



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) SU (11) 1508162 A1

(SD) 4 G 01 N 33/53

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГИИТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

И АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

1

(21) 4294597/28-14

(22) 07.08.87

(46) 15.09.89. Бюл. № 34

(71) Киевский медицинский институт
им. акад. А.А.Богомольца

(72) В.Г.Бордонос, Н.И.Якуба и
Л.И.Скрипка

(53) 615.375 (088.8)

(56) Злотницкая Р.П. и Фрадкин В.А.
Реакция нейтрофилов периферической
крови на печеночный антиген у боль-
ных с хроническими заболеваниями пе-
чени.

Советская медицина, 1982, № 3, с.34-
37.

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОРГАНСПЕЦИ-
ФИЧЕСКИХ АУТОИМУННЫХ ПРОЦЕССОВ

(57) Изобретение относится к медици-
не и может найти применение в терапии
и педиатрии при диагностике хроничес-
ких заболеваний, сопровождающихся

2

аутоиммунными процессами органоспе-
цифического типа. Цель изобретения -
повышение точности способа. Исследу-
емый тканевой антиген наслаивают на
частицы латекса и производят постанов-
ку реакции фагоцитоза и НСТ-теста с
частицами латекса без антигена и с
латексом, нагруженным определенным
органоспецифическим антигеном, опре-
деляют процент фагоцитоза, фагоцитар-
ное число и НСТ-тест в опытной и конт-
рольной пробам и результаты сопос-
тавляют. При снижении показателей
поглощения в опытной пробе в 2 и бо-
лее раз по сравнению с контрольной
наряду с повышением НСТ-теста в опыт-
ной пробе в 1,5 раза по сравнению с
контрольной диагностируют наличие
аутоиммунного процесса к данному ор-
ганоспецифическому антигену. Точность
способа возрастает с 62 до 96%.

Изобретение относится к медицине
и может найти применение в терапии и
педиатрии при диагностике хроничес-
ких заболеваний, сопровождающихся
аутоиммунными процессами органоспеци-
фического типа.

Цель изобретения - повышение точ-
ности способа определения аутоиммун-
ных процессов.

Способ осуществляется следующим
образом.

I этап. Наслоение тканевого анти-
гена на латекс. Инертные частицы ла-
текса размером 1,2 мк в концентрации
 10^9 в соотношении 1:1 смешивают с

тканевым антигеном, приготовленным
по обычной методике. Полученную смесь
помещают в испарительное отделение
холодильника на 18 ч, после чего цен-
трифугируют при 2000 об/мин в течение
20 мин, надосадочную жидкость снимают.
К осадку, содержащему латекс, нагру-
женный тканевым антигеном, добавляют
физиологический раствор в количестве,
равном первоначальному количеству ан-
тигена (концентрация латекса с анти-
геном сохраняется в пределах 10^9).

II этап. Постановка реакции поглоще-
ния и НСТ-теста с латексом, нагружен-
ным тканевым антигеном (опытная про-

ос. SU (11) 1508162 A1

ба) и с латексом без антигена (контрольная проба).

Кровь из пальца больного в количестве 0,4 мл собирают в пробирку, содержащую 1 каплю гепарина, центрифугируют при 1500 об/мин в течение 10 мин, снимают лейкозвесь и растворяют ее в 0,2 мл среды Игла. Полученную взвесь по 0,1 мл наносят на покровные стекла, помещенные в маленькие пластмассовые чашки, добавляют 0,1 мл 1%-ного раствора нитросинего тетразолия, после чего в контрольную пробу вносят 0,05 мл латекса без антигена, а в опытную пробу — 0,05 мл латекса, нагруженного тканевым антигеном. Пробы в закрытых чашечках инкубируют в термостате 30 мин, после чего надосадочную жидкость на покровных стеклах сливают, стекла высушивают и фиксируют в парах формалина в течение 15 мин. Докрашивают препараты ядерным красителем (например, 1%-ным раствором метилового зеленого в течение 7 мин). Пробы оценивают под иммерсионным микроскопом, определяя процент нейтрофилов, поглотивших частицы латекса (процент фагоцитоза), и процент нейтрофилов, восстановивших нитросиний тетразолий в нерастворимый формазан (НСТ-тест). Оба показателя определяются на одном и том же препарате как в контрольной, так и в опытной пробе. Латекс при этом служит как фагоцитируемый объект в реакции поглощения нейтрофилов, так и стимулятором НСТ-теста.

Сопоставляют результаты полученных исследований (процент фагоцитоза и НСТ-тест) в контрольной и опытной пробках, достоверным диагностическим критерием считая снижение фагоцитоза в 2 и более раз ниже по сравнению с контрольной, наряду с повышением НСТ-теста в опытной пробе в 1,5 раза выше по сравнению с контролем диагностируют наличие аутоиммунного процесса к данному органоспецифическому антигену.

Пример 1. Больной К., 12 лет. Впервые заболел вирусным гепатитом в возрасте 10 лет. Поступил в стационар на 7-ой день болезни в состоянии средней тяжести с умеренно выраженной иктеричностью склер, болями в животе, печень выступала из-под реберной дуги на 3,5 см. Виллирубин крови 28,5 мг/о, АЛТ-715 ед. АСТ-545 ед. Протром-

бин снижен до 63%, остаточный азот 0,27 г/л, общий белок 71 г/л, альбумины 33 г/л, глобулины α_1 -3 г/л; α_2 -8 г/л; β -9 г/л, γ -18 г/л. Общий анализ крови: эритроц. $4,7 \times 10^6$ /л; гемоглобин 132,5 г/л; лейкоциты $5,2 \times 10^9$; э-9%; л-7%; с-26%; лимф, 58%, м-5%; СОЭ 8 мм/ч. При многократном исследовании НВ_с - антиген обнаружен не был.

Эхограмма, сигналы от границ печени хорошо выражены, но имеют измененную форму. Дополнительные импульсы средней амплитуды правильной формы регистрируются в области ворот печени.

При обследовании по известному способу ППН без печеночного антигена 0,05; ППН с печеночным антигеном 0,14.

Обследование по предлагаемому способу. В контрольной пробе (при фагоцитозе латекса без антигена) процент фагоцитоза 47%, НСТ-тест 28%, а в опытной пробе (при фагоцитозе латекса, нагруженного печеночным антигеном) процент фагоцитоза 23%, НСТ-тест 42%. Следовательно, фагоцитарная активность нейтрофилов при применении латекса, нагруженного печеночным антигеном снижалась в 2 раза, тогда как НСТ-тест стимулированный латексом, нагруженным печеночным антигеном, повышался в 1,5 раза. Следовательно, полученные данные входят в диагностические критерии формулы изобретения и свидетельствуют о наличии аутоиммунного процесса в отношении печеночного антигена. Поставлен диагноз: хронический гепатит.

Дальнейшее течение заболевания позволило подтвердить установленный диагноз. Под давлением проведенного лечения, включающего дезинтоксикационную терапию, преднизолон, витаминные препараты, стимуляторы иммунитета и др., на 1-й день болезни состояние больного нормализовалось, однако полная нормализация лабораторных показателей наступила только на 68-й день. С диагностической целью при удовлетворительном самочувствии и удовлетворительных биохимических показателях произведена функциональная биопсия, в заключение которой выставлен окончательный диагноз: хронический гепатит умеренно выраженной активности без признаков цирротических изменений. В данном примере диагноз подтверждается совокупностью клинических

и лабораторных данных, показано также совпадение исследования, проведенного по предлагаемому способу с наиболее достоверным методом исследования - гистологическим, тогда как при обследовании по известному способу положительный результат не получен. Это подтверждает большую точность заявляемого метода по сравнению с прототипом.

П р и м е р 2. Больной Д., 8 лет, поступил в стационар с жалобами на боли в нижних отделах живота, преимущественно, после еды и перед актом дефекации. Периодически отмечается неустойчивость стула, примесь слизи и крови. При объективном исследовании - выражены симптомы интоксикации, значительная болезненность при пальпации в левой подвздошной области, сигмовидная кишка спастически уплотнена, болезненна при пальпации. В общем анализе крови: гемоглобин 80 г/л, лейкоцитов $8,9 \cdot 10^6$, э-2, п-8, с-62, м-9, СОЭ 25. Белковые фракции: общий белок 61 г/л, альбумины 28 г/л, глобулиновые фракции: α_1 - 2%; α_2 - 6, β - 11, γ - 14. При колпоскопии кала - слизь и кровь в умеренном количестве, бактериологическое исследование - дисбактериоз за усиленного роста патогенных штаммов кишечной палочки.

При обследовании по известному способу ППН без антигена 0,08; ППН с антигеном кишечника 0,18.

Обследование по изобретению проводится в два этапа: I-й - наложение антигена кишечника на латекс; II-й - постановка фагоцитарных реакций с латексом без антигена и с латексом, нагруженным антигеном кишечника.

Получены следующие результаты: поглотительная способность нейтрофилов при неспецифическом (без антигена кишечника) фагоцитозе 52%, НСТ-тест, стимулированный латексом, не нагруженным антигеном кишечника, 32%. При специфическом латексфагоците (с использованием латекса, нагруженного кишечным антигеном) процент фагоцитоза 26%, НСТ-тест 45%. Следовательно, поглотительная способность при постановке реакции специфического латексфагоцитоза увеличилась в 2 раза, в то время как НСТ-тест, стимулированный латексом, нагруженным кишечным антигеном, повысился в 1,5 раза, что является согласно формуле изобретения достоверным диагностическим критери-

ем, наличия аутоиммунного процесса и позволяет поставить диагноз неспецифического язвенного колита.

После стиханий острых проявлений язвенного колита с диагностической целью ребенку проведено ректороманоскопию, при которой выявлено отсек и гиперемия слизистой оболочки толстой кишки, утолщение ее складок, наличие геморрагий, отдельных эрозий.

Таким образом, в данном примере показаны клинико-лабораторные данные и данные диагностики по предлагаемому способу. Объективность диагноза подтверждена методом ректороманоскопии, тогда как при обследовании по известному способу положительного диагностического результата не получено, что подтверждает большую точность предлагаемого способа.

Для проверки диагностической ценности способа проведено исследование у 20 здоровых лиц и 68 больных различными хроническими заболеваниями, сопровождающимися аутоиммунными процессами.

Для повышения точности способа в формулу изобретения включены пограничные значения величин, характеризующих снижение поглотительной и повышение НСТ-восстанавливающей способности при специфическом фагоцитозе частиц латекс, нагруженных соответствующим тканевым антигеном по сравнению с неспецифическим фагоцитозом (при применении и в качестве фагоцитируемого объекта частиц латекса без антигена). На высокую достоверность данных указывает отсутствие разницы показателей поглотительной и НСТ-восстанавливающей способности при постановке неспецифического и специфического (с различными тканевыми антигенами) фагоцитоза у здоровых лиц ($p < 0,05$). В то же время высокая достоверность различия результатов ($p < 0,001$) при постановке неспецифического и специфического (с латексом, нагруженным соответствующим тканевым антигеном) фагоцитоза у больных хроническими заболеваниями, сопровождающимися аутоиммунными процессами, подтверждает высокую диагностическую ценность предлагаемого способа.

Точность диагностики у обследуемых больных по изобретению составила 96%, тогда как положительные результаты при использовании известного способа получены только у 62% случаев.

Высокая специфичность и связанная с ней большая точность диагностики заявляемого способа по сравнению с прототипом обусловлена тем, что регистрацию специфических аутоиммунных процессов проводят не на морфологическом, а на функциональном уровне.

Обладая широкой информативностью, высокой специфичностью и точностью диагностики при технической доступности, быстроте выполнения и незначительном объеме крови, требуемой для исследования, способ может найти широкое применение в практическом здравоохранении.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ определения органоспецифических аутоиммунных процессов путем выявления сенсibilизации нейтрофильных гранулоцитов к тканевым антигенам *in vitro*, отличающийся тем, что, с целью повышения точности способа выявления сенсibilизации нейтрофильных гранулоцитов осуществляют с помощью НСТ-теста и реакции фагоцитоза, при этом тканевый антиген адсорбируют на частицах латекса, далее вычисляют фагоцитарное число, процент фагоцитирующих клеток, процент лейкоцитов, содержащих формазан, и при снижении показателей процента фагоцитирующих клеток и фагоцитарного числа в два и более раз и повышении формазан - содержащих нейтрофилов в 1,5 раза по сравнению с контрольной пробой, не содержащей антигена, определяют наличие аутоиммунного процесса.

Составитель И.Балкаев

Редактор М.Келемеш

Техред М.Моргентал

Корректор Т.Малец

Заказ 5536/48

Тираж 789

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г.Ужгород, ул. Гагарина, 101