R. Burchill, J.M. Oliver, C.B. Pearson et al. // J. of Cell Biology. - 1978. - Vol.76, №2. - P.439-447.].

В настоящее время крайне важно определить уровень белково-связанного, восстановленного и окисленного глутатиона для диагностики апоптоза.

Содержание восстановленного глутатиона определяют методом, предложенным М.Е. Anderson (1985) в модификации S. Kojima et al. (2004) [Kojima, S. Low dose gamma-rays activate immune functions via induction of glutathione and delay tumor growth / S. Kojima, K. Nakayama, H. Ishida // J. Radiat. Res. - 2004. - Vol.45, №1. - P.33-39.]. Принцип метода основан на взаимодействии GSH с 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойной) кислотой (ДТНБ) с образованием тио-2-нитробензойной кислоты, водный раствор которой имеет максимум поглощения при длине волны 412 нм. При этом образуется GSSG, который восстанавливается глутатионредуктазой до GSH и вновь взаимодействует с ДТНБ. Скорость образования окрашенного продукта пропорциональна содержанию общего глутатиона. Для определения содержания GSSG пробы прединкубируются с блокатором SH-групп 2-винилпиридином («Wako», Япония), который необратимо связывает GSH, и, следовательно, скорость образования окрашенного продукта пропорциональна содержанию GSSG.

Лизат клеток готовят на 5% сульфосалициловой кислоте, которая осаждает белки, но не ингибирует активность глутатионредуктазы.

Концентрацию белка в клетках определяют методом [A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Analyt. Biochem.* - 1976. - Vol.7, №1, 2. - P.248-254.], основанным на взаимодействии Кумасси голубого G-250 с остатками аргинина и лизина в белках. Свободный краситель красного цвета (максимум поглощения 495 нм) при образовании комплекса с белком переходит в синюю форму (максимум поглощения 595 нм).

К 0,1 мл лизата клеток добавляют 1,0 мл раствора Кумасси голубого (100 мг красителя, 50 мл 96° этанола, 100 мл 85%  $H_3PO_4$ ,  $H_2O$  до 1,0 л), перемешивают, инкубируют 3 мин при комнатной температуре и измеряют оптическую плотность проб (длина волны 595 нм) против контроля, содержащего 0,1 мл воды и 1,0 мл раствора Кумасси голубого. Содержание белка рассчитывают по калибровочной кривой, построенной по разведениям стандартного раствора альбумина (1,0 мг/мл) и выражают в мг/мл.

Диагностика апоптоза с оценкой трех форм глутатиона необходима для анализа жизнеспособности клеток и тканей при их пересадке.

Все сказанное свидетельствует о крайней важности разработки способа диагностики апоптоза, а также для оценки токсического действия активных форм кислорода на культуру клеток.

Популярность указанного выше способа обоснована его высокой чувствительностью, простотой осуществления и достаточной адекватностью получаемых результатов, лежащих в основе определения концентрации трех форм глутатиона в среде инкубации клеток.

Существенные признаки, характеризующие изобретение, проявили в заявленной совокупности новые свойства, явным образом не вытекающие из уровня техники в данной области, и не являются очевидными для специалиста.

Идентичной совокупности признаков не обнаружено при изучении патентной и научной медицинской литературы.

Данное изобретение может быть использовано в медицинской практике для повышения эффективности и точности оценки диагностики апоптоза при различных заболеваниях. Таким образом, следует считать предлагаемое изобретение соответствующим условиям патентоспособности: «новизна», «изобретательский уровень», «промышленная применимость».

Метод основан на определении концентрации белок-связанного, восстановленного и окисленного глутатиона.

Способ осуществляется следующим образом поэтапно:

1. Выделение культуры клеток линии Jurkat.

Культивирование и исследование клеток на апоптоз проводилось в луночных планшетах ( $2,0 \times 10^4$  клеток на лунку) в питательной среде RPMI-1640 при инкубации 48 часов, температуре 37°C и 5% содержанием  $CO_2$  с добавлением минимальной концентрации индуктора апоптоза - синтетического глюкокортикоида дексаметазона ("KRCA", Словения), составлявшем  $10^{-4}$  моль/мл. Затем проводилась оценка количества апоптотических клеток с использованием FITC - меченного аннексина V и пропидиума йодида (PI) методом проточной лазерной цитометрии, а также проводилось определение жизнеспособности клеток по включению трипанового синего. В контроле количество клеток в апоптозе составило 7,06 (6,00-8,71)%, а после инкубации 28,2 (25,1-31,4)% (четырёхкратное увеличение)

2. Количественное определение численности жизнеспособных клеток с помощью окраски трипановым синим («Serva», CLUA) микроскопическим методом.

Клетки ресуспендируют в 1 мл клеточной взвеси. Отбирают 100 мкл ресуспендированной клеточной суспензии и добавляют 100 мкл 0,1% раствора трипанового синего на физ. растворе, хорошо перемешивают и заполняют камеру Горяева. Предварительно к камере притирают покровное стекло так, чтобы

появлялись радужные, ньютонические кольца (только при этих условиях соблюдался правильный объем камеры). Каплю клеточной взвеси с красителем вносят под притертое покровное стекло. Подсчет клеток производят в 5-ти больших квадратах по диагонали камеры Горяева. Расчет жизнеспособных клеток по содержанию «мертвых» клеток, окрашенных в синий цвет, производят по формуле:

$$A \times 10^6 = (\text{число клеток}) / 4$$

где, А - клеточность лимфоцитов крови.

Далее проводят обработку клеток 0,5 мМ гидроксида водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

3. Биохимическое исследование белково-связанного, восстановленного и окисленного глутатиона.

Лизат лимфоцитов готовят на 5% сульфосалициловой кислоте, которая осаждает белки, но не ингибирует активность глутатионредуктазы. Количество общего глутатиона (GSH и GSSG) определяют в пробе, содержащей 0,1 М Na-фосфатный буфер (рН=7,5) с 1 мМ ЭДТА, 0,4 мМ НАДФН<sub>2</sub>, 0,3 мМ ДТНБ и 1 U/мл глутатионредуктазы («Wako», Япония). Окисленный глутатион определяют аналогичным способом в клеточном лизате после предварительной инкубации пробы в течение 30 мин с 10 мМ 2-винилпиридином. Расчет содержания общего и окисленного глутатиона производят с помощью калибровочных графиков, для построения которых используют растворы GSH и GSSG («MP», США) в концентрации от 3 до 100 мкМ, обработанные аналогично опытным пробам. Концентрацию GSH рассчитывают как разницу между концентрацией общего глутатиона и GSSG, выражая результат в нмоль/мг белка.

Определение белково-связанного глутатиона.

После инкубации клетки центрифугируют 5 минут при 4°C и 1500 об/мин для их осаждения. Удаляют супернатант. Добавляют 1 мл охлажденного PBS (рН 7,4). Ресуспендируют на вортексе. Центрифугируют 5 минут при 4°C и 1500 об/мин. Удаляют супернатант. Осадок клеток ресуспендируют в 1 мл 5% сульфосалициловой кислоты для получения клеточного лизата. Центрифугируют при 3000 об/мин 10 мин, 1,0 мл осадка белка инкубируют 1 ч при 50°C с 1,0 мл 1% NaBH<sub>4</sub>. Далее оставшийся белок осаждают добавлением 0,4 мл 30% ТХУ. Пробу инкубируют 15 мин при 50°C. Затем пробу охлаждают 5 мин (0°C). Центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин. Супернатант смешивают с 2,5 мл PBS (рН 7,4) и добавляют 2,0 мл ацетона для полного окисления NaBH<sub>4</sub>. Перемешивают. Центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин. Удаляют верхнюю фазу. К нижней фазе добавляют равный объем диэтилового эфира (для удаления ТХУ). Перемешивают. Центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин. Затем снова удаляют верхнюю фазу. Далее процедуру отмывки пробы от ТХУ с помощью диэтилового эфира производят 4-кратно. Затем отбирают 0,1 мл жидкости (из нижней фазы) и смешивают с 0,4 мл 0,01 М фосфатного буфера (рН=7,0). В пробу добавляют 0,1 мл 0,4 мг/мл ДТНБ. Пробу спектрофотометрируют при 412 нм против контроля, содержащего воду вместо раствора осажденного белка.

Расчет производят с учетом коэффициента молярной экстинкции  $13 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Результаты определения концентрации белково-связанного глутатиона выражают в нмоль/мг белка.

Оценка способа диагностики апоптоза лимфоцитов по способу-прототипу и предлагаемому способу выполнялось 40 раз. Результаты исследования обработаны статистически с использованием пакета программ Stat Soft Statistica 6.0.

При проведении исследования по способу-прототипу уровень восстановленного глутатиона в среде инкубации лимфоцитов в норме составил  $2.11 \pm 0.17$  нмоль/мг белка, белково-связанного глутатиона  $2.8 \pm 0.26$  нмоль/мг белка, окисленного глутатиона  $0.16 \pm 0.2$  нмоль/мг белка, а при оценке по предлагаемому способу в случае эффективной диагностики апоптоза лимфоцитов уровень восстановленного глутатиона составил  $1.96 \pm 0.2$  нмоль/мг белка, белково-связанного глутатиона  $2.5 \pm 0.21$  нмоль/мг белка, окисленного глутатиона  $0.21 \pm 0.4$  нмоль/мг белка. При отсутствии апоптоза лимфоцитов уровень восстановленного глутатиона составил  $2.6 \pm 0.2$  нмоль/мг белка, белково-связанного глутатиона  $3.4 \pm 0.3$  нмоль/мг белка, окисленного глутатина  $0.18 \pm 0.02$  нмоль/мг белка (табл.2).

Увеличенное изображение (открывается в отдельном окне)

То есть при эффективной диагностике апоптоза лимфоцитов уровень восстановленного глутатиона возрастает на 7% и менее, белково-связанного глутатиона на 5% и менее, окисленного глутатиона на 18% и более. При отсутствии диагностики апоптоза лимфоцитов уровень восстановленного глутатиона увеличивается на 17% и более, белково-связанного глутатиона на 18% и более, окисленного глутатиона на 4% и менее.

Полученные результаты уровня глутатиона в среде инкубации лимфоцитов соответствуют данным литературы [Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н., 2005].

Итак, при применении способа-прототипа был получен недостаточно точный результат, не позволивший диагностировать апоптоз лимфоцитов, что связано с отсутствием биохимической стимуляции процесса, а наиболее эффективным и точным был предлагаемый способ.

При этом предлагаемый способ прост в исполнении и интерпретации полученных результатов.

#### Формула изобретения

Способ диагностики апоптоза лимфоцитов, включающий этапы выделения клеток, инкубацию клеток 48 часов при температуре 37°C и с 5% содержанием CO<sub>2</sub>, с добавлением индуктора апоптоза дексаметазона в концентрации 10<sup>-4</sup> моль/мл, количественное определение жизнеспособности лимфоцитов по включению трипанового синего, обработку клеток 0,5 мМ перекисью водорода и биохимическое определение концентрации белок-связанного, восстановленного и окисленного глутатионов в лизате лимфоцитов и при росте концентрации белок-связанного глутатиона на 5% и менее, восстановленного глутатиона на 7% и менее и окисленного глутатиона на 18% и более диагностируют апоптоз лимфоцитов

#### ИЗВЕЩЕНИЯ

**ММ4А Досрочное прекращение действия патента из-за неуплаты в установленный срок пошлины за поддержание патента в силе**

Дата прекращения действия патента: 08.05.2015

Дата публикации: [20.12.2015](#)



