

Винахід відноситься до галузі медицини та біології, а саме до галузі кардіології та імунології.

Відомий "Спосіб виявлення та/або кількісного визначення та/або відділення апоптичних клітин у зразку або частині зразка" (патент на винахід WO9527903 A1, від 19.10.95, Изобретения стран мира (1996). - Выпуск 084, №17. - С.48) передбачає контакт досліджуваного зразка клітин або тканини з реагентом - поліпептидом або білком з класу анексинів, який має спорідненість до фосфатиділсерину плазматичної мембрани апоптичних клітин. Виявлення та/або кількісна оцінка апоптичних клітин прямим способом здійснюється детекцією мітки, яка зв'язана з анексином. Такими мітками можуть бути радіоактивні маркери, флуоресцентні, ензимні, протейнові, окремі барвники, імуноглобуліни. Для виявлення наявності або відсутності мітки використовують, наприклад, проточну цитометрію, цитометрію зображення або аналіз зображення. При непрямому способі детекції зразок контактує з неміченим реагентом з високою спорідненістю до фосфатиділсерину та кількість зв'язаного агента визначають за допомогою специфічних до реагенту антитіл. В цьому випадку може бути використана будь-яка техніка імуноаналіза. Запропоновано визначати якісно та кількісно апоптичні клітини після інкубації проби з субстанціями, що можуть індукувати або гальмувати апоптоз. Спосіб дає можливість проводити діагностику, вивчати ефекти лікування або вивчати вплив реагентів, які посилюють або послаблюють апоптоз.

Недоліком використання абсолютних величин апоптозу для діагностики є залежність величини апоптозу від часу, що пройшов від моменту забору клітин до початку дослідження та лабільність цих величин - залежність від функціонального стану організму. Також величини спонтанного, індукованого апоптозу та індукція апоптозу характеризують кожна окрему ланку патогенезу.

Задачею заявляемого способу є об'єктивізація методу дослідження для усунення впливу факторів зовнішнього та внутрішнього середовища.

Задача досягається тим, що визначають індекс індукції апоптозу, а саме відношення апоптичних індексів спонтанного та індукованого апоптозу.

Заявлений спосіб виконують наступним чином. З гепаринізованої крові виділяють мононуклеарні клітини за допомогою центрифугування з прискоренням 400g протягом 25-35 хвилин у градієнті щільності фікол-верографіну ($\rho = 1,077 - 1,078$), знімають кільце мононуклеарів. Отримані клітини піпетують та двічі центрифугують по 8-12 хвилин з прискоренням 200g у розчині нейтрального буфера, наприклад phosphate buffer solution з pH7,2. З відмитих клітин в концентрації $5-6 \times 10^6$ клітин/мл готують подвійні культури, які поміщають у живильне середовище, що містить 10% ембріональної телячої сироватки, у співвідношенні 1:1. До однієї з подвійних культур додають розчин дексаметазону в кінцевій концентрації $10^{-5}-10^{-7}$ М. Культури клітин інкубують протягом 12-24 годин при температурі 37°C. Після інкубації клітини піпетують у розчині нейтрального буфера, наприклад phosphate buffer solution з pH7,2, центрифугують 3-7 хвилин з прискоренням 400g. Підраховують відсоткове співвідношення живих та мертвих клітин за допомогою стандартного тесту з трипановим синім. Відмиті клітини інкубують 25-35 хвилин при температурі 37°C з розчином барвника Hoechst 33342 в концентрації 0,05-0,15мкг/мл у співвідношенні суспензія клітин/розчин барвника - 1:1-2:1, центрифугують з додаванням розчину нейтрального буфера, наприклад phosphate buffer solution з pH7,2 протягом 3-7 хвилин з прискоренням 400g. Клітини фіксують фіксуючою сумішшю, поміщають на предметне скельце, покривають покривним скельцем та запаюють. Препарати переглядають при освітленні люмінесцентною лампою при збільшенні 7х90. Визначають апоптичний індекс як відсоткове співвідношення кількості клітин з ознаками апоптозу та 2000 клітин, виявлених у полях зору мікроскопу. Апоптичний індекс визначають як в клітинах, які інкубувались тільки у живильному середовищі - індекс спонтанного апоптозу, так і в клітинах, які інкубувались в живильному середовищі в присутності дексаметазону - індекс індукованого апоптозу. Індекс індукції апоптозу визначався як співвідношення індексів спонтанного та індукованого апоптозу у даного хворого. При індексі індукції апоптозу від 0,6106 до 0,6301 особи розцінювались як здорові, при індексі індукції апоптозу до 0,5064 - діагностують гіпертрофію міокарда (наприклад, при гіпертонічній хворобі 2-го ступеня), значення індексу індукції апоптозу від 0,5065 до 0,6105 вказують на потребу додаткового обстеження для виключення гіпертрофії міокарда, величина індексу індукції апоптозу від 0,6302 до 0,7563 вказує на необхідність виключення деструктивних змін в міокарді (наприклад, наявності ішемічної хвороби серця, кардіосклерозу) і при індексі індукції апоптозу, що перевищує 0,7563 діагностують деструкцію міокарда (наприклад, при ішемічній хворобі серця, кардіосклерозі). Запропонований метод може бути використаний також для визначення переважання гіпертрофічних змін над деструктивними та навпаки, при наявності захворювань, які супроводжуються обома названими процесами.

Приклад 1

Хворий Т-лі Г.Т., обстеження 17.04.02, діагноз: гіпертонічна хвороба 1 ступеня, цукровий діабет 2-го типу, дисциркуляторна енцефалопатія. Індекс маси міокарда, визначений методом радіоізотопної вентрикулографії, становив $92,3 \text{ г/м}^2$ - гіпертрофія міокарда відсутня. Індекс спонтанного апоптозу - 3,4%, індекс індукованого апоптозу - 5%, індекс індукції апоптозу - 0,6800.

Приклад 2

Хворий С-ов Ю.А., обстеження 16.04.02, діагноз: гіпертонічна хвороба 3-го ступеня, ішемічна хвороба серця, стенокардія напруги 3-го функціонального класу, кардіосклероз. Індекс маси міокарда, визначений методом радіоізотопної вентрикулографії, становив 244 г/м^2 - виражена гіпертрофія міокарда. Індекс спонтанного апоптозу - 7,4%, індекс індукованого апоптозу - 4,4%, індекс індукції апоптозу - 1,6818.

Приклад 3

Хворий Р-к А.Б., обстеження 18.04.02, діагноз: гіпертонічна хвороба 2-го ступеня. Індекс маси міокарда, визначений методом радіоізотопної вентрикулографії - 289 г/м^2 , виражена гіпертрофія міокарда. Індекс спонтанного апоптозу - 1,6%, індекс індукованого апоптозу - 5,5%, індекс індукції апоптозу - 0,2909.

Приклад 4

Хворий Б-ль Т.Ф., обстеження 23.04.02, діагноз: гіпертонічна хвороба 2-го ступеня, стенокардія спокою та напруги, 3-го функціонального класу, кардіосклероз. Індекс маси міокарда, визначений методом радіоізотопної вентрикулографії, становив 234 г/м^2 - виражена гіпертрофія міокарда. Індекс спонтанного апоптозу - 1,1%, індукованого - 4,7%, індекс індукції апоптозу - 0,2340.

Приклад 5

Хворий Г-о А.А., обстеження 15.02.01, діагноз: ішемічна хвороба серця, стенокардія напруги та спокою 2-го функціонального класу, шлуночкова екстрасистолія. Індекс спонтанного апоптозу - 7%, індукованого - 9%, індекс індукції апоптозу - 0,7778.

Приклад 6

Хворий Х-ш Є.В., обстеження 11.12.00, діагноз: ішемічна хвороба серця, стенокардія напруги та спокою 3-го функціонального класу, кардіосклероз, шлуночкова екстрасистолія. Індекс спонтанного апоптозу - 15%, індукованого - 16%, індекс індукції апоптозу - 0,9375.

Приклад 7

Хвора А-к Н.М., обстеження 26.04.01, діагноз: міокардитичний кардіосклероз, часта форма шлуночкової тахікардії. Індекс спонтанного апоптозу - 4,8, індукованого - 3,6, індекс індукції апоптозу - 1,3333.

Таким чином, впровадження заявляемого способу в роботу Центральної науково-дослідної лабораторії КМАПО ім. П.Л. Шупика та відділень науково-дослідного інституту кардіології ім. М.Д. Стражеска дозволило встановити наявність гіпертрофічних або деструктивних змін в міокарді. Крім того, заявляемий метод дозволив об'єктивізувати оцінку результатів дослідження апоптичного індексу за рахунок культивування клітин та використання для діагностики індексу індукції апоптозу.