

Предлагаемое изобретение относится к медицине, а именно к области стоматологии, и может быть применено при дополнительном лабораторном обследовании больных.

Известен способ определения НСТ-теста лейкоцитов крови - метод Стьюарта, описанный Б.С. Нагоевым (Лабораторные методы исследования в клинике: Справ. / Под ред. В.В. Меньшикова. - М.: Медицина, 1987. - 250с.).

Недостатком способа является использование крови больных, что вызывает организационные затруднения при амбулаторном обследовании больных. Другим недостатком способа является его малая информативность при обследовании стоматологических больных - выявлены заметные отклонения показателей теста лишь при генерализованных инфекционных заболеваниях, хирургической патологии. Также, при определении индуцированного НСТ-теста в качестве стимуляторов лейкоцитов используют вакцины или частицы латекса, что представляет технические трудности.

Известен способ определения НСТ-теста лейкоцитов ротовой жидкости (Tiede D. Die Phagozytosekapazität der Speichelleukozyten // Zahn-, Mund-, Kieferheilkunde. 75(1987)3 - 5.255 - 259).

Недостатком способа является использование малого количества ротовой жидкости, содержащей в основном разрушенные лейкоциты, что искажает результаты исследования, а также не производится индуцированный НСТ-тест, который выявляет потенциальные фагоцитарные возможности лейкоцитов.

Наиболее близким к заявляемому решению является способ Стьюарта, описанный Б.С. Нагоевым (Лабораторные методы исследования в клинике: Справ. / Под ред. В.В. Меньшикова. - М.: Медицина, 1987. - 250с.). Принцип способа заключается в поглощении нейтрофильными лейкоцитами нитросинего тетразолия и восстановление его в формазан, выявляемый при микроскопии мазков крови в виде гранул синего цвета. Объектом исследования являются наружные мембраны нейтрофильных лейкоцитов. При взаимодействии естественного (в организме) или искусственного стимула (добавляемого при инкубации биологического материала) происходит поглощение образовавшегося в инкубационной смеси комплекса НСТ-гепарин-фибриноген и перенос его в фагосомы нейтрофильных лейкоцитов. Этот процесс коррелирует с образованием внутри лейкоцитов перекиси водорода и супероксиданионрадикала. С помощью теста выявляют энзиматические дефекты клеточного иммунитета, ведущие к дисфагоцитозу и генерализации инфекционного процесса в организме. При проведении НСТ-теста в клинко-лабораторной практике применяют цитохимический анализ, основанный на определении процента содержания нейтрофилов, имеющих в цитоплазме гранулы формазана, и определяют тетразолиевую активность лейкоцитов. При этом учитывают IV степени активности лейкоцитов по степени поглощения формазана.

В основу изобретения поставлена задача создания такого способа определения дыхательного взрыва лейкоцитов смывов полости рта и протоковой слюны, в котором

использованием для исследования нейтрофильных лейкоцитов смывов полости рта или протоковой слюны, использованием в качестве стимулятора при проведении индуцированного НСТ-теста 5% раствора фторида натрия или формилметиониллейцилфенилаланина, и при значении индекса активации нейтрофилов выше 2,0, обеспечивается возможность выявления дыхательного взрыва нейтрофильных лейкоцитов ротовой полости и протоковой слюны, за счет чего обеспечивается объективность исследования и достоверность полученных результатов, что повышает эффективность диагностики воспалительного процесса, его выраженности в тканях челюстно-лицевой области и обеспечивается контроль эффективности лечения больных.

Поставленная задача решается тем, что в способе определения дыхательного взрыва лейкоцитов смывов полости рта и протоковой слюны, включающего исследования степени поглощения лейкоцитами тетразолия и восстановления его в формазан; определение индекса активации нейтрофилов (ИАН) по формуле: $ИАН = (a + 2b + 3c + 4d)/100$, где а - число клеток без гранул; b - число клеток с 1 - 3 гранулами (25% окрашенной цитоплазмы); с - число клеток с 3 - 7 гранулами (до 75% окрашенной цитоплазмы); d - число клеток с 7 и более гранулами (100% окрашенной цитоплазмы); использование согласно изобретения центрифугата нейтрофильных лейкоцитов смывов полости рта и протоковой слюны, а в качестве стимулятора при проведении индуцированного теста - 5% раствора фторида натрия или формилметиониллейцилфенилаланина (ФМЛФ), и при значении ИАН выше 2,0 определяют степень активации нейтрофилов в полости рта и протоковой слюне больных при воспалении.

Способ осуществляется следующим образом.

Секрет слюнных желез в количестве 2 - 3мл получают с помощью мягких полиэтиленовых катетеров без предварительной стимуляции слюноотделения химическими веществами. Смывы полости рта производят по методике Ясиновского (Данилевский Н.Ф., Магид Е.А., Магид В.Ю. Заболевания пародонта: Атлас. - М.: Медицина, 1993. - 319с.). Для полоскания используют 10мл физиологического раствора хлорида натрия. Длительность одного полоскания - 30 секунд, промежутки между полосканиями - 5 минут. Первые три порции не используют, последующие - собирают в пробирки для исследования. Смывы полости рта и протоковую слюну разводят физиологическим раствором до 10мл. Центрифугируют 10 минут при 3000об/мин. Осторожно удаляют надосадочную жидкость микропипеткой. Далее используют принцип метода Стьюарта, описанный Б.С. Нагоевым (Лабораторные методы исследования в клинике: Справ. / Под ред. В.В. Меньшикова. - М.: Медицина, 1987. - 250с.).

Реактивы:

- 1) 0,1% раствор нитросинего тетразолия (НСТ);
- 2) 50% раствор формалина в 0,9% растворе хлорида натрия;
- 3) 5% раствор фторида натрия;
- 4) формилметиониллейцилфенилаланин (ФМЛФ);
- 5) формалин-спиртовый раствор (1 : 1) или метанол;

6) сафранин 0,5% раствор в 0,9% растворе хлорида натрия.

Оборудование:

- 1) центрифуга;
- 2) термостат на 37°C;
- 3) световой микроскоп с иммерсионной системой;
- 4) силиконированные центрифужные пробирки,

Выполняют спонтанный НСТ-тест с нестимулированными нейтрофилами и НСТ-тест нейтрофилов, стимулированных раствором натрия фторида или ФМЛФ. Для этого:

1) в пробирки вносят 0,1мл прозрачного раствора НСТ;

2) в пробирки, предназначенные для стимулированного НСТ-теста, вносят 0,01мл раствора натрия фторида или ФМЛФ;

3) выдерживают пробирки при комнатной температуре 3мин;

4) инкубируют 10 минут при 37°C;

5) добавляют во все пробирки 0,1мл 50% раствора формалина в физиологическом растворе;

6) центрифугируют 5мин;

7) удаляют пипеткой надосадочную жидкость;

8) микропипеткой отбирают осадок и делают мазки на предварительно подготовленные стекла;

9) высушивают мазки на воздухе;

10) фиксируют мазки в течение 30 секунд в формалин-спиртовом растворе или метаноле;

11) окрашивают мазки сафранином 1 минуту.

При иммерсионной микроскопии просматривают 100 нейтрофилов. Учитывают клетки, которые восстановили НСТ-краситель до диформаза темного-синего цвета четко видимого в цитоплазме. Наряду с этим определяют тетразолиевую активность нейтрофилов, для чего определяют IV степени активности поглощения формаза клеткой. Результаты учитывают двумя способами:

1) определением процента активированных нейтрофилов (альтернативный учет);

2) определением индекса активации нейтрофилов (ИАН) по формуле: $ИАН = (a + 2b + 3c + 4d)/100$, где: a - число клеток без гранул; b - число клеток с 1 - 3 гранулами (25% окрашенной цитоплазмы); c - число клеток с 3 - 7 гранулами (до 75% окрашенной цитоплазмы); d - число клеток с 7 и более гранулами (100% окрашенной цитоплазмы).

ИАН представляет собой средний показатель активации системы фагоцитоза в расчете на 1 нейтрофил. По разности показателей спонтанного и стимулированного НСТ-теста судят о величине фагоцитарного резерва клеток (ФРК).

Пример применения: исследуют лейкоциты протоковой слюны околоушных и поднижнечелюстных желез, смывов полости рта у больных воспалительными заболеваниями мягких тканей челюстно-лицевой области (абсцессы и флегмоны поверхностных и глубоких клетчаточных пространств лица и шеи, острые лимфадениты). В результате проведенных исследований установлено:

1. У здоровых лиц процент формазан-положительных клеток смывов полости рта составляет $32,61 \pm 8,3\%$ при спонтанном тесте и $56,76 \pm 6,1\%$ при стимулированном тесте. ИАН смывов полости рта составляет $1,62 \pm 0,09$ при спонтанном тесте и

$1,98 \pm 0,1$ при стимулированном тесте. В протоковой слюне определяются единичные лейкоциты, поэтому, показатели НСТ-теста у здоровых людей принимаются за 0.

2. Величины процента формазан-положительных клеток и ИАН не зависят от выбранного стимулятора, но в случае с ФМЛФ отмечаются более крупные и темные гранулы диформаза, чем при стимуляции фторидом натрия.

3. У больных достоверно повышаются значения как спонтанного, так и стимулированного НСТ-теста (в среднем соответственно на 61% и 77%).

Пик увеличения показателей отмечается на 7 день течения воспалительного процесса.