

Винахід відноситься до медицини, зокрема, до клінічної медицини та може бути використований для оцінки резервної можливості організму при захворюваннях різної етіології.

Ураховуючи несприятливі екологічні фактори, зв'язані з підвищеною іонізуючою радіацією та впливом хімічних та фізичних факторів виробничої середовища на організм людини, проблема оцінки опірності організму для профілактики виникнення захворювань та вибору методів їх лікування є актуальним.

Загальновідомий традиційний засіб визначення резерву резистентності організму шляхом забору крові, одержання сироватки з подальшим визначенням у ній наявності імуноглобулінів класу А, М та С методом радіальної імунодифузії у гелі по Манчіні. Про резервну можливість резистентності організму вважають по змінюванню відносно норми кількості імуноглобуліна М [1].

Цей засіб оцінки резерву резистентності організму є інформативним лише у випадку гострих запальних процесів, при яких імуноглобуліни А і С залишаються у нормі або збільшенні, не впливаючи на зміну кількості імуноглобуліна М.

В той же час у випадках підгострого та хронічного перебігу захворювання інформативність оцінки за показником імуноглобуліна класу М значно знижується з приводу того, що в організмі спостерігається одночасно збільшення кількості як імуноглобуліна М, так і імуноглобуліна А, а також як імуноглобуліна М, так і імуноглобуліна С. Це обумовлено перенапруженою функцією антитілоутворення В-лімфоцитами. Отже, зміст імуноглобуліна М залежить як від кількості в організмі В-лімфоцитів, так і від характеру важкості перебігу захворювання.

З відомих способів визначення резерву резистентності організму найбільш інформативним та близьким до заявленого способу по технологічній суті є спосіб, який заснований на методі розеткоутворення лімфоцитів з послідуною диференціацією лімфоцитарних клітин за їх видами. Спосіб включає забір крові, виділення лейкоцитарної суміші, обробку її сумішшю еритроцитів барана та суспензією комплексу Зімосан-комплемента, приготування мазка для мікроскопії з послідуною обробкою його маркером-фарбником, диференціацію лімфоцитарних клітин на Т-, В- і О-лімфоцити.

У якості маркера-фарбника використовують фарбник Романовського.

Про резерв резистентності судять по відхиленню від норми змісту нульових лімфоцитарних клітин.

Більш висока інформативність цього способу у порівнянні з відомими зумовлена більш високою стабільністю показника оцінки резерву резистентності, оскільки нульові лімфоцити, на відміну від імуноглобулінів класу М, не є продуцентами природних аутоантитіл. У зв'язку з цим стало можливим регламентувати фізіологічну норму рівня нульових лімфоцитів у крові, відхилення від якої може судити про зниження, або перенапруження рівня резерву резистентності.

Однако, використання й якості маркера для мазка-фарбника Романовського не дає змогу

цитохімічно виявити гранули ДНК у лімфоцитарних клітинах, внаслідок чого не можливо диференційовано визначити наявність активних та неактивних нульових клітин, останні з яких не складають захисного резерву організму. Тому, наявність у складі показника оцінки резерву резистентності неактивних форм нульових клітин знижує інформативність способу, оскільки резерв резистентності може бути зниженим при збільшеному відносно норми вмісту нульових лімфоцитів, або підвищеним при зниженні їх кількості, внаслідок зміни при цьому активності нульових лімфоцитів.

У основу винаходу поставлена задача створити такий спосіб визначення резерву резистентності, який виключав би вплив на показник оцінки резерву резистентності біологічних факторів організму-таза рахунок цього давав би змогу підвищити інформативність способу.

Вирішення поставленої задачі досягається тим, що в способі визначення резерву резистентності організму, який включає забір крові, виділення лейкоцитарної суміші, обробку її сумішшю еритроцитів барана та суспензією Зімосан-комплемента, приготування мазка для мікроскопії з послідуною обробкою його маркером-фарбником, диференціацію лімфоцитарних клітин на Т-, В- і О-лімфоцити, відповідно винаходу, обробку мазка для мікроскопії проводять фуксинсірчаною кислотою, а потім в мазці диференціюють О-лімфоцити на активні і неактивні за вмістом гранул ДНК у протоплазмі та резерв резистентності організму визначають за співвідношенням

$$R = \frac{L_a}{L_o} \left(\frac{L - L_o}{100} \right),$$

де L_a - процентний зміст активних нульових лімфоцитів;

L_o - процентний зміст активних і неактивних нульових лімфоцитів;

L - процентний зміст Т-, В- і О-лімфоцитів

та при $R < 0,5$ умов. од. визначають знижений, а при $R > 0,5$ умов. од. нормальний рівень резерву резистентності.

Обробку мазка, що приготований для мікроскопії фуксинсірчаною кислотою дає змогу, на відміну від загальнопринятого забарвлення по Романовському, отримати специфічний прояв гранул ДНК в протоплазмі нульових лімфоцитів, що дає змогу потім диференціювати нульові клітини за їх активністю.

Запропонований параметр оцінки резерву резистентності за співвідношенням, який відображає індекс лімфоцитарної активності (R), дає змогу врахувати долю активних нульових лімфоцитів трансформуючих в Т- і В- клітини, та тим самим дає можливість виключити участь в оцінці резерву резистентності неактивних нульових лімфоцитів.

Враховуючи, що нульові активні лімфоцити вкладають резерв трансформації в Т- і В-лімфоцити, вони не можуть приймати участь в аутоімунних процесах, тобто, вони нейтральні, у зв'язку з чим виключається можливість впливу на

них функції біологічних факторів, що забезпечує значне підвищення інформативності визначаючого способу.

Спосіб полягає у наступному.

Здійснюють забір крові з кінцевої фаланги пальця, а потім шляхом гемоліза еритроцитів з послідовним центрифугуванням визначають лейкоцитарну суміш, у яку вносять споживаюче середовище 199 та для запобігання шоку клітини, інкубують на протязі 10 хвилин при 37°C. Потім лейкоцитарну суміш обробляють маркером, для чого у нього вносять 0,3% - ну суспензію еритроцитів барана, 0,1% - ну суспензію комплексу Зімосан-комплемента.

Осадок лейкоцитарних клітин проводять центрифугуванням на протязі 1 хвилини та інкубують на протязі 30 хвилин при 4°C. Для диференціації лімфоцитарних клітин на **T**-, **B**- і **O**- лімфоцити фіксують утворені розетки, додаючи у досліджувану пробу 1,5% - ний водний розчин глютарового альдегіду. Для мікроскопірування готують мазок, який після висихання фіксують сумішшю абсолютного спирту, хлороформу та льодяної оцтової кислоти, а потім термостатують та обробляють маркером-фарбником, в якості якого використовують фуксинсірчану кислоту. Мікроскопічно в препараті визначають вміст Т-лімфоцитів за кількістю еритроцитарних клітин барана, що утворюють Т-розетку з лімфоцитарною клітинною, а вміст В-лімфоцитів - за кількістю індикаторних частин комплексу Зімосан-комплемента, що утворюють В-розетку з лімфоцитарною кліткою. При цьому за О-лімфоцити приймають лімфоцитарні клітини, які не приєднали індикаторні частини.

З ціллю диференціації нульових клітин на активні та неактивні в кожній нульовій клітині підраховують кількість гранул ДНК у протоплазмі. Вважають, що активна клітина вміщує від 15 до 25 гранул ДНК. Неактивна - від 10 до 15 гранул ДНК.

Резерв резистентності організму визначають по співвідношенню

$$R = \frac{L_a}{L_o} \left(\frac{L - L_o}{100} \right),$$

де L_a - відсотковий зміст активних нульових лімфоцитів;

L_o - відсотковий зміст активних та неактивних нульових лімфоцитів;

L - відсотковий зміст **T**-, **B**- і **O**-лімфоцитів

та при $R < 0,5$ умовних одиниць визначають знижені, а при $R > 0,5$ умовних одиниць нормальний резерв резистентності.

Реалізація цього способу підтверджена слідуючими конкретними прикладами.

Приклад 1. Хворий К., 42 років, звернувся у клініку з діагнозом: гостра пневмонія. Для призначення адекватної терапії було проведено дослідження резерву резистентності організму.

Для цього з кінцевої фаланги пальця проведено забір крові у кількості 0,5мл у пробірку, яка містить 0,01мл 10% - ного водного розчину гепарину, котру центрифугували 10 хвилин при 1500об/хв. Надосадну рідину усували, а у лейкоцитарну зв'язь вносили живильну середу 199 та для запобігання шоку клітини суміш інкубували на протязі 10 хвилин при 37°C, а

потім до неї вносили по 0,1мл 0,3% - ої суспензії еритроцитів барана та 0,1% - ої суспензії комплексу Зімосан-комплемента. Проводили м'яке осаджування лейкоцитарних клітин центрифугуванням на протязі 1 хвилини, а потім інкубували на протязі 30 хвилин при 4°C. Для фіксації утворених розеток додавали 0,1мл 1,5% водного розчину глютарового альдегіду, витримували 5 хвилин, зливали надосадочну рідину та добавляли 0,1мл фізіологічного розчину. Потім готували мазок, котрий висушували при кімнатній температурі та фіксували 10 хвилин сумішшю абсолютного спирту, хлороформу та льодяною оцтовою кислотою, узятих у співвідношенні 1 : 0,5 : 0,2 відповідно. Препарат термостатували при 37°C на протязі 1 години, обробляли фуксинсірчаню кислотою на протязі 1 години, промивали водою, висушували при кімнатній температурі та мікроскопірували з імерсійною системою.

В препараті визначали наявність **T**-, **B**- та **O**-лімфоцитів на 100 клітин, котрі складали:

T- лімфоцитів - 51%, **B**- лімфоцитів - 23% та **O**- лімфоцитів - 20%, з котрих активних **O**-лімфоцитів - 17%.

Резерв резистентності визначали по формулі

$$R = \frac{L_a}{L_o} \left(\frac{L - L_o}{100} \right) = \frac{17}{26} \left(\frac{100 - 26}{100} \right) =$$
$$= 0,48 \text{ умов. од.},$$

що свідчило про зниження резерву резистентності організму.

Паралельно у хворого був визначений резерв резистентності засобом за прототипом, тобто по відхиленню від норми 7 - 11% змісту нульових лімфоцитарних клітин.

Оскільки зміст О-лімфоцитів у хворого перевищує їх норму 26%, що свідчить про нормальний рівень захисної реакції організму. Проведене лікування антибактеріальними та протизапальними медикаментами, показаними при даній патології, не виявило істотного впливу на видужання.

Оскільки у хворого запропонованим способом буї встановлений рівень резерву резистентності 0,48умов. од., йому додатково були призначені імуностимулюючі препарати, після примінення яких стан хворого значно покращився.

Повторне визначення резерву резистентності у хворого на 5 - й день після примінення імуностимулюючої терапії показало, що значення рівня резерву резистентності відповідало нормі та становило 0,58 умовних одиниць.

Приведені порівняльні дані підтверджують більш високу у порівнянні з прототипом інформативність запропонованого способу визначення резерву резистентності організму.

Приклад 2. Хворий А., 25 років, звернувся до поліклініки зі скаргами на болі в ділянці нижнього відділу черева. При об'єктивному обстеженні поставлено діагноз хронічний цистоуретрит. Для оцінки рівня резерву резистентності з метою вибору адекватної терапії хворий був обстежений запропонованим та відомими способами.

Результати дослідження периферичної крові: вміст Т-лімфоцитів - 6,2%; В-лімфоцитів - 3,2%; О-лімфоцитів - 6%, в тому числі активних нульових лімфоцитів - 3,3%.

Поскільки вміст нульових лімфоцитів у крові

хворого нижчий норми 6%, рівень резерву резистентності відповідно відомому способу є зниженим. В той же час об'єктивними дослідженнями не були виявлені ознаки астеничного синдрому, що характеризують понижену захисність організму. За запропонованим способом рівень резерву резистентності становив

$$R = \frac{3,3}{6} \left(\frac{100 - 6}{100} \right) = 0,52 \text{ умов. од.}$$

що відповідає нормальному рівню резерву резистентності, котрий підтверджується також об'єктивними клінічними ознаками.

Досягається більш висока інформативність запропонованого способу визначення резерву резистентності, забезпечується виключення можливості впливу біологічних факторів організму на функцію нульових лімфоцитів накоплювати ДНК як енергетичний матеріал та трансформуватись у **T- і B-** лімфоцити.