



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012139580/15, 14.09.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
14.09.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 14.09.2012

(45) Опубликовано: 10.10.2013 Бюл. № 28

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2112984 C1, 10.06.1995. RU 2106637 C1,
10.03.1998. ТОЛКАЧЕВА Е.В.

**Иммунологические аспекты формирования
патологии глоточной миндалины у детей и
оптимизация ее консервативного лечения //
Автореферат. - М.: 2010. ЗАВГОРОДНЯЯ
Е.Г. Применение оптического клеточного
зонда акридинового оранжевого в
клинической иммунологии: его значение для
диагностики заболеваний инфекционно-
воспалительного характера// Автореферат. -
М.: 1994.**

Адрес для переписки:

660073, г.Красноярск, а/я 2484, Л.Т. Жуковой

(72) Автор(ы):

**Терскова Наталья Викторовна (RU),
Савченко Андрей Анатольевич (RU),
Вахрушев Сергей Геннадиевич (RU),
Борисов Александр Геннадьевич (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

Терскова Наталья Викторовна (RU)**(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ АДЕНОИДИТЕ У ДЕТЕЙ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к оториноларингологии, и может быть использовано для определения функциональной активности лимфоцитов при хроническом аденоидите у детей, а также для оценки тяжести и вариантов течения заболевания. Способ включает унифицированную оценку качества и количества корреляционных связей между лабораторными показателями с расчетом значимого показателя функциональной активности ферментов лимфоцитов. При величине значимого показателя активности ферментов лимфоцитов (К), равного или

более 0,9, оценивают активность лимфоцитов как адекватную, предопределяющую благоприятное течение хронического аденоидита, а при величине значимого показателя активности ферментов лимфоцитов менее 0,9 оценивают активность лимфоцитов как пониженную, предопределяющую неблагоприятное течение хронического аденоидита. Технический результат изобретения состоит в достоверной, информативной, оптимизированной во времени оценке функциональной активности всех популяций лимфоцитов, в сокращении срока диагностики, в простоте проведения анализа. 3 ил., 3 примера.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2012139580/15, 14.09.2012**

(24) Effective date for property rights:
14.09.2012

Priority:

(22) Date of filing: **14.09.2012**

(45) Date of publication: **10.10.2013 Bull. 28**

Mail address:

660073, g.Krasnojarsk, a/ja 2484, L.T. Zhukovoj

(72) Inventor(s):

**Terskova Natal'ja Viktorovna (RU),
Savchenko Andrej Anatol'evich (RU),
Vakhrushev Sergej Gennadievich (RU),
Borisov Aleksandr Gennad'evich (RU)**

(73) Proprietor(s):

Terskova Natal'ja Viktorovna (RU)

(54) METHOD FOR LYMPHOCYTE FUNCTIONAL ACTIVITY ASSAY IN CHRONICAL ADENOIDITIS IN CHILDREN

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: method involves the unified assay of quality and quantity of the correlation of laboratory parameters with calculating a significant value of lymphocytic enzyme functional activity. If the significant value of lymphocytic enzyme activity (K) is 0.9 or more, lymphocyte activity is considered to be adequate and pre-determining the favourable clinical course of chronic adenoiditis, while the

significant value of lymphocytic enzyme activity is less than 0.9, lymphocyte hypoactivity pre-determining the unfavourable clinical course of chronic adenoiditis is stated.

EFFECT: reliable, informative, time-optimised the functional activity assay of lymphocyte populations, reducing the time of diagnosis, analysis simplicity.

3 dwg, 3 ex

RU 2 4 9 5 4 2 3 C 1

RU 2 4 9 5 4 2 3 C 1

Изобретение относится к медицине, а именно к оториноларингологии, и может быть использовано для определения функциональной активности лимфоцитов при хроническом аденоидите у детей, а также для оценки тяжести и вариантов течения заболевания.

5 Наиболее близким техническим решением является цитогенетический способ оценки функциональной активности Т-лимфоцитов крови пациента, включающий выделение их из пробы венозной крови, которые затем культивируют в течение 48 часов на питательной среде с добавлением фитогемагглютинаина, после чего добавляют колхицин до конечной его концентрации 0,5 мкг/мл и дополнительно культивируют Т-лимфоциты в течение 2 часов. Полученную культуральную жидкость центрифугируют, супернатант обрабатывают гипотоническим раствором и повторно центрифугируют. Полученные лимфоциты фиксируют и готовят из них препараты на предметных
10 стеклах. Подсчитывают количество лимфоцитов, содержащих не менее пяти акроцентриков (КЛ5) в одной акроцентрической ассоциации хромосом (ААХ), и количество лимфоцитов, не содержащих ААХ (КЛ0). Определяют процентное содержание указанных лимфоцитов от общего количества лимфоцитов, находящихся в метафазе. При увеличении процентного содержания КЛ0 не менее, чем на 20% по сравнению со значением указанного показателя, полученного у данного пациента ранее, и присутствии КЛ5 оценивают активность Т-лимфоцитов как адекватную. При увеличении процентного содержания КЛ0 не менее чем на 60% по сравнению со значением указанного показателя, полученного у данного пациента ранее, и
15 отсутствии КЛ5 или при снижении процентного содержания КЛ0 не менее чем на 60% и увеличении процентного содержания КЛ5 более чем в два раза по сравнению со значениями указанных показателей, полученных у данного пациента ранее, оценивают активность Т-лимфоцитов как пониженную (Патент РФ №2112984, М. кл. G01N 33/49, C12N 5/08 1995).

30 Недостатком известного способа является определение активности части лимфоцитов крови, а именно Т-лимфоцитов, которые действуют на нагруженные антигеном клетки-мишени. Ограничение в оценке функциональной активности всех лимфоцитов предопределялось использованием фитогемагглютинаина, поскольку на него реагируют Т-лимфоциты, определяющие клеточный иммунный ответ организма. Оценка уровня акроцентрической ассоциации хромосом в лимфоцитах не указывает на функциональную активность всех лимфоцитов: В-лимфоцитов, естественных киллеров, активизирующихся при реакциях замедленной гиперчувствительности. Для оценки функциональной активности лимфоцитов большое значение имеют разные популяции
35 лимфоцитов, в дифференцировке которых происходит обязательная соматическая рекомбинация дезоксирибонуклеиновой кислоты и сегментов генов рецепторов для антигенов, формируя суммарный иммунный ответ, от которого зависит раннее проспективное определение варианта течения заболевания.

45 В известном способе к недостаткам относится дополнительное использование фитогемагглютинаина в качестве стимулятора пролиферативной активности Т-лимфоцитов помимо этиологического антигенного стимула при заболевании, что вносит избыточный стимул и создает дополнительный фон активности лимфоцитов, формируя ошибку измерения. В известном способе не учитывается базальный уровень функциональной активности и пролиферации жизнеспособных лимфоцитов, который
50 наблюдается и поддерживается в течение всей жизни организма, а также обеспечивает распознавание клеток своего организма. Эта функциональная активность и пролиферация отличается от экспансии клона лимфоцитов в процессе развития

активного продуктивного иммунного ответа на антиген, подлежащий элиминации из организма, и не сопряжена с синтезом и секрецией активных цитокинов Т-лимфоцитов и индукцией иммунного воспаления.

5 Недостатком известного способа является отсутствие микроскопического контроля морфологического состава лимфоцитов. При сходном строении структур ядра лимфоцитов и других лейкоцитарных взвесей - моноцитов, бластных гемопоэтических клеток, гранулоцитов - препараты хромосом не исключают проведение анализа ассоциаций акроцентрических хромосом других лейкоцитарных взвесей в исследуемом образце, характеризующих активность лимфоцитов.

10 К недостаткам известного способа следует отнести исследование нежизнеспособных лимфоцитов. Три смены фиксации Т-лимфоцитов на стекле и долговременное осуществление способа более 48 часов исключают определение активности жизнеспособных лимфоцитов в условиях реального времени. Оценка функциональной активности лимфоцитов, присущей жизнеспособным клеткам, при констатации их нежизнеспособности неубедительна.

15 К недостаткам известного способа относится использование для оценки функциональной активности Т-лимфоцитов микроскопического анализа ААХ при стандартном светомикроскопическом тестировании препаратов в 100-200 клетках от каждого индивида. Субъективная визуализация без автоматизированного определения снижает объективность способа.

20 Недостатком известного способа является оценка активности Т-лимфоцитов при возникновении осложнений у больных ретроспективно, что не позволяет проспективно определять вариант течения и прогноз исхода заболевания на ранних стадиях. Это продемонстрировано в примерах при разных заболеваниях.

25 В известном способе к недостаткам следует отнести оценку функциональной активности Т-лимфоцитов у обследованных пациентов при широком спектре заболеваний, что не характеризует патогенетические специфические реакции исключительно при конкретной нозологии. Изменения функциональной активности Т-лимфоцитов общего характера не позволяют определять варианты течения при конкретном заболевании.

30 Недостатком известного способа является длительность цитогенетической оценки более 48 часов, что задерживает диагностику острого или обострения хронического заболевания с тяжелым течением. Использование образца венозной крови в количестве 5,0 мл и неоднократное взятие усугубляет инвазивность способа.

35 Задачей предлагаемого изобретения является создание достоверного информативного и оптимизированного во времени способа раннего проспективного определения характера течения хронического аденоидита у детей, обусловленного функциональной активностью лимфоцитов, предопределяющего дифференцированную тактику ведения больных детей.

40 Поставленная задача достигается тем, что в способе определения функциональной активности лимфоцитов при хроническом аденоидите у детей, включающем выделение лимфоцитов из венозной крови центрифугированием, обработку супернатанта раствором натрия хлоридом, центрифугирование разведенной крови и подсчет количества лимфоцитов, новым является то, что определяют чистоту выхода лимфоцитов путем проведения микроскопического контроля морфологического состава лейкоцитарных взвесей, затем определяют жизнеспособность лимфоцитов окрашиванием раствором трипанового синего, проводят осмотический лизис суспензии выделенных лимфоцитов содержащей клетки в концентрации 1,0 млн/мл,

путем введения в суспензию лимфоцитов дистиллированной воды 1:5 по объему, 1,0-2,0 мл дитиотреитола, полученную смесь разрушенных лимфоцитов в количестве 200 мкл инкубируют с 600 мкл субстрата концентрацией 0,50-8,70 мМ и кофактора концентрацией 0,50-8,10 мМ и определяют предварительную относительную величину функциональной активности ферментов лимфоцитов путем измерения свечения при смешивании инкубационной смеси и биоломинесцентных реактивов, абсолютную величину функциональной активности ферментов лимфоцитов определяют по калибровочному графику зависимости интенсивности свечения от концентрации ферментов лимфоцитов, а функциональную активность определяют по формуле:

$$A = \frac{\Delta C \times V \times 10^{-6}}{T};$$

где

A - функциональная активность ферментов лимфоцитов, E (единица активности фермента) на 10^4 лимфоцитов (1E=1 мкмоль/мин);

ΔC - разница концентраций ферментов лимфоцитов в абсолютных и относительных значениях, мкмоль;

V - объем пробы, в миллилитрах;

T - время инкубации, в минутах;

величину значимого показателя активности ферментов лимфоцитов определяют по формуле:

$$K = \frac{A_1 + A_2}{A_3 + A_4};$$

где

K - значимый показатель активности ферментов лимфоцитов;

A_1 - функциональная активность фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ) лимфоцитов, E (единица активности фермента) на 10^4 лимфоцитов (1E=1 мкмоль/мин);

A_2 - функциональная активность фермента никотинамидадениндинуклеотид фосфат-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДФГДГ), E (единица активности фермента) на 10^4 лимфоцитов (1E=1 мкмоль/мин);

A_3 - функциональная активность фермента малатдегидрогеназы (МДГ), E (единица активности фермента) на 10^4 лимфоцитов (1E=1 мкмоль/мин);

A_4 - функциональная активность фермента никотинамидадениндинуклеотид-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДГДГ), E (единица активности фермента) на 10^4 лимфоцитов (1E=1 мкмоль/мин);

при величине значимого показателя активности ферментов лимфоцитов (K) равном или более 0,9 определяют активность лимфоцитов как адекватную, предопределяющую благоприятное течение хронического аденоидита, а при величине значимого показателя активности ферментов лимфоцитов менее 0,9 определяют активность лимфоцитов как пониженную, предопределяющую неблагоприятное течение хронического аденоидита.

Хронический аденоидит (ХА) - полиэтиологичное заболевание, в основе которого лежит нарушение физиологических иммунных процессов глоточной миндалины.

Иммунная система, имея локальные представительства в органах, едина в организме и обеспечивает его жизнеспособность.

В предложенном способе определяется функциональная активность всех популяций лимфоцитов. Лимфоциты представляют морфологическую основу иммунной системы.

Взаимодействие всех популяций лимфоцитов формирует иммунный ответ организма, инициированный патогеном. Интеграция лимфоцитов при иммунном ответе обеспечивает доиммунное воспаление, распознавание поврежденных клеток, деструкцию поврежденных тканей в ходе иммунного воспалительного процесса, выведение продуктов деструкции из организма. Уточняющее определение активности всех лимфоцитов устанавливает иммунные механизмы, задействованные при заболевании, что предопределяет вариант течения и коррекцию тактики ведения больных детей.

В предложенном способе в качестве стимулятора пролиферативной активности (фазы нарастания иммунного ответа) лимфоцитов действует единственный этиологический антигенный стимул хронического аденоидита. Лимфоциты (и Т-лимфоциты, и В-лимфоциты) несут специфические антигенные клеточные рецепторы, фенотип которых регулируется внешними условиями активации. Они начинают пролиферацию после встречи с соответствующим антигеном, специфически связывая его с мембранными высокоаффинными рецепторами, образуя клоны специфических эффекторных клеток. Из В-лимфоцитов образуются плазматические клетки, секретирующие иммуноглобулины (антитела), из Т-лимфоцитов цитотоксические клетки, подавляющие патогенетические реакции при хроническом аденоидите. Естественная модель пролиферации лимфоцитов *in vivo* не является тождественной модели пролиферации В-, Т-лимфоцитов *in vitro* и ей принадлежит центральная роль, позволяя достоверно характеризовать внутриклеточные процессы и индукцию внутриклеточного сигнала к пролиферации.

В предложенном способе определяют чистоту выхода лимфоцитов путем проведения микроскопического контроля морфологического состава лейкоцитарных взвесей. Морфологическая идентификация исследуемых лимфоцитов в количестве 1 млн. выделенных клеток на миллилитр с контролем исключения других лейкоцитарных взвесей являются объективными критериями для достоверного определения функциональной активности и исключают ложноположительные результаты.

В предложенном способе определяют жизнеспособность лимфоцитов окрашиванием раствором трипанового синего. Этот краситель не проникает через мембраны живых клеток, но при их повреждении способен окрашивать клеточное ядро. Подсчет лимфоцитов проводят в камере Горяева. Доля жизнеспособных лимфоцитов, составляющая не менее 97% в образце, объективно характеризует их функциональную активность и отражает ее в условиях реального времени. Контроль жизнеспособности лимфоцитов исключает методологические неточности постановки реакций.

В предлагаемом способе проводят осмотический лизис суспензии выделенных лимфоцитов, содержащей клетки в концентрации 1,0 млн/мл, путем введения в суспензию лимфоцитов дистиллированной воды 1:5 по объему и 1,0-2,0 мл дитиотреитола, что создает условия для качественной подготовки проб биологического материала. Во-первых, это обеспечивает полный лизис всех лимфоцитов в 100%, так как величина осмотического потенциала лимфоцита больше величины осмотического потенциала дистиллированной воды. Во-вторых, использование в качестве модификатора дитиотреитола защищает SH-группы белковых компонентов клетки от неконтролируемого окисления в период лизиса и предотвращает образование неправильных внутримолекулярных и межмолекулярных -S-S- связей, что является важным для последующего определения

активности ферментов. В-третьих, при связывании дитиотреитола с мембраной лимфоцитов происходит ослабление взаимодействия цитоскелета с мембранными белкам, при котором форма белковых молекул и тенденция развития лизиса не изменяется.

5 Оценка традиционного иммунного статуса при хроническом аденоидите с подсчетом популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов крови не дает однозначный ответ о наличии и/или выраженности иммунодефицита.

10 Изменения в количественном составе лимфоцитов проявляются при выраженных поломках со стороны иммунной системы. В то же время ранние и/или качественные признаки нарушений изменяют функциональную активность клетки, формируя ответную реакцию на внешние воздействия, что позволяет составить представление о метаболической стратегии иммунного ответа, избранной организмом.

15 Функциональная активность лимфоцита крови отражает состояние обменных и регуляторных процессов организма: катаболизм, синтез, утилизацию, аэробное и анаэробное дыхание. Информативность обменных реакций в лимфоцитах позволяет использовать в качестве показателя их активности активность ферментов. К числу ферментов, максимально объективно отражающих основные параметры

20 внутриклеточного обмена, относятся ферменты класса оксидоредуктаз, которые катализируют окисление одного вещества (донора электронов и протонов), сопряженное с восстановлением другого соединения (их акцептора): никотинамидадениндинуклеотид- и никотинамидадениндинуклеотидфосфат-зависимые (НАД- и НАДФ-) дегидрогеназы в лимфоцитах крови.

25 В предложенном способе полученную смесь разрушенных лимфоцитов в количестве 200 мкл инкубируют с 600 мкл субстрата и кофактора с конкретными значениями концентраций, а также рН среды для каждого определяемого фермента, что подтверждает чувствительность, специфичность, информативность способа.

30 Выбор в качестве критериев показателей активности ферментов ЛДГ, МДГ, НАДГДГ, НАДФГДГ обусловлен результатами определения активности НАД- и НАДФ-зависимых ферментов в лимфоцитах крови у детей с хроническим аденоидитом, достоверно отличающимися от соответствующих показателей активности ферментов лимфоцитов здоровых детей (фиг.1).

35 Активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов крови у детей с ХА отражают характерные обменные механизмы патологического процесса: недостаточность энергетических процессов, обеспечивающих основные потребности клеток в аденозинтрифосфорной кислоте (АТФ). Метаболизм лимфоцитов при ХА

40 характеризуется низким уровнем анаэробного и аэробного дыхания и снижением субстратного взаимодействия цикла трикарбоновых кислот с реакциями аминокислотного обмена. Механизм обуславливает повышение уровня пластических реакций метаболизма и способность клеток к пролиферации, что проявляется при хроническом аденоидите гипертрофией лимфаденоидной ткани.

45 ЛДГ - фермент гликолиза, обратимо катализирующий окисление лактата в пировиноградную кислоту с участием в качестве кофермента НАД. ЛДГ занимает ключевое положение в регуляции цитоплазматического уровня НАДИ/НАД. В случае избытка НАДН в цитоплазме ЛДГ восстанавливает пируват до лактата, который

50 затем удаляется из клетки (анаэробная реакция ЛДГ). При активации аэробных процессов ЛДГ может окислять лактат до пирувата с образованием НАДН (аэробная реакция ЛДГ).

МЛГ - один из ключевых ферментов цикла Кребса, катализирует обратимое

окисление малата в оксалоацетат. Фермент локализуется как в митохондриях (цикл трикарбоновых кислот), так и в цитоплазме. В митохондриях уровень соотношения НАДН/НАД относительно велик, в результате чего внутримитохондриальный оксалоацетат восстанавливается в манат, который легко выходит из митохондрий. В цитоплазме уровень отношения НАДН/НАД мал, что приводит к окислению малата при участии цитоплазматической НАД-зависимой МДГ.

Глутаматдегидрогеназы осуществляют окислительное дезаминирование Г-глутаминовой кислоты. Выделяют две Глутаматдегидрогеназы, использующие в качестве кофакторов НАД или НАДФ. Ферментативные реакции глутаматдегидрогеназ являются обратимыми, соответственно аммиак в присутствии НАД(Ф)Н и α -кетоглутаровой кислоты может участвовать в синтезе глутамата. НАД- и НАДФ-зависимые глутаматдегидрогеназы являются регуляторными в системе аминокислотного обмена. НАДГДГ характеризует уровень поступления субстрата (продуктов распада аминокислот) в цикл трикарбоновых кислот.

В предложенном способе определяют предварительную относительную величину функциональной активности ферментов лимфоцитов путем измерения свечения при смешивании инкубационной смеси и биолюминесцентных реактивов, что исключает преаналитические ошибки в определении функциональной активности ферментов лимфоцитов. При лабораторном определении и математических расчетах предварительной относительной величины функциональной активности ферментов лимфоцитов были учтены показатели, условно названные «субстратный фон ферментов». Указанные показатели обусловлены наличием в клетках определенного количества субстратов для течения различных метаболических реакций, катализируемых исследуемыми ферментами. Активированные лимфоциты являются мощными эффекторами, запускающими механизмы каскадных реакций, обеспечивая развитие воспаления. Противоионфекционное действие лимфоцитов связано с рекомбинацией свободных радикалов и реакциями ферментативного окисления. Основными активаторами рекомбинации свободных радикалов и ферментативного окисления являются биолюминесцентные реактивы бактериальная люцифераза из *Photobacterium leiognathi* и оксидоредуктаза из *Vibrio fischeri*. Проведение реакции в жизнеспособных лимфоцитах с приоритетом выделения и фиксации энергии в световой форме по сравнению с тепловой является простым информативным методом, позволяющим объективно оценить кислород-зависимую биоцидность лимфоцитов.

В предложенном способе определяют абсолютную величину функциональной активности ферментов лимфоцитов по калибровочному графику зависимости интенсивности свечения от концентрации ферментов лимфоцитов, что обеспечивает корректность выводов, высокие чувствительность и специфичность, которые диктуют ликвидность способа. Чувствительность и специфичность способа акцентируют достоверные изменения активности ферментов лимфоцитов у детей, характерные для хронического аденоидита в отличие от аналогичных показателей при других воспалительных заболеваниях.

В предложенном способе функциональную активность лимфоцитов определяют автоматизировано, с оценкой результатов вне зависимости от субъективных факторов, с использованием представленной формулы в общепринятых единицах измерения, которая выражается математически количественно и исключает субъективность качественной оценки.

В предложенном способе определяют величину значимого показателя активности ферментов лимфоцитов (К) как новый достоверный дифференцированный критерий -

коэффициент пластического и энергетического обмена, интегративно характеризующий уровень интенсивности пластических и энергетических процессов. При величине коэффициента равном или более 0,9 констатируют преобладание пластических процессов в лимфоцитах (увеличивается наработка НАДФН), активность ферментов лимфоцитов определяют как адекватную, на основании чего предопределяют благоприятное течение хронического аденоидита. При величине коэффициента менее 0,9 констатируют преобладание энергетических процессов в лимфоцитах, снижение реакций макроглобулярного синтеза (в том числе и синтеза клеточных рецепторов), активность ферментов лимфоцитов определяют как пониженную, на основании чего предопределяют неблагоприятное течение хронического аденоидита.

Значение 0,9 получено опытным путем на основании сопоставления величин рассчитываемого коэффициента, данных клинического наблюдения детей, страдающих хроническим аденоидитом. Величина значимого показателя активности ферментов лимфоцитов - величина безразмерная, не зависящая от чувствительности биолоуминометра, на котором проводится исследование.

В предложенном способе положительным является воспроизводимость в условиях стандартной клинико-биохимической лаборатории, не требующей оборудования для работы с культурой клеток, низкая себестоимость, сокращение времени диагностики до 2-х часов, что позволяет его широко применять, оптимизируя определение функциональной активности лимфоцитов при хроническом аденоидите.

Использование малого объема образца венозной крови в количестве 2,0 мл и однократное взятие уменьшает инвазивность способа.

Способ осуществляют следующим образом.

У пациента с хроническим аденоидитом утром, натощак берут образец периферической крови из локтевой вены в объеме 2,0 мл в вакуумную пробирку с консервантом, содержащим Li-гепарин в качестве антикоагулянта. Исследование проводят в течение одного часа после взятия крови. Лимфоциты выделяют из венозной крови по методу, предложенному А.Воуи (1968) центрифугированием в градиенте плотности фикол-верографина ($\rho=1,077$ г/см³), разделяя клетки крови на:

а) моноклеарную фракцию (МФ), в которую входят лимфоциты, моноциты и бластные гемопоэтические клетки;

б) фракцию, содержащую гранулоциты и эритроциты.

Для этого венозную кровь смешивают с раствором натрия хлорида 0,9% (рН 7,2) в соотношении 1:2-1:3. Обогащенную лимфоцитами плазму получают путем центрифугирования стабилизированной крови при 400 г в течение 30 минут в градиенте плотности фикол-верографина ($\rho=1,077$ г/см³).

Полученную моноклеарную фракцию (МФ) 3 раза отмывают в растворе, в состав которого входит раствор натрия хлорида 0,9%, забуференный с помощью фосфатно-солевого буфера (ЗФФР). Ресуспендируют в питательной среде RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium, англ.) в количестве 10^6 клеток в 1 мл. Проводят микроскопический контроль морфологического состава лейкоцитарных взвесей путем подсчета количества лимфоцитов в камере Горяева для определения чистоты выхода лимфоцитов, которая должна составлять не менее 97%. Затем определяют жизнеспособность лимфоцитов окрашиванием раствором трипанового синего.

Разрушают лимфоциты методом осмотического лизиса путем добавления к суспензии лимфоцитов, содержащую клетки в концентрации 1,0 млн/мл, дистиллированной воды (1:5 по объему) и 1,0-2,0 мМ дитиотреитола.

Активность ферментов лимфоцитов - ЛДГ, НАДФГДГ, МДГ и НАДГДГ - определяют с помощью билюминесцентного метода. Для этого в 600 мкл инкубационной смеси, содержащей соответствующий субстрат и кофактор, вносят 200 мкл суспензии разрушенных клеток лимфоцитов. Конкретные значения концентраций субстратов и кофакторов, а также pH среды для определения ферментов представлены на фиг.2.

В инкубационную смесь для определения активности НАДН-зависимых реакций НАДГДГ и НАДФН-зависимых реакций НАДФГДГ дополнительно вносят NH_4Cl в концентрации 5.0 мМ.

После инкубации при 37°C в течение 30 минут (для ферментативных реакций с восстановлением НАД(Ф)) или 5 минут (для реакции с окислением НАД(Ф)Н) к 200 мкл инкубационной смеси добавляют 50 мкл флавиномононуклеотида (ФМН) в концентрации 1.5×10^{-5} М, 10 мкл ферментативной системы НАД(Ф)Н: ФМНОксидоредуктаза-люцифераза и 50 мкл 0,0005% миристинового альдегида C_{14} (все реактивы билюминесцентной системы разведены в 0,1 М K^+ , Na^+ - фосфатном буфере с pH 7.0). Ферментативная система НАД(Ф)Н: ФМНОксидоредуктаза-люцифераза изготовлена из очищенных методами ионообменной хроматографии и гель-фильтрации люциферазы из *Photobacterium leiognathi* и оксидоредуктазы из *Vibrio fischeri* в Институте биофизики СО РАН. После смешивания билюминесцентных реактивов и инкубационной смеси с помощью биохемилюминометра, например, марки «БЛМ-8803», измеряют свечение. Учитывая, что в клетках имеется определенное количество субстратов для течения различных метаболических реакций, в том числе и катализируемых исследуемыми ферментами, определяют показатели, условно названные «субстратный фон ферментов». Определение «субстратных фонов ферментов» проводят в тех же условиях, что и для вышеперечисленных дегидрогеназ, но в инкубационную смесь вместо соответствующего субстрата вносят буфер. В результате измерения свечения на биохемилюминометре получают предварительную относительную величину активности исследуемых ферментов. Для получения абсолютной величины активности ферментов (условно названной «фермент»), строят графики зависимости интенсивности билюминесценции от концентрации НАД(Ф)Н (калибровочный график). Для этого 200 мкл стандартного раствора НАД(Ф)Н в диапазоне 10^{-9} - 10^{-4} М вносят в кюветы билюминометра, содержащие ФМН, НАД(Ф)Н:ФМНОксидоредуктазу-люциферазу и миристиновый альдегид в концентрациях, указанных выше, после чего проводят измерение интенсивности билюминесценции. В связи с широким диапазоном pH буферов, используемых для определения дегидрогеназной активности, а также pH-зависимостью билюминесценции ферментативной системы из светящихся бактерий, калибровочные графики строят для каждого pH буфера. Функциональную активность ферментов лимфоцитов (или НАД(Ф)Н-дегидрогеназ) определяют по формуле:

$$A = \frac{\Delta C \times V \times 10^{-6}}{T};$$

где

A - функциональная активность ферментов лимфоцитов, E (единица активности фермента) на 10^4 лимфоцитов ($1E=1$ мкмоль/мин);

ΔC - разница концентраций ферментов лимфоцитов в абсолютных и относительных значениях («фермент» и «субстратный фон фермента»), мкмоль;

V - объем пробы, в миллилитрах;

T - время инкубации, в минутах.

Затем определяют величину значимого показателя функциональной активности ферментов лимфоцитов по формуле:

$$K = \frac{A_1 + A_2}{A_3 + A_4};$$

где

K - значимый показатель активности ферментов лимфоцитов,

A₁ - функциональная активность фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ)

лимфоцитов, E (единица активности фермента) на 10⁴ лимфоцитов (1E=1 мкмоль/мин);

A₂ - функциональная активность фермента никотинамидадениндинуклеотид фосфат-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДФГДГ), E (единица активности фермента) на 10⁴ лимфоцитов (1E=1 мкмоль/мин);

A₃ - функциональная активность фермента малатдегидрогеназы (МДГ), E (единица активности фермента) на 10⁴ лимфоцитов (1E=1 мкмоль/мин);

A₄ - функциональная активность фермента никотинамидадениндинуклеотид-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДГДГ), E (единица активности фермента) на 10⁴ лимфоцитов (1E=1 мкмоль/мин).

При величине значимого показателя активности ферментов лимфоцитов (K) равном или более 0,9 определяют активность лимфоцитов как адекватную, предопределяющую благоприятное течение хронического аденоидита. При величине значимого показателя активности ферментов лимфоцитов менее 0,9 определяют активность лимфоцитов как пониженную, предопределяющую неблагоприятное течение хронического аденоидита.

Данный способ подтвержден результатами динамического обследования 56 детей, страдающих хроническим аденоидитом. Всем детям с хроническим аденоидитом при первичном обращении проводили комиссионно эндоскопический ЛОР-осмотр, осмотр аллерголога и педиатра в комплексе с бактериологическим, морфологическим, рентгенологическим (по показаниям) и лабораторным методами исследования. Лабораторные методы включали развернутый анализ крови, анализ крови на иммунный статус.

Дополнительно был проведен ретроспективный анализ совпадения определения варианта течения хронического аденоидита у 56 детей. Совпадение определения варианта течения хронического аденоидита констатировали по факту документированных обострений заболевания через 90 суток от первичного обращения в соответствии со сроком продолжительности жизнедеятельности лимфоцита равным от 30 до 90 суток и сопоставления с проспективным определением функциональной активности лимфоцитов. Результаты представлены на фиг.3.

По результатам оториноларингологического обследования установлено, что к 90 суткам после первичного обращения из 24 детей с хроническим аденоидитом с адекватной функциональной активностью лимфоцитов и K≥0,9 у 23 детей полностью купированы симптомы хронического аденоидита, количество обострений в течение периода наблюдения составило 1. Из 32 детей с хроническим аденоидитом с низкой функциональной активностью лимфоцитов и K<0,9 у 30 детей симптомы заболевания уменьшились, но не были купированы, количество обострений в течение периода наблюдения составило 3. Суммарное совпадение определения варианта течения хронического аденоидита у детей с определением величины значимого показателя активности ферментов составило 94,5% (53 человека).

Таким образом, продемонстрировано достоверное определение варианта течения хронического аденоидита у детей, проведенное путем проспективного определения функциональной активности лимфоцитов крови и величины значимого показателя функциональной активности ферментов лимфоцитов.

Предложенный способ поясняется чертежами, где:

На фиг.1 изображено

Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови у здоровых детей и больных хроническим аденоидитом (Me, P₂₅-P₇₅).

На фиг.2 изображено

Концентрация субстратов, кофакторов и показатели рН среды для определения активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови биоллюминесцентным методом.

На фиг.3 изображено

Совпадение ретроспективного и проспективного определения варианта течения хронического аденоидита по величине значимого показателя активности ферментов лимфоцитов.

Пример осуществления способа

Пример 1

Пациентка Д., возраст - 6 лет 2 месяца (протокол исследования №26), обратилась на прием в Университетскую клинику Красноярского государственного медицинского университета г.Красноярска 14 декабря 2011 г. При первичном осмотре предъявляла жалобы на слабо выраженное затруднение носового дыхания за счет периодической заложенности носа, частые острые респираторно-вирусные инфекции (ОРВИ) 1 раз в месяц, умеренное снижение аппетита, быструю утомляемость, общую слабость, беспокойный сон с ночными страхами. Жалобы местного и общего характера предъявляет в течение 2-х лет.

Жалобы связывает с последствием повторных ОРВИ, нетипичного течения за счет затяжного периода болезни более 10 суток, с осложнением в виде рецидивирующего насморка. В течение года 4 раза верифицировано обострение хронического аденоидита. Амбулаторно неоднократно получала лечение у педиатра и оториноларинголога по общепринятой методике, последний раз - два месяца назад: сосудосуживающие и saniрующие капли в нос, эндоназальные промывания. Иммунокоррекция не проводилась. В результате проведенного лечения отмечалось кратковременное в течение 10 суток улучшение за счет уменьшения заложенности носа и насморка. Причиной обращения на повторный амбулаторный прием явилось длительное хроническое прогрессирующее течение симптомов интоксикации за счет утомляемости, снижения аппетита, сопровождающиеся отсутствием полного купирования заложенности носа.

При эндоскопии полости носа и носоглотки отмечен умеренно выраженный отек слизистой оболочки полости носа в области нижних носовых раковин с явлениями патогенетически обусловленной тканевой и вентиляционной гипоксии и венозного застоя в виде клинически проявленной синюшности, умеренное слизистое отделяемое в области гиперплазированной глоточной миндалины II степени, затрудняющей его отток. Со стороны других ЛОР-органов - признаков патологии не выявлено.

Лимфатические узлы задне-шейной группы увеличены до 0,7×0,7 см в диаметре, плотной консистенции, неспаянные, безболезненные при пальпации.

При соматическом осмотре пациентки Д. отмечались периорбитальный, периоральный непостоянный цианоз, усиливающийся при физической нагрузке,

бледность лица.

Клинический анализ крови не выявил отклонений в количестве эритроцитов, гемоглобина, лейкоцитарной формуле при констатации слабо ускоренной скорости оседания эритроцитов (СОЭ), равной 11 мм/час, которая являлась лабораторным показателем эндогенной интоксикации, косвенно отражала соотношение в плазме крови белковых частиц крупных размеров (глобулинов) и мелких размеров (альбуминов) и свидетельствовала о воспалительном процессе.

Результаты исследования иммунного статуса пациентки Д. показали достоверное увеличение на 12% относительного количества всех зрелых Т-лимфоцитов, несущих кластер клеточной дифференцировки CD3⁺ (CD - Cluster of Differentiation, англ.), в сравнении с показателями здоровых детей. Факт достоверного увеличения относительного и абсолютного количества хелперных Т-лимфоцитов, несущих CD3⁺CD4⁺, по сравнению с показателями здоровых детей позволял констатировать отсутствие Т-клеточного иммунодефицита. Выявленное повышение относительного числа супрессорно-цитотоксических Т-лимфоцитов, несущих CD3⁺CD8⁺, у пациентки Д. с хроническим аденоидитом характеризовало период инфекционного процесса, когда происходит увеличение специфических цитотоксических клеток. Значения остальных показателей не превышали установленных границ нормы для каждого из них.

При бактериологическом исследовании биологического материала с поверхности глоточной миндалины выявлено референсное значение степени обсемененности преимущественно за счет поликультуры условно-патогенной микрофлоры - золотистого стафилококка и сапрофитирующего стафилококка. Количественное содержание микроорганизмов на 1 г (мл) исследуемого материала составило до 1×10^3 КОЕ/г (мл) (КОЕ - колониеобразующая единица).

В назоцитограмме у пациентки Д. отмечалось слабо выраженное увеличение нейтрофилов 68,00% при референсном количестве фагоцитирующих нейтрофилов 15,05%, что отражало сохраненную фагоцитарную функцию нейтрофилов.

По рентгенограмме околоносовых пазух патологии не выявлено.

С учетом жалоб, анамнеза, данных объективного осмотра и комплексного клинко-лабораторно-инструментального исследования оториноларингологом, аллергологом и педиатром диагностирован хронический аденоидит, катаральная форма, ремиссия.

Проведено обследование по предложенному способу. В лимфоцитах периферической крови пациентки Д. были определены относительные и абсолютные значения функциональной активности ферментов лимфоцитов: A_1 (ЛДГ)=51,54 мкЕ на 10^4 лимфоцитов, A_2 (НАДФГДГ)=13,13 мкЕ на 10^4 лимфоцитов, A_3 (МДГ)=23,03 мкЕ на 10^4 лимфоцитов, A_4 (НАДГДГ)=30,24 мкЕ на 10^4 лимфоцитов. Рассчитана величина значимого показателя функциональной активности ферментов лимфоцитов $K=1,2$ и предопределено благоприятное течение хронического аденоидита.

При визите пациентки Д. через 90 суток после первичного обращения установлено достоверное объективное клиническое улучшение. Жалобы общего характера не беспокоили, самочувствие и эмоциональный тонус хорошие, ребенок активен. Аппетит удовлетворительный, сон нормализовался. При эндоскопии полости носа и носоглотки слизистая оболочка полости носа розовая, чистая, купированы отечность и слизистое отделяемое в области хоан, обеспечив свободное носовое дыхание. Лимфоузлы задне-шейной группы 0,5×0,5 см в диаметре, эластичной консистенции,

неспаянные, безболезненные при пальпации. Реинфекции ОРВИ не переносила, обострения не наблюдалось. Лекарственную иммунокоррекцию не получала.

В клиническом анализе крови нормализовалась СОЭ, равная 5 мм/час, что свидетельствовало о благоприятном течении болезни и выздоровлении пациентки.

Иммунологическое обследование показало, что исследованные иммунологические показатели не превышали установленных границ нормы для каждого параметра.

Ретроспективно определен варианта течения хронического аденоидита как благоприятный с элиминацией иммуно-метаболических нарушений. Совпадение определения благоприятного варианта течения хронического аденоидита полное - 100%.

Пример 2

Пациент Х., возраст - 4 года 6 месяцев (протокол исследования №20), обратился на прием в Университетскую клинику Красноярского государственного медицинского университета г.Красноярска 10 ноября 2011 г. Жалобы при осмотре на умеренно выраженное затруднение носового дыхания за счет постоянной заложенности и отделяемого из носа, периодическое утреннее покашливание, частые ОРВИ ежемесячно, значимое снижение аппетита с задержкой прибавки массы тела, быструю утомляемость, общую слабость, беспокойный сон. Жалобы местного и общего характера предъясняет в течение года. Жалобы связывает с поступлением в детское дошкольное учреждение и повторными затяжными ОРВИ. Повторные аденоидиты 4 раза в год. Амбулаторно неоднократно получал лечение у педиатра и оториноларинголога по общепринятой методике, последний раз - 1 месяц назад: системное антибактериальное лечение аугментинотом в возрастной дозе, сосудосуживающие и saniрующие капли в нос, эндоназальные промывания. До лечения и во время него иммунокоррекция не проводилась. Эффективность лечения была недостаточной, так как не обеспечивала полное долговременное купирование симптомов местного и общего характера. Сохранялись периодический насморк слизистого характера на фоне быстрой утомляемости, плаксивости, задержки прибавки массы тела.

При эндоскопии полости носа и носоглотки отмечен умеренно выраженный отек слизистой оболочки полости носа в области нижних носовых раковин с явлениями патогенетически обусловленной тканевой и вентиляционной гипоксии и венозного застоя в виде клинически проявленной синюшности, умеренное слизистое отделяемое с гнойным компонентом в области купулярно расположенной гиперплазированной глоточной миндалины II степени, затрудняющей его отток, с недифференциацией борозд. Со стороны других ЛОР-органов - признаков патологии не выявлено. Лимфоузлы задне-шейной группы увеличены до 0,7×0,7 см в диаметре, плотной консистенции, неспаянные, безболезненные при пальпации.

В клиническом анализе крови не было выявлено отклонений в количестве эритроцитов, гемоглобина, лейкоцитарной формуле при констатации слабо ускоренной скорости оседания эритроцитов, равной 14 мм/час, которая являлась лабораторным показателем эндогенной интоксикации.

Результаты исследования иммунного статуса пациента Х. показали недостоверное увеличение относительного количества всех зрелых Т-лимфоцитов, несущих кластер клеточной дифференцировки CD3⁺, на 5% в сравнении с показателями здоровых детей.

При бактериологическом исследовании биологического материала с поверхности глоточной миндалины выявлено референсное значение степени обсемененности преимущественно за счет поликультуры условно-патогенной микрофлоры -

золотистого стафилококка и сапрофитирующего стафилококка. Количественное содержание микроорганизмов на 1 г (мл) исследуемого материала составило до 1×10^4 КОЕ/г (мл).

5 С учетом жалоб, анамнеза, данных объективного осмотра и комплексного клинико-лабораторно-инструментального исследования оториноларингологом, аллергологом и педиатром диагностирован хронический аденоидит, гнойная форма, ремиссия.

10 Проведено обследование по предложенному способу. В лимфоцитах периферической крови пациентки были определены относительные и абсолютные значения функциональной активности ферментов лимфоцитов: A_1 (ЛДГ)=73,85 мкЕ на 10^4 лимфоцитов, A_2 (НАДФГДГ)=0,91 мкЕ на 10^4 лимфоцитов, A_3 (МДГ)=94,22 мкЕ на 10^4 лимфоцитов, A_4 (НАДГДГ)=54,77 мкЕ на 10^4 лимфоцитов. Рассчитан значимый показатель функциональной активности ферментов лимфоцитов $K=0,5$ и
15 предопределено неблагоприятное течение хронического аденоидита.

При визите пациента Х. через 90 суток после первичного обращения установлено достоверное объективное клиническое улучшение без купирования симптомов. Жалобы общего характера уменьшились, но не купировались: самочувствие, эмоциональный тонус улучшились за счет проявления желаний, выполнения
20 последовательности действий. Аппетит, сон улучшились, но не нормализовались. При эндоскопии полости носа и носоглотки слизистая оболочка полости носа уменьшилась синюшность, отечность и слизистое отделяемое в области хоан, обеспечив улучшение носового дыхания. Лимфоузлы задне-шейной группы
25 сохранялись 0,7×0,7 см в диаметре, восстанавливая консистенцию до плотно-эластичной. Реинфекции ОРВИ не переносил. Обострения хронического аденоидита отмечались 3 раза, что требовало лекарственной иммунокоррекции.

В клиническом анализе крови сохранялась слабо ускоренная скорость оседания эритроцитов, равная 12 мм/час, что свидетельствовало о неблагоприятном течении
30 болезни.

Ретроспективная констатация у пациента Х. остаточных клинических признаков хронического аденоидита общего и местного характера подтверждало неблагоприятное течение заболевания. Совпадение определения неблагоприятного
35 варианта течения хронического аденоидита полное - 100%.

Пример 3

Пациент Р., возраст - 4 лет 2 месяца (протокол исследования №52), обратился на прием в Университетскую клинику Красноярского государственного медицинского
40 университета г.Красноярска 26 января 2012 г. При первичном осмотре предъявлял жалобы на затруднение носового дыхания за счет скудного отделяемого из полости носа, сопение во время ночного сна вне зависимости от положения тела, частые острые респираторно-вирусные инфекции (ОРВИ) 1 раз в 2 месяца, быструю утомляемость. Жалобы местного и общего характера предъявляет в течение 2-х лет.
45 Жалобы связывает с контактом с больными ОРВИ в детском дошкольном учреждении. В течение года 6 раз верифицировано обострение хронического аденоидита с длительным слизисто-гнойным насморком. Амбулаторно неоднократно получал лечение у педиатра и оториноларинголога системными антибактериальными препаратами, последний раз - один месяц назад. Иммунокоррекция не проводилась. В
50 результате проведенного лечения отмечалось полное купирование симптомов в течение 30 суток. Причиной обращения на повторный амбулаторный прием явилось сопение во время ночного сна на фоне утомляемости.

При эндоскопии полости носа и носоглотки отмечены синюшность нижних

носовых раковин, гиперплазированная глоточная миндалина II степени. Со стороны других ЛОР-органов - признаки патологии не выявлены. Лимфатические узлы заднешейной группы увеличены до 0,7×0,7 см в диаметре, плотной консистенции, неспаянные, безболезненные при пальпации.

5 Клинический анализ крови не выявил отклонений в количестве эритроцитов, гемоглобина, при констатации относительного лимфоцитоза в лейкоцитарной формуле, слабо ускоренной скорости оседания эритроцитов (СОЭ), равной 12 мм/час, которая являлась лабораторным показателем эндогенной интоксикации, косвенно
10 отражала соотношение в плазме крови белковых частиц крупных размеров (глобулинов) и мелких размеров (альбуминов) и свидетельствовала о воспалительном процессе.

15 Результаты исследования иммунного статуса пациента Р. показали достоверное увеличение на 8% относительного количества всех зрелых Т-лимфоцитов, несущих кластер клеточной дифференцировки CD3⁺, в сравнении с показателями здоровых детей, что констатировало отсутствие Т-клеточного иммунодефицита. Значения остальных показателей не превышали установленных границ нормы для каждого из них.

20 При бактериологическом исследовании биологического материала с поверхности глоточной миндалины выявлено референсное значение степени обсемененности преимущественно за счет поликультуры условно-патогенной микрофлоры - золотистого стафилококка и сапрофитирующего стафилококка. Количественное
25 содержание микроорганизмов на 1 г (мл) исследуемого материала составило до 1×10³ КОЕ/г (мл) (КОЕ - колониеобразующая единица).

По рентгенограмме околоносовых пазух патологии не выявлено.

С учетом жалоб, анамнеза, данных объективного осмотра и комплексного клиничко-лабораторно-инструментального исследования оториноларингологом, аллергологом
30 и педиатром диагностирован хронический аденоидит, гнойная форма, ремиссия.

Проведено обследование по предложенному способу. В лимфоцитах периферической крови пациента Р. были определены относительные и абсолютные значения функциональной активности ферментов лимфоцитов: А₁(ЛДГ)=71,41 мкЕ
35 на 10⁴ лимфоцитов, А₂(НАДФГДГ)=0,04 мкЕ на 10⁴ лимфоцитов, А₃(МДГ)=0,0001 мкЕ на 10⁴ лимфоцитов, А₄(НАДГДГ)=27,44 мкЕ на 10⁴ лимфоцитов. Рассчитана величина значимого показателя функциональной активности ферментов лимфоцитов К=2,6 и диагностировано благоприятное течение хронического аденоидита.

40 При визите пациента Р. через 90 суток после первичного обращения установлено купирование общих и местных симптомов. При эндоскопии полости носа и носоглотки слизистая оболочка полости носа розовая, глоточная миндалина I степени. Лимфоузлы задне-шейной группы 0,5×0,5 см в диаметре, эластичной консистенции, неспаянные, безболезненные при пальпации. Реинфекции ОРВИ не переносил.

45 В клиническом анализе крови нормализовалась СОЭ, равная 6 мм/час, что свидетельствовало о благоприятном течении болезни и выздоровлении пациента.

Иммунологическое обследование показало, что исследованные иммунологические показатели не превышали установленных границ нормы для каждого параметра.

50 Ретроспективно определен варианта течения хронического аденоидита как благоприятный с элиминацией иммуно-метаболических нарушений. Совпадение определения благоприятного варианта течения хронического аденоидита полное - 100%.

Технический результат изобретения состоит в достоверном информативном

оптимизированном во времени определении функциональной активности всех популяций лимфоцитов, формирующих суммарный иммунный ответ, от которого зависит раннее проспективное определение варианта течения хронического аденоидита у детей.

5 Технический результат состоит в объективности диагностики показателей за счет:

1) использования в качестве единственного стимулятора пролиферативной активности лимфоцитов этиологического антигенного стимула витальных лимфоцитов при хроническом аденоидите с учетом показателей, условно названных «фермент» и «субстратный фон ферментов», что исключает дополнительный фон активности лимфоцитов;

2) определения функциональной активности ферментов всех лимфоцитов в витальном состоянии, объективно характеризуя количественные и качественные изменения в метаболизме лимфоцитов, чем демонстрирует возможность использования способа для широкой характеристики функциональной активности лимфоцитов в условиях реального времени, обеспечивая высокую чувствительность;

3) автоматизированного определения функциональной активности лимфоцитов с оценкой результатов вне зависимости от субъективных факторов;

4) высокого уровня совпадения проспективного и ретроспективного определения вариантов течения (94,5%).

Способ включает унифицированную оценку качества и количества корреляционных связей между лабораторными показателями с расчетом значимого показателя функциональной активности ферментов лимфоцитов. Разработанный тест значимого показателя активности ферментов лимфоцитов $K < 0,9$ и $K \geq 0,9$ в периферической крови информативен для дифференциальной диагностики метаболических состояний, вызванных как нарушениями при хроническом аденоидите, так и других воспалительных заболеваниях. Получение результата о функциональной активности лимфоцитов с количественной характеристикой является значимым критерием при диагностике и может быть применено на начальном этапе обследования при отсутствии изменения количества клеток, а также на последующих этапах с целью мониторинга течения.

Технический результат от реализации способа состоит в сокращении срока диагностики за счет времени культивирования лимфоцитов менее 2-х часов, что дает возможность своевременно определить функциональное состояние лимфоцитов, откорректировать план и тактику ведения больных детей с хроническим аденоидитом и улучшить результаты их реабилитации.

Технический результат изобретения состоит в значимом снижении себестоимости лабораторного исследования за счет низкой стоимости применяемых реактивов и используемого оборудования, прост в проведении, что обеспечивает широкое использование предложенного способа при первоначальном клиническом обследовании.

Предложенный способ может быть рекомендован для применения в клинической практике оториноларинголога, иммунолога, педиатра. Способ расширяет определение функциональной активности лимфоцитов при хроническом аденоидите у детей.

Краткое описание чертежей

50 На фиг.1 изображено

Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови у здоровых детей и больных хроническим аденоидитом (Me, P₂₅-P₇₅):

проведено сравнение показателей активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в

лимфоцитах крови у здоровых детей и больных хроническим аденоидитом, представленных как медиана с перцентильными значениями, которые заданная медиана не превышает с фиксированной вероятностью;

р - уровень статистической значимости при сравнении показателей с группой клинически здоровых детей, сформировавших контроль ($p < 0,05$).

На фиг.2 изображено

Концентрация субстратов, кофакторов и показатели рН среды для определения активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови

билюминесцентным методом:

представлены концентрации субстратов, кофакторов, показатели рН среды буфера специфичные для ферментов ЛДГ, НАДФГДГ, МДГ и НАДГДГ, необходимые для приготовления инкубационной смеси при определении активности этих ферментов.

На фиг.3 изображено

Совпадение ретроспективного и проспективного определения вариантов течения хронического аденоидита по величине значимого показателя активности ферментов лимфоцитов: сопоставлено проспективное определение варианта течения хронического аденоидита у 56 детей по величине значимого показателя активности

ферментов лимфоцитов (К) и ретроспективное определение варианта течения по факту купирования/отсутствия купирования симптомов заболевания через 90 суток.

Формула изобретения

Способ определения функциональной активности лимфоцитов при хроническом аденоидите у детей, включающий выделение лимфоцитов из венозной крови

центрифугированием, обработку супернатанта раствором натрия хлорида, центрифугирование разведенной крови и подсчет количества лимфоцитов,

отличающийся тем, что определяют чистоту выхода лимфоцитов путем проведения микроскопического контроля морфологического состава лейкоцитарных взвесей,

затем определяют жизнеспособность лимфоцитов окрашиванием раствором трипанового синего, проводят осмотический лизис суспензии выделенных

лимфоцитов, содержащей клетки в концентрации 1,0 млн/мл, путем введения в суспензию лимфоцитов дистиллированной воды 1:5 по объему, 1,0-2,0 мл

дितिотреитола, полученную смесь разрушенных лимфоцитов в количестве 200 мкл инкубируют с 600 мкл субстрата концентрацией 0,50-8,70 мМ и кофактора

концентрацией 0,50-8,10 мМ и определяют предварительную относительную величину функциональной активности ферментов лимфоцитов путем измерения свечения при

смешивании инкубационной смеси и билюминесцентных реактивов, абсолютную величину функциональной активности ферментов лимфоцитов определяют по

калибровочному графику зависимости интенсивности свечения от концентрации ферментов лимфоцитов, а функциональную активность определяют по формуле

$$A = \frac{\Delta C \times V \times 10^{-6}}{T},$$

где А - функциональная активность ферментов лимфоцитов, Е (единица активности фермента) на 10^4 лимфоцитов (1Е=1 мкмоль/мин);

ΔС - разница концентраций ферментов лимфоцитов в абсолютных и относительных значениях, мкмоль;

V - объем пробы, в мл;

T - время инкубации, мин;

величину значимого показателя активности ферментов лимфоцитов определяют по

формуле

$$K = \frac{A_1 + A_2}{A_3 + A_4},$$

- 5 где К - значимый показатель активности ферментов лимфоцитов;
 А₁ - функциональная активность фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ)
 лимфоцитов, Е (единица активности фермента) на 10⁴ лимфоцитов (1Е=1 мкмоль/мин);
 А₂ - функциональная активность фермента никотинамидадениндинуклеотид
 10 фосфатзависимой глутаматдегидрогеназы (НАДФГДГ), Е (единица активности
 фермента) на 10⁴ лимфоцитов (1Е=1 мкмоль/мин);
 А₃ - функциональная активность фермента малатдегидрогеназы (МДГ), Е (единица
 активности фермента) на 10⁴ лимфоцитов (1Е=1 мкмоль/мин);
 А₄ - функциональная активность фермента никотинамидадениндинуклеотид-
 15 зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДГДГ), Е (единица активности фермента) на
 10⁴ лимфоцитов (1Е=1 мкмоль/мин);
 при величине значимого показателя активности ферментов лимфоцитов (К), равной
 или более 0,9, оценивают активность лимфоцитов как адекватную,
 20 предопределяющую благоприятное течение хронического аденоидита, а при величине
 значимого показателя активности ферментов лимфоцитов менее 0,9 определяют
 активность лимфоцитов как пониженную, предопределяющую неблагоприятное
 течение хронического аденоидита.

25

30

35

40

45

50

Показатели (мкЕ/10 ⁴ клеток)	Здоровые дети N=38	Дети с ХА N=56	p
1	2	3	4
Г6ФДГ	18,31 2,39-54,42	7,54 1,56-23,51	0,30
ГЗФДГ	0,06 0,01-11,436	0,01 0,01-0,09	0,38
ЛДГ	62,26 32,07-72,62	12,06 0,03-57,96	0,04
МДГ	54,50 13,80-91,35	7,45 0,01-50,81	0,03
НАДФМДГ	0,01 0,01-0,99	0,01 0,01-1,61	0,63
НАДФГДГ	0,01 0,01-14,72	0,18 0,01-1,24	0,96
НАДФН-ГДГ	0,01 0,01-14,08	49,60 1,24-90,05	0,01
НАДГДГ	0,20 0,01-13,98	1,60 0,01-24,33	0,31
НАДН-ГДГ	17,85 0,86-45,10	19,24 0,93-66,72	0,70
НАДН-ЛДГ	76,99 12,22-119,37	0,77 0,01-14,22	0,01
НАДН-МДГ	98,02 42,58-129,47	0,96 0,01-14,27	0,01
НАДИЦДГ	3,97 2,92-6,10	2,81 0,73-4,58	0,10
НАДФИЦДГ	2,54 1,87-3,95	2,86 0,27-4,48	0,85
ГР	7,89 2,61-16,97	7,59 0,01-30,36	0,88

Фиг. 1

Фермент	Субстрат, мМ	Кофактор, мМ	pH буфера
ЛДГ	Лактат – 2,0	НАД – 0,50	9,0
НАДФГДГ	Глутамат – 0,5	НАДФ – 1,65	9,8
МДГ	Малат – 2,0	НАД – 2,50	9,8
НАДГДГ	Глутамат – 8,7	НАД – 8,10	9,8

Примечание: среду с pH 9,0 и 9,8 готовят на Трис-НСl буфере (INC Biomedicals Inc., США).

Фиг. 2

**СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ
АКТИВНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ И
ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКОГО АДЕНОИДИТА У ДЕТЕЙ**

№ п/п	Величина К	Прогнозируемая эффективность лечение	Эффективность лечения	Совпадение прогноза
1	2	3	4	5
1	0,9	должна быть	есть	+
2	0,3	не будет	нет	+
3	0,1	не будет	нет	+
4	2,2	должна быть	есть	+
5	3,4	должна быть	есть	+
6	0,2	не будет	нет	+
7	0,8	не будет	есть	-
8	0,6	не будет	нет	+
9	0,1	не будет	нет	+
10	0,1	не будет	нет	+
11	0,1	не будет	нет	+
12	0,5	не будет	нет	+
13	1,9	должна быть	есть	+
14	0,2	не будет	нет	+
15	0,8	не будет	есть	-
16	0,3	не будет	нет	+
17	0,1	не будет	нет	+
18	10,7	должна быть	есть	+
19	3,4	должна быть	есть	+
20	0,5	не будет	нет	+
21	1,3	должна быть	есть	+
22	11,6	должна быть	есть	+
23	0,9	должна быть	нет	-
24	0,6	не будет	нет	+
25	2,4	должна быть	есть	+
26	1,2	должна быть	есть	+
27	1,5	должна быть	есть	+
28	0,2	не будет	нет	+
29	0,3	не будет	нет	+
30	0,6	не будет	нет	+

Фиг. 3

31	0,2	не будет	нет	+
32	2,1	должна быть	есть	+
33	7,7	должна быть	есть	+
34	1,9	должна быть	есть	+
35	0,1	не будет	нет	+
36	0,1	не будет	нет	+
37	0,1	не будет	нет	+
38	0,1	не будет	нет	+
39	1,4	должна быть	есть	+
40	0,7	не будет	нет	+
41	1,0	должна быть	есть	+
42	0,9	должна быть	есть	+
43	0,1	не будет	нет	+
44	0,1	не будет	нет	+
45	1,0	должна быть	есть	+
46	1,4	должна быть	есть	+
47	0,1	не будет	нет	+
48	0,1	не будет	нет	+
49	0,1	не будет	нет	+
50	0,3	не будет	нет	+
51	0,6	не будет	нет	+
52	2,6	должна быть	есть	+
53	1,8	должна быть	есть	+
54	0,8	не будет	нет	+
55	0,9	должна быть	есть	+
56	0,9	должна быть	есть	+

Фиг. 3 (продолжение)