



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 79600

(13) U

(51) МПК

G01N 33/49 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2012 12770**

(22) Дата подання заявки: **09.11.2012**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.04.2013**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.04.2013, Бюл.№ 8**

(72) Винахідник(и):

**Фролова Лідія Олександрівна (UA),
Копійка Віра Вікторівна (UA),
Федотов Євген Рудольфович (UA),
Литвиненко Раїса Олександрівна (UA),
Фролов Олександр Кирилович (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ
ЗАКЛАД "ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ" МІНІСТЕРСТВА ОСВІТИ І
НАУКИ, МОЛОДІ ТА СПОРТУ УКРАЇНИ,
вул. Жуковського, 66, м. Запоріжжя, 69600
(UA)**

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ ЛЮДИНИ

(57) Реферат:

Спосіб визначення функціонального стану лімфоцитів крові людини включає забір венозної крові з антикоагулянтном. Виділення з неї лімфоцитів за допомогою градієнта щільності фікол-верографін; постановку реакції розеткоутворення з еритроцитами барана, які кон'юговані з моноклональними антитілами проти кожної окремої CD-структури з діагностичного набору для фенотипування лімфоцитів, центрифугування суміші клітин, їх теплової та холодової інкубації. Приготування препаратів; мікроскопування та визначення клітин, що приєднали 3 і більше еритроцитів барана. Порівняння отриманих показників із віковою фізіологічною нормою. Визначення за даними фенотипування функціонального стану лімфоцитів. Готують культуральну суміш у складі: середовище 199 та ембріональна теляча сироватка з об'ємним співвідношенням 4:1 з рН 7,2. Здійснюють додаткове центрифугування еритроцитарного діагностикуму "Анти-CD" з наступною заміною його рідинної фракції таким же об'ємом культуральної суміші. Фіксацію препаратів здійснюють 0,6 % розчином глютарового альдегіду, приготованого на культуральній суміші, після чого проводять видалення надосаду. Диференціюють пофарбовані препарати; визначають серед розеткоутворюючих клітин активовані лімфоцити, які приєднали 8 і більше еритроцитів барана.

UA 79600 U

Спосіб належить до біології та медицини, а саме до імунологічних методів оцінки функціонального стану імунітету за співвідношенням популяцій і субпопуляцій лімфоцитів в організмі людини.

Відомий спосіб визначення функціонального стану лімфоцитів крові людини за кількістю клітин в окремих популяціях та субпопуляціях лімфоцитів [Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / В.Л. Беркало, О.В. Бобович, Н.О. Бобров та ін.; під ред. Кайдашева І.П. - Полтава: Полімет, 2003.-320 с. - С. 50-52], який включає: забір венозної крові з антикоагулянтом; виділення з неї лімфоцитів за допомогою градієнта щільності філол-верографін; нанесення на предметне скло перфорованої стрічки Parafilm A (США), додавання в лунки цієї стрічки полі-L-лізину для формування підложки (для кращої адгезії клітин), відмивку залишку полі-L-лізину, приготування лімфоцитарних відбитків шляхом додавання в лунки Parafilm A суспензії лімфоцитів; обробку лімфоцитів у лімфоцитарних відбитках моноклональними антитілами (МКАТ) проти кожної окремої CD-структури з діагностичного набору для фенотипування лімфоцитів; відмивку залишку МКАТ забуференим фізіологічним розчином (ЗФР); обробку антиантитілами, міченими флуорохромом флуоресцеїн ізотіоціанат (ФІТЦ); відмивку залишку мічених ФІТЦ антиантитіл ЗФР; приготування тимчасових препаратів лімфоцитів шляхом накривання лімфоцитарних відбитків покривним склом; окантовку парафіном для попередження їх висихання; визначення за допомогою люмінесцентного мікроскопа 100 лімфоцитів у світлому полі та з них ФІТЦ-позитивних лімфоцитів у темному полі, які належать до кожної відповідної популяції та субпопуляції лімфоцитів; порівняння отриманих показників із віковою фізіологічною нормою та визначення за цими даними функціонального стану лімфоцитів.

Спільними ознаками є:

- забір венозної крові з антикоагулянтом;
- виділення з неї лімфоцитів за допомогою градієнта щільності філол-верографін;
- приготування лімфоцитарних відбитків із суспензії лімфоцитів;
- обробка лімфоцитів CD-діагностикумом на основі моноклональних антитіл проти кожної окремої CD-структури з діагностичного набору для фенотипування лімфоцитів;
- визначення за допомогою мікроскопа вмісту лімфоцитів, які належать до кожної відповідної популяції та субпопуляції лімфоцитів;
- порівняння отриманих показників із віковою фізіологічною нормою;
- визначення функціонального стану лімфоцитів за даними їх фенотипування.

Недоліками способу є недостатня точність визначення функціонального стану лімфоцитів крові людини, висока вартість та недостатня відтворюваність способу.

Причинами, що перешкоджають досягненню результатів, є:

- суб'єктивне візуальне визначення люмінесценції лімфоцитів. Спосіб дає значну напругу на систему зору, тому що необхідно підраховувати 100 клітин у світлому полі, а розрізняти клітини з наявністю люмінесценції - у темному полі;
- багатоетапність способу: інкубація з полі-L-лізином, з антиантитілами, міченими ФІТЦ, відмивка реагентів після виконання кожного із вказаних етапів;
- втрата частини Т-лімфоцитів, які мають слабку адгезію до підложки з полі-L-лізином;
- отримання тимчасових препаратів, що не дозволяє відкласти їх аналіз;
- необхідність використання значного за вартістю люмінесцентного мікроскопа.

Відомий спосіб визначення функціонального стану лімфоцитів крові людини за кількістю клітин в окремих популяціях та субпопуляціях лімфоцитів [Новиков П.Р. Сравнительная характеристика современных методов иммунофенотипирования // Иммунопатология / П.Р.Новиков, О.К.Новиков.-2000. - № 1. - С. 4-9], який включає: забір венозної крові з антикоагулянтом; виділення з неї лімфоцитів за допомогою градієнта щільності фіко-верографін; постановку реакції розеткоутворення з еритроцитами барана, які кон'юговані з моноклональними антитілами проти кожної окремої CD-структури з діагностичного набору для фенотипування лімфоцитів (еритроцитарні діагностикуми "Анти-CD") з центрифугуванням суміші клітин, їх тепловою та холодовою інкубаціями; приготування препаратів шляхом видалення надосадової рідини, фіксації осаду 0,12 % розчином глютарового альдегіду, перемішування, експозиції протягом 5 хв. при кімнатній температурі, повторного перемішування суспензії клітин, нанесення її на предметне скло, висушування та фіксації етанолом протягом 10 хв., фарбування за Романовським-Гімза; мікроскопування під світловим мікроскопом 200 лімфоцитів, визначення клітин, що приєднали 3 і більше еритроцитів барана окремо в кожній пробірці, де відбувалася реакція розеткоутворення з діагностичним набором для CD-фенотипування лімфоцитів; порівняння вмісту популяцій та субпопуляцій лімфоцитів із віковою

фізіологічною нормою та визначення за даними фенотипування функціонального стану лімфоцитів.

Спільними із запропонованим рішенням ознаками є:

- забір венозної крові з антикоагулянтом;
- 5 - виділення з неї лімфоцитів за допомогою градієнта щільності фікол-верографін;
- постановка реакції розеткоутворення з еритроцитами барана, які кон'юговані з моноклональними антитілами проти кожної окремої CD-структури з діагностичного набору для фенотипування лімфоцитів (еритроцитарні діагностикуми "Анти-CD") з центрифугуванням суміші клітин, їх тепловою та холодовою інкубаціями;
- 10 - приготування препаратів шляхом видалення надосадової рідини, фіксації осаду розчином глютарового альдегіду, експозиції при кімнатній температурі, перемішування суспензії клітин, нанесення її на предметне скло, висушування та фіксації, фарбування за Романовським-Гімза;
- мікроскопування під світловим мікроскопом 200 лімфоцитів, визначення клітин, що приєднали 3 і більше еритроцитів барана окремо в кожній пробірці, де відбувалася реакція розеткоутворення з діагностичним набором для CD-фенотипування лімфоцитів;
- 15 - порівняння отриманих показників із віковою фізіологічною нормою;
- визначення функціонального стану лімфоцитів за даними їх фенотипування.

Недоліками способу є те, що він не дозволяє виявляти частку активованих клітин у кожній популяції та субпопуляції фенотипованих лімфоцитів, що знижує точність оцінки функціонального стану лімфоцитів.

Причинами, що перешкоджають досягненню результатів, є:

- урахування всіх лімфоцитів, які приєднали 3 і більше еритроцитів барана з еритроцитарного діагностикуму "Анти-CD", до яких входять як неактивовані тривалоциркулюючі клітини пам'яті, так і активовані лімфоцити, які утворені в імуногенезних реакціях на час обстеження.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб визначення функціонального стану лімфоцитів крові людини, який шляхом постановки реакції розеткоутворення з еритроцитарним діагностикумом, визначення серед розеткоутворюючих популяцій та субпопуляцій лімфоцитів тих, що приєднали 8 та більше еритроцитів барана, тобто активованих лімфоцитів, та за їх вмістом розрахунок індексу активації кожної популяції та субпопуляції лімфоцитів, який дозволяє підвищити точність оцінки функціонального стану лімфоцитів та визначати напруження окремо в кожній CD-популяції та субпопуляції.

Суттєвими ознаками є:

- забір венозної крові з антикоагулянтом;
- 35 - виділення з неї лімфоцитів за допомогою градієнта щільності фікол-верографін;
- приготування культуральної суміші у складі: середовище 199 та ембріональна теляча сироватка з об'ємним співвідношенням 4:1 з рН 7,2;
- центрифугування еритроцитарного діагностикуму "Анти-CD" (еритроцити барана, які кон'юговані з моноклональними антитілами проти кожної окремої CD-структури з діагностичного набору для CD-фенотипування лімфоцитів з наступною заміною його рідинної фракції таким же об'ємом культуральної суміші;
- 40 - постановка реакції розеткоутворення шляхом додавання до суспензії лімфоцитів тотожного об'єму підготованого еритроцитарного діагностикуму "Анти-CD", із центрифугуванням суміші клітин, їх тепловою та холодовою інкубаціями;
- 45 - фіксація препаратів 0,6 % розчином глютарового альдегіду, приготованого на культуральній суміші з подальшим видаленням надосаду, нанесення суспензії лімфоцитів на предметне скло, висушування та фіксації метанолом протягом 10 хв., фарбування за Романовським-Гімза; диференціювання препаратів;
- мікроскопування під світловим мікроскопом 200 лімфоцитів, визначення клітин, що приєднали 3 і більше еритроцитів барана окремо в кожній пробірці, де відбувалася реакція розеткоутворення з діагностичного набору для CD-фенотипування лімфоцитів;
- 50 - порівняння отриманих показників із віковою фізіологічною нормою;
- визначення серед розеткоутворюючих клітин активованих лімфоцитів, що приєднали 8 і більше еритроцитів барана;
- 55 - розрахунок індексу активації (IA) для кожної окремої популяції та субпопуляції лімфоцитів за формулою:

$$IA = \frac{B}{a} \times 100\% \quad (1),$$

де:

IA - індекс активації, %;

а - загальний вміст розеткоутворюючих лімфоцитів, що приєднали 3 і більше еритроцитів барана, %;

в - загальний вміст активованих лімфоцитів, що приєднали 8 і більше еритроцитів барана, %;

5 - визначення функціонального стану лімфоцитів крові людини за індексом активації та даними фенотипування.

Відмінними від прототипу ознаками є:

- приготування культуральної суміші у складі: середовище 199 та ембріональна теляча сироватка з об'ємним співвідношенням 4:1 з рН 7.2;

10 - центрифугування еритроцитарного діагностикуму "Анти-CD" (еритроцити барана, які кон'юговані з моноклональними антитілами проти кожної окремої CD-структури панелі фенотипування лімфоцитів) з наступною заміною його рідинної фракції таким же об'ємом культуральної суміші;

15 - фіксація препаратів 0,6 % розчином глутарового альдегіду, приготованого на культуральній суміші з подальшим видаленням надосаду;

- диференціювання пофарбованих препаратів;

- визначення серед розеткоутворюючих клітин активованих лімфоцитів, що приєднали 8 і більше еритроцитів барана;

- розрахунок індексу активації (IA) за формулою (1);

20 - визначення функціонального стану лімфоцитів крові людини за індексом активації та даними фенотипування.

Спосіб здійснюють таким чином. Виконують забір крові з вени з антикоагулянтом в об'ємі, який необхідний для лікувальних або експериментальних потреб. Зі зразка взятої крові на градієнті щільності фікол-верографін виділяють лімфоцити. Готують культуральну суміш у складі: середовище 199 та ембріональна теляча сироватка з об'ємним співвідношенням 4:1 з рН 7,2, яке забезпечують додаванням концентрованого розчину харчової соди. Отриману культуральну суміш використовують для підготовки еритроцитарного діагностикуму "Анти-CD" та приготування суспензії лімфоцитів з концентрацією клітин 2 млн/мл. Центрифугують еритроцитарний діагностикум "Анти-CD" з наступною заміною його рідинної фракції таким же об'ємом культуральної суміші. Виконують постановку реакції розеткоутворення шляхом додавання до суспензії лімфоцитів тотожного об'єму (але в кількості не менше 0,050 мл) підготованого еритроцитарного діагностикуму "Анти-CD", центрифугування суміші клітин 5-5,5 хв. при 1000 об/хв., їх теплової інкубації в термостаті при температурі +37-37,5 °C протягом 25-27 хв. та холодової інкубації у холодильнику при температурі +4°-6 °C протягом 60-65 хв. Фіксацію осаду клітин здійснюють 0,6 % розчином глутарового альдегіду на культуральній суміші з витримуванням протягом 7-10 хв. при кімнатній температурі; здійснюють видалення надосаду, перемішують осад без утворення піни; готують препарат шляхом нанесення суспензії клітин на предметне скло; прискорено висушують суспензію клітин, наприклад, тепловентилятором; здійснюють фіксацію клітин метанолом протягом 10 хв., проводять інкубацію препаратів у фосфатному буфері при рН 6,8-6,9 протягом 2-3 хв., фарбують 10 % розчином Романовського-Гімза на фосфатному буфері (рН 6,8-6,9) протягом 4-6 хв., диференціюють препарати в підкисленій воді (1 крапля концентрованої соляної кислоти на 300 мл дистильованої води) протягом 1-2 с. з наступним триразовим промиванням препарату в дистильованій воді; мікроскопують під світловим мікроскопом не менше 200 лімфоцитів; визначають розеткоутворюючі клітини, до яких відносять ті, що приєднали 3 і більше еритроцитів барана; з них визначають активовані, до яких відносять такі, що приєднали 8 і більше еритроцитів барана. Порівнюють загальну кількість популяцій та субпопуляцій лімфоцитів з віковою фізіологічною нормою. Розраховують за формулою (1) індекс активації (IA) для кожної популяції і субпопуляції лімфоцитів. За отриманими даними визначають функціональний стан лімфоцитів крові людини.

Теоретичне обґрунтування способу.

На стадії активації лімфоцита стимулюється білок-синтетична система клітини, в результаті чого на її мембрані підвищується щільність рецепторів, у тому числі й відповідних CD-структур, наприклад, CD2, CD3, CD4, CD8, CD 16, CD22, CD25, CD71, HLA-DR. Це призводить до того, що активовані лімфоцити всією поверхнею адсорбують еритроцити барана, кон'юговані з МКАТ до відповідних CD-структур із утворенням фігури повної розетки. Часто активовані лімфоцити утворюють цитоплазматичні вирости, що збільшує їх поверхню, у такому разі формуються багаточарові мегарозетки. Неактивовані Т-лімфоцити містять на мембрані відповідні CD-структури в меншій щільності, тому вони утворюють неповні розетки, які характеризуються приєднанням від 3 до 7 еритроцитів барана. Це підтверджує запропоноване положення, що

популяції і субпопуляції, які приєднали 8 і більше еритроцитів барана, належать до активованих. За отриманими даними визначають функціональний стан лімфоцитів крові людини.

Приклад виконання способу.

5 Було обстежено 82 жінки, яких було розподілено на три групи: до першої групи входили 24 жінки репродуктивного періоду (середній вік по групі складав $24 \pm 4,3$ роки) - контрольна група; до другої - 27 жінок у перименопаузі (середній вік по групі $44,2 \pm 3,4$ роки); до третьої - 31 жінка в менопаузі зі встановленим діагнозом гіпертонічної хвороби I та II стадії (середній вік по групі $58,9 \pm 4,2$ роки).

10 Для обстеження відбирали по 10 мл венозної крові, стабілізованої гепарином у кількості 0,2 мг/мл, виділяли з неї лімфоцити на фікол-верографіновому градієнті ($\rho = 1,078$ г/см³), які використовували для фенотипування лімфоцитів із застосуванням МКАТ проти CD2, CD3, CD4, CD8, CD16, CD22.

Здійснювали підготовку культуральної суміші у складі: середовище 199 та ембріональна теляча сироватка з об'ємним співвідношенням 4:1 з рН 7,2, яку використовували для підготовки еритроцитарного діагностикуму "Анти-CD" та приготування суспензії лімфоцитів з концентрацією клітин 2 млн/мл. Центрифугували еритроцитарний діагностикум "Анти-CD" в об'ємі 0,050 мл для кожної із CD-структур з наступною заміною його рідинної фракції таким же об'ємом культуральної суміші. Виконували постановку реакції розеткоутворення шляхом додавання до 0,050 мл суспензії лімфоцитів з концентрацією 2 млн/мл тотожного об'єму підготованого еритроцитарного діагностикуму "Анти-CD", центрифугування суміші клітин здійснювали протягом 5 хв при 1000 об/хв; їх теплову інкубацію виконували в термостаті при температурі $+37$ °C протягом 25 хв, холодову інкубацію - у холодильнику при температурі $+4$ °C протягом 60 хв. Фіксацію осаду клітин здійснювали при кімнатній температурі протягом 10 хвилин шляхом додавання 0,020 мл 0,6 % розчину глютарового альдегіду на культуральній суміші. Рівень рН забезпечували додаванням насиченого розчину харчової соди. Потім здійснювали видалення надосаду, перемішували осад без утворення піни та готували препарати шляхом нанесення суспензії клітин з осаду на знежирене предметне скло; прискорено висушували суспензію клітин тепловентилятором; здійснювали фіксацію препаратів метанолом протягом 10 хв., проводили інкубацію препаратів у фосфатному буфері при рН 6,8-6,9 протягом 2-3 хв., фарбували їх 10 % розчином Романовського-Гімза на фосфатному буфері (рН 6,8-6,9) протягом 6 хв., диференціювали препарати в підкисленій воді (1 крапля концентрованої соляної кислоти на 300 мл дистильованої води) протягом 1-2 с. із наступним триразовим промиванням препарату в дистильованій воді; мікроскопували під світловим мікроскопом у різних місцях препарату 200 лімфоцитів; визначали розеткоутворюючі клітини, до яких відносили ті, що приєднали 3 і більше еритроцитів барана; з них визначали активовані, до яких відносили такі, що приєднали 8 і більше еритроцитів барана. Порівнювали загальну кількість популяцій та субпопуляцій лімфоцитів з віковою фізіологічною нормою. Далі розраховували за формулою (1) індекс активації (ІА) для кожної популяції і субпопуляції лімфоцитів. За отриманими даними визначали функціональний стан лімфоцитів крові людини. Дані дослідження наведені в таблиці.

Таблиця

Показники фенотипування та індексу активації лімфоцитів крові жінок

Показники	Групи обстежених					
	Перша група (контроль)		Друга група (перименопауза)		Третя група (менопауза)	
	Загальний вміст лімфоцитів, %	ІА, %	Загальний вміст лімфоцитів, %	ІА, %	Загальний вміст лімфоцитів, %	ІА, %
CD2-Т-лімфоцити і натуральні кілери	$64,21 \pm 1,2$	$43,2 \pm 1,4$	$75,2 \pm 2,4^{*,\Delta}$	$57,2 \pm 1,6^{*,\Delta}$	$70,2 \pm 1,46^{*,\Delta}$	$50,71 \pm 1,3^{*,\Delta}$
CD3-Т-лімфоцити	$55,3 \pm 1,7$	$28,9 \pm 1,9$	$63,7 \pm 1,7^{*,\Delta}$	$36,3 \pm 1,9^{*,\Delta}$	$61,5 \pm 1,32^*$	$47,0 \pm 2,1^{*,\Delta}$
CD4-Т-хелпери	$39,2 \pm 1,9$	$22,2 \pm 2,1$	$44,5 \pm 1,8^{*,\Delta}$	$48,5 \pm 2,0^{*,\Delta}$	$39,7 \pm 1,3^{\Delta}$	$45,1 \pm 1,9^{*,\Delta}$
CD8-Т-кілери/супресори	$18,5 \pm 1,1$	$22,7 \pm 2,1$	$22,5 \pm 2,0^{*,\Delta}$	$23,6 \pm 1,3^{\Delta}$	$23,8 \pm 1,54$	$32,4 \pm 1,4^{*,\Delta}$

Продовження таблиці

CD 16-натуральні кілери	19,5±0,9	28,7±1,2	25,1±1,0*	45,4±1,5 ^{*,Δ}	26,6±1,2*	50,0±1,4 ^{*,Δ}
CD22- В-лімфоцити	16,8±1,0	16,6±1,1	19,9±1,3	35,2±1,4 ^{*,Δ}	19,7±1,2	46,7±1,5 ^{*,Δ}
Регуляторний індекс (CD4/CD8)	2,12±0,06	0,98±0,07	1,98±0,05	2,06±0,06 ^{*,Δ}	1,67±0,05 ^{*,Δ}	1,39±0,05 ^{*,Δ}

Примітки:

1) * - показники статистично достовірно відрізняються від даних групи контролю (жінок у репродуктивному періоді), $p \leq 0,05$;

2) ^Δ - показники статистично достовірно відрізняються між групами жінок у перименопаузі (друга група) і менопаузі (третя група), $p \leq 0,05$.

За даними багатьох дослідників, у жіночому організмі в зрілому віці відбуваються значні зміни в багатьох системах органів, у тому числі й імунній системі. Нашими дослідженнями (таблиця) встановлено, що на фоні нейрогормональної перебудови в жінок у перименопаузі активується переважно хелперна регуляція імуногенезу: 44,5±1,8 % - загальний вміст Т-хелперів, 48,5±2,0 % - індекс їх активації, яка забезпечує конституційну перебудову тканин та органів в організмі. Тоді як Т-кілери/супресори дорівнювали: загальний вміст - 22,5±2,0 %, індекс їх активації - 23,6±1,3 %. У жінок у менопаузі підвищений контроль репаративної активності тканин та органів супроводжується супресорною негативною регуляцією імуногенезу, яка стримує аутоімунні реакції клітинного і гуморального імунітету. У них загальний вміст Т-кілерів/супресорів складає 23,8±1,54 %, а індекс їх активації - 32,4±1,4 %. Ще більше натуральних кілерів, які виконують синергічну з Т-кілерами функцію.

Більш об'єктивно виглядає визначення стану імунної системи за аналізом регуляторного індексу (CD4/CD8) із урахуванням активованих лімфоцитів. Аналіз хелперно/супресорного відношення субпопуляцій лімфоцитів тільки за загальним їх вмістом, який зараз використовують у лабораторній імунології, не дає об'єктивної інформації про стан імунної системи. Наприклад, регуляторний індекс у жінок репродуктивного віку дорівнює 2,12±0,6 %, що свідчить про хелперну перевагу імуногенезу, тоді як насправді його позитивна і негативна регуляції збалансовані, про що свідчить регуляторний індекс, розрахований за індексом активації - 0,98±0,07 %.

Тобто, у жінок репродуктивного віку показники CD-популяцій знаходяться в межах фізіологічної норми для даного онтогенетичного періоду, у них збалансована хелперна і супресорна активність лімфоцитів, що відображає нормальну фізіологічну регенеративну активність тканин усіх систем органів (регуляторний індекс активованих фракцій Тх і Тс CD4/CD8 дорівнює 0,98±0,07 %).

У жінок у перименопаузі на фоні гормональної перебудови та морфофункціональної перебудови тіла має місце хелперна регуляторна активність Т-лімфоцитів (ІА регуляторного індексу за способом складає 2,06±0,06 %).

У жінок у менопаузі превалює супресорна регуляторна активність лімфоцитів (ІА регуляторного індексу за способом - 0,39±0,05 %). Тому в цей онтогенетичний період на фоні згасання репродуктивної активності, зниження інтенсивності фізіологічної регенерації існує загроза розвитку аутоімунних реакцій.

Таким чином, запропонований спосіб підвищує точність оцінки функціонального стану лімфоцитів у відповідний онтогенетичний період і конкретну імунологічну ситуацію організму на момент обстеження.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення функціонального стану лімфоцитів крові людини, який включає забір венозної крові з антикоагулянтом; виділення з неї лімфоцитів за допомогою градієнта щільності фікол-верографін; постановку реакції розеткоутворення з еритроцитами барана, які кон'юговані з моноклональними антитілами проти кожної окремої CD-структури з діагностичного набору для фенотипування лімфоцитів, центрифугування суміші клітин, їх теплову та холодкову інкубації; приготування препаратів; мікроскопування та визначення клітин, що приєднали 3 і більше еритроцитів барана; порівняння отриманих показників із віковою фізіологічною нормою; визначення за даними фенотипування функціонального стану лімфоцитів, який **відрізняється**

тим, що готують культуральну суміш у складі: середовище 199 та ембріональна теляча сироватка з об'ємним співвідношенням 4:1 з рН 7,2; здійснюють додаткове центрифугування еритроцитарного діагностикуму "Анти-CD" з наступною заміною його рідинної фракції таким же об'ємом культуральної суміші; а фіксацію препаратів здійснюють 0,6 % розчином глютарового альдегіду, приготованого на культуральній суміші, після чого проводять видалення надосаду; диференціюють пофарбовані препарати; визначають серед розеткоутворюючих клітин активовані лімфоцити, які приєднали 8 і більше еритроцитів барана; розраховують індекс активації за формулою:

$$IA = \frac{B}{a} \times 100\% ,$$

10 де:

IA - індекс активації, %;

a - загальний вміст розеткоутворюючих лімфоцитів, що приєднали 3 і більше еритроцитів барана, %;

в - загальний вміст активованих лімфоцитів, що приєднали 8 і більше еритроцитів барана, %;

15 визначають функціональний стан лімфоцитів крові людини за індексом активації та даними фенотипування.

Комп'ютерна верстка М. Ломалова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601