

Запропонований спосіб відноситься до галузей біології і медицини та може бути використаний для оцінки реакції лейкоцитів на різні екзогенні та ендогенні впливи в дослідях.

Відомі способи оцінки функціональної активності лейкоцитів [Лебедев К.И., Понякина И.Д. Иммунограмма в клинической практике. – М.: Наука, 1990. – С. 91 – 101, Нагоев Б.С. Модификация цитохимического метода восстановления нитросинего тетразолия //Лабораторное дело. – 1983. – № 8. – С. 7 – 11, Пигаревский В.Е. Зернистые лейкоциты и их свойства. – М.: Медицина, 1978. – 128 с., Лимфоциты: Методы. Ханс С. / Под ред. Клауса Дж.; Пер. с англ. – М.: "Медицина", 1990. – 395 с., Чернушенко Е.Ф., Когосова Л.С. Иммунологические исследования в клинике. – Киев: "Здоров'я", 1978. – С. 13 – 15].

Найбільш близьким до запропонованого способу є спосіб оцінки функціонального стану клітин тканини, що включає нанесення клітинної суспензії на предметне скло, інкубування у вологій камері протягом 2 годин, фіксацію метиловим спиртом та їх регідратацію, нанесення на 30 – 60 хвилин специфічного до вуглеводного залишку глікопротеїдів клітин лектину, відмивання в забуференому ізотонічному розчині, інкубування препаратів з пероксидазою хрину або тиреоглобуліном, які вибірково зв'язують лектин, виявлення пероксидази хрину (або тиреоглобуліна), для чого препарати інкубують з одним із хромогенів (3'3-діамінобензидін, тетраметілбензидін, пара-фенілдіамін-пірокатехол, 4-хлор-1-нафтол). Активність пероксидази хрину (або тиреоглобуліну) та відповідно локалізацію пов'язаного з глікокон'югатом лектину визначають по коричневим відкладенням продуктів окиснення полімеризації. [Луцик А.Д., Детюк Е.С., Луцик М.Д. Лектины в гистохимии. – Львов: Львовский университет, 1989. – 144 с].

Недоліком відомого способу є його трудомісткість, неможливість вивчення зміни поверхневих глікопротеїдів клітин після їх функціонального навантаження та диференціювання клітин у клітинній суспензії.

В основу винаходу поставлена задача створити спосіб оцінки функціонального стану лейкоцитів шляхом удосконалення відомого способу, дослідити зміни поверхневих глікопротеїдів після їх функціонального навантаження, забезпечити можливість диференціювання клітин у клітинній суспензії та досягти спрощення виконання способу.

Поставлену задачу вирішують створенням способу оцінки функціонального стану лейкоцитів, що включає нанесення крові на предметне скло, інкубування крові у вологій камері, відмивання препаратів у забуференому ізотонічному розчині, фіксацію спиртом, нанесення на препарат лектину конканаваліну-А, який специфічно зв'язується з моновуглеводним залишком поверхневих глікопротеїдів клітин D-манозою та маркеру лектина – пероксидазу хрину, інкубування з діамінобензидіном, визначення продуктів окиснення полімеризації, в якому, згідно з винаходом, додатково в кров додають фізіологічно активну речовину, проводять забарвлення ядер лейкоцитів 1% розчином сафраніну, а оцінку функціонального стану лейкоцитів проводять по продуктах окиснення полімеризації з використанням середнього цитохімічного коефіцієнту.

Запропонований нами спосіб дає можливість дати оцінку функціонального стану лейкоцитів шляхом підрахунку зміни поверхневих глікопротеїдів з моновуглеводним залишком D-манозою, які відіграють роль у реалізації головних функцій лейкоцитів – відповіді на антиген, активації комплемента, опсонізації мікроорганізмів та в посиленні процесів фагоцитозу [Cella M., Lanzavecchia A. Antigen Targeting to DCs Via the Mannose-receptor. – Basel., 1995. – Р. 97, Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология. Одесса "Астро Принт", 1999. 604 с.] та одночасне диференціювання лейкоцитів. Спосіб достатньо простий, не потребує великих фінансів та часу.

Спрощення методу досягають виключенням з процесу дегідратації препаратів, заміну фіксатора препаратів на етиловий спирт, який не дає високої токсичної дії, дешевший та доступний для використання (метиловий спирт є токсичним та дефіцитним), а можливість диференціювання клітин крові досягають за рахунок додаткового забарвлення клітин крові розповсюдженням та простим у використанні барвником – сафраніном.

Заявлений спосіб здійснюють наступним чином.

Використовують кров донорів у кількості 0,5мл. Кров інкубують з дослідною фізіологічно активною речовиною протягом двох годин на предметних стеклах у вологій камері. Прикріплені до скла лейкоцити відмивають від еритроцитів в забуференому ізотонічному розчині (рН 7,4), фіксують етиловим спиртом 5 хвилин та інкубують протягом 30 хвилин з лектином конканаваліном-А (30мкг/мл), який має вуглеводну специфічність до поверхневих глікопротеїдів з моновуглеводним залишком D-манозою. В якості маркеру конканаваліну-А використовує пероксидазу хрину (30мкг/мл), яку наносять на препарати на 30 хвилин. Активність пероксидази та відповідно локалізацію пов'язаного з глікокон'югатами конканаваліну-А виявляють у розчині, який вміщує 0,05% 3,3-діамінобензидину тетрагідрохлориду та 0,015% перекису водню у забуференому ізотонічному розчині. Ядра лейкоцитів фарбують 30 секунд у 1% розчині сафраніну. Стан поверхневих глікопротеїдів з моновуглеводним залишком D-манозою лейкоцитів оцінюють під мікроскопом по коричневих відкладеннях продуктів окисної полімеризації діамінобензидину у вигляді гранул за допомогою середнього цитохімічного коефіцієнту для кожного виду клітин окремо. Для кількісної оцінки зміни манозомісних мембранних структур лейкоцитів усі клітини ділять на групи. До першої нульової групи відносять клітини без забарвлення; до 2-ї групи – клітини, площа забарвлення яких була до 25% ; до 3-ї групи – площа забарвлення клітин 25 – 75%; до 4-ї групи – клітини, які повністю забарвлені. Для визначення показника середнього цитохімічного коефіцієнту на препаратах враховують 100 клітин. Отримане число множать на номер групи і суму отриманих добуток ділять на 100. Це число являє собою показник середнього цитохімічного коефіцієнту ступеню експресії манозомісних мембранних структур лейкоцитів.

Показник середнього цитохімічного коефіцієнту = $(1a + 2b + 3c + 4d)/100$, де (a, b, c, d – кількість клітин відповідно нульової, 1, 2, 3 і 4 групи) [Нагоев Б.С. Модификация цитохимического метода восстановления нитросинего тетразолия //Лабораторное дело. – 1983. – № 8 – С. 7 – 11].

Приклади.

Щоб довести ефективність методу оцінки функціонального стану лейкоцитів на основі дослідження експресії манозомісних мембранних структур лейкоцитів, нами було одночасно проведено серію дослідів на крові донорів для встановлення кореляційної залежності, яку досліджували між експресією манозомісних мембранних структур лімфоцитів та нейтрофілів, а також показниками функціональної активності нейтрофілів: тест з використанням нітросинього тетразолію, показниками фагоцитозу, лізосомальними катіонними білками [Посібник з експериментально-клінічних досліджень в фармакології, біології та медицині / Беркало Л.В., Бобович О.В., Боброва Н.О. та ін.; під ред. Кайдашева І.П., Соколенко В.М., Катрушова О.В. – Полтава, вид-во УМСА, 1996. – 271 с.] та мембранними маркерами лімфоцитів: Т–лімфоцитів CD3 та В–лімфоцитів CD22 [Сидоренко С.П. Поверхностные антигены клеток человека, систематизированные международными рабочими совещаниями по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека // Иммунология та алергологія. – 1998. – № 3. – С. 16 – 38, Лимфоциты: Методы. Ханс С. /Под ред. Клауса Дж.; Пер. с англ. – М: "Медицина", 1990. – 395 с.] (табл. 1).

Таблиця 1

Коефіцієнти попарної кореляції між експресією манозомісних мембранних структур лімфоцитів та нейтрофілів і показниками клітинного імунітету на крові донорів (n = 40).

		Тест з використанням нітросинього тетразолію	Фагоцитоз	Лізосомальні катіонні білки	Манозомісні мембранні структури лімфоцитів	Манозомісні мембранні структури нейтрофілів	Маркери Т–лімфоцитів CD3	Маркери В–лімфоцитів CD22
Тест з використанням нітросинього тетразолію	г р							
Фагоцитоз	г р	– 0,224 0,104						
Лізосомальні катіонні білки	г р	–0,124 0,208	–0,121 0,324					
Манозомісні мембранні структури лімфоцитів	г р	–0,152 0,096	+0,780 0,001 *	+0,489 0,0032 *				
Манозомісні мембранні структури нейтрофілів	г р	–0,081 0,034	0,795 0,0024 *	–0,084 0,386	+0,077 0,163			
Маркери Т–лімфоцитів CD3	г р	–0,187 0,069	+0,740 0,034 *	–0,354 0,078	+0,694 0,084 *	–0,249 0,124		
Маркери В–лімфоцитів CD22	г р	–0,131 0,204	+0,428 0,0081 *	+0,422 0,0039 *	–0,110 0,352	+0,406 0,0033 *	–0,104 0,125	

Примітка:

* – вірогідні коефіцієнти кореляції; г – коефіцієнти кореляції; р – показник надійності коефіцієнту кореляції.

Виявлено, що експресія манозомісних мембранних структур лімфоцитів була пов'язана кореляціями середньої сили з експресією CD3 Т–лімфоцитів (г = 0,694) і ЛКБ гранулоцитів (г = 0,489) нейтрофілів. Вона також утворювала позитивну кореляцію з показником фагоцитозу (г = 0,780). В цих же зразках крові експресія манозомісних мембранних структур нейтрофілів формувала вірогідну позитивну кореляцію з маркером В–лімфоцитів CD22 (г = 0,406), з показником фагоцитозу (г = 0,795) та ЛКБ (г = 0,422). Також був виявлений кореляційний зв'язок між показниками фагоцитозу та маркером Т–лімфоцитів CD3 (г=0,740).

Таким чином, виявлено, що експресія манозомісних мембранних структур лімфоцитів та нейтрофілів пов'язана з показниками їх функціональної активності, дослідження яких може бути використано для оцінки функціонального стану одночасно як лімфоцитів так і нейтрофілів.

Нами також були проведені на крові донорів досліді впливу неселективного стимулятора α –, β –адренорецепторів адреналіну [Машковский М.Д. Лекарственные средства: В 2т. / Харьков: Торсинг, 1997. – Т.1. – 560 с.] на експресію поверхневих манозомісних мембранних структур лімфоцитів та нейтрофілів. Адреналін використовували у трьох концентраціях: 220×10^{-12} /мл; 440×10^{-12} /мл; 660×10^{-12} /мл. Функціональну активність лімфоцитів та нейтрофілів оцінювали за допомогою визначення експресії манозомісних мембранних структур запропонованим способом.

Наші дослідження показали, що адреналін у концентраціях 220×10^{-12} /мл і 440×10^{-12} /мл викликав вірогідне зниження експресії манозомісних мембранних структур лімфоцитів у порівнянні з контрольними серіями. У той же час концентрація 660×10^{-12} /мл спричинила незначну інгібуючу дію.

Дослідження відповіді нейтрофілів під дією адреналіну виявило, що α –, β –адреностимуляція не викликала змін експресії манозомісних мембранних структур у концентрації 220×10^{-12} /мл. У концентрації 440×10^{-12} /мл ми спостерігали незначне посилення експресії манозомісних мембранних структур, а у концентрації 660×10^{-12} /мл – вірогідне посилення експресії манозомісних мембранних структур (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив адреналіну на експресію манозомісних мембранних структур лімфоцитів та нейтрофілів (n = 6)

Експресія манозомісних мембранних структур	0,9% розчин хлориду натрію	Дози внесеного адреналіну		
	Контроль	220x10 ⁻¹² /мл	440x10 ⁻¹² /мл	660x10 ⁻¹² /мл
Лімфоцити	1,45±0,06	1,26±0,04*	1,07±0,05*	1,39±0,23
Нейтрофіли	1,52±0,09	1,51±0,17	1,60±0,08	1,79±0,04*

Примітка: * – вірогідність відмін показників в порівнянні з контролем (p < 0,05).

Таким чином, дія адреналіну на поверхневі структури лімфоцитів та нейтрофілів призводить до зміни експресії їх манозомісних мембранних структур, що вказує на його вплив на функціональну активність лейкоцитів.