



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 33801

(13) A

(51) 6 G01N33/49

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ НЕЙТРОФІЛІВ КРОВІ

(21) 99041829

(22) 01.04.1999

(24) 15.02.2001

(33) UA

(46) 15.02.2001, Бюл. № 1, 2001 р.

(72) Бовт Валентина Дем'янівна, Єщенко Віталій Андрійович, Єщенко Юлія Віталіївна, Скорняков Ілля Григорович, Григорова Наталія Володимирівна, Скорняков Володимир Ілліч

(73) Запорізький державний університет

(57) Спосіб визначення функціональної активності нейтрофілів крові, що полягає у фіксації, фарбуванні та дослідженні гранул нейтрофілів, який відрізняється тим, що мазки крові фіксують у парах формаліну та фарбують метиловим фіолетовим з флоксином, підраховують число гранул в нейтрофілах і по зниженню кількості гранул роблять висновок про підвищення їх функціональної активності.

Винахід відноситься до гематології і стосується клінічних лабораторних методів дослідження.

Існує відомий спосіб визначення функціональної активності нейтрофілів крові, який міститься у вивченні їх руху / Истаманова Т.С., Алмазов В.А. Лейкопении и агранулоцитозы. – Л.: Медгиз, 1961/, Краплю крові помішають у закріплений на столику мікроскопу термонагрівальний столик, який автоматично підтримує температуру 37°C. Дослідження нейтрофілів проводять за допомогою фазово-контрастного устрою, сполученого зі звичайним мікроскопом. Реєстрація швидкості руху нейтрофілів відбувається за допомогою рисувального апарату, сполученого з мікроскопом.

Ознакою, спільною з заявленим рішенням, є мікроскопічне дослідження нейтрофілів. Але даний спосіб потребує особливої апаратури, що ускладнює його широке використання, і не дозволяє отримати добре порівнянних результатів, тому що не має високої точності.

Існує відомий спосіб визначення функціональної активності нейтрофілів, який міститься у дослідженні фагоцитозу / Кост Е.А., Стенко М.И. Советский грамицидин и его применение в клинической практике. Лабораторные исследования и оценка их результатов // Научные труды Клинической больницы имени С.П. Боткина. – М., 1947. – С. 253-256/, прийнятий як прототип. Об'єктом фагоцитозу є живі і вбиті мікроби. У відальевську пробірку набирають одним і тим самим капіляром від апарата Панченкова: 1 капіляр 4%-ного розчину цитрату натрію, 2 капіляра крові, 1 капіляр одностійкої живої культури з 1-2 млрд мікробних тіл в 1 мл, або вбитих мікробів концентрацією 4 млрд тіл в 1 мл. Суміш ретельно перемішують і ставлять у термостат при 37°C на 1 годину. Потім вміст пробірок старанно перемішують, роблять на предметних

склах дуже тонкі мазки, висушують їх на повітрі, фіксують на протязі 30 хвилин рідиною Нікіфорова / яка складається з рівних об'ємів етилового спирту та сірчаного ефіру /. Фіксовані мазки заливають на 25-40 хвилин розведеною фарбою Романовського, яку готують таким чином. 3,8 г сухої фарби Романовського розчиняють у 250 мл чистого метилового спирту. Розчин залишають на 3-5 доби, часто збовтуючи для кращого розведення фарби. Потім додають 250 мл чистого гліцерину і знову залишають на 3-5 діб, періодично збовтуючи. Перед вживанням барвник відтитровують, тобто фарбують декілька фіксованих мазків крові на протязі 30 хвилин / 1-2 краплі фарби на 1 мл дистильованої води /. Цим барвником фарбують декілька фіксованих мазків крові на протязі 25-40 хвилин. По добре пофарбованому препарату встановлюють необхідну кількість краплин фарби на 1 мл води та час фарбування. У пофарбованих мазках підраховують 100 нейтрофілів. Відмічають процент фагоцитуючих нейтрофілів / показник фагоцитарної активності / і середню кількість мікробів у коленому з фагоцитуваних нейтрофілів /фагоцитарний індекс /.

Але цей спосіб дуже складний, має потребу в наявності мікробних культур. Джерело помилок: забруднення культури, у зв'язку з чим перед кожним дослідженням потрібно перевіряти культуру бактеріоскопічним методом; використання нестерильних реактивів; застосування кислого розчину цитрату натрію замість нейтрального та ін.

В основу винаходу поставлено задачу розробити спосіб визначення функціональної активності нейтрофілів крові, в якому фіксація та пофарбування нейтрофілів дозволяє з високою точністю виявляти та підраховувати кількість гранул у цих клітинах, а на основі даних зниження їх числа суди-

(19) UA (11) 33801 (13) A

ти про підвищення їх активності.

Відмінними від прототипу ознаками є: використання як фіксатора парів формаліну, а в складі барвника - метилового фіолетового, підрахунок кількості гранул у нейтрофілах.

Спосіб здійснюють таким чином:

- у чашку Петрі наливають 20 мл формаліну;
- на дно чашки кладуть дві скляні палички;
- на палички мазками вниз поміщають два предметних скла і закривають чашку;
- проводять на протязі 5 хвилин інкубацію мазків у сходячих парах формаліну;
- витягують мазки з чашки і на них наливають на 30 сек 1%-ний розчин метилового фіолетового;
- промивають мазки дистильованою водою на протязі 1 хвилини;
- наливають на мазки 1%-ний розчин флоксину на 5 хвилин;
- промивають мазки дистильованою водою;
- висушують;
- мікроскопують з імерсією.

На пофарбованих препаратах у цитоплазмі нейтрофілів виявляють фіолетові гранули, середнє число яких у клітинах встановлюють на підставі підрахунку на 100 нейтрофілів.

Приклад 1. У здорової людини брали кров з пальця та готували мазки. Останні фіксували в парах формаліну і фарбували метиловим фіолетовим з флоксином запропонованим способом. На препаратах у цитоплазмі нейтрофілів виявлялись фіолетові гранули. Середня їх кількість із розрахунку на одну клітину складала $129 \pm 4,3$.

Приклад 2. Із запаленої ділянки брали краплі крові, з яких готували мазки. Останні фіксували і фарбували метиловим фіолетовим з флоксином розробленим способом. На приготованих таким чином препаратах у цитоплазмі нейтрофілів виявлялись фіолетові гранули. Середня кількість гранул із розрахунку на одну клітину складала $97 \pm 3,2$ ($p < 0,001$). Зменшення кількості гранул пов'язане з підвищенням секреторної активності клітин.

Порівняльний аналіз заявленого способу з прототипом показує, що він відрізняється від відомого простотою. Сукупність перерахованих операцій, які характеризують суттєві ознаки заявленого винаходу дозволяють по зниженню кількості гранул робити висновок про підвищення функціональної активності клітин.

Таким чином, заявлений спосіб можна використовувати в клінічних лабораторних дослідженнях.

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2001 р. Формат 60x84 1/8.
Обсяг _____ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.
(044) 268-25-22
