

ВОЗМОЖНОСТИ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛЮОРИМЕТРИИ В ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.

Часть 3

С.В. Хайдуков^{1, 2}, А.В. Зурочка³

¹ Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

² ФГУ Федеральный Научно-Клинический Центр детской гематологии, онкологии
и иммунологии РОСЗДРАВА, Москва

³ Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург

Резюме. Развитие современной клинической иммунологии, в том числе и инфекционной, требует применения максимально объективных тестов оценки функционального состояния различных типов фагоцитирующих клеток, таких как нейтрофилы, моноциты, макрофаги и дендритные клетки. Широкие потенциальные возможности проточной цитометрии привели к разработке способов регистрации функционального состояния этих клеток, оценке процессов их активации и изучению механизмов формирования дефектов их функционирования. К разряду таковых относятся: анализ фагоцитарной и бактерицидной активности нейтрофилов, а также измерение количества клеток, находящихся на различных стадиях программируемой клеточной гибели (апоптоза). Методические подходы с использованием проточной цитометрии, представленные в данном обзоре, как раз и представляют новое высокотехнологичное направление научных и клинических исследований.

Ключевые слова: проточная цитометрия, нейтрофилы, моноциты, фагоцитоз, кислородный взрыв, апоптоз.

OPPORTUNITIES OF THE FLOW CYTOMETRY IN DIAGNOSTICS OF INFECTIOUS DISEASES. Part 3

Khaidukov S.V., Zurochka A.V.

Abstract. Development of modern clinical and infectious immunology, demands maximum objective tests for estimation of functional condition of various types phagocytic cells, such as neutrophils, monocytes, macrophages and dendritic cells. Wide potential opportunities of flow cytometry have led to development of ways of registration of a functional condition of these cells, an estimation of processes of their activation and study of mechanisms formation of defects of their functions. For example: analysis of phagocytic and bactericidal activity of neutrophils and measurement number of the cells, which are taking place at various stages of programmed cellular death (apoptosis). Flow cytometry methods described in this review represent a new hi-tech direction for scientific and clinical researches. (*Infekc. immun., 2011, vol. 1, N 3, p. 221–230*)

Key words: flow cytometry, neutrophils, monocytes, oxygenic explosion, apoptosis.

Использование метода проточной цитометрии в медико-биологических исследованиях весьма многообразно. Эта технология первоначально была широко использована для анализа клеточного цикла по распределению ДНК в различных его фазах, определения маркеров поверхности и структурных компонентов клеток. Однако знание только этих клеточных

характеристик не всегда дает однозначный ответ о процессах, происходящих с иммунной системой. Клеткам иммунной системы присущи определенные функции, которые они выполняют в ответ на внешние раздражители. Наличие или отсутствие такого ответа может о многом сказать специалисту. Например, нейтрофилы как эффекторы играют важную роль

поступила в редакцию 06.04.2011
отправлена на доработку 10.04.2011
принята к печати 03.05.2011

© Хайдуков С.В.,
Зурочка А.В., 2011

Адрес для переписки:

Хайдуков Сергей Валерьевич,
д.б.н., зав. лабораторией физиологии
и патологии иммунной системы
ФГУ Федеральный Научно-Клинический
Центр детской гематологии, онкологии
и иммунологии РОСЗДРАВА

117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10,
ФГУ ФНКЦ детской гематологии,
онкологии и иммунологии РОСЗДРАВА.
Тел.: 8 985 923-41-62.
E-mail: khsv@mail.ibch.ru;
khsergey54@mail.ru

во врожденном иммунном ответе для обеспечения резистентности организма, индуцируют и регулируют деятельность различных клеток иммунной системы. Нарушение фагоцитарной активности, как одной из основных функциональных характеристик нейтрофилов, является индикатором снижения устойчивости организма к инфекционным заболеваниям [7, 14].

Широкие потенциальные возможности проточной цитометрии привели к разработке способов регистрации функционального состояния различных клеток, оценке процессов их активации и изучению механизмов формирования дефектов их функционирования.

Наиболее часто используемые приложения метода проточной цитометрии для данного рода исследований основаны на измерении различных функциональных характеристик клеток. К таковым относятся: фагоцитарная и бактерицидная активности нейтрофилов, а также измерение количества клеток, находящихся на различных стадиях программируемой клеточной гибели (апоптоз).

Данная статья является продолжением цикла обзоров, посвященных применению проточной цитометрии для исследований в области инфекционной иммунологии. Она преследует цель представить широкому кругу специалистов современные подходы для регистрации функционального состояния отдельных клеток и рассмотреть возможности последующего внедрения этих тестов в клиническую лабораторную практику [5, 6].

Определение фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов

Изменение фагоцитарной активности нейтрофилов может приводить к формированию разнообразных клинических расстройств [21, 36]. Данный эффект может быть связан как непосредственно с дефектом нейтрофилов, так и с дефектами системы комплемента или иммуноглобулинов. Известны врожденные дефекты, такие как дисфункция актина и дефицит рецептора комплемента C3bi. В результате сниженной фагоцитарной активности нейтрофилов эти дефекты могут привести к повышенной восприимчивости к инфекциям. Приобретенные дефекты, связанные с изменением фагоцитарной активности, обнаруживаются при травмах, диабете, почечной недостаточности и инфекциях. Так, снижение фагоцитарной активности было обнаружено у пациентов с бактериальными инфекциями кожи и легких [8], при инфицировании ожоговых ран [17], у пациентов со СПИД [20, 41].

Процесс фагоцитоза разделяют на несколько стадий: хемотаксис (перемещение клеток-

фагоцитов к воспаленным участкам), адгезию (прилипание частиц к поверхности фагоцитов), «собственно фагоцитоз» и внутриклеточное уничтожение фагоцитированных объектов зависимыми и независимыми от кислорода механизмами [39]. Использование метода проточной цитометрии для измерения «собственно фагоцитоза» значительно облегчило анализ этой важной функции нейтрофилов. В качестве субстрата фагоцитоза в данном случае применяется флуоресцентно меченые частицы (бактерии, клетки дрожжей, латексные частицы) [11, 13]. Однако данный метод не обеспечивал регистрацию различий между частицами, находящимися внутри клеток, и теми частицами, которые могли просто прикрепиться к их поверхности [11, 24]. Эту проблему удалось преодолеть за счет использования витальных красителей, подавляющих флуоресценцию прикрепившихся снаружи частиц. В качестве таковых можно отметить трипановый синий [12] и кристаллический фиолетовый [14, 25].

В свою очередь, использование этих красителей создало некоторые технические проблемы, поскольку исключало возможность фиксации клеток, и, как следствие этого, не позволяло проводить отсроченный анализ. С другой стороны, изменения рН так же могут значительно влиять на флуоресценцию красителей. Это относится, прежде всего, к изотиоцианату флуоресцеина (FITC), который наиболее часто используется для маркировки частиц при анализе фагоцитарной активности [9, 10, 14]. Применение бромида этидия позволило преодолеть данные затруднения. Процедура была основана на том, что дрожжи *Candida albicans*, меченые FITC, прикрепившиеся к поверхности клеток, теряли зеленую флуоресценцию и приобретали красную флуоресценцию при инкубации с бромидом этидия. Этот эффект проявлялся за счет передачи энергии в результате резонанса между двумя этими флуорохромами [22]. Таким образом, из анализа был исключен дополнительный сигнал от налипших на поверхность клеток частиц субстрата и регистрировались исключительно фагоцитированные объекты.

В качестве мишеней для фагоцитоза используют различные субстраты. Примером могут служить такие субстраты, как зимозан [35], фиксированные микроорганизмы: *Staphylococcus aureus* [44], *Escherichia coli* [41], *Haemophilus influenzae* [43] и т.д.

В свою очередь, для регистрации фагоцитарной активности нейтрофилов рядом компаний были разработаны коммерческие наборы, которые с успехом применяются в настоящее время. В частности, к ним относится PHAGOTEST® компании ORPEGEN Pharma (Германия).

PHAGOTEST® позволяет количественно определить фагоцитарную активность нейтро-

филов. В данном случае измеряют долю клеток фагоцитов, поглотивших бактерии, и их активность (количество бактерий в клетке). Для проведения анализа используют гепаринизированную цельную кровь, в которую добавляют флуоресцентно меченые бактерии *Escherichia coli* и инкубируют при 37°C. Отрицательный контроль оставляют на льду, поскольку холод препятствует поглощению частиц субстрата. Фагоцитоз останавливают, помещая образцы на лед, и добавляют реагенты для гашения флуоресценции, позволяющие провести дискриминацию между прилипшими и интернализированными бактериями. При этом подавляется флуоресценция бактерий, прилипших к поверхности фагоцитов, и остается флуоресценция поглощенных. Перед цитометрическим анализом проводят окрашивание ДНК, тем самым исключая вклад агрегатов клеток и бактерий из окончательного результата.

На рис. 1 показаны типичные гистограммы, полученные в результате анализа фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов периферической крови человека.

Данная тест-система хорошо себя показала при исследовании фагоцитарной активности у пациентов, инфицированных ВИЧ-1

и *M. tuberculosis*. Так у ВИЧ-1-инфицированных индивидуумов фагоцитоз гранулоцитов был значительно повышен. Однако гранулоциты от индивидуумов, инфицированных *M. tuberculosis* или в комбинации с ВИЧ-1, имели значительно пониженную способность к фагоцитозу *E. coli*. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что гранулоциты пациентов с легочной формой туберкулеза, как с ВИЧ-1 или без него, обладают меньшей способностью к фагоцитозу. По-видимому, этот факт и способствует увеличению восприимчивости к оппортунистическим инфекциям пациентов с туберкулезом и ВИЧ [41].

Аналогичные результаты были получены и при нарушении работы печени. Фагоцитарный потенциал нейтрофилов был значительно ниже у пациентов с циррозом печени по сравнению с контрольной группой и мог быть одной из причин повреждения механизмов иммунного ответа [34].

Анализ «кислородного взрыва»

Как отмечено выше, нейтрофилы играют важную роль во врожденном и на конечных этапах адаптивного иммунного ответа, или, иначе, резистентности организма, нейтрализуя

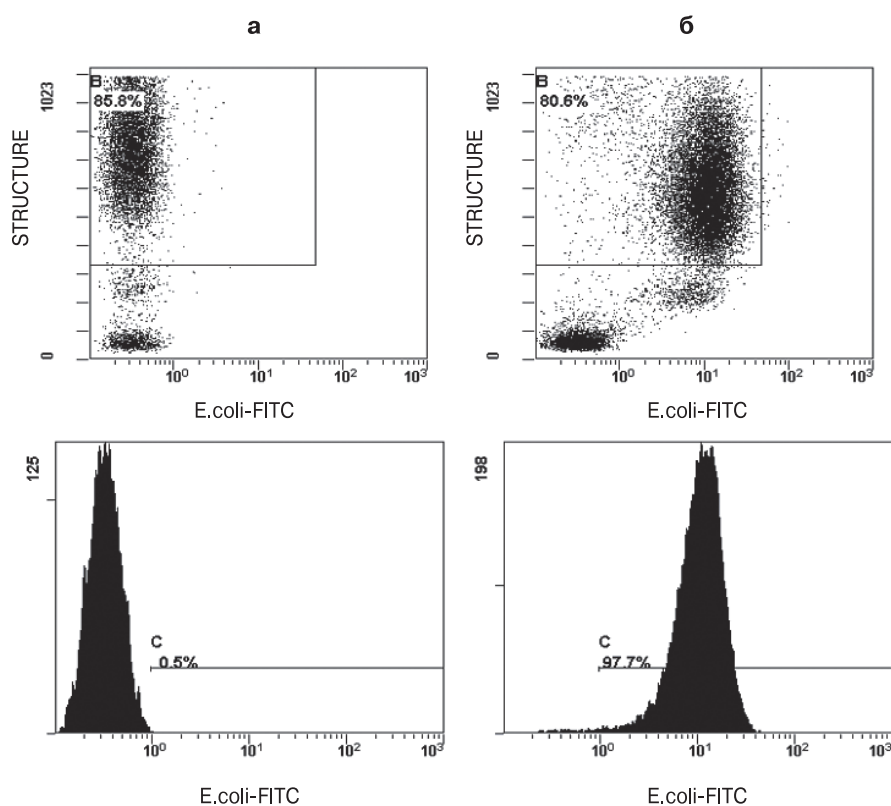


Рисунок 1. Определение фагоцитарной активности клеток периферической крови с использованием набора PHAGOTEST® компании ORPEGEN Pharma (Германия)

а — отрицательный контроль; б — фагоцитоз *E. coli* клетками-фагоцитами. Однопараметрические гистограммы гейтированы по зоне В.

чужеродные объекты. Поглощенные микроорганизмы уничтожаются за счет как зависимых, так и независимых от кислорода механизмов. Свободные радикалы кислорода убивают поглощенные бактерии в фагосомах, однако часть радикалов попадает в окружающую среду, где они, с одной стороны, усиливают уничтожение микроорганизмов, но с другой стороны повреждают окружающие ткани. Этот эффект получил название «окислительного, или кислородного, взрыва». Данный процесс усилено протекает при остром воспалении и, в меньшей степени, при хроническом течении воспалительных заболеваний [16]. Уничтожение микроорганизмов также возможно и за счет белков в азурофильных гранулах, таких как катепсин G, лизоцим, интерфероны и др.

Понижение или отсутствие «кислородного взрыва» наблюдается при некоторых врожденных дефектах, например, хроническом гранулематозе. Данное заболевание обычно проявляется в течение первых двух лет жизни [21, 42] и характеризуется клинически повторяющимися и опасными для жизни инфекциями, вызванными бактериальными и грибковыми микроорганизмами. Клинически эти инфекции проявляются как пневмонии, лимфадениты или абсцессы, затрагивающие лимфоузлы, легкие и печень. Одну из ведущих ролей в этом играет NADPH-оксидаза, ответственная за продукцию супероксид анионов, которые быстро преобразуются в перекись водорода и гидроксильные радикалы. Нарушения структуры основных пептидов NADPH-оксидазы являются главной причиной дисфункций при хроническом гранулематозе, так как нейтрофилы у данных пациентов после активации не могут произвести значительный «кислородный взрыв». Данные нарушения также наблюдаются после трансплантаций и у пациентов со СПИД [20]. С другой стороны спонтанный и вызванный пептидом хемотаксиса N-formyl-MetLeuPhe (fMLP) «кислородный взрыв» нейтрофилов наблюдался у новорожденных с признаками инфекции [23, 42].

Коммерческие наборы для измерения «кислородного взрыва», также как и для измерения фагоцитарной активности, присутствуют на рынке. Примером может служить набор BURST-TEST компании ORPEGEN Pharma (Германия).

Он содержит немеченые опсонизированные бактерии *E. coli* для стимуляции фагоцитоза, фарболмиристатацетат (РМА), являющийся активатором протеинкиназы С, слабый физиологический стимулятор хемотаксиса fMLP и флуорогенный субстрат дигидрорадамин-123 (DHR-123) [37]. Анализ проводят на цельной гепаринизированной крови, инкубируя ее с различными стимуляторами при 37°C, причем отрицательным контролем служит нестимули-

рованный образец. На стимуляцию гранулоциты и моноциты отвечают продукцией реактивных метаболитов кислорода (супероксид анион, перекись водорода, гипохлорная кислота), которые уничтожают фагоцитированные бактерии. В свою очередь, формирование этих реактивных окислителей в течение «кислородного взрыва» может быть оценено за счет окисления DHR-123. Реакцию останавливают лизирующим раствором, который выполняет две функции — удаляет эритроциты и фиксирует лейкоциты. Перед анализом проводят окрашивание ДНК клеток, исключая таким образом вклад агрегатов клеток и бактерий из окончательного результата.

На рис. 2 показаны типичные гистограммы, полученные в результате анализа окислительного взрыва в клетках-фагоцитах периферической крови человека.

Человеческие полиморфноядерные лейкоциты (нейтрофилы) и мононуклеарные фагоциты типа макрофагов являются основой врожденного иммунного ответа против внедрения микроорганизмов. Врожденная способность фагоцитов уничтожать бактерии является критическим фактором для защиты хозяина. Хотя процессы, в которых задействованы эти клетки, очень эффективны при устранении большинства бактерий, но некоторые патогенные для человека микроорганизмы развили механизмы, ингибирующие фагоцитоз и собственную гибель от кислородных радикалов и ряда других антимикробных продуктов. Модуляция апоптоза фагоцитов бактериальными патогенами представляет собой важное направление в исследовании патогенеза.

Важно отметить несколько основных функциональных и физиологических различий между нейтрофилами и макрофагами. Во-первых, макрофаги являются долгоживущими клетками, регулирующими воспаление и последующий иммунный ответ. Это очень выгодно для организма, так как эти клетки остаются резидентами в тканях в течение длительного периода времени. Во-вторых, в сравнении с нейтрофилами, макрофаги обладают меньшей способностью производить кислородные радикалы и, следовательно, имеют ограниченную бактерицидную активность [29, 30, 33, 45, 46]. Благодаря этим характеристикам макрофаги могут быть инфицированы многими бактериальными патогенами, которые, в свою очередь, могут вызвать апоптоз (табл. 1) [19]. Индукция апоптоза макрофагов бактериями невыгодна для ответа хозяина на патоген, но это зависит в большей степени от патогенного микроорганизма. С другой стороны, нейтрофилы имеют большой спектр антибактериальной активности, способствующий полному уничтожению микробов. На сегодняшний день известно толь-

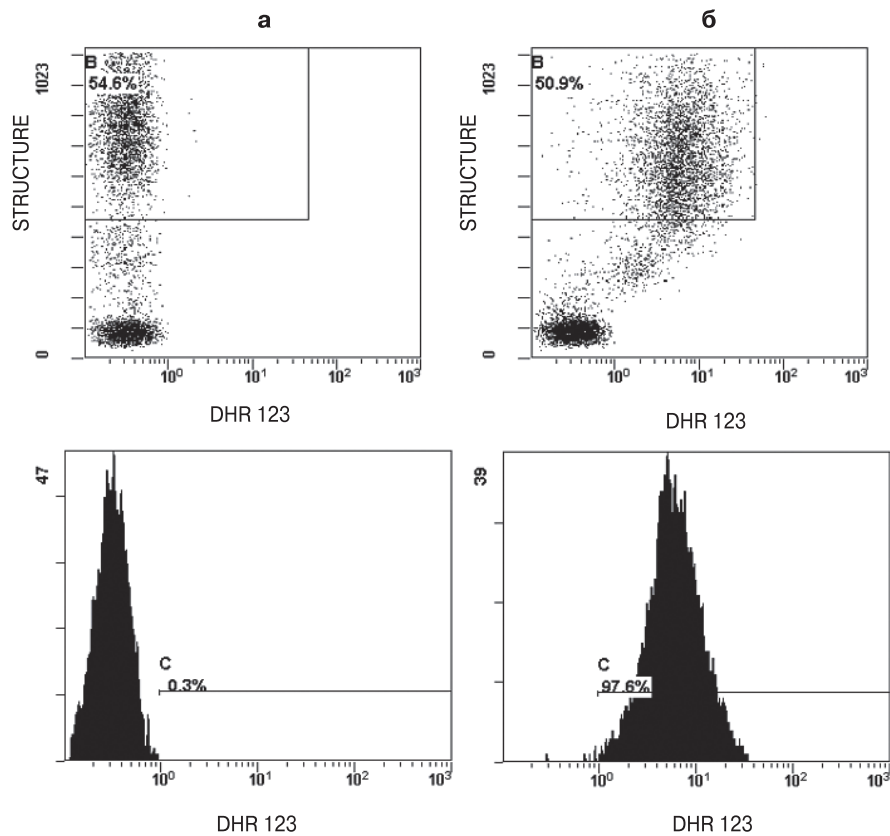


Рисунок 2. Анализ кислородного взрыва у клеток-фагоцитов периферической крови с использованием набора BURSTTEST компании ORPEGEN Pharma (Германия)

а — негативный контроль; б — кислородный взрыв у клеток-фагоцитов. Однопараметрические гистограммы гейтированы по зоне В.

ко два бактериальных патогена, которые могут выжить и размножиться в нейтрофилах — это *Chlamydia pneumoniae* и *Anaplasma phagocytophilum* [15, 26, 40, 47, 48]. В тоже время продолжительность жизни зрелого нейтрофила ограничена приблизительно 1–3 днями, и это также препятствует долгосрочному выживанию внутриклеточных патогенов [19].

Регулирование количества нейтрофилов является критическим ввиду того, что нейтрофилы составляют большинство лейкоцитов у людей. Они преобладают в областях бактериальной инфекции и содержат цитотоксические компоненты, которые могут повредить ткани хозяина, если нейтрофилы подвергаются лизису. Поэтому апоптоз нейтрофилов является основным механизмом регулирования числа этих клеток при воспалении, и регистрация этого процесса может отражать состояние инфицированного организма [38].

Цитометрическая оценка апоптоза

Апоптоз является проявлением физиологического процесса программированной клеточной гибели (клеточного суицида) — естественной, закономерной, генетически запрограммированной, физиологически активной гибели клетки

(нередко термины «программированная клеточная гибель» и «апоптоз» рассматриваются как синонимы). Апоптоз включает несколько этапов. Во-первых, получение клеткой экзогенного (внешнего, рецепторного) или эндогенного (нерецепторного) сигнала, «запускающего» процесс апоптоза. Во-вторых, характерная для многих биологических процессов «каскадная» активация внутриклеточных белков, реализующих программу апоптоза (инициирующих и эффекторных каспаз), которая регулируется множеством про- и антиапоптогенных белков. В-третьих, деструктуризация жизненно важных для функционирования клетки белковых субстратов, «запуск» ядерных эндонуклеаз, деградация ДНК до олигонуклеосомных фрагментов и формирование «апоптозных телец» с последующим их удалением путем фагоцитоза.

В многоклеточном организме апоптоз необходим для поддержания адекватного баланса между пролиферацией клеток, их дифференцировкой и элиминацией, и является важнейшим фактором иммунорегуляции как в процессе онтогенеза иммунной системы, так и при реализации реакций врожденного и адаптивного иммунитета [1, 4, 31]. Клеточные механизмы апоптоза тонко реагируют на изменения внутриклеточ-

ТАБЛИЦА 1. БАКТЕРИИ, МОДУЛИРУЮЩИЕ КЛЕТЧНУЮ ГИБЕЛЬ ФАГОЦИТИРУЮЩИХ ЛЕЙКОЦИТОВ [19]

Бактериальные патогены	Лейкоциты
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	Макрофаги (J774.1), мононуклеарные клетки периферической крови
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Макрофаги (RAW264.7)
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Нейтрофилы
<i>Bacillus anthracis</i>	Макрофаги (J774.A1, RAW264.7), мононуклеарные клетки периферической крови
<i>Borrelia hermsii</i>	Нейтрофилы
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Макрофаги
<i>Bordetella pertussis</i>	Макрофаги, нейтрофилы
<i>Brucella abortus</i>	Макрофаги (RAW264.7), моноциты
<i>Brucella melitensis</i>	Моноциты
<i>Brucella suis</i>	Моноциты
<i>Burkholderia cepacia</i>	Макрофаги (J774.2), нейтрофилы
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Промиелоцитарные клетки (U937, THP-1), нейтрофилы
<i>Chlamydia psittaci</i>	Макрофаги (J774)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Макрофаги, нейтрофилы
<i>Clostridium difficile</i>	Макрофаги, эозинофилы
<i>Coxiella burnetii</i>	Промиелоцитарные клетки (THP-1)
<i>Escherichia coli</i>	Моноциты, нейтрофилы
<i>Francisella tularensis</i>	Макрофаги (J774)
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	Нейтрофилы
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Нейтрофилы, мононуклеарные клетки периферической крови
<i>Haemophilus somnus</i>	Нейтрофилы
<i>Helicobacter pylori</i>	Макрофаги, моноциты, нейтрофилы
<i>Legionella longbeachae</i>	Промиелоцитарные клетки (HL60)
<i>Legionella pneumophila</i>	Моноциты, промиелоцитарные клетки (U937, HL60)
<i>Leptospira interrogans</i>	Макрофаги (J774.A1)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Дендритные клетки, макрофаги, нейтрофилы
<i>Mannheimia (Pasteurella) haemolytica</i>	Нейтрофилы
<i>Mycobacterium avium</i>	Макрофаги, моноциты
<i>Mycobacterium bovis-BCG</i>	Макрофаги, моноциты, нейтрофилы
<i>Mycobacterium kansasii</i>	Макрофаги, моноциты
<i>Mycobacterium leprae</i>	Макрофаги
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Макрофаги, моноциты, нейтрофилы
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	Макрофаги (J774)
<i>Mycoplasma fermentans</i>	Промиелоцитарные клетки (U937, HL60)
<i>Parachlamydia acanthamoeba</i>	Макрофаги
<i>Photobacterium damsela subsp. piscicida</i>	Макрофаги, нейтрофилы
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Промиелоцитарные клетки (THP-1), нейтрофилы
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Дендритные клетки, макрофаги, нейтрофилы
<i>Orientia (Rickettsia) tsutsugamushi</i>	Промиелоцитарные клетки (THP-1)
<i>Salmonella choleraesuis</i>	Макрофаги
<i>Shigella dysenteriae</i>	Макрофаги, нейтрофилы
<i>Shigella flexneri</i>	Макрофаги, моноциты
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>	Промиелоцитарные клетки (HL60)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Нейтрофилы
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Макрофаги, моноциты
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Макрофаги, нейтрофилы
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Промиелоцитарные клетки (U937), нейтрофилы
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Макрофаги
<i>Yersinia pestis</i>	Макрофаги
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Макрофаги
<i>Vibrio vulnificans</i>	Макрофаги

ного «оксидативного баланса», «химического» микроокружения клетки [2, 27]. Таким образом, характеристика «апоптотической реактивности» лейкоцитов (термин предложен А.Н. Чередеевым и Л.В. Ковальчуком [3]) — соотношения между интенсивностью пролиферации и апоптоза при активации, чувствительности лимфоцитов к рецепторным и нерцепторным апоптогенным сигналам, экспрессии про- и антиапоптогенных белков — чрезвычайно важна как в клинических, так и в экспериментальных исследованиях.

Как наиболее надежные, воспроизводимые и адекватные методы документации апоптоза в иммунологических исследованиях, рекомендованных базовыми руководствами по иммунологическим методам [18], следует выделить следующие методики, связанные с проточной цитометрией: 1) идентификации характерных для апоптотирующих клеток изменений мембраны; 2) характеристика изменений структуры и содержания ДНК. К сожалению, большинство этих методик не позволяют использовать цельную кровь, что важно при клинических исследованиях.

Развитие апоптоза уже на ранних этапах сопровождается снижением активности Mg^{2+} -зависимой аминоксидотрансферазы, что приводит к нарушению «фосфолипидной асимметрии» мембраны и появлению фосфатидилсерина на наружном слое мембраны. Использование меченого флуорохромом антикоагулянта аннексина-V (An-V), который специфически связывается с фосфатидилсеринном в присутствии ионов Ca^{2+} , и последующий цитометрический анализ обеспечивают четкую идентификацию клеток, уходящих в апоптоз. Использование многопараметрового анализа и одновременное «докрашивание» клеток красителями для нуклеиновых кислот (например, йодид пропидия, PI), которые не проникают в живые клетки, позволяет диф-

ференцировать клетки, находящиеся в ранней фазе апоптоза ($An-V^+PI^-$), позднем апоптозе ($An-V^+PI^+$) и мертвые клетки ($An-V^-PI^+$) (рис. 3). Весьма ценной является возможность одновременной оценки экспрессии мембранных маркеров и окрашивание An-V, что позволяет охарактеризовать конкретную популяцию апоптотирующих клеток [28, 32]. В то же время «аннексиновый» метод не допускает фиксации и хранения клеток, требует строгого соблюдения временного фактора при окрашивании.

Довольно распространенными, что связано с простотой выполнения, невысокими затратами и возможностью длительного хранения клеток, являются методы, основанные на окрашивании клеток ДНК-связывающими флуорохромами. Чаще всего используются йодид пропидия и 7-аминоактиномицин D (7-AAD). В этом случае клетки фиксируют этанолом, что обеспечивает, с одной стороны, «вымывание» низкомолекулярных фрагментов ДНК, с другой — фиксацию клеток. Затем клетки окрашивают флуорохромом в присутствии РНКазы и в процессе цитометрии выявляют так называемый гиподиплоидный (суб-G1) пик на гистограммах. Следует подчеркнуть, что, несмотря на довольно низкую точность идентификации апоптоза, данный подход оптимален для скрининговых исследований, требующих анализа большого числа проб и характеризуется хорошей воспроизводимостью (рис. 4).

В заключение следует отметить, что процедуры измерения фагоцитарной активности, «кислородного взрыва» и апоптоза представляют собой многошаговый и многофакторный процесс, поэтому специалисты должны контролировать его на всех этапах. Однако высокая производительность современных цитометров и большие выборки анализируемых клеток делают этот анализ более достоверным по сравнению с микроскопией.

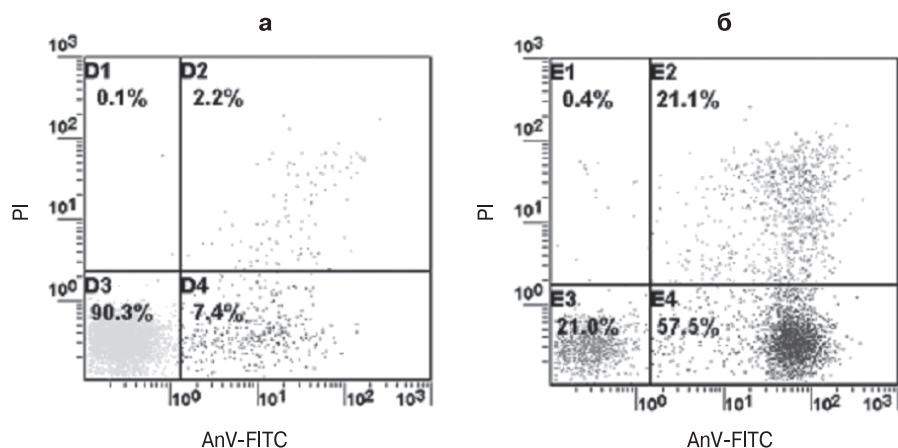


Рисунок 3. Пример использования аннексина-V для анализа ранних стадий апоптоза

а — свежее выделенные лимфоциты; б — лимфоциты после инкубации с цитостатиком.

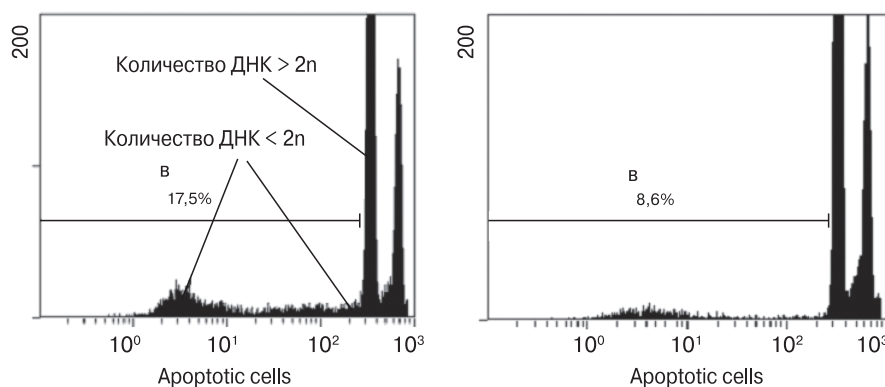


Рисунок 4. Идентификация апоптоза культивируемых клеток линии VERO с помощью окрашивания ДНК йодистым пропидием

Правая гистограмма: нормально делящаяся культура клеток. Левая гистограмма: увеличение клеток, содержащих ДНК $< 2n$, после длительного культивирования без замены среды.

Развитие современной клинической иммунологии, в том числе и инфекционной, требует применения максимально объективных тестов оценки функционального состояния различных типов фагоцитирующих клеток, таких как нейтрофилы, моноциты, макрофаги и дендритные клетки. Методы с использованием проточной цитометрии, представленные в данном обзоре, как раз и представляют новое высокотехнологичное направление научных исследований. Данные подходы позволяют, с одной стороны, значительно расширить наши представления о механизмах фагоцитоза, а с другой стороны, разработать более точные критерии нарушений функций фагоцитов при развитии патологических процессов, и, в первую очередь, оценить дефекты в системе фагоцитирующих клеток при инфекционной патологии. Все это в ближайшие годы найдет широкое применение в клинической практике и значительно улучшит качество диагностики первичных и вторичных нарушений функций фагоцитов.

Список литературы

1. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Иммунологические проблемы апоптоза. — М.: Эдиториал УРСС, 2002. — 309 с.
2. Сибиряк С.В., Вахитов В.А., Курчатова Н.Н. Цитохром P450 и иммунная система: факты, гипотезы, перспективы. — Уфа: ГИЛЕМ, 2003. — 211 с.
3. Череев А.Н., Ковальчук Л.В. Апоптоз, как важный этап оценки иммунной системы по патогенетическому принципу // *Клин. лаб. диагностика*. — 1997. — № 7. — С. 31–34.
4. Ярилин А.А. Апоптоз и его место в иммунных процессах // *Иммунология*. — 1996. — № 6. — С. 10–23.
5. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Возможности проточной цитофлуориметрии в диагностике инфекционных заболеваний. Часть 1 // *Инфекция и иммунитет*. — 2011. — Т. 1, № 1. — С. 59–66.
6. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Возможности проточной цитофлуориметрии в диагностике инфекционных заболеваний. Часть 2 // *Инфекция и иммунитет*. — 2011. — Т. 1, № 2. — С. 113–120.
7. Axtell R.A. Evaluation of the patients with a possible phagocytic disorder // *Hematol. Oncol. Clin.* — 1988. — Vol. 2. — P. 1–13.
8. Bassøe C.F. Flow cytometric studies on phagocyte function in bacterial infections // *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. C.* — 1984. — Vol. 92, N 3. — P. 167–171.
9. Bassøe C.F., Laerun O.D., Glette J., Hopen G., Haneburg B., Solberg C.O. Simultaneous measurement of phagocytosis and phagosomal pH by flow cytometry: role of polymorphonuclear neutrophilic leukocyte granules in phagosome acidification // *Cytometry*. — 1983. — Vol. 4. — P. 254–262.
10. Bassøe C.F., Bjercknes R. Phagocytosis by human leukocytes, phagosomal pH and degradation of seven species of bacteria measured by flow cytometry // *J. Med. Microbiol.* — 1985. — Vol. 19. — P. 115–125.
11. Bjercknes R. Flow cytometric assay for combined measurement of phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* // *J. Immunol. Methods*. — 1984. — Vol. 72. — P. 229–241.
12. Bjercknes R., Bassøe C.F. Human leukocytes phagocytosis of zymosan particles measured by flow cytometry // *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. C.* — 1983. — Vol. 91. — P. 341–348.
13. Braunstein J.D., Gorski A., Sharpless T.K., Melamed M.R. Quantitation of granulocyte phagocytosis by flow cytometry // *Fed. Proc.* — 1976. — Vol. 35. — P. 490.
14. Cantinieaux B., Hariga C., Courtoy P., Hupin J., Fondu P. Staphylococcus aureus phagocytosis: a new cytofluorometric method using FITC and paraformaldehyde // *J. Immunol. Methods*. — 1989. — Vol. 121. — P. 203–208.
15. Chen S.M., Dumler J.S., Bakken J.S., Walker D.H. Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species

- as the etiologic agent of human disease // *J. Clin. Microbiol.* — 1994. — Vol. 32. — P. 589–595.
16. Chishti A.D., Shenton B.K., Kirby J.A., Boudouin S.V. Neutrophil chemotaxis and receptor expression in clinical septic shock // *Intensive Care Med.* — 2004. — Vol. 30. — P. 605–611
 17. Crogan J.B. Altered neutrophil phagocytic function in burn patients // *J. Trauma.* — 1976. — Vol. 16. — P. 734–738.
 18. Darzynkiewitch Z., Li X., Gong J., Traganos F. Methods for analysis of apoptosis by flow cytometry // *Manual of Clinical Laboratory Immunology*; Eds. N.R. Rose et al. — 5th ed. — Washington: ASM Press, 1997. — P. 334–345.
 19. DeLeo F.R. Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens // *Apoptosis.* — 2004. — Vol. 9. — P. 399–413.
 20. Dobmeyer T.S., Raffel B., Dobmeyer J.M., Findhammer S., Klein S.A., Kabelitz D. Hoelzer D., Helm E.B., Rossol R. Decreased function of monocytes and granulocytes during HIV-1 infection correlates with CD4 cell counts // *Eur. J. Med.* — 1995. — Vol. 1, N 1. — P. 9–15.
 21. Donadebian H.D. Congenital and acquired neutrophil abnormalities // *Phagocytes and Disease*; Eds. M.S. Klempner et al. — Kluwer–Dordrecht–Boston–New York, 1989. — P. 103–118.
 22. Fattorossi A., Nisini R., Pizzolo J.G., D'Amelio R. New, simple flow cytometry technique to discriminate between internalized and membrane-bound particles in phagocytosis // *Cytometry.* — 1989. — Vol. 10, Iss. 3. — P. 320–325.
 23. Gessler P., Nebe T., Birle A., Haas N. Kachel W. Neutrophil respiratory burst in term and preterm neonates without signs of infection and in those with increased levels of C-reactive protein // *Pediatr. Res.* — 1996. — Vol. 39. — P. 843–848.
 24. Hausi M., Hirabayashi Y., Kobayashi Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood // *J. Immunol. Methods.* — 1989. — Vol. 117. — P. 53–58.
 25. Hed J. The extinction of fluorescence by crystal violet and its use to differentiate between attached and ingested microorganisms in phagocytosis // *FEMS Lett.* — 1977. — Vol. 1. — P. 357–361.
 26. Herron M.J., Nelson C.M., Larson J., Snapp K.R., Kansas G.S., Goodman J.L. Intracellular parasitism by the human granulocytic ehrlichiosis bacterium through the P-selectin ligand, PSGL-1 // *Science.* — 2000. — Vol. 288. — P. 1653–1656.
 27. Hildeman D., Mitchell Th., Kappler J., Marrack Ph. T cell apoptosis and reactive oxygen species // *J. Clin. Invest.* — 2003. — Vol. 111. — P. 575–581.
 28. Holm G.H., Gabuzda D. Distinct mechanisms of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell activation and bystander apoptosis induced by human immunodeficiency virus type 1 virions // *J. Virol.* — 2005. — Vol. 79, Iss. 10. — P. 6299–6311.
 29. Johansson A., Jesaitis A.J., Lundqvist H., Magnusson K.E., Sjölin C., Karlsson A., Dahlgren C. Different subcellular localization of cytochrome b and the dormant NADPHoxidase in neutrophils and macrophages: Effect on the production of reactive oxygen species during phagocytosis // *Cell. Immunol.* — 1995. — Vol. 161. — P. 61–71.
 30. Kakinuma K., Yamaguchi T., Shimada K., Sato N. Comparative studies on alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes. III. Difference spectra of their cellular and subcellular fractions // *J. Biochem.* — 1980. — Vol. 88. — P. 1467–1474.
 31. Krammer P. CD95 (APO-1/Fas) mediated apoptosis: live and let die // *Adv. Immunol.* — 1999. — Vol. 71. — P. 163–210.
 32. Lyadova I.V., Eruslanov E.B., Khaidukov S.V., Yermeev V.V., Majorov K.B., Pichugin A.V., Nikonenko B.V., Kondratieva T.K., Apt A.S. Comparative analysis of T lymphocytes recovered from the lungs of mice genetically susceptible, resistant, and hyperresistant to Mycobacterium tuberculosis-triggered disease // *J. Immunol.* — 2000. — Vol. 165, N 10. — P. 5921–5931.
 33. Nakagawara A., Nathan C.F., Cohn Z.A. Hydrogen peroxide metabolism in human monocytes during differentiation in vitro // *J. Clin. Invest.* — 1981. — Vol. 68. — P. 1243–1252.
 34. Panasiuk A., Wysocka J., Maciorkowska E., Panasiuk B., Prokopowicz D., Zak J., Radomski K. Phagocytic and oxidative burst activity of neutrophils in the end stage of liver cirrhosis // *World. J. Gastroenterol.* — 2005. — Vol. 11, Iss. 48. — P. 7661–7665.
 35. Remold-O'Donnell E., Parent D. Downregulation of neutrophil CD43 by opsonized zymosan // *Blood.* — 1995. — Vol. 85, N 2. — P. 337–342.
 36. Robinson J.P., Carter W.O. Flow cytometric analysis of granulocytes // *Clinical Flow Cytometry, Principles and Applications*; Eds: Bauer K.D. et al. — Baltimore: Williams&Wilkins, 1993. — P. 405–433.
 37. Rothe G., Oser A., Valet G. Dihydrorhodamin 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes // *Naturwissenschaften.* — 1988. — Vol. 75. — P. 354–355.
 38. Savill J. Apoptosis in the resolution of inflammation // *J. Leukoc. Biol.* — 1997. — Vol. 61. — P. 375–380.
 39. Sawyer D.W., Donowitz G.R., Mandell G.L. Polymorphonuclear neutrophils: An effective antimicrobial force // *Rev. Infect. Dis.* — 1989. — Vol. 11. — P. 1532–1544.
 40. Scaife H., Woldehiwet Z., Hart C.A., Edwards S.W. Anaplasma phagocytophilum reduces neutrophil apoptosis in vivo // *Infect. Immun.* — 2003. — Vol. 71. — P. 1995–2001.
 41. Shalekoff S., Tiemessen C.T., Gray C.M., Martin D.J. Depressed phagocytosis and oxidative burst in polymorphonuclear leukocytes from individuals with pulmonary tuberculosis with or without human immunodeficiency virus type 1 infection // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* — 1998. — Vol. 5, N 1. — P. 41–44.
 42. Smith R.M., Curnutte J.T. Molecular basis of chronic granulomatous disease // *Blood.* — 1991. — Vol. 77. — P. 673–686.

43. Vogel L., Alphen L. van, Geluk F., Troelstra A., Martin E., Bredius R., Eijk P., Jansen H., Dankert J. Quantitative flow cytometric analysis of opsonophagocytosis and killing of nonencapsulated *Haemophilus influenzae* by human polymorphonuclear leukocytes // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* — 1994. — Vol. 1(4). — P. 394–400.
44. White-Owen C., Alexander J.W., Sramkoski R.M., Babcock G.F. Rapid whole-blood microassay using flow cytometry for measuring neutrophil phagocytosis // *J. Clin. Microbiol.* — 1992. — Vol. 30, N 8. — P. 2071–2076.
45. Yagisawa M., Yuo A., Yonemaru M., Imajoh-Ohmi S., Kanegasaki S., Yazaki Y., Takaku F. Superoxide release and NADPH oxidase components in mature human phagocytes: Correlation between functional capacity and amount of functional proteins // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1996. — Vol. 228. — P. 510–516.
46. Yamaguchi T., Kakinuma K., Kaneda M., Shimada K. Comparative studies on alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes. I. H_2O_2 and O_2 -generation by rabbit alveolar macrophages // *J. Biochem.* — 1980. — Vol. 87. — P. 1449–1455.
47. Yoshiie K., Kim H.Y., Mott J., Rikihisa Y. Intracellular infection by the human granulocytic ehrlichiosis agent inhibits human neutrophil apoptosis // *Infect. Immun.* — 2000. — Vol. 68. — P. 1125–1133.
48. Zandbergen G. van, Gieffers J., Kothe H., Rupp J., Bollinger A., Aga E., Klinger M., Brade H., Dalhoff K., Maass M., Solbach W., Laskay T. *Chlamydia pneumoniae* multiply in neutrophil granulocytes and delay their spontaneous apoptosis // *J. Immunol.* — 2004. — Vol. 172. — P. 1768–1776.