

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041262**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

- | | |
|--|---|
| <p>(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.09.30</p> <p>(21) Номер заявки
201900160</p> <p>(22) Дата подачи заявки
2019.04.12</p> | <p>(51) Int. Cl. <i>C12N 5/077</i> (2006.01)
<i>C12N 5/0786</i> (2006.01)
<i>C12N 1/20</i> (2006.01)
<i>C12Q 1/04</i> (2006.01)
<i>C12R 1/32</i> (2006.01)</p> |
|--|---|

(54) СПОСОБ МОДЕЛИРОВАНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ IN VITRO

- | | |
|---|---|
| <p>(31) 2018129016/14 (046637)</p> <p>(32) 2018.08.06</p> <p>(33) RU</p> <p>(43) 2020.02.29</p> | <p>(56) RU-C1-2491551
RU-C2-2428484
US-A1-20130040829
WO-A1-2018076404</p> |
|---|---|

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
"НОВОСИБИРСКИЙ НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ТУБЕРКУЛЕЗА"
МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (ФГБУ
"ННИИТ" МИНЗДРАВА РОССИИ)
(RU)**

(72) Изобретатель:
**Белгородцев Сергей Николаевич,
Шварц Яков Шмульевич, Краснов
Владимир Александрович (RU)**

(57) Изобретение относится к экспериментальной медицине, а именно к способам моделирования туберкулезной инфекции *in vitro*. Способ включает в себя получение гранулемоподобных структур из мононуклеарных клеток венозной крови человека или крови спленоцитов экспериментального животного (в том числе с добавлением полученных из костного мозга мезенхимальных стромальных клеток) в присутствии микобактерий туберкулеза, культивируемых в трехмерном матриксе, полученном из аутоплазмы: мононуклеарные клетки крови или спленоциты лабораторного животного суспендируют в аутоплазме в соотношении 1 млн клеток на 1 мл плазм, добавляют в полученную взвесь микобактерии туберкулеза в соотношении возбудитель: клетка от 3:1 до 1:5, к полученной клеточной суспензии добавляют 10% CaCl₂ из расчета 15 мкл на 150 мл клеточной суспензии, проводят интубацию при 37°C, 5% CO₂ и 96% влажности в течение 30 мин после чего добавляют культурную среду и культивируют не менее 24 ч. Способ позволяет избежать использования гетерологичных препаратов, исключая искусственные воздействия на тонкие механизмы взаимодействия клеток иммунной системы *in vitro*, а также избежать использование дорогостоящих коммерческих препаратов и аппаратуры.

B1

041262

041262 B1

Изобретение относится к экспериментальной медицине, а именно к способам моделирования туберкулезной инфекции *in vitro*, и может быть использовано при изучении молекулярных и клеточных механизмов патогенеза туберкулеза, эффективности противотуберкулезных препаратов и прочих лекарственных веществ, влияющих на взаимодействие клеток иммунной системы больного человека с микобактерией туберкулеза.

Отличительной чертой туберкулезного процесса является формирование специфических гранул, представляющих собой хорошо организованные динамичные структуры, основным составляющим компонентом которых являются клетки иммунной системы находящиеся на разной стадии дифференцировки и в разной функциональной активности. Формирование туберкулезной гранулы начинается сразу после инфицирования человека за счет направленной миграции к очагу макрофагов, Т- и В-лимфоцитов, нейтрофилов и прочих клеток преимущественно из периферической крови. В зависимости от выраженности и направленности иммунных реакций в грануле, микобактерия туберкулеза может элиминироваться, приводя к полному выздоровлению, либо длительно персистировать в грануле (так называемая латентная туберкулезная инфекция), либо активироваться, десминировать и вызывать активные формы туберкулеза (1). Микобактерии туберкулеза, находясь внутриклеточно в грануле также претерпевают изменения, часто переходя в дормантное состояние и приобретая антибиотикорезистентность (2). Экспериментальные модели туберкулезной инфекции, основанные на использовании экспериментальных животных, из-за значительного отличия функционирования иммунной системы не способны полностью охватить особенности иммунопатогенеза туберкулеза у человека (3), поэтому перспективным является использование моделей туберкулезной инфекции *in vitro* (1; 4).

Известно несколько способов моделирования трехмерных гранулематозных структур *in vitro*, используемых для изучения взаимодействий микобактерий туберкулеза и клеток макроорганизма. В способе, предложенном К.А. Вікness и соавт. (5), использовались мононуклеарные клетки периферической крови в равных соотношениях с аутологичными макрофагами, к которым добавляли микобактерии туберкулеза. Культивирование клеток проводили на пластике с низкими адгезивными свойствами. В получившихся при этом гранулах часть клеток все равно прилипала к дну культуральной посуды и сформированные структуры носили смешанный двух-трехмерный характер. Причем агрегаты клеток были небольшими по размеру - до 10-15 клеток, а для получения более крупных структур требовалось добавление цитокинов (IL-2, TNF α или IFN γ), что является дополнительным искусственным фактором и искажает протекающие в физиологических условиях процессы. Обязательное использование специального культурального пластика с низкими адгезивными свойствами делает этот метод довольно дорогостоящим.

Известен также способ (6), при котором предлагается использовать агарозный гель, которым предварительно покрывают лунки 96-луночного культурального планшета. Суспензия мононуклеарных клеток в культуральной среде на основе питательной среды RPMI помещается поверх застывшего агарозного геля. Дальнейшее культивирование осуществляется при избегании малейших механических воздействий - условие, которое надо соблюдать и при смене культуральной среды, иначе гранулы не формируются. Выполнить это условие довольно сложно, что делает метод малонадежным. Использование в качестве матрикса линейного полисахарида агарозы нежелательно, так как она взаимодействует с рецепторами на поверхности макрофагов, меняя реактивность этих гранулем-образующих клеток. Кроме того, агароза - довольно дорогой по стоимости субстрат.

Описан способ (7), в котором трехмерные туберкулезные гранулы *in vitro* получали из мононуклеаров периферической крови, используя микрошарики сефарозы, покрытые микобактериальными антигенами, либо инфицированные микобактериями. Недостатком способа является необходимость использования инородного материала и, таким образом, существенные отличия структуры гранул от тех, которые формируются при реальном заболевании.

Наиболее близким к заявленному является способ формирования гранул в коллагеновом матриксе (8), заключающийся в выделении мононуклеарных клеток периферической крови на градиенте плотности фикола с последующим их суспендированием в растворе, состоящем из коллагена 95%, фибронектина 4% и NaOH 1%. При этом для формирования гранулемоподобных структур к 50 мкл раствора добавляется 50000 мононуклеарных клеток, микобактерии туберкулеза добавляются к клеткам в соотношении 1:10. Формирование трехмерной структуры происходит в течение 45 мин при температуре 37°C.

Указанный способ имеет несколько недостатков.

1. В качестве веществ для формирования трехмерного матрикса используются коммерческие препараты коллаген и фибронектин, которые обладают иммуногенными свойствами и могут оказывать влияние на взаимодействие мононуклеарных клеток крови.

2. Технические особенности способа не позволяют использовать объем трехмерной структуры более 50 мкл с 50000 мононуклеарных клеток, что создает неудобства для манипуляций и накопления необходимого материала для исследований.

3. Авторы указывают, что при других соотношениях микобактерий и мононуклеарных клеток, кроме как 1:10, гранулы не формируются.

4. Длительное время формирования матрикса приводит к тому, что большая часть клеток оседает на

дно и не участвует в формировании трехмерной гранулемоподобной структуры.

Предлагаемый способ моделирования туберкулезной инфекции *in vitro* путем получения гранулемоподобных структур из мононуклеарных клеток венозной крови в присутствии микобактерий туберкулеза, культивируемых в трехмерном матриксе, отличающийся тем, что мононуклеарные клетки крови ресуспендируют в аутоплазме крови с добавлением в полученную взвесь микобактерий туберкулеза в соотношении возбудитель:клетка от 3:1 до 1:50, с последующим добавлением 10% CaCl₂ из расчета 15 мкл на 150 мкл клеточной суспензии, что позволяет более полно отобразить особенности иммунопатогенеза туберкулезной инфекции у человека за счет использования аутологичных тканей, расширить возможности использования этой модели в эксперименте, за счет использования более широкого спектра соотношения микобактерия/клетка и привлечения других, участвующих в гранулемогенезе типов клеток, а также отказаться от использования дорогостоящих коммерческих реактивов и специфической аппаратуры. Кроме того, активация факторов свертывания крови наступает сразу после добавления CaCl₂, плазматический сгусток формируется через 10-15 мин, при этом клетки не успевают осесть на дно культурального планшета и оказываются в фибриновой сети, которая, тем не менее, не мешает их направленной миграции. Использование в качестве матрикса аутологичной плазмы исключает искусственные воздействия, связанные с использованием гетерологичных материалов. При использовании указанного способа, мы наблюдали формирование гранул при добавлении микобактерий туберкулеза в соотношении к мононуклеарным клеткам от 3:1 до 1:50, что позволяет существенно расширить решаемые экспериментальные задачи. Еще одним преимуществом заявляемого способа является возможность его осуществления без применения дорогостоящих реактивов, что позволяет широко использовать его в практике научных исследований иммунопатологических механизмов гранулемогенеза при развитии туберкулезного процесса, изучении иммунологических механизмов, регулирующих процессы образования и эволюции гранул при инфекционных гранулематозных воспалительных процессах, при поиске, разработке и изучении новых противотуберкулезных препаратов.

Способ осуществляется следующим образом: проводится забор периферической крови в стерильную одноразовую пробирку с хелатором двухвалентных катионов (ЭДТА или цитрат натрия). Выделение мононуклеарных клеток крови проводится центрифугированием на градиенте плотности, например, с использованием фикола с плотностью 1,077 г/см³. После центрифугирования плазма крови собирается в отдельную пробирку и стерилизуется фильтрованием через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Полученные мононуклеарные клетки дважды отмываются от фикола в культуральной среде или солевом буферном растворе, не содержащем кальция и магния. Далее мононуклеарные клетки ресуспендируются в аутоплазме в соотношении 1 млн клеток на 1 мл плазмы. К суспензии клеток добавляются микобактерии туберкулеза в соотношении микобактерия/клетка от 3:1 до 1:50 в зависимости от задач эксперимента. Суспензия мононуклеарных клеток и микобактерий туберкулеза в аутоплазме перемещается в лунки 96-луночного планшета в объеме 150 мкл. Активация образования плазматического сгустка, содержащего клетки и микобактерии, осуществляется добавлением 10% CaCl₂ в количестве 150 мкл на 1 мл суспензии. Затем планшет инкубируется в течение 30 мин при 37°C, 5% CO₂ и 96% влажности, и далее в лунки добавляется культуральная среда типа IMDM или RPMI-1640 в количестве 100 мкл. Смена среды выполняется через 24 ч и затем каждые 3-4 суток. При этом более 95% клеток сохраняют свою жизнеспособность на сроках 7 и 10 дней. Через 24 ч можно наблюдать формирование трехмерных структур, состоящих из мононуклеарных клеток периферической крови (моноциты, лимфоциты) размерами от 10 до 200 клеток - процесс, в основе которого лежит хемотаксис лимфоцитов к фагоцитировавшим микобактерии туберкулеза моноцитам. При наблюдении в более поздние сроки, клеточные структуры увеличиваются в размерах за счет привлечения новых клеток, моноциты подвергаются дифференцировке в макрофаги и в дальнейшем в эпителиоидные клетки - процесс, во многом напоминающий таковой при развитии туберкулезной инфекции у человека. При окраске нитросиним тетразолием видно, что моноциты-макрофаги, расположенные в толще гранулемы, активируются с образованием активных форм кислорода, сами гранулемы состоят из моноцитов, макрофагов и лимфоцитов без примеси нейтрофилов и эритроцитов. Трехмерные гранулемоподобные структуры формируются также при добавлении к суспензии мононуклеарных клеток крови клеток иного гистогенетического происхождения (мезенхимальные стромальные клетки), лекарственных препаратов (рифампицин), а также при использовании мононуклеарных клеток лабораторного животного (спленоциты мыши).

Пример 1. Вакуумную пробирку DB Vacutainer® CPT™ для выделения моноцитов и лимфоцитов, содержащую цитрат натрия и разделительную систему гель/Ficoll™, заполняют кровью из локтевой вены человека, аккуратно тщательно перемешивают, центрифугируют при 1500g 20 мин, затем плазму, находящуюся над поверхностью полученного мононуклеарного клеточного слоя отбирают пипеткой, переносят в отдельную пробирку и стерилизуют фильтрованием через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, мононуклеары переносят в другую пробирку и отмывают от фикола и плазмы, для чего добавляют 10 мл раствора Хэнкса без ионов кальция и магния, центрифугируют 10 мин при 1500g и супернатант осторожно декантируют; последнюю процедуру повторяют еще раз. Далее подсчитывают число выделенных клеток, ресуспендируют их в плазме в соотношении 1 млн клеток на 1 мл плазмы, к суспензии мононуклеарных

клеток добавляют микобактерии туберкулеза в различных пропорциях микобактерия/клетки - от 3:1 до 1:50, перемешивают и переносят в лунки 96-луночного планшета в объеме по 150 мкл. Затем в лунки раскапывают по 15 мкл 10% раствора кальция хлорида, планшет помещают в CO₂-инкубатор при 37°C и 96% влажности и через 30 мин инкубации в лунки добавляют культуральную питательную среду RPMI-1640 в количестве 100 мкл. Через 24 ч в составе сгустка наблюдаются гранулематозные очаги размером 10-20 клеток в количестве от 10 до 30 гранулем на лунку.

Пример 2. Все процедуры идентичны таковым в примере 1, за исключением того, что суспензию клеток в концентрации 1 млн на 1 мл получают не из мононуклеарных клеток крови человека, а из спленоцитов лабораторной мыши и используют аутоплазму крови. В данном примере, предназначенном для демонстрации возможности формирования гранулем не из мононуклеаров крови, а из сложной смеси мононуклеаров и других клеток лабораторных животных, взвесь спленоцитов получали стандартным методом из селезенки мыши, и кровь - из ретроорбитального синуса. После 24-часовой инкубации в сгустках наблюдали сформированные гранулемы, состоящие из 5-15 клеток в количестве 15-30 гранулем на лунку.

Пример 3. Получают суспензию мононуклеаров в аутоплазме точно так же, как в примере 1, но затем к суспензии мононуклеарных клеток добавляют клетки иного гистогенеза. В данном примере, предназначенном для демонстрации возможности изменения клеточной композиции гранулем, готовили суспензию, состоящую из 750 тыс. мононуклеаров крови и 250 тыс. мезенхимальных стромальных клеток человека костномозгового происхождения, предварительно меченых флуоресцентным красителем CFSE. В результате через 24 ч инкубации в сгустке выявляются гранулемы, состоящие из 10-20 клеток в количестве 10-30 гранулем на лунку, причем в составе гранулем обнаруживаются CFSE-меченые клетки.

Пример 4. Все процедуры идентичны таковым в примере 1, но при смене культуральной среды в лунках планшета с гранулемами добавляли антибактериальный препарат рифампицин. После окончания культивирования через 10 суток при конфокальной микроскопии фиксированного плазматического сгустка наблюдали уменьшение количества микобактерий в гранулемах как вне-, так и внутриклеточно. Уменьшение микобактериальной нагрузки подтвердилось последующими микробиологическими методами при посеве гомогенизированного плазматического сгустка на твердые питательные среды. Аналогично, при смене культуральной среды использовали не рифампицин, а иммуномодулирующий препарат полудан, добавление которого приводило к увеличению клеточности трехмерных гранулемоподобных структур, уменьшению микобактериальной нагрузки.

Способ опробован в экспериментальной лаборатории ФГБУ "Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза" Минздрава России.

Общий объем экспериментальных работ приведен в таблице.

№ п/п	Использованный вариант метода	Количество образцов
1	Формирование трехмерных гранулем с соотношением микобактерия : клетка от 3:1 до 1:50	3 серии по 5-8 образцов
2	Формирование трехмерных гранулем с добавлением мезенхимальных стромальных клеток	3 образца
3	Формирование трехмерных гранулем с исследованием антибактериальной активности рифампицина	5 образцов
4	Формирование трехмерных гранулем из спленоцитов мыши	2 серии по 10-12 образцов

При использовании указанного метода трехмерные гранулемоподобные структуры получали при спектре соотношений микобактерия/клетка от 3:1 до 1:50. Аналогичный результат получали при использовании спленоцитов лабораторной мыши. При добавлении к суспензии мононуклеарных клеток крови мезенхимальных клеток костномозгового происхождения отмечали включение последних в состав гранулем с изменением клеточного состава гранулем и количества в них микобактерий. В серии экспериментов с добавлением антибактериального препарата отмечали изменение клеточности гранулем и микобактериальной нагрузки.

Таким образом, указанный метод позволяет стабильно получать трехмерные туберкулезные гранулемы *in vitro* без использования гетерологичных коммерческих препаратов, что позволяет исключить искусственные воздействия на тонкие механизмы взаимодействия клеток иммунной системы *in vitro*. Технологические особенности формирования трехмерного матрикса из аутоплазмы позволяют формировать плазматический сгусток объемом до 200 мкл, что в совокупности с более широким спектром соотношений клетка/микобактерия позволяет расширять спектр решаемых экспериментальных задач, в частности добавлять к клеточной суспензии клетки иного генеза, изучать эффективность и механизмы действия антибактериальных и иммуномодулирующих препаратов. Сокращение времени формирования трехмерного матрикса с 40 до 10-15 мин приводит к тому, что большая часть клеток остается в суспензии и

сформированные гранулемы носят характер истинных трехмерных структур. Отказ от дорогостоящих коммерческих реактивов также позволяет широко использовать его в практике научных исследований иммунопатологических механизмов гранулемогенеза при развитии туберкулезного процесса, изучении иммунологических механизмов, регулирующих процессы образования и эволюции гранул при инфекционных гранулематозных воспалительных процессах, при поиске, разработке и изучении новых противотуберкулезных препаратов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ моделирования туберкулезной инфекции *in vitro* путем получения гранулемоподобных структур из мононуклеарных клеток венозной крови или спленоцитов лабораторного животного в присутствии микобактерий туберкулеза, культивируемых в трехмерном матриксе, отличающийся тем, что мононуклеарные клетки крови или спленоциты лабораторного животного суспендируют в аутоплазме в соотношении 1 млн клеток на 1 мл плазмы, добавляют в полученную взвесь микобактерии туберкулеза в соотношении возбудитель:клетка от 3:1 до 1:50, к полученной клеточной суспензии добавляют 10% раствор CaCl_2 из расчета 15 мкл на 150 мкл клеточной суспензии, проводят инкубацию при 37°C, 5% CO_2 и 96% влажности в течение 30 мин, после чего добавляют культуральную среду и осуществляют культивирование в течение не менее 24 ч.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что к суспензии мононуклеарных клеток или спленоцитов добавляют полученные из костного мозга мезенхимальные стромальные клетки.

