

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель министра

_____ В.А. Ходжаев

16.02.2010 г.

Регистрационный № 057-0510

**МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ
ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГРУППЫ РИСКА РАЗВИТИЯ
САХАРНОГО ДИАБЕТА 1 ТИПА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

УО «Международный государственный экологический университет
им. А.Д. Сахарова»

ГУ «Республиканский центр медицинской реабилитации и бальнеолечения»

АВТОРЫ:

канд. мед. наук, доц. Зафранская М.М.,

Коктыш И.В.,

канд. мед. наук Бойко Ю.Н.,

канд. мед. наук Хмара И.М.,

канд. мед. наук Корытько С.С.,

д-р мед. наук, проф. Мохорт Т.В.

Минск 2010

Инструкция содержит клинико-лабораторные рекомендации по раннему донозологическому выявлению функциональных нарушений лимфоцитов у детей с семейной предрасположенностью к сахарному диабету 1 типа (СД 1) и выявления лиц с высоким риском заболевания. Скрининг СД 1 на доклинических стадиях является сложной задачей и предназначен для выявления пациентов с различной степенью риска заболевания. Технология основана на применении аутоантигена (глутаматдекарбоксилазы) и ИЛ-1 β в качестве индукторов пролиферации и синтеза аутоантител лимфоцитами *in vitro* и позволяет выявить детей, которым показано углубленное иммунологическое обследование, для определения степени риска развития СД 1 типа у сиблингов и последующей корригирующей терапии выявленных нарушений. Рекомендации включают алгоритм отбора детей с семейной предрасположенностью к СД 1, технологию лабораторных исследований функционального состояния лимфоцитов в присутствии аутоантигена.

Инструкция рассчитана на эндокринологов, иммунологов, педиатров и врачей лабораторной диагностики.

Область применения: эндокринология, педиатрия, иммунология и клиническая лабораторная диагностика.

Уровень внедрения: республиканский.

Инструкция разработана в рамках научно-исследовательской работы «Функциональная характеристика Т-клеточного ответа при органоспецифических аутоиммунных заболеваниях»

(№ гос. регистрации 20071862).

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ И РЕАКТИВОВ

Оборудование

1. Камера пылезащитная с ламинарным потоком стерильного воздуха (не ниже II класса).
2. Центрифуга с охлаждением (1200–1500–1800 об/мин) с роторами для пробирок и планшетов.
3. CO₂-инкубатор.
4. Харвестр.
5. Счетчик β -излучения.
6. Гематологический анализатор.
7. Шейкер.
8. Вошер.
9. Микропланшетный спектрофотометр с фильтрами 405, 570 и 620 нм.
10. Холодильник, обеспечивающий температурный режим +4° С.
11. Морозильная камера, обеспечивающая температурный режим -20°С
12. Набор автоматических дозаторов переменного объема 2–1000 мкл.

Материалы

1. 96-луночные кругло-донные и плоскодонные планшеты для культур клеток.
2. Стерильные наконечники для дозаторов.
3. Стерильные центрифужные пробирки 15 мл.

Реактивы

1. Фиколл-верографин, $1,077 \text{ г/см}^3$, отфильтрованный через 0,22 мкм фильтр.
2. Среда RPMI-1640.
3. Гентамицин в конечной концентрации 80 мкг/мл.
4. Раствор L-глутамина в конечной концентрации 2,5 мМ.
5. Эмбриональная телячья сыворотка, термоинактивированная в течение 30 минут при 56°C .
6. Буферный раствор HEPES.
7. Тимидин, меченный H^3 , 4 МБ/мл.
8. Хлорид натрия (NaCl) 0,9%, отфильтровать через 0,22 мкм фильтр.
9. Хлористый аммоний (NH_4Cl) 0,83%, отфильтровать через 0,22 мкм фильтр.
10. Сцинтилляционная жидкость.
11. Иммуноферментный набор для определения аутоантител к островковым аутоантигенам (анти-ICA).
12. Аутоантиген, глутаматдекарбоксилаза (GAD).
13. Стандарт интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β ; NIBSC 86/680).

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Исследование показано детям и здоровым лицам до 21 года без клинических проявлений сахарного диабета 1 и имеющих кровных братьев/сестер с данным заболеванием.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Наличие острого либо обострение хронического воспалительного процесса любой локализации.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРЕДЛАГАЕМОГО МЕТОДА

Перечень необходимых клинико-лабораторных исследований

При подготовке к функциональному исследованию лимфоцитов периферической крови сиблингов пациентов, страдающих СД 1 с целью исключения манифестной формы заболевания, острых или обострений хронических заболеваний, необходимо провести следующие клинико-лабораторные обследования:

- 1) осмотр детского или взрослого эндокринолога;
- 2) общий анализ крови;
- 3) общий анализ мочи;
- 4) оральный глюкозо-толерантный тест.

Программа исследования функционального состояния лимфоцитов периферической крови у сиблингов пациентов, страдающих сахарным диабетом 1 типа

1. Исследование пролиферации лимфоцитов периферической крови в присутствии аутоантигена глутаматдекарбоксилазы (GAD) и ИЛ-1 β .
2. Оценка влияния глутаматдекарбоксилазы и ИЛ-1 β на синтез аутоантител к островковым антигенам поджелудочной железы (ICA).

Приготовление культуральной среды и реагентов

Культуральная среда (полная питательная среда, ППС): RPMI-1640, 4Мм L-глутамин, 0,02мМ NEPES, 10% ЭТС. Довести pH ППС до 7,2–7,4, затем профильтровать в стерильную посуду через фильтр (диаметр пор 0,22 мкм), добавить гентамицин в конечной концентрации 80 мкг/мл.

Среда для отмывания клеток (СОК): RPMI-1640, 1% ЭТС. Довести pH ППС до 7,2–7,4, затем профильтровать в стерильную посуду через фильтр (диаметр пор 0,22 мкм).

Маточный раствор глутаматдекарбоксилазы (GAD) 1 мг/мл: лиофилизированный аутоантиген растворить в стерильной ППС, разлить по аликвотам, заморозить при -20°C. По мере необходимости маточный раствор разводится ППС. Конечная используемая концентрация в лунке — 5 мкг/мл.

Маточный раствор ИЛ-1 β 10000 МЕ/мл: ИЛ-1 β растворить в стерильной ППС, разлить по аликвотам, заморозить при -20° С. По мере необходимости маточный раствор разводится ППС. Конечная используемая концентрация в лунке — 100 МЕ/мл.

Выделение мононуклеаров периферической крови (МПК)

1. Периферическую кровь отобрать в стерильные пробирки с добавлением 20 ЕД/мл гепарина.
2. Развести образцы периферической крови средой для отмывания клеток.
3. Наслоить 6 мл клеточной суспензии на 3 мл раствора фиколла-верографина ($D=1,077 \text{ г/см}^3$).
4. Центрифугировать при 1500 об/мин в течение 20 мин.
5. Удалить верхний слой без нарушения интерфазы.
6. Собрать интерфазу (мононуклерное «кольцо») в отдельную стерильную пробирку, содержащую среду для отмывания клеток.
7. Центрифугировать при 1500 об/мин 10 мин, температура +4°C. Удалить надосадок.
8. Ресуспендировать мононуклеары в среде для отмывания клеток.
9. В случае присутствия в суспензии клеток эритроцитов провести лизис последних с помощью 0,83% стерильного раствора NH_4Cl .
10. Центрифугировать при 1500 об/мин 10 мин, температура +4°C. Удалить надосадок.
11. Ресуспендировать мононуклеары в ППС в концентрации 2×10^6 /мл.

Постановка радиометрического пролиферативного теста

1. В 96-луночный плоскодонный стерильный планшет внести по 100 мкл клеток (в концентрации 2×10^6 /мл, что соответствует 2×10^5 клеток/на лунку). В каждый из триплетов добавить по 100 мкл ППС, содержащей стимуляторы пролиферации лимфоцитов: GAD, GAD+ИЛ-1 β (схему внесения реагентов см. на рис. 1).
2. Параллельно поставить контроль для каждого сиблинга: в 96-луночный плоскодонный стерильный планшет в триплетах внести по 100 мкл клеток (в концентрации 2×10^6 /мл, что соответствует 2×10^5 клеток/на лунку) и 100 мкл ППС (рис. 1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	o	o	O	o	o	o	o	o	o	o	o	o
B	o	к	к	к	g	g	g	gi	gi	gi	o	o
C	o	к	к	к	g	g	g	gi	gi	gi	o	o
D	o	к	к	к	g	g	g	gi	gi	gi	o	o
E	o	к	к	к	g	g	g	gi	gi	gi	o	o
F	o	к	к	к	g	g	g	gi	gi	gi	o	o
G	o	к	к	к	g	g	g	gi	gi	gi	o	o
H	o	o	O	o	o	o	o	o	o	o	o	o

Рис. 1.1. Схема внесения стимуляторов и клеток

Примечание: к — ППС (контроль, спонтанная пролиферация мононуклеаров); g — ППС, содержащая GAD; gi — ППС, содержащая GAD+ИЛ-1 β ; o — для уменьшения испарения в крайние лунки вносится стерильный раствор 0,9% NaCl; в ряды B–G вносится суспензия мононуклеаров различных 6 сиблингов.

3. Культивировать в CO₂-инкубаторе (37°C, 5% CO₂) 6 сут.
4. За 6 ч до окончания культивирования добавить 10 мкл маточного раствора тимидина, меченного H³ (1 мкКи/лунку). Ресуспендировать, продолжить культивирование при тех же условиях.
5. Отобрать клетки на фильтры с помощью харвестера.
6. Трижды отмыть лунки планшета 0,9% раствором NaCl, зафиксировать фильтры этанолом.
7. Высушенные фильтры поместить в виолы, добавить сцинтилляционную жидкость.
8. Определить активность в образцах с помощью β -счетчика.
9. Рассчитать индексы стимуляции по следующей формуле:

$$\text{ИП} = \frac{\text{пролиферативная активность под действием стимулятора (имп/мин)}}{\text{спонтанная пролиферативная активность (имп/мин)}}$$

Индукция синтеза аутоантител

1. В 96-луночный круглодонный стерильный планшет внести аналогичным способом, как и при постановке радиометрического пролиферативного теста, суспензию моноклеаров и ППС, содержащую стимуляторы (см. пункты 1, 2 в разделе 1.2.3).
2. Культивировать в CO₂-инкубаторе (37 °С, 5% CO₂) 6 сут.
3. По окончании культивирования планшет центрифугировать при 1 тыс. об./мин в течение 3 мин. Супернатанты отобрать в пробирки и заморозить при -20°С до последующего анализа на наличие аутоантител ИСА.

Определение анти-ИСА антител в супернатантах культуры МПК

Концентрацию анти-ИСА в полученных супернатантах МПК определить с помощью иммуноферментного анализа с использованием диагностического набора.

Аутоантитела против ИСА исследуются в цельных супернатантах, без предварительного разведения образцов при использовании для исследования сыворотки или плазмы. Процедура иммуноферментного анализа при определении анти-ИСА антител в супернатантах культуры моноклеаров периферической крови не отличается от таковой при исследовании в сыворотке, а время реакции лимитируется производителем коммерческого набора. Ход исследования включает следующие этапы:

1. Во все лунки кроме А1 (бланк) внести по 100 мкл в дуплетах образцы супернатантов, положительный, отрицательный и референс-контроли.
2. Инкубировать 1 ч при +25°С.
3. Трижды отмыть от несвязавшихся компонентов промывающим раствором по 300 мкл.
4. Во все лунки кроме А1 (бланк) внести по 100 мкл ИСА-IgG конъюгата.
5. Инкубировать 1 ч при +25°С.
6. Трижды отмыть от несвязавшихся компонентов промывающим раствором по 300 мкл.
7. Во все лунки внести по 100 мкл субстрат-хромогенную смесь.
8. Инкубировать в темноте 30 мин при +25°С.
9. Во все лунки внести по 50 мкл стоп-реагента.
10. Регистрация результатов на микропланшетном спектрофотометре.

Интерпретация результатов

В табл. 1 представлены референтные интервалы (нормативные значения) для показателей функциональной оценки лимфоцитов *in vitro*, полученные современным методом статистического анализа, основанным на вычислении 95% доверительного интервала исследуемых показателей у практически здоровых детей на момент обследования.

Референтные интервалы для параметров функциональной оценки лимфоцитов *in vitro* в присутствии аутоантигена GAD.

Показатель *	95% доверительный интервал
спонтанная пролиферация лимфоцитов, имп/мин	463,7–937
индекс пролиферации (GAD)	1,0–1,54
индекс пролиферации (GAD+ИЛ-1 β)	1,0–1,57
синтез ICA (GAD+ИЛ-1 β), U/ml	0,212–0,352

Примечание: * — в скобках указан стимулятор, в присутствии которого оценивается функция лимфоцитов

Трактовка результатов:

1. Индекс пролиферации лимфоцитов под действием аутоантигена GAD, превышающий референтный интервал, характерен только для пациентов с сахарным диабетом 1 типа.
2. Для сиблингов с высоким риском возникновения СД 1 характерно выявление превышающей нормативные показатели индекса пролиферации лимфоцитов в присутствии GAD вместе с ИЛ-1 β и/или снижения синтеза аутоантител ICA в присутствии тех же стимуляторов. Данные изменения ассоциированы с высоким риском возникновения СД 1 и характерны только для сиблингов, чьи кровные братья/сестры заболели сахарным диабетом в возрасте до 10 лет.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Учет результатов пролиферации лимфоцитов может проводиться не только радиометрическим способом, требующим разрешения по 2-му классу безопасности работы с изотопами. Принимая во внимание техническое оснащение лабораторий, результаты пролиферативной активности клеток можно также оценить спектрофотометрически (при использовании МТТ-теста) или с помощью проточного цитофлуориметра (при внутриклеточном окрашивании флуоресцирующим красителем карбоксифлуоресцеина CFSE).

В случае применения колориметрического МТТ-теста процедура регистрации пролиферации лимфоцитов включает (вместо пунктов 4–9 раздела 1.2.3 настоящей инструкции):

1. За 3 ч до окончания культивирования добавить 20 мкл раствора МТТ (в конечной концентрации 5 мг/мл). Ресуспендировать, продолжить культивирование при тех же условиях.
2. Удалить аккуратно по 150 мкл супернатанта из каждой лунки.
3. Внести 150 мкл лизирующего раствора, содержащего 50% диметилсульфоксида и 48% этанола. Тщательно ресуспендировать содержимое лунок.

4. Инкубировать в темноте при комнатной температуре в течение 10 мин, встряхивая.
5. Определить оптическую плотность (OD) в образцах на микропланшетном спектрофотометре при длине волны измерения 570 нм по сравнению с фоновой длиной волны 620 нм.
6. Рассчитать индексы стимуляции по следующей формуле:

$$\text{ИП} = \frac{\text{OD (в присутствии стимулятора)}}{\text{OD (в отсутствии стимулятора)}}$$

Осложнения возможны лишь при нарушении асептических условий проведения культуральных исследований (во избежание высоких уровней пролиферации лимфоцитов вследствие контаминации микроорганизмами культуральной среды необходимо готовить ППС, содержащую аутоантиген не ранее чем в день забора периферической крови у сиблинга).