



УКРАЇНА

(19) UA (11) 42062 (13) U
(51) МПК (2009)
G01N 33/50МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ СТАНУ АКТИВНОСТІ ЛУЖНОЇ ФОСФАТАЗИ НЕЙТРОФІЛІВ

1

(21) u200814781

(22) 22.12.2008

(24) 25.06.2009

(46) 25.06.2009, Бюл.№ 12, 2009 р.

(72) ОМЕЛЬЯНЧИК ЛЮДМИЛА ОЛЕКСАНДРІВНА,
КОЛІСНИК НАДІЯ ВАСИЛІВНА, САМОЙЛЕНКО
ЖАННА СЕРГІЙВНА, СКИРТА ВАЛЕНТИНА ФЕДО-
РІВНА(73) ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
"ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ"
МІНІСТЕРСТВА ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ(57) Спосіб оцінки стану активності лужної фосфа-
тази нейтрофілів, що включає реєстрацію дати
дослідження, забір капілярної крові, приготування
мазка, висушування мазка, фіксацію мазка у роз-
чині формаліну в абсолютному етанолі, інкубацію
мазка із забуференим розчином α -
нафтилфосфату (рН 9,75) з фарбником міцним
гранатовим, промивання проточною водою, дофа-
рбовування мазка метиловим зеленим, висушу-
вання на повітрі, визначення у 100 нейтрофілах

2

активності лужної фосфатази за коричневим ко-
льором гранул у цитоплазмі клітин, порівняння
даних пацієнта з показником цього ферменту в
популяції, який **відрізняється** тим, що додатково
визначають відносну активність лужної фосфатази
за формулою:

$$\text{ЛФН}_{\text{відн.}} = \frac{\text{ЛФН}_n}{36,3 + 1,5x} \times 100\%, (1)$$

де

$\text{ЛФН}_{\text{відн.}}$ - відносна активність ЛФн у обстежуваної
особи, %;

ЛФН_n - активність ЛФн в обстежуваної особи, у.о.;

36,3 - постійний коефіцієнт активності ферменту в
популяції протягом року, у.о.;

1,5 - постійний коефіцієнт впливу місяця року на
активність ферменту;

x - порядковий номер місяця року,
за значенням якої роблять висновок про стан ак-
тивності лужної фосфатази нейтрофілів пацієнта.

Спосіб відноситься до галузі медицини, а саме
лабораторної діагностики. Може бути використа-
ний у гематології, імунології, терапії, хірургії, аку-
шерстві, гінекології та ін.

Відомий спосіб визначення стану активності
лужної фосфатази нейтрофілів (ЛФн) (К.Ф.
3.1.3.1.) цитохімічним методом азосполучення за
Найхое, Quaglinо [Ф.Г. Дж. Хейхоу, Д. Кваглино.
Щелочная фосфатаза: методы азосочетания /
Гематологическая цитология. - М.: Медицина. -
1983. - С.143. - 320 с], який включає: забір капіля-
рної крові; приготування мазка; висушування маз-
ка на повітрі; фіксацію мазка в 10% розчині фор-
маліну в абсолютному етанолі протягом 30±1с при
температурі 0±5°C; інкубацію мазка при кімнатній
температурі протягом 5-10хв. у свіжоприготовано-
му субстратно - буферному розчині (рН 9,75), який
містить у 35мл 0,05моль/л пропандіолового буфе-
ру 35мг α -нафтилфосфату натрію, 35мг фарбника
міцного гранатового; швидке промивання проточ-
ною водою; дофарбовування 2% метиловим зеле-
ним протягом 15±1хв.; висушування; мікроскопу-
вання; виявлення активності ЛФн за забарвленими

у коричневий колір гранулами у місцях локалізації
ферменту, підрахунок активності ЛФн у 100 нейт-
рофілах в умовних одиницях за Астальді-Верга.
Для чого, залежно від кількості забарвлених гра-
нул у цитоплазмі, досліджувані нейтрофіли розпо-
діляють на 4 групи: з негативною реакцією (-), сла-
бокопозитивною (+), позитивною (++) і різко
позитивною (+++); далі число нейтрофілів з одна-
ковою інтенсивністю забарвлення помножують на
відповідне даній групі число плюсів, сума цих до-
бутків складає умовні одиниці (у.о.); отримані дані
порівнюють з даними, що визначені у практично
здорової людини (у контролі), і за цим показником
роблять висновок про стан активності лужної фо-
сфатази у пацієнта.

Недоліком даного способу є неврахування по-
казника активності ЛФн, який відображає актив-
ність ферменту в різні пори року, що обумовлює
некоректну оцінку результатів дослідження.

Ознаками, спільними з рішенням, що заявля-
ється, є:

- забір капілярної крові;
- приготування мазка;
- висушування мазка на повітрі;

(19) UA (11) 42062 (13) U

- фіксація мазка в 10% розчині формаліну в абсолютному етанолі протягом 30 ± 1 с при температурі $0 \pm 5^\circ\text{C}$;

- інкубація мазка при кімнатній температурі протягом 5-10хв. у свіжоприготованому субстратно-буферному розчині (рН 9,75), який містить у 35мл 0,05моль/л пропандіолового буферу 35мг α -нафтілфосфату натрію, 35мг міцного гранатового;
- швидке промивання проточною водою;
- дофарбовування 2% метиловим зеленим протягом 15 ± 1 хв.;

- висушування;
- мікроскопування;
- виявлення активності ЛФн за забарвленою у коричневий колір цитоплазмою нейтрофілів;
- підрахунок активності ЛФн у 100 нейтрофілах в умовних одиницях за Астальді-Верга;
- порівняння отриманих даних з даними контролю і висновок за цим показником про стан активності лужної фосфатази в пацієнта.

Відомий спосіб оцінки стану активності ЛФн за параметрами її річного біоритму [Н.В. Колесник, Н.Г. Баранник, Ю.А. Кривохацька, Г.Б. Стерн, Н.Б. Широколобова. Параметры годовых ритмов активности ферментов лейкоцитов практически здоровых лиц // Тезисы докладов научно-практической конференции врачей г. Запорожье, посвященной памяти выдающихся медиков - рационализаторов В.В. Ярошенко и Я.Р. Гасуля. Запорожье. - 1994. - 156 с. - С.95-97], який включає:

- реєстрацію місяця і години забору капілярної крові;

- забір капілярної крові;
- приготування мазка;
- висушування мазка на повітрі;
- фіксацію мазка в 10% розчині формаліну в абсолютному етанолі протягом 30 ± 1 с при температурі $0 \pm 5^\circ\text{C}$;

- інкубацію мазка при кімнатній температурі протягом 5-10хв. у свіжоприготованому субстратно-буферному розчині (рН 9,75), який містить у 35мл 0,05моль/л пропандіолового буферу 35мг α -нафтілфосфату натрію, 35мг міцного гранатового;
- швидке промивання проточною водою;
- дофарбовування метиловим зеленим протягом 15 ± 1 хв.;

- висушування;
- мікроскопування;
- виявлення активності ЛФн за забарвленою у коричневий колір цитоплазмою нейтрофілів;
- підрахунок активності ферменту у 100 нейтрофілах залежно від ступеня забарвлення цитоплазми в умовних одиницях;

- порівняння даних із середньорічним значенням цього показника в популяції, який беруть за норму, а амплітуду річного коливання - за верхню і нижню межі норми, і висновок за цим показником про стан активності лужної фосфатази.

Недоліком даного способу є неможливість порівняння активності ЛФн досліджуваного зразка крові з такою, яка відповідає сезону дослідження, що обумовлює некоректну оцінку результатів дослідження.

Спільними з прототипом ознаками є:

- реєстрація дати забору капілярної крові;

- забір капілярної крові;

- приготування мазка;

- висушування мазка на повітрі;

- фіксація мазка в 10% розчині формаліну в абсолютному етанолі протягом 30 ± 1 с при температурі $0 \pm 5^\circ\text{C}$;

- інкубація мазка при кімнатній температурі протягом 5-10хв. у свіжоприготованому субстратно-буферному розчині (рН 9,75), який містить у 35мл 0,05моль/л пропандіолового буферу 35мг α -нафтілфосфату натрію, 35мг, барвника міцного гранатового;

- швидке промивання проточною водою;
- дофарбовування 2% метиловим зеленим протягом 15 ± 1 хв.;

- висушування;
- мікроскопування;
- виявлення активності ЛФн за забарвленою у коричневий колір цитоплазмою нейтрофілів;

- підрахунок активності ЛФн у 100 нейтрофілах в умовних одиницях за Астальді-Верга;

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб визначення стану активності лужної фосфатази нейтрофілів (ЛФн), який шляхом цитохімічної реакції і врахування залежності активності ферменту від сезону року, дозволяє здійснити експрес-оцінку стану активності ЛФн в обстежуваній особі, підвищити її точність і коректність.

Суттєвими ознаками способу є:

- реєстрація дати забору капілярної крові;

- забір капілярної крові;

- приготування мазка;

- висушування мазка на повітрі;

- фіксація мазка в 10% розчині формаліну в абсолютному етанолі протягом 30 ± 1 с при температурі $0 \pm 5^\circ\text{C}$;

- інкубація мазка у свіжоприготованому субстратно-буферному розчині (рН 9,75), який містить у 35мл 0,05моль/л пропандіолового буферу 35мг α -нафтілфосфату натрію, 35мг міцного гранатового при кімнатній температурі протягом 5-10хв.;

- швидке промивання проточною водою;
- дофарбовування 2% метиловим зеленим протягом 15 ± 1 хв.;

- висушування;
- мікроскопування;
- виявлення активності ЛФн за забарвленою у коричневий колір цитоплазмою нейтрофілів;

- підрахунок активності ЛФн у 100 нейтрофілах в умовних одиницях за Астальді-Верга;

- розрахунок відносної активності ЛФн_{відн.} у досліджуваній особі за формулою:

$$\text{ЛФн}_{\text{відн.}} = \frac{\text{ЛФн}_n}{36,3 + 1,5x} \times 100\%, \quad (1)$$

де

- ЛФн_{відн.} - відносна активність ЛФн у обстежуваній особі, %;

- ЛФн_n - активність ЛФн в обстежуваній особі, у.о.;

- 36,3 - постійний коефіцієнт активності ферменту в популяції протягом року, у.о.;

- 1,5 - постійний коефіцієнт впливу місяця року на активність ЛФн;

- х - порядковий номер місяця року;
- визначення за цим показником стану активності лужної фосфатази у пацієнта.

Відмінними від прототипу ознаками є визначення відносної активності лужної фосфатази нейтрофілів за формулою 1 шляхом порівняння результатів активності ЛФН пацієнта зі значеннями активності ферменту в популяції у конкретний місяць року.

Спосіб обґрунтовано щомісячними дослідженнями протягом трьох років (394 особи) активності ферменту в мазках периферичної крові позаштатних донорів з діагнозом «здоровий» і відсутністю змін у лейкоцитарній формулі. Досліджували кров, що була відібрана між 9-10 годинами ранку; готували мазки; висушували їх на повітрі; фіксували в 10% розчині формаліну в абсолютному етанолі протягом 30±1с при температурі 0±5°C; наносили на мазки 3-5мл свіжоприготованого інкубаційного середовища, яке містить у 35мл 0,05моль/л пропандіолового буферу 35мг α-нафтілфосфату натрію, 35мг міцного гранатового при кімнатній температурі протягом 5-10хв.; швидко промивали проточною водою; дофарбовували 2% метиловим зеленим протягом 15±1хв.; висушували; мікроскопували; активність ЛФН виявляли за забарвленою у коричневий колір цитоплазмою у 100 нейтрофілах, яку виражали в умовних одиницях, залежно від ступеня забарвлення цитоплазми, для чого досліджувані нейтрофіли розподіляли на 4 групи: з негативною реакцією (-), слабопозитивною (+), позитивною (++) і різко позитивною (+++), число нейтрофілів з однаковою інтенсивністю забарвлення помножували на відповідне даній групі число плюсів, сума цих добутків складає умовні одиниці (у.о.).

Статистичний аналіз отриманої бази даних здійснювали за допомогою ППП SPSS, модулів «Регресія» - метод зважених найменших квадратів, «Факторний аналіз», «Часові ряди» і «Графічний аналіз». Активність ферменту в практично здорових осіб не залежить від віку і статі. На основі статистичного аналізу бази даних було встановлено залежність активності лужної фосфатази від сезону року, що відображається рівнянням

$$\text{ЛФН}_m = 36,3 + 1,5x, \quad (2)$$

де:

ЛФН_м - активність лужної фосфатази нейтрофілів, що відповідає конкретному місяцю року, у.о.;
36,3 - постійний коефіцієнт значення активності ЛФН у популяції протягом року, у.о.

1,5 - постійний коефіцієнт місяця року;

Х - порядковий номер місяця року.

95% довірчий інтервал дорівнює ±5 у.о.

Спосіб здійснюють таким чином: реєструють дату дослідження, проводять забір капілярної крові; готують мазки; висушують їх на повітрі; фіксують у 10% розчині формаліну в абсолютному етанолі протягом 30±1с при температурі 0±5°C; наносять на мазки 3-5мл свіжоприготованого інкубаційного середовища (рН 9,75), яке містить у 35мл 0,05моль/л пропандіолового буферу 35мг α-нафтілфосфату натрію, 35мг міцного гранатового при кімнатній температурі на 5-10хв.; швидко про-

мивають проточною водою; дофарбовують 2% метиловим зеленим протягом 15±1хв.; висушують; мікроскопують; активність ЛФН виявляють за забарвленою у коричневий колір цитоплазмою у 100 нейтрофілах, яку виражають в умовних одиницях залежно від ступеня забарвлення цитоплазми, для чого досліджувані нейтрофіли розподіляють на 4 групи: з негативною реакцією (-), слабопозитивною (+), позитивною (++) і різко позитивною (+++), число нейтрофілів з однаковою інтенсивністю забарвлення помножують на відповідне даній групі число плюсів, сума цих добутків складає умовні одиниці (у.о.); визначають відносну активність ЛФН_{відн.} за формулою 1, і за цим показником роблять висновок про стан активності лужної фосфатази нейтрофілів пацієнта і при значенні показника у діапазоні 100±15 діагностують норму.

Приклад конкретного виконання.

Пацієнтка К., вік - 29 років. Діагноз - вагітність 31 тиждень, загроза переривання вагітності.

Дата дослідження активності ЛФН - 19 лютого 2008р.

Здійснювали забір капілярної крові; готували мазок; висушували його на повітрі; фіксували в 10% розчині формаліну в абсолютному етанолі протягом 30±1с при температурі 0±5°C; наносили на мазок 3-5мл свіжоприготованого інкубаційного середовища (рН 9,75), яке містить у 35мл 0,05моль/л пропандіолового буферу 35мг α-нафтілфосфату натрію, 35мг міцного гранатового при кімнатній температурі на 5-10хв.; швидко промивали проточною водою; дофарбовували 2% метиловим зеленим протягом 15±1хв.; висушували; мікроскопували; визначали активність ферменту за забарвленою у коричневий колір цитоплазмою нейтрофілів; у 100 нейтрофілах підраховували активність ЛФН в умовних одиницях за Астальді-Верга.

Активність ферменту вагітної жінки складала 76 у.о.

Розраховували відносну активність ЛФН_{відн.} у пацієнтки за формулою 1:

$$\text{ЛФН}_{\text{відн.}} = \frac{76}{36,3 + 1,5 \times 2} \times 100\% = 193,4\%.$$

Значення активності лужної фосфатази нейтрофілів у пацієнтки перевищує показник популяції у лютому в два рази, що характеризує участь цієї групи ферментів (лужних фосфатаз) у патогенезі невиношування вагітності.

Пацієнт Т., вік - 23 роки. Діагноз - загострення лівобічного хронічного мезотімпаніту.

Дата дослідження активності ЛФН - 12 грудня 2007р.

Здійснювали забір капілярної крові; готували мазок; висушували його на повітрі; фіксували в 10% розчині формаліну в абсолютному етанолі протягом 30±1с при температурі 0±5°C; наносили на мазок 3-5мл свіжоприготованого інкубаційного середовища (рН 9,75), яке містить у 35мл 0,05моль/л пропандіолового буферу 35мг α-нафтілфосфату натрію, 35мг міцного гранатового при кімнатній температурі на 5-10хв.; швидко промивали проточною водою; дофарбовували 2%

метиловим зеленим протягом 15 ± 1 хв.; висушували; мікроскопували; визначали активність ферменту за забарвленими у коричневий колір гранулами; у 100 нейтрофілах підраховували активність ЛФн в умовних одиницях за Астальді-Верга.

Активність ЛФн хворого складала 80 у.о.

Розраховували відносну активність ЛФн_{відн.} у пацієнта за формулою:

$$\text{ЛФн}_{\text{відн.}} = \frac{80}{36,3 + 1,5 \times 2} \times 100\% = 147,3\%$$

Відповідно до отриманих даних активність ЛФн пацієнта Т. при загостренні хронічного мезотімпаніту підвищена практично на 50 %, що в умовах

хронічного деструктивного процесу у вусі хворого слід розглядати як показник тяжкості запалювального процесу, який супроводжується порушенням кислотно-лужного балансу.

Таким чином, запропонований спосіб дозволяє проводити експрес-оцінку стану метаболічної активності клітин запалення обстежуваного з урахуванням стану активності лужної фосфатази в популяції, яка відповідає місяцю дослідження, що забезпечує коректне оцінювання результатів аналізу пацієнта та обумовлює призначення адекватної терапії.