



УКРАЇНА

(19) UA (11) 46661 (13) U
(51) МПК (2009)
G01N 33/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ СТУПЕНЯ ІМУНОЛОГІЧНОЇ НЕДОСТАТНОСТІ

1

2

(21) u200908710

(22) 19.08.2009

(24) 25.12.2009

(46) 25.12.2009, Бюл.№ 24, 2009 р.

(72) ЧЕРНИШОВА ОЛЬГА МИКОЛАЇВНА

(73) ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ

(57) Спосіб визначення ступеня імунологічної недостатності, що включає навантаження туберкуліном та реєстрацію внутрішньошкірної реакції, який **відрізняється** тим, що туберкуліном навантажують пробу периферичної крові людини, потім вимірюють інтенсивність хемілюмінесценції проби, а ступінь імунологічної недостатності визначають за величиною ємності функціональних резервів імунокомпетентних клітин, яку розраховують за формулою:

$$\text{ЄФР} = \frac{\text{ХЛ}_{\text{туб+т}} - \text{ХЛ}_{\text{спон}}}{\text{ХЛ}_{\text{спон}} - \text{ТС}},$$

де: ЄФР - ємність функціональних резервів імунокомпетентних клітин;

ТС - рівень фонового світіння;

ХЛ_{спон.} - хемілюмінесценція без навантаження алергеном;

ХЛ_{туб+т} - хемілюмінесценція після навантаження туберкуліном і

термостатування протягом 25±1хв. при t=37±0,1°C, і при значеннях цього показника 20 та більше у.о. реєструють відсутність імунологічної недостатності; у межах 16-19у.о. - 1-й ступінь імунологічної недостатності, 10-15,9у.о. - 2-й ступінь імунологічної недостатності, 9,9у.о. та менше - 3-й ступінь імунологічної недостатності.

Корисна модель відноситься до медицини, а також до лабораторних методів виявлення ушкодження імунної системи і може бути використана як інформативний метод, за допомогою якого за одним показником можна установити ступінь імунологічної недостатності організму.

Ушкодження стану імунологічної реактивності лежать в основі розвитку більшості захворювань людини, тому пошук методів, що дозволяють об'єктивно судити про ступінь імунологічної недостатності організму, є актуальною проблемою. Одним з пріоритетних напрямків може стати використання алергійних проявів та ступеня їх виразності, які являються показником порушень нормальної імунної відповіді організму.

Відповідно до класифікації Кумбса й Джелла (1963) усі імунні реакції, що лежать в основі алергійних проявів і синдромів, підрозділяються на 4 типи:

- тип I - Анафілактичні й атопічні реакції - гіперчутливість негайного типу (ГНТ), Ig E-опосередковані;

- тип II - Цитотоксичні реакції;

- тип III - Реакції імунних комплексів;

- тип IV - Клітинноопосередковані реакції - гіперчутливість уповільненого типу (ГУТ) чи реакції туберкульозного типу.

Тип IV - це реакції, що обумовлені функцією імунокомпетентних клітин. Крім гіперчутливості організму до мікобактерій туберкульозу, сюди відноситься також імунна відповідь при реакції відторгнення трансплантата, що характеризує міцність Т-системи імунітету господаря. Це дозволяє за результатами реакцій цього типу судити про стан імунної системи та його ушкодження як у здорових осіб, так і хворих на туберкульоз.

Відносно проби Манту важливо відзначити, що гіперергічною вона вважається, якщо діаметр папули досягає 17мм і більше. Однак особливий інтерес представляє феномен недостатньої прояви реакції (негативна та сумнівна проби, відповідно папула 0-1 і 2-4мм у діаметрі), якщо не спостерігається "відторгнення" інфікованої туберкуліном зони. Це вважається свідченням недостатності функції імунної системи у людини, тобто імунодефіциту, і може бути використано для визначення ступеня його виразності.

Відомий спосіб, в якому пропонується оцінка імунологічного стану та його недостатності шляхом застосування реакцій внутрішньошкірних проб

(19) UA (11) 46661 (13) U

(туберкулінових) та інших, що дозволяють реєструвати розлади в клітинному імунітеті хворих. Так, при негативній пробі Манту діагностували анегію, що підтвердили показниками клітинного імунітету, оскільки спостерігали супресію клітинної ланки імунітету, тобто підвищення рівня Т-супресорів у периферичній крові хворих (Батян А.Н. Иммунологические нарушения у больных туберкулезом легких и пути повышения эффективности лечения: Автореф. дис. докт. мед. наук. - М., 1995. - 35с).

Даний спосіб є найбільш близьким до того, що заявляється, за технічною суттю та результатом, який може бути досягнутим, тому його обрано в якості прототипу.

Основним недоліком способу-прототипу є його інвазивність.

У зв'язку з вищевикладеним, в основу корисної моделі покладена задача зменшення інвазивності та підвищення інформативності способу.

Задачу, яку покладено в основу корисної моделі, вирішують тим, що у відомому способі визначення ступеня імунологічної недостатності, який включає внутрішньошкірні проби з навантаженням туберкуліном, згідно з корисною моделлю, туберкуліном навантажують пробу периферичної крові і вимірюють інтенсивність хемілюмінесценції (ХЛ), а ступінь імунологічної недостатності визначають за величиною ємності функціональних резервів імунокомпетентних клітин, яку розраховують за формулою:

$$\text{ЄФР} = \frac{\text{ХЛ}_{\text{туб}+t} - \text{ХЛ}_{\text{спон}}}{\text{ХЛ}_{\text{спон}} - \text{ТС}},$$

де: ЄФР - ємність функціональних резервів імунокомпетентних клітин, ТС - рівень фонового світіння,

$\text{ХЛ}_{\text{спон}}$ - хемілюмінесценція без навантаження алергеном,

$\text{ХЛ}_{\text{туб}+t}$ - хемілюмінесценція після навантаження туберкуліном і

термостатування протягом 25 ± 1 хв. при $t=37 \pm 0,1^\circ\text{C}$

і при значеннях цього показника 20 та більше у.о. реєструють відсутність імунологічної недостатності; у межах 16-19 у.о. - 1-й ступінь імунологічної недостатності, 10-15,9 у.о. - 2-й ступінь імунологічної недостатності, 9,9 у.о. та менше - 3-й ступінь імунологічної недостатності.

Спосіб здійснюють таким чином. З венозної гепаринізованої крові хворого, узятої натще, виділяють у градієнті щільності фікол-верографіну ($d=1,077$) популяцію мононуклеарів (лімфоцити, моноцити), двічі відмивають від слідів верографіну й фіколу розчином Рінгера. Розводять суспензію клітин до $1-1,5$ млн./мл і поміщають по 50мкл у 2 пробірки. Потім у пробірки додають по 1 мл фізрозчину (0,9% NaCl), 10мкл люмінолу (1мг/мл) і перед виміром - 20мкл 3%-ного перекису водню. Після цього проводять реєстрацію люмінолзалежної хемілюмінесценції (ЛЗХЛ), вимірюючи інтенсивність надслабкого світіння (імпл/с) у діапазоні від 200 до 600нм у режимі рахунку фотонів. Спочатку вимірюють рівень фонового світіння, а потім до другого зразка додають 0,2 ТО туберкуліну і інкубують суміш 25 ± 1 хвилин у термостаті при темпе-

ратурі $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$, та вимірюють інтенсивність ХЛ, а ступінь імунологічної недостатності визначають за величиною ємності функціональних резервів імунокомпетентних клітин, яку розраховують за формулою:

$$\text{ЄФР} = \frac{\text{ХЛ}_{\text{туб}+t} - \text{ХЛ}_{\text{спон}}}{\text{ХЛ}_{\text{спон}} - \text{ТС}}$$

де: ЄФР - ємність функціональних резервів імунокомпетентних клітин, ТС - рівень фонового світіння,

$\text{ХЛ}_{\text{спон}}$ - хемілюмінесценція без навантаження алергеном,

$\text{ХЛ}_{\text{туб}+t}$ - хемілюмінесценція після навантаження туберкуліном і термостатування протягом 25 ± 1 хв. при $t=37 \pm 0,1^\circ\text{C}$

і при значеннях цього показника 20 та більше у.о. реєструють відсутність імунологічної недостатності; у межах 16-19 у.о. - 1-й ступінь імунологічної недостатності; 10-15,9 у.о. - 2-й ступінь імунологічної недостатності; 9,9 у.о. та менше - 3-й ступінь імунологічної недостатності.

Ефективність способу ілюструють наступні приклади.

Приклад 1

Хворий М., історія хвороби №709, вік 55 років, в минулому робітник ливарного цеху, чистильник, стаж у шкідливих умовах праці в пиловій професії 27 років. Основний діагноз - хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ) пиловий етіології II стадії, у фазі ремісії, невеликий пневмофіброз, емфізема легень II стадії, легенева недостатність II стадії.

За результатами виміру ЛЗХЛ клітин крові й підрахунку за формулою показник ЄФР складає 75,9 у.о.

Висновок: показник ємності функціональних резервів вище 20 у.о., слід діагностувати відсутність імунологічної недостатності. Це збігається з даними імунного статусу, де кількість Т-хелперів (CD4) складає 31%, а число Т-супресорів (CD8) - 14%. Імунорегуляторний індекс (ІРІ), що означає співвідношення CD4/CD8, складає число 2,21 (норма 1,4-1,8), що навіть перевищує норму і дозволяє робити висновок про відсутність імунологічної недостатності.

Приклад 2

Хворий А., історія хвороби №726, вік 57 років, в минулому робітник ливарного цеху, стриженьщик, стаж у шкідливих умовах праці, в пиловій професії 33 роки. Основний діагноз - хронічне обструктивне захворювання легень, токсико-пиловий етіології II стадії, у фазі ремісії, невеликий пневмофіброз. Супутні захворювання - гіпертонічна хвороба II стадії.

За результатами виміру ЛЗХЛ клітин крові й підрахунку за формулою, показник ЄФР складає - 17,7 у.о.

Висновок: показник ємності функціональних резервів трошки менше межі норми (20 у.о.), слід діагностувати перший, тобто невеликий ступінь імунологічної недостатності. Це узгоджується з даними імунного статусу, де ще не реєструється дисбаланс в співвідношенні між хелперами та супресорами, однак величини їх знижені. Кількість Т-

хелперів (CD4) складає 15%, число Т-супресорів (CD8) - теж 15%. ІРІ - співвідношення CD4/CD8, складає число 1,0, що також нижче норми (1,4-1,8). Таким чином, усі показники свідчать про певну ступінь імунологічної недостатності.

Приклад 3

Хвора М, історія хвороби №761, вік 49 років, робітниця ливарного виробництва, формувальниця, стаж у шкідливих умовах праці 12 років. Діагноз - хронічне обструктивне захворювання легень пиловий етіології, II-III стадії, вторинна персистируюча бронхіальна астма II-III стадії, емфізема II стадії, невеликий пневмофіброз. Супутні захворювання - холецистит, гіпертонічна хвороба II стадії. За результатами виміру ЛЗХЛ клітин крові й підрахунку за формулою показник ЄФР складає 13,4у.о.

Висновок: показник ємності функціональних резервів знаходиться у межах 16-19у.о., що дозволяє діагностувати 2-й ступінь імунологічної недостатності. Це узгоджується з даними імунного статусу. У даному випадку перевищує число Т-супресорів (CD8), яке складає 33% і нижче - кількість Т-хелперів (CD4) - 27%, що відповідає супре-

сії клітинної ланки імунітету. ІРІ (CD4/CD8) у цій хворобі значно знижений, складає 0,82 і свідчить про наявність імунодефіциту.

Приклад 4

Хворий С, історія хвороби №745, вік 48 років, в минулому електрозварник, стаж у шкідливих умовах праці 17 років. Основний діагноз - хронічне обструктивне захворювання легень токсикопиловий етіології II стадії, ускладнення - початковий пневмофіброз.

За результатами виміру ЛЗХЛ клітин крові й підрахунку за формулою, показник ЄФР складає - 7,4у.о.

Висновок: показник ємності функціональних резервів менше 9,9у.о., що дозволяє діагностувати 3-й ступінь імунологічної недостатності. Це узгоджується з даними імунного статусу. Число Т-супресорів (CD8) складає 29% і перевищує кількість Т-хелперів (CD4) - 17%, що відповідає супресії клітинної ланки імунітету. ІРІ в цьому випадку низький, складає 0,58. Таким чином, усі показники вказують на наявність імунодефіциту.