

профсоюзные организации, дирекцию завода, инженерно-технических работников и широкую общественность, постоянно поддерживая с ними деловой контакт.

Благодаря осуществлению всех этих мероприятий в 1966 г. по сравнению с 1964 г. заболеваемость дерматозами и временная потеря трудоспособности снизились соответственно на 25,2 и 33,2%, в том числе пнодермитами — на 23,7 и 25,5%, профдерматозами — 11,6 и 22,6%.

НОВЫЕ МЕТОДЫ И ИНСТРУМЕНТЫ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ ЛЕЙКОЦИТОВ

А. И. Бухин и Г. В. Дервиз

*Центральный ордена Ленина институт гематологии и переливания крови
(директор — доц. А. Е. Киселев)*

Определение активности щелочной фосфатазы лейкоцитов представляет интерес для целей практической и теоретической медицины. При ряде заболеваний (острые воспалительные заболевания, сепсис, лейкозы, злокачественные опухоли, лучевые поражения и др.) активность щелочной фосфатазы лейкоцитов часто закономерно меняется, что может послужить для дифференциальной диагностики и прогноза.

Большинство исследований щелочной фосфатазы лейкоцитов базируется на применении в различных модификациях качественных цитохимических методов, хотя и удобных (легкость взятия, обработки и хранения мазка крови), но все же довольно субъективных.

Из биохимических количественных методик, преимуществом которых является возможность точного количественного учета полученных результатов, следует упомянуть модификации методик Боданского и Кея с применением в качестве субстрата β -глицерофосфата натрия с последующим определением освобожденного фосфора.

Мы пользовались методикой, разработанной Г. К. Шлыгиным и С. Я. Михлиным для определения щелочной фосфатазы в плазме крови. При этой методике применяется в качестве субстрата довольно доступный паранитрофенилфосфат натрия, и в результате воздействия фосфатазы на субстрат получается окрашенное вещество (паранитрофенол). Реакция идет в присутствии ионов Mg, которые являются активаторами щелочной фосфатазы. Получающийся в результате реакции паранитрофенол в щелочных растворах имеет желтую окраску. По интенсивности окраски судят о количестве освобожденного паранитрофенола, а отсюда — и об активности фермента, содержащегося в имеющемся количестве лейкоцитов. Для унификации результатов и возможности их сравнения с данными, полученными при других методах, мы предлагаем количество освобожденного паранитрофенола выражать в миллимолях и пересчитывать на 10^{10} лейкоцитов.

Реактивы. р-нитрофенилфосфат натрия или бария; 0,001 н. раствор HCl; водонасыщенный бутиловый спирт; водонасыщенный этиловый эфир; аммиачная буферная смесь: 1 н. раствор NH_3 , проверенный титриметрически, смешивают с 1 н. раствором NH_4Cl в соотношении 4 : 1 (рН — 10,1); 0,3% раствор MgCl_2 ; 5% раствор NaCl; 0,9% раствор NaCl; 0,3% раствор NaCl; 5% раствор секвестрена (динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты — ЭДТА-Na), готовится на горячем физиологическом растворе; 10% раствор желатин; р-нитрофенол для приготовления стандартных растворов; 0,1 н. раствор двузамещенной соды (удобно брать безводный Na_2CO_3).

Приготовление забуференного раствора субстрата. Приготавливают 0,45% раствор р-нитрофенилфосфата натрия в 0,001 н. соляной кислоте. Раствор хранится 3—6 дней, его следует готовить столько, чтобы израсходовать за это время. Полученный раствор желтого цвета (примесь р-нитрофенола) взбалтывают (для обесцвечивания) в делительной воронке с равным количеством водонасыщенного бутилового спирта. Разделив оба слоя, образовавшиеся в делительной воронке, водный слой обрабатывают еще 1—2 раза бутиловым спиртом, а затем 1—2 раза эфиром. Бутиловый и эфирный слои выливают. В результате такой обработки водный раствор р-нитрофенилфосфата становится бесцветным. К полученному бесцветному раствору субстрата добавляют раствор аммиачного буфера из расчета 1 мл на каждые 9 мл субстрата (в смеси концентрация буфера равна 0,1 н., а концентрация субстрата 0,4%). Забуференный субстрат хранят в тщательно закрытом пробкой темном сосуде в холодильнике при 4°С. Если раствор при хранении окрашивается в желтый цвет, то он не годен и его заменяют свежим.

Если применяется р-нитрофенилфосфат бария, то в этом случае приготавливают 0,9% раствор препарата в 0,001 н. растворе HCl (примеси в препарате составляют около 50%). Навеску берут из расчета 0,9 г препарата на 100 мл HCl с тем, чтобы общее количество раствора соответствовало 3—6-дневной потребности. Полученный мутный раствор фильтруют, фильтрат переносят в делительную воронку и дальнейшие процедуры производят так же, как и при приготвлении забуференного субстрата р-нитрофенилфосфата натрия. Небольшой осадок, образующийся после добавления аммиачной буферной смеси, удаляют фильтрованием.

Приготовление стандартного щелочного раствора р-нитрофенола. Приготавливают 0,4 мг% раствор р-нитрофенола в 0,1 н-растворе Na_2CO_3 . Удобно сначала приготовить этот раствор более концентрированным, взяв навеску 100 мг р-нитрофенола и растворив ее в 100 мл 0,1 н. раствора Na_2CO_3 (100 мг% раствор). Раствор должен стоять ночь или более, и затем часть его разводят в 250 раз 0,1 н. раствором соды.

Стенку окрашивания стандартного раствора после его приготовления проверяют на спектрофотометре СФ-4; оптическая плотность должна быть равна 0,520—0,530 в области 400 мкм при толщине слоя в 1 см и ширине щели 0,02 мм (в нашем случае она равнялась 0,525). Можно воспользоваться для этой же цели и фотозлектрическим колориметром (модель ФЭК-М, 1953 г.). При измерении с синим светофильтром в кювете на 5 см светового пути оптическая плотность равна 0,190—0,200.

Приготовление взвеси лейкоцитов. В пробирку в качестве стабилизатора берут 1 мл 5% раствора секвестрена и 1 мл 10% раствора желатина для ускорения осаждения эритроцитов, а затем из вены — около 10 мл крови. Кровь тщательно перемешивают и оставляют отстаиваться на 40—50 мин. За это время осажается большая часть эритроцитов. Снимают верхний мутный надстой, содержащий основную массу лейкоцитов с небольшой примесью эритроцитов и тромбоцитов. Надстой центрифугируют при 400—500 об./мин. в течение 7—8 мин. для осаждения лейкоцитов и оставшейся части эритроцитов. Плазму с добавленными секвестреном и желатином выбрасывают. Осадок взбалтывают в течение 1,5—2 мин. с 5 мл 0,3% раствора NaCl для разрушения оставшихся эритроцитов и немедленно доводят до изотонии 0,6 мл 5% раствора NaCl. Смесь вновь центрифугируют при вышеописанных условиях. Мутный розового цвета надстой (за счет гемолизированных эритроцитов) снимают и выливают. Под микроскопом проверяют наличие неразрушенных эритроцитов. Вышеописанную процедуру повторяют до тех пор, пока под микроскопом не останутся единичные в поле зрения неразрушенные эритроциты. Обычно это достигается после проведения данной процедуры 2—3 раза. Оставшиеся лейкоциты размешивают в 4 мл физиологического раствора NaCl и производят подсчет их в камере Горяева. Для получения устойчивых результатов достаточно 500—1000 лейкоцитов в 1 мм³.

Для определения щелочной фосфатазы лейкоцитов их необходимо предварительно разрушить. Это достигается двумя путями: либо добавлением к суспензии лейкоцитов 0,08—0,1 г очищенного сапонина, который не изменяет цвета суспензии, либо замораживанием суспензии в жидком азоте с последующим постепенным оттаиванием ее. Мы применяли в основном второй путь. Оценка степени разрушения лейкоцитов, проводившаяся под микроскопом, показала, что практически все лейкоциты бывают разрушены при применении обоих методов. Однако последний метод позволяет длительно хранить суспензии в замороженном виде, что дает возможность проводить инкубацию сразу нескольких образцов крови по мере накопления их в течение 3—4 дней.

Ход определения. В пробирку с 4 мл оттаянных и разрушенных лейкоцитов добавляют 2 мл забуференного субстрата (1/2 объема суспензии лейкоцитов) и 3—4 капли 0,3% раствора хлористого магния. Смесь ставят в водную баню или ультратермо-

стат при 37° С на 1 час для инкубации. После инкубации пробы фильтруют и определяют их оптическую плотность на спектрофотометре СФ-4 при длине волны 400 мкм в кювете с рабочей толщиной слоя в 1 см при ширине щели 0,02 мм.

Зная, что оптическая плотность при 400 мкм 0,4 мг% раствора р-нитрофенола равняется 0,525, вычисляют количество образовавшихся в течение 1 часа миллимолей р-нитрофенола на 10^{10} лейкоцитарных клеток по следующей формуле:

$$\text{Количество миллимолей р-нитрофенола} = \frac{E_n \times 0,004 \times 6 \times 10^{10}}{0,525 \times 139 \times L},$$

где E_n — оптическая плотность испытуемой пробы; 0,004 — количество мг р-нитрофенола в 1 мл стандартного раствора; 6 — количество мл испытуемой пробы; 10^{10} — пересчет на 10^{10} лейкоцитов; 0,525 — оптическая плотность стандартного раствора р-нитрофенола, содержащего 0,004 мг его в 1 мл; 139 — молекулярный вес р-нитрофенола; L — количество лейкоцитов в испытуемой пробе.

Пример расчета. Взята взвесь лейкоцитов, в 1 мм³ которой содержится 650 лейкоцитов. Тогда в 4000 мм³ (количество суспензии) содержится 2,5—10⁶ лейкоцитов. После соответствующей обработки и инкубации взвеси лейкоцитов с добавленным субстратом в течение 1 часа при 37° в ультратермостате получаем оптическую плотность, равную 0,38, и активность щелочной фосфатазы выразится:

$$\frac{0,38 \times 0,004 \times 6 \times 10^{10}}{0,525 \times 139 \times 2,5 \times 10^6} \text{ мМ (миллимолей)} = 0,5 \text{ мМ р-нитрофенола на } 10^{10} \text{ лейкоцитов.}$$

Полученные результаты (предварительные). У 10 доноров количество щелочной фосфатазы колебалось от 0,3 до 0,55 мМ освобожденного р-нитрофенола.

У всех больных с хроническим миелолейкозом уровень активности щелочной фосфатазы был резко снижен и не превышал 0,2 мМ (колебания от 0,035 до 0,2 мМ). Напротив, у больных с миелофиброзом в подавляющем большинстве случаев он был повышен в 2 и более раз (от 0,8 до 3 мМ). Пока рано делать какие-либо определенные выводы, так как материал еще статистически не обработан.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шлыгин Г. К. и Михлин С. Я. Вопр. мед. химии, 1955, т. 1, вып. 6. —
2. Щеклик Э. Клиническая ферментология. Медицина, М., 1966.

НОВЫЕ ПРИБОРЫ ДЛЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО АНАЛИЗА ВНЕШНЕГО И ВНУТРЕННЕГО ДЫХАНИЯ

Казанское специальное конструкторско-технологическое бюро медицинских физиологических приборов (СКТБ «Медфизприбор») Министерства медицинской промышленности СССР за последние годы разработало и внедрило в производство ряд новых аппаратов для анализа газового обмена у здорового и больного человека.

Эти приборы уже сейчас нашли широкое применение в ряде клиник, больниц и научно-исследовательских лабораторий; они являются спутниками хирурга в операционной, терапевта и педиатра в кабинетах функциональной диагностики, врача-физиолога при испытаниях спортсменов и летчиков. Аппараты изображены на обложке журнала, их краткая характеристика дается ниже.

АЗИВ-1, аппарат для замера концентрации ионов водорода (рис. 1). Позволяет в течение 10 минут определить 8 параметров, характеризующих уровень кислотно-щелочного равновесия в организме (рН, pCO_2 , буферные основания, избыток или дефицит оснований и т. д.). Для одного замера рН достаточно всего 0,03 мл цельной крови.

Медицинский рН-метр предназначен для измерения величины рН и pCO_2 в пробах крови и других биологических жидкостях (рис. 2). Для анализа берется 0,05 мл крови. Экспресс-анализ с помощью этого прибора дает возможность оценивать эффективность реанимационных мероприятий, контролировать функцию аппарата искусственного кровообращения и т. д.

ГУХ-2 — газоанализатор углекислого газа химический (рис. 3). Новая, более совершенная модель отлично зарекомендовала себя аппарата ГУХ-1. Современная форма, удовлетворяющая требованиям технической эстетики, предельное упрощение системы управления аппаратом разрешают применять его в амбулаторной практике, при массовых исследованиях спортсменов, у койки больного в стационаре и на дому. Используя уравнение Бора и Комро, по данным аппарата ГУХ-2 можно рассчитывать альвеолярную вентиляцию и определять ее эффективность.

ГУМ-3 — малоинерционный газоанализатор углекислого газа (рис. 4), работает по принципу измерения поглощения лучистой энергии газами в инфракрасной области спектра. Процентное содержание CO_2 в выдыхаемом воздухе непрерывно регистрируется на бумаге, вследствие чего можно рассчитать ряд параметров газообмена, в том числе и возбудимость дыхательного центра к CO_2 (по методике Р. С. Виницкой). Газоанализа-