

Корисна модель ставитися до області біофізики, одним з актуальних завдань якої є вивчення біологічної ефективності факторів різної природи й інтенсивності.

Найбільш адекватними в оцінці функціонального стану формених елементів крові є цитохімічні методи, оскільки біохімічне дослідження периферичної крові досить утруднене у зв'язку зі складністю виділення клітин із крові, методи кількісного цитохімічного дослідження або цитоспектрофотометрії, засновані на фотометрії, вимагають застосування відповідних приладів, які досить складні у використанні й дорогі.

Цитохімічними способами оцінюють функціональний стан нейтрофілів по змісту в них пероксидази, кислотої й лужної фосфатази [Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. - М.: Мир, 1969. - 648с.], катіонних білків [Шубич М.Г. Виявление катионного белка в цитоплазме лейкоцитов с помощью бромфенолового синего // Цитология. - 1974. - Т.16, №10. - С.1321-1322.], ліпідів [Sheehan H.L., Sforey G.W. An improved method of staining leukocyte granules with Sudan black // B.G. Path. - 1947. - Vol. 59, №2. - P.336-339.] і визначають вміст катехоламінів в еритроцитах [Мардарь А.И., Кладиенко Д.П. Цитохимический способ выявления катехоламинов в эритроцитах // Лабораторное дело. - 1986. - №10. - С.586-590]. Результатом такої оцінки є розрахунок цитохімічного показника вмісту, запропонований L.S. Kaplow [Kaplow L.S. A histochemical procedure for localizing and evaluation leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow // Blood. - 1955. - №10. - P.1023-1029], обраний нами як прототип винаходу.

Цей спосіб полягає в тому, що після фіксації й фарбування свіжоприготовлених мазків крові й цитохімічного виявлення відповідного показника, всі клітини, залежно від ступеня фарбування цитоплазми й кількості виявлених у них гранул, розподіляють на кілька груп. Для кількісної оцінки отриманих результатів виводять цитохімічний показник вмісту (ЦПВ) розраховуючи на 100 клітин. Для цього відсоток клітин, що належать до кожної групи, множать на номер даної групи. Загальна сума отриманих добутків є показником інтенсивності реакції.

Цей спосіб має певні недоліки. По-перше, більша трудомісткість кількісної оцінки результатів. По-друге, він є напівкількісним, тому що для нього характерна більша погрішність виміру через значну частку суб'єктивізму дослідження. По-третє, дозволяє визначити тільки ЦПС включення, що виявляє, у клітині, тоді як велике значення для визначення функціональної активності клітини мають і інші показники.

В основу корисної моделі поставлене завдання вдосконалити обробку результатів цитохімічних реакцій шляхом застосування морфологічного аналізу зображень при дослідженні мазків крові.

Поставлене завдання вирішується таким чином. Спосіб визначення показників форми клітин периферичної крові включає фіксацію й фарбування свіжоприготовлених мазків крові, цитохімічне виявлення відповідного показника й відрізняється тим, що зображення пофарбованої клітини вводять у комп'ютер і піддають цифровій обробці за допомогою системи фільтрів, результатом якої є нове зображення, з відсутністю перекручувань і перешкод, потім проводять виділення пофарбованих клітин, вимірюють лінійні розміри - периметр клітини й периметр еліпса, у який ця клітина вписана, а також площу клітини й площу окружності, у яку ця клітина вписана й визначають показники форми клітин: коефіцієнт порізаності границь (КПГ) і коефіцієнт деформації клітин (КДК) по формулах:

$$КПГ = P/Pэ,$$

де P - периметр клітини, Pэ - периметр еліпса, у який ця клітина вписана,

$$КДК = S/Sк,$$

S - площа клітини, Sk - площа окружності, у яку ця клітина вписана.

Мазки крові готуються й офарблюються по стандартних методиках, що дозволяє виявити наявність тієї або іншої речовини в клітинах. У кожному мазку досліджується 45-50 клітин.

Приклад конкретного виконання.

Розглянемо застосування даного способу на прикладі дослідження зміни еритроцитів крові пацюків при впливі факторів різної природи й інтенсивності. У якості низькоінтенсивного впливу застосовували електромагнітне випромінювання вкрай високої частоти (ЕМВ KBЧ). Як фактор високої інтенсивності використали обмеження рухливості (гіпокінезія, ГК), що викликає розвиток в організмі стрес-реакції. Використання цих факторів пов'язане з тим, що доведено високу чутливість біологічних об'єктів до цих впливів.

Дослідження виконані на 64 безпородних білих пацюках-самцях масою 120-150 р. Для експерименту відбирали тварин однакового віку, що характеризуються середнім рівнем рухової активності й низкою емоційністю в тесті "відкритого поля", які згідно нашим і літературним даним переважають у популяції, тому можна затверджувати, що саме в цих тварин розвивається найбільш типова реакція на будь-який вплив. Подібний добір дозволив сформувати однорідні групи тварин, що однотипно реагують на дію різних факторів.

Попередньо відібрані тварини були розділені на чотири групи по 16 особин у кожній. До першої групи були віднесені тварини, що втримувалися у звичайних умовах віварію (біологічний контроль, ДО). Тварини другої групи піддавалися ізольованому впливу ЕМВ KBЧ (KBЧ). Третю групу склали пацюки, піддані дії ГК стресу, що створювався приміщенням пацюків у спеціальні піни з оргскла, у яких вони перебували протягом дев'яти днів експерименту по 22 години на добу. У четверту групу ввійшли тварини, що перебували в умовах ГК і одночасно піддавалися впливу ЕМВ KBЧ (KBЧ+ГК). Вплив ЕМВ KBЧ здійснювався протягом дев'яти діб за допомогою генератора "Промінь. KBЧ-071" ( $\lambda=7,1\text{мм}$ , щільність потоку потужності  $0,1\text{мВт/см}^2$ ) на потилично-комірцеву зону по 30 хв щодня протягом дев'яти днів.

Забірання крові здійснювалося шляхом пункції хвостової вени на дев'яту добу експерименту. Мазки крові офарблювали за методом А. Мардаря [Мардарь А.И., Кладиенко Д.П. Цитохимический способ выявления катехоламинаминов в эритроцитах // Лаборат. Дело. - 1986. - №10. - С. 586-590.] і досліджували за допомогою системи морфометричного аналізу. Для цього використовували мікроскоп «Zeiss», ПЗС-відеокамеру (SK-2046), плату відеозахвату (дозвіл 640x480), персональний комп'ютер і пакет проблемно-орієнтованого програмного забезпечення - морфометр «Image - Pro».

Для статистичної обробки використовувався стандартний пакет статистичний програм Statistika 6.0.

Результати дослідження представлені в таблиці 1.

Дослідження еритроцитів тварин контрольної групи показало, що клітини мали рівні границі й форму, близьку до окружності. Коефіцієнти КДК і КПГ у цьому випадку були близькі до одиниці й склали  $1,22 \pm 0,07$  ум. од. і

1,05±0,09 ум. од. відповідно.

При впливі ЕМВ КВЧ на інтактних тварин деформації еритроцитів не спостерігалось, про що свідчать значення коефіцієнтів порізаності границь і деформації клітин, близькі до таких в інтактних тварин і складові 104,7% і 100,2% ( $p>0,05$ ) відповідно.

Поява деструктивних змін у клітинах гіпокінезованих тварин призвела до достовірного збільшення КДК на 34,0% ( $p<0,01$ ) і КПГ на 24,3% ( $p<0,01$ ) у порівнянні з відповідними значеннями в контрольній групі тварин, що може свідчити про розвиток деформаційного стресу [Ney P.A., Christopher M.M., Nebbel R.P. Synergistic effects of oxidation and deformation on erythrocyte monovalent cation leak (1990) Blood, 75, 1192-1998]

При впливі ЕМВ КВЧ на тварин, які перебувають в умовах ГК, деформації еритроцитів не спостерігалось, а значення досліджуваних коефіцієнтів деформації клітин і порізаності границь наближалися до таких в інтактних тварин і склали 119,6% і 97,9% ( $p>0,05$ ) відповідно. У свою чергу було відзначено достовірне зниження досліджуваних коефіцієнтів на 10,7% ( $p<0,05$ ) і 21,2% ( $p<0,05$ ) відповідно в порівнянні з показниками в групі тварин, які також перебували в умовах обмеженої рухливості, але додатково не піддавалися впливу ЕМВ КВЧ.

Отже, застосування морфологічного аналізу дозволило виявити, що вплив ЕМВ КВЧ обмежує розвиток стрес-реакції на обмеження рухливості

Спосіб морфометричного аналізу зображень клітин периферичної крові дозволяє значно підвищити ефективність використання методів цитохімічного аналізу й одержувати не тільки якісні, але й кількісні результати дослідження.

Таблиця 1.

Зміна коефіцієнтів деформації клітин (КДК) і порізаності границь (КПГ) в еритроцитах крові пацієнтів контрольної групи (ДО) і при впливах ЕМВ КВЧ (КВЧ), гіпокінезії (ГК), їхньої комбінації (ГК+КВЧ) на дев'яту добу експерименту

Група	КДК	КПГ
К (1)	1,22±0,07	1,05±0,09
КВЧ (2)	1,28±0,11	1,06±0,10
ГК (3)	1,64(0,04 $p_{1,3}<0,001$ $p_{2,3}<0,01$	1,31(0,07 $p_{1,3}<0,001$ $p_{2,3}<0,01$
ГК+КВЧ (4)	1,46±0,12	1,03±0,06