

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра



В.В. Колбанов

17 февраля 2003 г.

Регистрационный № 29–0203

**МЕТОД КОМПЛЕКСНОЙ ОЦЕНКИ
ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ
НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ**

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, И.Н. Коростелева

Метод оценки фагоцитарной активности нейтрофилов крови предназначен для комплексной диагностики нарушений неспецифической резистентности организма в различных условиях среды обитания и профессиональной деятельности.

МЕТОДОЛОГИЯ

Фагоцитоз в настоящее время считают одним из основных критериев оценки состояния иммунного статуса, являющегося фундаментальной составляющей иммунной защиты организма. Расстройство фагоцитарных функций существенным образом ослабляет всю систему защитных механизмов. Это обусловлено тем, что филогенетически фагоцитоз является наиболее древним защитным приспособлением, на основе которого эволюционно сформировалась вся система иммунной защиты. Возможно по этой же причине нарушение фагоцитарной реакции лейкоцитов происходит раньше других функциональных сдвигов при действии на организм неблагоприятных факторов, особенно эволюционно ему чуждых.

Оценка фагоцитарной активности нейтрофилов крови (основного звена фагоцитарной системы организма) является ценным диагностическим критерием как в лабораторно-клинической практике, так и при массовом иммунологическом обследовании (скрининге), в том числе и производственно-экологической направленности.

Однако применяющиеся в настоящее время методы оценки функциональной активности фагоцитов либо чрезмерно громоздки, что не позволяет эффективно применять их при массовых иммунологических исследованиях, либо не дают полноценной информации о функциональном состоянии фагоцитирующих лейкоцитов. Так, например, широко распространенный в клинической иммунологии латексный тест оценки фагоцитоза не позволяет анализировать наиболее важную функцию фагоцитов — их переваривающую (бактерицидную) активность. В то же время известно, что некоторые наиболее патогенные микроорганизмы способны персистировать в функционально дефектных фагоцитирующих клетках, разрушать их и выходить в новый жизненный цикл с соответствующими последствиями для организма-носителя.

В последние годы в медико-биологических и экологических исследованиях достаточно широко стали применяться разнообразные

методы и техника люминесцентного анализа клеток. Этот вид анализа по своей чувствительности практически не имеет аналогов, поэтому для создания спектрального метода оценки фагоцитарной активности нейтрофилов мы применили именно этот подход.

Особенностью метода является то, что объектом фагоцитоза являются живые пекарские дрожжи *S. cerevisiae*. Использование именно этих дрожжей является обязательным условием выполнения метода, поскольку только живые интактные дрожжевые клетки имеют зеленую люминесценцию постоянной интенсивности при их флуорохромировании акридиновым оранжевым (АО) в низкой концентрации.

Для исследования фагоцитарной реакции нейтрофилов дрожжи *S. cerevisiae* удобны и интересны по нескольким причинам. Во-первых, в мире нарастает число системных микозов. Поэтому выявление дефекта фагоцитоза по отношению именно к грибам, может свидетельствовать о потенциальной уязвимости тестируемого лица к микозам. Во-вторых, в клеточной стенке *S. cerevisiae* содержится зимозан, поэтому они не требуют опсонизации, что значительно упрощает постановку реакции фагоцитоза. В-третьих, в силу своих размеров (3–4 мкм) они хорошо визуализируются при микроскопии и полностью соответствуют по диаметру используемым флуоресцентным зондам.

Первые видимые изменения у поглощенных нейтрофилами дрожжей начинают проявляться через 15 мин после начала инкубации в виде повышения яркости зеленого свечения. При дальнейшей инкубации зеленая люминесценция поглощенных дрожжей меняется на желтую, а затем — на ярко-оранжевую. Эта стадия переваривания протекает в течение последующих 40–45 мин. Весь процесс активного переваривания завершается через 1–1,5 ч полным лизисом поглощенных дрожжей и визуально наблюдается в цитоплазме нейтрофила в виде пустых эндовакуолей.

У непоглощенных же дрожжевых клеток, включая аттрактированные, и у поглощенных, но не активными фагоцитами, люминесценция так и остается зеленой. При этом также и в активных фагоцитах обычно встречаются дрожжи, находящиеся на разных стадиях переваривания (см. Приложение 1, рис. 1, 2). Очевидно, это связано

с различиями в функциональном состоянии лизосомального аппарата нейтрофилов и, скорее всего, с их общим метаболизмом.

Из модельных экспериментов и исследований различных клеток *in situ* известно, что АО обладает ярко выраженной способностью к метахромазии, т.е., в данном случае, способностью давать интенсивную зеленую и красную люминесценцию. Эта особенность связана с тем, что данный флуорохром способен существовать в растворе или взаимодействовать с субстратом (в первую очередь с нуклеиновыми кислотами) в форме мономеров, димеров или агрегатов более высокого порядка.

Излучение в зеленой области спектра ($\lambda_{\max} = 530$ нм) характерно для мономеров АО, тогда как димеры и агрегаты этого флуорохрома обладают люминесценцией в красной ($\lambda_{\max} = 640$ нм) области спектра.

Обычно изучаемые клетки содержат двух- (преимущественно ДНК) и односпиральные (РНК и однопитевые участки ДНК) нуклеиновые кислоты. В низких концентрациях АО будет преимущественно связываться с двухспиральными нуклеиновыми кислотами, поскольку константа связывания красителя с ними значительно выше таковой с односпиральными нуклеиновыми кислотами (соответственно $2,6 \times 10^5$ и $0,29 \times 10^5$ л/моль⁻¹). В этих условиях молекулы АО интеркалируют между парами оснований двухспиральных нуклеиновых кислот, находящихся на значительном расстоянии друг от друга (в форме мономеров), и поэтому не способны взаимодействовать между собой. При возбуждении таких молекул именно они и люминесцируют в зеленой области спектра.

Соотношение интенсивностей красной и зеленой полос излучения окрашенных АО клеток нейтрофилов описывается безразмерным параметром α , значение которого определяется следующим уравнением (при выводе этих значений на фазовую плоскость Y/X):

$$\alpha = I_{640} / I_{530}, \quad (1)$$

Параметр α может характеризовать разнообразие стороны жизнедеятельности нейтрофилов. В частности, жизнеспособность клеток, их биосинтетическую активность или состояние лизосомного аппарата в зависимости от условий их флуорохромирования АО.

Если исследуемые клетки были предварительно фиксированы (убиты) или специальным образом обработаны, то параметр α может характеризовать отношение содержащихся в клетке односпиральных нуклеиновых кислот (НК_1) к двухспиральным (НК_2) и описываться следующим уравнением:

$$\alpha = I_{640}/I_{530} = A \times \text{НК}_1/\text{НК}_2, \quad (2)$$

где A — коэффициент пропорциональности, связанный с доступностью для красителя НК *in situ*. В нашем случае, когда исследуется один тип клеток (дрожжи), этот коэффициент равен 1.

Известно, что сам АО в определенных условиях может денатурировать ДНК *in situ*, переводя ее из двухспиральной в односпиральную форму. Очевидно, нарастающее переваривание дрожжевых клеток лизосомными ферментами нейтрофилов дестабилизирует содержащуюся в них ДНК и облегчает ее денатурацию с соответствующим изменением спектра люминесценции таких дрожжей. Не подвергающиеся перевариванию дрожжи сохраняют нативную форму своей ДНК и, соответственно, зеленую люминесценцию постоянной интенсивности.

Поскольку все исследования проводились нами при одной и той же концентрации АО, и никакой биосинтез РНК или ДНК (тем более за такой короткий промежуток времени) в поглощенных фагоцитами дрожжах не мог осуществиться, то остается полагать, что изменение спектра люминесценции перевариваемых дрожжей связано именно с изменением конформации ДНК *in situ*.

Однако одиночные спектры люминесценции поглощенных дрожжей малоинформативны для популяционного анализа функционального состояния нейтрофилов. Для этих целей более целесообразно применять двухволновую микрофлуориметрию (Приложение 1, рис. 3). Этот вид люминесцентного анализа позволяет выводить на фазовую плоскость в виде точки в координатах интенсивностей зеленой и красной люминесценции (X и Y) на максимумах эмиссии сигналы любого количества клеток различного типа и видовой биологической принадлежности. Результаты визуального наблюдения и анализа во многом совпадают с результатами инструментального (Приложение 1, рис. 4). Поэтому при отсутствии соответствующей

техники можно ограничиться обычным микроскопическим исследованием под люминесцентным микроскопом (Приложение 2).

Таким образом, разработанный нами люминесцентный микрофлуориметрический метод оценки фагоцитарной активности нейтрофилов является строго объективным, обладает высокой чувствительностью и производительностью и может быть реализован на основе имеющейся отечественной или зарубежной микрофлуориметрической техники. Предложенный подход соответствует современной политике ВОЗ, направленной на внедрение в практическую медицину методов количественной оценки состояния здоровья людей.

За неимением соответствующей техники анализ может быть проведен визуально с использованием стандартного люминесцентного микроскопа (люминесцентной приставки).

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Метод функционального тестирования фагоцитарной активности нейтрофилов крови рекомендуется применять в следующих случаях:

- выявление нарушений и отклонений в иммунной системе при первичном клинико-лабораторном исследовании;
- динамическое наблюдение (мониторинг) за состоянием системы иммунной защиты и организма в целом (например, наличие стресса) на протяжении всего лечебно-диагностического процесса;
- скрининговые исследования состояния иммунной защиты и общего состояния организма у населения в различных группах риска при проведении профилактических медицинских осмотров и диагностических мероприятий.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ И СРЕДСТВ

Оборудование

1. Люминесцентный микроскоп типа «Люам» с микрофлуориметрической насадкой или стандартный световой бинокулярный микроскоп с люминесцентной приставкой.
2. Центрифуга ОПН-8-УХЛ 4.2.
3. Магнитная мешалка ММ-5.
4. Водяная баня до 100° С.
5. Термостат воздушный типа ТС-80М-2 на 37° С.

Лабораторная посуда и принадлежности

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

Материалы и реактивы

1. Сухие пекарские дрожжи *S. cerevisiae* (ГОСТ 28483–90; ТУ 9182–001–42449240–97).
2. Марля медицинская.
3. Иммерсионное нелюминесцентное масло (с вязкостью при 200° С около 437 mPs) для микроскопии (например, Immersion Oil EINECS Fluorescence-free, UV-transparent «Fluka» № 56821).
4. Раствор АО (готовится *ex tempore* в день анализа на физиологическом растворе или буфере с рН 7,2–7,4) в разведении 1:30000.
5. Смесь Никифорова стандартная для обезжиривания предметных и покровных стекол.
6. Фосфатный буфер (рН 4,2).
7. Физиологический раствор хлорида натрия.

ТЕХНОЛОГИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Методика выполнения

Предметом анализа являются нейтрофилы из нефракционированной венозной крови.

Объектом фагоцитоза служат обычные живые пекарские дрожжи *S. cerevisiae*.

Предварительная подготовка к постановке реакции фагоцитоза осуществляется следующим образом: 2 г сухих пекарских дрожжей растворяют в 100 мл физиологического раствора в течение 1 ч с помощью магнитной мешалки, затем суспензию выдерживают 30 мин на водяной бане при 25° С и фильтруют через 3–4 слоя мар-

ли. После фильтрации смесь разливают в пластиковые пробирки по 1,0 мл и замораживают для длительного хранения. Суспензия пекарских дрожжей хранится при -18°C в течение 12 мес.

Непосредственно перед постановкой реакции 1,0 мл суспензии дрожжей размораживается и 3 раза отмывается физиологическим раствором путем центрифугирования при 1000 об./мин по 5 мин.

Для приготовления рабочей концентрации дрожжей к 0,1 мл осадка добавляют 9,9 мл физиологического раствора.

Затем, после естественной седиментации эритроцитарной массы (не менее 40 мин) в пробирке с венозной кровью, у границы раздела фаз отбирается 0,5 мл плазмы, содержащей все фракции клеток белой крови, и добавляется 0,5 мл 1% приготовленной суспензии дрожжей. Пробирку встряхивают и центрифугируют в течение 5 мин при 1000 об./мин. После этого ее инкубируют при 37°C в течение 40 мин.

Для выполнения анализа на предметное стекло наносится 50 мкл осадка, к которому добавляют 50 мкл раствора АО в указанной концентрации. Смесь накрывается покровным стеклом. Излишек жидкости удаляется фильтровальной бумагой до плотного прилегания покровного стекла к предметному.

Оценка фагоцитарной активности нейтрофилов может проводиться двумя способами:

1. Визуальный. Под люминесцентным микроскопом подсчитывается в 100 нейтрофилах число поглощенных дрожжей с оранжево-красной люминесценцией относительно таких же с зеленой люминесценцией. Красная люминесценция, как указано выше, характерна для активно перевариваемых дрожжей.

2. Количественный (микрофлуориметрический) вариант. В этом случае измеряется отношение интенсивностей красной и зеленой люминесценции (Y/X) у поглощенных 100 нейтрофилами дрожжей с максимумом полос $\lambda = 640$ нм и $\lambda = 530$ нм, соответственно. Этот параметр количественно характеризует уровень их переваривания. По окончании анализа с помощью соответствующей аналитической компьютерной программы строится гистограмма распределения значений Y/X в популяции фагоцитов. В обоих случаях параллельно расчетным путем определяются еще несколько показателей фагоцитоза:

Фагоцитарный индекс (ФИ) — число нейтрофилов (%), участвующих в фагоцитозе. Норма — 60,0–80,0%.

Фагоцитарное число (ФЧ) — среднее число дрожжевых частиц, поглощенных одним фагоцитом. Норма — 2,0–4,0.

Число активных фагоцитов (АФ) — число фагоцитов (%), содержащих хотя бы одну активно перевариваемую дрожжевую клетку. Норма — 80,0–100,0%.

Индекс переваривания (ИП) — процентное отношение числа активно перевариваемых дрожжевых клеток ко всем поглощенным 100 нейтрофилами. Норма — 70,0–90,0%.

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 I_{640} и I_{530} 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. Это достигается с помощью регуляции освещенности в поле зрения микроскопа и напряжения на фотоумножителях.

Концентрация раствора применяемого флуорохрома (как основного реагента) должна постоянно контролироваться спектрофотометрически. Это также обеспечивает объективность получаемых результатов.

Для анализа следует использовать только то иммерсионное масло, которое само не вызывает люминесцентного свечения, т.е. нелюминесцентное с вязкостью около 437 mPs (150 сантипуаз). Пипеточный дозатор жидкостей с изменяющимся объемом используется для дозирования объемов от 0,1 до 10,0 мл.

Результаты

Основным результатом внедрения метода функционального тестирования фагоцитарной активности нейтрофилов крови является

улучшение качества иммунодиагностики при лечебном процессе за счет именно количественной оценки переваривающей активности фагоцитов.

На основании вышеизложенного этот метод может быть рекомендован для внедрения в практику лечебно-профилактических учреждений Беларуси.

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 одновременно 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: не установлены, поскольку метод относится к клинической лабораторной диагностике.

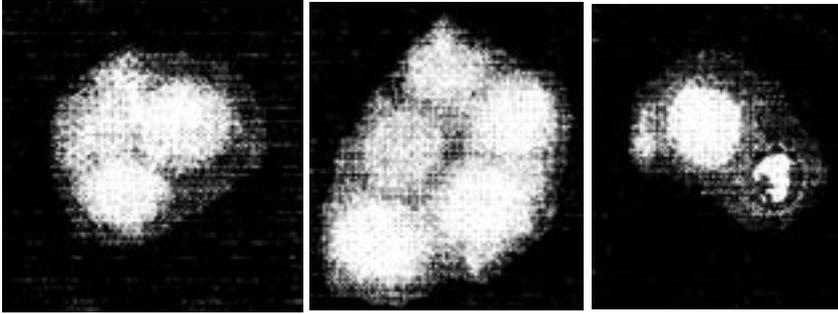


Рис. 1. Фагоцитоз нейтрофилами крови дрожжевых клеток *S. cerevisiae*. Цифровая флуоресцентная микроскопия. Флуорохромирование АО. Степень яркости поглощенных дрожжевых частиц указывает на их уровень переваривания. Об. $\times 100$, масляная иммерсия

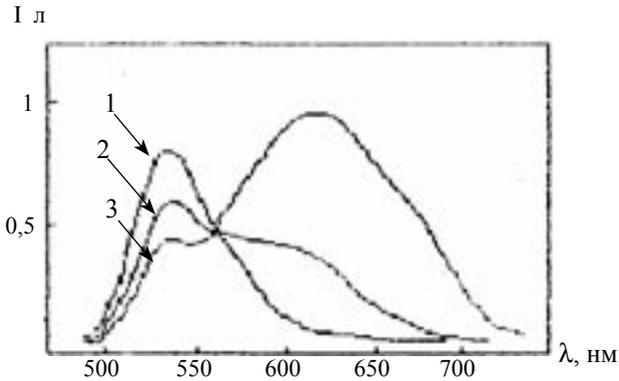


Рис. 2. Динамика спектров люминесценции дрожжей *S. cerevisiae* в процессе переваривания нейтрофилами:
 1 — начало инкубации; 2 — 20 мин инкубации; 3 — 40 мин инкубации.
 Витальное флуорохромирование АО. Ось абсцисс — длина волны в нм.
 Ось ординат — интенсивность люминесценции в люксах.
 Спектры нормированы

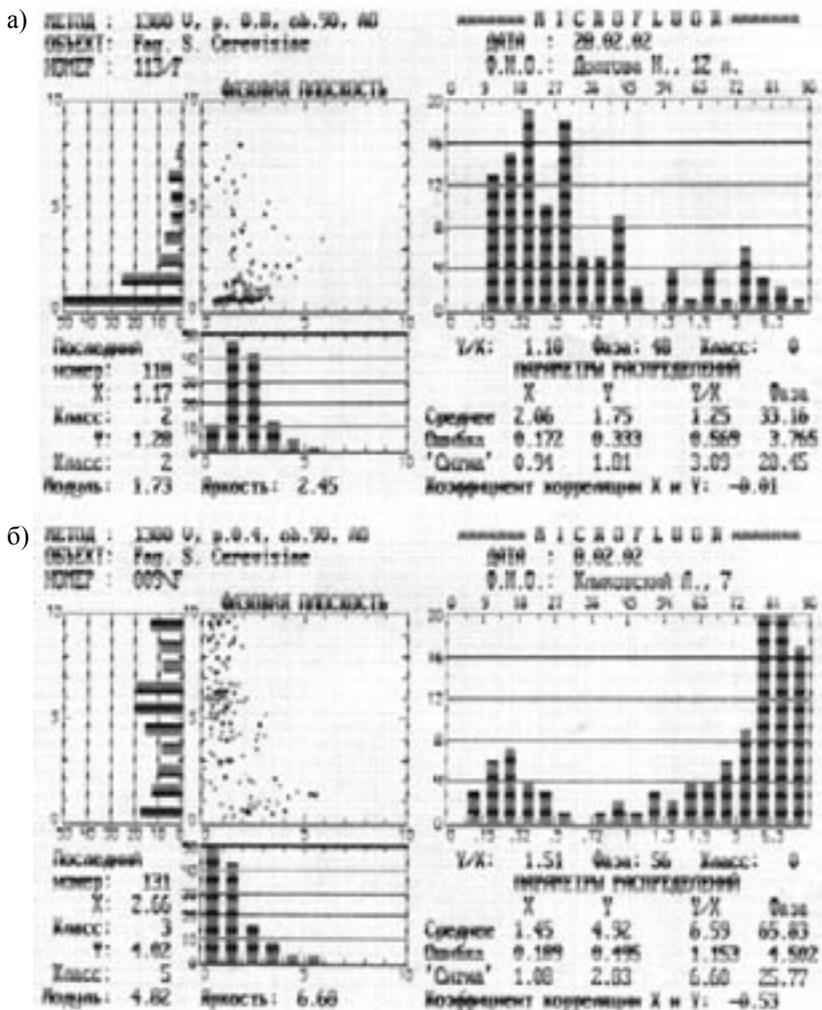


Рис. 3. Примеры распределения параметра Y/X (а), характеризующего переваривающую способность нейтрофилов крови по отношению к *S. cerevisiae* в клинических условиях:
 а) низкая активность переваривания,
 б) высокая степень переваривания. Двухцветная микрофлуориметрия поглощенных дрожжей, флуорохромированных АО

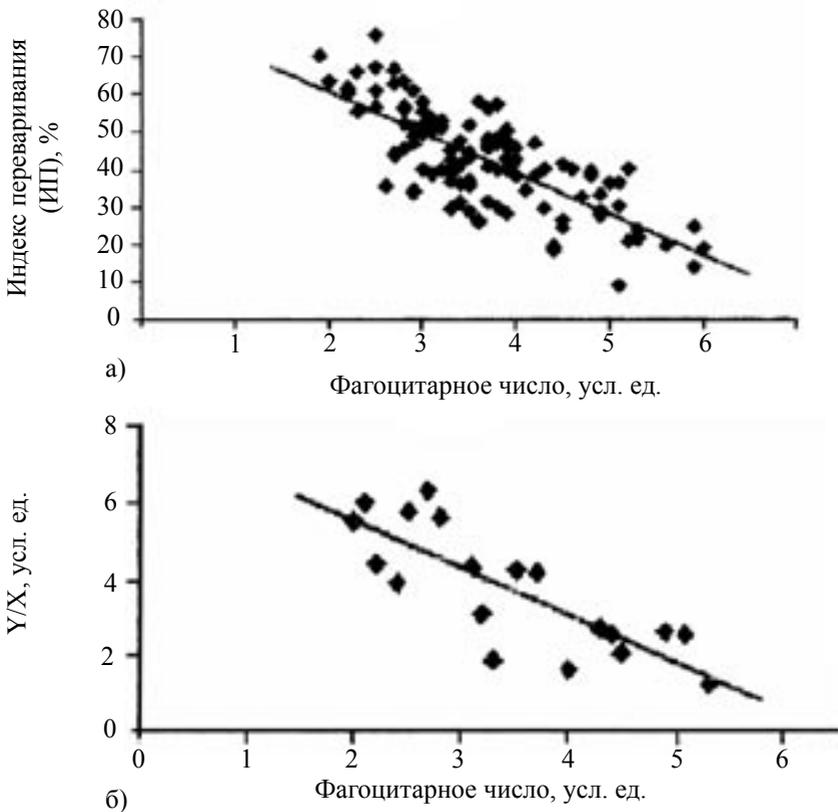


Рис. 4. Зависимость переваривающей активности нейтрофилов крови от числа поглощенных дрожжевых частиц *S. cerevisiae*:
 а) люминесцентный визуальный способ микроскопического анализа;
 б) люминесцентный микроспектральный вид анализа

Приложение 2

Пример представления результатов исследования фагоцитарной активности нейтрофилов крови у больного Л. в истории болезни

<u>Вид анализа</u>	<u>Фагоцитарная активность нейтрофилов крови</u>	
<u>Лечебное учреждение</u>	<u>№ анализа в базе данных</u>	<u>Дата анализа</u>
Клиника НИИ ЭПП	2	05.09.02
<u>Ф.И.О.</u>	<u>Пол</u>	<u>Возраст</u>
Л-в А.А.	м	24
<u>Отделение</u>	<u>Диагноз</u>	
Экологической и профессиональной патологии № 2		

Параметр	Единицы измерения	Норма	Результат	Оценка результата: увеличение — «+»; снижения — «-»
Индекс фагоцитоза	%	60,0–80,0	93,0	+
Фагоцитарное число	усл. ед.	2,0–4,0	3,2	
Индекс перевариваемости	%	80,0–100,0	60,2	
Процент активных фагоцитов	%	70,0–90,0	85,4	

Заключение: напряжение иммунной системы. Переваривающая активность фагоцитов снижена. Повышена их секреторная активность. Фагоцитоз неполноценен.

Пример представления результатов исследования фагоцитарной активности нейтрофилов крови у больного К. в истории болезни

<u>Вид анализа</u>	Фагоцитарная активность нейтрофилов крови	
<u>Лечебное учреждение</u>	<u>№ анализа в базе данных</u>	<u>Дата анализа</u>
Клиника НИИ ЭПП		24.07.02
<u>Ф.И.О.</u>	Пол	Возраст
К-ч А.	м	13
<u>Отделение</u>	Диагноз	
Педиатрии	Очаговая алопеция III степени	

Параметр	Единицы измерения	Норма	Результат	Оценка результата: увеличение — «+»; снижение — «-»
Индекс фагоцитоза	%	60,0–80,0	96,0	+
Фагоцитарное число	усл. ед.	1,0–3,0	3,6	+
Индекс перевариваемости	%	50,0–90,0	26,0	-
Процент активных фагоцитов	%	60,0–90,0	47,9	-

Заключение: резкое снижение переваривающей активности фагоцитов. Сильное повышение секреторной активности нейтрофилов. Высокое напряжение иммунной системы.