



УКРАЇНА

(19) UA (11) 54766 (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 ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ НЕЙТРОФІЛІВ КРОВІ

1

2

(21) u201005422

(22) 05.05.2010

(24) 25.11.2010

(46) 25.11.2010, Бюл. № 22, 2010 р.

(72) КОЛІСНИК НАДІЯ ВАСИЛІВНА, МАСЛОВА
ОКСАНА ВОЛОДИМИРІВНА, КОЛІСНИК РОМАН
ВАЛЕРІЙОВИЧ(73) ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
"ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ"
МІНІСТЕРСТВА ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ(57) Спосіб визначення функціонального стану
нейтрофілів крові, що включає дослідження крові,

визначення мієлопероксидази нейтрофілів, який відрізняється тим, що здійснюють реєстрацію сезону дослідження, виконують забір капілярної крові, готують два мазки, визначають цитохімічними методами з використанням світлового мікроскопа в одному мазку активність лужної фосфатази, у другому активність мієлопероксидази, розраховують відносну активність лужної фосфатази і мієлопероксидази з урахуванням сезону року, і за значеннями цих показників діагностують стан спокою, праймінгу або активації нейтрофілів у циркуляції обстеженої особи.

Спосіб відноситься до галузі медицини, а саме лабораторної діагностики. Може бути використаний у хірургії, акушерстві, гінекології, отоларингології, стоматології, гематології, імунології, терапії, медицині невідкладних станів.

Нейтрофіл крові може знаходитися в одному з трьох функціональних станів: спокою, праймінгу або активації. У нормі в кровообігу нейтрофіли знаходяться в стані спокою, при незначному підвищенні рівня прозапальних цитокінів вони переходять у праймований стан, - це стан підвищеної функціональної активності, готовності до переміщення їх у вогнище запалювання в тканинах; при збільшенні вмісту прозапальних цитокінів у крові праймовані циркулюючі нейтрофіли переходять у стан активації, який характеризується дегрануляцією первинних гранул, що містять протеолітичні та окислювально-відновні ферменти. Стан активації нейтрофілів у кровообігу обумовлює розвиток системної запалювальної реакції та поліорганну недостатність. Важливо, що праймований стан є зворотним, а активований - ні, тому в клініці дуже важлива своєчасна лабораторна діагностика функціонального стану нейтрофілів, що складають понад 70% циркулюючих лейкоцитів.

Відомий спосіб визначення функціонального стану нейтрофілів, а саме праймованого стану, шляхом оцінки підвищення генерації супероксид аніону при додатковій стимуляції їх пептидом N-форміл-L-метіоніл-L-лейціл-L-фенілаланіном (N-Formyl-Met-Leu-Phe), формілпептид (fMLF) [J.G.

Moreland, A. P. Davis, J.J. Matsuda et al. Endotoxin Priming of Neutrophils Requires NADPH Oxidase - generated Oxidants and Is Regulated by the Anion Transporter ClC-3 //JBC. - 2007, Vol. 282. - P.33958-33967]. Спосіб засновано на тому, що праймовані нейтрофіли змінюють фенотип, однією з ознак зміни якого є поява на їхній плазматичній мембрані рецепторів до fMLF. При рецепції нейтрофілами fMLF активується мембранозв'язаний фермент НАДФН-оксидаза (НАДФ - нікотинамідаденіндинуклеотид, Н відновлений), продуктом цієї реакції є вільний радикал кисню супероксид аніон. Спосіб включає:

- відбір у пацієнта венозної крові, яку стабілізує гепарином;
- виділення нейтрофілів у градієнті густини фікол-верографін;
- 3-ох разове промиванням клітин розчином Хенкса при 4°C;
- приготування суспензії нейтрофілів, що містить $2,5 \times 10^6$ клітин/мл у середовищі Хенкса;
- визначення генерації супероксид аніону суспензії нейтрофілів за збільшенням інтенсивності хемілюмінесценції люцигеніну в присутності fFMLF та оцінку за цим показником функціонального стану нейтрофілів.

Недоліками способу є необхідність:

- взяття венозної крові;
- виділення нейтрофілів за процедурою, що займає не менш як 3 години і вимагає наявності дорогих реактивів зарубіжних фірм, у тому числі:

(13) U
(11) 54766
(19) UA

суміші фікол-верографін, збалансованого живильного середовища Хенкса;

- хемілюмінометру і відповідного програмного забезпечення для визначення та аналізу даних за допомогою ПК;

- спеціалізованої лабораторії та підготованих фахівців;

Ознаками, спільними з рішенням, що заявляється, є:

- дослідження крові;
- визначення фенотипу нейтрофілів у циркуляції крові.

Відомий спосіб визначення функціонального стану нейтрофілів [Б.С.Нагоев. Модификация цитохимического метода восстановления НСТ //Лаб. дело - 1983. - №8. - С.7-11], який заснований на визначенні рівня генерації супероксид аніона за його здатністю відновлювати розчинний нітросиній тетразолій (НСТ) до формазану, що утворює в цитоплазмі нейтрофілів осад у вигляді синіх гранул, який включає:

- відбір капілярної крові, яку стабілізують гепарином;

- приготування ex tempore розчину нітросинього тетразолію у фосфатно-сольовому буфері pH 7,2;

- приготування суміші крові та розчину НСТ;
- інкубування суміші у водяному термостаті;
- фіксацію клітин крові додаванням до суміші рівного об'єму 4% розчину формальдегіду у фізіологічному розчині;

- додавання дистильованої води та помішування суміші для лізису еритроцитів;

- внесення хлориду натрію для відновлення ізотонічності суміші;

- центрифугування суміші для отримання осаду лейкоцитів;

- приготування з осаду мазка на предметному склі;

- фіксацію мазка у формаліново-спиртовому розчині;

- фарбування мазка водним розчином нейтрального червоного;

- підрахунок у мазку 100 нейтрофілів і кількості з них, що містять темно-сині грудочки формазану;

- діагностування праймованого стану нейтрофілів у циркуляції при перевищенні НСТ - позитивних нейтрофілів більш ніж 18%. Недоліками способу є значна кількість підготовчих не стандартизованих операцій з нейтрофілами крові, які обов'язково змінюють функціональний стан нейтрофілів, праймують їх та вносять невизначеність у кінцевий результат.

Ознаками, спільними з рішенням, що заявляється, є:

- дослідження капілярної крові;
- приготування мазка;
- визначення фенотипу нейтрофілів у циркулюючій крові.

Відомий спосіб визначення функціонального стану нейтрофілів, а саме їхнього активованого стану, який заснований на визначенні підвищення у сироватці або плазмі крові кількості білка-маркера азурофільних гранул мієлопероксидази (МПО), тобто на визначенні ступеня звільнення

білка-ферменту азурофільними гранулами [Sima Samimi-Fard, Alberto Dominguez-Rodriguez, Pedro Abreu-Gonzalez, Cristina Enjuanes-Grau, Gabriela Blanco-Palacios, Idaira F. Hernandez-Baldero, Francisco Bosa-Ojeda, Francisco Marrero-Rodriguez Role of Myeloperoxidase as Predictor of Systemic Inflammatory Response Syndrome in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction After Primary Percutaneous Coronary Intervention. American Journal of Cardiology. - 2009. - Vol.104, №5. - P.634-637], що включає:

- забір венозної крові;
- отримання сироватки крові;
- установа вмісту МПО за допомогою тест-системи зі специфічними до білка-ферменту людини мишиними антитілами;

- визначення функціонального стану нейтрофілів, а саме стану активації нейтрофілів: нейтрофіли активовані, якщо вміст МПО сироватки на 20% перевищує вміст ферменту в контролі.

Недоліками способу є необхідність:

- взяття венозної крові;
- тест - систем з моноклональними антитілами до МПО нейтрофілів людини;

- комплексу устаткування для проведення твєрдофазного імуоферментного аналізу з відповідним програмним забезпеченням для визначення та аналізу даних за допомогою ПК.

Ознаками, спільними з рішенням, що заявляється, є:

- дослідження крові;
- визначення мієлопероксидази нейтрофілів.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб визначення функціонального стану нейтрофілів крові, який шляхом цитохімічного виявлення рівня активності лужної фосфатази (ЛФ) та МПО у нейтрофілах мазків крові дозволяє діагностувати їхній функціональний стан, знизити вартість та забезпечити доступність діагностики невідкладних станів у клінічних лабораторіях будь-якого рівня акредитації. Суттєвими ознаками способу є:

- реєстрація дати дослідження;
- забір капілярної крові;
- приготування двох мазків крові;
- визначення цитохімічними методами з використанням світлового мікроскопа на одному з мазків активності ЛФн, а на другому - МПОн;

- розрахунок відносної активності ЛФн та МПОн;
- визначення функціонального стану нейтрофілів за значеннями відносної активності ЛФн та МПОн. При значеннях відносної активності ЛФн та МПОн $100 \pm 15\%$ діагностують норму - стан спокою нейтрофілів. При значеннях відносної активності ЛФн більше 115% , а МПОн - більше 85% діагностують праймований стан нейтрофілів. При значеннях відносної активності ЛФн більше 115% , а відносної активності МПОн менше 85% діагностують активований стан нейтрофілів у циркуляції.

Відмінними від прототипу ознаками є:

- реєстрація дати дослідження;
- забір капілярної крові;
- приготування двох мазків;

- визначення активності ЛФн та МПОн цитохімічним методом з використанням світлового мікроскопа;

- визначення функціонального стану нейтрофілів за значеннями відносної активності ЛФн та МПОн з урахуванням сезону року. При значеннях відносної активності ЛФн та МПОн $100 \pm 15\%$ діагностують норму - стан спокою нейтрофілів. При значеннях відносної активності: ЛФн більш ніж 115% , а МПОн - більше 85% діагностують праймований стан нейтрофілів. При значеннях відносної активності ЛФн більше 115% , а відносної активності МПОн менше 85% діагностують активований стан нейтрофілів у циркуляції.

Теоретичну основу способу склали новітні дані відносно біології нейтрофілів і механізму їхнього праймування та активації. Відомо, що в нормі циркулюючі нейтрофіли крові знаходяться в стані спокою, який характеризується відповідним фенотипом та відсутністю маркерів активації їхнього гранулярного апарату. При станах організму, які супроводжуються підвищенням у крові системних прозапальних цитокінів, останні зв'язуються зі специфічними рецепторами на нейтрофілах й індукують активацію внутрішньоклітинних сигнальних шляхів. При незначному підвищенні концентрації прозапальних цитокінів у цитоплазмі нейтрофілів відбувається обмежене фосфорилування кількості білків-мішеней без зміни внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію; цей процес викликає мобілізацію секреторних пухирців та включення їхніх мембран у плазматичну мембрану нейтрофілів, що призводить до зміни фенотипу клітин, а також до мобілізації третинних та вторинних гранул. Проявом мобілізації секреторних пухирців є підвищення активності ЛФн; проявом мобілізації третинних гранул - підвищення активності МПО азурофільних гранул. Збільшення концентрації прозапальних цитокінів у циркуляції супроводжується підвищенням внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію, активацією актоміозинового комплексу, який обумовлює дегрануляцію азурофільних гранул та визволення МПОн у крові, як наслідок, зниження її активності в нейтрофілах, але підвищення у крові.

Викладене дозволяє вважати, що показники активності ЛФн та МПОн відображають функціональний стан нейтрофілів, а саме - підвищення активності ЛФн та МПОн відображає стан праймингу циркулюючих нейтрофілів, зниження активності МПОн на фоні підвищеної активності ЛФн - стан їхньої активації.

Спосіб здійснюють таким чином: реєструють дату дослідження; проводять забір капілярної крові; готують два мазки, цитохімічними методами з використанням світлового мікроскопа в одному з них визначають в умовних одиницях активність ЛФн, а в другому МПОн; розраховують відносну активність цих ферментів у порівнянні з контролем; діагностують за цими показниками функціональний стан нейтрофілів у циркуляції.

Спосіб обґрунтовано дослідженнями активності ферментів у мазках периферичної крові 60 хворих на хронічний обструктивний бронхит (ХОБ), 28 хворих на хронічний середній отит (ХСО), 21

хворого на хронічний риносинусит (ХРС), 80 хворих на червоний плоский лишай слизової оболонки ротової порожнини (ЧПЛ СОРП); 85 жінок із загрозою невиношування вагітності та 31 жінки з нормальним перебігом вагітності (контрольна група); контрольну групу для хворих на ХОБ, ХСО, ХРС, ЧПЛ СОРП склали 218 практично здорових осіб, у 15-18 методом випадкової вибірки щомісячно протягом року відбирали кров і досліджували активність ЛФн та МПОн.

Статистичний аналіз отриманої бази даних здійснювали за допомогою пакета прикладних програм SPSS, версія 13, для Windows, використовували: методи непараметричної статистики: U - test Мана-Уїтні; однофакторний дисперсійний аналіз; достовірними вважали відмінності між досліджуваними групами при значенні $P < 0,01$.

Приклади конкретного виконання:

Приклад 1.

Пацієнтка С, вік - 31 рік. Діагноз: лівобічний хронічний середній отит. Дата дослідження активності ЛФн та МПОн - 21 січня 2009р.

Спосіб здійснювали таким чином: реєстрували дату дослідження, діагноз; проводили забір каплі капілярної крові; готували 2 мазки. В одному мазку визначали активність ЛФн: фіксували мазок у 10% розчині формаліну в абсолютному етанолі протягом 30 ± 1 с при температурі $0 \pm 5^\circ\text{C}$; інкубували мазок у свіжоприготованому субстратно - буферному розчині, який містив у 35мл $0,05$ моль/л пропандіолового буферу (рН 9,75), 35мг α -нафтілфосфату натрію, 35мг міцного гранатового, при кімнатній температурі протягом 5-10хв; швидко промивали проточною водою; дофарбовували 2% метиловим зеленим протягом 15 ± 1 хв.; висушували; мікроскопували; виявляли активність ЛФн за забарвленими в коричневий колір гранулами в місцях локалізації ферменту, підраховували активність ЛФн з використанням світлового мікроскопа у 100 нейтрофілах в умовних одиницях за Ф.Г.Дж.Хейхоу та Д.Кваглино. Для чого, залежно від кількості забарвлення у цитоплазмі, досліджувані нейтрофіли розподіляли на 4 групи: з негативною реакцією (-), слабопозитивною (+), позитивною (++) і різко позитивною (+++); далі число нейтрофілів з однаковою інтенсивністю забарвлення помножували на відповідне даній групі число плюсів, сума цих добутків складала умовні одиниці (у.о.).

При підрахунку активності ЛФн у хворі зі 100 нейтрофілів у 56 клітинах забарвлення було відсутнє, в 11 відповідало +, у 12 - ++, та у 21-+++; активність ЛФн хворої дорівнювала $56 \times 0 + 11 \times 1 + 12 \times 2 + 21 \times 3 = 98$ у.о.

Відносну активність ЛФн визначали за формулою:

$$\text{ЛФн}_{\text{відн.}} = \frac{\text{ЛФн}_n}{43,6 - 3,34x} \times 100\% \quad (1)$$

де $\text{ЛФн}_{\text{відн.}}$ - відносна активність ЛФн в обстежуваній особі, %; ЛФн_n - активність ЛФн в обстежуваній особі, у.о.;

43,7 - постійний коефіцієнт активності ферменту в популяції протягом року, у.о.;

3,34 - постійний коефіцієнт сезону року;

x - порядковий номер сезону року;

$$ЛФН_{\text{відн.}} = \frac{98}{43,6 - 3,34 \times 1} \times 100\%.$$

Рівень відносної активності ЛФн хворої складав 243,4%.

У другому мазку визначали активність МПОн фіксацією його 4% формаліново-спиртовим розчином протягом 30с; промиванням у проточній воді; висушуванням на повітрі; інкубацією протягом 5хв. у свіжоприготованому розчині для виявлення активності мієлопероксидази (2-3мг бензидину на кінчику скальпеля в 6мл 96% спирту, 4мл води і 0,02мл 3% перекису водню); промиванням дистильованою водою; його висушуванням; дофарбовуванням мазка фарбником Романовського-Гімзи; оцінюванням активності мієлопероксидази за допомогою світлового мікроскопа в 100 нейтрофілах шляхом підрахунку кількості нейтрофілів нульовою активністю ферменту (d) - відсутність жовтуватокоричневих гранул у цитоплазмі клітин, зі слабо-позитивною активністю - одиничні, гранули (с), позитивною активністю - забарвлені гранули займають 50% цитоплазми (b) і з різко позитивною реакцією - більше половини цитоплазми зайнято гранулами (a), яку вираховували в умовних одиницях за формулою: $y.o. = a3 + b2 + c1 + d$.

При підрахунку активності МПОн у хворої зі 100 нейтрофілів у 34 клітинах забарвлення було відсутнє, в 4 - гранули були одиничні, у 33 - забарвлені гранули займали 50% цитоплазми та у 29 - займали більш половини цитоплазми. Активність МПОн хворої дорівнювала: $34 \times 0 + 4 \times 1 + 33 \times 2 + 29 \times 3 = 157 y.o.$ Визначали відносну активність МПОн обстежуваної у порівнянні з контролем з урахуванням сезону дослідження за формулою:

$$МПОн_{\text{відн.}} = \frac{МПОн}{190,5 - 9,53x} \times 100 \quad (2)$$

де МПОн_{відн.} - відносна активність МПОн обстежуваної особи, %;

МПОн_n - активність МПОн в обстежуваної особи, у.о.;

190,5 - постійний коефіцієнт значення мієлопероксидази в популяції протягом року;

9,53 - постійний коефіцієнт сезону року;

x - порядковий номер сезону року;

Розрахунок відносної активності МПО в обстежуваної особи за формулою:

$$МПОн_{\text{відн.}} = \frac{157}{190,5 - 9,53 \times 1} \times 100 = 78,5\%.$$

Оскільки, відносна активність ЛФн дорівнювала 243,4%, а МПОн - 78,5%, то було діагностовано активований стан нейтрофілів у циркуляції.

Приклад 2.

Пацієнт О., вік - 65 років. Діагноз: хронічний риносинусит. Дата дослідження активності ЛФн та МПОн - 2 листопада 2009 року. Дослідження здійснювали аналогічно прикладу 1.

При підрахунку активності ЛФн у хворого зі 100 нейтрофілів у 52 клітинах забарвлення було відсутнє, в 30 відповідало +, у 7 - ++, та у 11-+++, активність ЛФн хворого дорівнювала

$$52 \times 0 + 30 \times 1 + 7 \times 2 + 11 \times 3 = 77 y.o.$$

Активність ЛФн хворого дорівнювала 77у.о.

Відносна активність ферменту складала

$$ЛФН_{\text{відн.}} = \frac{77}{43,6 - 3,34 \times 4} \times 100\% = 254,6\%.$$

При підрахунку активності МПОн у хворого зі 100 нейтрофілів у 2 клітинах забарвлення було відсутнє, в 10 - гранули були одиничні, у 50 - забарвлені гранули займали 50 % цитоплазми та у 38 - займали більше половини цитоплазми. Активність МПОн хворого дорівнювала: $2 \times 0 + 10 \times 1 + 50 \times 2 + 38 \times 3 = 224 y.o.$

Активність МПОн у хворого дорівнювала 224у.о., відповідно відносна активність МПОн

$$МПОн_{\text{відн.}} = \frac{224}{190,5 - 9,53 \times 4} \times 100 = 98\%$$

На основі отриманих даних діагностовано праймований стан нейтрофілів у циркуляції хворого.

Приклад 3.

Пацієнтка К., вік - 25 років. Діагноз: вагітність 8 тижнів, загроза переривання вагітності. Дата дослідження ЛФн та МПОн - 29 листопада 2009 року. Дослідження здійснювали аналогічно прикладу 1.

Активність ЛФн хворої складала 62у.о., відповідно значення відносної активності ферменту було 224,9%; активність МПОн вагітної дорівнювала 241у.о., а відносна активність - 105,4%. На основі отриманих даних стану активності ферментів діагностовано праймований стан нейтрофілів у циркуляції вагітної жінки.

Приклад 4.

Пацієнт Ш., вік - 68 років. Діагноз: хронічний обструктивний бронхіт у фазі загострення. Дата дослідження активності ЛФн та МПОн - 28 травня 2009 року.

При підрахунку активності ЛФн у хворого зі 100 нейтрофілів у 32 клітинах забарвлення було відсутнє, в 35 відповідало +, у 22 - ++, та у 11-+++, активність ЛФн хворого дорівнювала $32 \times 0 + 35 \times 1 + 22 \times 2 + 11 \times 3 = 112 y.o.$

Відносна активність ферменту складала

$$ЛФН_{\text{відн.}} = \frac{112}{43,6 - 3,34 \times 2} \times 100\% = 303\%.$$

При підрахунку активності МПОн у хворого зі 100 нейтрофілів у 26 клітинах забарвлення було відсутнє, в 50 - гранули були одиничні, у 14 - забарвлені гранули займали 50 % цитоплазми та у 10 - займали більше половини цитоплазми. Активність МПОн хворого дорівнювала: $26 \times 0 + 50 \times 1 + 14 \times 2 + 10 \times 3 = 108 y.o.$

Активність МПОн становила 108 у.о., відносна активність ферменту дорівнювала:

$$МПОн_{\text{відн.}} = \frac{108}{190,5 - 9,53 \times 2} \times 100 = 51,5\%.$$

Отримані дані свідчать про активований стан нейтрофілів у крові хворого.

Приклад 5. Пацієнтка Ч., вік - 68 років. Діагноз - ЧПЛ СОПР. Дата дослідження активності ЛФн та МПОн - 22 вересня 2009 року.

При підрахунку активності ЛФн у хворої зі 100 нейтрофілів у 80 клітинах забарвлення було відсутнє, в 13 відповідало +, у 4 - ++, та у 3- +++ , активність ЛФн хворої дорівнювала $80 \times 0 + 13 \times 1 + 4 \times 2 + 3 \times 3 = 30 y.o.$

Активність ЛФн хворої дорівнювала 30 у.о.
Відносна активність ЛФн дорівнювала

$$\text{ЛФн}_{\text{відн.}} = \frac{30}{43,6 - 3,34 \times 4} \times 100\% = 99\% .$$

При підрахунку активності МПОн у хворої зі 100 нейтрофілів у 10 клітинах забарвлення було відсутнє, в 3 - гранули були одиничні, у 23 - забарвлені гранули займали 50 % цитоплазми та у 64 - займали більше половини цитоплазми. Активність МПОн хворої дорівнювала: $10 \times 0 + 3 \times 1 + 23 \times 2 + 64 \times 3 = 241 \text{ у.о.}$, відносна активність МПОн хворої склала

$$\text{МПОн}_{\text{відн.}} = \frac{241}{190,5 - 9,53 \times 4} \times 100 = 105\% .$$

Значення відносної активності ЛФн та МПОн хворої на ЧПЛ СОРП свідчать про стан спокою нейтрофілів у циркуляції.

Таким чином, запропонований спосіб дозволяє доступно діагностувати функціональний стан обстежуваного: стан спокою, стан праймінгу або стан активації нейтрофілів у циркуляції в лікарнях будь - якого ступеня акредитації та обґрунтовано використовувати відповідний протокол лікування.