

М. В. ХУДГАРЯН

О ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИМФОЦИТОВ В ПРАКТИЧЕСКОМ ЗДРАВООХРАНЕНИИ (сообщение 1)

Исследован ряд вариантов флюорохромирования фиксированных мазков крови. Предложен оптимальный вариант окраски препаратов, удобный для применения в практическом здравоохранении.

Уровень функциональной активности нуклеиновых кислот (НК) является важным показателем жизнедеятельности клетки. Изменение функциональной активности НК в сторону повышения или понижения дает определенную информацию как относительно состояния самой клетки, так и окружающей ее среды.

В этом аспекте существенное значение приобретает изучение функциональной активности НК лимфоцитов, являющихся неотъемлемым звеном одной из важных адаптивных систем организма, контролирующих и регулирующих гомеостаз на клеточном, субклеточном и молекулярном уровне.

В настоящее время при исследованиях клеток крови широко применяется метод люминесцентной микроскопии благодаря его высокой чувствительности и возможности исследовать быстро протекающие процессы [2]. Микрофлуорометрический метод исследования лимфоцитов был детально разработан Rigler [9], который установил, что возрастание способности нуклеопротеидного комплекса лимфоцитов связывать краситель акридиновый оранжевый (АО) после их одночасового инкубирования в питательной среде свидетельствует о переходе дезоксирибонуклеопротеида ядра клетки из неактивной в активную форму. Это объясняется тем, что интенсивность свечения обусловлена числом развернутых активных фосфатных радикалов, с которыми и связывается краситель АО. Естественно, чем больше активных групп, тем выше интенсивность свечения окрашенных структур. Следовательно, данный метод позволяет контролировать функциональное состояние клетки. Именно этим методом было обнаружено изменение функциональной активности лимфоцитов в динамике шизофрении [7] и эпилепсии [8].

Все вышеизложенное свидетельствует об адекватности и информативности микрофлуорометрического метода для исследования клеток крови, в частности лимфоцитов, о возможности с его помощью прогнозировать тип течения болезни и судить об эффективности терапии. Однако попытка применить метод в практическом здравоохранении встречает ряд трудностей. Если для теоретических исследований важнее всего адекватность метода, то для практических целей большое значение приобретают такие факторы, как доступность аппаратуры и реактивов, простота манипуляций, минимальное количество биологического материала, быстрота получения результатов и их воспроизводимость. Этим требованиям метод Rigler, к сожалению, не отвечает.

Учитывая ценность данного метода и малочисленность строго объективных методов исследования в психиатрической практике, мы предприняли попытку адаптировать люминесцентный метод к требованиям практической медицины.

С этой целью прежде всего мы проанализировали ряд методов люминесцентной микроскопии, используемых для исследования клеток крови. Среди них самым приемлемым с позиций практической медицины оказался метод флюорохромирования фиксированных мазков периферической крови [4]. Преимущество этого метода заключается в доступности материала исследования (несколько капель крови из пальца), возможности хранения фиксированного препарата в течение некоторого времени до флюорохромирования, краткосрочности окраски (всего 3—5 мин), сохранности препарата после флюорохромирования в течение достаточно длительного времени. Однако этот метод имеет существенный недостаток: после фиксации нередко нарушается дифференцированное окрашивание одно- (РНК) и двухспиральных (ДНК) структур хроматина клетки в результате грубой денатурации нуклеопротеидных структур. Исходя из того, что особенности окраски препаратов флюорохромом АО обнаруживают прямую зависимость от фиксации, pH буферного раствора, концентрации флюорохрома [3, 6], мы сделали попытку ликвидировать дефект метода, несколько видоизменив условия приготовления препаратов. Для решения поставленной задачи было необходимо: 1) найти оптимальные условия для всех этапов обработки фиксированных препаратов, в которых постоянно визуальная картина была бы аналогична той, которая наблюдается при флюорохромировании витальных препаратов; 2) изыскать возможность получения сопоставимых между собой показателей визуальной и микрофлуорометрической оценки интенсивности свечения.

Нами обследовано 15 здоровых доноров с таким расчетом, чтобы кровь одного и того же человека была обработана во всех предусмотренных вариантах исследования. Кровь бралась утром натощак. Готовились обычные мазки на предметных стеклах. Обработано и проанализировано 160 мазков крови. Диапазон условий обработки препаратов был выбран в соответствии с условиями, предусмотренными микрофлуорометрическим методом Rigler и флюорохромированием фиксированных мазков крови с визуальным анализом [4, 9]. Варианты фиксации: 1) простое высушивание, 2) высушивание и фиксация метиловым спиртом в течение 3, 5, 10 мин, 3) выдерживание в высушенном состоянии несколько часов, дней, недель, месяцев, затем перед дальнейшей обработкой—фиксация в течение 3, 5, 10 мин, и без фиксации. Варианты буферной основы красителя: 1) цитратно-фосфатный буфер с pH 3,0, 3,5, 4,1, 4,5, 5,0; 2) ацетатный буфер с pH 3,0, 3,5, 4,1, 4,5, 5,0. Варианты концентрации флюорохрома АО—1:10, 1:50, 1:100; время окраски 1, 3, 5, 7, 10, 15 минут.

Сопоставив визуальную картину и микрофлуорометрические данные при различных вариантах обработки препаратов, мы пришли к выводу, что оптимальными условиями обработки являются следующие: 1) высушивание свежеприготовленных мазков крови и фиксация их ме-

тиловым спиртом в течение 3—5 мин, после чего мазки можно хранить достаточно длительное время (до нескольких месяцев); 2) краситель следует готовить на цитратно-фосфатном буфере с рН 4,1; 3) предпочтительная концентрация рабочего раствора красителя АО 1:100; 4) время окраски 3 мин.

При строгом соблюдении именно таких условий обработки мазков крови здоровых доноров мы получили следующую визуальную картину: в сегментоядерных лейкоцитах—четко очерченное ядро зеленого цвета специфической формы с прозрачной протоплазмой местами бледно-зеленого цвета на черном фоне; в лимфоцитах и моноцитах—характерное для каждой клетки ядро зеленого цвета с протоплазмой умеренно-оранжевого или желто-оранжевого цвета. Таким образом, в фиксированных препаратах мы получили ту же визуальную картину, что и при витальном и субвитальном флюорохромировании с четким стабильным дифференцированным окрашиванием одно- и двухспиральных структур хроматина.

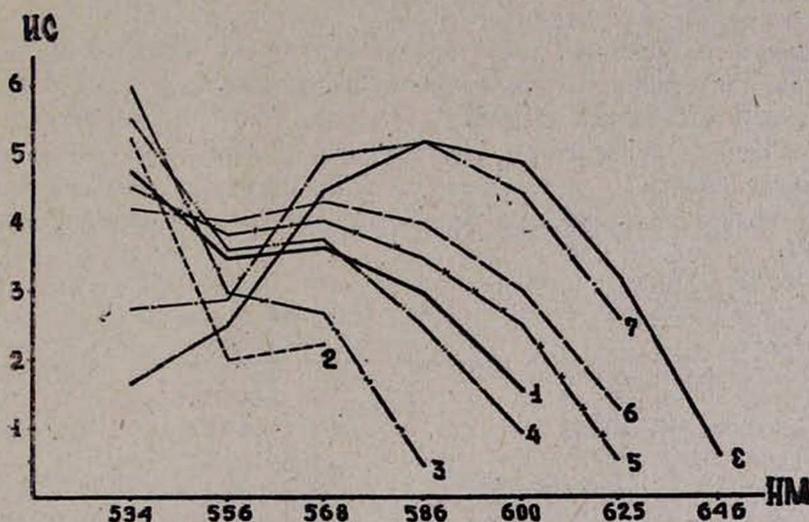


Рис. Изменение диапазона и интенсивности свечения хроматина лимфоцитов больных эпилепсией в зависимости от клинических особенностей болезни. 1—контроль, 2—судорожный припадок, 3—4—межприпадный период у больных с преобладанием судорожных припадков, 5—8—межприпадный период у больных с полиморфной симптоматикой.

Для выполнения следующей задачи необходимо было учесть, что при микрофлуориметрии статистической обработке подлежат показатели, которые фиксируются на счетчике установки. При этом имеет значение лишь абсолютная величина показателя, а не род измеряемой в данном случае величины (напряжение или сила переменного тока), которая и дает возможность судить об изменении интенсивности свечения окрашенных структур. При визуальном анализе интенсивность свечения оценивается +, ++, +++, +++++, после чего показатель выводится по формуле $\frac{a + 2b + 3c + 4d}{100}$, где a—процент клеток с интенсивностью свечения +, b++, c+++, d++++ [1].

При микроскопировании мы одновременно фиксировали показатель микрофлуорометра и визуальную оценку. Зеленое свечение фиксировалось на λ 530, а желто-оранжево-красное—на λ от 580 до 650 нм.

Как визуально, так и микрофлуорометрически нами была установлена четкая взаимосвязь изменений зеленого и красного (вернее желто-оранжево-красного) свечения: нарастание зеленого сопровождается убылью красного, а нарастание красного соответствует снижению зеленого свечения. Эта закономерность демонстрируется на рисунке, где изображен весь диапазон возможных колебаний свечения клеток, которые мы наблюдали при исследовании здоровых лиц (кривая 1) и больных эпилепсией (прочие кривые) посредством микрофлуорометрии.

Вышеизложенное позволяет прийти к выводу, что уровень синтетической активности клетки может быть охарактеризован величиной, представляющей собой отношение люминесценции в красной зоне спектра, подвергающейся наибольшим колебаниям, к таковой в зеленой зоне спектра. Аналогичная характеристика применена недавно и другими авторами, как параметр α [5].

Показатели синтетической активности клетки каждого обследованного мы сопоставили с показателями визуальной оценки, в результате чего стало возможным составить таблицу, в которой показатели визуальной оценки приведены в соответствие с цифровыми показателями микрофлуорометра. С помощью таблицы и в отсутствие микрофлуорометра можно получить данные, сопоставимые с микрофлуорометрическими.

Т а б л и ц а

Визуальная оценка	Микрофлуорометрический показатель
0+1	0,05—0,15
+1—0	0,16—0,25
+1	0,25—0,35
+1+2	0,36—0,45
+2+1	0,46—0,55
+2	0,56—0,65
+2+3	0,66—0,75
+3+2	0,76—0,85
+3	0,86—0,95
+3+4	0,96—1,05
+4+3	1,06—1,15
+4	1,16—1,25

Под люминесцентный микроскоп можно приспособить простой биологический микроскоп, приобретя к нему недорогое люминесцентное устройство ОИ-17 или ОИ-18.

Полученные данные позволяют рекомендовать модифицированный метод исследования лимфоцитов для применения в широкой клинической практике.

ԼԻՄՖՈՑԻՏՆԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅԱՆ ԼՅՈՒՄԻՆԵՍՑԵՆՏԱՅԻՆ ՄԵԹՈԴԻ
ԿԻՐԱՌՈՒՄԸ ՊՐԱԿՏԻԿ ԱՌՈՂՋԱՊԱՀՈՒԹՅԱՆ ՄԵՋ

Բուֆերային լուծույթի pH-ի, ֆլուորոքրոմի խտության, ֆիքսման և ֆլուորոքրոմացման ժամանակ փոփոխման միջոցով որոշվել են արյան ֆիքսված բուկների ֆլուորոքրոմացման լավագույն պայմանները, ցույց տրվել այդ բուկների վիզուալ և միկրոֆլուորոմետրիկ ուսումնասիրության մեթոդների համեմատական գնահատականը և դրանով իսկ լյումինեսցենտամանրադիտակային մեթոդը հարմարեցվել է պրակտիկ բժշկության արդի պայմաններին:

M. V. KHUDGARIAN

ON THE POSSIBILITY OF APPLICATION OF THE LUMINESCENTIVE
METHOD OF LYMPHOCYTES' INVESTIGATION IN PRACTICAL
MEDICINE

Different variants of fluorochroming of the fixated blood smears have been investigated. The optimal variant of the staining of preparations is suggested, which is very useful in practical medicine.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Алмазов В. А., Рябов С. И. Методы функционального исследования системы крови. М., 1963.
2. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М., 1980.
3. Головацкий А. С. Цитология, 1979, XXI, 4, с. 480.
4. Закржевский Е. Б., Васильева Л. Г. Люминесцентная микроскопия в клинко-гематологических исследованиях. Л., 1963.
5. Заруди Ж. Х. В сб.: Иммунопатология нервных и психических заболеваний. М., 1983, с. 61.
6. Зеленик А. В. Взаимодействие аминопроизводных акридина с клеткой. М., 1971.
7. Прилипко Л. Л. Канд. дисс. М., 1970.
8. Худгарян М. В. Канд. дисс. Ереван, 1981.
9. Rigler R. Acta Physiol. Scand., 1966, 67, suppl. 267.

УДК 616.831—005

Г. С. ГРИГОРЯН, Ю. С. ТУНЯН, С. Э. АКОПОВ

СОСТОЯНИЕ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ГЕМОДИНАМИКИ У
БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМИ НАРУШЕНИЯМИ МОЗГОВОГО
КРОВООБРАЩЕНИЯ

Изучено состояние мозгового кровотока у больных с преходящими нарушениями мозгового кровообращения в системе каротид и инфарктами головного мозга в комплексе с реологическими параметрами. Выявлено, что нарушение мозговой перфузии тесно взаимосвязано с изменениями агрегационных свойств эритроцитов и тромбоцитов и внутритромбоцитарной концентрацией серотонина.

Для успешного лечения и профилактики мозгового инсульта необходимо четкое представление о тех интимных механизмах расстройств