



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/48 (2022.01); C12N 5/0611 (2022.01); C12N 5/0646 (2022.01)

(21)(22) Заявка: 2021120799, 13.07.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
13.07.2021Дата регистрации:  
24.03.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 13.07.2021

(45) Опубликовано: 24.03.2022 Бюл. № 9

Адрес для переписки:

199034, Санкт-Петербург, Менделеевская  
линия, 3, ФГБНУ "НИИ АГиР им. Д.О. Отта",  
научная часть

(72) Автор(ы):

Михайлова Валентина Анатольевна (RU),  
Давыдова Алина Алексеевна (RU),  
Баженов Дмитрий Олегович (RU),  
Загайнова Валерия Алексеевна (RU),  
Коган Игорь Юрьевич (RU),  
Беспалова Олеся Николаевна (RU),  
Гзгзян Александр Мкртичевич (RU),  
Соколов Дмитрий Игоревич (RU),  
Сельков Сергей Алексеевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
научное учреждение  
"Научно-исследовательский институт  
акушерства, гинекологии и репродуктологии  
им. Д.О. Отта" (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: RU 2548754 C1, 20.04.2015.АГНАЕВА А.О. и др. Роль естественных  
киллеров (НК-клеток) в репродуктивных  
потерях. Журнал акушерства и женских  
болезней. 2017; 66(3): 143-156. ПЛУЖНИКОВА  
Т.А. и др. Опыт применения иммуноглобулина  
для внутривенного введения у беременных с  
невынашиванием и хроническим  
эндометритом. Журнал акушерства и женских  
болезней. (см. прод.)

(54) СПОСОБ ОЦЕНКИ ЦИТОПРОТЕКТИВНОГО ЭФФЕКТА ПРЕПАРАТОВ  
ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ДЛЯ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОК  
ТРОФОБЛАСТА В УСЛОВИЯХ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ЕСТЕСТВЕННЫМИ КИЛЛЕРАМИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины. Предложен способ оценки цитопротективного эффекта (ЦПЭ) препаратов иммуноглобулинов для внутривенного введения (ВВИГ) в отношении клеток трофобласта в условиях их взаимодействия с естественными киллерами. Используют культуру клеток трофобласта, часть из которых инкубируют без мононуклеаров, часть - в

присутствии монокулеаров и часть - в присутствии препарата ВВИГ в концентрации 6 мг/мл. Определяют количество нежизнеспособных клеток трофобласта. Рассчитывают коэффициент цитопротективного эффекта препаратов ВВИГ в отношении клеток трофобласта. При ЦПЭ <1 прогнозируют положительный цитопротективный эффект. При

ЦПЭ  $\geq 1$  цитопротективный эффект отсутствует.  
Изобретение позволяет оценить эффективность  
ЦПЭ препарата ВВИГ в отношении клеток

трофобласта в условиях *in vitro* в присутствии НК-  
клеток периферической крови. 4 ил., 2 табл., 2 пр.

(56) (продолжение):

2018; 67(5): 21-31. СЕРПАНОВ S. et al. Experimental rationale for the endothelial protective effect of intravenous immunoglobulins in obstetric disease. *Akusherstvo i Ginekologiya*. 2016 May; 5: 82-88.

R U 2 7 6 8 4 6 1 C 1

R U 2 7 6 8 4 6 1 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*G01N 33/48* (2006.01)  
*C12N 5/073* (2010.01)  
*C12N 5/0783* (2010.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*G01N 33/48 (2022.01); C12N 5/0611 (2022.01); C12N 5/0646 (2022.01)*(21)(22) Application: **2021120799, 13.07.2021**(24) Effective date for property rights:  
**13.07.2021**Registration date:  
**24.03.2022**

Priority:

(22) Date of filing: **13.07.2021**(45) Date of publication: **24.03.2022 Bull. № 9**

Mail address:

199034, Sankt-Peterburg, Mendeleevskaya liniya,  
3, FGBNU "NII AGiR im. D.O. Otta", nauchnaya  
chast

(72) Inventor(s):

**Mikhajlova Valentina Anatolevna (RU),  
Davydova Alina Alekseevna (RU),  
Bazhenov Dmitrij Olegovich (RU),  
Zagajnova Valeriya Alekseevna (RU),  
Kogan Igor Yurevich (RU),  
Bespalova Olesya Nikolaevna (RU),  
Gzgzyan Aleksandr Mkrtichevich (RU),  
Sokolov Dmitrij Igorevich (RU),  
Selkov Sergej Alekseevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe  
nauchnoe uchrezhdenie  
"Nauchno-issledovatel'skij institut akusherstva.  
ginekologii i reproduktologii im. D.O. Otta" (RU)**

(54) **METHOD FOR ASSESSING THE CYTOPROTECTIVE EFFECT OF IMMUNOGLOBULIN PREPARATIONS FOR INTRAVENOUS INTRODUCTION ON TROPHOBLAST CELLS UNDER CONDITIONS OF THEIR INTERACTION WITH NATURAL KILLERS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to the field of medicine. A method for evaluating the cytoprotective effect (CPE) of intravenous immunoglobulin preparations (IVIGP) against trophoblast cells under conditions of their interaction with natural killers is proposed. A culture of trophoblast cells is used, some of which are incubated without mononuclear cells, some in the presence of monoclonals, and some in the presence of IVIGP preparation at a concentration of 6 mg/ml. The number of non-viable trophoblast cells is

determined. The coefficient of the cytoprotective effect of IVIGP preparations in relation to trophoblast cells is calculated. With CPE <1, a positive cytoprotective effect is predicted. With CPE ≥1, there is no cytoprotective effect.

EFFECT: invention allows evaluating the effectiveness of CPE of IVIGP preparation in relation to trophoblast cells in vitro in the presence of peripheral blood NK cells.

1 cl, 4 dwg, 2 tbl, 2 ex

Изобретение относится к области медицины, и может быть использовано для оценки цитопротективного эффекта препаратов в отношении клеток трофобласта в условиях их взаимодействия с естественными киллерами.

5 Исследование функционального статуса естественных киллеров (NK-клеток) при бесплодии позволило установить повышение количества NK-клеток с фенотипом CD56dim у женщин с бесплодием по сравнению со здоровыми фертильными небеременными женщинами [1]. Потенциальными клетками-мишенями NK-клеток при бесплодии являются клетки трофэктодермы, дифференцирующиеся в клетки трофобласта.

10 Для увеличения вероятности имплантации бластоцисты при бесплодии в циклах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) применяют различные варианты иммунотерапии, в том числе глюкокортикоиды (например, преднизолон) и иммуноглобулины для внутривенного введения (ВВИГ) [2]. Показано, что *in vitro* преднизолон подавлял цитотоксическую активность NK-клеток периферической крови 15 женщин с бесплодием [3]. Однако, использование глюкокортикоидов в настоящее время оспаривается из-за сопутствующих побочных эффектов и возможного системного влияния [4]. Показано, что применение препаратов ВВИГ на прегравидарном этапе и в первом триместре беременности в цикле вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) увеличивает вероятность успешной имплантации эмбриона [4-6]. Актуальным 20 является решение вопроса об оценке потенциального эффекта препаратов ВВИГ в отношении клеток трофобласта в условиях их взаимодействия с NK-клетками.

Известен способ (прототип) прогнозирования цитопротективного эффекта ВВИГ при терапии женщин с привычным невынашиванием беременности и диагностированным антифосфолипидным синдромом (Патент №2548754) [7], в котором оценивают 25 цитопатическое действие сывороток периферической крови у пациенток и коррекцию этого эффекта с помощью препаратов ВВИГ. В качестве клеток, в отношении которых оценивают эффект препаратов ВВИГ, используют эндотелиальные клетки. Учет гибели клеток производится при помощи метода проточной цитофлюориметрии, позволяющем проанализировать большое количество клеток.

30 Недостаток способа заключается в отсутствии конкретных клеток-эффекторов, реализующих цитотоксические эффекты (NK-клеток), что в значительной степени снижает оценку специфичности метода. Кроме того, недостатком способа является отсутствие использования клеток трофобласта, как потенциальных мишеней для NK-клеток в процессе внедрения бластоцисты в стенку матки.

35 Патент №2632109 [8] дает подробное описание способа определения цитотоксической активности NK-клеток в отношении клеток трофобласта линии Jeg-3, которые используются в качестве клеток-мишеней для естественных киллеров.

Недостатком способа является отсутствие оценки влияния препаратов, используемых в терапии репродуктивных потерь, на предлагаемую систему клеточных взаимодействий, 40 что существенно ограничивает его использование в клинической практике для прогнозирования эффективности терапии.

В научных и патентных источниках не обнаружено способов оценки потенциального цитопротективного эффекта препаратов в отношении клеток трофобласта в условиях их взаимодействия с естественными киллерами.

45 Техническим результатом изобретения является создание способа, позволяющего оценить эффективность цитопротективного эффекта препарата ВВИГ в отношении клеток трофобласта, в условиях *in vitro* в присутствии NK-клеток периферической крови.

Указанный технический результат достигается в способе оценки цитопротективного

эффекта препаратов ВВИГ в отношении клеток трофобласта в условиях их взаимодействия с естественными киллерами, в котором используют культуру клеток трофобласта, часть из которых инкубируют без мононуклеаров, часть - в присутствии только мононуклеаров периферической крови и часть - в присутствии мононуклеаров периферической крови и препарата ВВИГ в концентрации 6 мг/мл, после чего определяют количество нежизнеспособных клеток трофобласта и рассчитывают коэффициент цитопротективного эффекта препаратов ВВИГ в отношении клеток трофобласта по формуле:

$$\text{ЦПЭ} = [(X2) / (X1)], \text{ где}$$

X1 - разность количества нежизнеспособных клеток трофобласта, инкубированных с мононуклеарами периферической крови и инкубированных без мононуклеаров;

X2 - разность количества нежизнеспособных клеток трофобласта, инкубированных с мононуклеарами периферической крови и препаратом ВВИГ и инкубированных без мононуклеаров;

при ЦПЭ <1 прогнозируют положительный цитопротективный эффект.

Исследование, на котором основано изобретение, включало три этапа.

На первом этапе проводили оценку возможного токсического действия препарата ВВИГ в отношении НК-клеток. На втором этапе исследования оценивали влияние препарата ВВИГ в системе контактного взаимодействия НК-клеток линии NK-92 и клеток трофобласта. На третьем этапе работы проводили оценку влияния препарата ВВИГ на клетки трофобласта в случае контактных взаимодействий с НК-клетками периферической крови небеременных женщин. Полученные данные статистически обработаны с помощью программы GraphPadPrism8. Для сравнения полученных данных использовали критерий Краскела - Уоллиса, являющийся непараметрическим критерием для множественных сравнений. Статистически значимыми признавались различия при  $p < 0,05$ .

На первом этапе исследования были использованы НК-клетки линии NK-92, полученные из костного мозга человека со злокачественной неходжкинской лимфомой. Клеточная линия NK-92 воспроизводит все основные морфологические, фенотипические и функциональные характеристики, присущие НК-клеткам периферической крови.

Для культивирования клеток линии NK-92 используют  $\alpha$ -модификацию среды MEM («Альфа-МЕМ», Биолот, Россия) с добавлением 12,5% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 12,5% инактивированной лошадиной сыворотки, 100 мкг/мл стрептомицина, 100 ед/мл пенициллина, 2 мМ L-глутамин, 0,2 мМ миоинозитола, 0,02 мМ фолиевой кислоты, 20 мМ буфера HEPES, 0,1 мМ меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich, США), 500 U/ml IL-2 («Ронколейкин», Биотех, Россия). Клетки прокультивировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> во влажной атмосфере. В работе использовали препарат внутривенных иммуноглобулинов («Интралект», Biotest, Германия).

Клетки линии NK-92 были помещены в круглодонные 96-луночные планшеты для суспензионных культур (Sarstedt, Германия) и осаждены с помощью центрифугирования (100 g, 10 мин, 22°C), после чего надосадочная жидкость была удалена. Затем к клеткам добавляли препарат ВВИГ, разведенный в культуральной среде в различных концентрациях. К части клеток была добавлена культуральная среда без препаратов для определения спонтанной (базовой) гибели НК-клеток.

Клетки инкубировали в планшетах в течение 24 часов при 37°C, CO<sub>2</sub> 5% во влажной атмосфере. Затем к клеткам добавляли раствор пропидия йодида (Sigma-Aldrich, США), используемого для оценки количества клеточной гибели. Оценка проводилась с помощью проточного цитофлуориметра FACSCanto II (BD, США).

Препарат ВВИГ оказывал токсическое действие на НК-клетки в концентрации 24 мг/мл (Табл. 1). В более низких концентрациях, начиная с 12 мг/мл, гибель клеток НК-92 не отличалась от базовой. На основании полученных данных для экспериментов по оценке влияния препаратов в кокультуре НК-клеток линии НК-92 и клеток трофобласта использовали меньшие концентрации по сравнению с токсическими.

Таблица 1

Концентрация препарата ВВИГ	Гибель клеток линии НК-92 (%)
25 мг/мл	26,80 {24,9; 54,8}***
12,5 мг/мл	17,60 {13,4; 37,6}
6,25 мг/мл	14,50 {11,9; 34,4}
3,125 мг/мл	14,50 {11,40; 33,20}
1,6 мг/мл	13,75 {10,80; 22,35}
0,8 мг/мл	13,80 {10,9; 25,20}
0,4 мг/мл	13,60 {9,70; 21,70}
0,2 мг/мл	14,20 {10,40; 22,60}
0 мг/мл	17,00 {9,90; 22,15}
Контроль (гибель клеток без препарата ВВИГ)	12,5 {9,2; 25,4}

\*\*\* - гибель НК-клеток в присутствии препарата ВВИГ отличается от гибели НК-клеток, проинкубированных без препаратов ( $p < 0,001$ ).

На втором этапе работы в качестве клеток-эффекторов также использовали клетки линии НК-92. В качестве клеток-мишеней использовали клетки трофобласта линии Jeg-3, которые представляют собой клетки инвазивного вневорсинчатого трофобласта первого триместра беременности. В силу экспрессии специфичных для клеток трофобласта поверхностных рецепторов и секреции цитокинов клетки линии Jeg-3 позволяют моделировать *in vitro* клеточные взаимодействия, происходящие при беременности. Специфичность клеток линии Jeg-3, обусловленная их профилем экспрессии, позволяет использовать эти клетки для оценки функциональных взаимодействий при патологиях беременности. Для использования в модельной системе первичных клеток трофобласта необходимо провести их выделение из материала биопсии, затем прокультивировать для получения необходимого количества клеток. Процедура получения биопсии инвазивна для пациента, а процесс выделения клеток трудоемок и не позволяет получить достаточное количество материала для анализа. По сравнению с первичными клетками трофобласта клетки линии Jeg-3 являются более стабильными, что позволяет стандартизовать методики оценки взаимодействия клеток трофобласта с другими клеточными популяциями.

За сутки до эксперимента пересевали клетки линии JEG-3, используя флаконы для адгезионных клеточных культур площадью 75 см<sup>2</sup> (BD, США), в концентрации  $3 \times 10^6$  клеток в 10 мл. Через 24 часа клетки обрабатывали раствором CFSE (Sigma-Aldrich, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Затем проводили дезинтеграцию монослоя обработанных CFSE клеток трофобласта с помощью смеси растворов версена и трипсина (3:1) (Biolog, Россия) и помещали клетки в лунки круглодонного 96-луночного планшета (BD, США) по 30.000 клеток линии JEG-3 в 50 мкл среды DMEM. В эти же лунки добавляли клетки линии НК-92 в 100 мкл, в соотношении эффектор:мишень 5:1. Затем к клеткам добавляли препарат ВВИГ, разведенные в культуральной среде в

концентрациях: 6мг/мл, 1,5 мг/мл, 0,375 мг/мл, 0,009375 мг/мл. К части клеток была добавлена культуральная среда без препаратов для определения гибели клеток трофобласта в присутствии НК-клеток, также в каждом эксперименте проводили оценку гибели клеток линии Jeg-3, прокультивированных без НК-клеток и препаратов (базовая гибель). Затем планшет центрифугировали 3 минуты 100 g, после чего инкубировали 4 часа (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). После инкубации клетки обрабатывали в течение 10 минут 2 мкг/мл раствором пропидия иодида (Sigma-Aldrich, США) при 4°C. Анализ флуоресценции проводили с помощью проточного цитофлуориметра FacsCantoII (BD, США).

Установлено, что в присутствии препарата ВВИГ в концентрациях 6мг/мл и 1,5 мг/мл относительная гибель клеток трофобласта в результате цитотоксической активности клеток линии НК-92 была снижена по сравнению с гибелью клеток трофобласта, прокультивированных только с НК-клетками. Более того, в присутствии препарата ВВИГ в концентрации 6мг/мл гибель клеток трофобласта была сопоставима с базовой гибелью клеток трофобласта (Фи. 1). Различий в гибели клеток линии Jeg-3 в присутствии НК-клеток между условиями культивирования с препаратом ВВИГ в разных концентрациях выявлено не было. В связи с этим, в экспериментах с мононуклеарами периферической крови использовали такие же концентрации препаратов ВВИГ.

На третьем этапе работы проведена оценка цитопротективного влияния препарата ВВИГ в отношении клеток трофобласта линии Jeg-3 в условиях взаимодействия с НК-клетками фракции мононуклеаров периферической крови. Сформировано две группы обследуемых: здоровые небеременные женщины репродуктивного возраста с регулярным менструальным циклом без предшествующих беременностей (Группа 1, n=10) и здоровые небеременные женщины репродуктивного возраста с регулярным менструальным циклом, у которых ранее были беременности, закончившиеся родами в срок, и в анамнезе отсутствуют неразвивающиеся беременности и/или самопроизвольные выкидыши фертильные (Группа 2, n=12). Периферическую кровь собирали в секреторной фазе менструального цикла после УЗИ-контроля прохождения овуляции.

Критериями исключения для обеих групп были установленный диагноз антифосфолипидный синдром, наружный генитальный эндометриоз 3-4 стадии, аномалии развития половых органов, острые и обострения хронических заболеваний, ожирение 2-3 степени, наследственная форма тромбофилии высокого риска, сахарный диабет 1 и 2 типов, гестационный сахарный диабет на инсулинотерапии, гормональная терапия, в том числе комбинированные оральные контрацептивы, многоплодная беременность, отказ женщины от участия в программе исследования.

Для анализа цитотоксической активности выделены мононуклеары, содержащие НК-клетки, с помощью стандартного метода центрифугирования в градиенте плотности из периферической крови. Клетки линии Jeg-3 обрабатывали раствором CFSE и помещали в лунки планшета в концентрации 30.000 клеток в 50 мкл среды DMEM. Затем в часть лунок добавляли суспензию мононуклеаров в среде DMEM в концентрации 300000 клеток в 50 мкл. Для исследования цитотоксической активности НК-клеток фракции мононуклеаров использовали соотношение эффектор: мишень 1:10, согласно описанному [9] и запатентованному ранее протоколу [8]. В лунки, содержащие НК-клетки и клетки трофобласта, вносили препарат ВВИГ в концентрациях 6 мг/мл, 1,5 мг/мл, 0,375 мг/мл, 0,009375 мг/мл. Дополнительно было проанализировано влияние ВВИГ в концентрации 12 мг/мл на гибель клеток трофобласта в присутствии НК-клеток фракции мононуклеаров, так как на первом этапе исследования было установлено, что данная концентрация не токсична для клеток. Часть лунок с клетками линии Jeg-3

инкубировали без добавления моноклеаров периферической крови и без препаратов ВВИГ для определения уровня базовой гибели клеток трофобласта. Часть лунок с клетками линии Jeg-3 инкубировали также без добавления моноклеаров НК-клеток, но в присутствии препаратов ВВИГ для определения влияния этих препаратов на жизнеспособность клеток трофобласта. Затем клетки инкубировали в течение 4 часов (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). После инкубации суспензию клеток обрабатывали раствором пропидия иодида и анализировали гибель клеток трофобласта с помощью проточного цитофлуориметра FacsCantoII (BD, США).

Установлено, что в присутствии моноклеаров периферической крови женщин как группы 1, так и группы 2 гибель клеток трофобласта была выше, чем базовая гибель. После инкубации клеток трофобласта с моноклеарами периферической крови женщин 1 группы и препаратом ВВИГ в концентрациях 6 мг/мл, 1,5 мг/мл, 0,375 мг/мл, 0,09 г/мл гибель клеток трофобласта была повышена по сравнению с базовой гибелью. В присутствии моноклеаров женщин 1 группы и препарата ВВИГ в концентрациях 12 мг/мл и 6 мг/мл гибель клеток трофобласта была ниже, чем гибель клеток трофобласта в присутствии моноклеаров, но без добавления препарата. В случае инкубации клеток трофобласта и НК-клеток в составе фракции моноклеаров женщин 1 группы в присутствии препарата ВВИГ в концентрации 12 мг/мл гибель клеток трофобласта не отличалась от базовой (Фиг. 2а).

После инкубации клеток трофобласта с моноклеарами периферической крови женщин 2 группы и препаратом ВВИГ гибель клеток трофобласта была повышена по сравнению с базовой гибелью в случае использования концентраций ВВИГ 1,5 мг/мл, 0,375 мг/мл, 0,09 г/мл. В присутствии моноклеаров женщин 2 группы и препарата ВВИГ в концентрациях 12 мг/мл, 6 мг/мл и 1,5 мг/мл гибель клеток трофобласта была ниже, чем гибель клеток трофобласта в присутствии моноклеаров, но без добавления препарата. Более того, в случае инкубации клеток трофобласта и НК-клеток в составе фракции моноклеаров в присутствии препарата ВВИГ в концентрации 12 мг/мл и 6 мг/мл гибель клеток трофобласта не отличалась от базовой. При сравнении влияния разных концентраций препарата ВВИГ в используемой модельной системе установлено, что гибель клеток трофобласта в присутствии моноклеаров была выше в случае использования концентрации 6 мг/мл по сравнению с концентрацией 12 мг/мл. Различий влияния препарата ВВИГ в концентрации 6 мг/мл и 1,5 мг/мл на гибель клеток трофобласта в присутствии моноклеаров не выявлено, в тоже время при использовании концентрации 0,375 мг/мл гибель клеток трофобласта была выше, чем при использовании концентрации 1,5 мг/мл (Фиг. 2б).

Таким образом, в случае использования моноклеаров периферической крови здоровых небеременных женщин без предшествовавших беременностей и родов (группа 1) цитопротективный эффект ВВИГ в отношении клеток трофобласта наблюдался только при использовании концентраций препарата 12 мг/мл и 6 мг/мл. Моноклеары периферической крови здоровых небеременных фертильных женщин (группа 2) демонстрировали снижение цитотоксической активности к клеткам трофобласта в случае применения ВВИГ в концентрациях 12 мг/мл, 6 мг/мл и 1,5 мг/мл. Таким образом, целесообразно оценивать эффект препаратов ВВИГ в отношении коррекции цитотоксической активности НК-клеток периферической крови в концентрациях 12 мг/мл, 6 мг/мл и 1,5 мг/мл. Способ иллюстрируется фиг. 1-4, где:

На фиг. 1 представлен график изменения цитотоксической активности клеток линии НК-92 в отношении клеток трофобласта линии JEG-3 в присутствии препаратов ВВИГ в различных концентрациях. Гибель клеток линии JEG-3 отличается от базовой гибели

(без НК-клеток и препаратов ВВИГ):  $\bullet\bullet$ - $p < 0,01$ ,  $\bullet\bullet\bullet$ - $p < 0,001$ . Достоверность различий:  $\bullet\bullet$ - $p < 0,05$ ,  $\bullet\bullet$ - $p < 0,01$ ; ns - различия не достоверны.

На фиг. 2 представлен график изменения цитотоксической активности НК-клеток периферической крови в составе фракции мононуклеаров небеременных женщин (а) и фертильных небеременных женщин (б) в отношении клеток трофобласта линии JEG-3 в присутствии препаратов ВВИГ в различных концентрациях. Гибель клеток линии JEG-3 отличается от базовой гибели (без НК-клеток и препаратов ВВИГ):  $\bullet\bullet\bullet$ - $p < 0,001$ . Достоверность различий:  $\bullet$ - $p < 0,05$ ,  $\bullet\bullet$ - $p < 0,01$ ,  $\bullet\bullet\bullet$ - $p < 0,001$ ; ns - различия не достоверны.

На фиг. 3 представлен способ оценки гибели клеток трофобласта в случае культивирования без мононуклеаров периферической крови и препаратов ВВИГ методом проточной цитофлуориметрии. а) Двумерная гистограмма распределения клеток трофобласта в координатах FSC-SSC. Регион Cells содержит клетки трофобласта. б) Двумерная гистограмма с координатами FSC-FITC, на которую отражены клетки из региона Cells. Регион Jег + CFSE содержит клетки трофобласта. в) Двумерная гистограмма распределения клеток трофобласта в координатах FSC-PE. Квадрант DEAD CELLS содержит нежизнеспособные клетки трофобласта.

На фиг. 4 представлен способ оценки гибели клеток трофобласта в случае культивирования в присутствии мононуклеаров периферической крови и препаратов ВВИГ методом проточной цитофлуориметрии. а) Двумерная гистограмма распределения клеток трофобласта в координатах FSC-SSC. Регион Cells содержит клетки трофобласта. б) Двумерная гистограмма с координатами FSC-FITC, на которую отражены клетки из региона Cells. Регион Jег + CFSE содержит клетки трофобласта. в-г) Двумерные гистограммы распределения клеток трофобласта в координатах FSC-PE. Квадрант DEAD CELLS содержит нежизнеспособные клетки трофобласта. Клетки трофобласта прокультивированы в присутствии мононуклеаров периферической крови (в) и в присутствии мононуклеаров периферической крови и препаратов ВВИГ (г).

Способ осуществляют, например, следующим образом: Для оценки цитопротективного эффекта препаратов ВВИГ в отношении клеток трофобласта используют клетки трофобласта линии Jег-3 и мононуклеары периферической крови пациентки, которой планируется проводить лечение с использованием указанного препарата. Порядок исследования.

#### 1. Подготовка рабочих растворов.

1.1. Культуральная среда DMEM с добавлением 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамина, 10 мМ пирувата натрия (полная культуральная среда).

1.2. Раствор Версена стерильный.

1.3. Раствор Трипсина стерильный.

1.4. Раствор для культуральных работ ХЕПЕС

1.5 Раствор градиента плотности фиколл-верографин.

1.6 Раствор Хенкса стерильный.

1.7 Раствор пропидия иодида 1 мкг/мл, приготовленный на PBS.

#### 2. Подготовка необходимых материалов.

2.1. Эппендорфы 0,6 мл, стерильные, с крышкой, прозрачные.

2.2. Флакон для культивирования адгезивных культур с вентилируемой синей крышкой 75 см<sup>2</sup>.

2.3. Камера Горяева, покровное стекло

2.4 Стерильные наконечники на 5 мл, 10 мкл, 300 мкл, 1000 мкл

2.5 Конические стерильные пробирки объемом 15 мл, 50 мл.

3. Подготовка необходимого оборудования:

3.1 Вертикальный ламинарно-поточный шкаф.

3.2 Набор механических дозаторов переменного объема.

5 3.3 Центрифуга.

3.4 Термостат.

3.5 Вортекс.

3.6 Холодильник  $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

3.7 CO<sub>2</sub> инкубатор.

10 3.8 Проточный цитофлюориметр оборудованный 488 нм лазером, датчиками прямого и прямого светорассеяния, датчиками учета флюоресценции FITC (519 нм), PE (578 нм).

II. Культивирование клеток трофобласта линии Jeg-3.

1. До начала процедуры прогреть стерильные контейнеры со средой для культивирования клеток трофобласта, со стерильным раствором Трипсина и стерильным  
15 раствором Версена при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ .

2. Все необходимые материалы, перечисленные в пункте 2 раздела I внести стерильно в вертикальный ламинарно-поточный шкаф для работы с клеточными культурами.

3. Смешать стерильно раствор Трипсина с раствором Версена (ТВ), содержащий равные части раствора Трипсина и раствора Версена.

20 4. Аккуратно слить через край среду из матраса. На противоположную стенку без клеток добавить 5 мл раствора ТВ для дезинтеграции монослоя, через 10 секунд и слить раствор. Повторить процедуру дважды, инкубировать с раствором ТВ последовательно 20 и 30 секунд. Слить раствор через край, затем добавить две капли раствора ТВ. Закрыть крышку флакона. Покачивать флакон в течение 5 минут так, чтобы клетки  
25 все время омывались раствором. Похлопать флакон по бокам, чтобы снять клетки со стенок флакона.

5. Добавить 5 мл ранее приготовленной среды для клеток трофобласта во флакон  $75\text{ см}^2$ .

30 6. Тщательно ресуспендировать. Перенести 700 мкл среды с клетками в новый флакон  $75\text{ см}^2$  и долить в него 10 мл среды для культивирования.

7. Культивировать клеточную культуру во влажной атмосфере с 7% CO<sub>2</sub> при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 72 часов или до образования клетками 50% монослоя.

III. Выделение мононуклеаров из периферической крови.

35 1. Все необходимые материалы, перечисленные в пункте 2 раздела I, внести стерильно в вертикальный ламинарно-поточный шкаф для работы с клеточными культурами.

2. Подогреть раствор Хенкса и раствор градиента плотности в термостате  $37^{\circ}\text{C}$ .

3. Подписать и внести в ламинар (из расчета на анализ одного пациента): 1 пробирку на 50 мл, 6 пробирок на 15 мл.

40 4. Внести в пробирки на 15 мл по 3 мл раствора градиента. В пробирки на 50 мл внести по 16 мл Хенкса, в пробирки для отмывки мононуклеаров внести по 10 мл раствора Хенкса.

5. Смешать 8 мл периферической крови с теплым раствором Хенкса в соотношении 1:2.

45 6. Дозатором на 1 мл аккуратно наложить разведенную периферическую кровь на раствор градиента из расчета на 4 мл градиента по 6 мл разведенной крови.

7. Центрифугировать 400g в течение 40 мин при  $22^{\circ}\text{C}$ .

8. Стерильно внести пробирки в ламинарно-поточный шкаф. Отобрать 4-5 мл плазмы пипеткой на 1 мл и слить ее. Собрать мононуклеары.

9. Перенести моноклеары в пробирку с 10 мл раствора Хенкса.

10. Центрифугировать 200g в течение 10 мин при 22°C.

11. Аккуратно слить надосадочную жидкость, добавить к моноклеарам 3 мл раствора Хенкса, ресуспендировать.

5 12. Посчитать концентрацию моноклеаров в камере Горяева. Добавить 10 мл раствора Хенкса.

13. Центрифугировать 350 g в течение 10 мин при 22°C.

14. Аккуратно слить надосадочную жидкость. Развести клетки в культуральной среде на основе DMEM до концентрации 6 млн/мл.

10 15. Перенести клетки в эппендорфы.

16. Инкубировать в течение 96 часов при 37°C во влажной атмосфере и 5% CO<sub>2</sub>.

IV. Проведение эксперимента.

1. Подогреть культуральную среду DMEM, полную культуральную среду для клеток трофобласта линии JEG-3, раствор ТВ в термостате 37°C.

15 2. Все необходимые материалы, перечисленные в пункте 2 раздела I, внести стерильно в вертикальный ламинарно-поточный шкаф для работы с клеточными культурами.

3. Приготовить раствор CFSE, для этого в 1 пробирку теплого DMEM добавить 8 мкл CFSE (стоковый раствор: 4,48 ммоль/л) и ресуспендировать.

4. Аккуратно слить среду из флакона для культивирования с клетками трофобласта, добавить 5 мл стерильного раствора, внести раствор красителя CFSE.

20 5. Инкубировать в течение 10 мин при 37°C, 7% CO<sub>2</sub>.

6. Слить раствор красителя, внести 10 мл холодной культуральной среды для JEG-3 без ЭТС. не касаясь стенки с клетками. Закрыть матрас, покачать 3 раза, слить среду. Повторить процедуру еще 1 раз.

25 7. Слить раствор культуральной среды.

8. Добавить во флакон для культивирования клеток трофобласта 5 мл стерильного раствора ТВ, чтобы дезинтегрировать монослой клеток. Подождать 30 секунд, аккуратно потрясти флакон и слить раствор ТВ. Повторить операцию 2 раза, затем добавить две капли раствора ТВ. Закрыть крышку флакона. Покачивать флакон в течение 5 минут так, чтобы клетки все время омывались раствором. Похлопать флакон по бокам, чтобы снять клетки со стенок флакона.

9. Внести 2 мл теплой среды для клеток трофобласта. Посчитать концентрацию клеток в камере Горяева. Развести клетки в культуральной среде до концентрации 0,6 млн/мл.

35 10. Стерильно внести в лунки планшета (табл. 2) согласно схеме (на 1 человека: РВМС- моноклеары, Jeg - клетки трофобласта линии Jeg-3) по 50 мкл Jeg-3 (30000 кл.) + 50 мкл моноклеаров (300000 кл.) В соответствующие лунки внести препарат ВВИГ в концентрации 6 мг/мл. Все варианты заполнения лунок проводить в 4 повторностях.

40

45

Таблица 2

Планшет круглодонный 96-луночный												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	//////											
B		Jeg	Jeg	Jeg	Jeg							
C		Jeg + PBMC	Jeg + PBMC	Jeg + PBMC	Jeg + PBMC							
D		Jeg+ PBMC ВВИГ 6 мг/мл	Jeg+PBMC ВВИГ 6 мг/мл	Jeg+PBMC ВВИГ 6 мг/мл	Jeg+PBMC ВВИГ 6 мг/мл							
E												
F												
G												
H	//////											

1. Центрифугировать планшет 2 мин 100 g 22°C.
2. Инкубировать пробы в течение 4 часов в инкубаторе при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.
3. Обработать пробы красителем пропидия иодида. Конечная концентрация пропидия иодида должна составлять 2 мкг/мл. Оставить неокрашенной 1 пробу с клетками JEG-3.

4. Инкубировать пробы 20 минут при 4°C.
  5. Добавить в пробы по 300 мкл стандартного фосфатно-солевого буфера.
- V. Проведение анализа и учет результатов.

Анализ клеток проводят на проточном цитофлуориметре, укомплектованном 488 нм лазером, по четырем параметрам: интенсивности прямого и бокового светорассеяния, флуоресценции по каналу FITC (спектр поглощения 488 нм, спектр эмиссии 519 нм), флуоресценции по каналу PE (спектр поглощения 488 нм, спектр эмиссии 578 нм). Анализируется 10000 событий. На двумерной гистограмме с координатами FSC-SSC выделяют регион Cells, содержащий клетки трофобласта (фиг. 3а). Клетки из региона Cells проецируют на двумерную гистограмму с координатами FSC-FITC (фиг. 3б). Определяют количество событий в квадранте Jeg + CFSE (фиг. 3б), данное количество соответствует количеству клеток трофобласта. Границу квадрантов на графике устанавливают предварительно, на основании предшествующего измерения контрольной пробы, необработанной раствором CFSE. Затем события из квадранта Jeg + CFSE проецируют на двумерную гистограмму с координатами FSC-PE. Границу квадрантов на графике устанавливают предварительно, на основании предшествующего измерения контрольной пробы, необработанной раствором пропидия иодида. При измерении опытной пробы обработанной растворами CFSE и пропидия иодида, на двумерной гистограмме с координатами FSC-PE анализируют относительное количество клеток трофобласта линии Jeg-3, содержащих пропидия иодид (клетки из квадранта DEAD CELLS) (фиг. 3в). Количество событий в квадранте DEAD CELLS соответствует нежизнеспособным клеткам трофобласта. Гибель клеток в контрольной лунке (после инкубации клеток трофобласта без моноклеаров периферической крови) не должна превышать 35%.

Затем определяют количество событий в квадранте DEAD CELLS после инкубации клеток трофобласта с моноклеарами периферической крови (фиг.4 а, б, в). Стратегия гейтирования событий аналогична представленной и описанной выше для фиг. 3. По количеству событий в квадрантах DEAD CELLS определяют процент нежизнеспособных клеток трофобласта (фиг. 4в). Затем оценивают количество событий в квадранте DEAD

CELLS после инкубации клеток трофобласта с мононуклеарами периферической крови и препаратом ВВИГ в концентрации бмг/мл (фиг. 4 г).

Затем вычисляют коэффициент цитопротективного эффекта препаратов ВВИГ в отношении клеток трофобласта:

$$5 \quad \text{ЦПЭ} = [(X2) / (X1)], \text{ где}$$

параметр X1 соответствует разности количества клеток в гейте Dead cells после измерения пробы клеток трофобласта, инкубированных с мононуклеарами периферической крови (фиг. 4в) и инкубированных без мононуклеаров (фиг. 3в).

10 Параметр X2 соответствует разности количества клеток в гейте Dead cells после измерения пробы клеток трофобласта, инкубированных с мононуклеарами периферической крови и препаратом ВВИГ (фиг. 4г) и инкубированных без мононуклеаров (фиг. 3в).

15 Цитопротективный эффект препаратов ВВИГ в отношении клеток трофобласта прогнозируют как положительный при значениях коэффициента ЦПЭ меньше 1. При значениях коэффициента ЦПЭ, равном или больше 1, цитопротективный эффект препарата ВВИГ в отношении клеток трофобласта - незначительный, применение ВВИГ для коррекции взаимодействия клеток трофобласта и НК-клеток в таком случае не целесообразно.

Способ подтверждается следующими клиническими примерами.

20 Пример 1. Участник исследования А. Количество клеток в гейте Dead cells после измерения пробы клеток трофобласта, инкубированных без мононуклеаров, соответствует 29,7%. Количество клеток в гейте Dead cells после измерения пробы клеток трофобласта, инкубированных с мононуклеарами периферической крови, составляет 51,8%. Параметр X1 равен  $51,8 - 29,7 = 22,1\%$ . Количество клеток в гейте Dead cells после измерения пробы клеток трофобласта, инкубированных с мононуклеарами периферической крови и препаратом ВВИГ, составляет 31%. Параметр X2 равен  $31 - 29,7 = 1,3\%$ .

30 Значение ЦПЭ по формуле составляет  $1,3/22,1 = 0,06$ , что меньше 1. Следовательно, препарат ВВИГ осуществляет коррекцию цитотоксического действия мононуклеаров периферической крови в отношении клеток трофобласта *in vitro*.

35 Пример 2. Участник исследования Б. Количество клеток в гейте Dead cells после измерения пробы клеток трофобласта, инкубированных без мононуклеаров, соответствует 8,7%. Количество клеток в гейте Dead cells после измерения пробы клеток трофобласта, инкубированных с мононуклеарами периферической крови, составляет 26,0%. Параметр X1 равен  $26,0 - 8,7 = 17,3\%$ . Количество клеток в гейте Dead cells после измерения пробы клеток трофобласта, инкубированных с мононуклеарами периферической крови пациентки и препаратом ВВИГ, составляет 26,2%. Параметр X2 равен  $26,2 - 8,7 = 17,5\%$ .

40 Значение ЦПЭ по формуле составляет  $17,5/17,3 = 1,01$ , что больше 1. Следовательно, препарат ВВИГ не целесообразен для коррекции цитотоксического действия мононуклеаров периферической крови этого участника исследования в отношении клеток трофобласта *in vitro*.

45 Способ позволяет оценивать протективный эффект ВВИГ в отношении клеток трофобласта в условиях их взаимодействия с НК-клетками. Оценка цитопротективного эффекта ВВИГ в отношении клеток трофобласта может быть применена на этапе подбора терапии при различных формах репродуктивной патологии, при которых планируется использование указанных препаратов.

Источники информации:

1. Elabd, S.H., et al., Percentage of CD3-CD56 + dim and of CD3-CD56 + dim CD69 + Natural Killer Cells in the Peripheral Blood of Women with In Vitro Fertilization (IVF) Failure. Egypt J Immunol, 2016. 23(1): p. 39-44.

2. Kofod, L., A. Lindhard, and T.V.F. Hviid, Implications of uterine NK cells and regulatory T cells in the endometrium of infertile women. Hum Immunol, 2018. 79(9): p. 693-701.

3. Thum, M.Y., et al., Prednisolone suppresses NKcell cytotoxicity in vitro in women with a history of infertility and elevated NKcell cytotoxicity. Am J Reprod Immunol, 2008. 59(3): p.259-65.

4. Polanski, L.T., et al., Interventions to improve reproductive outcomes in women with elevated natural killer cells undergoing assisted reproduction techniques: a systematic review of literature. Hum Reprod, 2014. 29(1): p.65-75.

5. Chemyshov, V.P., et al., Multiple immune deviations predictive for IVF failure as possible markers for IVIG therapy. Immunol Lett, 2016. 176: p.44-50.

6. Ho, Y.K., et al., Peripheral CD56(+)CD16(+) NK Cell Populations in the Early Follicular Phase Are Associated With Successful Clinical Outcomes of Intravenous Immunoglobulin Treatment in Women With Repeated Implantation Failure. Front Endocrinol (Lausanne), 2019. 10: p.937.

7. Чепанов, С.В., et al., Способ прогнозирования цитопротективного эффекта иммуноглобулинов для внутривенного введения при терапии женщин с привычным невынашиванием беременности и диагностированным антифосфолипидным синдромом, ФГБУНИИ АиГ им. Д.О. Отта", Editor. 2015: Российская Федерация.

8. Соколов, Д.И., et al., Способ определения цитотоксической активности НК-клеток, г.и.р.и. Д.О.О. Федеральное государственное научное учреждение "Научно-исследовательский институт акушерства, Editor. 2017: Российская Федерация.

9. Sokolov, D.I., et al., NK and trophoblast cells interaction: cytotoxic activity on recurrent pregnancy loss. Gynecological Endocrinology, 2019. 35(sup 1): p.5-10.

#### (57) Формула изобретения

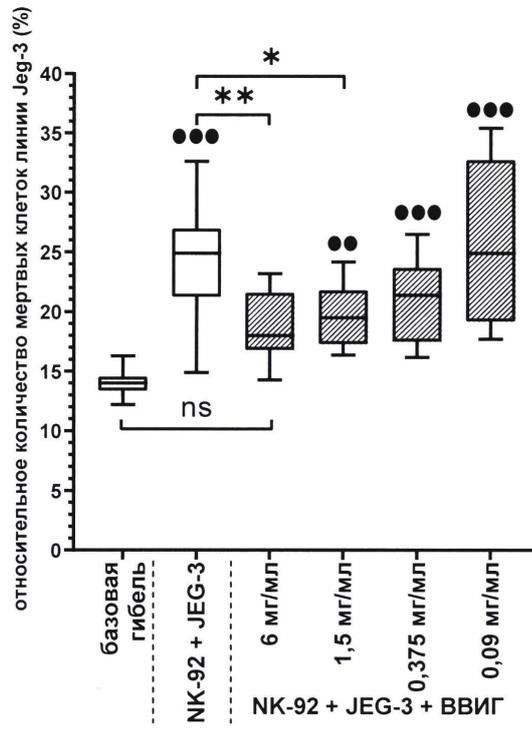
Способ оценки цитопротективного эффекта препаратов иммуноглобулинов для внутривенного введения (ВВИГ) в отношении клеток трофобласта в условиях их взаимодействия с естественными киллерами, отличающийся тем, что используют культуру клеток трофобласта, часть из которых инкубируют без моноклеаров, часть - в присутствии моноклеаров и часть - в присутствии препарата ВВИГ в концентрации 6 мг/мл, после чего определяют количество нежизнеспособных клеток трофобласта и рассчитывают коэффициент цитопротективного эффекта препаратов ВВИГ в отношении клеток трофобласта по формуле:

$$\text{ЦПЭ} = [(X2) / (X1)],$$

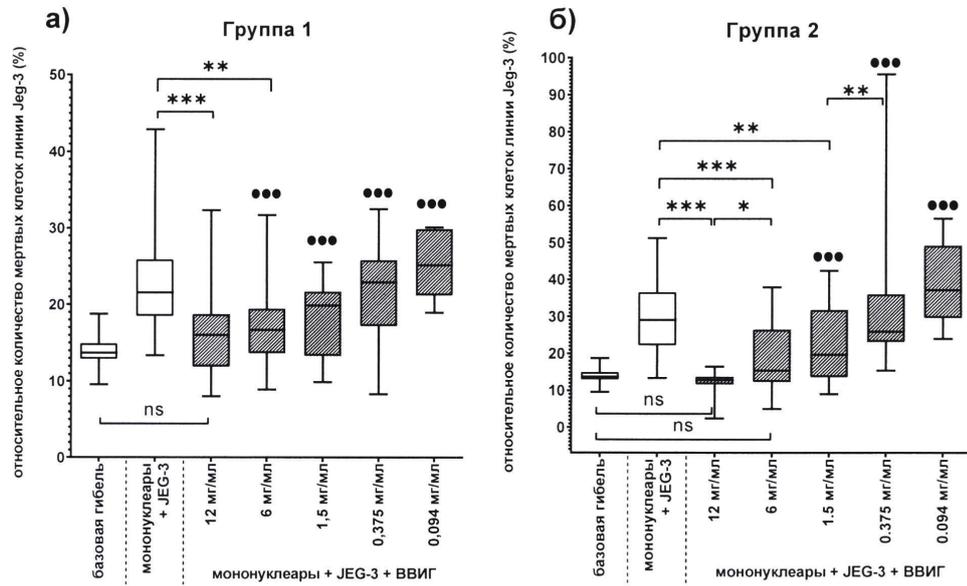
где X1 - разность количества нежизнеспособных клеток трофобласта, инкубированных с моноклеарами периферической крови и инкубированных без моноклеаров;

X2 - разность количества нежизнеспособных клеток трофобласта, инкубированных с моноклеарами периферической крови и препаратом ВВИГ и инкубированных без моноклеаров;

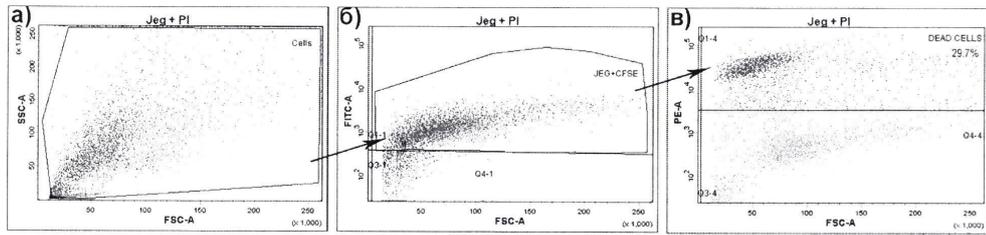
при ЦПЭ <1 прогнозируют положительный цитопротективный эффект, при ЦПЭ ≥1 - цитопротективный эффект отсутствует.



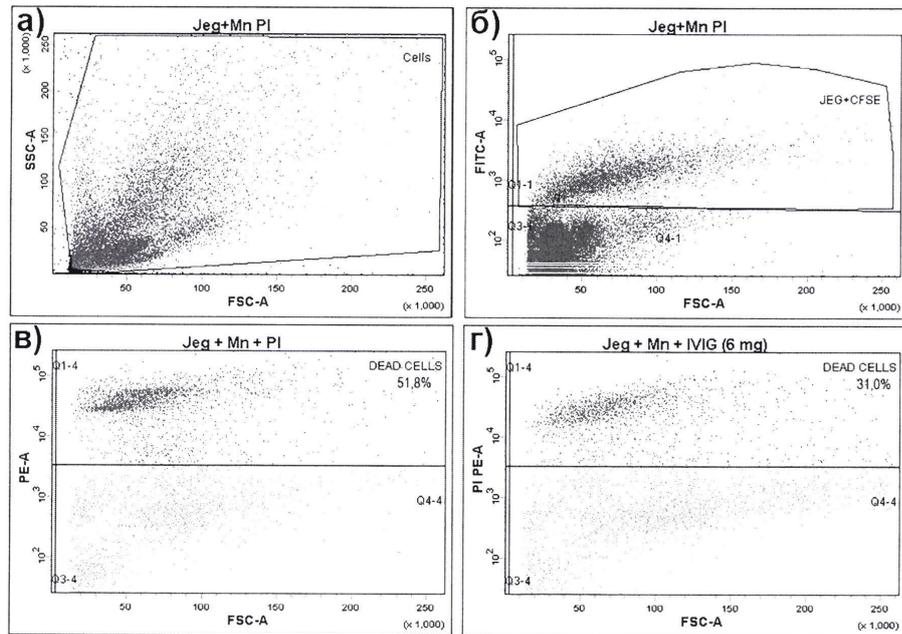
Фиг.1



Фиг.2



Фиг.3



Фиг.4