



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013126123/15, 06.06.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
06.06.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 06.06.2013

(45) Опубликовано: 20.07.2014 Бюл. № 20

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2180116 C1, 27.02.2002. SU 1807401
A1, 07.04.1993. RU 2092851 C1, 10.10.1997. RU
2159437 C1, 20.11.2000. SU 1704084 A1,
07.01.1992. SU 1781607 A1, 15.12.1992

Адрес для переписки:

614045, г.Пермь, ул. Монастырская, 82, ФБУН
"ФНЦ медико-профилактических технологий
управления рисками здоровью населения",
директору Н.В. Зайцевой

(72) Автор(ы):

ДОЛГИХ Олег Владимирович (RU),
ХАРАХОРИНА Регина Атласовна (RU),
ДИАНОВА Дина Гумяровна (RU),
ГУГОВИЧ Алеся Михайловна (RU),
ЛЫХИНА Татьяна Станиславовна (RU),
МАЕРОВА Евгения Давидовна (RU),
БУБНОВА Ольга Алексеевна (RU),
ВДОВИНА Надежда Алексеевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное бюджетное учреждение науки
"Федеральный научный центр медико-
профилактических технологий управления
рисками здоровью населения" (ФБУН "ФНЦ
медико-профилактических технологий
управления рисками здоровью населения")
(RU)(54) СПОСОБ ОЦЕНКИ НАРУШЕНИЙ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ
ФЕНОЛА

(57) Реферат:

Изобретение относится к биологическим исследованиям и медицине и предназначено для идентификации неблагоприятного воздействия фенола, поступающего из среды обитания, на здоровье населения. Для оценки нарушений клеточного иммунитета при воздействии фенола производят отбор пробы крови и ее исследование с использованием опытного и контрольного образцов с предварительным введением в опытный образец токсиканта - фенола в концентрации, соответствующей его региональному фоновому уровню. В качестве критериальных показателей в способе используют индекс специфической чувствительности клеток для цитокина фактора некроза опухолей ФНО- α и индекс специфической чувствительности клеток для цитокина Интерлейкина-10 ИЛ-10, которые определяют следующим образом: опытную и контрольную пробы крови вносят во флакон со стерильной питательной средой ДМЕМ с гепарином и гентамицином в объемном

соотношении 1:4 соответственно (в преимущественном варианте содержание в стерильной питательной среде ДМЕМ гепарина составляет 2,5 Ед/мл и гентамицина - 100 мкг/мл), осуществляют при 37°C в течение суток инкубацию этих проб, а затем центрифугирование в течение 3 минут при 1000 об/мин и в отобранном супернатанте опытной пробы определяют уровень фенол-индуцированной продукции цитокинов, а именно уровень ИПЦ_{ИЛ-10} фенол-индуцированной продукции цитокина ИЛ-10 и уровень ИПЦ_{ФНО- α} фенол-индуцированной продукции цитокина - фактора некроза опухолей ФНО- α , а в отобранном супернатанте контрольной пробы определяют уровень спонтанной продукции цитокинов, а именно уровень СПЦ_{ИЛ-10} спонтанной продукции цитокина ИЛ-10 и уровень СПЦ_{ФНО- α} спонтанной продукции цитокина ФНО- α , далее рассчитывают индекс ИСЧ_{ФНО- α} специфической

чувствительности клеток для цитокина ФНО- α , а также рассчитывают индекс ИСЧ_{ИЛ-10} специфической чувствительности клеток для цитокина ИЛ-10 по следующим формулам:

$$\text{ИСЧ}_{\text{ФНО-}\alpha} = (\text{ИПЦ}_{\text{ФНО-}\alpha} - \text{СПЦ}_{\text{ФНО-}\alpha}) : \text{СПЦ}_{\text{ФНО-}\alpha},$$
$$\text{ИСЧ}_{\text{ИЛ-10}} = (\text{ИПЦ}_{\text{ИЛ-10}} - \text{СПЦ}_{\text{ИЛ-10}}) : \text{СПЦ}_{\text{ИЛ-10}},$$

где

ИПЦ_{ИЛ-10} - уровень фенол-индуцированной продукции цитокина ИЛ-10;

ИПЦ_{ФНО- α} - уровень фенол-индуцированной

продукции цитокина ФНО- α ;

СПЦ_{ИЛ-10} - уровень спонтанной продукции цитокина ИЛ-10;

СПЦ_{ФНО- α} - уровень спонтанной продукции цитокина ФНО- α ;

и при выполнении одновременного условия ИСЧ_{ФНО- α} более 10 и ИСЧ_{ИЛ-10} более 2 судят о нарушении клеточного иммунитета организма под воздействием фенола. Изобретение обеспечивает повышение достоверности установления оценки влияния фенола на нарушение клеточного иммунитета организма человека. 1 з.п. ф-лы, 8 табл.

RU 2 5 2 3 4 1 8 C 1

RU 2 5 2 3 4 1 8 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2013126123/15, 06.06.2013

(24) Effective date for property rights:
06.06.2013

Priority:

(22) Date of filing: 06.06.2013

(45) Date of publication: 20.07.2014 Bull. № 20

Mail address:

614045, g.Perm', ul. Monastyrskaja, 82, FBUN
"FNTs mediko-profilakticheskikh tekhnologij
upravlenija riskami zdorov'ju naselenija", direktoru
N.V. Zajtsevoj

(72) Inventor(s):

DOLGIK Oleg Vladimirovich (RU),
KhARAKHORINA Regina Atlasovna (RU),
DIANOVA Dina Gumjarovna (RU),
GUGOVICH Alesja Mihajlovna (RU),
LYKhINA Tat'jana Stanislavovna (RU),
MAEROVA Evgenija Davidovna (RU),
BUBNOVA Ol'ga Alekseevna (RU),
VDOVINA Nadezhda Alekseevna (RU)

(73) Proprietor(s):

Federal'noe bjudzhetnoe uchrezhdenie nauki
"Federal'nyj nauchnyj tsentr mediko-
profilakticheskikh tekhnologij upravlenija
riskami zdorov'ju naselenija" (FBUN "FNTs
mediko-profilakticheskikh tekhnologij
upravlenija riskami zdorov'ju naselenija") (RU)

(54) **METHOD OF ASSESSMENT OF DISORDER OF CELLULAR IMMUNITY IN EXPOSED TO PHENOL**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: for evaluation of disorders of cellular immunity when exposed to phenol the blood sampling and its analysis is carried out using experimental and control samples with preliminary introduction to the test sample of toxicant - phenol in a concentration corresponding to its regional background level. As a criterion factors in the method the index of specific sensitivity of cells is used for cytokine tumour necrosis factor TNF- α and the index of specific sensitivity of cells to cytokine interleukin-10 IL-10, which are defined as follows: the experimental and control blood samples are placed into the vial with a sterile nutrient medium DMEM with heparin and gentamicin in a volume ratio of 1:4, respectively (in a preferred embodiment, the contents in the sterile nutrient medium DMEM of heparin is 2.5 U/ml and gentamicin - 100 mcg/ml), incubation of these samples is carried out at 37°C during 24 hours, followed by centrifugation for 3 minutes at 1000 rev/min, and in the selected supernatant of the test sample the level of IPC_{IL-10} phenol-induced production of cytokine IL-10 is determined and the level of IPC_{TNF- α} phenol-induced production of cytokine - tumour necrosis factor TNF- α , and in the selected supernatant

of the control sample the level of spontaneous cytokine production is determined, namely the SPC_{IL-10} level of spontaneous production of cytokine IL-10 and SPC_{TNF- α} level of spontaneous production of the cytokine TNF- α , then ISS_{TNF- α} index of specific sensitivity of cells for cytokine TNF- α is calculated, and the ISS_{IL-10} index of specific sensitivity of cells for cytokine IL-10 is calculated using the following formulas: ISS_{TNF- α} = (IPC_{TNF- α} - SPC_{TNF- α}): SPC_{TNF- α} , ISS_{IL-10} = (IPC_{IL-10} - SPC_{IL-10}): SPC_{IL-10}, where IPC_{IL-10} is the level of phenol-induced production of cytokine IL-10; IPC_{TNF- α} is the level of phenol-induced production of cytokine TNF- α ; SPC_{IL-10} is the level of spontaneous production of cytokine IL-10; SPC_{TNF- α} is the level of spontaneous production of the cytokine TNF- α ; and when meeting the simultaneous requirement of ISS_{TNF- α} of over 10 and ISS_{IL-10} of over 2 the disorder of cellular immunity of the organism is determined under the influence of phenol.

EFFECT: increase in reliability of making assessment of impact of phenol on disorder of cellular immu-

nity of the human body.

2 cl, 8 tbl

R U 2 5 2 3 4 1 8 C 1

R U 2 5 2 3 4 1 8 C 1

Изобретение относится к биологическим исследованиям и медицине и предназначено для идентификации неблагоприятного воздействия фенола, поступающего из среды обитания, на здоровье населения, в частности, для установления степени вероятности возникновения изменений клеточного иммунитета населения в условиях
5 неблагоприятной экологической обстановки, которая будет учитываться при проведении мероприятий социально-гигиенического мониторинга.

В настоящее время большое внимание уделяется проблеме изучения влияния вредных химических факторов на формирование здоровья населения. Иммунная система является основной защитной системой организма, которая контролирует поддержание гомеостаза
10 внутренней среды и обеспечивает нормальное функционирование организма в целом.

Клеточный иммунитет - это такой тип иммунного ответа, в котором не участвуют ни антитела, ни система комплемента. В процессе клеточного иммунитета активируются макрофаги, натуральные киллеры, антиген-специфичные цитотоксические Т-лимфоциты, и в ответ на антиген выделяются цитокины («Википедия»). Иными словами клеточный
15 иммунитет - это структурная часть иммунной системы, представляющая собой комплекс взаимодействующих клеток, связанных между собой внутренними регуляторными связями посредством цитокинов.

Цитокины - группа гормоноподобных белков и пептидов - синтезируются и секретируются клетками иммунной системы и другими типами клеток. Цитокины - это
20 небольшие регуляторные пептиды, участвующие в иммунорегуляции, хеморегуляции и биорегуляции в целом, которые секретируются неэндокринными клетками (в основном, иммунными) и оказывают местное воздействие на соседние клетки-мишени.

Известен способ оценки влияния химических токсикантов, в частности фенола, на состояние иммунного статуса населения (Патент РФ №2180116). Согласно этому
25 способу, устанавливают в пробе венозной крови содержание токсиканта, обусловленного экологической средой обитания населения, выделяют из пробы лимфоциты (моноклеарные клетки) и добавляют к ним установленный токсикант в концентрации, соответствующей норме, полученную смесь инкубируют при температуре, соответствующей нормальной температуре организма человека, далее методом
30 иммунологического анализа устанавливают в пробе количество лимфоцитов, содержащих дифференцировочные антигены, обусловленных воздействием токсиканта, и при снижении количества соответствующих кластеров лимфоцитов в пробе под воздействием токсиканта не менее чем в 1,5 раза по сравнению с контрольной пробой
35 без введенного в нее дополнительно токсиканта, при одновременном обнаружении токсиканта в пробе крови в концентрации, превышающей норму судят об ухудшении состояния иммунитета. Этот известный способ является наиболее близким к предлагаемому изобретению и использован в качестве прототипа.

Указанный известный способ повышает точность и достоверность установления оценки влияния химического токсиканта на состояние иммунного статуса населения.

В указанном известном способе анализируется динамика количества моноклеарных клеток (лимфоцитов CD3 и CD4) после инкубации с референтной концентрацией токсиканта - фенола. Но это идентифицируемое количество указанных клеток не отражает их функционального состояния. Тогда как в предлагаемом способе спонтанный и, прежде всего, индуцированный уровень цитокинов демонстрирует функциональные
45 возможности иммуноцитов и конкретизирует влияние на выработку цитокинов конкретного токсиканта - фенола. То есть в новом способе используются показатели более чувствительные по сравнению с клетками маркеров в известном способе. Эти показатели по цитокинам отражают не только и не столько количественное (как в

известном способе), сколько качественное состояние иммунитета, т.е. его функционал.

Технический результат, достигаемый предлагаемым изобретением, заключается в повышении достоверности установления оценки влияния фенола на нарушение клеточного иммунитета организма человека, за счет использования в качестве информативного критерия - уровень цитокинов клеток иммунной системы.

Поставленный технический результат достигается предлагаемым способом оценки нарушений клеточного иммунитета при воздействии фенола, включающим отбор пробы крови, ее исследование с использованием опытного и контрольного образцов с предварительным введением в опытный образец токсиканта - фенола в концентрации, соответствующей его региональному фоновому уровню, и установление критериальных показателей, по которым судят о нарушении клеточного иммунитета, при этом новым является то, что в качестве метода исследования используют тесты *ex vivo* влияния токсиканта на продукцию цитокинов клетками иммунной системы, а в качестве критериальных показателей используют индекс специфической чувствительности клеток для цитокина фактора некроза опухолей ФНО- α и индекс специфической чувствительности клеток для цитокина Интерлейкина-10 ИЛ-10, которые определяют следующим образом: опытную и контрольную пробу крови вносят во флакон со стерильной питательной средой ДМЕМ с гепарином и гентамицином в объемном соотношении 1:4 соответственно, осуществляют при 37°C в течение суток инкубацию этих проб, а затем - центрифугирование в течение 3 минут при 1000 об/мин, и в отобранном супернатанте опытной пробы определяют уровень фенол-индуцированной продукции цитокинов, а именно уровень ИПЦ_{ИЛ-10} фенол-индуцированной продукции цитокина ИЛ-10 и уровень ИПЦ_{ФНО- α} фенол-индуцированной продукции цитокина - фактора некроза опухолей ФНО- α , а в отобранном супернатанте контрольной пробы определяют уровень спонтанной продукции цитокинов, а именно уровень СПЦ_{ИЛ-10} спонтанной продукции цитокина ИЛ-10 и уровень СПЦ_{ФНО- α} спонтанной продукции цитокина ФНО- α , далее рассчитывают индекс ИСЧ_{ФНО- α} специфической чувствительности клеток для цитокина ФНО- α , а также рассчитывают индекс ИСЧ_{ИЛ-10} специфической чувствительности клеток для цитокина ИЛ-10 по следующим формулам:

$$\text{ИСЧ}_{\text{ФНО-}\alpha} = (\text{ИПЦ}_{\text{ФНО-}\alpha} - \text{СПЦ}_{\text{ФНО-}\alpha}) : \text{СПЦ}_{\text{ФНО-}\alpha},$$

$$\text{ИСЧ}_{\text{ИЛ-10}} = (\text{ИПЦ}_{\text{ИЛ-10}} - \text{СПЦ}_{\text{ИЛ-10}}) : \text{СПЦ}_{\text{ИЛ-10}},$$

где:

ИПЦ_{ИЛ-10} - уровень фенол-индуцированной продукции цитокина ИЛ-10;

ИПЦ_{ФНО- α} - уровень фенол-индуцированной продукции цитокина ФНО- α ;

СПЦ_{ИЛ- α} - уровень спонтанной продукции цитокина ИЛ-10;

СПЦ_{ФНО- α} - уровень спонтанной продукции цитокина ФНО- α ;

и при выполнении одновременного условия ИСЧ_{ФНО- α} более 10 и ИСЧ_{ИЛ-10} более 2 судят о нарушении клеточного иммунитета организма под воздействием фенола.

Содержание в стерильной питательной среде ДМЕМ гепарина составляет 2,5 Ед/мл и гентамицина - 100 мкг/мл.

Указанный технический результат обеспечивается за счет следующего.

Благодаря использованию в качестве исследуемого материала пробы венозной крови обеспечивается простота и надежность исследований, а также получение нужной информативности, т.к. главный информативный показатель - цитокины - играют главную

роль в регуляции иммунного ответа. Цитокины - продуцируемые клетками крови белково-пептидные факторы, осуществляющие регуляцию межклеточных и межсистемных взаимодействий.

5 Большинство цитокинов являются растворимыми циркулирующими медиаторами и их концентрацию легко можно определить в биологических жидкостях. Полученные при этом данные отражают текущее состояние иммунной системы, тогда как в ситуациях, сопряженных с дефицитом или дисбалансом регуляторных факторов необходимо оценить способность клеток крови к секреции цитокинов. В последние годы для такого рода исследований широко используется метод *ex vivo*, в котором для анализа
10 используют пробы цельной крови без выделения мононуклеарных клеток. Результаты определения уровня спонтанной продукции цитокинов при этом позволяют оценить активацию клеток крови в организме обследуемого, а установление уровня индуцированной продукции - их потенциальную способность к секреции цитокинов.

Химические факторы окружающей среды, оказывая влияние на регуляторные
15 механизмы иммунной системы, могут выступать в качестве индукторов синтеза цитокинов мононуклеарными клетками крови. В связи с этим актуальным является исследование продукции цитокинов, стимулированной органическими соединениями, в частности, фенолом. Это позволяет воспроизвести и усилить функциональные реакции клеточной системы иммунитета *ex vivo*.

20 Фенолы - одна из наиболее распространенных в мегаполисах группа токсикантов, это выбросы химических предприятий, питьевая вода поверхностных водотоков, бытовые средства - моющие, чистящие и дезинфицирующие вещества, клеи, смолы, краски, лекарства (карболовая кислота, аспирин).

Для обоснования изобретательского уровня предлагаемого изобретения следует
25 указать, что из уровня техники известен «Способ прогнозирования длительности периода антигенемии вируса клещевого энцефалита» (Патент РФ №2439566), согласно которому до введения противоклещевого иммуноглобулина у инфицированных лиц определяют уровень спонтанной и индуцированной митогеном продукции цитокинов IFN- γ и IL-4. В случае если уровень спонтанной продукции IFN- γ выше 59,7 пг/мл, а
30 митоген-индуцированной - выше 122,2 пг/мл и уровень спонтанной продукции IL-4 ниже 23,5, а митоген-индуцированной ниже 25,3 пг/мл, прогнозируют быструю элиминацию антигена.

Указанный известный способ предполагает определение тяжести и длительности антигенемии путем оценки иммунологических показателей. При этом способ основан
35 на изучении доминирующего участия Th1- или Th2-популяций лимфоцитов при развитии иммунного ответа на инфекцию через оценку спонтанного и индуцированного уровней продукции цитокинов с использованием универсального митогена - конканавалина А. Однако отличием предлагаемого способа является то, что в качестве митогена используется сам антиген (фенол), а по индуцированной продукции цитокинов можно
40 судить о его непосредственном влиянии на клетки иммунной системы. Кроме того, использование цитокинового ряда в виде ФНО- α и ИЛ-10 в заявляемом способе позволяет провести оценку функционального состояния иммунитета не только с точки зрения соотношения Th1/Th2 (термины "Th1-цитокины" и "Th2-цитокины" отражают происхождение цитокинов, секретируемых этими двумя популяциями Т-хелперов), но
45 и с позиции детализации сочетания про-, противовоспалительных цитокинов и состояния факторов запрограммированной клеточной гибели, к которым относятся ФНО- α и ИЛ-10. Все это делает предлагаемый способ более точным и специфичным по идентификации иммуотропного эффекта конкретного антигена - фенола.

Благодаря тому, что при реализации заявляемого способа в опытную пробу дополнительно добавляют фенол в фоновой концентрации, т.е. концентрации, соответствующей региональной норме содержания фенола в крови, обеспечивается возможность усилить и идентифицировать эффект воздействия этого токсиканта на цитокины *ex vivo*, т.к. чем выше содержание этого токсиканта над нормальной, так называемой "допустимой", концентрацией (а это содержание на этапе идентификации в предлагаемом способе будет складываться из базового, ранее содержащегося в пробе крови фенола, и из дополнительно введенного фенола), тем значительнее повреждающее его действие на клетки иммунной системы, а значит, благодаря внесению фиксированной нетоксичной концентрации фенола, повысится точность определения влияния указанного токсиканта - фенола - на нарушение клеточного иммунитета.

Использование в предлагаемом способе в качестве сопоставительной базы контрольной пробы, без введенного в нее дополнительного фенола, позволяет с большой долей достоверности установить при сопоставлении данных опытной и контрольной проб влияние именно неблагоприятного экологического фактора - фенола - на нарушение клеточного иммунитета.

Использование в качестве метода исследования - иммуноферментного метода *ex vivo* позволяет воспроизвести условия *in vivo*, искусственно усилить их и количественно идентифицировать результат.

Выполнение исследования с использованием стерильной питательной среды ДМЕМ с гепарином и гентамицином, при заявленных режимах инкубации пробы крови и центрифугирования, позволяют получать супернатанты контрольного и опытного образцов для установления в них уровня спонтанной продукции цитокинов ФНО- α и уровня фенол-индуцированной продукции цитокинов Интерлейкина-10 (далее ИЛ-10) соответственно. Выбор показателей ФНО- α и ИЛ-10 обусловлен следующим.

ФНО- α - основной цитокин провоспалительного ряда является позитивным регулятором воспалительной реакции и пусковым фактором в цепи продукции цитокинов воспалительного каскада.

ИЛ-10 - противовоспалительный цитокин, тормозит пролиферативный ответ Т-клеток на антигены и ингибирует клеточный иммунитет. Одновременное определение уровня как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов может в полной мере характеризовать интенсивность иммунного ответа и системность воспалительной реакции.

Использование при реализации предлагаемого способа двух индексов: ИСЧ_{ФНО- α} - индекса специфической чувствительности клеток для цитокина ФНО- α и ИСЧ_{ИЛ-10} - индекса специфической чувствительности клеток для цитокина ИЛ-10 позволяет оценить состояние специфической чувствительности иммунцитов к конкретному химическому токсиканту по интенсивности индуцированной экспрессии приоритетных для клеточного иммунитета цитокинов.

Экспериментальным путем было установлено, что при выполнении одновременного условия ИСЧ_{ФНО- α} более 10 и ИСЧ_{ИЛ-10} более 2 активность воздействия фенола на продукцию цитокинов клетками крови иммунной системы оценивается как повышенная, приводящая к нарушению клеточного иммунитета под воздействием фенола.

Предложенные диагностические (критериальные) индексы позволяют точно ориентировать на характер нарушений в зависимости от конкретики и сочетания нарушений индуцированной экспрессии ФНО- α и ИЛ-10. Так как каждый из них несет уникальную функциональную ответственность в иммунной регуляции. ФНО- α - отвечает

за контроль жизненного цикла клетки, прежде всего его финальной фазы - апоптоза (программированная клеточная гибель). ИЛ-10 - цитокин, при его повышенной экспрессии, курирующий атопические процессы - аллергия, аутоиммунитет.

5 Таким образом, оценка *ex vivo* предлагаемым способом позволит охарактеризовать иммуотропный эффект поступления фенола в организм из внешней среды на уровне всего организма в целом и принимать решения о коррекционных и профилактических мероприятиях по снижению экзогенной контаминации фенолом как на индивидуальном, так и на популяционном уровнях.

10 Исходя из вышеизложенного можно сделать вывод, что поставленный технический результат обеспечивается за счет совокупности операций предлагаемого способа, их последовательности и режимов его реализации.

Предлагаемый способ реализуется следующим образом.

1. 1 мл отобранной утром, натощак, периферической крови вносили во флакон, содержащий 4 мл стерильной питательной среды ДМЕМ с гепарином (2,5 Ед/мл) и гентамицином (100 мкг/мл).

2. Для определения фенол-индуцированной продукции цитокинов ФНО- α и ИЛ-10 клетками крови, 1 мл крови (опытная проба) в среде ДМЕМ инкубировали с референтной концентрацией фенола (0,05 мг/дм³) в течение суток при 37°C.

3. Для определения уровня спонтанной продукции исследуемых цитокинов клетками крови 1 мл крови (контрольная проба) в указанной среде ДМЕМ инкубировали при таких же условиях без добавления фенола.

4. После инкубации образцы указанных проб центрифугировали в течение 3 минут при 1000 об/мин.

5. Полученные супернатанты отбирали для определения уровня цитокинов ФНО- α и ИЛ-10. При этом в супернатанте опытной пробы определяли уровень фенол-индуцированной продукции цитокинов, а именно: уровень ИПЦ_{ИЛ-10} фенол-индуцированной продукции цитокина ИЛ-10 и уровень ИПЦ_{ФНО- α} фенол-индуцированной продукции цитокина - фактора некроза опухолей ФНО- α , а в отобранном супернатанте контрольной пробы определяли уровень спонтанной продукции цитокинов, а именно: уровень СПЦ_{ИЛ-10} спонтанной продукции цитокина ИЛ-10 и уровень СПЦ_{ФНО- α} спонтанной продукции цитокина ФНО- α .

6. Количественное определение исследуемых цитокинов проводили методом твердофазного иммуоферментного анализа на микропланшетном анализаторе «Elx808IU» («Bio-Tek Instruments», США) с использованием иммуоферментных наборов реагентов альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ, интерлейкин-10-ИФА-БЕСТ («Вектор-Бест», Россия).

7. Рассчитывали индекс специфической чувствительности клеток для цитокина ФНО- α (ИСЧ_{ФНО- α}) по отношению разницы уровня фенол-индуцированной и спонтанной продукции цитокина ФНО- α к уровню его спонтанной продукции

8. Рассчитывали индекс специфической чувствительности клеток для цитокина ИЛ-10 (ИСЧ_{ИЛ-10}) по отношению разницы уровня фенол-индуцированной и уровня спонтанной продукции цитокина ИЛ-10 к уровню спонтанной продукции цитокина ИЛ-10.

9. В тех опытах, где индекс ИСЧ_{ФНО- α} был более 10 и одновременно ИСЧ_{ИЛ-10} был более 2, прогнозировали у пациентов нарушение клеточного иммунитета за счет повышенной активности воздействия фенола на продукцию цитокинов клетками крови

иммунной системы. Используя эту информацию, в дальнейшем осуществляли в отношении пациентов дополнительные иммунологические исследования, а также элиминационные и корректирующие иммунитет программы.

В процессе экспериментов было обследовано 30 детей для доказательства 5 правильности выбранных пределов вышеуказанных индексов, для характеристики степени влияния фенола на продукцию цитокинов клетками иммунной системы, за счет чего у пациентов диагностировали отклонения в иммунной регуляции клеточного иммунитета. Из указанных детей 15 чел. проживали на территории, измененной 10 повышенной экспозицией фенолом, а 15 детей - из сельской местности, характеризующейся отсутствием техногенной (антропогенной) экспозиции фенолом.

В качестве группы населения были выбраны здоровые на момент обследования дети в возрасте 3-6 лет, постоянно проживающие на указанной территории. Выбор 15 контингента предусматривал такой возрастной ценз обследуемых, который, с одной стороны, позволял до определенной степени избежать влияния на здоровье вредных привычек (например, курение), с другой стороны, обеспечивал необходимую для 20 корректности исследования зрелость формирующейся иммунной системы. У всех детей была взята венозная кровь, исследование которой проводилось по вышеуказанной схеме.

Данные, полученные в результате исследований, приведены в таблицах 1-4. 20 В таблицах 1 и 3 приведены данные об индексе ИСЧ_{ФНО-α} специфической чувствительности клеток для цитокина ФНО-α и об индексе ИСЧ_{ИЛ-10} специфической чувствительности клеток для цитокина ИЛ-10 соответственно для детей, проживающих на экологически благополучной территории и в крови которых концентрация фенола не превышала региональный фоновый показатель ($<0,05 \pm 0,017$). 25

В таблицах 2 и 4 приведены данные об индексе ИСЧ_{ФНО-α} специфической чувствительности клеток для цитокина ФНО-α и об индексе ИСЧ_{ИЛ-10} специфической чувствительности клеток для цитокина ИЛ-10 соответственно для детей, проживающих на экологически неблагополучной территории и в крови которых концентрация фенола 30 превышала региональный фоновый показатель ($>0,05 \pm 0,017$). Причем приведенные значения индуцированной продукции цитокинов и предлагаемых индексов достоверно отличались от аналогичных данных в группе детей, проживающих на территории без техногенной экспозиции фенолом ($p < 0,05$).

Для обоснования пороговости индекса ИСЧ_{ФНО-α} специфической чувствительности 35 клеток для цитокина ФНО-α и индекса ИСЧ_{ИЛ-10} специфической чувствительности клеток для цитокина ИЛ-10, которые бы характеризовали нарушение клеточного иммунитета, исходили из следующего принципа.

Для обоснования минимальных значений этих индексов использовали среднее число по показателям индексов двух детей из таблиц 1 и 13, в крови которых было установлено 40 максимальное количество фенола (т.е. вредного действующего фактора) по сравнению с другими детьми из группы с содержанием фенола в крови на уровне региональных фоновых значений. Такой подход обусловлен тем, что при этом выбирается для этой группы детей максимально недействующая концентрация фенола, которая может 45 характеризовать границу влияния этого химического фактора на возможный переход от здорового состояния к нарушению клеточного иммунитета у ребенка.

Исходя из приведенных данных было установлено следующее:

- минимальный индекс ИСЧ_{ФНО-α} составляет величину 10 (данные таблицы 1 показывают, что у пациентов №1 и №13 содержание в крови фенола 0,067 и 0,059 мг/

дм соответственно является наиболее высоким по сравнению с другими детьми. Индексы ИСЧ_{ФНО-α} для указанных пациентов составляют величину 12,47 и 8,39 соответственно. Среднее значение индекса ИСЧ_{ФНО-α} равно 10,43. Но принимая во внимание математическую погрешность, минимальное значение ИСЧ_{ФНО-α} выбирается равным 10. То есть при значении ИСЧ_{ФНО-α} более 10 можно говорить о нарушении клеточного иммунитета на ранней стадии);

- минимальный индекс ИСЧ_{ИЛ-10} составляет величину 2 (данные таблицы 3 показывают, что у пациентов №1 и №13 содержание в крови фенола 0,067 и 0,059 мг/дм³ соответственно является наиболее высоким по сравнению с другими детьми. Индексы ИСЧ_{ИЛ-10} для указанных пациентов составляют величину 2,21 и 1,83 соответственно. Среднее значение индекса ИСЧ_{ИЛ-10} равно 2,02. Но, принимая во внимание математическую погрешность, минимальное значение ИСЧ_{ИЛ-10} выбирается равным 2. То есть при значении ИСЧ_{ИЛ-10} более 2 можно говорить о нарушении клеточного иммунитета организма на ранней стадии).

Таким образом, согласно предлагаемому способу, о нарушении клеточного иммунитета можно судить при выполнении одновременного условия: ИСЧ_{ФНО-α} более 10 и ИСЧ_{ИЛ-10} более 2. В таблицах 2 и 4 приведены данные по указанным индексам для детей, которые характеризуются повышенным содержанием фенола в крови. У всех исследованных детей эти индексы достоверно выше указанных пороговых.

Повышенный индекс отношения индуцированной экспрессии цитокинов к спонтанной отражает степень экспозиции (концентрация) митогеном (стимулятором), в качестве которого в нашем случае выступает фенол. Чем выше имеющаяся нагрузка фенола в крови, тем выше определяемый индекс стимуляции продукции цитокинов.

Таким образом, рекомендуемые к определению индексы (их величины) позволяют диагностировать наличие, степень и направленность нарушений здоровья при экспозиции фенола по изменению самой чувствительной из систем - иммунной, и, в свою очередь, по изменению самых чувствительных показателей иммунной системы - продукции цитокинов.

Установленные значения индекса позволят не только определить степень выраженности интоксикации и нарушений клеточного иммунитета, но и вовремя провести лечебные и профилактические мероприятия как на индивидуальном (программа по детоксикации и иммуномодуляции), так и на популяционном уровнях (мероприятия на источниках и реабилитационные мероприятия в организованных и других группах населения).

Реализация способа основана на установленной закономерности - внесение фоновой (региональной) концентрации фенола в клеточную культуру будет индуцировать экспрессию цитокинов тем выраженнее, чем выше начальная концентрация фенола в крови, обусловленная экспозицией в месте проживания, а величина и характер индуцированных изменений будут отражать особенности иммунных нарушений на клеточном уровне.

Для доказательства воздействия фенола на нарушение клеточного иммунитета в таблицах 5-8 приведены данные по содержанию CD4-лимфоцитов, являющихся основными показателями клеточного иммунитета (Т-хелперы). Данные, приведенные в этих таблицах, показывают, что у детей, имеющих высокие уровни контаминации фенола и индексов ИСЧ_{ФНО-α} и ИСЧ_{ИЛ-10} специфической чувствительности (таблицы

6 и 8), наблюдается иммунодефицитное состояние по данному фактору, а достоверно значимый ($p < 0,05$) средний уровень относительного ($37,74 \pm 0,86$ и $36,73 \pm 1,24$) и абсолютного ($1,10 \pm 0,09$ и $1,17 \pm 0,09$) содержания Т-хелперов у них достоверно ниже по сравнению с показателями ($40,73 \pm 0,94$ и $40,73 \pm 0,94$) и ($1,37 \pm 0,05$ и $1,37 \pm 0,05$) детей с содержанием фенола в крови, не превышающим референтную концентрацию (таблицы 5 и 7). А согласно сведениям, приведенным в книге «Иммунология» А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл, 2000, Т-хелперы (CD4-лимфоциты) являются общепринятым показателем клеточного иммунитета, снижение которого свидетельствует о состоянии иммунодефицита.

10 Следует отметить, что показатели по CD4-лимфоцитам (таблицы 5-8) для всех детей не выходят за пределы нормы, т.к. определение нарушения клеточного иммунитета предлагаемым способом проводится на раннем этапе, на котором отсутствуют клинические проявления такого нарушения. Норма - понятие соответствующее здоровому состоянию организма, а показатели вне нормы соответствуют уже состоянию
15 болезни, т.е. должны быть клинические проявления. Имунные нарушения и иммунодефицитные состояния - своеобразная предболезнь. Согласно закону Либиха - есть состояние оптимума, а за его пределами - зоны стресса (показатели выше среднего и ниже среднего), которые ограничены двумя точками - пределами устойчивости, в сумме это и есть норма. Но зоны стресса или компенсации, пусть и входят в диапазон
20 нормы, характеризуются опасностью перехода в разряд болезни или гибели. И поэтому, исходя из этого закона и того, что для обоснования доказательств в науке всегда оценивается разница объекта с воздействием (т.е. группа детей с неблагоприятной в отношении фенола территории) с объектом вне такого воздействия (т.е. группа детей с территории без антропогенного воздействия фенола), было проведено сопоставление
25 достоверно значимых показателей ($p < 0,05$), характеризующих нарушения клеточного иммунитета у детей с экспозицией фенола, с детьми без этой экспозиции.

Для иллюстрации реализации предлагаемого способа приведены два примера по конкретным пациентам одного возраста и пола из группы детей с повышенным содержанием фенола в крови и с содержанием фенола в пределах фоновой концентрации.

30 Пример 1. Девочка, 4 года. Химико-аналитический анализ крови показал увеличение в крови фенола до $0,257 \text{ мг/дм}^3$. Иммунологические показатели в анализе крови имели следующие значения: CD4⁺-лимфоциты - 32%; $1,29 \times 10^9 \text{ дм}^3$ (норма 31-60% и $0,410 - 1,590 \times 10^9 \text{ дм}^3$); CD3⁺-лимфоциты - 69%; $2,78 \times 10^9 \text{ дм}^3$ (норма 55-84% и $0,690 - 2,540 \times 10^9 \text{ дм}^3$);
35); CD3⁺CD8⁺-лимфоциты - 29%; $1,17 \times 10^9 \text{ дм}^3$ (норма 13-41% и $0,190 - 1,140 \times 10^9 \text{ дм}^3$); CD19⁺-лимфоциты - 16%; $0,65 \times 10^9 \text{ дм}^3$ (норма 6-25% и $0,090 - 0,660 \times 10^9 \text{ дм}^3$); CD16⁺-лимфоциты - 7%; $0,28 \times 10^9 \text{ дм}^3$ (норма 5-27% и $0,090 - 0,590 \times 10^9 \text{ дм}^3$); CD3⁺CD95⁺-лимфоциты - 17%;
40 $0,69 \times 10^9 \text{ дм}^3$; CD3⁺CD25⁺-лимфоциты - 4%; $0,16 \times 10^9 \text{ дм}^3$; IgG - $11,04 \text{ г/дм}^3$ (норма 9,26-10,00 г/дм³); IgA - $0,90 \text{ г/дм}^3$ (норма 0,98-1,12 г/дм³); IgM - $1,09 \text{ г/дм}^3$ (норма 1,32-1,56 г/дм³). Установленные индексы ИСЧ_{ФНО-α} и ИСЧ_{ИЛ-10} специфической чувствительности были равны: ИСЧ_{ФНО-α}=94,92; ИСЧ_{ИЛ-10}=74,14. Анализируя представленные данные,
45 необходимо отметить что представленный ребенок относился к группе длительно и часто болеющих детей (ОРЗ 3 раза в год, бронхопневмония в анамнезе), из чего можно сделать вывод, что у пациента имеются изменения в иммунной системе, в частности, иммунодефицитное состояние. Такой вывод подкрепляется тем, что наблюдается

дефицит иммуноцитов с фенотипом хелперов (CD4⁺ лимфоциты), функцией которых является продукция цитокинов, то есть участие в иммунной регуляции, а также активация факторов, повышение которых носит компенсаторный характер, не восполняющий дефекты иммунорегуляции (например, иммуноглобулины - IgG, IgM, IgA).

5 Пример 2. Девочка, 5 лет. В химико-аналитическом анализе крови показатель по фенолу ниже фоновых значений: 0,013 мг/дм³. В иммунологическом анализе значения показателей были следующими: CD4⁺-лимфоциты - 45%; 1,09×10⁹/дм³ (норма 31-60% и 0,410-1,590×10⁹/дм³); CD3⁺-лимфоциты - 77%; 1,87×10⁹/дм³ (норма 55-84% и 0,690-10 2,540×10⁹/дм³); CD3⁺CD8⁺-лимфоциты - 27%; 0,66×10⁹/дм³ (норма 13-41% и 0,190-1,140×10⁹/дм³); CD19⁺-лимфоциты - 14%; 0,34×10⁹/дм³ (норма 6-25% и 0,090-0,660×10⁹ /дм³); CD16⁺56⁺-лимфоциты - 5%; 0,12×10⁹/дм³ (норма 5-27% и 0,090-0,590×10⁹/дм³); 15 CD3⁺CD95⁺-лимфоциты - 26%; 0,63×10⁹/дм³; CD3⁺CD25⁺-лимфоциты - 6%; 0,15×10⁹/дм³; IgG - 10,29 г/дм³ (норма 9,26-10,00 г/дм³); IgA - 0,92 г/дм³ (норма 0,98-1,12 г/дм³); IgM - 0,87 г/дм³ (норма 1,32-1,56 г/дм³). Установленные индексы ИСЧ_{ФНО-α} и ИСЧ_{ИЛ-10} специфической чувствительности были равны: ИСЧ_{ФНО-α}=7,34; ИСЧ_{ИЛ-10}=1,30.

20 Анализируя представленные данные, необходимо отметить, что ребенок относится к 1 группе здоровья и за последний год не обращался к врачу по поводу острых заболеваний. Иммунологические показатели соответствуют возрастному диапазону нормы. Нарушение клеточного иммунитета отсутствует.

25 Таким образом, приведенные данные показывают, что при реализации предлагаемого способа обеспечивается его назначение.

30

35

40

45

Таблица 1

Характеристика спонтанной и фенол-индуцированной продукции ФНО- α у детей с уровнем содержания фенола в крови, не превышающим региональный фоновый ($0,05 \pm 0,017$ мг/дм³)

Пациент	Уровень спонтанной продукции ФНО- α (СПЦ _{ФНО-α}), пг/мл	Уровень фенол-индуцированной продукции ФНО- α (ИПЦ _{ФНО-α}), пг/мл	Содержание фенола в крови пациентов, мг/дм ³	Индекс ИСЧ _{ФНО-α} специфической чувствительности клеток для цитокина ФНО- α =(ИПЦ _{ФНО-α} : СПЦ _{ФНО-α})
1. Пациент, 5 лет	4,21	56,7	0,067	12,47
2. Пациент, 4 года	3,84	31,1	0,055	7,10
3. Пациент, 5 лет	2,93	23,8	0,044	7,12
4. Пациент, 5 лет	9,88	40,2	0,057	3,07
5. Пациент, 5 лет	6,77	45,8	0,031	5,77
6. Пациент, 6 лет	6,44	32,9	0,01	1,00
7. Пациент, 5 лет	6,04	31,1	0,01	4,15
8. Пациент, 5 лет	5	41,7	0,013	7,34
9. Пациент, 5 лет	8,41	50	0,052	4,95
10. Пациент, 6 лет	3,84	25,6	0,01	5,67
11. Пациент, 5 лет	4,62	29,30	0,041	1,32
12. Пациент, 5 лет	6,59	41,7	0,01	5,33
13. Пациент, 5 лет	3,11	29,2	0,059	8,39
14. Пациент, 6 лет	4,57	27,4	0,042	5,00
15. Пациент, 5 лет	4,57	23,8	0,044	4,21
	4,59 \pm 0,99	35,35 \pm 2,61	0,036 \pm 0,005	5,53 \pm 0,73

Таблица 2

Характеристика спонтанной и фенол-индуцированной продукции ФНО- α у детей с уровнем содержания фенола в крови, превышающим региональный фоновый ($0,05 \pm 0,017$ мг/дм³)

Пациент	Уровень спонтанной продукции ФНО- α (СПЦ _{ФНО-α}), пг/мл	Уровень фенол-индуцированной продукции ФНО- α (ИПЦ _{ФНО-α}), пг/мл	Содержание фенола в крови пациентов, мг/дм ³	Индекс ИСЧ _{ФНО-α} специфической чувствительности клеток для цитокина ФНО- α =(ИПЦ _{ФНО-α} : СПЦ _{ФНО-α})
1. Пациент, 4 года	6,04	206,9	0,242	33,25
2. Пациент, 3 года	3,76	201,9	0,323	52,70
3. Пациент, 4 года	5,98	573,6	0,257	94,92
4. Пациент, 4 года	6,41	247	0,293	37,53
5. Пациент, 3 года	4,06	351,7	0,26	85,63
6. Пациент, 5 лет	3,65	337,9	0,174	91,58
7. Пациент, 5 лет	3,24	322,9	0,463	98,66
8. Пациент, 4 года	3,29	298,4	0,492	89,70
9. Пациент, 5 лет	2,59	297,8	0,492	113,98
10. Пациент, 5 лет	1,59	91,5	0,273	56,55
11. Пациент, 5 лет	2,29	154,9	0,199	66,64
12. Пациент, 5 лет	2	142,5	0,195	70,25
13. Пациент, 5 лет	1,18	122	0,492	102,39
14. Пациент, 5 лет	4	364,9	0,411	90,23
15. Пациент, 5 лет	4,47	285,9	0,313	62,96
	3,64 \pm 0,41	266,65 \pm 31,57*	0,33 \pm 0,03*	76,46 \pm 6,27*

* значения индуцированной продукции цитокинов и предлагаемых индексов достоверно отличались от аналогичных данных в группе детей, проживающих на территории без техногенной экспозиции фенолом ($p < 0,05$).

Таблица 3

Характеристика спонтанной и фенол-индуцированной продукции ИЛ-10 у детей с уровнем содержания фенола в крови, не превышающим региональный фоновый ($0,05 \pm 0,017$ мг/дм³)

Пациент	Уровень спонтанной продукции ИЛ-10, (СПЦ _{ИЛ-10}), пг/мл	Уровень фенол-индуцированной продукции ИЛ-10, (ИПЦ _{ИЛ-10}), пг/мл	Содержание фенола в крови пациентов, мг/дм ³	Индекс ИСЧ _{ИЛ-10} специфической чувствительности клеток для цитокина ИЛ-10=(ИПЦ _{ИЛ-10} -СПЦ _{ИЛ-10}): СПЦ _{ИЛ-10}
1. Пациент, 5 лет	1,85	5,94	0,067	2,21
2. Пациент, 4 года	2,06	4,66	0,055	1,26
3. Пациент, 5 лет	1,79	4,96	0,044	1,77
4. Пациент, 5 лет	2,36	5,16	0,057	1,19
5. Пациент, 5 лет	1,73	4,12	0,031	1,38
6. Пациент, 6 лет	2,91	5,76	0,01	0,98
7. Пациент, 5 лет	2,97	6,9	0,01	1,32
8. Пациент, 5 лет	2	4,6	0,013	1,30
9. Пациент, 5 лет	1,73	4,6	0,052	1,66
10. Пациент, 6 лет	2,15	5,58	0,01	1,60
11. Пациент, 5 лет	3,03	4,72	0,041	0,56
12. Пациент, 5 лет	2,58	4,66	0,01	0,81
13. Пациент, 5 лет	2	4,54	0,059	1,83
14. Пациент, 6 лет	1,67	4,72	0,042	1,27
15. Пациент, 5 лет	2,12	5,52	0,044	1,60
	2,20±0,12	5,10±0,19	0,036±0,005	1,38±0,11

Таблица 4.

Характеристика спонтанной и фенол-индуцированной продукции ИЛ-10 у детей с уровнем содержания фенола в крови, превышающим региональный фоновый ($0,05 \pm 0,017$ мг/дм³)

Пациент	Уровень спонтанной продукции ИЛ-10 (СПЦ _{ИЛ-10}), пг/мл	Уровень фенол-индуцированной продукции ИЛ-10, (ИПЦ _{ИЛ-10}), пг/мл	Содержание фенола в крови пациентов, мг/дм ³	Индекс ИСЧ _{ИЛ-10} специфической чувствительности клеток для цитокина ИЛ-10=(ИПЦ _{ИЛ-10} -СПЦ _{ИЛ-10}): СПЦ _{ИЛ-10}
1. Пациент, 4 года	2,63	75,4	0,242	27,67
2. Пациент, 3 года	1,48	10,94	0,323	6,39
3. Пациент, 4 года	3,29	247,2	0,257	74,14
4. Пациент, 4 года	3,53	159,92	0,151	44,30
5. Пациент, 3 года	3,71	267,04	0,26	70,98
6. Пациент, 5 лет	1,49	383,3	0,19	256,25
7. Пациент, 5 лет	4,61	133,74	0,174	28,01
8. Пациент, 4 года	1,8	12,78	0,463	6,10
9. Пациент, 5 лет	2,97	96,74	1,241	31,57
10. Пациент, 5 лет	1,51	166,12	0,492	109,01
11. Пациент, 5 лет	1,52	11,12	0,492	6,32
12. Пациент, 5 лет	2,6	136,22	0,212	51,39
13. Пациент, 5 лет	4,55	286,92	0,168	62,06
14. Пациент, 5 лет	3,82	214,94	0,411	55,27
15. Пациент, 5 лет	3,4	280,04	0,313	81,36
	2,86±0,29	165,49±29,32*	0,359±0,070*	60,72±15,97*

* значения индуцированной продукции цитокинов и предлагаемых индексов достоверно отличались от аналогичных данных в группе детей, проживающих на территории без техногенной экспозиции фенолом ($p < 0,05$).

Таблица 5.

Данные по содержанию CD4-лимфоцитов у детей с уровнем содержания фенола в крови, не превышающим региональный фоновый (0,05±0,017 мг/дм³)

Пациент	Уровень спонтанной продукции ФНО-α, пг/мл	Уровень фенол-индуцированной продукции ФНО-α, пг/мл	Содержание фенола в крови пациентов, мг/дм ³	Индекс ИСЧ _{ФНО-α} специфической чувствительности клеток для цитокина ФНО-α	CD4 ⁺ , % (Норма: 31-60)	CD4 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³ (Норма: 0,410-1,590)
1	2	3	4	5	6	7
Пациент, 5 лет	4,21	56,7	0,067	12,47	42	1,61
Пациент, 4 года	3,84	31,1	0,055	7,10	42	1,62
Пациент, 5 лет	2,93	23,8	0,044	7,12	42	1,39
Пациент, 5 лет	9,88	40,2	0,057	3,07	41	1,14
Пациент, 5 лет	6,77	45,8	0,031	5,77	36	1,22
Пациент, 6 лет	16,44	32,9	0,01	1,00	38	1,36
Пациент, 5 лет	6,04	31,1	0,01	4,15	44	1,46
Пациент, 5 лет	5	41,7	0,013	7,34	45	1,09
Пациент, 5 лет	8,41	50	0,052	4,95	47	1,52
Пациент, 6 лет	3,84	25,6	0,01	5,67	42	1,42
Пациент, 5 лет	6,59	41,7	0,01	5,33	41	1,39
Пациент, 5 лет	3,11	29,2	0,059	8,39	39	1,05
Пациент, 6 лет	4,57	27,4	0,042	5,00	39	1,52
Пациент, 5 лет	4,57	23,8	0,044	4,21	41	1,56
	6,59±0,99	35,35±2,61	0,036±0,005	5,53±0,73	40,73±0,94	1,37±0,05

Таблица 6.

Данные по содержанию CD4-лимфоцитов у детей с уровнем содержания фенола в крови, превышающим региональный фоновый (0,05±0,017 мг/дм³)

Пациент	Уровень спонтанной продукции ФНО-α, пг/мл	Уровень фенол-индуцированной продукции ФНО-α, пг/мл	Содержание фенола в крови пациентов, мг/дм ³	Индекс ИСЧ _{ФНО-α} специфической чувствительности клеток для цитокина ФНО-α	CD4 ⁺ , % (Норма: 31-60)	CD4 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³ (Норма: 0,410-1,590)
1	2	3	4	5	6	7
Пациент, 4 года	6,04	206,9	0,242	33,25	37	1,11
Пациент, 3 года	3,76	201,9	0,323	52,70	35	1,22
Пациент, 4 года	5,98	573,6	0,257	94,92	32	1,29
Пациент, 4 года	6,41	247	0,293	37,53	39	1,17
Пациент, 3 года	4,06	351,7	0,26	85,63	37	1,29
Пациент, 5 лет	3,65	337,9	0,174	91,58	31	0,88
Пациент, 5 лет	3,24	322,9	0,463	98,66	36	0,70
Пациент, 4 года	3,29	298,4	0,492	89,70	39	1,11
Пациент, 5 лет	2,29	154,9	0,199	66,64	35	0,48
Пациент, 5 лет	2	142,5	0,195	70,25	34	0,90
Пациент, 5 лет	1,18	122	0,492	102,39	38	1,29
Пациент, 5 лет	4	364,9	0,411	90,23	34	0,82
	3,64±0,41	266,65±31,57	0,33±0,03	76,46±6,27	37,74±10,86*	1,10±0,09*

Примечание. * - разница достоверна по сравнению с группой детей с допустимым уровнем фенола в крови (p<0,05)

Таблица 7

Данные по содержанию CD4-лимфоцитов у детей с уровнем содержания фенола в крови, не превышающим региональный фоновый (0,05±0,017 мг/дм³)

Пациент	Уровень спонтанной продукции ИЛ-10, пг/мл	Уровень фенол-индуцированной продукции ИЛ-10, пг/мл	Содержание фенола в крови пациентов, мг/дм ³	Индекс ИСЧ _{ИЛ-10} специфической чувствительности клеток для цитокина ИЛ-10	CD4 ⁺ , % (Норма: 31-60)	CD4 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³ (Норма: 0,410-1,590)
1	2	3	4	5	6	7
Пациент, 5 лет	1,85	5,94	0,067	2,21	42	1,61
Пациент, 4 года	2,06	4,66	0,055	1,26	42	1,62
Пациент, 5 лет	1,79	4,96	0,044	1,77	42	1,39
Пациент, 5 лет	2,36	5,16	0,057	1,19	41	1,14
Пациент, 5 лет	1,73	4,12	0,031	1,38	36	1,22
Пациент, 6 лет	2,91	5,76	0,01	0,98	38	1,36
Пациент, 5 лет	2,97	6,9	0,01	1,32	44	1,46
Пациент, 5 лет	2	4,6	0,013	1,30	45	1,09
Пациент, 5 лет	1,73	4,6	0,052	1,66	47	1,52
Пациент, 6 лет	2,15	5,58	0,01	1,60	42	1,42
Пациент, 5 лет	2,58	4,66	0,01	0,81	41	1,39
Пациент, 5 лет	2	4,54	0,059	1,27	39	1,05
Пациент, 6 лет	1,67	4,72	0,042	1,83	39	1,52
Пациент, 5 лет	2,12	5,52	0,044	1,60	41	1,56
	2,20±0,12	5,10±0,19	0,036±0,005	1,38±0,11	40,73±0,94	1,37±0,05

Таблица 8

Данные по содержанию CD4-лимфоцитов у детей с уровнем содержания фенола в крови, превышающим региональный фоновый (0,05±0,017 мг/дм³)

Пациент	Уровень спонтанной продукции ИЛ-10, пг/мл	Уровень фенол-индуцированной продукции ИЛ-10, пг/мл	Содержание фенола в крови пациентов, мг/дм ³	Индекс ИСЧ _{ИЛ-10} специфической чувствительности клеток для цитокина ИЛ-10	CD4 ⁺ , % (Норма: 31-60)	CD4 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³ (Норма: 0,410-1,590)
1	2	3	4	5	6	7
Пациент, 4 года	2,63	75,4	0,242	27,67	37	1,11
Пациент, 3 года	1,48	10,94	0,323	6,39	35	1,22
Пациент, 4 года	3,29	247,2	0,257	74,14	32	1,29
Пациент, 3 года	3,71	267,04	0,26	70,98	37	1,29
Пациент, 4 года	1,49	383,3	0,19	256,25	31	1,10
Пациент, 5 лет	4,61	133,74	0,174	28,01	31	0,88
Пациент, 5 лет	1,8	12,78	0,463	6,10	36	0,70
Пациент, 4 года	1,51	166,12	0,492	109,01	39	1,11
Пациент, 5 лет	1,52	11,12	0,492	6,32	41	1,66
Пациент, 5 лет	2,6	136,22	0,212	51,39	38	0,72
Пациент, 5 лет	4,55	286,92	0,168	62,06	30	0,80
Пациент, 5 лет	3,82	214,94	0,411	55,27	34	0,82
Пациент, 5 лет	3,4	280,04	0,313	81,36	40	1,73
	2,86±0,29	165,49±29,32	0,359±0,070	60,72±15,97	36,73±1,24*	1,17±0,09*

Примечание. * - разница достоверна по сравнению с группой детей с допустимым уровнем фенола в крови (p<0,05)

Формула изобретения

1. Способ оценки нарушений клеточного иммунитета при воздействии фенола, включающий отбор пробы крови, ее исследование с использованием опытного и контрольного образцов с предварительным введением в опытный образец токсиканта - фенола в концентрации, соответствующей его региональному фоновому уровню, и установление критериальных показателей, по которым судят о нарушении клеточного иммунитета, отличающийся тем, что в качестве метода исследования используют тесты *ex vivo* влияния токсиканта на продукцию цитокинов клетками иммунной системы, а в качестве критериальных показателей используют индекс специфической чувствительности клеток для цитокина фактора некроза опухолей ФНО- α и индекс специфической чувствительности клеток для цитокина Интерлейкина-10 ИЛ-10, которые определяют следующим образом: опытную и контрольную пробу крови вносят во флакон со стерильной питательной средой ДМЕМ с гепарином и гентамицином в объемном соотношении 1:4 соответственно, осуществляют при 37°C в течение суток инкубацию этих проб, а затем центрифугирование в течение 3 минут при 1000 об/мин и в отобранном супернатанте опытной пробы определяют уровень фенол-индуцированной продукции цитокинов, а именно уровень ИПЦ_{ИЛ-10} фенол-индуцированной продукции цитокина ИЛ-10 и уровень ИПЦ_{ФНО- α} фенол-индуцированной продукции цитокина - фактора некроза опухолей ФНО- α , а в отобранном супернатанте контрольной пробы определяют уровень спонтанной продукции цитокинов, а именно уровень СПЦ_{ИЛ-10} спонтанной продукции цитокина ИЛ-10 и уровень СПЦ_{ФНО- α} спонтанной продукции цитокина ФНО- α , далее рассчитывают индекс ИСЧ_{ФНО- α} специфической чувствительности клеток для цитокина ФНО- α , а также рассчитывают индекс ИСЧ_{ИЛ-10} специфической чувствительности клеток для цитокина ИЛ-10 по следующим формулам:

$$\text{ИСЧ}_{\text{ФНО-}\alpha} = (\text{ИПЦ}_{\text{ФНО-}\alpha} - \text{СПЦ}_{\text{ФНО-}\alpha}) : \text{СПЦ}_{\text{ФНО-}\alpha},$$

$$\text{ИСЧ}_{\text{ИЛ-10}} = (\text{ИПЦ}_{\text{ИЛ-10}} - \text{СПЦ}_{\text{ИЛ-10}}) : \text{СПЦ}_{\text{ИЛ-10}},$$

где

ИПЦ_{ИЛ-10} - уровень фенол-индуцированной продукции цитокина ИЛ-10;

ИПЦ_{ФНО- α} - уровень фенол-индуцированной продукции цитокина ФНО- α ;

СПЦ_{ИЛ-10} - уровень спонтанной продукции цитокина ИЛ-10;

СПЦ_{ФНО- α} - уровень спонтанной продукции цитокина ФНО- α ;

и при выполнении одновременного условия ИСЧ_{ФНО- α} более 10 и ИСЧ_{ИЛ-10} более 2 судят о нарушении клеточного иммунитета организма под воздействием фенола.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что содержание в стерильной питательной среде ДМЕМ гепарина составляет 2,5 Ед/мл и гентамицина - 100 мкг/мл.