

Винахід відноситься до галузі медицини та біології, а саме до галузі цитології та імунології та може бути використаний для комплексної оцінки резистентності організму.

Відомий "Спосіб визначення та/або кількісного виявлення та/або відділення апоптичних клітин у зразку або частині зразка" (патент на винахід WO 9527903 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 фосфатидилсерину 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, протеїнові, 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 фосфатидилсерину 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. Запропонований спосіб використовується для діагностики.

Недоліком використання абсолютної величини спонтанного та індукованого апоптозу для діагностики є оцінка лише кінцевого результату апоптичного процесу без урахування численних факторів, які можуть призводити до апоптозу (стан окисдантної та антиоксидантної систем, рівня фактору некрозу пухлин, стан клітинних мембран, оцінюваний за величиною агрегації тромбоцитів).

Задачею заявляемого способу є збільшення інформативності та достовірності способу за рахунок визначення рівней спонтанного та індукованого модулятором, наприклад, дексаметазоном, апоптозу та індексу індукції апоптозу, а саме відношення спонтанного та індукованого, наприклад, дексаметазоном, апоптозу, одночасно з комплексною оцінкою стану окисдантно-антиоксидантної системи, клітинних мембран за величиною агрегаційних властивостей тромбоцитів та рівня спонтанного та індукованого, наприклад, ліпополісахаридом, фактору некрозу пухлин.

Задача досягається тим, що резистентність організму, яку визначають у відомому способі шляхом виділення мононуклеарних клітин, інкубацією їх з дексаметазоном, забарвленням барвником з наступним визначенням індексів спонтанного та індукованого, наприклад, дексаметазоном, апоптозу, згідно з методом, що пропонується, вимірюють величини перекисного окислення ліпідів, каталази, агрегації тромбоцитів та рівнів спонтанного та індукованого, наприклад, ліпополісахаридом, фактору некрозу пухлин та визначають індекс індукції апоптозу, а саме, відношення апоптичних індексів спонтанного та індукованого, наприклад, дексаметазоном, апоптозу і при значеннях індексу індукції апоптозу в межах від 0,6106 до 0,6301 і величинах спонтанного та індукованого, наприклад, дексаметазоном, апоптозу, перекисного окислення ліпідів, каталази, агрегації тромбоцитів та спонтанного і індукованого, наприклад, ліпополісахаридом, фактору некрозу пухлин в межах норми діагностують, що реактивність організму в межах норми, при зниженні рівня всіх визначених показників, крім індексу індукції апоптозу, діагностують зниження резистентності організму внаслідок виснаження, при підвищенні рівня індексу індукції апоптозу вище 0,6301 та зростанні всіх інших показників, що вивчалися, діагностують напруження резистентності організму з достатніми компенсаторними можливостями.

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 pH 7,2. 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 $10^{-5} - 10^{-7}$ M. Культури клітин інкубують протягом 12-24 годин при температурі 37°C. Після інкубації клітини піпетують у розчині нейтрального буфера, наприклад phosphate buffer solution з pH 7,2, центрифугують 3-7 хвилин з прискоренням 400g. Підраховують відсоткове співвідношення живих та мертвих клітин за допомогою стандартного теста 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 суспензії клітин/розчин барвника - 1:1-2:1, потім центрифугують з додаванням розчину нейтрального буфера, наприклад phosphate buffer solution з pH 7,2, 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 7×90. 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. Величини перекисного окислення ліпідів та рівень каталази крові, рівні спонтанного та індукованого, наприклад, ліпополісахаридом, фактору некрозу пухлин, величину агрегації тромбоцитів визначали за загальноприйнятими методиками. При значеннях індексу індукції апоптозу в межах від 0,6106 до 0,6301 і величинах спонтанного та індукованого, наприклад, дексаметазоном, апоптозу, перекисного окислення ліпідів, каталази, агрегації тромбоцитів та спонтанного і індукованого, наприклад, ліпополісахаридом, фактору некрозу пухлин в межах норми діагностують, що реактивність організму в межах норми, при зниженні рівня всіх визначених показників, крім індексу індукції апоптозу, діагностують зниження резистентності організму внаслідок виснаження, при підвищенні рівня індексу індукції апоптозу вище 0,6301 та зростанні всіх інших показників, що вивчалися, діагностують напруження резистентності організму з достатніми компенсаторними можливостями. Зниження антиоксидантної активності при підвищенні прооксидантної системи та індексу індукції апоптозу діагностували як початок декомпенсації резистентності організму. Зниження рівня індукції фактору некрозу пухлин при підвищенні його спонтанного рівня діагностували як свідчення про наявність в організмі інфекційного процесу або гіпоксії, при останній спостерігали зниження

антиоксидантної системи. Значне підвищення агрегаційної здатності тромбоцитів діагностували як можливість виникнення критичного стану у хворого.

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

Таким чином, використання запропонованого методу для оцінки схильності мононуклеарних клітин крові до апоптозу у хворих, у донорів та в експериментальних тварин дозволило збільшити достовірність та інформативність методу визначення реактивності організму.