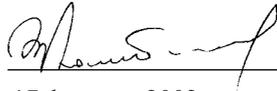


**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра



В.В. Колбанов

17 февраля 2003 г.

Регистрационный № 28–0203

**МЕТОД ОЦЕНКИ СПОНТАННОГО
ПОВРЕЖДЕНИЯ НЕЙТРОФИЛОВ
НА ОСНОВЕ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО
МИКРОСПЕКТРАЛЬНОГО АНАЛИЗА**

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: НИИ экологической и профессиональной патологии

Авторы: канд. биол. наук А.М. Горчаков, канд. мед. наук Н.Г. Кручинский, Ф.Т. Горчакова

ВВЕДЕНИЕ

Метод оценки спонтанного повреждения нейтрофилов крови предназначен для комплексной диагностики и анализа нарушений неспецифической резистентности организма в условиях клиники.

МЕТОДОЛОГИЯ

Иммунологическая защита организма обеспечивается специфическими и неспецифическими механизмами. Такое деление достаточно условно, поскольку в организме эти механизмы теснейшим образом интегрированы.

Базовым элементом системы иммунной защиты организма являются иммунокомпетентные клетки крови (ИКК). Это прежде всего лимфоциты и моноциты/макрофаги (их также принято называть мононуклеарными лейкоцитами), а также полиморфноядерные лейкоциты (гранулоциты), которые играют исключительно важную роль в обеспечении неспецифической иммунологической защиты организма.

Принимая во внимание вышеизложенное, можно утверждать, что функциональное зондирование нейтрофилов имеет важное клиническое значение. Во-первых, тесты с нейтрофилами можно использовать для определения резервов иммунитета, т.е. в традиционном аспекте. Во-вторых, получаемая таким образом информация полезна для суждения о глубине и динамике общих нарушений гомеостаза независимо от природы заболевания или внешнего воздействия. Если первое направление нацелено на выявление эффекторных ресурсов нейтрофилов, то во втором случае нейтрофилы (их реактивные сдвиги) используются в качестве индикаторов или маркеров возможной патологии.

В качестве тестов могут быть использованы любые реактивные сдвиги, которые регистрируются чувствительными, простыми и воспроизводимыми методами.

Согласно учению об общем адаптационном синдроме, любая болезнь связана с возникновением стрессового состояния в силу нарушений физиологического гомеостаза организма и изменений в психоэмоциональной сфере больного. Как известно, при стрессе в первую очередь повреждается мембранный аппарат циркулирующих ИКК из-за повышения в крови уровня глюкокортикостероидов и индукции процессов перекисного окисления липидов в мембра-

нах. Свой вклад в повреждение клеток вносит и индуцированный глюкокортикоидами процесс апоптоза. Очевидно, что клетки с поврежденной плазматической мембраной нежизнеспособны. Поврежденная мембрана перестает выполнять барьерные функции, вследствие чего клетка теряет трансмембранный потенциал, что приводит к нарушениям клеточного гомеостаза, несовместимым с жизнью клетки. Термин «спонтанное повреждение лейкоцитов» подразумевает именно такое положение вещей.

Помимо поверхностной мембраны, при неблагоприятных воздействиях на организм страдают и внутриклеточные мембранные структуры, которые обеспечивают компартментализацию клетки. Деструкция клеток развивается постепенно, а не одновременно, поэтому они какое-то время могут функционировать. Но в случае ИКК это может быть более опасно для организма, чем просто их гибель. Клетки, выполняющие в организме «цензорные» функции, при развитии в них регуляторных, структурных и метаболических нарушений могут при выполнении своих «привычных» функций нанести больше вреда организму, чем просто своей гибелью. Поэтому анализируя уровень повреждения мембранного аппарата лейкоцитов крови, можно достаточно объективно судить как об уроне, понесенном иммунной системой в экстремальных ситуациях, так и о тяжести патологического процесса в целом.

Процессы, индуцирующие и сопровождающие повреждение клеток, и методы оценки их жизнеспособности рассматривались неоднократно. При этом следует отметить перспективность использования в этих случаях люминесцентного анализа клеток с применением флуоресцентных зондов и микрофлуориметрической техники.

Для оценки состояния мембран лейкоцитов могут быть использованы как инструментальные методы в виде люминесцентного микроспектрального анализа клеток и двухволновой микрофлуориметрии (рис. 1–4), так и визуальный анализ под люминесцентным микроскопом. Если первый подход более точен, то второй быстрее по исполнению.

Для исследования состояния плазматической мембраны живых лейкоцитов мы рекомендуем использовать двойное флуорохромирование клеток акридиновым оранжевым (АО) и этидиум бромидом (ЭБ). Первый флуорохром вызывает зеленое свечение клеток,

второй — красное. У нативных лейкоцитов плазматическая мембрана практически непроницаема для ЭБ, только при повреждении поверхностная мембрана начинает пропускать его внутрь клетки, где он и окрашивает ядро. АО в низкой концентрации (10^{-6} моль) используется только в целях визуализации клеток.

Часто лейкоциты еще не поглощают ЭБ, но уже имеют дефект мембран. Для выявления такого дефекта достаточно выдержать готовые препараты в термостате при 37°C в течение 40 мин. Если исследуемая клетка уже получила повреждение в силу внутренней интоксикации, она, естественно, окажется менее устойчивой к внешнему воздействию. Таким образом, есть возможность оценить устойчивость одного из наиболее важных звеньев иммунной системы и потенциальную угрозу для организма в целом.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Люминесцентный метод оценки спонтанного повреждения мембранного аппарата лейкоцитов крови рекомендуется применять в следующих случаях:

- выявление нарушений и отклонений в системах защиты организма при первичном клинико-лабораторном исследовании;
- динамическое наблюдение (мониторинг) за состоянием систем защиты и организма в целом (наличие стресса, интоксикации и т.п.) на протяжении лечебного процесса;
- скрининговые исследования состояния защитных систем и общего состояния организма у населения в различных группах риска при проведении профилактических и диагностических мероприятий и массовых осмотров.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Оборудование

1. Люминесцентный микроскоп типа «Люам» с двухканальной микрофлуориметрической насадкой либо любой другой стандартный люминесцентный или световой бинокулярный микроскоп с люминесцентной приставкой, либо микроспектрофлуориметр;
2. Термостат воздушный типа ТС-80М-2.

Лабораторная посуда и принадлежности

1. Стекла предметные.
2. Стекла покровные.
3. Мерные стаканчики до 150 мл.
4. Мерные цилиндры на 200 мл.
5. Полуавтоматическая пипетка-дозатор с постоянным объемом на 50 мкл.
6. Пипеточный дозатор объемом до 10 мл.
7. Фильтровальная бумага.

Материалы и реактивы

1. Раствор ЭБ в концентрации 3×10^{-4} моль на физиологическом растворе или фосфатном буфере (рН = 7,4).
2. Раствор АО в концентрации 10^{-6} моль на физиологическом растворе или фосфатном буфере с рН 7,2–7,4.
3. Смесь Никифорова для обезжиривания предметных и покровных стекол.
4. Иммерсионное масло для микроскопии (нелюминесцирующее с показателем преломления порядка $n_D = 1,518-1,531$).

ТЕХНОЛОГИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Методика выполнения

Объект исследования: прижизненно окрашенные препараты лейкоцитов крови.

Тест спонтанного повреждения нейтрофилов крови ставится следующим образом:

- с соблюдением правил асептики производят забор крови в пластиковую пробирку;
- кровь инкубируют при 25°C в течение 40 мин;
- после естественной седиментации эритроцитарной массы в пробирке с венозной кровью у границы раздела эритроциты-«белая» кровь пипеткой отбирают 10 мкл плазмы, содержащей все фракции ядерных клеток крови;
- отобранные 10 мкл плазмы наносят в виде капли на предметное стекло, затем поочередно добавляют к ней по 10 мкл растворов АО и ЭБ.

При нарушении целостности плазматической мембраны флуорохром ЭБ проникает внутрь клетки и окрашивает ядро в красный цвет. В нормальном же состоянии будет наблюдаться только слабое зеленое свечение АО.

Регистрацию флуоресцентных характеристик популяции ИКК осуществляли с помощью двухволнового микрофлуориметра. Этот вид люминесцентного анализа позволяет выводить на фазовую плоскость в виде точки в координатах интенсивностей зеленой (X) и красной люминесценции (Y) на максимумах эмиссии сигналы любого количества клеток различного типа и количественно оценивать уровень повреждения мембранного аппарата клеток. Сдвиг в красную область спектра означает повышенный уровень повреждения мембранного аппарата клетки (рис. 1, 3).

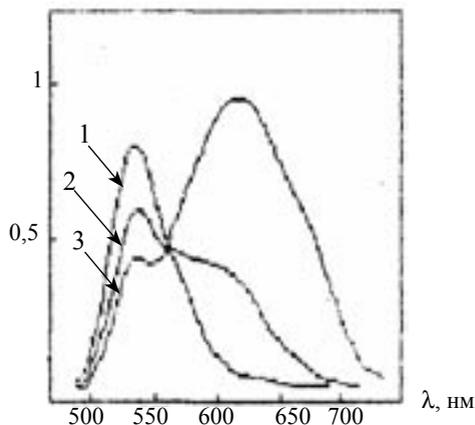


Рис. 1. Спектры флуоресценции живых нейтрофилов:

- 1 — нейтрофилы с неповрежденной плазматической мембраной;*
 - 2 — нейтрофилы с частично поврежденной плазматической мембраной;*
 - 3 — нейтрофилы с мембраной, полностью потерявшей барьерные функции. Двойное флуорохромирование АО и ЭБ. Объектив ×100. Масляная иммерсия. Ось ординат — интенсивность люминесценции в люксах. Ось абсцисс — длина волны в нанометрах.*
- Спектры нормированы*

Техника выполнения метода с помощью люминесцентного микроспектрофлуориметра

1. Готовят препарат для исследования, для чего отобранные 10 мкл плазмы, смешанной ранее с АО и ЭБ на покровном стекле,

закрывают под покровное стекло и окантовывают стекло раствором полистирола либо адекватного заменителя (например, парафина лабораторного) для предотвращения высыхания.

2. Препарат выдерживают в термостате при температуре 37° С в течение 40 мин.

3. Получают спектры люминесценции или производят одновременное измерение интенсивностей красной и зеленой люминесценции с определением их отношения (Y/X) у 50–100 нейтрофилов (максимум полос, соответственно, $\lambda = 610$ нм и $\lambda = 540$ нм). Анализ проводится с помощью компьютерной программы «MICROFLUOR» (строится гистограмма распределения значений Y/X).

Измерения проводятся под люминесцентным микроскопом при приборном зонде диаметром 0,6 мм и рабочем напряжении на ФЭУ — 1300 Вт (иммерсия, увеличение объектива — 100).

4. Визуально определяется процент поврежденных клеток.

Поврежденные гранулоциты имеют красную люминесценцию ядер, а неповрежденные — зеленую.

Визуальный полуколичественный люминесцентный метод выполнения и оценки секреторной активности нейтрофилов крови человека

Объект исследования: прижизненно окрашенные препараты лейкоцитов крови.

Оборудование: люминесцентный микроскоп.

Техника выполнения:

1. Отобранные 10 мкл плазмы крови смешивают на предметном стекле с 10 мкл раствора АО в концентрации 10^{-6} моль (рН 7,2–7,4; готовится *ex tempore* на физиологическом растворе).

2. Добавляют к этой смеси 10 мкл раствора ЭБ.

3. Закрывают мазки под покровные стекла и окантовывают раствором полистирола либо адекватного заменителя для предотвращения высыхания (например, парафин лабораторный).

4. Выдерживают в термостате при температуре 37° С в течение 40 мин.

5. Исследование проводится визуально под люминесцентным микроскопом. Средняя секреторная активность нейтрофилов (гранулоцитов) определяется при просмотре 10 полей зрения под иммерсией (объектив $\times 100$).

Функциональная оценка осуществляется полуколичественно с помощью набора цветных эталонов в виде символов от 0 (0%), что соответствует полному отсутствию процесса секреции до + + + + (100%), что соответствует максимуму секреции (рис. 2).

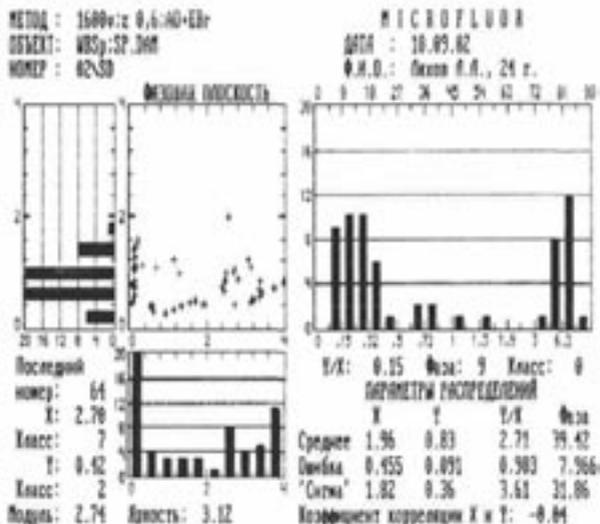


Рис. 2. Пример оценки спонтанного повреждения плазматической мембраны лейкоцитов крови больного с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки. Двойное флуорохромирование АО и ЭБ.

Объектив $\times 100$. Масляная иммерсия.

Ось абсцисс — интенсивность зеленой люминесценции.

Ось ординат — интенсивность красной люминесценции

Особенности техники выполнения метода

Для получения объективных и воспроизводимых данных необходима регулярная калибровка прибора по внешним стандартам. Такими стандартами в нашем случае являются люминесцирующие стекла ЖС-10 и ЖС-19, обладающие разными интенсивностями люминесценции в зеленой и красной областях спектра. Распределение на фазовой плоскости в координатах I610 и I540 люминесцентных сигналов от 30–50 точек на этих стеклах заносится в память компьютера и является эталонным. При калибровке прибора вновь регистрируемые сигналы должны укладываться в ранее полученные эллипсы рассеяния точек на фазовой плоскости, что достигает-

ся с помощью регуляции освещенности в поле зрения микроскопа и напряжения на фотоумножителях.

Концентрация растворов применяемых флуорохромов (как основных реагентов) должна постоянно контролироваться спектрофотометрически. Это также обеспечивает объективность получаемых результатов.

Для анализа следует использовать только нелюминесцирующее масло с показателем преломления порядка n_D 1,518–1,531.

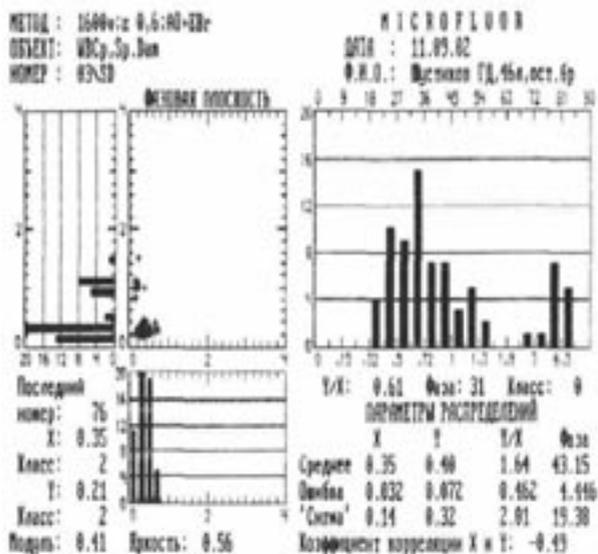


Рис. 3. Пример оценки спонтанного повреждения плазматической мембраны лейкоцитов крови больного с острым бронхитом. Двойное флуорохромирование АО и ЭБ. Объектив $\times 100$. Масляная иммерсия. Ось абсцисс — интенсивность зеленой люминесценции. Ось ординат — интенсивность красной люминесценции

Объемы анализируемой крови и рабочих растворов флуорохромов должны быть постоянны и дозироваться с помощью калиброванных пипеточных дозаторов в равных пропорциях.

Результаты

Основным результатом внедрения метода оценки секреторной активности нейтрофилов крови является повышение возможностей

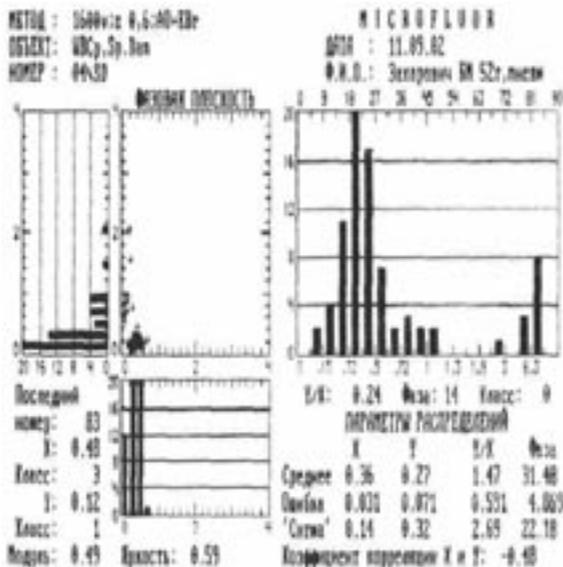


Рис. 4. Пример оценки спонтанного повреждения плазматической мембраны лейкоцитов крови больного с пневмококциозом. Двойное флуорохромирование АО и ЭБ. Объектив $\times 100$. Масляная иммерсия. Ось абсцисс — интенсивность зеленой люминесценции. Ось ординат — интенсивность красной люминесценции

иммунодиагностики и анализа как в лечебной практике, так и при проведении исследований в области медицинской экологии и профпатологии. Это достигается самим подходом (методологией), количественной оценкой результатов и быстротой выполнения метода.

Контроль качества исследований

Для получения объективных и воспроизводимых результатов необходимо строго соблюдать правила настройки микроскопов и процедуры ежедневной проверки в соответствии с инструкцией по эксплуатации.

Состояние здоровья индивидуума и соответственно его иммунной системы — процесс динамический и у разных людей выраженный по-разному. Поэтому для подтверждения объективности или истинности получаемых результатов необходимо регулярно и одно-

моментно исследовать не менее 3 препаратов, приготовленных из одного образца крови конкретного донора. Разброс средних регистрируемых параметров не должен превышать 2σ . При таких условиях гарантируется воспроизводимость и истинность полученных результатов.

Техника безопасности

Правила техники безопасности регламентируются инструкцией по применению микроскопа, правилами техники безопасности при работе в клиничко-диагностической лаборатории и нормативными документами по соблюдению санитарно-эпидемиологического режима при работе с биологическими материалами.

Возможные осложнения: при разработке методики не выявлены.

Противопоказания к применению метода: не установлены, поскольку метод относится к клинической лабораторной диагностике.