

# 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 № 97-0601

## МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ НА ОСНОВЕ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК КРОВИ (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

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

В сочетании с рутинным лабораторно-гематологическим анализом разработанный метод позволяет идентифицировать следующие характерные виды патологии (без указания их локализации): предпатология и вялотекущие воспалительные процессы, острые патологические процессы в ранней фазе развития, хронические патологические процессы в стадии ремиссии и обострения, хронические патологические процессы с органическими поражениями.

Все изменения в организме отслеживаются строго количественно путем измерения люминесцентных характеристик циркулирующих в крови иммунокомпетентных клеток (ИКК), выполняющих цензорные функции.

## **МЕТОДОЛОГИЯ**

В живой клетке акридин оранжевый (АО) взаимодействует в основном с ДНК хроматина в форме мономера, люминесцируя при этом в области 530 нм. Кроме того, АО накапливается в лизосомах, где агрегирует и люминесцирует уже в области 640 нм. Поскольку специфические функции ИКК базируются на процессах биосинтеза, эндо- и экзоцитоза, протекающих с непременным участием упомянутых органелл, происходит закономерное изменение их физико-химического и структурно-функционального статуса при инициации и развитии патологического процесса.

Изучение поведения люминесцентных характеристик ИКК в динамике различных болезненных состояний позволяет выявить определенные закономерности в формировании их бипараметрических распределений на фазовой плоскости. Показано, что форма и взаиморасположение эллипсов рассеяния популяций лимфоцитов и лейкоцитов, вернее их

люминесцентных характеристик, на фазовой плоскости могут иметь диагностический смысл.

Действительно, используя методы математической статистики, а именно многомерный статистический анализ (методы дискриминантного и кластерного анализа, теорию снижения размерности), удалось построить решающие правила, позволяющие классифицировать состояние пациента по имеющемуся набору интенсивностей люминесценции ИКК. При решении задач классификации и снижения размерности максимально использовалось «обучение» в настройке математических моделей.

Важным элементом такого диагностирования является автоматическое определение величины отклонений регистрируемых параметров от нормы, иными словами количественная оценка тяжести патологии.

Методологической основой метода послужил распространившийся в последнее время при решении задач медицинской диагностики принцип «обучения» экспертной системы, позволивший выстроить формальные диагностические правила (алгоритмы) распознавания различных состояний организма.

## **1. ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Метод идентификации патологических состояний на основе люминесцентного анализа ИКК рекомендуется применять в следующих случаях:

- проведение скринингового обследования людей, пострадавших от аварий и в чрезвычайных ситуациях, или профилактического обследования, проводимого с целью раннего выявления патологических состояний;

- труднодиагностируемые состояния;
- контроль в процессе лечения больных для его прогнозирования и оптимизации.

## **2. ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ И СРЕДСТВ**

### **2.1. Оборудование**

- люминесцентный микроскоп «Люмам-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 пипеточные дозаторы с постоянным объемом на 0,1; 0,5 и 1,0 мл (по одному каждого диапазона);
- полуавтоматический пипеточный дозатор с изменяющимся объемом в диапазоне от 20 до 200 мкл (1 шт.);
- фильтровальная бумага.

### **2.3. Реактивы:**

- раствор АО (готовится ex tempore в разведении 1:30000 в день анализа) в концентрации  $1 \times 10^{-5}$  моль в фосфатном буфере;
- фосфатный буфер (рН 4,2).

## **3. МЕТОДИКА ВЫПОЛНЕНИЯ**

В качестве объекта исследования используются живые ИКК — лимфоциты и лейкоциты крови. ИКК исследуют в составе нефракционированной крови. Каплю крови (10–15 мкл) смешивают на предметном стекле с равным объемом раствора АО в фосфатном буфере (рН 7,4) в концентрации  $5 \times 10^{-5}$  моль. Затем препарат накрывают покровным стеклом и избыток жидкой среды удаляют с помощью фильтровальной бумаги.

Люминесцентные параметры популяций ИКК (по 50–100 клеток) регистрируют с помощью двухканального микрофлуориметра, снабженного компьютером. 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».

Эффективность алгоритмов классификации функциональных состояний организма, осуществляемых только на основе анализа люминесцентных характеристик живых клеток, составила 75%. Это объясняется тем, что в ряде случаев встретились трудности в диагностировании обострения вялотекущего хронического процесса и обострения хронического воспаления с органическими поражениями. Эллипсы рассеяния точек на фазовой плоскости при таких типах патологического процесса в некоторых случаях могут имитировать состояние нормы или ремиссии хронического патологического процесса. Использование дополнительных параметров, характеризующих состояние организма пациентов, таких как количество лейкоцитов, величина СОЭ и отношение лимфоциты/гранулоциты в крови позволило оптимизировать разработанную компьютерную систему типирования патологических процессов и повысить ее эффективность практически до 95%.

Следует подчеркнуть, что при проведении клинического мониторинга необходимо получить исходную информацию, то есть исследовать кровь пациента данным методом до начала лечения.

#### **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.

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  $2s$ . При таких условиях гарантируется воспроизводимость и истинность полученных результатов метода.

## **5. РЕЗУЛЬТАТЫ**

Основным результатом внедрения метода идентификации патологических состояний на основе люминесцентного анализа иммунокомпетентных клеток в БелНИИЭПП явилось улучшение качества диагностического процесса за счет возможности ранней диагностики патологических состояний и за счет повышения эффективности контроля процесса 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.

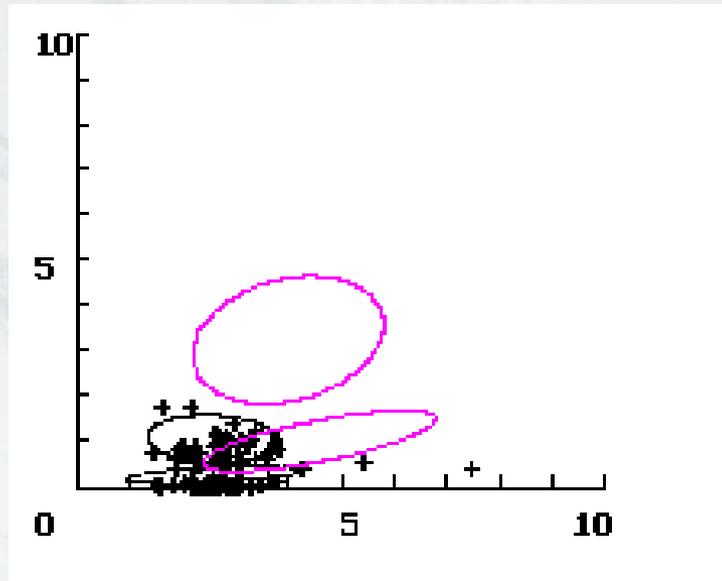
## **7. ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ**

При разработке методики не выявлены.

Схема распознавания и анализа функциональных состояний организма на основе двухволновой микрофлуорометрии иммуноцитов крови



Использование разработанных алгоритмов распознавания (или обучающих моделей) в комплексе с мечеными диагностическими антителами позволяет идентифицировать характер патологического процесса (вплоть до определения конкретного заболевания)



Параметры распределений				
Средние	2,582	0,265	2,606	1,037
Дисперсии	0,774	0,011	0,445	0,081
Отклонение от центра нормы	-2,02	-0,74	-1,41	-2,17
Вывод:	Хронический процесс Состояние ремиссии			

Рис. 1. Пример идентификации патологического состояния