

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России)



МЕТОДЫ КОМПЛЕКСНОЙ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ

**Методические рекомендации
для иммунологов-аллергологов, врачей и биологов клинической
лабораторной диагностики**

Краснодар, 2017

УДК 616.155.34+612.112.91.017.1]-078.33(07.5.9)

ББК 28.707.4

М54

Составители ÷ авторы:

И.В.Нестерова – д.м.н, профессор, профессор кафедры аллергологии и иммунологии ФПК МР МИ РУДН Минобрнауки РФ; главный научный сотрудник ЦНИЛ ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России;

Г.А.Чудилова – к.б.н., доцент, доцент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС, зав. отделом ЦНИЛ ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России;

С.В.Ковалева – к.м.н., ассистент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС, снс ЦНИЛ ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России;

Л.В.Ломтатидзе – к.б.н., ассистент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС, снс ЦНИЛ ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России;

Н.В.Колесникова – д.б.н., профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС, зав.ЦНИЛ ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России;

А.А.Евглевский – к.м.н., доцент, доцент кафедры гистологии с эмбриологией, снс ЦНИЛ ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

Нормативно-правовую базу методических рекомендаций составляют: ФГОС ВО по специальности 31.08.05 «Клиническая лабораторная диагностика», Федеральный закон от 29.12.2012 г. №273-ФЗ «Об образовании в Российской Федерации»; Приказ МЗ России от 25.12.1997 года №380 "О состоянии и мерах по совершенствованию лабораторного обеспечения диагностики и лечения пациентов в учреждениях здравоохранения РФ», Приказ МЗ РФ от 08 октября 2015 г. №707н «Об утверждении квалификационных требований к медицинским и фармацевтическим работникам с высшим образованием по направлению подготовки «здравоохранение и медицинские науки»; Приказ от 21.02.2000 г. №64 «Об утверждении номенклатуры клинических лабораторных исследований».

Предлагаемые методические рекомендации базируются на большом фактическом материале и являются обобщением опыта научных исследований нейтрофильных гранулоцитов в Центральной научно-исследовательской лаборатории и кафедре клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

Методические рекомендации предназначены для иммунологов-аллергологов, слушателей циклов повышения квалификации по специальностям «Аллергология и иммунология», «Клиническая лабораторная диагностика», клинических ординаторов, аспирантов, а так же могут быть использованы в научной и практической деятельности врачей различных специальностей.

Рецензенты:

Профессор кафедры аллергологии и иммунологии ФПК МР ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Минобрнауки РФ, заведующая лабораторией патогенеза и методов лечения инфекционных заболеваний НИМСИ Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова, доктор медицинских наук,

И.П. Балмасова

Заведующий кафедрой общей и клинической патофизиологии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, профессор, доктор медицинских наук **А.Х. Каде**

Рекомендовано к изданию ЦМС ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, протокол № ___ от _____ 2017 г.

© Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

© Кафедра кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС

© Центральная научно-исследовательская лаборатория

Введение	6
Раздел I. ОЦЕНКА ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ	7
1.1. Реакция бактериального фагоцитоза нейтрофилов с определением степени завершенности (И. В. Нестерова, 1988).....	7
1.2. Определение фагоцитарной активности НГ с использованием зимозана (Нестерова И.В. и соавт., 1996, модификация).....	9
1.3. Определение фагоцитарной активности лейкоцитов периферической крови методом проточной цитофлуориметрии (набор <i>Phagotest</i> ®).....	9
1.4. Определение фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов периферической крови методом проточной цитофлуориметрии (Мазуров Д.В., Пинегин Б.В., 2000).	10
Раздел II. ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ.....	12
2.1. Определение активности щелочной фосфатазы нейтрофилов по М. Г. Шубичу (1965)..	13
2.2. Определение активности кислой фосфатазы лейкоцитов (Шубич М.Г., Нестерова И. В., 1980).	14
2.3. Определение катионных белков.....	15
2.3.1. Определение катионных белков (по Пигаревскому в модификации Нестеровой И.В., 1992).	15
2.3.2. Способ определения функционального потенциала нейтрофильных гранулоцитов по реализации неферментных катионных белков (И. В. Нестерова, М. А. Светличная, изобретение по заявке 4290225/28-14, 1987г.)	16
2.4. Определение активности миелопероксидазы нейтрофильных гранулоцитов по Sato (1928).	17
2.4.1. Способ определения функционального резерва нейтрофильных гранулоцитов по уровню расходования миелопероксидазы (Нестерова И.В., Фомичева Е.В., 2000).	18
2.5. Определение активности хлорацетат-AS-D-эстеразы в нейтрофильных гранулоцитах в модификации Нестеровой И.В. 1983.....	19
2.5.1. Способ определения функционального потенциала нейтрофилов по расходованию хлорацетат-AS-D-эстеразы. (Нестерова И.В., Чудилова Г.А., патент РФ 2082972 от 26.06.1997).....	20
2.6. Оценка оксидазных микробицидных систем нейтрофильных гранулоцитов в спонтанном и стимулированном NBT – тесте (Нестерова И.В., 1980).....	21
2.6.1. Оценка оксидазных микробицидных систем нейтрофильных гранулоцитов в спонтанном и стимулированном зимозаном NBT-тесте (модификация Нестеровой И.В. и соавт., 1996).....	24
2.7. Методика определения активационного потенциала нейтрофильных гранулоцитов по топологическим свойствам хроматина их ядер (Евглевский А.А., 2000).....	24
2.7.1. Метод определения индуцированной реструктуризации ядерного хроматина (Нестерова И.В., Фомичева Е.В., 2002).	26
2.8. Методика выявления и оценки нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей (NET) в гнойном отделяемом и различных экссудатах (Евглевский А.А., 2017).	27
Раздел III. ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ.....	29
3.1. Определение популяционного состава нейтрофильных гранулоцитов.	29
3.1.1. Определение фенотипа нейтрофильных гранулоцитов по одному маркеру.....	29
3.3.2. Фенотипирование нейтрофильных гранулоцитов с помощью мультипараметрического (многоцветного) анализа поверхностных CD маркеров.....	30

3.3.3.Определение экспрессии TLR9 нейтрофильными гранулоцитами и моноцитами с помощью проточной цитометрии	32
Раздел IV. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ IL8 И IL1β МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ (ПЦР-РВ).	34
4.1.ЭтапыпроведенияПЦР-РВ.	34
4.1.1.Выделение чистой взвеси нейтрофилов на градиенте плотности (Нестерова И.В. и соавт., 1996) и индукция экспрессии генов цитокинов.	34
4.1.2.Выделение РНК из НГ периферической крови.	34
4.1.3.Проведение реакции обратной транскрипции.	34
4.1.4.Проведение ПЦР-РВ.	35
4.1.5.Анализ полученных данных.....	35
4.1.6.Оценка полученных результатов	36
Раздел V. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОКИНПРОДУЦИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ НА ПРИМЕРЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ IL-8... ..	37
5.1. Выделение чистой взвеси нейтрофилов	37
5.1.1. Определение жизнеспособности клеток (Кондратьева И. А., Самуилова В.Д., 2001) ..	37
5.2. Культивирование нейтрофилов (модификация Кондратьевой И. А., Самуиловой В.Д., 2001)	38
5.3. Иммуноферментный анализ определения IL-8.	38
Раздел VI. КОНТРОЛЬНЫЕ ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ И СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ	39
6.1.Тестовый контроль	39
6.2.Ситуационные задачи (обучающие)	42
6.3. Ситуационные задачи для самостоятельного решения.....	43
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	44
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	45
Основная литература.....	45
Дополнительная литература.....	45
Список литературы, использованной авторами-составителями	46
Научные публикации, в которых использованы предложенные методы диагностики системы нейтрофильных гранулоцитов.....	47

Предисловие

Цель данных методических разработок состоит в помощи по лабораторной диагностике и интерпретации результатов исследований функционирования нейтрофильных гранулоцитов, по выполнению научно-исследовательской и клинической работы.

Методические рекомендации включают: 5 разделов с подробным описанием методов комплексной оценки системы нейтрофильных гранулоцитов, иллюстрированных микрофотографиями цитохимических реакций, гистограммами (классические методы, методы, разработанные и модифицированные авторами, нагрузочные тесты «in vitro»), один раздел с контрольными тестовыми и ситуационными задачами, списком рекомендуемой и используемой литературы.

Методические рекомендации предназначены для иммунологов-аллергологов, слушателей циклов повышения квалификации по специальностям «Аллергология и иммунология», «Клиническая лабораторная диагностика», клинических ординаторов, аспирантов, студентов, а также могут быть использованы в научной и практической деятельности врачей различных специальностей.

Введение

В течение последних 20 лет значительно расширены представления о роли нейтрофильных гранулоцитов (НГ) в реализации врожденного и адаптивного иммунитета. В связи с этим является неоспоримо актуальным комплексное изучение функционирования НГ в условиях нормы и патологии.

Ранее полагали, что НГ, являясь клетками врожденной иммунной системы способны лишь к уничтожению бактерий, вирусов, грибов посредством реализации своей фагоцитарной функции. В настоящее время убедительно показано, что эти клетки способны к синтезу белков *de novo*, т.е. обладают белоксинтетической функцией, секретируют большое количество гранулярных ферментных и неферментных белков, обладающих антибактериальными и регуляторными свойствами, цитокинов, хемокинов, регуляторных молекул, ростовых факторов и др. На поверхностную мембрану НГ экспрессируется сотни различных молекул – рецепторов, обеспечивающих их связь с микроокружением и другими клетками иммунной системы.

НГ пластичны и способны, в зависимости от условий, менять свой фенотип и приобретать новые функции. В борьбе с патогенами НГ проявляют не только внутриклеточную фагоцитарную активность, но и уничтожают их при помощи формирования нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей/ловушек (NET), выброса экстрацеллюлярных везикул (ЭВ). НГ способны регулировать функции клеток, как врожденной, так и адаптивной иммунной системы, оказывая на них в зависимости от условий, как активирующие, так и супрессирующие влияния. НГ участвуют в иммунопатогенезе многих инфекционно-воспалительных, аллергических, аутоиммунных, неопластических заболеваний. С одной стороны с дефицитом количества НГ и нарушением их функций ассоциированы упорно-рецидивирующие гнойно-воспалительные процессы, нейтропеническая форма сепсиса, генерализованный кандидоз и т.д., с другой стороны при гиперактивации НГ возникают повреждения клеток и тканей при таких аутоиммунных процессах как СКВ, болезнь Крона, сахарный диабет 1 типа, васкулиты, антифосфолипидный синдром и т.д. Современная тактика лечебно - профилактических мероприятий базируется на основании анализа комплекса показателей, отражающих состояние целого организма и отдельных его систем. Поэтому важно проведение полноценной диагностики количественных и функциональных нарушений НГ – являющихся зеркалом гомеостаза, для проведения корректной иммунотерапии на современном этапе.

В настоящих методических рекомендациях приведен комплекс наиболее информативных и доступных методов, позволяющих оценить функционирование и резервные возможности НГ. При этом использованы как традиционные, ставшие уже классическими методы, так и методы, модифицированные и разработанные в ЦНИЛ и на кафедре клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России

Раздел I. ОЦЕНКА ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ

Фагоцитоз является одной из важнейших реакций, обеспечивающих естественную резистентность организма. Это многостадийный процесс, включающий в себя хемотаксис, захват объекта с последующим образованием фагосомы, слияние фагосомы и лизосомы с образованием фаголизосомы и протеолитическую деградацию поглощенного объекта. Нарушения на различных этапах фагоцитоза приводят к развитию многочисленных патологических состояний. При иммунокоррекции заболеваний, связанных с фагоцитарной недостаточностью, используются различные иммуномодуляторы: цитокины (IL-2, GM-CSF и IFN), растительные экстракты, препараты, полученные из бактерий и другие.

Таким образом, определение фагоцитарной активности лейкоцитов периферической крови является важным диагностическим критерием, а также может использоваться для оценки иммунокорректирующего действия лекарств (*ex vivo*) и разработки скрининговых тест-систем для создания новых иммуномодулирующих препаратов (*in vitro*).

1.1. Реакция бактериального фагоцитоза нейтрофилов с определением степени завершенности (И. В. Нестерова, 1988).

1. На середину хорошо обезжиренного стекла помещают 10 мкл гепарина (в разведении 2 ЕД в 0,1 мл физиологического р-ра) и 20 мкл крови (гепаринизация крови).
2. Добавляют 10 мкл мясопептного бульона (МПБ).
3. Добавляют 10 мкл микробной взвеси лабораторного штамма *Staphylococcus aureus* (лабораторный штамм №209 на физиологическом растворе в концентрации 1×10^6 клеток/мл).
4. Круговыми движениями стекла перемешивают компоненты.
5. Инкубируют в термостате во влажной камере 120 мин., при 37°C.
6. Излишек крови осторожно удаляется при наклоне предметного стекла под углом 45°, и на предметном стекле остается лейкоконцентрат, ограниченный хорошо видимыми контурами капли.
7. Высушенные при комнатной температуре мазки фиксируют в метаноле в течение 5 мин.
8. Окрашивают по Романовскому в течение 3-4 мин.
9. Промывают в дистиллированной воде, высушивают, микроскопируют в световом микроскопе при увеличении 10x90, иммерсионный объектив. При этом оценивают поглотительную способность и переваривающую функцию фагоцитов.

ОЦЕНКА ПОГЛОТИТЕЛЬНОЙ СПОСОБНОСТИ И ПЕРЕВАРИВАЮЩЕЙ ФУНКЦИИ ФАГОЦИТОВ



Для оценки поглотительной способности и переваривающей функции фагоцитов подсчитывается 100 нейтрофилов в мазке. В каждом НГ определяется: есть или нет внутриклеточно расположенные бактерии (M), количество живых бактерий ($M_{\text{жив}}$), количество убитых и разрушенных бактерий ($M_{\text{уб}}$):

$$M = M_{\text{уб}} + M_{\text{жив}}$$

«Активный» нейтрофил – нейтрофил, поглотивший микробы (ΦA).

Поглотительную функцию оценивают по показателям:

- **процент фагоцитоза (% $\Phi A H$)** – процент НГ, поглотивших микробы (ΦA), из общего числа посчитанных нейтрофилов:

$$\% \Phi A H = \frac{\Phi A}{100}$$

- **фагоцитарное число ($\Phi Ч$)** – среднее число фагоцитированных микробов (M), приходящееся на 1 «активный» НГ (ΦA):

$$\Phi Ч = \frac{M}{\Phi A}$$

- **фагоцитарный интегральный индекс ($\Phi И$)** – среднее число фагоцитированных микробов, деленное на Φ , где Φ – 100 посчитанных НГ:

$$\Phi И = \frac{M}{\Phi}$$

Завершенность фагоцитарного акта оценивают по показателям:

- **процент переваривания (% Π)** – отношение числа убитых бактерий ($M_{\text{уб}}$) к общему числу фагоцитированных бактерий (M):

$$\% \Pi = \frac{M_{\text{уб}} * 100}{M}$$

- **индекс переваривания ($\И П$)** – среднее число убитых бактерий ($M_{\text{уб}}$) на 1 посчитанный НГ, т.е. на $\Phi=100$:

$$\И П = \frac{M_{\text{уб}}}{\Phi}$$

- **интегральный показатель переваривающей активности ($\И П П А$)** – позволяет оценить фагоцитарную активность НГ в абсолютных значениях, где $\Phi A H$ (абс.) – фагоцитарная активность *абсолютного количества НГ*:

$$\И П П А = \frac{\Phi A H \text{ (абс.)} * \% \Pi}{1000}$$

Примечание:

$\text{ФАН (абс.)} = \frac{\% \text{ФАН} * \text{НГ(абс.)}}{100}$, $\text{НГ(абс.)} = \frac{\% \text{НГ} * L}{100}$, где L – лейкоцитоз, %НГ – относительное количество НГ (морф.).

1.2. Определение фагоцитарной активности НГ с использованием зимозана (Нестерова И.В. и соавт., 1996, модификация).

1. На середину хорошо обезжиренного предметного стекланыосят 50 мкл гепарина (в разведении 2 ЕД в 0,1 мл физиологического р-ра), добавляют 100 мкл крови и 50 мкл взвеси зимозана в концентрации 3,5 мг/мл.

2. Инкубируют во влажной камере в термостате в течение 120 минут при 37°C.

3. Излишки крови осторожно удаляют при наклоне предметного стекла под углом 45°, и на предметном стекле остается лейкоконцентрат, ограниченный хорошо видимыми контурами капли.

4. Мазки сушат, фиксируют в метаноле в течение 5 минут. Окрашивают по Романовскому в течение 5-10 минут.

5. Промывают в дистиллированной воде, оставляют до полного высыхания, микроскопируют.

Определяют %ФАН – процент активно фагоцитирующих НГ из общего числа посчитанных нейтрофилов. Количество «активно фагоцитирующих нейтрофилов» оценивают по количеству клеток с внутриклеточно расположенными частицами зимозана, подсчитывая их на 100 НГ в мазке.

Приготовление опсонизированного зимозана: в пробирку помещают 15 мг сухого зимозана, добавляют 5 мл ЗФР, центрифугируют 10 минут. Затем надосадоk сливают, добавляют 5 ЗФР, отмывают на центрифуге ещё 10 минут. Сливают надосадоk, добавляют 2,5 мл ЗФР, перемешивают. Получается неопсонизированный зимозан с концентрацией 3,5 мг/мл. Для дальнейшего приготовления опсонизированного зимозана к 1 мл полученной взвеси неопсонизированного зимозана добавляют 1 мл пулированной сыворотки здоровых людей и помещают в термостат на 1 час. После чего центрифугируют 10 минут, сливают надосадоk, добавляют 5 мл ЗФР и центрифугируют ещё 10 минут. Надосадоk сливают. Добавляют 1 мл ЗФР раствора, перемешивают. Полученный опсонизированный зимозан может храниться в течение 10 дней в холодильнике при t – 4°C.

1.3. Определение фагоцитарной активности лейкоцитов периферической крови методом проточной цитофлуориметрии (набор *Phagotest*®).

Для определения фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови используется диагностический набор *Phagotest*®, производства *ORPEGEN Pharma (BD Bioscience cat №341060)*, поставляемый ООО «БиоЛайн». Протокол исследования позволяет количественно определить способность фагоцитов к захвату объекта, т.е. к опосредованному рецепторами

связыванию и последующему образованию внутриклеточной фагосомы. В соответствии с данным протоколом для анализа используют венозную кровь, взятую в гепаринизированные пробирки BDVacutainer™ LH.

1. По 100 мкл цельной крови вносят в две пробирки 12x75 мм и инкубируют на ледяной бане (0°C) в течение 10 минут.

2. К образцам добавляют по 20 мкл суспензии опсонизированных и окрашенных флуорохромом (FITC) бактерий *E. coli*, пробирки встряхивают на вортексе (3500 об./мин., 5 сек.).

3. Одну из пробирок (опытную) помещают в водяную баню (37°C) на 10 мин., другую (контрольную) оставляют в ледяной бане.

4. После окончания инкубации опытную пробирку переносят в ледяную баню, к обеим пробам добавляют по 100 мкл “гасящего” раствора, встряхивают на вортексе.

5. Затем добавляют по 3 мл охлажденного до 4°C отмывочного раствора, встряхивают и центрифугируют в течение 5 минут (250 g, 4°C). Процедуру отмывки повторяют дважды.

6. Полученные осадки клеток лизируют и фиксируют при комнатной температуре в течение 20 минут.

7. Затем клетки центрифугируют (5 мин., 250 g, 4°C), отбрасывают супернатант, проводят окраску при температуре ледяной бани в течение 10 минут.

Полученные образцы анализируют на проточном цитометре *Cytomics FC500* фирмы *Beckman Coulter*, США. Учет фагоцитирующих клеток проводят по интенсивности зеленой флуоресценции (FL-1 канал), ядросодержащие клетки определяют по интенсивности красной флуоресценции (FL-3 канал). По результатам цитометрии определяют процентное содержание фагоцитирующих гранулоцитов в опытном образце.

1.4. Определение фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов периферической крови методом проточной цитофлуориметрии (Мазуров Д.В., Пинегин Б.В., 2000).

Для постановки реакции используют цельную гепаринизированную венозную кровь и взвесь ФИТЦ-меченых микроорганизмов в соотношении 1:10.

1. Пробы инкубируют при температуре 37°C в течение 30 минут. По окончании инкубации проводят лизис эритроцитов и фиксацию лейкоцитов с использованием лизирующего комплекта реагентов *ImmunoPrep™* (в состав набора входит реагент А – лизирующий эритроциты, реагент В – стабилизирующий и реагент С – фиксирующий реагент) на автоматической станции пробоподготовки *Q-Prep™*.

2. Анализ образцов проводят на проточном цитофлуориметре *Cytomics FC500* фирмы *Beckman Coulter*, США.

В окне *DotPlot* по показаниям прямого и бокового светорассеивания однопараметрическая гистограмма по FL1 для нейтрофилов. Процент

флуоресцирующих (фагоцитировавших) нейтрофилов высчитывается автоматически, что отражается в соответствующих гистограммах, таблицах статистики. Количество собираемых событий по нейтрофилам не менее 3000. Также оценивают и такой показатель как MFI, который является средней геометрической интенсивности свечения клеток и позволяет судить о количестве частиц, захваченных клетками.

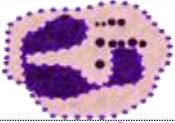
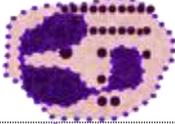
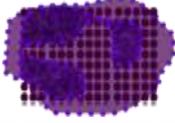
Приготовление ФИТЦ-меченых микроорганизмов: суточные культуры *St. aureus*, культивируемые на скошенном агаре, смывают изотоническим раствором хлорида натрия, убивают нагреванием 96-98°C в течение 40 минут и осаждают путем центрифугирования в течение 25 минут при 1000 об./мин. После этого дважды отмывают в 10 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ, pH 7,4). По стандарту мутности концентрацию бактерий доводят до 1 млн/мл карбонатно-бикарбонатным буфером (pH 9,5). К взвеси бактерий добавляют флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ) (Sigma, США) в конечной концентрации для убитых бактерий 0,1 мг/мл, инкубируют при +4°C в течение 12 часов. Затем несвязавшийся ФИТЦ удаляют путем трехкратной отмывки ФСБ, в течение 25 минут при 1000 об./мин. Концентрацию бактерий доводят до 500 млн/мл по стандарту мутности. Взвесь бактерий аликвотируют и хранят при -20°C до 6 месяцев.

Раздел II. ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

Цитохимические методы характеризуются высокой информативностью, простотой в постановке реакции, малым количеством исследуемого материала, не требуют специального оборудования и могут легко воспроизводиться в любых клинико-диагностических лабораториях. Цитохимический анализ дает глубокую и всестороннюю информацию о состоянии обменных и структурных изменений в клетке, и может быть использован как в клинической практике, так и в экспериментальной работе.

Для количественной оценки результатов цитохимических реакций используется принцип Karlow (1955), дающий возможность сравнительной оценки полученных результатов. Этот метод позволяет определить показатель активности НГ, т.е. выразить количественное содержание исследуемых компонентов в условных единицах измерения. При оценке цветных цитохимических реакций предполагается, что интенсивность окраски и количество окрашенного материала соответствует и количеству исследуемого в клетке вещества или активности фермента.

Учет и оценка результатов цитохимических реакций по Karlow(1955)

	0 степень — окрашено только ядро, цитоплазма не окрашена, не видно контуров гранул
	1-я степень — вся цитоплазма диффузно окрашена или окрашено не более 1/4 цитоплазмы
	2-я степень — в цитоплазме хорошо видны хорошо окрашенные гранулы, окрашено более 1/4 цитоплазмы
	3-я степень — всю цитоплазму занимают гранулы, но ядро свободно, окрашено 3/4 и более цитоплазмы
	4-я степень — гранулы занимают всю цитоплазму и наслаиваются на ядро

После подсчета 100 НГ рассчитывается средний цитохимический индекс (СЦИ):

$$\text{СЦИ} = \frac{0a + 1b + 2c + 3d + 4e}{100}$$

где a, b, c, d, e – количество НГ 0, 1, 2, 3, 4 степени соответственно.

2.1. Определение активности щелочной фосфатазы нейтрофилов по М.Г. Шубичу (1965).

Щелочная фосфатаза является весьма лабильным ферментом и при различных патологических состояниях изменения ее активности бывают значительными и постоянными. Показателем повышения активности щелочной фосфатазы является увеличение ее количества в клетке, при снижении ее активности уровень данного фермента в клетке уменьшается.

Принцип метода: Расщепление щелочной фосфатазой нафтилфосфата с освобождением нафтола, образующего с солями диазоля нерастворимый, окрашенный в сине-коричневый цвет осадок, выпадающий в местах локализации фермента.

1. Мазки крови готовят по обычным правилам на очищенных и обезжиренных предметных стеклах и высушивают на воздухе.
2. Фиксируют мазки в парах формалина в течение 1 мин.
3. После фиксации мазки просушивают на воздухе в течение 15 мин.
4. Инкубируют мазки в течение 30 мин. при 20°C в инкубационной смеси следующего состава:

Раствор А. 25 мг α -нафтилфосфата натрия растворяют в 25 мл боратного буфера рН — 9,18 (19, 1 г буры на 1 л дист. воды), коррекцию рН проводят 0,7—1,0 мл 1н. р-ра едкого натрия.

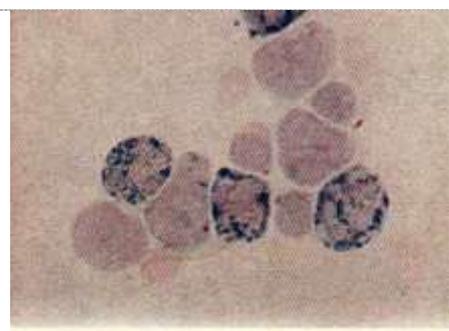
Раствор В. 50 мл диазоля синего или синего прочного ВВ растворяют в 25 мл боратного буфера рН—9,18 (фильтруется в темноте). Растворы А и В сливаются.

5. После инкубации мазки промывают в течение 10 мин. проточной водой, ополаскивают в дистиллированной воде.

6. Ядра докрасивают 0,1%-ным водным р-ром сафранина в течение 1 мин.

7. Промывают, высушивают, микроскопируют в световом микроскопе при увеличении 10х90, иммерсионный объектив.

Мазки микроскопируют, подсчитывают нейтрофилы с учетом степени интенсивности окраски гранул. После этого выводят СЦИ



Результаты реакции: активность щелочной фосфатазы определяется по количеству гранул коричневого цвета в цитоплазме нейтрофилов, ядра докрасены в красный цвет.

P.S. Возможно проведение реакции с использованием готовых наборов реагентов для цитохимических исследований НПФ «Абрис», Россия, Санкт-Петербург.

2.2. Определение активности кислой фосфатазы лейкоцитов (Шубич М.Г., Нестерова И.В., 1980).

Кислая фосфатаза в отличие от щелочной присутствует и в лимфоцитах и моноцитах. Однако более сильная положительная реакция отмечается в нейтрофильных гранулоцитах и зависит от функционального состояния клеток: фагоцитоз стимулирует синтез лизосомальных ферментов, в том числе и кислой фосфатазы, в количествах, соответствующих перевариваемости поглощенного материала.

Принцип метода: Расщепление кислой фосфатазой нафтилфосфата с освобождением нафтола, немедленно вступающего в реакцию с фуксином с образованием нерастворимого, окрашенного в красно-коричневый цвет осадка азокрасителя, выпадающего в местах локализации фермента.

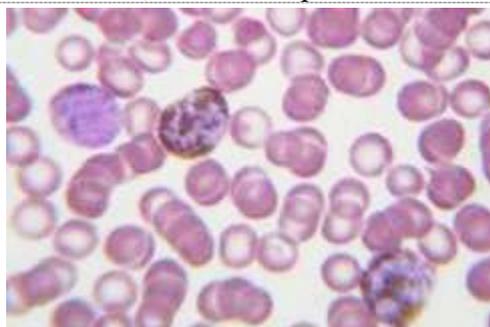
1. Мазки крови готовят по обычным правилам на очищенных и обезжиренных предметных стеклах и высушивают на воздухе.
2. Фиксируют мазки в парах 10%-ного формалина в течение 1 мин.
3. После фиксации мазки просушивают на воздухе в течение 15 мин.
4. Инкубируют мазки в течение 120 мин. в термостате при 37°C.

Инкубационная смесь готовится непосредственно перед употреблением и имеет следующий состав:

1. 20 мг α -нафтилфосфата растворяется в 13 мл дистиллированной воды, далее добавляется 5 мл ацетат-вероналового буфера, 1,6 мл гексаметиленамина; после добавления всех компонентов в смесь вносят 12 мг ЭДТА. Поправка рН до 5,0 производится с помощью 1н.р-ра едкого натрия.
2. Промывают дистиллированной водой.
3. Докрашивают ядра 0,75%-ным водным р-ром метиленового синего в течение 30 сек., рН—7,0.
4. Промывают дистиллированной водой, высушивают, микроскопируют.

Мазки микроскопируют, подсчитывают нейтрофилы с учетом степени интенсивности окраски гранул. После этого выводят СЦИ

Примечание: гексаметиленамин готовится по следующей прописи: к 0,8 мл 4%-ного р-ра основного фуксина на 2Н соляной кислоте по каплям добавляют 0,8 мл 4%-ного р-ра нитрита натрия. Для удаления двуокиси азота в смесь добавляется 5—7 мг мочевины, стакан встряхивается до прекращения отхождения пузырьков газа.



Результаты реакции: активность кислой фосфатазы лейкоцитов определяется по количеству гранул красно-коричневого цвета в цитоплазме нейтрофилов, ядра докрашиваются в голубой цвет.

P.S. Возможно проведение реакции с использованием готовых наборов реагентов для цитохимических исследований НПФ «Абрис», Россия, Санкт-Петербург.

2.3. Определение катионных белков.

Катионные белки представляют собой большую, гетерогенную по своей структуре и функциям группу протеинов, отличительным физико-химическим свойством которых является катионный характер их молекул. К катионным белкам относятся: дефенсины, лизоцим, лактоферрин, бактерицидный проницаемость-увеличивающий белок, катепсин G, эластаза, фосфолипаза А и миелопероксидаза. Катионные белки содержатся только в гранулоцитах (нейтрофилах и эозинофилах) и выявляются на различных стадиях миелопоэза, начиная с промиелоцита. В процессе созревания и дифференцировки гранулоцитов происходит увеличение внутриклеточного содержания катионных белков, достигающее максимального уровня на стадии зрелых клеток костномозгового резерва. Зрелые нейтрофилы периферической крови не способны к синтезу и накоплению катионных белков и в ходе выполнения своих функций только расходуют преформированные запасы данных биоцидных и регуляторных протеинов.

2.3.1. Определение катионных белков (по Пигаревскому в модификации Нестеровой И.В., 1992).

Принцип метода: При значениях рН 8,1-8,2 катионные белки являются единственным биополимером, с которым молекулы диахромного лимонного красителя прочного зеленого реагируют с образованием стойких ионных связей.

1. Мазки крови готовят по обычным правилам на очищенных и обезжиренных предметных стеклах и высушивают на воздухе.

2. Фиксацию – инкубацию проводят в забуференном спиртовом р-ре прочного зеленого (рН 8,0—8,2) в течение 15 мин. 0,2 м р-р трис-буфера: 24,2 г сухого трис-буфера на 1 л дист. воды.

Метаноловый трис-буфер: 10 мл трис-буфера и 9 мл 0,1 н р-ра соляной кислоты и 21 мл метанола.

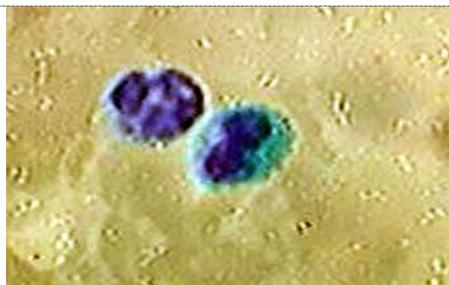
Забуференный спиртовой р-р прочного зеленого: 100 мг прочного зеленого растворить в 100 мл метанолового трис-буфера с рН 8,0—8,2 (до нужного рН доводят трис-аминометаном $C_4H_{11}O_3N$).

3. После инкубации мазки ополаскивают в дистиллированной воде.

4. Докрашивают ядра 0,25%-ным р-ром азура А в течение 30 сек.

5. Промывают дистиллированной водой, высушивают, микроскопируют.

Мазки микроскопируют, подсчитывают нейтрофилы с учетом степени интенсивности окраски гранул. После этого выводят СЦИ.



Результаты реакции: катионные белки и убитые бактерии окрашены в зеленый цвет, ядра и живые бактерии — в сиреневый цвет.

P.S. I. 0,1 н р-р соляной кислоты — 1,0 мл конц. кислоты на 120 мл дист. воды.
Концентрированная HCl = 37% = 12Н раствор HCl.

II. 200 мл метанолового трис-буфера:

1.50 мл 0,2 М трис-буфера.

2.45 мл 0,1 н р-ра соляной кислоты.

3.105 мл метанола.

2.3.2. Способ определения функционального потенциала нейтрофильных гранулоцитов по реализации неферментных катионных белков (И.В. Нестерова, М.А. Светличная, изобретение по заявке 4290225/28-14,1987г.)

1. Из крови готовят параллельно 2 препарата:

Приготовление первого препарата капли (уровень катионных белков в неактивированных НГ)

a. На середину хорошо обезжиренного стекла помещают 10 мкл гепарина (в разведении 2 ЕД в 0,1 мл физиологического р-ра) и 20 мкл крови (гепаринизация крови).

b. Добавляют 10 мкл физиологического раствора.

c. Перемешивают компоненты круговыми движениями стекла

Приготовление второго препарата капли (уровень катионных белков в активированных НГ)

a. На середину хорошо обезжиренного стекла помещают 10 мкл гепарина (в разведении 2 ЕД в 0,1 мл физиологического р-ра) и 20 мкл крови (гепаринизация крови).

b. Добавляют 10 мкл микробной взвеси *Staphylococcus aureus* (лабораторный штамм №209 на физиологическом растворе в концентрации 1×10^6 клеток/мл).

c. Перемешивают компоненты круговыми движениями стекла.

2. Оба препарата инкубируют в термостате в течение 1 часа 45 минут во влажной камере.

3. После инкубации излишек крови осторожно удаляется при наклоне предметного стекла под углом 45° , и на предметном стекле остается лейкоконцентрат, ограниченный хорошо видимыми контурами капли.

4. Высушенные при комнатной температуре мазки фиксируют в метаноле в течение 5 мин.

5. Окрашивание препаратов проводят в инкубационной смеси следующего состава: 0,2М р-р трис-буфера — 24,2 г сухого трис-буфера на 1 л дист. воды. Метаноловый трис-буфер — 10 мл 0,2М трис-буфера и 9 мл 0,1Н р-ра соляной

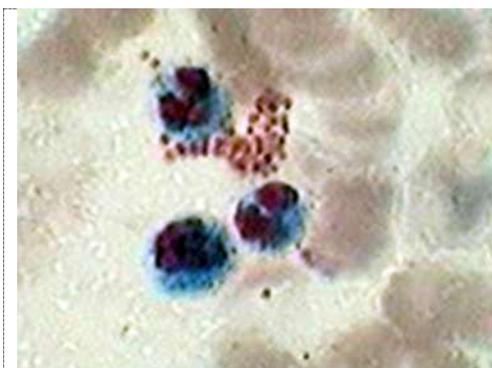
кислоты и 21 мл метанола. Забуференный спиртовой р-р прочного зеленого FCF—100 мг прочного зеленого растворить в 100 мл метанолового трис-буфера с рН 8,0—8,2. (Окрашивание производят в течение 15 мин. при 22°С)

Докрашивают ядра в 0,25%-ном р-ре азура в течение 15—30 сек.

6.Промывают, высушивают, микроскопируют, подсчитывают нейтрофилы с учетом степени интенсивности окраски их гранул.

7.Расчитывают СЦИ и коэффициент реализации катионных белков (КР):

$$\text{КР(коэффициент реализации)} = \frac{\text{КБ(СЦИ)в неактивированных НГ}}{\text{КБ(СЦИ)в активированных НГ}}$$



Результаты реакции: гранулы, содержащие катионные белки, окрашиваются в салатно-зеленый, ядра — в фиолетовый цвет.

2.4. Определение активности миелопероксидазы нейтрофильных гранулоцитов по Sato (1928).

В нейтрофилах миелопероксидаза (МП) выявляется со стадии промиелоцита, внутриклеточно локализована в вакуолях пластинчатого комплекса и в азурофильных гранулах. МП принимает участие в формировании регуляторных веществ, необходимых для созревания гранулоцитов, играет важную роль по обеспечению функциональной активности зрелых НГ. В норме 100% НГ содержат миелопероксидазу.

Активность фермента в НГ подвержена небольшим колебаниям по возрасту и полу. При различных заболеваниях уровень активности МП колеблется, чаще в сторону уменьшения. Определение содержания МП в супернатантах нейтрофилов является одним из тестов, позволяющих судить о бактерицидной активности нейтрофилов. Изменение активности фермента при стимуляции клетки может косвенно свидетельствовать о способности клетки к дегрануляции. Уменьшение содержания МПО в супернатантах может быть свидетельством подверженности обследуемого к инфекционным заболеваниям.

Принцип метода: В присутствии миелопероксидазы бензидин окисляется перекисью водорода в коричневый оксибензидин.

1. Мазки крови готовят по обычным правилам на очищенных и обезжиренных предметных стеклах и высушивают на воздухе.

2. . Фиксируют в смеси этанол 96° — формалин (9:1) в течение 1 мин.

3. Тщательно промывают в 3 сменах дистиллированной воды. Высушивают на воздухе.

4. Инкубация мазков:

а. Мазки опускают в 0,5%-ный р-р медного купороса (1,0 г медного купороса на 200 мл дист. воды) на 1 мин.

б. Промывают в дист. воде.

с. Погружают в бензидинна 2 мин.

Приготовление бензидина: 100 мг бензидина на 250 мл дист. воды нагревается до +80°C, охлаждается в холодильнике в течение суток. Фильтруется. На 50 мл бензидина добавляется 2—3 капли 3%-ной перекиси водорода (свежей!).

5. Мазки промывают дистиллированной водой.

6. Докрашивают ядра 0,5%-ным водным р-ром сафранина в течение 1 мин. (возможно окрашивание ядер другими красителями: нейтральным красным, азуром, Романовским).

7. Промывают, высушивают, микроскопируют, подсчитывают нейтрофилы с учетом степени интенсивности окраски их гранул. Рассчитывают СЦИ.



P.S. Возможно проведение реакции с использованием готовых наборов реагентов для цитохимических исследований НПФ «Абрис», Россия, Санкт-Петербург.

2.4.1. Способ определения функционального резерва нейтрофильных гранулоцитов по уровню расходования миелопероксидазы (Нестерова И.В., Фомичева Е.В., 2000).

Для определения резервного потенциала и оценки мобилизационных возможностей гранулярного аппарата НГ, нами разработан тест с искусственной активацией НГ бактериальным антигеном в условиях *in vitro*.

Для исследования берут кровь из вены, стабилизированную этилендиаминтетраацетатом К.

1. В 2 лунки планшета для иммунологических исследований помещают по 100 мкл крови.

2. В 1 лунку добавляют 100 мкл физиологического раствора (спонтанный тест), в другую – 100 мкл бактериальной взвеси *St.aureus* в концентрации 1×10^6 микробных тел в 1 мл физиологического раствора (стимулированный тест).
3. Содержимое лунок осторожно перемешивают, после чего инкубируют в термостате при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 1 часа.
4. После инкубации содержимое лунок перемешивают и готовят каплю-препарат на хорошо обезжиренном предметном стекле. Стекло помещают во влажную камеру для оседания клеток в строго горизонтальном положении. Через 10 минут излишек жидкости осторожно удаляют наклоном стекла под углом 45° и сушат образцы на воздухе в течение 6-12 часов.
5. Высушенные образцы фиксируют в парах формалина в течение 3-4 минут, промывают в проточной воде 1-2 минуты и высушивают на воздухе.
6. Затем мазок опускают в 0,5% раствор медного купороса на 1 минуту, после чего переносят в свежеприготовленный раствор бензидина с 2 каплями перекиси водорода (раствор бензидина готовят, растворяя 100 мг бензидина в 250 мл дистиллированной воды при нагревании до 80°C , раствор хранится в холодильнике).
7. После этого образцы промывают в проточной воде в течение 1-2 минут и докрашивают в течение 30-60 секунд в 0,5% растворе нейтрального красного, еще раз ополаскивают в проточной воде и сушат на воздухе.
8. Микроскопируют. При микроскопировании окрашенных мазков просматривают 100 НГ.

Внутриклеточную активность миелопероксидазы оценивают полуколичественно в условных единицах путем расчета среднего цитохимического индекса (СЦИ) по принципу Karlow L.S [1956]. Вычисляя отношения показателя активности миелопероксидазы в стимулированном варианте, к аналогичному показателю в спонтанном варианте, определяют коэффициент расходования (КР):

$$\text{КР} = \text{СЦИ}_{\text{ст}} / \text{СЦИ}_{\text{сп}},$$

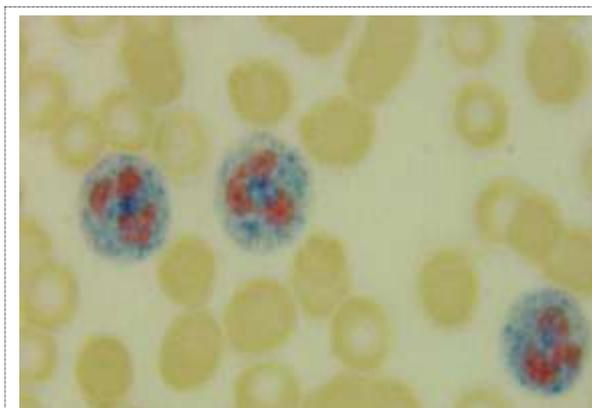
который отражает потенциальный резерв НГ, имеет высокую информативность при оценке состояния системы НГ у больных ЯБ ДПК, осложненной стенозом, что дает возможность использования теста в клинической практике для прогнозирования хирургических осложнений в послеоперационном периоде.

2.5. Определение активности хлорацетат-AS-Д-эстеразы в нейтрофильных гранулоцитах в модификации Нестеровой И.В., 1983.

Хлорацетат-AS-Д-эстераза как и другие неспецифические эстеразы и кислая фосфатаза, является ферментом и концентрируется в первичных азурофильных гранулах НГ. Хлорацетатэстераза гранулоцитов имеет свойства, аналогичные таковым химотрипсинподобным ферментам нейтрофилов, обеспечивает протеолитическую и переваривающую активность НГ и является цитохимическим маркером катепсина G.

Принцип метода: Под влиянием неспецифических эстераз нафтол-AS-D-хлорацетат гидролизуеться с образованием свободного нафтола, который при взаимодействии с солями диазония образует окрашенное в синий цвет нерастворимое соединение (азокраситель), выпадающее в осадок в местах локализации фермента.

1. Мазки крови готовят по обычным правилам на очищенных и обезжиренных предметных стеклах и высушивают на воздухе.
2. Фиксируют в парах 10%-ного формалина в течение 1 мин.
3. Подсушивают на воздухе в течение 15 мин.
4. Инкубируют мазки в течение 30 мин. при 20°C в инкубационной смеси следующего состава: 10 мг нафтол-AS-D-хлорацетата растворить в 4 мл ацетона, добавить 50 мл дист. воды, 50 мл ацетат-вероналового буфера Михаэлиса pH—7,0. Добавить в смесь 100 мг синего прочного ВВ. Профильтровать в темноте.
5. Промывают в 2 сменах дистиллированной воды.
6. Докрашивают ядра 0,5%-ным р-ром нейтрального красного на забуференном физиологическом растворе, pH—7,0.
7. Промывают, высушивают, микроскопируют, подсчитывают нейтрофилы с учетом степени интенсивности окраски их гранул. Рассчитывают СЦИ.



Результаты реакции: активность хлорацетат-AS-D-эстеразы определяется по количеству гранул интенсивно-синего цвета в цитоплазме нейтрофилов. Ядра докрашены в красный цвет.

P.S. Возможно проведение реакции с использованием готовых наборов реагентов для цитохимических исследований НПФ «Абрис», Россия, Санкт-Петербург.

2.5.1. Способ определения функционального потенциала нейтрофилов по расходованию хлорацетат-AS-D-эстеразы (Нестерова И.В., Чудилова Г.А., патент РФ 2082972 от 26.06.1997).

1. Из крови готовят параллельно 2 препарата:

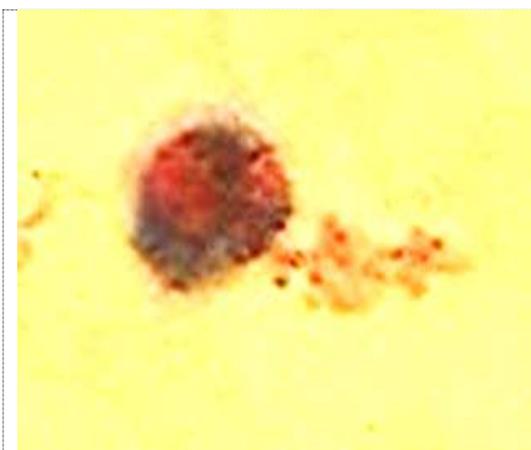
Приготовление первого препарата: мазки крови готовят по обычным правилам на очищенных и обезжиренных предметных стеклах и высушивают на воздухе (уровень хлорацетат-AS-D-эстеразы в неактивированных нейтрофилах).

Приготовление второго препарата-капли: в лунку планшета помещают 50 мкл крови, добавляют 50 мкл гепарина, потом 50 мкл аллергена гемолитического стафилококка в концентрации 10^{-5} - 10^{-3} , далее вводят 50 мкл

0,2%-ного раствора тетранитросинеготетразолия. Планшет встряхивают в течение 1 мин для смешения компонентов реакции, затем инкубируют в термостате при температуре 37° в течение 1 ч 45 мин. Далее готовят препарат каплю на стекле и высушивают на воздухе (уровень хлорацетат-AS-D-эстеразы в активированных нейтрофилах).

2. Оба препарата после фиксации в парах 10%-го формалина в течение 1 мин окрашивают в течение 30 мин при 22°С инкубационной смесью следующего состава (аналог в модификации Нестеровой И.В. 1983): 10 мл нафтол-AS-D-хлорацетата, растворенного в 4 мл ацетона, 50 мл ацетат-вероналового буфера Михаэлиса рН 7,0, 100 мл синего прочного ВВ, ядра докрасивают в течение 1 мин 0,5-1,0%-ным раствором нейтрального красного на забуференном физрастворе. Мазки микрофотографируют, подсчитывают нейтрофилы с учетом степени интенсивности окраски гранул. После этого выводят СЦИ и рассчитывают коэффициент расходования (КрЭ) хлорацетат-AS-D-эстеразы:

$$\text{КрЭ} = \frac{\text{СЦИ хлорацетат - AS - D - эстеразы в неактивированных НГ}}{\text{СЦИ хлорацетат - AS - D - эстеразы в неактивированных НГ}}$$



Результаты реакции: активность хлорацетат-AS-D-эстеразы определяется по количеству гранул сине-черного цвета в цитоплазме нейтрофилов. Ядра докрасены в красный цвет.

2.6. Оценка оксидазных микробицидных систем нейтрофильных гранулоцитов в спонтанном и стимулированном NBT – тесте (Нестерова И.В., 1980).

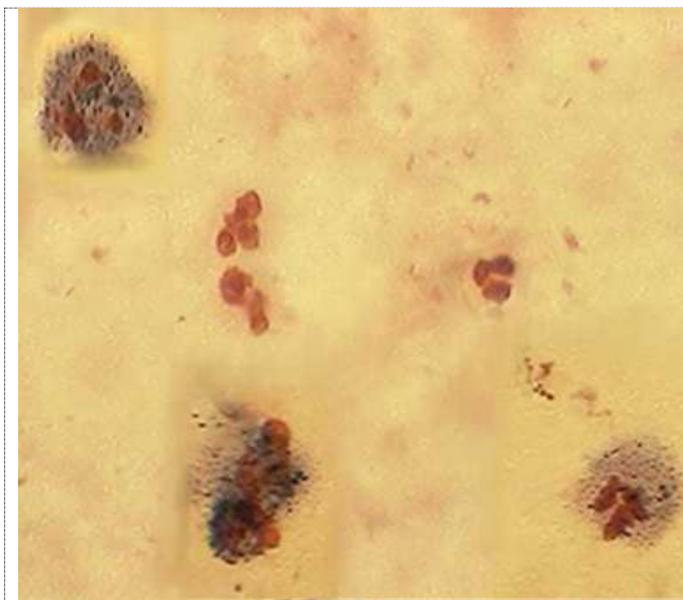
NBT-тест является интегральным показателем биоцидной способности нейтрофильных гранулоцитов, который позволяет оценить активность всех составляющих кислородзависимой NADPH-оксидазной системы клеток. Проведение NBT-теста в двух вариантах, спонтанном и индуцированном, дает возможность судить, с одной стороны, о реактивности не стимулированных НГ, а с другой — оценивать их функциональный резерв, или готовность к осуществлению завершеного фагоцитоза. Кроме того, являясь своеобразным "зеркалом гомеостаза", NBT-тест чувствительно реагирует на малейшие сдвиги гомеостаза, отражая, в широком смысле, состояние реактивности макроорганизма.

Для оценки кислородзависимой микробицидной активности НГ используют

спонтанный и стимулированный NBT – тест (Нестерова И.В., 1980).

Принцип метода: Восстановление растворимого красителя нитросинеготетразолиевого в нерастворимый диформазаан под влиянием супероксиданиона, образующегося в NADPH-оксидазной реакции.

1. На середину двух хорошо обезжиренных предметных стекол помещают 10 мкл гепарина (в разведении 2 ед. гепарина на 0,1 мл физиологического раствора) и добавляют 10 мкл крови.
2. Затем в NBT-спонтанный (NBTсп.) добавляют – 10 мкл физиологического раствора и 10 мкл 0,1% раствора нитросинеготетразолия (NBT).
3. BNBT-стимулированный тест (NBTст.) добавляют 10 мкл бактериальной взвеси *Staphylococcus aureus* (лабораторный штамм №209) в разведении 1×10^6 микробных тел в 1 мл физиологического раствора и через 2 минуты вводят 10 мкл 0,1% раствора нитросинеготетразолия (NBT).
4. Все ингредиенты размешивают осторожным покачиванием стекла и инкубируют в термостате при $t\ 37^{\circ}\text{C}$ в течение 15 минут.
5. Охлаждают при комнатной температуре в течение 15 минут.
6. Излишек крови осторожно удаляют наклоном стекла под углом 45° и на предметных стеклах остается лейкоконцентрат, ограниченный хорошо видимыми контурами капли.
7. Мазки фиксируют в метаноле (или 96% этаноле) в течение 2 минут, подсушивают и докрашивают ядра 0,5% раствором нейтрального красного, приготовленного на забуференном физиологическом растворе pH-7,0 в течение 1 минуты.
8. Промывают в дистиллированной воде, сушат, микроскопируют.



Результаты реакции: Формазан позитивные гранулы окрашиваются в сине-черный цвет, ядра – в красный.

Подсчитываются клетки с восстановленным формазаном (% формазан позитивных клеток – % ФПК) из 100 посчитанных в мазке НГ с использованием принципа Karlow L.S. (1955), основанного на оценке интенсивности реакции по количеству окрашенного вещества в цитоплазме.

Формаза́н-позитивными нейтрофилами считаются НГ, в которых гранулы красителя занимают не менее ¼ части цитоплазмы.

	0 степень – окрашено только ядро, цитоплазма не окрашена, не видно контуров гранул;
	1 степень – вся цитоплазма диффузно окрашена или окрашено не более ¼ цитоплазмы;
	2 степень – в цитоплазме хорошо видны окрашенные гранулы, окрашено более ¼ цитоплазмы;
	3 степень – всю цитоплазму занимают гранулы, но ядро свободно, окрашено ¾ и более цитоплазмы;
	4 степень – гранулы занимают всю цитоплазму и наслаиваются на ядро.

Рассчитывается средний цитохимический индекс (СЦИ):

$$\text{СЦИ} = \frac{0a + 1b + 2c + 3d + 4e}{100}$$

где a, b, c, d, e – количество НГ 0, 1, 2, 3, 4 степени.

%ФПК – это сумма формаза́н позитивных клеток НГ только 2,3,4 степеней, приходящаяся на сто клеток НГ.

Резервные возможности НГ к мобилизации оксидазных систем определялись **КОЭФФИЦИЕНТОМ МОБИЛИЗАЦИИ (КМ)**, который вычисляется из соотношения показателя стимулированного теста (**НВТст.**) к спонтанному **НВТсп.**

КМ рассчитывают по **%ФПК**:

$$\text{КМ} = \frac{\% \text{ формаза́н – позитивных НГ в стимулированном НВТ}}{\% \text{ формаза́н – позитивных НГ в спонтанном НВТ}}$$

2.6.1. Оценка оксидазных микробицидных систем нейтрофильных гранулоцитов в спонтанном и стимулированном зимозаном NBT-тесте (модификация Нестеровой И.В. и соавт., 1996).

На середину двух хорошо обезжиренных предметных стекол помещают 50 мкл гепарина (2 МЕ/мл) и каплю крови (100 мкл), затем добавляют в NBT-стимулированный тест 50 мкл взвеси зимозана в концентрации 3,5 мг/мл и 50 мкл 0,1% раствора нитросинего тетразолия, а в NBT-спонтанный – 50 мкл ЗФР и 50 мкл 0,1% раствора нитросинего тетразолия. Оба мазка инкубируются в термостате при 37°C в течение 15 минут. Излишек крови осторожно удаляют наклоном стекла под 45°, и на предметных стеклах остается лейкоконцентрат, ограниченный хорошо видимыми контурами капли. Мазки фиксируют в метаноле в течение 1 минуты, подсушивают и докрашивают ядра 0,5% раствором нейтрального красного. Подсчитываются клетки с восстановленным формазаном (% формазан-позитивных клеток, %ФПК) с использованием принципа L.S. Karlow (1995). Рассчитывается средний цитохимический индекс (СЦИ) и коэффициент мобилизации (КМ):

$$\text{СЦИ} = \frac{0a + 1b + 2c + 3d + 4e}{100}$$

где a, b, c, d, e – количество НГ 0, 1, 2, 3, 4 степени.

$$\text{КМ} = \frac{\% \text{ формазан} - \text{позитивных НГ в стимулированном NBT}}{\% \text{ формазан} - \text{позитивных НГ в спонтанном NBT}}$$

2.7. Методика определения активационного потенциала нейтрофильных гранулоцитов по топологическим свойствам хроматина их ядер (Евглевский А.А., 2000).

Известно, что при окраске ядер клеток толуидиновым синим при рН-5,0, обработанных после солянокислого гидролиза солянокислым гидроксиламином или бисульфитом натрия, возникает эффект двулучепреломления тем более сильный, чем более упорядоченной является структура ДНК в изучаемых ядрах.

Механизм реакции состоит в том, что толуидиновый синий взаимодействует как с фосфатными группами ДНК, так и с открывшимися после гидролиза альдегидными группами, пространственная ориентация которых различна. Указанный эффект усиливается после блокады альдегидных группа гидроксиламином или бисульфитом натрия. Это связано с возникновением дополнительной химической связи:

АЛЬДЕГИДНАЯ ГРУППА – БЛОКАТОР – КРАСИТЕЛЬ,

при этом необходимо, чтобы расстояние между молекулами красителя составляло не более 50 нм (Т. Фрейвальдс., 1980). Подобное условие выполняется только при определенной степени конденсации хроматина, а значит и при определенном уровне его биологической активности. Такой вид анизотропии следует считать «текстурным» (Фрей Вислинг, 1950). Как правило, чем более упорядоченной по своей структуре является ДНК, тем более конденсированным является соответствующий ей хроматин и тем менее он активен в биологических процессах. Таким образом, количественный учет степени анизотропии ядер позволяет судить об активности хроматина.

Мазки клеток крови, подсушивают на воздухе, фиксируют смесью этанол/ацетон в соотношении 1:1, подвергают гидролизу в 5 N HCl при 20°C и обработке солянокислым гидроксиламином (Р. Лилли, 1969), при температуре 37°C в течение 3 часов. Обработанные таким образом отпечатки, окрашивают 0,05% раствором толуидинового синего при pH-5.0, приготовленного на 0,001M цитратном буфере. Время окраски 20 минут. Окрашенные препараты быстро отмывают цитратным буфером, высушивают на воздухе и исследуют под поляризационным микроскопом «МП-8».

Полученные поляризационные картины фотографируют в строго стандартизированных условиях на пленку типа РФ-3 и ФН-100, полученные фотографии обрабатывают методами морфометрии (методом равноудаленных точек по Вейблу, 1978) или методом компьютерного анализа изображений.

Учету подвергаются зоны микрофотографии, имеющие признаки анизотропии и зоны, которые этим эффектом не обладают.

Для массовых исследований в клинических условиях используют модификацию хорошо известного полуколичественного метода Астальди и Верга адаптированного для изучения ядер.

Все ядра разделяют по степени анизотропии на 5 групп, каждой из которых была присвоена определенная величина анизотропии (0 – полное ее отсутствие; 4 – анизотропно все ядро) (рис. 2.7).

В дальнейшем расчет анизотропии проводился по известной формуле:

$$\text{СЦИ} = \frac{0x_a + 1x_b + 2x_c + 3x_d + 4x_e}{a + b + c + d + e},$$

где СЦИ – средний цитохимический индекс или величина оптической анизотропии

a, b, c, d, e – количество клеток с разной величиной оптической анизотропии

0, 1, 2, 3, 4 – условная степень оптической анизотропии.

Полученные результаты обрабатывают методами вариационной статистики.

Учитывая наличие обратной связи между степенью анизотропии хроматина и его биологической активностью, нами был введен показатель активности нейтрофильных гранулоцитов ПАН, который рассчитывается по формуле:

$$\text{ПАН} = 4 - X,$$

где 4 – максимально возможный СЦИ, а X – СЦИ, подсчитанный в конкретном мазке крови.

Таким образом, чем выше анизотропия хроматина (СЦИ=X), тем ниже активность клеточного ядра.

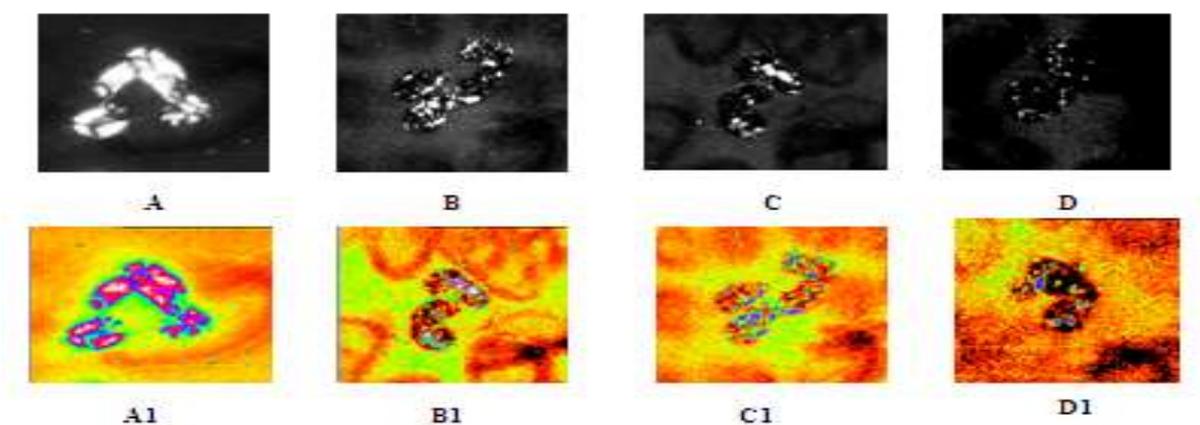


Рисунок 2.7.Различная степень анизотропии ядер нейтрофильных гранулоцитов. Окраска толуидиновым синим при pH-5,0. Ув. 10x100.(A-4 степень; B-3 степень; C-2 степень;D-1 степень)

2.7.1. Метод определения индуцированной реструктуризации ядерного хроматина (Нестерова И.В., Фомичева Е.В., 2002).

Для определения индуцированной реструктуризации хроматина НГ используется искусственная активация НГ бактериальным антигеном в условиях *in vitro*.

1.Для исследования берут кровь из вены стабилизированную этилендиаминтетраацетатом К (2,5% раствор).

2.В 2 лунки планшета для иммунологических исследований помещают по 100 мкл крови. В 1 лунку добавляют 100 мкл физиологического раствора (спонтанный тест), в другую-100мкл бактериальной взвеси *St. aureus* в концентрации 1×10^6 микробных тел в 1 мл физиологического раствора (стимулированный тест).

3.Содержимое лунок осторожно перемешивают, после чего инкубируют в термостате при температуре +37С в течение 1 часа.

4.После инкубации содержимое лунок перемешивают и готовят каплю-препарат на хорошо обезжиренном предметном стекле.

Стекло помещают во влажную камеру для оседания клеток в горизонтальном положении. Через 10 минут излишек жидкости осторожно удаляют наклоном стекла под углом 45 и сушат мазки на воздухе в течение 6-12 часов.

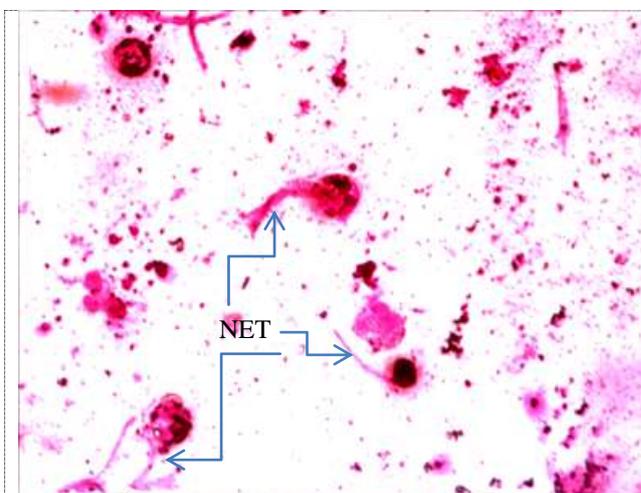
5.Мазки клеток крови, подсушивают на воздухе, фиксируют смесью этанол/ацетон в соотношении 1:1, подвергают гидролизу в 5 N HCl при 20°C и обработке солянокислым гидроксиламином, при температуре 37°C в течение 3 часов. Обработанные таким образом препараты, окрашивают 0,05% раствором

толуидинового синего при рН-5.0, приготовленного на 0,001 М цитратном буфере. Время окраски 20 минут.

Окрашенные препараты быстро отмывают цитратным буфером, высушивают на воздухе и исследуют под поляризационным микроскопом по методике описанной в пункте 2.7.

2.8. Методика выявления и оценки нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей (NET) в гнойном отделяемом и различных экссудатах (Евглевский А.А., 2017).

1. Подсушенные на воздухе мазки-отпечатки экссудата помещают в фиксатор на 15 минут (**реагент А**).
2. После фиксации производят депуринизацию ДНК НГ и NET, для этого помещают мазки-отпечатки в **реагент Б** на 40 минут при 20⁰С.
3. Производят окраску ядер НГ и NET с помощью реактива для специфического выявления депуринизированной ДНК (**реагент С**). Продолжительность обработки 60 минут.
4. Отмывают реагент С **реагентом Д** (3 смены по 5 минут).
5. Промывают мазки-отпечатки дистиллированной водой (3 смены по 5 минут).
6. Высушивают мазки-отпечатки на воздухе.
7. Изучают мазки-отпечатки с помощью светового микроскопа при суммарном увеличении 600х.



Неттинг нейтрофильных гранулоцитов – NET в мазках-отпечатках гнойной раны.

- А. В мазках-отпечатках производят подсчет НГ и NET в 10 произвольно выбранных полях зрения микроскопа.
- Б. Определяют среднее количество НГ и NET
- В. Общее число НГ в одном поле зрения рассчитывают, как сумму НГ и NET:
общее число НГ = НГ среднее + NET среднее.
- С. Рассчитывают показатель количества NET, как %NET среднее от общего числа НГ.

Приготовление реагентов.

1. Для приготовления **реагента А** смешать 100 мл 96⁰ этанола и 100 мл ацетона марки ЧДА.
2. Для приготовления **реагента Б** смешать 80 мл концентрированной хлористоводородной кислоты и 120 мл дистиллированной воды.

3. Для приготовления **реагента С** в 200 мл вскипевшей дистиллированной воды растворить 1 г основного фуксина для фуксинсернистой кислоты, после растворения фуксина добавить 4 г сульфита натрия марки ЧДА и 4 мл концентрированной хлористоводородной кислоты. Приготовленный раствор оставить для созревания на одни сутки. Хранить в темноте при 4⁰С. Использовать при 20⁰С.

4. Для приготовления **реагента Д** в 200 мл дистиллированной воды при комнатной температуре растворить 4 г сульфита натрия и 4 мл концентрированной хлористоводородной кислоты.

Раздел III. ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Использование современных цитометров позволяет значительно расширить минимальный объем исследований, в результате чего появляются дополнительные прогностические факторы особенностей течения заболевания и его исхода.

По сравнению с другими методами проточная цитометрия имеет большое преимущество, так как позволяет детектировать редкие события, исследовать большое количество частиц и определять наличие антигенов на их поверхности.

Возможности проточной цитометрии:

- определение количества, как основных популяций, так и малых субпопуляций по фенотипическим и функциональным признакам, в т.ч. по внутриклеточной продукции специфических цитокинов, характерных для определенного типа клеток;
- анализ функциональной активности процессов клеточной активации;
- определение маркеров пролиферативной активности клеток иммунной системы;
- анализ клеточного цикла с определением распределения клеточной популяции по фазам цикла (ДНК-цитометрия);
- анализ маркеров апоптоза (аннексина V, CD95 Fas/APO-1, CD95L, Bcl-2, P53);
- исследование фагоцитоза, поглотительной способности фагоцитов, бактерицидной и фунгицидной функции фагоцитов;
- исследование продукции активных форм кислорода.

3.1. Определение популяционного состава нейтрофильных гранулоцитов.

Принцип метода: Тест основан на способности специфических моноклональных антител связываться с дискретными антигенными детерминантами, экспрессированными на поверхности нейтрофильных гранулоцитов.

В процессе инкубации образца с реагентом происходит специфическое окрашивание. После этого эритроциты удаляются путем лизирования, а клетки белой крови анализируются на проточном цитофлюориметре с использованием гейта нейтрофильных гранулоцитов. Уникальность проточной цитофлюориметрии заключается в возможности исследовать целевую клеточную популяцию в среде гетерогенного образца.

3.1.1. Определение фенотипа нейтрофильных гранулоцитов по одному маркеру.

1. Окрашивание МКТ проводят в цельной крови. С этой целью, по 100 мкл крови помещают в пробирку размером 12x75 мм и добавляют в нее по 10 мкл антител меченых различными флюорохромными метками.
2. Пробирки инкубируют в темноте при комнатной температуре в течение 25 минут.
3. По окончании инкубации проводят лизис эритроцитов и фиксацию лейкоцитов с использованием лизирующего комплекта реагентов Immuno-Prep™ (в состав набора входили реагент А – лизирующий эритроциты, реагент В – стабилизирующий и реагент С – фиксирующий) на автоматической станции пробоподготовки Q-Prep™.
4. Готовый образец анализируют на лазерном проточном цитофлюориметре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США), с использованием гомогенного гейтирования по показателям светорассеяния.
5. Оценивают относительное количество НГ (%НГ) и уровень плотности экспрессируемых молекул по показателю интенсивности флуоресценции (MFI).

Используемая панель МКТ: CD64-FITC, CD32-PE, CD16-ECD, CD11b-PC₅, CD63-FITC, CD62-ECD, CD14-FITC, CD10-FITC, CD15-PE, CD16-FITC, HLADR-PC₅ (Beckman Coulter, США).

3.3.2. Фенотипирование нейтрофильных гранулоцитов с помощью мультипараметрического (многоцветного) анализа поверхностных CD маркеров

Фенотипирование клеток с помощью многоцветного анализа создает предпосылки для появления множества новых методологических подходов для диагностики различных клеточных дисфункций. Анализ позволяет выявить не только ту или иную субпопуляцию клеток, но и ее функциональную активацию или депрессию.

Процесс развития иммунного ответа организма на проникновение инфекции или какие-либо другие воздействия сопровождается значительными изменениями абсолютного количества, субпопуляционного состава нейтрофильных гранулоцитов, так и к появлением на клеточной поверхности определенных функциональных молекул.

Вариации метода:

- анализ поверхностных и/или внутриклеточных маркеров

Общий протокол:

1. Окрашивание МКТ проводят в цельной крови. В пробирку размером 12x75 мм МКТ помещают по 5-7 мкл антител на разные маркеры НГ с различными флюорохромными красителями и добавляют по 50 мкл крови.
2. Пробирки инкубируют в темноте при комнатной температуре в течение 25 минут.

3. По окончании инкубации проводят лизис эритроцитов и фиксацию лейкоцитов с использованием 250 мкл лизирующего комплекта реагентов OptiLyseC (Beckman Coulter).

4. Готовый образец анализируют на лазерном проточном цитофлуориметре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США), с использованием последовательного гейтирования:

а. Первый гейт. На гистограмме FSC-A (прямое светорассеяние) против SSC-A (боковое светорассеяния) выделяют гейт, в котором расположены гранулоциты. Из этого гейта определяют %НГ несущих CD16⁺-рецепторы.

б. Второй гейт по CD16⁺НГ. Из второго гейта определяют субпопуляции НГ.

Для корректного анализа образца используются контроли: отрицательный контроль (неокрашенные клетки), изотипический контроль.

5. Оценивают относительное количество НГ (%НГ) и уровень плотности экспрессируемых молекул по показателю интенсивности флуоресценции (MFI).

Пример: Определение субпопуляций НГ при оценке одномоментной экспрессии молекул поверхностной цитоплазматической мембраны CD64, CD32, CD16, CD11b методом проточной цитометрии на CytomicsFC500 (Beckman Coulter, США) с использованием панели моноклональных антител: CD64-FITC, CD32-PE, CD16-ECD, CD11b-PC5 (Beckman Coulter, США).

1. В пробирку размером 12x75 мм МКТ помещают по 5мкл антител CD64-FITC, CD32-PE, CD16-ECD, CD11b-PC5 и добавляют по 50 мкл крови.

2. Пробирки инкубируют в темноте при комнатной температуре в течение 25 минут.

3. По окончании инкубации проводят лизис эритроцитов и фиксацию лейкоцитов с использованием 250 мкл лизирующего комплекта реагентов OptiLyse C (Beckman Coulter).

4. Готовый образец анализируют на лазерном проточном цитофлуориметре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США) с использованием последовательного гейтирования:

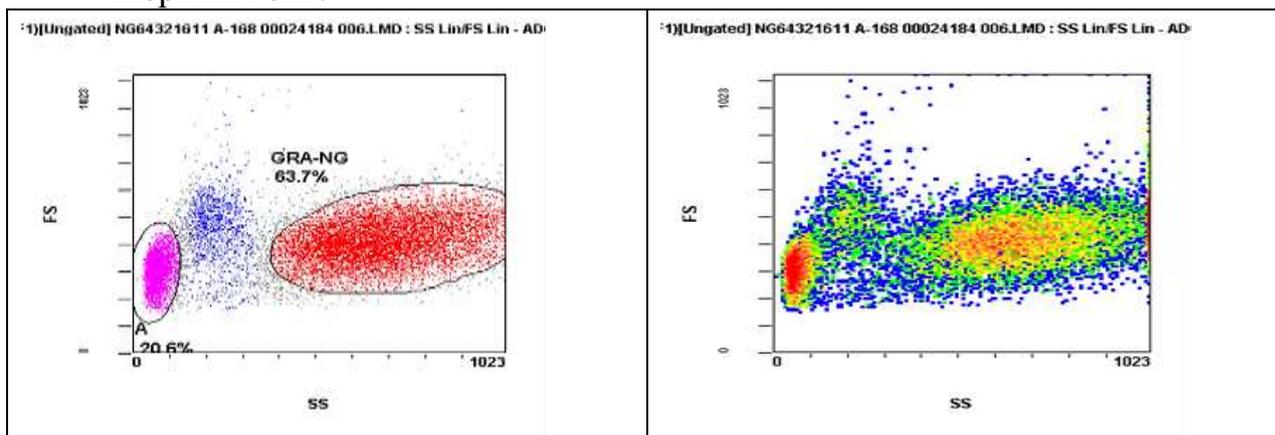
а. Первый гейт. На гистограмме FSC-A (прямое светорассеяние) против SSC-A (боковое светорассеяния) выделяют гейт, в котором расположены гранулоциты. Из этого гейта определяют %НГ, несущих CD16⁺-рецепторы

б. Второй гейт по CD16⁺НГ. Из второго гейта определяют субпопуляции НГ.

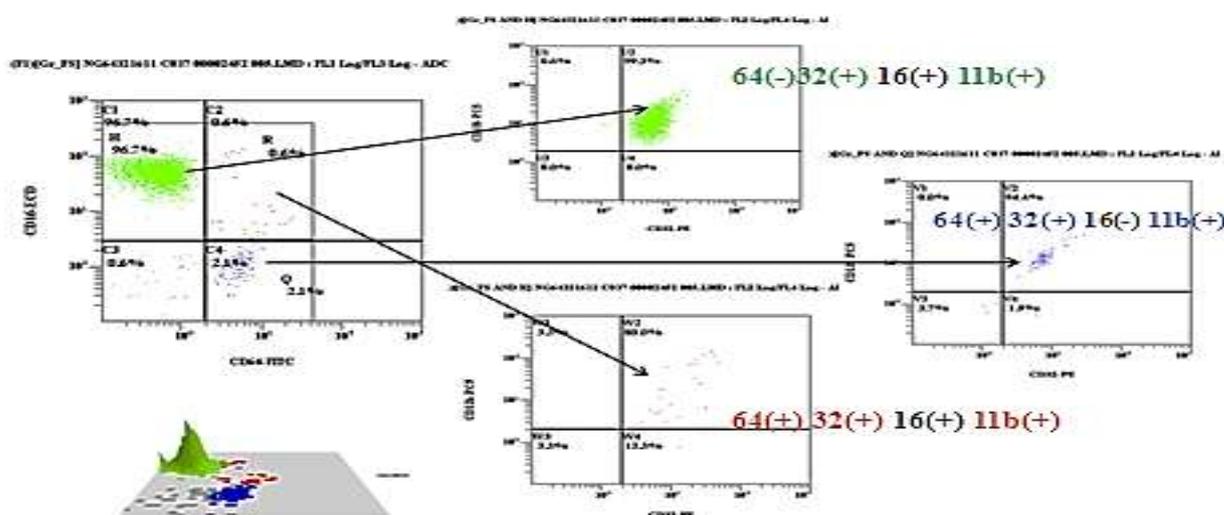
Для корректного анализа образца используются контроли: отрицательный контроль (неокрашенные клетки), изотипический контроль.

5. Оценивают относительное количество НГ (%НГ) и уровень плотности экспрессируемых молекул по показателю интенсивности флуоресценции (MFI).

Первый гейт:



Последовательность гейтирования для определения субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов



3.3.3. Определение экспрессии TLR9 нейтрофильными гранулоцитами и моноцитами с помощью проточной цитометрии

Методами проточной цитометрии показана конститутивная экспрессия TLR клетками различных тканей, но особенно – лейкоцитами. При этом TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 и TLR6 экспрессируются на поверхности клеток, а TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9 локализируются преимущественно внутриклеточно, где они распознают нуклеиновые кислоты вирусов и бактерий. Нейтрофильные гранулоциты экспрессируют все TLRs кроме TLR3, в то время как моноциты лишены экспрессии TLR3, TLR6, TLR7 и TLR10. TLR9 – это эндосомальный рецептор, который распознает неметилированные нуклеотиды CpG, которые обычно встречаются в бактериальных и вирусных геномах, а также синтетические олигодезоксирибонуклеотиды. В частности, известно, что TLR9 распознает ДНК патогенных микроорганизмов, таких как мышинный цитомегаловирус и вирус простого герпеса типа 1 или типа 2 в качестве PAMPs. Стимулирование TLR9 приводит к активации MyD88 – пути, в результате чего,

в конечном счете, происходит активация N-концевой киназы и транслокация ядерного фактора NFκB.

Оценку экспрессии TLR9 нейтрофильными гранулоцитами и моноцитами периферической крови проводят с использованием МкАТ CD289-PE, в качестве изотипического контроля используют мышиные IgG2aK-PE (eBioscience, США), для одновременного определения CD16, CD11b антигенов нейтрофильных гранулоцитов и CD14, CD11b антигенов моноцитов использовали МкАТ CD14-FITC, CD16-FITC, CD11b-PC5 (Beckman Coulter, США) и соответствующие изотипические контроли на проточном цитометре Cytomics FC-500 (Beckman Coulter, США) с расчетом плотности их экспрессии (MFI);

Для определения локализации TLR9 **на поверхности** нейтрофильных гранулоцитов:

1. Периферическую кровь инкубируют с мечеными МкАТ (CD289-PE/CD16-FITC/CD11b-PC5) в течение 15–20 мин. при комнатной температуре
2. Лизируют эритроциты раствором Optilyse C (Beckman Coulter)
3. Отмывают фосфатным буферным раствором при 1500–2000 об/мин, аспирируют супернатант.
4. В каждом образце выявляют процент двойных позитивных (CD16⁺CD289⁺ или CD16⁺CD11b⁺) клеток и оценивают уровень экспрессии по средней интенсивности флуоресценции (MFI) TLR9, CD16, CD11b.

Для определения **внутриклеточной** локализации TLR9 нейтрофильными гранулоцитами:

1. Применяют стандартную методику пермеабилзации с использованием реактива для пермеабилзации Fix&Perm Cell Permeabilization reagents (Invitrogen, США).
2. Периферическую кровь инкубируют с мечеными МкАТ (CD16-FITC/CD11b-PC5) в течение 15–20 мин. при комнатной температуре.
3. Добавляют 100 мкл реагента А (Fixation Medium).
4. Инкубируют при комнатной температуре 15 минут.
5. Промывают один раз 3 мл PBS + 0,1% NaN₃ + 5% FBS.
6. Центрифугируют 5 минут на 300–350 оборотов, аспирируют супернатант, встряхивают на Vortex для полного распределения клеток.
7. Добавляют 100 мкл реагента В (Permeabilization Medium), PE-конъюгированные внутриклеточные антитела CD289 (TLR9) и изотипический контроль IgG2aK-PE.
8. Встряхивают на Vortex 1–2 сек. и инкубируют 20 минут.
9. Промывают один раз 3 мл PBS + 0,1% NaN₃, + 5% FBS.
10. Центрифугируют 5 минут на 300–350 оборотов, аспирируют супернатант.
11. В каждом образце выявляют процент двойных позитивных CD16⁺CD289⁺ клеток и оценивают уровень экспрессии по средней интенсивности флуоресценции (MFI) TLR9, CD16.

Раздел IV. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ IL8 И IL1 β МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ (ПЦР-РВ).

4.1. Этапы проведения ПЦР-РВ.

4.1.1. Выделение чистой взвеси нейтрофилов на градиенте плотности (Нестерова И.В. и соавт., 1996) и индукция экспрессии генов цитокинов.

Кровь в объеме 4–5 мл забирают путем пункции локтевой вены утром, натощак, в пробирки вакуумного отбора крови с ЭДТА (концентрация 2,7%), затем наслаивают ее на фиколл-верографинный градиент плотности (1,077) и выдерживают 40 минут в холодильнике (4⁰С). Снимают плазму со взвешенными лейкоцитами и наслаивают на градиент двойной плотности (1,093:1,077) в соотношении 1:1. Центрифугируют 15-20 минут при 1500 об/мин. На границе между двумя градиентами пастеровской пипеткой отбирают кольцо НГ. Клетки отмывают средой 199 дважды с последующим центрифугированием по 5 минут при 1500 об/мин для удаления надосадочной жидкости. Полученные клетки ресуспендируют и подсчитывают в камере Горяева, доводя суспензию до концентрации 1 млн. НГ/мл. Часть полученной суспензии подвергают преинкубации с ГМДП и ИФН γ . При этом исследуют уровень экспрессии генов IL-8 и IL-1 β , а также особенности реструктуризации хроматина ядер НГ. Для предварительной инкубации в системе *invitro* используют ИФН γ (ООО Иммунофарм, Россия), в конечной концентрации 1 мкг/мл. (время предварительно инкубации составляет 1 час при температуре 37⁰С), а также ГМДП (чистый продукт ГМДП синтезирован в ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова) в конечной концентрации 1 мкг/мл (время предварительной инкубации составляет 1 час при температуре 37⁰С). Дополнительным контролем служат НГ выделенной взвеси, не подвергавшиеся индукции в системе *in vitro*. Полученные клетки проходят стадии выделения РНК из НГ и реакцию обратной транскрипции.

4.1.2. Выделение РНК из НГ периферической крови.

РНК из НГ периферической крови выделяют стандартным методом с использованием коммерческого набора тризол (TRI REAGENT, Sigma) для выделения РНК в соответствии с прилагаемой инструкцией.

4.1.3. Проведение реакции обратной транскрипции.

Для получения кДНК в качестве матрицы применяют образцы РНК. Реакцию обратной транскрипции проводят, используя коммерческий набор RevertAid (ThermoLab, Fermentas, Латвия) в соответствии с инструкцией производителя.

4.1.4. Проведение ПЦР-РВ.

ПЦР-РВ осуществляют с использованием коммерческого набора AmpliTagGold 360 MasterMix (AppliedBiosystems, США) для проведения ПЦР согласно инструкции производителя. При этом используют коммерческие зонды для исследования экспрессии генов цитокинов IL-8, IL-1 β , TNF и act β (Hs00174103_m1; Hs01555410_m1; Hs01113624_g1; Hs01060665_g1, AppliedBiosystems, США).

Общий объем реакционной смеси составляет 20 мкл. Пробирки (стрипы) переносят в прибор для проведения ПЦР-РВ (Rotor-Gene 6000, Qiagen, США), в котором проводится амплификация в автоматическом режиме по заданной программе (50 $^{\circ}$ C 2 мин, 95 $^{\circ}$ C 5 мин, и 40 циклов 95 $^{\circ}$ C 15 сек, 60 $^{\circ}$ C 1 мин).

4.1.5. Анализ полученных данных

Расчет относительной экспрессии генов IL-8, IL-1 β . осуществляют по общепринятой методике (Livak K.J., Schmittgen T.D., 2001).

Определение относительной экспрессии генов:

Уравнение, используемое для анализа данных ПЦР в режиме реального времени, основано на формуле, описывающей ПЦР амплификацию в экспоненциальной фазе реакции:

$$X_n = X_0^x(E + 1)^n \quad (1), \text{ где}$$

X_n – количество ПЦР продукта в цикле n ,

X_0 — начальное количество ДНК,

E — эффективность амплификации.

При ПЦР реакции с использованием флуоресцентного красителя накопление данного красителя пропорционально накоплению ПЦР продукта, и уравнение (1) может быть представлено как:

$$R_n = R_0x(E + 1)^n \quad (2).$$

Таким образом, начальная флуоресценция определяется как:

$$R_0 = R_n / (E + 1)^n \quad (3), \text{ где}$$

R_n — интенсивность флуоресценции в цикл n ,

R_0 — теоретическая начальная флуоресценция, которая пропорциональна начальному количеству вносимого ДНК.

Проводят измерение C_t (пороговый цикл) — точки, в которой флуоресценция достигает значений выше фоновых величин и ее изменение нарастает экспоненциально (первая производная даёт линейную зависимость). Далее в уравнении (3) - n соответствует C_t :

$$R_0 = R_{Ct} / (E + 1)^{Ct} \quad (4), \text{ где}$$

R_{Ct} представляет собой пороговый цикл, который устанавливается для каждой реакции или может быть общим для всех сравниваемых реакций. В этом случае уравнение (4) приобретает вид:

$$R_0 = 1 / (E + 1)^{C_t} \quad (5).$$

При использовании полуколичественного метода убеждались, что эффективность реакции для образца и гена «домашнего хозяйства» равны. В экспоненциальной фазе амплификационной кривой проводят измерение флуоресценции R1 — нижнее значение и R2 — верхнее значение и соответствующие значения C_t . Для измерения используют логарифмический график амплификационной кривой, так как на нем легче определить экспоненциальную фазу. Амплификационную эффективность (E) каждой реакции подсчитывают по уравнению:

$$E = (R2/R1)^{1/(C_{t2}-C_{t1})} \quad (6)$$

Конечным этапом определения относительной экспрессии гена является нормализация. Для нормализации полученных данных используют ген «домашнего хозяйства» — β -актин.

$$\text{относительная экспрессия гена} = R_{0x}/R_{0\beta} = (1 / (E+1)^{C_{tx}}) / (1 / (E+1)^{C_{t\beta}}) \quad (7)$$

Для определения влияния индуктора на экспрессию генов используют формулу:

$$\text{Изменение экспрессии гена} = 2^{-(\Delta C_t \text{ интерферон} - \Delta C_t \beta\text{-актин})} \quad (8), \text{ где}$$

$\Delta C_t = C_{t \text{ клеток после индукции}} - C_{t \text{ неиндуцированных клеток}}$;

$\Delta C_t \beta\text{-актин} = C_t \beta\text{-актин клеток после индукции} - C_t \beta\text{-актин неиндуцированных клеток}$.

4.1.6. Оценка полученных результатов

1. После проведения реакции устанавливают пороговый цикл, который применяется далее для всех реакций. На уровне этого порогового цикла определяют значение C_t для образца и для β -актина.

2. Определяют эффективности реакции, как указано выше. При правильной постановке реакции эффективность равняется 1.

3. Все данные вводят в формулу (7) и получают результат.

4. Для определения эффективности индуктора используют формулу (8). Полученное значение указывает на степень изменения экспрессии гена под воздействием индуктора.

Раздел V. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОКИН ПРОДУЦИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ НА ПРИМЕРЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ IL-8.

5.1. Выделение чистой взвеси нейтрофилов

Получение максимально чистой и минимально активированной популяции НГ – важное условие исследования. В методике выделения НГ используется классический метод выделения гранулоцитов на градиенте плотности (А.Войум, 1968).

Венозную кровь 1,5–2 мл наслаивают на двойной фиколл-верографиновый градиент плотности (1,093:1,077) в соотношении 1:1:1. Центрифугируют 20-25 минут при 1500 об/мин при 4°C. Удаляют кольцо мононуклеарных клеток. На границе между двумя градиентами плотности пастеровской пипеткой в центрифужные пробирки отбирают кольцо НГ. Клетки трижды отмывают 2-3 мл ЗФР с последующим центрифугированием каждый раз по 5 минут при 1500 об/мин, сливая надосадок. К осадку НГ, полученному после последней отмывки и центрифугирования добавляют 1 мл полной культуральной среды RPMI 1640 с 2 мМ L-глутамина с добавлением 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 40 мкг/мл гентамицина и 10 мМ HEPES-буфера.

В выделенной клеточной суспензии подсчитывают количество НГ с использованием камеры Горяева, доводя их до концентрации 1×10^6 кл/мл. По морфологическому анализу мазка (окрашивание по Романовскому) определяют чистоту взвеси. Методом эксклюзии трипанового синего определяют жизнеспособность клеток.

Технически точное выполнение данного варианта метода позволяет получить достаточно жизнеспособную (>98%) и чистую (>95-97%) популяцию НГ. Остальные 3-5% составляют другие гранулоциты (2-3,3%), лимфоциты (0,8-1,3%) и моноциты (0,2-0,4%). Клеточная взвесь с примесью эритроцитов или содержанием НГ <95% в дальнейших экспериментах использовать не рекомендуется, так как дополнительные процедуры очистки от контаминирующих клеток ведут к снижению жизнеспособности и/или усилению активации НГ в процессе выделения, что влияет на воспроизводимость результатов.

5.1.1. Определение жизнеспособности клеток (Кондратьева И.А., Самуилова В.Д., 2001)

Жизнеспособность клеток определяют методом эксклюзии трипанового синего. 0,1% раствор трипанового синего в дистиллированной воде смешивают с 0,1% раствором эозина в двукратном растворе Хенкса в соотношении 1:1. Добавляют в 0,5 мл полученного красителя 0,1 мл суспензии клеток в концентрации 1×10^6 клеток. Заполняют камеру Горяева и просчитывают 100 клеток. Живые клетки бесцветны и опалесцируют, мёртвые имеют синевато-фиолетовый цвет вследствие проникновения красителя через повреждённую

мембрану. Взвесь клеток считается жизнеспособной, если мёртвые клетки составляют не более 10-13%.

5.2. Культивирование нейтрофилов (модификация Кондратьевой И.А., Самуиловой В.Д., 2001)

При исследовании IL-8-продуцирующей способности НГ нами были проведены серии экспериментов *invitro* физиологическим раствором, липополисахаридом (ЛПС), γ -D-глутаминил-L-триптофаном (бестимом), глюкозаминилмурамилдипептидом (ГМДП).

В концентрации 1×10^6 кл/мл НГ вносят в стерильные пластиковые чашки Петри (d=60 мм) аликвотой в 1 мл и культивируют в полной культуральной среде RPMI 1640 с 2 мМ L-глутамин с добавлением 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 40 мкг/мл гентамицина и 10 мМ HEPES-буфера в 5% CO₂, при 37°C, 20 часов с ЗФР (спонтанная секреция, контроль), ЛПС в конечной концентрации 10 нг/мл (ЛПС-индуцированная секреция).

ГМДП и БС вносят в инкубационную среду в конечной концентрации 0,1 мкг/мл. Исследуется влияние препаратов на спонтанную продукцию IL-8 НГ и ЛПС-индуцированную. При инкубации НГ с препаратами и ЛПС совместно – препараты вносятся через 30 минут после начала инкубации НГ с ЛПС.

После инкубации культуральную жидкость отбирают в центрифужные пробирки, центрифугируют 5 минут при 1500 об/мин, отбирают и замораживают супернатант при -20°C до момента определения IL-8.

Для определения степени «ответа» на ЛПС рассчитывается **индекс стимуляции (ИС)** по формуле:

ИС = концентрация IL-8 в ЛПС стимулированном тесте / концентрация IL-8 в спонтанном тесте.

5.3. Иммуноферментный анализ определения IL-8.

Концентрацию IL-8 в супернатанте определяют методом твердофазного неконкурентного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем согласно инструкции к тест-набору. В основе технологии лежит непрямой «сэндвич»-метод.

Стандарты и образцы инкубируют вместе с биотилированными моноклональными (мышинными) антителами к IL-8 в покрытых стрептавидином ячейках микропланшета. В процессе инкубации IL-8, содержащийся в стандартах или образцах, адсорбируется на покрытых стрептавидином ячейках микропланшета с биотилированными моноклональными антителами. Стрипы затем промываются и инкубируются с пероксидазой хрена, меченой вторыми моноклональными антителами. После промывки в каждую ячейку добавляется буферный субстрат/хромогенный реагент, в результате происходит ферментативная реакция, в результате которой развивается окрашивание. Интенсивность окраски пропорциональна количеству IL-8, присутствующему в образце. Концентрация цитокина в образцах рассчитывается автоматически по калибровочной кривой. Чувствительность метода для IL-8 составляет 20 пг/мл.

Раздел VI. КОНТРОЛЬНЫЕ ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ И СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

6.1. Тестовый контроль

1. Для зрелых функционально активных нейтрофилов характерно:

- А. высокое содержание гликогена (ШИК-реакция)
- Б. фосфолипидов (реакция с Суданом черным Б)
- В. активности нафтол-ASD-хлорацетатэстеразы
- Г. щелочной фосфатазы
- Д. все перечисленное

2. Активность щелочной фосфатазы повышается:

- А. при бактериальных инфекциях
- Б. при вирусных инфекциях
- В. при инфекциях независимо от возбудителя
- Г. при любых стрессовых ситуациях
- Д. при беременности, родах, в послеродовом периоде

3. Кислая фосфатаза (гидролитический лизосомальный фермент) в гранулоцитарном ряду выявляется:

- А. в миелобластах
- Б. в промиелоцитах
- В. в миелоцитах и метамиелоцитах
- Г. только у зрелых нейтрофилов
- Д. со стадии миелобласта до зрелых нейтрофилов

4. Активность кислой фосфатазы максимальна:

- А. в миелобластах
- Б. в промиелоцитах
- В. в миелоцитах
- Г. метамиелоцитах
- Д. сегментоядерных нейтрофилах

5. В период обострения воспалительного процесса, как правило, происходит:

- А. активация щелочной и кислой фосфатазы в нейтрофилах
- Б. снижение щелочной и кислой фосфатазы в нейтрофилах
- В. активация щелочной фосфатазы и снижение кислой фосфатазы в нейтрофилах
- Г. снижение щелочной и активация кислой фосфатазы в нейтрофилах
- Д. уровень ферментов не меняется

6. Реакция на миелопероксидазу:

- А. специфична для клеток гранулоцитарного ряда
- Б. проявляется во всех клетках крови
- В. активность фермента выявляется на всех стадиях созревания
- Г. характерна для зрелых нейтрофилов
- Д. не характерна для созревающих нейтрофилов

7. Нейтрофилы:

- А. образуются в селезёнке
- Б. секретируют гистамин
- В. синтезируют Ig
- Г. всё вышесказанное верно
- Д. всё вышесказанное неверно

8. По современным представлениям нейтрофильные гранулоциты:

- А. участвуют в фагоцитозе
- Б. синтезируют цитокины
- В. активно перемещаются
- Г. участвуют в гуморальном и клеточном иммунитете
- Д. все перечисленное верно

9. Показатели активности фагоцитоза:

- А. процент фагоцитирующих нейтрофилов (процент фагоцитоза)
- Б. среднее число поглощенных микробов (фагоцитарное число)
- В. абсолютный фагоцитарный показатель (ФАН абс.) – количество микробов, которое могут поглотить фагоциты 1 литра крови
- Г. определение индекса завершенности фагоцитоза (%П)
- Д. все перечисленное

10. Дефекты фагоцитоза наблюдаются при:

- А. нейтропениях
- Б. нарушении поглощающей и переваривающей способности фагоцитов
- В. нарушении хемотаксиса
- Г. дефиците миелопероксидазы
- Д. все перечисленное верно

11. Причинами незавершенного фагоцитоза могут быть:

- А. Избыточное количество глюкокортикоидов в крови
- Б. Недостаточность микробицидной активности нейтрофилов, моноцитов/макрофагов
- В. Лейкопении, дефицита опсонинов
- Г. Активации системы комплемента
- Д. все перечисленное

12. Деструкцию тканей вызывают следующие продукты секреции нейтрофилов:

- А. токсические метаболиты кислорода
- Б. ферменты гранул
- В. продукты метаболизма арахидоновой кислоты
- Г. все перечисленное

13. При нейтропении пул циркулирующих клеток формируется за счет:

- А. выхода клеток из костного мозга и мобилизации пула пристеночных нейтрофилов
- Б. выхода нейтрофилов из тканей
- В. все перечисленное верно
- Г. все перечисленное неверно

14. Основные цитокины, участвующие в воспалительных процессах:

- А. фактор некроза опухоли
- Б. интерлейкин-1
- В. интерлейкин-6
- Г. интерфероны альфа и гамма
- Д. интерлейкин-8 и другие хемокины
- Е. все перечисленные

15. Основные цитокины – регуляторы кроветворения:

- А. эритропоэтин
- Б. интерлейкин-1
- В. интерлейкин-3
- Г. Тромбопоэтин
- Д. фактор, стимулирующий образование колоний гранулоцитов и моноцитов
- Е. все перечисленное

16. К системным эффектам провоспалительных цитокинов относят:

- А. повышение температуры тела
- Б. скопление нейтрофилов и макрофагов
- В. лейкоцитоз
- Г. увеличение синтеза белков острой фазы
- Д. активация процессов свертывания крови в очаге поражения
- Е. все перечисленное

17. Функции клеток фагоцитарной системы:

- А. защита организма от чужеродных микроорганизмов путем киллинга (убийства) и переваривание их
- Б. роль клеток-“мусорщиков”, убивающих и разрушающих собственные клетки организма – поврежденные, дефектные, старые
- В. секреция биологически активных веществ, регулирующих образование других иммунокомпетентных клеток; презентация чужеродного антигена Т-лимфоцитам
- Г. все перечисленное верно

18. Основные фазы фагоцитоза:

- А. направленное движение фагоцита к объекту фагоцитоза (положительный хемотаксис)
- Б. прикрепление к объекту (адгезия), захват объекта, образование фагосомы
- В. слияние фагосомы с лизосомами и образование фаголизосомы, убийство (киллинг) живого объекта
- Г. переваривание и обработка антигена для представления другим иммунокомпетентным клеткам
- Д. все перечисленное

19. Степень усиления активности НВТ-теста зависит

- А. от стадии, остроты патологического процесса
- Б. формы клинических проявлений
- В. наличия сопутствующих заболеваний
- Г. характера осложнений
- Д. от всего перечисленного.

20. Иммунные нарушения, нехарактерные для хронической гранулематозной болезни:

- А. признаки незавершенного фагоцитоза нейтрофилов
- Б. резкое снижение или отсутствие результатов НСТ-теста
- В. снижение бактериальной активности фагоцитов за счет недостаточности НАДФ-оксидазы и низкого уровня H_2O_2
- Г. нарушение бактерицидного эффекта фагоцитов за счет дефекта миелопироксидазы.
- Д. процесс фагоцитоза не сопровождается хемиллюминесценцией

Ответы на тестовые задания

1-Д	5-А	9-Д	13-В	17-Г
2-А,Г,Д	6-А,В	10-Д	14-Е	18-Д
3-Д	7-Д	11-Д	15-Е	19-Д
4-Б	8-Д	12-Г	16-Е	20-Г

6.2. Ситуационные задачи (обучающие)

Задача 1. Как может повлиять на конечный результат неточное гейтирование при подсчете клеток с помощью проточной цитометрии?

- А. Никак не повлияет
- Б. Подсчет нужной популяции клеток будет неточным
- В. Результат будет завышен
- Г. Результат будет занижен

Ответ: Б. Подсчет нужной популяции клеток будет неточным. Гейтирование является этапом выбора исследуемой популяции клеток. Неправильное выполнение этой процедуры приводит к ошибке в подсчете клеток данной популяции. При этом невозможно определить будет ли результат подсчета завышен или занижен.

Задача 2. Какое утверждение лучше всего описывает иммунофенотипирование?

- А. Определение линейного происхождения клеток путем обнаружения мембранных антигенов с помощью флуоресцентно меченые антител
- Б. Определение зрелости клеток с помощью антител к ядерным антигенам
- В. Идентификация и сортировка клеток по прямому и боковому светорассеянию
- Г. Анализ методами агглютинации собранных с помощью проточной цитометрии клеток

Ответ: А. Определение линейного происхождения клеток путем обнаружения мембранных антигенов с помощью флуоресцентно меченые антител. Иммунофенотипирование используется для классификации клеток по их происхождению (линейности) и степени зрелости с использованием наборов флуоресцентно меченых антител к определенным мембранным антигенам. Используемые антитела обозначаются соответствующим CD номером (от англ. Cluster of differentiation — кластер дифференцировки). Моноклональные антитела, имеющие общий CD номер, связываются с одним и тем же

антигеном, но не обязательно с одними и теми же эпитопами данного антигена. Связывание тех или иных антител панели с поверхностными антигенами позволяет отличать лимфоидные клетки от миелоидных и идентифицировать этапы их созревания.

Задача 3. Что из нижеперечисленного содержится в первичных гранулах нейтрофилов?

- А. Лактоферрин
- Б. Миелопероксидаза
- В. Гистамин
- Г. Щелочная фосфатаза

Ответ: Б. Миелопероксидаза. В первичных гранулах нейтрофилов содержится миелопероксидаза, лизоцим и кислая фосфатаза. Вторичные и третичные гранулы содержат лактоферрин, коллагеназу, НАДФН-оксидазу и щелочную фосфатазу.

Задача 4. Фагоцитоз – это процесс поглощения фагоцитами микробных клеток, вирусов и собственных клеток организма. Какие из показателей характеризуют функции захвата, какие функцию переваривания?

Ответ: Для характеристики процессов захвата используются показатели %ФАН (процент активно фагоцитирующих нейтрофилов), ФЧ(фагоцитарное число) и ФИ(фагоцитарный индекс) - способность к поглощению антигена). Для характеристики переваривающей способности нейтрофильных гранулоцитов используются показатели - %П (%переваривания) и ИП(индекс переваривания 1 нейтрофилом).

6.3. Ситуационные задачи для самостоятельного решения

Задача 1. У больного с сахарным диабетом имеется склонность к фурункулезу и другим инфекционно-воспалительным процессам. С чем это связано? **Ответ:**

Задача 2. При микроскопии препарата крови тестирующего фагоцитарную функцию НГ отмечено снижение процессов захвата АГ и переваривания. Какие причины лежат в основе такого рода нарушений фагоцитоза? **Ответ:**

Задача 3. Пациенту 20 лет, жалобы на гнойные ангины 2 раза в год. В клиническом статусе увеличение и склерозирование небных миндалин, наличие казеозных масс в лакунах миндалин. Что можно предположить при иммунологических показателях: L - $4,25 \times 10^9$ /л, %НГ- 28%, %ФАН-41%, %П-50%? **Ответ:**

Задача 4. Ребенок М. (мальчик), доношенный, 10 суток, находился в отделении реанимации с диагнозом: Поздний неонатальный сепсис. По лабораторным показателям: уровень лейкоцитов 39,9 г/л, из них гранулоцитов 31,4%, уровень СРБ 36 мг/л, уровень прокальцитонина > 2 нг/мл. Уровень CD64⁺CD32⁺CD11b⁺ составил 94,2%, что более чем в 57 раз выше показателей здоровых доношенных детей ($1,63 \pm 0,68\%$). О чем свидетельствует значительное увеличение популяции CD64⁺CD32⁺CD11b⁺НГ? **Ответ:**

ПРИЛОЖЕНИЕ 1.

Список полученных патентов на изобретения по методам исследования и коррекции дисфункций нейтрофильных гранулоцитов.

- 1.Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Авдеева М.Г., Чудилова Г.А., Ковалева С.В., Ломтатидзе Л.В. Способ дифференциальной экспресс-диагностики острых вирусных и бактериальных инфекций. // 2602677.
- 2.Нестерова И.В., Смерчинская Т.В., Ломтатидзе Л.В., Сапун О.И., Клещенко Е.И., Чудилова Г.А. Способ диагностики гнойно-септических заболеваний у новорожденных детей. // 2484479
- 3.Нестерова И.В., Синьков С.В., Швыдченко И.Н., Роменская В.А., Фомичева Е.В. Способ прогнозирования развития генерализованных осложнений при остром деструктивном панкреатите. // 2393771.
- 4.Нестерова И.В., Швыдченко И.Н., Капранова Н.П., Быковская Е.Ю., Николаев В.В. Способ прогнозирования риска развития деструктивных изменений слизистой оболочки гастродуоденальной зоны. // 2391915.
- 5.Нестерова И.В., Фомичева Е.В. Способ прогнозирования развития гнойных осложнений при хирургическом лечении язвенной болезни двенадцатиперстной кишки, осложненной стенозом. // 2237251.
- 6.Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Колесникова Н.В. Средство для коррекции дисфункций нейтрофильных гранулоцитов. // 2112513.
- 7.Колесникова Н.В., Нестерова И.В., Чудилова Г.А. Способ моделирования иммунодефицитного состояния у экспериментальных животных // 2123702.
- 8.Нестерова И. В., Светличная М. А. Способ определения функционального потенциала нейтрофильных гранулоцитов по реализации неферментных катионных белков // Изобретение по заявке 4290225/28-14,1987.
- 9.Нестерова И.В., Чудилова Г.А. Способ определения функционального потенциала нейтрофилов по расходованию хлорацетат-AS-D-эстеразы. // 2082972.
- 10.Нестерова И.В. Лызарь О.Г. Способ контроля оптимальной физической нагрузки детям 6 - 10 лет. // 2106797.
- 11.Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Рожкова Г.Г. Способ определения розеткообразующей реакции нейтрофилов. // 1758556.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Ответы на ситуационные задачи для самостоятельного решения

Задача 1. Ответ: Склонность к фурункулезу и гнойно-воспалительным заболеваниям при сахарном диабете связана с ослаблением иммунной системы организма. Отмечается снижение количества и функциональной активности Т-лимфоцитов, депрессия фагоцитоза, нарушения гуморального иммунитета (дефицит иммуноглобулинов М).

Задача 2. Ответ: В данном мазке отмечается картина незавершенного фагоцитоза, который нередко возникает при длительно текущем, хроническом воспалительном заболевании. К незавершенному фагоцитозу также приводят следующие факторы:

- Недостаточность миелопероксилазы;
- Низкая эффективность опсонизации объекта фагоцитоза;
- Мембрано- и ферментопатии лизосом;
- Дефицит или недостаточная экспрессия молекул адгезии;
- Недостаточный эффект регуляторов процесса фагоцитоза.

Задача 3. Ответ. У пациента при нормальном общем количестве лейкоцитов и нейтрофильных гранулоцитов снижено количество активно фагоцитирующих нейтрофилов, переваривающая способность нейтрофилов сохранена. Данный ответ системы НГ свидетельствует об их неадекватном ответе на имеющуюся длительную бактериальную антигенную нагрузку – дисфункция НГ с клиническими проявлениями в виде хронического воспалительного процесса в лимфоузловом кольце (небные миндалины) – хронического тонзиллита.

Задача 4. Ответ. Появление популяции $CD64^+CD32^+CD11b^+$ НГ отражает тяжесть воспалительного бактериального процесса и является прогностически неблагоприятным признаком.

Основная литература

1. Клиническая лабораторная диагностика. Национальное руководство. Т.1,2. Под ред. В.В. Долгова, В.В. Меньшикова. - М.:ГЭОТАР-Медиа, 2012.,808с.
2. Иммунология. Учебник. Ярилин А.А., М.: ГЭОТАР- Медиа, 2010, 752с.
3. Гематологическая цитохимия.ХейхоуФ.Г.Дж., Кваглино Д.- М.:Медицина,1983.-320с.
4. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. Назаренко Г.И., Кишкун А.А.-М.: Медицина. - 2000. — 544 с.

Дополнительная литература

1. Карпищенко А.И. Медицинская лабораторная диагностика: программы и алгоритмы. М.: "ГЭОТАР-МЕД", 2014. - 696 с.
2. Бережная Н.М. Нейтрофилы и иммунологический гомеостаз / Н.М. Бережная Киев, 1988. - 202 с.
3. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб: Фолиант, 2008. -552 с.

4. Фрейдлин И.С., Тотолян А.А. Клетки иммунной системы ч. I-II, СПб: Наука, 2000. – 231 с.
5. Фрейдлин И.С., Тотолян А.А. Клетки иммунной системы ч. III-IV, СПб: Наука, 2001. – 390 с.
6. Хаитов Р.М. Иммунология: учебник.- М.: ГЭОТАР-Медиа, 2-е издание. - 2011. - 528 с.
7. Хаитов Р.М., Ярилин А.А., Пинегин Б.В. Иммунология. Атлас. Издательство «ГЭОТАР-Медиа», 2011г.
8. Пинегин Б.В. Хаитов Р.М. Ярилин А.А. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы. ГЭОТАР-Медиа, 2009 г.

Список литературы, использованной авторами-составителями

1. Герасимов И.Г. Функциональная неоднородность нейтрофилов. // Клиническая лабораторная диагностика. - 2006. – N. 2. – С. 34–36.
2. Долгушин И.И., Шишков Ю.С., Савочкина А.Ю. Нейтрофильные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. // М.: РАМН. -2009. – 203 с.
3. Cassatella M. A., Locati M., Mantovani A. Never underestimate the power of a neutrophil. // Immunity. – 2009. – N.31. – P. 698 – 700.
4. Cheng O.Z., Palaniyar N. NET balancing: a problem in inflammatory lung diseases. // Front Immunol. – 2013. - N. 24. – P. 4.
5. Courtney Frasci S., Fernandez-Boyanapalli Ruby F. et al. Neutrophils Regulate Tissue Neutrophilia in Inflammation via the Oxidant-modified Lipid Lysophosphatidylserine. // The Journal of Biological Chemistry. - 2013. - N. 288. - P. 4583 - 4593.
6. De Oliveira-Junior E. B., Bustamante J., Newburger P. E., Condino-Neto A. The Human NADPH Oxidase: Primary and Secondary Defects Impairing the Respiratory Burst Function and the Microbicidal Ability of Phagocytes. // Scandinavian Journal of Immunology. –2011.- V. 73, N.5. –P. 420-427.
7. Elghetany M. T. Surface Antigen Changes during Normal Neutrophilic Development: A Critical Review. // Blood Cells, Molecules, and Diseases. – 2002.- V.28, N. 2. – P. 260–274.
8. Gupta A.K. et al. // Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. // Human Immunology. – 2005. – N. 66. – P. 1146 - 1154.
9. Hamon V.F., Cossart P. Histone modifications and chromatin remodeling during bacterial infections. // Cell Host Microbe. – 2008. – V.4, N.2. -P. 100-109.
10. Klebanoff S.J., Kettle A.J., Rosen H., Winterbourn C.C., Nauseef W.M. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. // J. Leukoc. Biol. – 2013. – V. 93, N.2. – P.185-198.
11. Mantovani A., Cassatella M.C., Costantini C., Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. // Nature Reviews Immunology. – 2011. – N. 11. – P. 519 - 531.

12. Metelitsa L.S., Gillies S.D., Super M., Shimada H., Reynolds C.P. et al. Antidisialogangliosid/granulocyte macrophage-colony-stimulating factor fusion protein facilitates neutrophil antibody-dependent cellular cytotoxicity and depends on fc-gammaRII (CD32) and Mac-1 (CD11b/CD18) for enhanced effector cell adhesion and azurophil granule exocytosis. // *Blood*. – 2002. – V. 99 – P. 4166 – 4173.

13. Pillay J., Tak T., Kamp V. M., Koenderman L. Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2013. V.70. – P. 3813–3827.

Научные публикации, в которых использованы предложенные методы диагностики системы нейтрофильных гранулоцитов.

1. Нестерова И.В., Швыдченко И.Н., Быковская Е.Ю., Роменская В.А., Фомичева Е.В., Рожкова Г.Г., Ковалева С.В., Расторгуева Е.А. Дифференцированные влияния стимуляции *invitro* на фенотип и функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов в норме и при осложненном остром деструктивном панкреатите. // *Иммунология*.-2009.-Т. 30, №5.-С.283-286.

2. Нестерова И.В., Ковалёва С.В., Фомичева Е.В., Ющенко А.В., Евглевский А.А., Ломтатидзе Л.В. Профили активности цитотоксических и цитолитических механизмов нейтрофильных гранулоцитов при неопластических заболеваниях пищеварительной системы. // *Российский иммунологический журнал*.- 2010. –Т.4 (13) - №3 – С. 267-275.

3. Нестерова И.В., Ковалёва С.В., Чудилова Г.А., Коков Е.А., Ломтатидзе Л.В., Сторожук С.В., Уваров И.Б., Казанцева М.В. Особенности фенотипа нейтрофильных гранулоцитов при неопластических процессах. // *Российский иммунологический журнал*.-2010. – Т.4 (13).- №4 – С. 374-380.

4. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Евглевский А.А., Фомичева Е.В., Ковалёва С.В., Ломтатидзе Л.В. Спонтанная и индуцированная реструктуризация хроматина ядер нейтрофильных гранулоцитов при остром деструктивном панкреатите в стадии гнойных осложнений. // *Цитокины и воспаление*.- 2010.- Т.9. - №2.- с. 13-17.

5. Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Коков Е.А., Сторожук С.В. Особенности трансформации фенотипа субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD64(-)CD32(+)CD16(+)CD11b(+) и CD64(+)CD32(+)CD16(+)CD11b(+) пациентов с колоректальным раком под влиянием Г-КСФ, ИФН α и ИФН γ в системе *invitro*// *Аллергология и иммунология*. – 2011. – Т.12. - №3. – с.265-268.

6. Нестерова И.В., Евглевский А.А., Фомичева Е.В., Колесникова Н.В., Ковалёва С.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Коков Е.А., Кокова Л.Н. Особенности спонтанной и индуцированной реструктуризации хроматина и функционирования кислородзависимых цитотоксических механизмов нейтрофильных гранулоцитов при колоректальном раке. // *Российский иммунологический журнал*.- 2011.-Т. 5(14). - № 3-4, с. 254 – 261.

7. Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Chudiliva G.A., Lomtatidze L.V. Defects in

- functioning of interferon and immune systems and their correction in chronic active Epstein-Barr infection. -Allergy, Asthma & Immunophysiology: from basic science to clinical application. – Medimond International Proceedings, 2012.- С. 187 – 191
- 8.Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Евглевский А.А. Двойственная роль нейтрофильных гранулоцитов в реализации противоопухолевой защиты.// Иммунология.-2012.- №5.- С.281-287.
- 9.Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Клешенко Е.И., Тараканов В.А., Смерчинская Т.В., Сапун О.И., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Фомичева Е.В., Кокова Л.Н., Стрюковский А.Е. Различные варианты дефектов функционирования нейтрофильных гранулоцитов при врожденных пневмониях у новорожденных. // Российский иммунологический журнал. - 2012.- Т.6 (15), №2. - С.170-175.
- 10.Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Евглевский А.А., Колесникова Н.В., Фомичева Е.В., Коков Е.А. Особенности ремоделирования фенотипа и функциональных возможностей нейтрофильных гранулоцитов пациентов с колоректальным раком под влиянием G-CSF в системе *in vitro*. // Иммунология.-2012.-№6.- С. 306-311
- 11.Нестерова И.В., Ковалева С.В., Клешенко Е.И., Алексеева–Шинкарева О.Н., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Кокова Л.Н., Сторожук С.В. Особенности фенотипа и функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов у иммунокомпрометированных детей с повторными ОРВИ ассоциированными с различными герпесвирусными инфекциями. // Российский аллергологический журнал.-2012. - №5(1). – С.185-186.
- 12.Колесникова Н.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Сторожук С.В., Крутова В.А., Опрышко В.С., Нестерова И.В. Фенотипические особенности нейтрофильных гранулоцитов у женщин на этапе предгравидарной подготовки. // Российский аллергологический журнал. – 2012. - №5(1). – С.183-184
- 13.Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Тараканов В.А., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Коков Е.А., Кокова Л.Н., Стрюковский А.Е., Сторожук С.В., Ковалева С.В. Различные субпопуляции нейтрофильных гранулоцитов у здоровых детей и их вариабельность при гнойно-воспалительных заболеваниях. // Российский Аллергологический Журнал.-2012.-№5 (1).- с.187-188.
- 14.Евглевский А.А., Нестерова И.В., Ковалева С.В. Особенности реструктуризации хроматина нейтрофильных гранулоцитов при хроническом миелолейкозе. // Российский иммунологический журнал. – 2012.- Т.6 (15), №4. – С.384-387.
- 15.Евглевский А.А., Фомичева Е.В., Ковалева С.В., Нестерова И.В. Варианты реструктуризации хроматина нейтрофильных гранулоцитов при различных видах патологии и их диагностическое значение. // Аллергология и иммунология.- 2013.- Т. 14.- № 1. – С. 19-20
- 16.Нестерова И.В., Ковалёва С.В., Клешенко Е.И., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Шинкарева О.Н., Малиновская В.В., Выжлова Е.Н. Новые подходы к

- проведению интерфероно- и иммуномодулирующей терапии у иммунокомпрометированных детей с возвратными ОРВИ, ассоциированными с герпесвирусными инфекциями. // Лечащий врач.-2014.-№4.- С.107-111.
- 17.Нестерова И.В.,Ковалёва С.В., Евглевский А.А., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Фомичева Е.В.Ремоделирование структуры хроматина и изменение фенотипа нейтрофильных гранулоцитов под влиянием G-CSF у больных колоректальным раком в системе invitro. // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 3; URL: www.science-education.ru/117-13006 (дата обращения:22.05.2014).
- 18.Нестерова И.В., Ковалева С.В., Клещенко Е.И, Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Шинкарева О.Н., Парфенов В.В., Кольцов В.Д. Оптимизация тактики интерфероно- и иммунотерапии в реабилитации иммунокомпрометированных детей с повторными респираторными и герпетическими вирусными инфекциями. // Педиатрия. – 2014.- Т.93, №3.-С.66-72.
- 19.Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалёва С.В., Сапун О.И., Клещенко Е.И., Смерчинская Т.В. Ремоделирование фенотипа субпопуляций CD64–CD16+CD32+CD11b+ и CD64+CD16+CD32+CD11b+ нейтрофильных гранулоцитов при врожденной пневмонии у глубоко недоношенных новорожденных. // Российский иммунологический журнал. – 2014.- Т.8 (17), №1. – С.48-53.
- 20.Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А. Нейтрофильные гранулоциты: новые роли старых игроков. // Физиология и патология иммунной системы(ФИПИС), 2014. – Т. 18, №10, стр. 3-25.
- 21.Нестерова И.В., Евглевский А.А., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Калашников А.Е. Дифференцированность индуцированной экспрессии генов ИЛ-8, ИЛ-1 β и ФНО α в нейтрофильных гранулоцитах под влиянием ГМДП и ИФН γ в системе invitro у здоровых субъектов и пациентов с хроническим гайморитом. // Аллергология и иммунология.- 2014.- Т. 15.- № 2. – С. 105-108.
- 22.Нестерова И.В., Тараканов В.А., Ковалёва С.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., СтрюковскийА.Е. Дифференцированная трансформация фенотипа субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов у иммунокомпрометированных детей с рецидивирующими вирусными и бактериальными инфекциями. // Ж.Аллергология и иммунология 2014, том15, №1, с.46-47.
- 23.Нестерова И.В., Клещенко Е.И, Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Сапун О.И. Различный образ действия субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов- партнеров миелоидной фагоцитарной системы, экспрессирующих одинаковые мембранные маркеры, у глубоко недоношенных новорожденных с врожденной пневмонией. // Ж.Аллергология и иммунология 2014, том 15, №1, с.42-43.
- 24.Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Клещенко Е.И, Смерчинская Т.В., Сапун О.И. Особенности трансформации экспрессии CD62L, CD63 на мембране нейтрофильных гранулоцитов при врожденной

пневмонии у доношенных новорожденных. // Ж.Аллергология и иммунология 2014, том 15, №3, с.219-220.

25. Колесникова Н. В., Ковалева С. В., Нестерова И. В., Чудилова Г. А., Ломтатидзе Л. В. Коррекция нарушений рецепторной функции нейтрофильных гранулоцитов на этапе прегравидарной подготовки. // Российский иммунологический журнал, 2014, Т.8(17), №3 – с. 697-699

26. Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Chudilova G.A., Lomtadze L.V., Malinovskaja V.V. The positive transformation of the phenotype, the functional activity of neutrophilic granulocytes in children with recurrent respiratory infections as treatment' results of interferon and immunomodulation therapy. - ALLERGY, ASTHMA & IMMUNOPHYSIOLOGY: Recent Advances in Understanding and Management (Singapore – April 26-29, 2015). – MEDIMOND International Proceedings, 2015. – P.69-72.

27. Nesterova I.V., Chudilova G.A., Lomtadze L.V., Kleschenko E., Kovaleva S., Smerchinskaja T., Sapun O. Three neutrophilic granulocyte's subpopulations CD62L^{dim+}CD63^{dim+}, CD62L^{bright+}CD63^{dim+} and CD62L^{dim+}CD63^{mid+} in newborns with congenital pneumonia. // Allergy © 2015 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd, 70 (Suppl. 101), p217.

28. Колесникова Н.В., Нестерова И.В., Павлюченко И.И., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Крутова В.А. Предгравидарная иммунокоррекция дисфункций в системе врожденного иммунитета. // Российский иммунологический журнал, 2015.- Т.9 (18), №1 (1). – с. 106-108

29. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А. Нейтрофильные гранулоциты: новый взгляд на «старых игроков» на иммунологическом поле. // Иммунология, 2015.- Т.35, №4. – с. 257 – 265.

30. Нестерова И.В., Евглевский А.А., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Калашников А.Е. Особенности реструктуризации хроматина и изменение уровня относительной экспрессии генов IL8, IL-1β и TNFα нейтрофильных гранулоцитов под влиянием глюкозаминилмурамилдипептида и интерферона-γ у больных хроническим гайморитом в системе invitro. // Иммунология, 2015.- Т.36, №6. – с. 363 – 367.

31. Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Малиновская В.В. Перепрограммирование фенотипа и функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов у иммунокомпрометированных детей с возвратными вирусно-бактериальными инфекциями на фоне интерферона- и иммунотерапии. // Ж.Аллергология и иммунология 2015, том 16, №3, с.274-275.

32. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А. TLR-9 – опосредованные механизмы иммуотропных эффектов деривата при дефектах фагоцитарной и микробицидной функции нейтрофильных гранулоцитов. // Российский иммунологический журнал, 2015. – Т.9 (18), №2 (1). – с. 18-19.

- 33.Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Колесникова Н. В., Нестерова И.В. Новые иммунологические биомаркеры острых вирусных и бактериальных инфекций: детекция дифференцированной трансформации фенотипа нейтрофильных гранулоцитов. // Ж.Аллергология и иммунология 2015, том 16, №4, с.383.
- 34.Ковалева С.В., Нестерова И.В., Асланян И.Э., Тулендинова А.И. Эффективность интерфероно- и иммунотерапии у иммунокомпрометированных девочек с неспецифическими хроническими рецидивирующими вульвовагинитами. // Российский иммунологический журнал, 2016. – Т.10 (19), №2 (1). – с. 470-472.
- 35.Смерчинская Т.В., Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ковалева С.В., Ломтатидзе Л.В., Клещенко Е.И., Сапун О.И. Варианты дефектного функционирования иммунной системы новорожденных с врожденной пневмонией тяжелого течения. // Российский иммунологический журнал, 2016. – Т.10 (19), №2 (1). – с. 339-341.
- 36.Евглевский А.А., Нестерова И.В., Ковалева С.В. Особенности реструктуризации хроматина нейтрофильных гранулоцитов при различных видах патологии и их диагностическое значение. // Российский иммунологический журнал, 2016. – Т.10 (19), №2 (1). – с. 84-86.
- 37.Евглевский А.А., Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ковалева С.В., Ломтатидзе Л.В. Хроматин ядер нейтрофильных гранулоцитов здоровых людей: фракции, спонтанная и индуцированная реструктуризация, ассоциированность с экспрессией генов цитокинов. // Аллергология и иммунология 2016, Т 17, №2, с.100-103.
- 38.Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Крутова В.А., Малиновская В.В. Эффективность комбинированной интерфероно- и иммунотерапии при хронических инфекционно-воспалительных заболеваниях генитального тракта у женщин. // Аллергология и иммунология 2016, Т 17, №2, с.147-148.
- 39.Evglevsky A.A., Nesterova I.V., Chudilova G.A., Lomtatidze L.V., Kovaleva S.V. Features of spontaneous and induced restructurization of the nucleus chromatin of neutrophilic granulocytes of healthy people. - ALLERGY, ASTHMA & IMMUNOPHYSIOLOGY: INNOVATIVE TECHNOLOGIES. – FILODIRITTO International Proceedings, 2016. – P.327-332.
- 40.Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Колесникова Н.В., Авдеева М.Г., Русинова Т.В. Дифференцированность вариантов субпопуляций трансформированного фенотипа CD16⁺CD11b⁺ нейтрофильных гранулоцитов при острой вирусной и острой бактериальной инфекциях. // Иммунология, 2016.-Т.37, №4. – с. 199 – 204.
- 41.Русинова Т.В., Чудилова Г.А., Колесникова Н.В. Сравнительная оценка иммуотропных эффектов invitродерината и синтетического агониста TLR9 на рецепторную функцию нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов в норме и при инфекционном процессе. // Кубанский научный медицинский вестник, 2016.-№5 (160).- С.94-97.