

Винахід відноситься до галузі медицини, а саме до галузі імунології та цитології і може бути використаний для оцінки стану імунної системи у хворих та у донорів.

Відомий спосіб оцінки стану клітин імунної системи з визначенням функціональної активності за величиною негативної активації імунокомпетентних клітин - апоптозу (Чередєєв А.М., Ковальчук Л.В. Патогенетический принцип оценки иммунной системы: положительная и отрицательная активация //Российский журнал иммунологии. - 1997. - №2, Т2 - С.85-90) передбачає визначення величини апоптозу клітин імунної системи. Низька величина апоптозу асоціюється з аутоіммунними та лімфопроліферативними захворюваннями, а висока його величина свідчить про різні типи імунодефіциту.

Недоліком цього способу є використання абсолютної величини апоптозу для оцінки функціонального стану імунної системи, оскільки лабільність абсолютних величин апоптозу знижує достовірність методу та унеможливує визначення потенційної здатності імунокомпетентних клітин реагувати на вплив внутрішніх та зовнішніх факторів.

Відомий спосіб оцінки стану клітин імунної системи (Чередєєв А.М., Ковальчук Л.В. Апоптоз как важный этап оценки иммунной системы по патогенетическому принципу//Клиническая лабораторная диагностика. - 1997. - №7. - С.31-35) полягає у вивченні негативної активації клітин імунної системи -апоптозу. Спосіб виконується наступним чином: у виділеній культурі імунокомпетентних клітин, наприклад, мононуклеарних клітин, лімфоцитів, виявляють апоптичні маркери, які характеризують ступінь їхньої негативної активації та її механізм.

Недоліком цього способу є використання маркерів апоптозу, які характеризують ступінь розвитку процесу та його механізм, але не дають можливість оцінити потенційну можливість реагувати на подразники, що важливо для оцінки функціонального стану імунної системи.

Найбільш близьким аналогом є спосіб оцінки стану імунної системи з використанням принципу "золотого перетину" (Книшов Г., Настенко Є. Принцип "золотого сечения" в регуляции сердечно-сосудистой системы//Dostog. - 2003. - №2 - С.17-19. Метод виконується наступним чином: визначається кількість В- та Т-лімфоцитів, та Т-хелперів та Т-супресорів з подальшим підрахуванням частки від ділення кількості В-лімфоцитів на кількість Т-лімфоцитів, та кількості Т-супресорів на кількість Т-хелперів. Стан імунної системи донорів характеризувався часткою від ділення вказаних показників, яка наближалась до значення "золотого перетину" - 0,618.

Недоліком аналогу є оцінка стану імунної системи за кількісним показником, таким, як кількість імунокомпетентних клітин, натомість більш інформативним є метод, що використовує здатність клітин реагувати на певний подразник, наприклад, дексаметазон.

Задачею заявляемого способу є збільшення достовірності та інформативності за рахунок використання індукції апоптозу, наприклад, дексаметазоном, з наступним визначенням індексу спонтанного та індукowanego апоптозу, з підрахуванням індексу індукції апоптозу та порівнянням його величини з величиною "золотого перетину".

Задача досягається тим, що виділені клітини перед забарвленням інкубують, наприклад, з дексаметазоном, визначають індекс індукції апоптозу, а саме відношення апоптичних індексів спонтанного та індукowanego апоптозу, і, при значенні індексу індукції апоптозу, яке наближається до величини "золотого перетину" та становить від 0,6106 до 0,6301 визначають оптимальне функціонування мононуклеарних клітин крові, при значеннях індексу індукції апоптозу менших за 0,6106 виявляють зростання функціонального резерву, при значеннях індексу індукції апоптозу, які переважають 0,6301, визначають виснаження функціонального резерву мононуклеарних клітин.

Заявлений спосіб виконують наступним чином. З гепаринізованої крові виділяють мононуклеарні клітини за допомогою центрифугування у градієнті щільності фікол-верографіну ($\rho = 1,077$), знімають кільце мононуклеарів. Отримані клітини піпетують та двічі центрифугують по 10 хвилин з прискоренням 200g у розчині нейтрального буфера, наприклад PBS (protein based solution). З відмитих клітин в концентрації 5-6x10⁶клітин/мл готують подвійні культури, які поміщають у живильне середовище, що містить 10% нативної сироватки, у співвідношенні 1:1. До однієї з подвійних культур додають розчин, наприклад, дексаметазону в концентрації 10⁻⁵-10⁻⁷моль. Культури клітин інкубують протягом 10-72 годин при температурі 37°C. Після інкубації клітини піпетують у розчині нейтрального буфера, наприклад PBS, центрифугують 5 хвилин з прискоренням 400g. Підраховують відсоткове співвідношення живих та мертвих клітин за допомогою стандартного теста, наприклад, з трипановим синім. Відмиті клітини інкубують 20-40хв. при температурі 37°C з розчином барвника Hoechst 33342, центрифугують з додаванням розчину нейтрального буфера, наприклад, PBS. Клітини фіксують фіксуючою сумішшю, поміщають на предметне скельце, покривають покривним скельцем та запаюють. Препарати переглядають при освітленні люмінесцентною лампою при збільшенні 7x90. Визначають апоптичний індекс як відсоткове співвідношення між кількістю клітин з ознаками апоптозу на 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 індукowanego апоптозу. Індекс індукції апоптозу визначають як співвідношення індексів спонтанного та індукowanego апоптозу у даного хворого. При значенні індексу індукції апоптозу, яке наближається до величини "золотого перетину" та становить від 0,6106 до 0,6301 визначають оптимальне функціонування мононуклеарних клітин крові, при значеннях індексу індукції апоптозу менших за 0,6106 виявляють зростання функціонального резерву, при значеннях індексу індукції апоптозу, які переважають 0,6301 визначають виснаження функціонального резерву мононуклеарних клітин.

Експериментально-клінічне впровадження заявляемого способу проведено на базі ЦНДЛ КМАПО ім. П.Л. Шупика у 34 щурів та 18 кролів, а також у 15 донорів та 66 хворих з серцево-судинними захворюваннями, у 13 хворих з хронічним лімфолейкозом, у 18 хворих із неходжінськими злоякісними лімфомами та у 32 хворих на туберкульоз легень.

Таким чином, використання запропонованого методу для оцінки функціонального резерву мононуклеарних клітин крові у хворих та донорів дозволило збільшити достовірність та інформативність визначення функціональних можливостей мононуклеарних клітин.