


**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра здравоохранения



Л.А. Постоялко

9 апреля 2002 г.
Регистрационный № 40-0201

Оценка пролиферативной активности лимфоцитов в МТТ-тесте

(инструкция по применению)

Учреждение-разработчик: ГУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии»

Авторы: канд. биол. наук Н.А. Кузовкова, канд. мед. наук Е.О. Самойлович, Л.Д. Маковская

Перейти к оглавлению

ОГЛАВЛЕНИЕ

Показания к применению	4
Перечень необходимого оборудования, материалов и реагентов.....	5
Оборудование	5
Материалы и реагенты.....	5
Метод исследования	6
Технология использования метода.....	6

Оценка пролиферативной активности лимфоцитов в МТТ-тесте

Главными компонентами функционирования иммунной системы являются распознавание, активация, пролиферация, дифференцирование и регуляция. Для оценки каждого из этих компонентов необходим свой набор тестов, наиболее полноценно их характеризующий. Пролиферация лимфоцитов — один из важнейших этапов ответа иммунной системы на активацию клетки. Для оценки пролиферативной функции клеток используют митогенную или антигенную стимуляцию *in vitro*. При исследовании способности лимфоцитов отвечать пролиферацией на стимуляцию фитогемагглютинином (ФГА) и конканавалином А можно судить о функциях Т-клеток, на стимуляцию липополисахаридом — о функциях В-клеток, а на стимуляцию митогеном лаконоса — о кооперативных процессах между Т- и В-лимфоцитами. Пролиферативный ответ лимфоцитов на антигены позволяет составить представление о выраженности специфической сенсибилизации организма.

Оценка пролиферативной активности лимфоцитов в МТТ-тесте

Известны три основных методических подхода к оценке степени пролиферации клеток: микроскопический, изотопный, колориметрический. Первый метод имеет такие недостатки, как трудоемкость и субъективность учета, второй широко распространен, однако нуждается в специфическом и дорогом оборудовании, основан на применении радиоизотопов, что требует специальных помещений, удаления радиоактивных отходов и представляет определенную опасность для исследователя. С помощью этого метода определяется скорость синтеза ДНК, а не истинное количество клеток в образце. Кроме того, в последнее время доказано, что при этом исследовании наблюдается значительный спонтанный выход изотопов из меченых клеток, что искажает результаты измерений. Третий метод свободен от указанных недостатков первых двух методов, достаточно прост и информативен в клинической иммунологии. Колориметрический метод основан на способности митохондриальных ферментов живых клеток восстанавливать тетразолиевую соль МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия) до МТТ-формазана (Mossman T.R., 1983). Только живые клетки восстанавливают желтый МТТ-субстрат в темно-синий формазан. Мертвые клетки и среда для культивирования такой способностью не обладают (Mossman T.R., 1983; Page M et al., 1988). Число жизнеспособных клеток прямо пропорционально количеству восстановленного формазана, которое можно определить спектрофотометрически после растворения в органическом растворителе (Denizot F., Lang R., 1986; Mossman T.R., 1983; Page M. et al., 1988). Доказана более высокая чувствительность колориметрического исследования по сравнению с изотопным: оно отражает истинное число жизнеспособных клеток в образце (Mossman T.R., Fong T.A.T, 1989; Селедцов В.И., Перминова О.М., 1991; Кравченко И.Н. и соавт., 1992). Метод экономичен (оборудование и реагенты значительно дешевле, чем для изотопного исследования), позволяет быстро и с высокой точностью просчитать на иммуноферментном анализаторе большое число образцов в 96-луночных планшетах.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Метод может использоваться для исследования функциональной активности иммунокомпетентных клеток при активации их *in vitro* митогенами или антигенами, оценки иммунного статуса, эффективности иммуномодуляторов, скрининга фармпрепаратов и др.

Показаниями к применению метода являются вторичные иммунодефициты, хронические, затяжные, вялотекущие инфекционные процессы, аутоиммунные и онкологические заболевания, посттравматические и постоперационные состояния, а также любая патология, связанная с нарушениями иммунитета.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, МАТЕРИАЛОВ И РЕАГЕНТОВ

Оборудование

1. Иммуноферментный анализатор, имеющий длину волны 560 нм.
2. Термостат с CO_2 либо эксикатором, в который на период инкубации помещается зажженная свеча для обогащения воздуха CO_2 .
3. Центрифуга.
4. Вытяжной шкаф.
5. Микрошейкер (по возможности).

Материалы и реагенты

1. Планшеты 96-луночные стерильные.
2. Дозаторы.
3. Полная питательная среда (ППС) (RPMI-1640, L-глутамин, эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС), гентамицин, Hepes).
4. МТТ (Sigma).
5. ФГА и другие митогены или антигены.
6. Диметилсульфоксид (ДМСО).
7. Хлористый аммоний (NH_4Cl) 0,83%.
8. Фикол, верографин.

МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Клетки после культивирования с митогеном или антигеном окрашивают МТТ. Функционирующие в живых клетках митохондриальные дегидрогеназы образуют из МТТ нерастворимый в водной среде формазан.

Прирост массы пролиферирующих клеток, активированных митогеном или антигеном, оценивают на иммуноферментном анализаторе по оптической плотности экстракта красителя, поглощенного клетками, относительно такового в контроле.

ТЕХНОЛОГИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Приготовить ППС: 100 мл RPMI-1640 (Sigma), 10 мл ЭТС, 1 мл (2 ммоль) L-глутамин (Sigma), 100 мкл 4% раствора гентамицина, 25 мкг Нерес (Sigma).
2. Выделить мононуклеары периферической крови в градиенте фicol-верографина, лизировать эритроциты 0,83% хлористым аммонием, довести концентрацию клеток ППС до 5×10^6 кл/мл.
3. Развести 200 мкл взвеси клеток ППС 1:10 (добавить 1800 мкл ППС).
4. Разделить полученный объем клеток на две пробирки, в одну из них добавить ФГА из расчета 10 мкл на 1000 мкл клеточной суспензии.
5. Все пробы ставят в 96-луночных плоскодонных планшетах в четырех параллелях. Лунку А1 не заполняют (контроль для иммуноферментного анализатора).

Оценка пролиферативной активности лимфоцитов в МТТ-тесте

6. Клетки с ФГА (опыт) и без него (контроль) разделить по 200 мкл в лунки планшета (по 4 лунки на каждый образец).

7. Планшет поместить в инкубатор с CO_2 или эксикатор, в котором созданы соответствующие условия для инкубации: влажность (вода на дне эксикатора) и атмосфера, обогащенная CO_2 (зажженная свеча). Эксикатор поместить в термостат при 37°C .

8. Длительность инкубации — 72 ч.

9. Через 72 ч во все лунки добавить по 20 мкл 0,5% раствора МТТ и инкубировать планшет еще 3,5 ч. Маточный раствор МТТ готовят на фосфатном буфере в концентрации 5 мг/мл и хранят при 4°C в темной посуде не более 2 недель.

10. Осторожно отсосать 165–170 мкл надосадка из лунок и добавить по 150 мкл ДМСО (в вытяжном шкафу), для растворения образовавшихся гранул формазана, содержимое лунок необходимо тщательно пипетировать либо использовать микрошейкер для встряхивания планшет.

11. Оптическую плотность (OD) раствора измеряют в иммуноферментном анализаторе при длине волны 560 нм. Коэффициент пролиферации вычисляют по формуле: $K = \text{OD}_{\text{опыт}} / \text{OD}_{\text{контроль}}$.

В табл. 1 представлены значения коэффициентов пролиферации при бронхолегочной патологии различной степени тяжести. Хотя индивидуальные показатели пролиферации при всех заболеваниях имеют достаточно широкий разброс значений, как и любые другие иммунологические, гематологические или биохимические показатели, все же заметна тенденция их увеличения при более тяжелых заболеваниях, таких как саркоидоз и рак легкого.

Нормативные значения и изменения коэффициента пролиферации при различных бронхолегочных заболеваниях

Нозоформы	Коэффициент пролиферации	
	пределы колебаний	средние значения
Пневмония	1,02–1,97	1,34
Бронхиальная астма	1,00–2,32	1,52
Хронический бронхит	1,01–2,51	1,55
Туберкулез	1,10–2,15	1,55
Саркоидоз	1,34–2,07	1,85
Рак легкого	0,88–2,35	1,77
Здоровые доноры	1,21–1,68	1,42

В табл. 2 показаны различия пролиферативной активности Т-лимфоцитов на разных стадиях заболеваний нервной системы герпетической этиологии.

Изменения коэффициента пролиферации в зависимости от стадии заболевания

Заболевания нервной системы герпетической этиологии	Клиническая стадия		
	рецидив со стабилизацией	рецидив с прогрессированием	прогрессирующее течение
Энцефаломиелит	1,48 (1,10–2,15)	2,07 (1,98–2,16)	1,43 (1,15–1,98)
Полирадикулоневрит	1,54 (1,30–1,84)		1,31 (1,06–1,53)

Оценка пролиферативной активности лимфоцитов в МТТ-тесте

Безусловно, функциональная активность иммунокомпетентных клеток определяется не столько нозоформой, сколько стадией заболевания, а также индивидуальными особенностями иммунной системы для поддержания внутренних взаимосвязей, определяющих состояние баланса или дисбаланса, то есть иммунопатологии. Нарушения пролиферативной активности лимфоцитов — одного из важнейших показателей функциональной активности клеток — должны рассматриваться иммунологом в совокупности с другими параметрами иммунного статуса. Необходимо учитывать, что недостаточность функциональной активности иммунокомпетентных клеток при хронических заболеваниях, затяжном течении острых заболеваний указывает на необходимость применения иммуномодуляторов.

Осложнения возможны лишь при неправильной эксплуатации иммуноферментного анализатора, в частности, при ошибочной установке длины волны (во избежание ошибки необходимо проверить фильтр), либо при несоответствии параметров планшета и гнезда в приборе (необходимо предварительно подобрать планшет).

Противопоказаний для применения метода нет.