



УКРАЇНА

(19) UA (11) 40061 (13) A

(51) 6 G01N33/53

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ОРГАНІЗМУ

(21) 99095338

(22) 28.09.1999

(24) 16.07.2001

(33) UA

(46) 16.07.2001, Бюл. № 6, 2001 р.

(72) Ткаченко Вадим Васильович, Голік Виктор Павлович, Гончаренко Марія Степанівна, Куц Павел Валерьевич

(73) Харківський державний медичний університет, UA

(57) Спосіб оцінки резистентності організму, який включає забір крові, приготування мазка для мікроскопування з послідовним визначенням загальної кількості тромбоцитів, який **відрізняється** тим, що додатково у пробу крові вводять маркер - фуксинсірчану кислоту, термостатують, а потім у мазку диференціюють зруйновані тромбоцити та 0-

лімфоцити клітини і оцінку резистентності визначають за рівнем трансформації 0-лімфоцитарних клітин у імунокомпетентні, який обчислюють по відношенню:

$$PT = \frac{T_3}{T_0 \cdot L_0} \cdot K, \text{ де}$$

PT - рівень клітинної трансформації;

T<sub>3</sub> - тромбоцити зруйновані;T<sub>0</sub> - загальна кількість тромбоцитів;L<sub>0</sub> - 0-лімфоцитні клітини;

K - нормуючий коефіцієнт, рівний 100,

при PT=0,3-0,6 визначають нормальний рівень трансформації 0-лімфоцитарних клітин у імунокомпетентні, а при PT<0,3>0,6 - зниження або перепадна рівня трансформації.

Винахід відноситься до медицини, зокрема до імунології, та може бути використаний для оцінки імунного статусу людини.

Відомий традиційний спосіб визначення імунокомпетентних клітин, що включає забір крові, виділення лейкоцитарної зависі, інкубацію лейкоцитів у присутності індикаторної частки, підрахування розеткоутворюючих клітин (В.М. Меньшиков, Клиническая лабораторная диагностика. М., 1987).

Для цього забір крові здійснюють з локтевої вени у пробірку з розчином гепаріна, відділяють плазму від клітин крові, центрифугують протягом 40 хвилин, а потім відділяють лейкоцитарну завись від еритроцитарної маси і відмивають її (лейкоцитарну завись) буферним розчином. Для збереження функціональної здібності лейкоцитарних клітин у лейкоцитарну завись додають харчовальну середу 199 і для переборення шоку клітини інкубують протягом 60 хвилин при t +37°C. Здійснюють інкубацію лейкоцитів у присутності індикаторних частин для чого при визначенні Т-лімфоцитів до лейкоцитарної зависі додають 0,5% суспензію еритроцитів барана і інкубують протягом 10 хвилин при t +37°C, а потім пробу центрифугують 5 хвилин і інкубують протягом 12 годин при t +4°C.

Для фіксації утворених розеток додають 1,5% водяний розчин глютарового альдегіду, витримують 5 хвилин і із отриманої зависі готують препарат, висушують його на повітрі з посліду-

чою фіксацією цього препарату абсолютним етиловим спиртом і фарбують азур-еозіном за Романовським, промивають, висушують і мікроскопують з імерсійною системою.

Паралельно для визначення В-лімфоцитів до залишеної частини лейкоцитарної зависі додають сенсibilізовані еритроцити барана, змішані з компліментом, суміш інкубують протягом 45 хвилин при t +37°C, створені розетки фіксують глютаровим альдегідом, з отриманої зависі аналогічно готують препарат, мікроскопують.

Визначають Т-лімфоцити за кількістю еритроцитарних клітин барана, утворюючих Т-розетку з лімфоцитарною клітиною і В-лімфоцити за кількістю сенсibilізованих лейкоцитарних клітин барана, змішаних з компліментом, створюючих В-розетку з лімфоцитарною клітиною. У двох випадках за розетку прийнятий лімфоцит, який приєднав 3 і більше еритроцитарних клітин барана.

Суттєвим недоліком способу є його багатоступовість, що ускладнює і збільшує тривалість визначення. Спосіб не знайшов широкого застосування у медичній практиці, за неможливістю тривалого збереження еритроцитів барана, трудомісткістю забору проби крові у тварин і високої вартості реактивів. Ефективність способу знижується також за необхідністю визначення Т- і В-лімфоцитів, за використанням різних препаратів,

(19) UA (11) 40061 (13) A

що не дозволяє урахувати зміст 0-лімфоцитів, а отже знижує його інформативність.

Найбільш близьким технічним рішенням до винаходу за технічною суттєвістю є спосіб визначення резерву резистентності організму, який полягає в заборі крові, виділення лейкоцитарної зависі, обробку її зависю еритроцитів барана і суспензією комплексу Зімозан-комплімент, виготовлення мазка для мікросконування з послідуною обробкою його маркером-фарбником, диференціацію лімфоцитарних клітин на Т-, В-, 0-лімфоцити, згідно з винаходом, обробку мазка для мікросконування ведуть фуксін-сірчаною кислотою, а потім у мазку диференціюють 0-лімфоцити на активні і неактивні за змістом гранул ДНК у протоплазмі і резерв резистентності організму визначають за відношенням:

$$R = \frac{L_a}{L_0} \left( \frac{L - L_0}{100} \right),$$

де  $L_a$  - відсотковий зміст активних нульових лімфоцитів;

$L_0$  - відсотковий зміст активних і неактивних нульових лімфоцитів;

$L$  - відсотковий зміст Т-, В- і 0-лімфоцитів і при  $P < 0,5$  умовних одиниць визначають знижений, а при  $P > 0,5$  умовних одиниць - нормальний рівень резерву резистентності (патент № 24686 А).

В порівнянні з раніше написаним даний спосіб дозволяє диференціювати 0-лімфоцити на активні і неактивні за змістом гранул ДНК у протоплазмі 0-лімфоцитарних клітин, що дає змогу урахувати резерв трансформації 0-лімфоцитів у Т- і В-клітинах, а слідчить, визначити можливий рівень у імунокомпетентних клітин при виникненні дефіциту активності резистентності організму.

Однак, даний спосіб виключає можливість урахування рівня трансформуючого факту, сприяючого підвищенню активності процесу перетворення 0-лімфоцитів у імунокомпетентні Т- і В-клітини.

В основу винаходу поставлена задача створити такий спосіб визначення резистентності організму, який дозволить урахувати рівень активності процесу трансформації 0-лімфоцитів у імунокомпетентні Т- і В-клітини.

Рішення задачі досягається тим, що у способі визначення резистентності організму за рівнем трансформації імунокомпетентних клітин, що включає забір проби крові з послідуочим введенням в неї маркера фуксін-сірчаної кислоти, отримують лейкоцитарну завись, готують мазок для мікроскопії, з послідуочим визначенням загальної кількості тромбоцитів, зруйнованих лімфоцитарних клітин і 0-лімфоцитів.

Резистентність організму визначають за рівнем трансформації 0-лімфоцитів у імунокомпетентні клітини за відношенням:

$$PT = \frac{T_3}{T_0 \cdot L_0} \cdot K,$$

де  $PT$  - рівень трансформації;

$T_3$  - тромбоцити зруйновані;

$T_0$  - загальна кількість тромбоцитів;

$L_0$  - 0-лімфоцитарні клітини;

$K$  - нормуючий коефіцієнт, рівний 100, і при  $PT = 0,3-0,6$  умовних одиниць визначають нормальний рівень трансформації, а при  $PT < 0,3 > 0,5$  умовних одиниць - знижений, або перенапружений рівень трансформації.

Обробку мазка, виготовленого для мікроскопії фуксін-сірчаною кислотою, дає можливість диференціювати в загальній кількості тромбоцитів зруйновані форми, а також 0-лімфоцити за змістом гранул ДНК у їх протоплазмі.

Запропонований параметр оцінки резистентності організму за співвідношенням відображаючого рівень трансформації ( $PT$ ) дає змогу урахувати удільну ефективність комплексу поліпептиду для стимуляції 0-лімфоцитарних клітин (Кузник Б.И. и др. Иммунотенез, гемостаз и неспецифическая резистентность организма. Москва, 1987). Співвідношення

$\frac{T_3}{T_0}$  дозволяє урахувати кількість поліпептидів, або удільну ефективність даного тромбоцита для стимуляції одного 0-лімфоцита, а саме визначити рівень поліпептидів, необхідних для трансформації одного лімфоцита у імунокомпетентну клітину. Отже

$\frac{T_3}{T_0 \cdot L_0}$  визначає удільну ефективність одного тромбоцита для стимуляції 0-лімфоцитарних клітин. Після перетворення даного співвідношення формула для розрахунку має такий вигляд:

$\frac{T_3}{T_0 \cdot L_0} \cdot K$ , де  $K$  - нормуючий коефіцієнт, рівний 100.

Спосіб полягає у наступному. У обстеженого здійснюють забір крові з кінцевої фаланги пальця. У пробірку з забором крові вносять 3% розчин цитрату натрію і центрифугують для виділення клітинної зависі. У лейкоцитарну завись вносимо харчовальну середу 199 і для запобігання шоку клітин інкубують завись протягом 10 хвилин при  $t + 37^\circ\text{C}$ . Потім лейкоцитарну завись обробляють маркером (фуксін-сірчаною кислотою). Пробу крові термостатують при  $t + 37^\circ\text{C}$  протягом одної години. Після цього готують мазок крові на предметному склі. Мазок висушують, фіксують у фіксаторі за Май-Грюнвальдом протягом 1 хвилини. Промивають водою з послідуочим висушуванням на повітрі. Після цього отриманий мазок фарбують за Романовським. Мазок проби крові мікросконують і підраховують у ньому кількість загальних тромбоцитів, кількість зруйнованих лімфоцитів і 0-лімфоцитів.

За 0-лімфоцити приймають клітину, у протоплазмі якої містяться від 10 і більше гранул ДНК. Зруйновані тромбоцити визначаються за їх фарбою маркером оранжево-жовтого кольору. Не зруйновані тромбоцити визначаються вишнево-синього кольору (фарбник Романовського). Розрахунок проводиться на 100 лімфоцитарних клітин.

Оцінку резистентності організму за рівнем трансформації імунокомпетентних клітин визначають за співвідношенням:

$$PT = \frac{T_3}{T_0 \cdot L_0} \cdot K,$$

де PT - рівень трансформації;

$T_3$  - тромбоцити зруйновані;

$T_0$  - загальна кількість тромбоцитів;

$L_0$  - 0-лімфоцити клітини;

$K$  - нормуючий коефіцієнт, рівний 100 та при  $PT=0,3-0,6$  умовних одиниць визначають нормальний рівень трансформації, а при  $PT<0,3>0,6$  умовних одиниць - знижений або перенапружений рівень трансформації.

Приклад 1. Хворий Т., 43 роки, потрапив до клініки з діагнозом: гостра пневмонія. Для оцінки імунного статусу і послідовного призначення адекватної терапії проведено дослідження рівня трансформації імунокомпетентних клітин.

При дослідженні периферичної крові були отримані такі результати:

$T_0$  - тромбоцити загальні -  $180 \cdot 10^{12/n}$ .

$T_3$  - тромбоцити зруйновані -  $20 \cdot 10^{12/n}$ ;

$L_0$  - 0-лімфоцити - 26%;

$L_a$  - активні 0-лімфоцити - 17%;

$T$ -лімфоцити - 51%;

$B$ -лімфоцити - 23%.

Резистентність організму за рівнем трансформації імунокомпетентних клітин визначають за формулою:

$$PT = \frac{T_3}{T_0 \cdot L_0} \cdot 100 = \frac{20}{180 \cdot 26} \cdot 100 = 0,42 \text{ ум.од.},$$

що свідчить про нормальну резистентність організму.

Паралельно у хворого був визначений резерв резистентності за прототипом за формулою:

$$R = \frac{L_a}{L_0} \left( \frac{L - L_0}{100} \right) = \frac{17}{26} \left( \frac{100 - 26}{100} \right) = 0,48 \text{ ум.од.},$$

що свідчить про зниження резерву резистентності організму (норма 0,5 та більше).

Оскільки у хворого запропонованим способом резистентність організму була у нормі, тому імуностимулятори у комплексній терапії не призначались.

Хворий був виписаний у задовільному стані.

Приклад 2. Хворий К., 24 роки, звернувся до поліклініки зі скаргами на біль у ділянці нижнього відділу живота. Після об'єктивного дослідження встановлений діагноз: хронічний цистоуретрит. Для оцінки резистентності організму за рівнем трансформації імунокомпетентних клітин і за прототипом було проведено дослідження периферичної крові. Результати дослідження:

$T_0$  - тромбоцити загальні -  $320 \cdot 10^{12/n}$ .

$T_3$  - тромбоцити зруйновані -  $22 \cdot 10^{12/n}$ ;

$L_0$  - 0-лімфоцити - 6%;

$L_a$  - активні 0-лімфоцити - 3,3%;

$T$ -лімфоцити - 62%;

$B$ -лімфоцити - 32%.

За запропонованим способом резистентність організму за рівнем трансформації складала:

$$PT = \frac{T_3}{T_0 \cdot L_0} \cdot 100 = \frac{22}{320 \cdot 6} \cdot 100 = 1,1 \text{ ум.од.}$$

що свідчить про напругу процесу імуотрансформації організму, тоді як за прототипом резерв резистентності склав:

$$R = \frac{L_a}{L_0} \left( \frac{L - L_0}{100} \right) = \frac{3,3}{6} \left( \frac{100 - 6}{100} \right) = 0,52 \text{ ум.од.},$$

що відповідає нормальному рівню резерву резистентності (норма 0,5 умовних одиниць та більше).

Згідно з прототипом хворому у комплексній терапії не доцільно назначати імуномодулятори, у той час як за запропонованим способом рівень трансформації імунокомпетентних клітин підвищував нормальні параметри даного показника, що свідчить про необхідність призначення йому у загальній терапії імунодепресантів (антибіотиків) з антигістамінними препаратами (діазолін).

Після проведеного лікування хворий був виписаний у задовільному стані.

Приклад 3. Хвора О., 48 років, звернулася до поліклініки, гінекологічного кабінету. Після об'єктивного дослідження встановлений діагноз: хронічний аднексит. Для оцінки резистентності організму за запропонованим способом і прототипом було проведено дослідження периферичної крові. Результати дослідження:

$T_0$  - тромбоцити загальні -  $280 \cdot 10^{12/n}$ .

$T_3$  - тромбоцити зруйновані -  $8 \cdot 10^{12/n}$ ;

$L_0$  - 0-лімфоцити - 13%;

$L_a$  - активні лімфоцити - 10%;

$T$ -лімфоцити - 55%;

$B$ -лімфоцити - 32%.

За запропонованим способом резистентність організму за рівнем трансформації складала:

$$PT = \frac{T_3}{T_0 \cdot L_0} \cdot 100 = \frac{8}{280 \cdot 13} \cdot 100 = 0,21 \text{ ум.од.},$$

що свідчить про знижену активність процесу імуотрансформації організму, тоді як за прототипом резерв резистентності склав:

$$R = \frac{10}{13} \left( \frac{100 - 13}{100} \right) = 0,66 \text{ ум.од.},$$

що відповідає нормальному рівню резистентності організму (норма 0,5 умовних одиниць і більше).

Згідно з прототипом хворій у комплексній терапії не доцільно назначати імунотерапію, у той час як за запропонованим нами способом рівень імуотрансформації знаходився нижче нормальних величин - 0,21 ум.од. (норма 0,3-0,6 ум.од.). Цей показник свідчить про необхідність призначення хворій імуностимуляторів (лізоцим у сполученні з вітамінами). Після проведеного лікування показники периферичної крові склали:

$T_3$  - тромбоцити зруйновані -  $8 \cdot 10^{12/n}$ ;

$T_0$  - загальна кількість тромбоцитів -  $280 \cdot 10^{12/n}$ ;

$L_0$  - 0-лімфоцити - 7%.

Резистентність організму за рівнем трансформації складала:

$$PT = \frac{8}{280 \cdot 7} \cdot 100 = 0,41 \text{ ум.од.},$$

що свідчить про відновлення активності процесу імуотрансформації та адекватно проведеної комплексної терапії.

---

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 60х84 1/8.  
Обсяг \_\_\_\_\_ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. \_\_\_\_\_

---

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

---