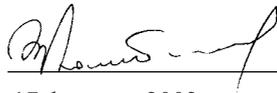


**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра



В.В. Колбанов

17 февраля 2003 г.

Регистрационный № 30–0203

**МЕТОД ОЦЕНКИ СЕКРЕТОРНОЙ  
АКТИВНОСТИ 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 секреторной активности нейтрофилов крови предназначен для комплексной диагностики и анализа нарушений неспецифической резистентности организма в условиях клиники.

Ранее считалось, что основную иммунную нагрузку в организме несут лимфоциты. В настоящее время всё больше осознается факт теснейшей интеграции в организме систем специфической (иммунной) и неспецифической защиты, т.е. нельзя их искусственно разделять и отдельно рассматривать в рамках функционирования единой защитной системы организма. Появляется всё больше данных о том, что лейкоциты крови, основную массу которых (60–70%) составляют нейтрофилы, осуществляют ряд весьма важных и ответственных функций по обеспечению общей резистентности организма. Они осуществляют не только неспецифическую защиту в виде фагоцитоза, но и выполняют регуляторные функции по обеспечению антигенно-структурного гомеостаза и гомеостаза вообще. Иными словами, они обеспечивают восстановление различных клеточных систем организма, нарушенных в результате стресса, эндотоксемии и других патологических процессов. Это достигается за счет активной секреторной деятельности нейтрофилов, которая физиологически протекает в виде экзоцитоза как в очаге воспаления, так и в кровотоке. Патологическое проявление в виде гиперсекреторной активности тех же нейтрофилов непосредственно в кровяном русле может иметь серьезные негативные последствия для организма. Показано, например, что трансмембранный выброс содержимого гранул нейтрофилов (включая лизосомы) в кровь может инициировать развитие воспаления по аллергическому типу. При различных проявлениях патологии в виде ишемии, гипоксии, ацидозе, сепсисе и т.п. в крови повышается содержание лизосомальных гидролитических ферментов ( $\beta$ -глюкокоронидазы, кислой фосфатазы, пептидазы, нуклеаз), главным источником которых являются лизосомы нейтрофилов и которые вызывают нарушение поверхностных и субклеточных мембран контактирующих клеток. Подобный феномен может запустить целый каскад патологических реакций, протекающих на молекулярно-клеточном уровне. Поскольку секреторная активность нейтрофилов является одной из активных форм функционирования всей защитной системы организма, то определение активности этого

звена является необходимым и может служить ценным диагностическим критерием при лабораторно-клиническом мониторинге и массовом иммунологическом скрининге, особенно экологической направленности. Однако применяющиеся в лабораторной практике методы оценки секреторной активности лейкоцитов в основном базируются на достаточно трудоемких биохимических и иммунохимических методах, что не позволяет эффективно применять их при массовых и интенсивных иммунологических исследованиях.

В настоящее время в медико-биологических исследованиях широко применяются разнообразные методы и техника люминесцентного анализа клеток: разные виды микрофлуориметрии, люминесцентный микроспектральный анализ и люминесцентный анализ видеоизображения клетки (цифровая микроскопия). Люминесцентный анализ не имеет аналогов по чувствительности, поэтому для создания спектрального метода оценки секреторной активности нейтрофилов мы применили именно этот подход, который наиболее отвечает целям и задачам биомониторинга, тем более, что принципы метода были уже разработаны нами ранее и апробированы на практике.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Люминесцентный метод оценки секреторной активности нейтрофилов 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.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ И СРЕДСТВ**

### **Оборудование**

Люминесцентный микроскоп типа «Люам» с двухканальной микрофлуориметрической насадкой либо любой другой стандарт-

ный люминесцентный или световой бинокулярный микроскоп с люминесцентной приставкой.

### **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. Водный раствор этидиума бромида в концентрации  $3 \times 10^{-5}$  моль.
2. Водный раствор флуоресцеина изотиоцианата (изомер 1) в концентрации  $10^{-4}$  моль.
3. Смесь Никифорова для обезжиривания предметных и покровных стекол.
4. Батарея спиртов с понижающей концентрацией ( $96^\circ$ ,  $70^\circ$ ,  $50^\circ$ ).
5. Ацетон.
6. Иммерсионное масло для микроскопии (нелюминесцирующее с показателем преломления порядка  $n_D 1,518-1,531$ ).

## **ТЕХНОЛОГИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

### **Методика выполнения**

Делается стандартный мазок крови из капиллярной или венозной крови. Затем для исследования секреторной активности нейтрофилов мазки крови фиксируют в смеси «спирт-ацетон» в соотношении 1:1 в течение 15 мин. Мазки доводят в спиртовой батарее с понижающейся концентрацией до воды и проводят двойное флуорохромирование водными растворами этидиума бромида ( $3 \times 10^{-5}$  моль) и флуоресцеина изотиоцианата ( $10^{-4}$  моль). При данном способе флуорохромирования лимфоциты крови зеленой люминесценцией не обладают, поскольку циркулируя в крови в состоянии относительного функционального покоя не накапливают значительного

количества внутриклеточных белков и служат только реперными клетками. Изменение зеленой люминесценции у нейтрофилов связано с изменением содержания в их цитоплазме секреторных белков. В норме нейтрофилы имеют яркую зеленую люминесценцию цитоплазмы, так как в этих условиях содержимое своих гранул в транспортное русло не секретируют. Активируясь при патологии непосредственно в кровяном русле и не уходя из циркуляции, они начинают осуществлять свою экзоцитозную функцию *in situ*. При тяжелой патологии нейтрофилы способны полностью реализовать свой секреторный потенциал, находясь в циркуляции.

Люминесцентный метод оценки секреторной активности нейтрофилов крови человека разработан нами в двух вариантах: 1) инструментальный метод; 2) визуальный полуколичественный метод.

*Вариант 1:* инструментальный люминесцентный метод оценки секреторной активности нейтрофилов крови человека. *Объект исследования:* нейтрофилы крови на фиксированных мазках. *Оборудование:* регистрирующий прибор — двухволновой микрофлуориметр. *Техника определения:* препарат готовят как описано выше. Производят одновременное измерение интенсивностей красной (Y) и зеленой (X) люминесценции и их отношения (Y/X) с максимумом полос, соответственно,  $\lambda = 610$  нм и  $\lambda = 540$  нм у 50–100 нейтрофилов при приборном зонде диаметром 0,8 мм и рабочем напряжении на ФЭУ 1300 В. По окончании анализа с помощью компьютерной программы «Microfluor» строится гистограмма распределения значений Y/X (рис. 1), которая и характеризует количественно секреторную активность популяции нейтрофилов крови у конкретного лица.

*Вариант 2:* визуальный полуколичественный люминесцентный метод оценки секреторной активности нейтрофилов крови человека. *Объект исследования:* тот же, что и в варианте 1. *Оборудование:* люминесцентный микроскоп. *Техника определения:* препарат приготавливается так же, как и в варианте 1. Исследование производится визуально под люминесцентным микроскопом. Средняя секреторная активность нейтрофилов (гранулоцитов) определяется при просмотре 10 полей зрения под иммерсией (об.×100). Функциональная оценка осуществляется полуколичественно с помощью набора цветных эталонов в виде символов от 0 (0%) или отсутствие секрета, до + + + + (100%) — максимум секрета (рис. 2).

## **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  $I_{610}$  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 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  $n_D 1,518-1,531$ .

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

## **Результаты**

Основным результатом внедрения метода оценки секреторной активности нейтрофилов крови является повышение возможностей иммунодиагностики и анализа как в лечебной практике, так и при проведении исследований в области медицинской экологии и профессиональной патологии. Это достигается самым 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 одновременно исследовать не менее 3 препаратов, приготовленных из одного образца крови конкретного донора. Разброс средних регистрируемых параметров не должен превышать  $2\sigma$ . 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.

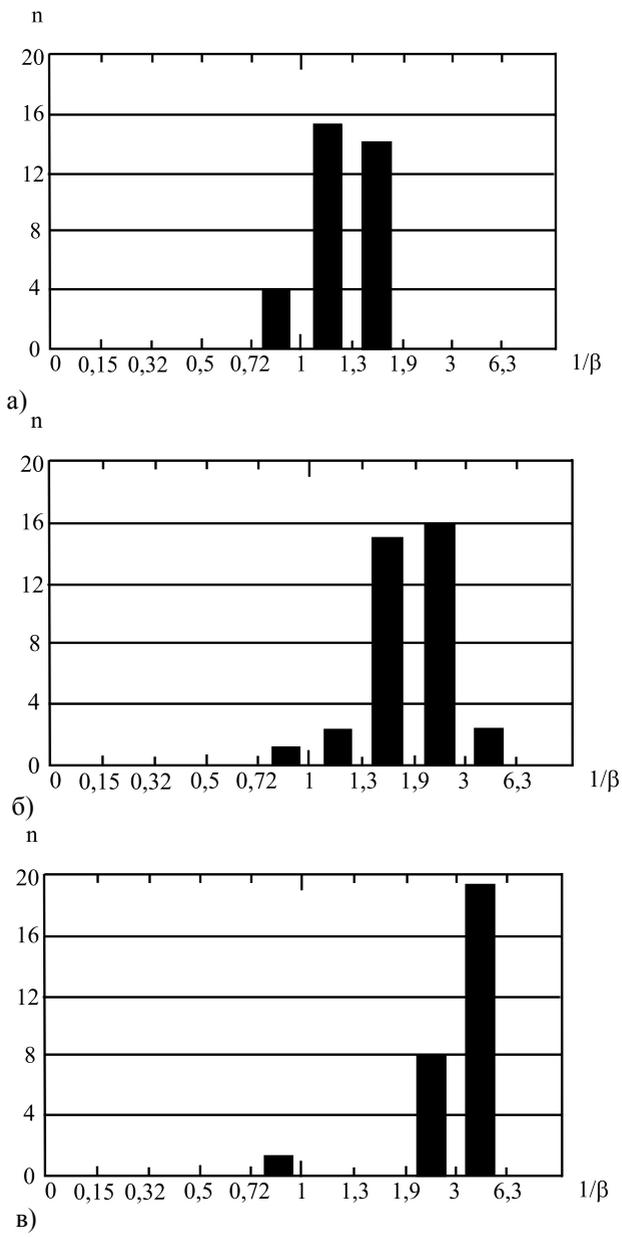
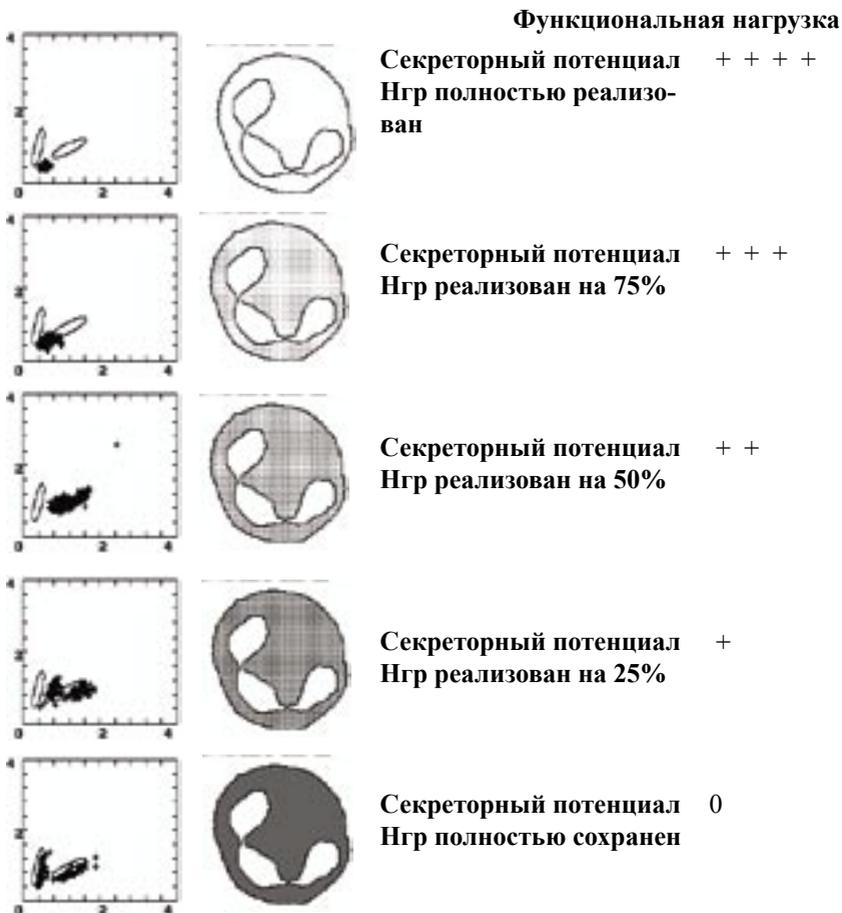


Рис. 1. Характеристика секреторной активности популяции нейтрофилов: а) низкая секреторная активность; б) средняя; в) высокая

Лаборатория цитологии и иммуноморфологии НИИ ЭПП  
 Ф.И.О. пациента \_\_\_\_\_ Пол — М Ж Возраст \_\_\_\_\_  
 № истории болезни (АК) \_\_\_\_\_ Отделение \_\_\_\_\_  
 Диагноз \_\_\_\_\_ Дата \_\_\_\_\_

**Секреторная активность нейтрофилов (Нгр) в крови  
 (уровень напряжения неспецифического иммунитета)**



Нужное подчеркнуть  
 Врач-лаборант \_\_\_\_\_

*Рис. 2. Пример отображения результатов исследования секреторной активности нейтрофилов крови визуальным полуколичественным люминесцентным методом*