

Винахід відноситься до галузі медицини, зокрема - імунології, і може використовуватися при лабораторних дослідженнях з метою визначення імунологічного статусу організму.

Відомі способи дослідження популяцій та субпопуляцій лімфоцитів, що ґрунтуються на виявленні активності у клітинах ферментів - кислих гідролаз, що можуть виступати як маркери клітин різних типів. Одним із таких способів є обраний нами як прототип спосіб дослідження лімфоцитів [1].

Вказаний спосіб передбачає приготування мазка та забарвлення його для виявлення активності ферменту - кислої неспецифічної естерази (КНЕ) - шляхом витримання у субстратно-буферному інкубаційному середовищі, що містить відповідний субстрат (наприклад - нафтілбутиратестеразу) у фосфатному буфері. Забарвлений мазок дофарбовують для виявлення ядер клітин ядерним барвником, наприклад, ядерним тривким червоним.

За характером виявленої активності КНЕ наведений спосіб дозволяє ідентифікувати В-лімфоцити, у яких активність не проявляється, а також Т-хелпери, у яких активність КНЕ проявляється у вигляді великих забарвлених гранул. Крім того, О-лімфоцити, у яких проявляється дрібногранулярна активність КНЕ, можна виявити за розмірами. Що ж до Т-супресорів, Т-кіллерів та В-активованих лімфоцитів, то у всіх цих клітинах КНЕ має однакову дрібногранулярну активність, в тому їх неможливо ідентифікувати. Це знижує діагностичну цінність способу-прототипу.

В основу винаходу покладена задача створити таку технологію забарвлення мазка, яка б дозволила на базі використання єдиного субстратно-буферного інкубаційного середовища одночасно виявляти активність кислої фосфатази, і КНЕ (КФ), і таким чином одержувати вичерпну інформацію щодо популяцій лімфоцитів та субпопуляцій Т-лімфоцитів.

Технічний результат винаходу полягає в тому, що активність КНЕ виявляється у вигляді велико- або крупногранульованої зернистості, а активність КФ - у вигляді темно-рожевих плям або середньо- та дрібногранульованої зернистості: поєднання цих ознак у різних комбінаціях дозволяє ідентифікувати будь-яку клітину з тих, що досліджуються.

Поставлена задача вирішена способом визначення популяцій лімфоцитів на мазках крові шляхом витримання їх в інкубаційному середовищі, що містить нафтол-As-фосфат, парарозанилін, натрій азонокислий і ацетатний буферний розчин з дофарбуванням ядерним барвником і ідентифікації клітин за розміром і присутністю пофарбованих гранул і лізосом, згідно з винаходом, середовище додатково містить  $\alpha$ -нафтилацетат натрію при таких співвідношеннях компонентів (мас. %):

нафтол As-фосфат	50-50,5
$\alpha$ -нафтилацетат натрія	25-25,5
4% натрій азотистокислий	3,0-3,1
4% парарозанилін	3,0-3,1
Ацетатний буфер pH 5,0-5,2	остальное,

Ацетатний буфер при pH 5,0-5,2 - решта, і якщо рожева лізосома розміром 5-7 мкм і темно-сині гранули, то лімфоцит відносять до Т-хелперів; якщо в клітині присутні більш як одна рожева лізосома і дрібно гранульована темно-синя зернистість - до Т-супресорів; якщо в клітині присутні рожеві лізосоми розміром 1,0-1,5 мкм і дрібногранульована темно-синя зернистість - до Т-кіллерів; якщо в клітині присутня рожева і темно-синя дрібно і середня зернистість - до О-лімфоцитів і активованих В-лімфоцитів; якщо в клітині відсутні лізосоми і гранули, то лімфоцит відносять до В-лімфоцитів.

Встановлена можливість забарвлення одного мазка у складному субстратно-буферному інкубаційному середовищі із загальним ацетатним буфером, дозволяє одночасно виявити активність і КФ, і КНЕ. Таке подвійне забарвлення забезпечує нову і досить достовірну інформацію - дає змогу виявити в одному мазку як популяції (Т, В та О) лімфоцитів, такі субпопуляції Т-лімфоцитів - хелпери, супресори і кіллери.

Слід підкреслити, що новий ефект від винаходу аж ніяк не зводиться до суми ефектів, що їх дає окреме забарвлення різних мазків на активність КФ і КНЕ, оскільки саме при одночасному фарбуванні властиві кожному ферментові характерні маркірувальні забарвлення взаємно доповнюють одне одного. Як буде показано нижче, це дозволяє однозначно "розшифрувати" мазок. Для пояснення винаходу нижче даємо опис конкретної реалізації способу та наводимо ілюстративні матеріали, де на фіг. 1-6 схематично зображені клітини забарвлені за нашим способом. Позиція 1 на всіх фігурах показує активність КФ, а позиція 2 - активність КНЕ. Спосіб виявлення популяцій лімфоцитів і субпопуляцій Т-лімфоцитів реалізується таким чином.

Мазок крові з пальця, попередньо обробленого спиртом, протягом 3 хвилин фіксують у парах нейтрального формаліну промивають дистильованою водою, с шать.

Гутоють інкубаційне середовище такого складу: 10 мг  $\alpha$ -нафтілацету натрію розчиняють у кількох краплях ацетону. Так само готують розчин 20 мг нафтол-As-фосфату. Одержані розчини субстратів послідовно вводять у загальний ацетатний буферний розчин у кількості 40 мл, для приготування якого 2,7 г оцтовокислого натрію попередньо розчиняють у 100 мл дистильованої води і доводять pH розчину до 5-5,4, використовуючи для цього 50%-ну оцтову кислоту. Розчин субстратів у загальному буфері (розчин № 1) може використовуватися протягом місяця при зберіганні у холодильнику (+5°C).

Другий компонент інкубаційного середовища (розчин № 2) готують так: 4 г фуксину основного для фуксинсірчаної кислоти розчиняють у 100 мл 2N розчину HCl і отримують в результаті 4%-ний розчин парарозаниліну. На дистильованій воді готують 4%-ний розчин натрію азотистокислого. Розчин парарозаниліну та натрію азотистокислого змішують по 8 крапель кожного і після проходження реакції азосполучення (1-1,5 хв, у нормальних умовах) отримують розчин № 2.

Розчин № 2 вводять у розчин № 1 і отримане таким чином інкубаційне середовище нагрівають до 37°C. В ньому розмішують приготовлений мазок. Час інкубації у термостаті 1-2 години. Протягом інкубації ступінь забарвлення можна контролювати під мікроскопом.

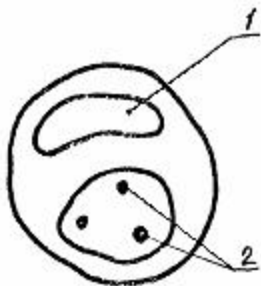
Забарвлений мазок промивають дистильованою водою і дофарбовують для виявлення ядер клітин 1%-ним розчином метилового зеленого, відмитого хлороформом від фіолетової фракції, потім остаточно промивають,

сушать та мікроскопіюють з Імерсійним маслом при окулярі 10х та об'єктиві 90. При цьому в мазках крові одночасно виявляють активність КНЕ у вигляді велико- або крупногранульованої зернистості та КФ у вигляді темно-рожевих плям або середньої та дрібногранульованої зернистості. Ядра клітин забарвлені у зелений колір.

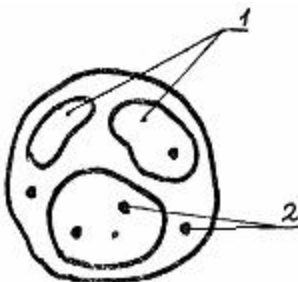
Одночасне фарбування мазків на КНЕ і КФ дозволяє встановити, що за наявності у Т-лімфоцитах великогранульованої зернистості КНЕ, характерної для Т-хелперів, активність КФ матиме вигляд однієї темно-рожевої плями (див. фіг. 1). Дві темно-рожеві плями КФ та дрібногранульована зернистість КНЕ характерна для Т-супресорів (див. фіг. 2). Для Т-кіллерів характерна великогранульована зернистість КФ у вигляді округлих або полігональних гранул та дрібногранульована зернистість КНЕ (див. фіг. 3). В-лімфоцити не виявляють активності КФ і КНЕ (див. фіг. 4). В-активовані лімфоцити (див. фіг. 5) мають дрібногранульовано-дифузне забарвлення КФ та дрібногранульоване забарвлення КНЕ. В-активовані та О-лімфоцити відрізняються тим, що перші мають розмір середніх або великих лімфоцитів, а також меншу щільність забарвлення ядра метиловим зеленим (на 1 або 2 хреста).

Слід зазначити, що правильність ідентифікації Т-супресорів та Т-кіллерів за активністю КФ (відповідно дві плями та одна) у поєднанні з типом забарвлення на КНЕ збігається із спостереженнями Д.Ф.Глузмана (див. вище), який проводив дослідження методами змішанного розеткоутворення та моноклональних антитіл і зазначав, що у Т-супресорах і Т-кіллерах повинно виявлятися відповідно "дуже висока" і просто "висока" активність КФ.

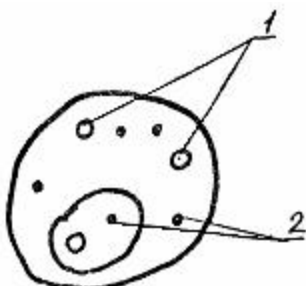
Із всього сказаного можна зробити висновок: спосіб, що заявляється, потребує використання порівняно простих реактивів та нескладного обладнання, дозволяє на одному мазку і за один прийом отримати повну та достовірну інформацію як при популяції лімфоцитів, так і при субпопуляції Т-лімфоцитів. Це робить його зручним та інформативним при імунологічних дослідженнях.



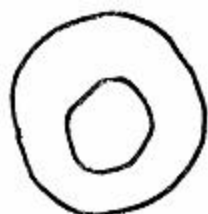
Фиг. 1



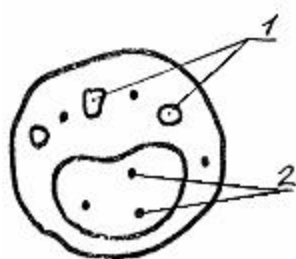
Фиг. 2



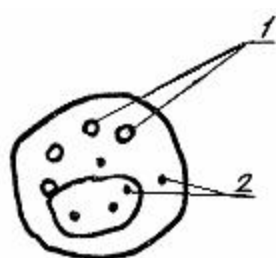
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6