

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Разрешено Минздравом Республики
Беларусь для практического использования

Первый заместитель министра здраво-
охранения, председатель комиссии по способам
профилактики, диагностики, лечения и
организационным формам работы МЗ РБ

 В.М. Ореховский
7 июля 2001 г.
Регистрационный № 96-0601

МЕТОД ИНТЕГРАЛЬНОЙ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО НАПРЯЖЕНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

(инструкция по применению)

Учреждение-разработчик: НИИ экологической и профессиональной патологии

Авторы: канд. биол. наук А.М. Горчаков, д-р мед. наук, проф. В.А. Остапенко, канд.
мед. наук Н.Г. Кручинский, Ф.Т. Горчакова

[Перейти к оглавлению](#)

Оглавление

МЕТОДОЛОГИЯ	3
1. ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ	4
2. ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ И СРЕДСТВ	5
2.1. Оборудование	5
2.2. Лабораторная посуда и принадлежности	5
2.3. Реактивы	5
3. МЕТОДИКА ВЫПОЛНЕНИЯ МЕТОДА	6
4. ОСОБЕННОСТИ ТЕХНИКИ ВЫПОЛНЕНИЯ МЕТОДА	7
5. РЕЗУЛЬТАТЫ	8
6. ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ	8
7. ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ	8

Метод основан на наблюдении за изменением состояния (люминесценция) после окрашивания акридиновым оранжевым (АО) фиксированных иммунокомпетентных клеток крови (ИКК) у пациентов с различными заболеваниями, у здоровых людей и в экспериментальных моделях (лабораторные животные и клеточные культуры). Подобные наблюдения были проведены и при оценке состояния иммунной системы у детей и взрослых, проживающих на радиоэкологически неблагоприятных территориях.

Методология

Принцип метода основан на том, что иммуногенез является частным случаем адаптогенеза. Система крови, выполняющая в организме интегрирующие функции, способна наиболее полно отражать состояние адаптации или дезадаптации организма. Ключевым элементом этой системы, обеспечивающим все уровни защиты организма, являются циркулирующие в крови иммуноциты.

Дезадаптация организма наблюдается при любой патологии, в экстремальных условиях и чрезвычайных ситуациях. Напряжение защитно-приспособительных функций говорит о неполноценности компенсаторной реакции и возможности формирования патологии.

В реализации пластических компонентов адаптации основную роль играет интенсификация синтеза нуклеиновых кислот и белков. Первым этапом этого процесса является синтез РНК, который может быть количественно оценен в клетках *in situ* спектрально-люминесцентным методом (Карнаухов В.Н., 1978) с помощью уравнения:

$$\alpha = I_{640}/I_{530} = \text{НК}_1/\text{НК}_2 \approx \text{РНК}/\text{ДНК},$$

где I_{640} — интенсивность люминесценции клеток на длине волны 640 нм,

I_{530} — интенсивность люминесценции клеток на длине волны 530 нм,

НК_1 — односпиральные нуклеиновые кислоты,

НК₂ — двуспиральные нуклеиновые кислоты.

Подобное исследование может быть проведено и с применением проточной цитофлуориметрии (Darzynkiewictz Z. et al., 1976; Halliday G. et al., 1981). Однако в наших условиях использование этого метода является дорогостоящим и трудоемким, кроме того более широкое внедрение его в практику сдерживается отсутствием необходимого оборудования. В нашей разработке исследование проводится в течении 30 мин на обычных мазках крови, которые в фиксированном состоянии могут храниться неограниченно долго с возможной последующей транспортировкой для анализа в лабораторию, оснащенную указанным комплексом.

Значение безразмерного параметра α , предлагаемого нами для оценки состояния иммунной системы путем изучения изменения люминесценции иммуноцитов крови после их окраски АО, составляет $0,20 \pm 0,05$ усл. ед. для контрольной группы (практически здоровые доноры).

1. Показания к применению

Метод интегральной оценки функционального напряжения иммунной системы рекомендуется применять в следующих случаях:

- проведение скрининговых исследований состояния иммунной системы и общего состояния организма у населения различных групп риска;
- мониторинг состояния иммунной системы и общего состояния организма в динамике лечебного процесса.

2. ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ И СРЕДСТВ

2.1. Оборудование:

- люминесцентный микроскоп «Люам-ПМ-11»;
- центрифуга ОНП-8-УХЛ 4,2;
- магнитная мешалка ММ-5;
- водяная баня до 100° С;
- термостат воздушный типа ТС-80 М-2 на 37° С.

2.2. Лабораторная посуда и принадлежности:

- стекла предметные;
- стекла покровные;
- стандартные центрифужные пробирки емкостью по 10,0 мл;
- чашки Петри (5 штук);
- колбы термостатируемые на 250,0 и 500,0 мл (по 5 штук каждой емкости);
- мерные стаканчики на 100,0; 50,0 и 25,0 мл (по 10 штук каждой емкости);
- мерные цилиндры на 50,0; 100,0 и 200,0 мл (по 1 каждой емкости);
- полуавтоматические пипетки-дозаторы с постоянным объемом микролитров на 0,1; 0,5 и 1,0 мл (по одному каждого диапазона);
- фильтровальная бумага;
- полуавтоматический пипеточный дозатор с изменяющимся объемом в диапазоне от 20 до 200 мкл (1 шт.).

2.3. Реактивы:

- раствор АО (готовится в день анализа (ex tempore) в разведении 1:30000);
- цитрат-фосфатный буфер (рН 4,2);

Метод интегральной оценки функционального напряжения иммунной системы

- смесь Карнуа (спирт, хлороформ и ледяная уксусная кислота в соотношении 6:3:1);
- батарея спиртов с понижающейся концентрацией (96°, 70° и 30°);
- иммерсионное масло для микроскопии.

3. Методика выполнения метода

В качестве объекта исследования используются фиксированные лимфоциты крови. Для этого делается стандартный мазок крови, взятой из пальца или из вены пациента. Препарат высушивается и фиксируется 10 мин в смеси Карнуа (спирт, хлороформ, ледяная уксусная кислота в соотношении 6:3:1), затем проводится через батарею спиртов с понижающейся концентрацией (96°, 70°, 30°) с экспозицией по 2 минуты в каждом до дистиллированной воды. После этого препарат выдерживается 4 мин в цитрат-фосфатном буфере (рН 4,2) и окрашивается 10 мин в растворе АО (разведение 1:30000), приготовленном на том же буфере. Затем мокрый препарат накрывается покровным стеклом и исследуется под иммерсией на двухканальном микрофлуориметре, снабженном компьютером.

Анализируются 50–100 лимфоцитов по всему полю препарата. Накопление и обработка информации осуществляется с помощью специально разработанной компьютерной программы «Клетка».

Популяции исследованных клеток отображаются на фазовой плоскости (на экране монитора компьютера) в виде скопления точек в координатах интенсивностей красной (I_{640} , ось Y) и зеленой (I_{530} , ось X) люминесценции и одновременно в виде гистограмм распределения этих параметров, а также их отношения I_{640}/I_{530} , (Y/X).

Дальнейшая обработка информации производится с помощью экспертной системы идентификации патологических состояний организма, интегрированной с программой «Клетка».

В фиксированных лимфоцитах АО взаимодействует с ДНК и РНК. С ДНК — в форме мономера с соответствующей люминесценцией в области 530 нм, а с РНК — в форме полимера с люминесценцией в области 640 нм. Основным рабочим параметром является параметр a , иными словами отношение I_{640}/I_{530} .

Средняя величина параметра a в популяции лимфоцитов конкретного пациента является интегральным показателем функционального напряжения его иммунной системы, что служит важной характеристикой общего состояния организма в целом. В норме величина параметра a колеблется в пределах $0,2 \pm 0,05$ усл. ед. При патологии его значение может достигать 1,0 и более, что является критерием тяжести патологического процесса.

4. Особенности техники выполнения метода

Для получения объективных и воспроизводимых данных необходима регулярная калибровка прибора по внешним стандартам. Такими стандартами в нашем случае являются люминесцирующие стекла ЖС-10 и ЖС-19, обладающие разными интенсивностями люминесценции в зеленой и красной областях спектра. Распределение на фазовой плоскости в координатах I_{640} и I_{530} люминесцентных сигналов от 30–50 точек на этих стеклах заводится в память компьютера и является эталонным. При калибровке прибора, вновь регистрируемые сигналы должны укладываться в ранее полученные эллипсы рассеяния точек на фазовой плоскости. Это достигается с помощью регуляции освещенности в поле зрения микроскопа и напряжения на фотоумножителях.

Концентрация растворов применяемых флуорохромов (как основных реагентов) должна постоянно контролироваться спектрофотометрически. Это также обеспечивает объективность получаемых результатов.

Для анализа следует использовать только то иммерсионное масло, которое само по себе не вызывает люминесцентного свечения.

Метод интегральной оценки функционального напряжения иммунной системы

Полуавтоматический пипеточный дозатор жидкостей с изменяющимся объемом используется для дозирования объемов 30,0 и 50,0 мкл.

Состояние здоровья и соответственно иммунной системы — процесс динамический и по-разному выраженный у разных людей. Поэтому для подтверждения объективности или истинности получаемых результатов необходимо регулярно и одновременно исследовать 6–10 мазков, приготовленных из одного образца крови конкретного пациента. Разброс средних значений регистрируемых параметров не должен превышать 2σ . При таких условиях гарантируется воспроизводимость и истинность полученных результатов метода.

5. Результаты

Основным результатом внедрения метода интегральной оценки функционального напряжения иммунной системы в БелНИИЭПП явилось улучшение качества диагностического процесса за счет возможности ранней диагностики патологических состояний и за счет повышения эффективности контроля в процессе лечения.

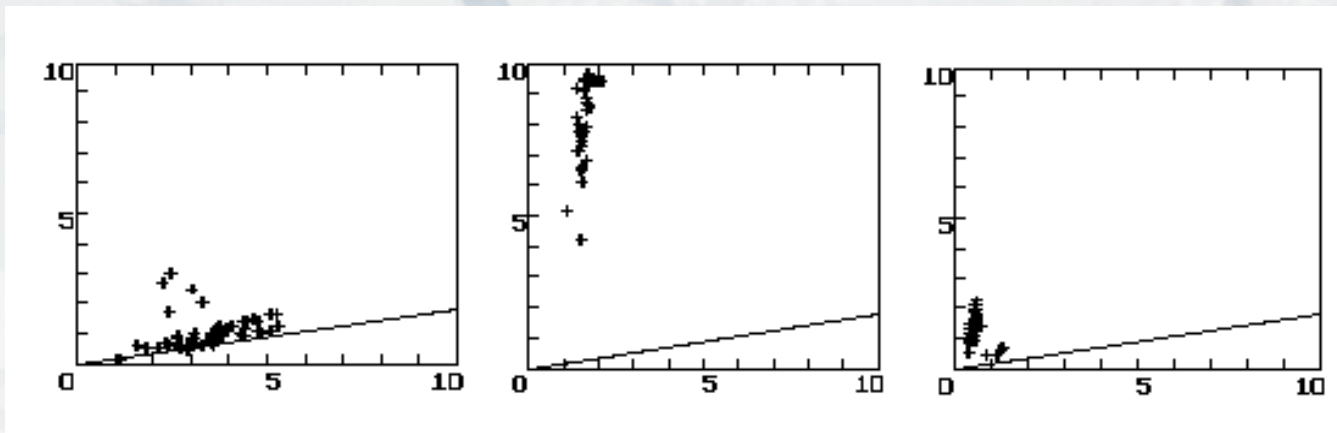
На основании вышеизложенного этот метод может быть рекомендован для внедрения в практику ЛПУ Беларуси.

6. Противопоказания

Не установлены, поскольку метод относится к клинической лабораторной диагностике.

7. Возможные осложнения

При разработке методики не выявлены.



Определение уровня функционального напряжения иммунной системы в фиксированных препаратах ИКК методом двухволновой микрофлуорометрии

Флуорохромирование акридиновым оранжевым.

Наклонной линией на фазовой плоскости обозначена зона нормы.

а — здоровый ребенок;

б — ребенок, больной хроническим пиелонефритом;

в — ребенок, подвергавшийся хроническому низкоуровневому радиационному воздействию.

Заключение: у ребенка, постоянно проживающего на загрязненной территории, определяется перенапряжение иммунной системы, что иллюстрируется высокими значениями параметра α ИКК при низких значениях интенсивностей люминесценции при I_{530} и I_{640} нм.