

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ КЛЕТОК КРОВИ В МЕДИЦИНЕ: ИСТОРИЯ, ТЕОРИЯ, ПРАКТИКА

И.В. Образцов¹, М.А. Годков², доктор медицинских наук

¹Федеральный научно-клинический центр детской гематологии,
онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева МЗ РФ, Москва,

²НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва

E-mail: mgodkov@yandex.ru

Хемилюминесцентный анализ используется для оценки окислительного метаболизма клеток крови уже в течение полувека. Разработаны многочисленные методики для исследования функциональной активности моноцитов и нейтрофилов. В последние десятилетия применение хемилюминесцентного анализа в клинических и экспериментальных исследованиях позволило расширить возможности лабораторной диагностики различных патологических процессов. В настоящем обзоре систематизированы описанные в литературе подходы к хемилюминесцентному анализу клеток крови, перспективные для использования в клинической практике.

Ключевые слова: хемилюминесцентный анализ, нейтрофилы, моноциты, функциональная активность фагоцитов

CHEMILUMINESCENT ANALYSIS OF THE BLOOD CELLS IN MEDICINE: HISTORY, THEORY, PRACTICE

I.V. Obraztsov¹, M.A. Godkov²

¹Federal Research Center for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow,

²Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Moscow

Chemiluminescence is used to investigate the oxidative metabolism of blood cells for half a century. Numerous techniques for evaluation monocyte and neutrophil function have been developed. Applying of chemiluminescent analysis in clinical and experimental research has strengthened the ability of laboratory diagnosis of various pathological processes since last decades. In this review, we have described and classified methods of chemiluminescent analysis of blood cells that are promising for use in clinical practice.

Key words: chemiluminescent assay, neutrophils, monocytes, phagocytic function, oxidative metabolism

ВВЕДЕНИЕ

Постоянной задачей врачей клинической лабораторной диагностики является совершенствование методов неинвазивной (малоинвазивной) диагностики патологических состояний. Современные методы тестирования биологических тканей и клеточных популяций должны характеризоваться как высокой избирательностью исследуемого объекта (возможностью тестирования тонких механизмов развития конкретной патологии), так и способностью проводить интегральную оценку сложных патологических процессов. Группа биофизических методов тестирования функционального состояния клеточных популяций и биологических жидкостей, основанная на регистрации эмиссии квантов света и объединенная названием хемилюминесцентный анализ (ХЛА), полностью отвечает перечисленным требованиям.

Так, ХЛА полиморфно-ядерных лейкоцитов (ПЯЛ) или моноцитов/макрофагов (в цельной крови или выделенных с помощью различных лабораторных технологий) позволяет с достаточной опреде-

ленностью судить о функциональном соответствии конкретных популяций фагоцитарного звена иммунной системы, состоянии их рецепторного аппарата, способности к эффективному фагоцитозу и киллингу микроорганизмов. Вместе с тем оценка состояния иммунитета пациентов с использованием ХЛА клеток крови характеризуется малой инвазивностью, возможностью регистрации клеточной активации в процессе ее развития, высокой чувствительностью, исключением субъективного фактора работы оператора.

Биофизические и физиологические принципы ХЛ клеток крови

Хемилюминесценцией (ХЛ) называют эмиссию электромагнитного излучения в диапазоне видимого света, сопровождающую химические реакции. ХЛ часто сопровождает процессы, протекающие в биологических системах, в частности, в клетках человека и животных. ХЛ живых систем принято классифицировать следующим образом [4]:

1. Биолюминесценция – свечение некоторых организмов, связанное со специфическими ферментативными реакциями: свечение весьма интенсивное и может быть зафиксировано невооруженным глазом, однако оно не характерно для клеток человеческого организма.

2. Сверхслабое свечение – собственная ХЛ клеток и тканей человека и животных, обусловлена метаболизмом активных форм кислорода, азота и липидов. Интенсивность настолько мала, что этот тип свечения может быть зарегистрирован только с помощью высокочувствительных приборов (фотоэлектронный умножитель, газоразрядные счетчики).

3. Усиленная ХЛ – свечение, усиленное за счет введения в систему специальных веществ (ХЛ-зондов), которые увеличивают ХЛ-сигнал в результате взаимодействия с конкретными формами свободных радикалов-субстратов, ответственных за формирование ХЛ. Наиболее распространенные ХЛ-зонды – люминол и люцигенин.

4. Индуцированная ХЛ – свечение клеток, вызванное воздействием индукторов, запускающих специфические метаболические каскады, приводящие к синтезу активных форм кислорода (АФК) или органических свободных радикалов, являющихся субстратом ХЛ. В качестве индуктора применяются: физические факторы (облучение лазером, электрический ток, тепловое или механическое воздействие), химические стимулы (12-0-тетрадеканойлфорбол-13-ацетат – ТФА, 4β-форбол-12-миристинат-13-ацетат – ФМА, N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин – ФМЛФ, липополисахарид – ЛПС), агенты, ини-

цирующие процесс фагоцитоза (частицы латекса, суспензии микроорганизмов).

Первооткрывателем собственной клеточной ХЛ является российский ученый А. Гурвич, показавший в 1934 г. существование чрезвычайно слабого свечения клеток в ультрафиолетовом (УФ) диапазоне, названного им митогенетическими лучами [3]. Первым способностью клеток человеческой крови испускать сверхслабое свечение продемонстрировал Р. Аллен, который в 1973 г. открыл собственную ХЛ лейкоцитов крови человека [12], а также предложил использовать люминол в качестве активатора ХЛ макрофагов. В этих работах показано, что субстратом ХЛ клеток крови являются ПЯЛ и моноциты, обладающие специфическим ферментативным аппаратом для реализации кислородзависимой микробицидности.

Кислородзависимая микробицидность фагоцитов осуществляется за счет синтеза АФК. Под действием индуктора фагоцит активируется, что сопровождается респираторным взрывом – процессом активной краткосрочной выработки АФК, направленной на окисление и разрушение молекулярных структур чужеродного агента. Респираторный взрыв наблюдается при образовании везикул в процессе фагоцитоза и при адгезии фагоцита на недоступные для фагоцитоза объекты [13]. АФК, выделяющиеся при активации фагоцита в первую очередь, относятся к первичным кислородным метаболитам; молекулы, образующиеся из них, называют вторичными кислородными метаболитами [25, 30].

Деструктивные эффекты кислородных метаболитов весьма многообразны. К прямым деструк-

тивным эффектам относятся перекисное окисление липидов и белков, инактивация ферментов и окисление ДНК, опосредованное – повышение чувствительности к гидролазам, подавление ингибиторов нейтральных протеиназ, образование липидных хемоаттрактантов и вторичных биотоксинов, активация металлопротеиназ.

В начале в цепи превращений цитотоксичных метаболитов кислорода стоит супероксидный радикал [11] OO^- . Генерация его происходит за счет переноса 2 электронов на 2 молекулы кислорода при участии НАДФ • Н-оксидазного комплекса (НАДФ • Н-оксидазы) [3]. Значение этого превращения трудно переоценить, так как недостаточность синтеза супероксид-радикала, развивающаяся в

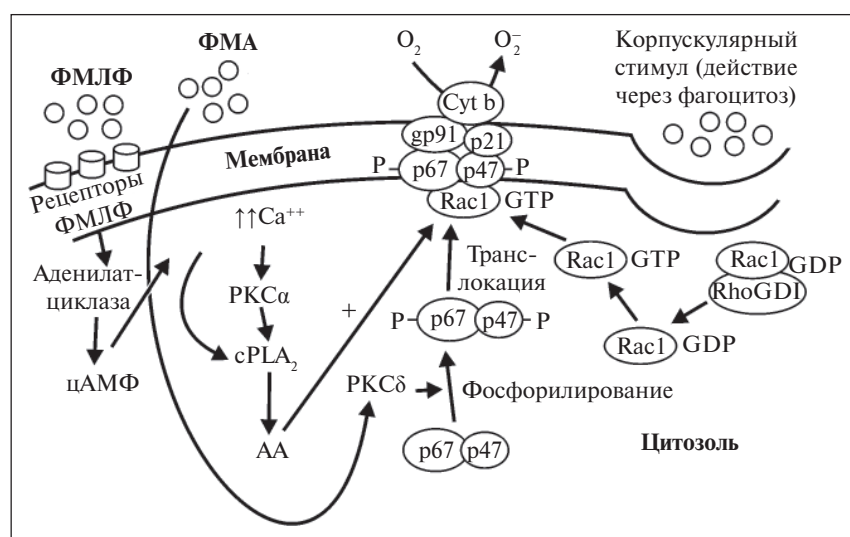


Рис. 1. Действие различных индукторов клеточной ХЛ и механизм сборки НАДФ • Н-оксидазы фагоцитов: цАМФ – циклический аденозинмонофосфат; PKC – протеинкиназа C; PLA2 – фосфолипаза A2; АА – арахидоновая кислота. Овалы обозначают субединицы комплекса НАДФ • Н-оксидазы. По [24] с изменениями и дополнениями

результате какой-либо дисфункции НАДФ•Н-оксидазы, приводит к серьезным нарушениям иммунного ответа. НАДФ•Н-оксидаза представляет собой многокомпонентный ферментативный комплекс, направленный на перенос электрона на молекулу кислорода. Этот комплекс встроен в липидный бислой мембраны и может находиться как на плазмалемме, так и на мембранах внутриклеточных вакуолей фагоцитов. Весь ферментативный комплекс состоит из нескольких субъединиц. В покоящейся клетке эти субъединицы разобщены и распределены между плазматической мембраной и цитозолем [39]. Во время активации клетки каким-либо индуктором запускается каскад внутриклеточных посредников, который приводит к сборке мембранного комплекса НАДФ•Н-оксидазы и активации синтеза супероксидного радикала [24]. На рис. 1 представлено действие растворимых (ФМА и ФМЛФ) и корпускулярных индукторов и механизм сборки НАДФ•Н-оксидазы.

Сборка НАДФ•Н-оксидазного комплекса происходит не только на клеточной мембране, но и на мембранах фагоцитируемых везикул. Работа фермента в мембране фагосомы направлена на окисление структур поглощенных микроорганизмов под действием АФК; НАДФ•Н-оксидаза, встроенная в плазмалемму, необходима для выработки супероксида, направленного на объекты, недоступные для фагоцитоза. Выделяющийся супероксид взаимодействует с другими ферментами (супероксиддисмутазой – СОД, миелопероксидазой – МПО) и превращается во вторичные цитотоксические продукты [4, 25].

Методология проведения ХЛА фагоцитов

Объектами исследования ХЛ клеток крови являются: 1) разведенная цельная кровь; 2) выделенные фракции ПЯЛ; 3) выделенные фракции мононуклеаров. Авторы, исследующие ХЛ цельной крови, рекомендуют использование различных степеней разведения крови для анализа: 1/9 [15]; 1/21 [6]; 1/40 [10]; 1/100 [16]; 1/200 [8]; в отечественных методических рекомендациях [7] предложено разведение крови в 22 раза. При этом рост интенсивности ХЛ-ответа при увеличении степени разведения с 2- до 22-кратного обусловлен снижением оптической плотности раствора; дальнейшее увеличение степени разведения приводит к падению интенсивности ХЛ-ответа за счет снижения количества фагоцитов в пробе.

Однако, несмотря на значительное упрощение процедуры анализа, работа с разведенной цельной кровью имеет существенный недостаток: невозможно избавиться от антиоксидантной активности плазмы, способной значительно исказить результаты ХЛА клеток крови. В связи с этим большинство исследователей работают с изолированной фракцией клеток: ПЯЛ [17] или мононуклеаров [19, 43, 47]. Выделение необходимой фракции клеток выполняется на градиенте Ficoll-верографин с плотностью 1,077 – для получения фракции ПЯЛ или 1,119 – для мононуклеаров.

Как уже указывалось, наиболее простым способом оценки синтеза АФК клетками крови является регистрация собственной ХЛ клеток без использования какого-либо усилителя свечения [5]. Субстратом ХЛ является синглетный кислород [27]. Существенный недостаток тестирования собственной ХЛ – крайне низкая интенсивность свечения, вследствие чего приходится использовать большие количества клеток в пробе.

Благодаря работам Р. Аллена и соавт. [12], в начале 1970-х годов широкое распространение получило использование люминола в качестве химического усилителя ХЛ (за счет окисления люминола, АФК и взаимодействия его окисленных форм с супероксидным радикалом или пероксидом водорода). Этот сложный процесс протекает в 8 стадий, в итоге приводящих к испусканию кванта света (рис. 2) [23].

Среди исследователей весьма популярно применение люминола и его изомеров в качестве ХЛ-зондов. Молекула люминола свободно проникает в клетку, в отличие от своего изомера изолуминола,

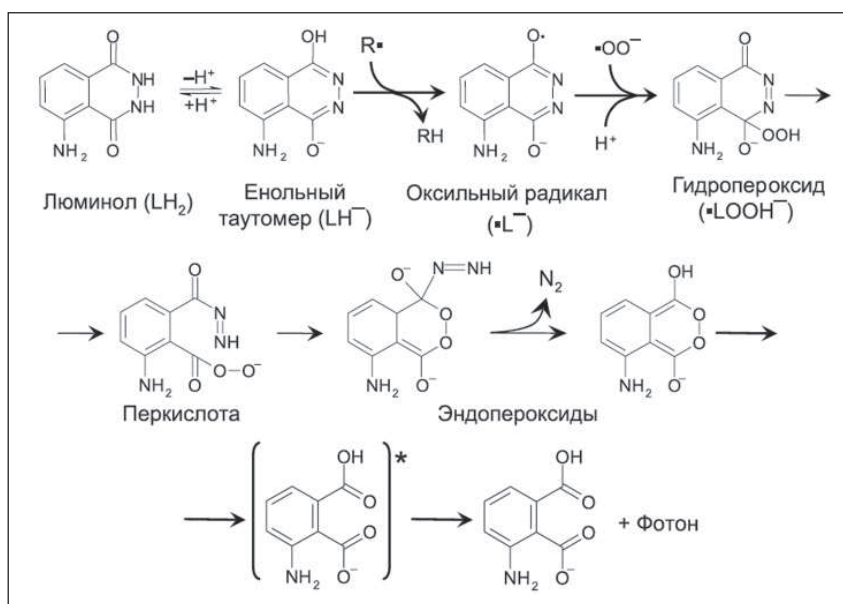


Рис. 2. Выделение кванта света при взаимодействии люминола с АФК (схема реакции, по [4])

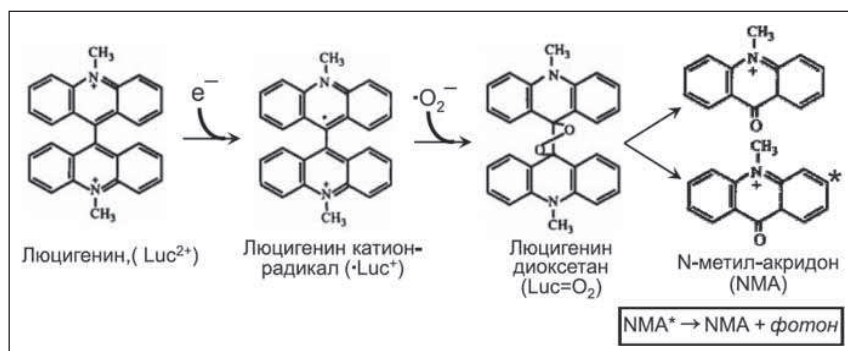


Рис. 3. Выделение кванта света при взаимодействии люцигенина с АФК (схема реакции, по [4])

в котором аминогруппа находится не в 5-м, а в 6-м положении [35]. Изолуминол, вступая во взаимодействие с АФК по тем же механизмам, что и люминол, позволяет оценить экскрецию кислородных метаболитов только во внеклеточную среду.

Помимо производных люминола, в качестве усилителя ХЛ широкое распространение получил люцигенин [38] с принципиально иными структурой и механизмом действия. Этот ХЛ-зонд также используется для обнаружения супероксидного радикала. Описан [17] механизм действия люцигенина (рис. 3).

Стоит отметить, что выше охарактеризованы только наиболее часто используемые ХЛ-зонды. Многообразие веществ, чувствительных к супероксиду и способных усиливать клеточную ХЛ, весьма велико. К ним относятся, к примеру, L012, целентеразин, аналог люциферина MCLA [17].

В современных исследованиях используется целый спектр индукторов, вызывающих сборку

НАДФ • Н-оксидазы и реализацию кислородного взрыва фагоцитов (см. таблицу).

Применение физических индукторов ХЛ, таких, как низкоинтенсивное лазерное излучение или световое излучение диодов, широко представлено в работах отечественных исследователей [3, 19]; другие физические индукторы в настоящее время используют значительно реже. Химические индукторы – такие, как агенты, способные избирательно влиять на то или иное звено каскада вторичных посредников, приводящего

к активации клетки, получили широкое признание и у отечественных [4, 6] и у зарубежных [12, 42] ученых. Отработана технология применения при ХЛА ряда веществ, способных стремительно активировать клетку благодаря лигандрецепторному взаимодействию (ФМЛФ для рецептора ФМЛФ, зимозан для β-гликанового рецептора, моноклональные антитела и др.). Липофильные молекулы специфических активаторов протеинкиназы С (ПКС) проникают в клетку за счет пассивной диффузии, этот процесс более медленный. В результате действия обоих семейств химических индукторов происходят открытие кальциевых каналов, вход ионов Ca²⁺ в клетку и ее активация. Такое же действие оказывают молекулы иономицина, A23187 (Ca²⁺-ионофоры) и эффект электропорации. Корпускулярные индукторы являются макрочастицами, способными активировать процесс фагоцитоза с последующей наработкой АФК в пространство сформированной фаголизосомы. Их использование позволяет оценить эффективность внутриклеточного бактериального киллинга (см. рис. 1).

Исследователями [2, 41] оценен эффект последовательного воздействия растворимых и корпускулярных индукторов на фагоциты цельной крови человека. Показано значительное усиление интенсивности ХЛ-ответа на внесение ФМЛФ или латекса в суспензию клеток, предварительно стимулированных ФМА, по сравнению с контрольным опытом (предстимуляция физиологическим раствором) (рис. 4).

Яркая вспышка ХЛ после внесения ФМЛФ в систему, предстимулированную ФМА, подтверждает данные об эффекте потенцирования рецепторов ФМЛФ за счет действия ФМА [27]. Потенцирование ХЛ-ответа, индуцированного латексом, за счет предстимуляции ФМА связано с непосредственным действием последнего (активация ПКС). Активация ПКС способствует сборке НАДФ • Н-оксидазного комплекса на мембранах везикул с поглощенными частицами латекса.

ИНДУКТОРЫ КЛЕТочНОЙ ХЛ

Индукторы	Источник	
Физические	Облучение светом [46]	
	Лазерное излучение [36], [28]	
	Электропорация [37]	
Химические	Агонисты рецепторов	ФМЛФ [38], [2]
		анти-CD36 [11]
		Зимозан А [9], [21]
	Ca ²⁺ ионофор	A23187 [40]
		Иономицин [50]
	Активаторы ПКС	ФМА [20], [2]
	ТФА [34]	
Корпускулярные	Частицы латекса [31]	
	Микроорганизмы	<i>E. coli</i> [47]
		<i>C. albicans</i> [48]

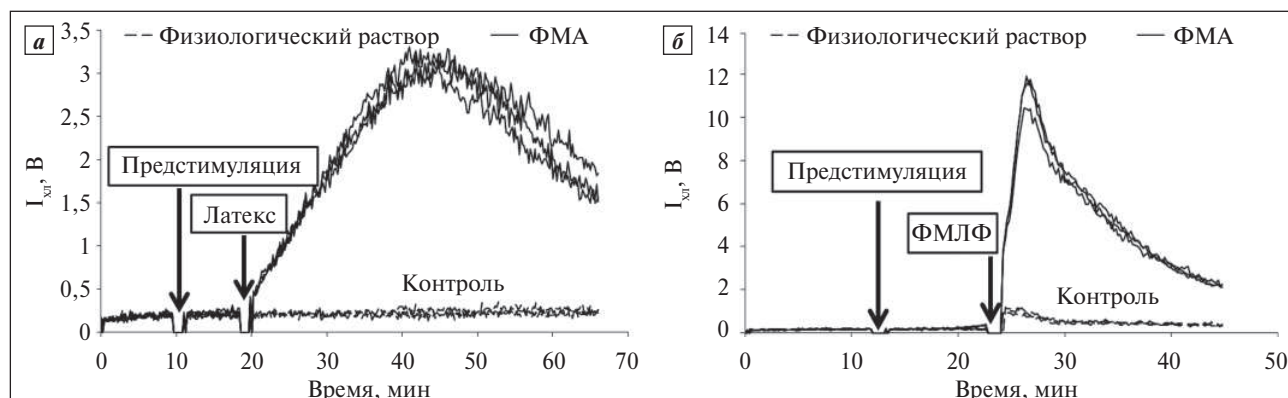


Рис. 4. Влияние предстимуляции ФМА на ХЛ, индуцированную латексом (а) или ФМЛФ (б)

ХЛ клеток крови у пациентов с различными видами патологии

Учитывая все многообразие подходов и методологий ХЛА клеток крови, целесообразно охарактеризовать направления применения клеточной ХЛ в клинической практике.

Развитие гнойно-септических осложнений и сепсиса является основной причиной гибели пациентов с тяжелыми травмами, массивной кровопотерей, обширными ожогами, отравлениями химическими веществами и рядом других патологических состояний. Выброс эндогенных продуктов распада приводит к развитию синдрома системного воспалительного ответа (ССВО), сопровождающегося дискоординацией и супрессией различных звеньев иммунитета. Массивная микробная инвазия и(или) транслокация микроорганизмов из различных компартментов организма в кровяное русло и поврежденные ткани являются частью комплекса факторов, приводящих к септическим осложнениям. Нарушение функции фагоцитов при ССВО проявляется в нарушении бактериального киллинга, изменении уровня секреции интерлейкинов и цитокинов макрофагами, что приводит к активации и дегрануляции нейтрофилов с возникновением оксидативного стресса. Развивается системное повреждение тканей, приводящее к полиорганной недостаточности и гибели пациента. Поэтому определение функции фагоцитов у больных с развивающимся ССВО может оказаться ценным в прогнозе развития гнойно-септических осложнений.

Исследованию функции фагоцитов при сепсисе различной этиологии посвящено большое количество работ. В эксперименте на крысах показано [29] значимое снижение оксидативного метаболизма нейтрофилов периферической крови на начальных этапах острого панкреатита, ткани поджелудочной железы, напротив, характеризовались интенсивным оксидативным стрессом. Это согласуется с данными [32] о снижении окислительного метаболизма периферических нейтрофилов с инфильтрацией и избыточной оксидацией в очаге воспаления при индуцированном

перитоните у крыс. В работе [6] показано снижение ХЛ-ответа фагоцитов периферической крови, индуцированного зимозаном, у больных с сочетанной травмой, осложнившейся ССВО и сепсисом. Премонстрированы подавление хемотаксиса и угнетение респираторного метаболизма лейкоцитов при ожоговом сепсисе [22]. Показано изменение кинетики ХЛ-ответа при двустадийной стимуляции фагоцитов цельной крови в виде появления медленной вспышки ХЛ у больных с тяжелой термической травмой [2] (рис. 5).

При высоком содержании нейтрофилов недостаточная интенсивность медленной кинетики позволяла прогнозировать тяжелое длительное течение заболевания с вероятностью развития гнойно-септических осложнений и летального исхода.

Отдельного упоминания заслуживают работы, посвященные определению уровня эндотоксина, основанные на регистрации ХЛ нейтрофилов. Этот подход основан на использовании эффекта прайминга нейтрофилов опсонизированными комплексами иммунными комплексами [44]. Существуют официальные тест-системы [49] для определения уровня эндотоксина методом ХЛ фагоцитов, однако пока опубликованы преимущественно работы, выполненные на животных.

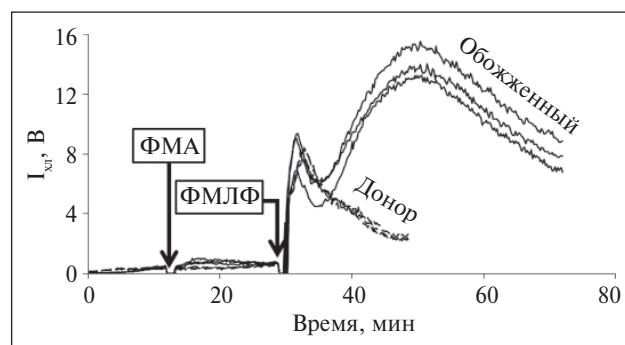


Рис. 5. Типичные хемилуминограммы донора (пунктирная кривая) и пациента с ожогами (сплошная линия)

Исследование ХЛ клеток крови нашло применение в изучении и диагностике иммунодефицитов. ХЛА нейтрофилов стал методом первой линии при диагностике хронической гранулематозной болезни (ХГБ) – наследственного первичного иммунодефицита, характеризующегося рекуррентными инфекциями и обусловленного дефектом структуры НАДФ•Н-оксидазы [14]. ХЛ фагоцитов при других первичных иммунодефицитных состояниях изучена мало, однако существуют данные об отсутствии нарушения оксидативного метаболизма моноцитов и ПЯЛ при ХЛА с использованием дрожжей и ФМЛФ в качестве индуктора у пациентки с общей вариабельной иммунной недостаточностью (ОВИН) [26].

При аллергической реакции активация ПЯЛ происходит в результате влияния всего многообразного комплекса медиаторов и биологически активных веществ, высвобождающихся из клеток-мишеней в ответ на действие специфического аллергена. Использование аллергенов в качестве клеточных индукторов позволило создать протоколы для выявления сенсibilизации тестируемыми аллергенами [1]. Показано усиление ХЛ-ответа на внесение аллергенов *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Candida albicans* у детей с аллергическими заболеваниями легких [9].

Изменение функции фагоцитов периферической крови показано при онкологических заболеваниях. Так, в исследовании [45] на основе данных ХЛА нейтрофилов выявлено усиление базальной продукции АФК вместе с более быстрым ответом на внесение зимозана у больных раком почки по сравнению с контролем (здоровые).

Активированная ХЛ применяется для определения влияния различных лекарственных веществ на

кислородный метаболизм моноцитов и нейтрофилов. В работе [42] подробно изучен эффект возрастания дозы и времени инкубации с антибиотиками группы пенициллинов, цефалоспоринов и аминокликозидов на моноциты и ПЯЛ периферической крови. А. Кӧhnке и соавт. [33] показали угнетение синтеза АФК макрофагами, полученными из моноцитов периферической крови человека, при воздействии морфина и его производных в дозе выше 10^{-7} М. Налоксон потенцировал эффект морфина при больших концентрациях и являлся антагонистом при малых. Показано также отсутствие эффекта пропранолола и бупивакаина на ХЛ-ответ макрофагов. В исследовании А. Basile и соавт. [16] на основе результатов ХЛА цельной крови, изолированных ПЯЛ и моноцитов продемонстрировано антиоксидантное действие кумаринов растения *Ferulago campestris*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ХЛА клеток крови является высокочувствительным прямым методом анализа, характеризующимся безопасностью, высокой скоростью и простотой выполнения. Использование различных ХЛ-зондов позволяет оценить и общую интенсивность окислительного метаболизма, и синтез конкретных форм АФК. Имеющийся арсенал клеточных индукторов дает возможность исследователям создавать протоколы ХЛА как для оценки функциональной активности ПЯЛ или моноцитов в целом, так и различных ее аспектов. Анализ литературных данных показал многогранность предлагаемых подходов к ХЛА клеток крови, которая открывает широкие перспективы для внедрения метода в различные области клинической лабораторной диагностики.

ЛИТЕРАТУРА

- Агафонов В.Е., Митреева Д.Е. Модификация метода хемилюминесцентного анализа для оценки активности фагоцитов цельной крови сенсibilизированных животных // Клиническая лабораторная диагностика. – 2004; 3: 47–50.
- Владимиров Ю.А., Годков М.А., Образцов И.В., Проскурнина Е.В. Опыт исследования функциональной активности нейтрофилов у пациентов с тяжелой термической травмой // Материалы XVII Всероссийской научно-практической конференции «Интеграция в лабораторной медицине». – М., 2012.
- Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. Лекции по медицинской биофизике. – М.: Изд-во МГУ, 2007. – 432 с.
- Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // Успехи биологической химии. Т. 49. – 2009. – С. 341–88.
- Владимиров Ю.А., Литвин Ф.Ф. Исследование сверхслабых свечений в биологических системах // Биофизика. – 1959; 4 (5): 601–5.
- Годков М.А. Хемилюминесцентный анализ нейтрофилов неразделенной крови в клинической практике. – Дис. канд. мед. наук. – М. – 1998.
- Земсков В.М. и др. Изучение функционального состояния фагоцитов человека (кислородный метаболизм и подвижность клеток) // Метод. рекомендации. – М., 1988.
- Невмятулин А.Л. Реактивная хемилюминесценция нейтрофилов человека в системах со стафилококками. – Дис. канд. мед. наук. – Горький. – 1987.
- Семенов А.В., Миненкова Т.А., Мизерницкий Ю.Л. Хемилюминесцентное определение активности нейтрофилов периферической крови при аллергических болезнях легких у детей с грибковой сенсibilизацией // Клин. лаб. диагностика. – 2012; 10: 47–50.
- Фролов В.М., Пересадин Н.А., Ларионов Г.М. Применение хемилюминесценции для прогнозирования гнойно-воспалительных осложнений при роже и ангине // Клин. лаб. диагностика. – 1993; 3: 29–31.
- Albrecht D., Jungi T. Luminol-enhanced chemiluminescence induced in peripheral blood-derived human phagocytes: obligatory requirement of myeloperoxidase exocytosis by monocytes. // J. of Leukocyte Biology. – 1993; 54: 300–6.
- Allen R., Stenholm R., Steele R. Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bacterial activity // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1972; 47: 679–84.
- Babior B. Oxidants from phagocytes: Agents of defense and destruction. Blood. – 1984; 64: 959–66.
- Barbouche M., Sghiri R. et al. Chronic septic granulomatous disease. 14 cases // Presse Med. – 1999; Nov 27; 28 (37): 2034–6.
- Bartelt S. et al. The effect of dietary fish oil supplementation to healthy young men on oxidative burst measured by whole blood chemiluminescence // British J. of Nutrition. – 2008; 99: 1230–8.
- Basile A., Sorbo S. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of coumarins from the roots of *Ferulago campestris* (Apiaceae) // Molecules. – 2009; Feb 27; 14 (3): 939–52.
- Beloborodova N. et al. Effect of phenolic acids of microbial origin on production of

- reactive oxygen species in mitochondria and neutrophils // *J. Biomed. Sci.* – 2012; Oct12;19: 89.
18. Benbarek H. et al. Modulatory effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of equine neutrophils // *Vet Res Commun.* – 2012; 36: 29–33.
19. Bilenko M. et al. Production of Reactive Oxygen Species by Monocyte-Derived Macrophages from Blood of Healthy Donors and Patients with Ischemic Heart Disease. ISSN 1990–7508, *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry.* – 2009; 3 (1): 64–70.
20. Björnsdóttir H., Granfeldt D. et al. Inhibition of phospholipase A(2) abrogates intracellular processing of NADPH-oxidase derived reactive oxygen species in human neutrophils // *Exp Cell Res.* – 2013; Mar 10; 319 (5): 761–74.
21. Bukhari S., Jantan I. et al. Synthesis and Effects of Pyrazolines and Isoxazoles on the Phagocytic Chemotaxis and Release of Reactive Oxygen Species by Zymosan Stimulated Human Neutrophils // *Med Chem.* – 2012; Oct 23.
22. Calum H., C. Moser et al. «Thermal injury induces impaired function in polymorphonuclear neutrophil granulocytes and reduced control of burn wound infection» // *Clin. Exp. Immunol.* – 2009; 156 (1): 102–10.
23. Campbell A. *Chemiluminescence: Principles and Applications in Biology and Medicine* // Ellis Horwood series in biomedicine. – New York, 1988.
24. Cathcart M. Regulation of Superoxide Anion Production by NADPH Oxidase in Monocytes / Macrophages: Contributions to Atherosclerosis. *Arterioscler // Thromb. Vasc. Biol.* – 2004; 24: 23–8.
25. Dahlgren C., Karlsson A., Bylund J. Measurement of Respiratory Burst Products Generated by Professional Phagocytes // *Methods in Molecular Biology, Vol. 412 Neutrophil Methods and Protocols.* Humana Press Inc, Totowa, NJ. – 2007.
26. Di Renzo M., Pasqui A. et al. Evaluation of some immune functions in a patient affected by common variable immunodeficiency using luminescent techniques // *J. Biolumin. Chemilumin.* – 1997; Jul-Aug; 12 (4): 193–7.
27. Edwards S. *Biochemistry and physiology of the neutrophil.* Cambridge University Press, U.K. 1994.
28. Fujimaki Y., Shimoyama T. et al. Low-level laser irradiation attenuates production of reactive oxygen species by human neutrophils // *J. Clin. Laser Med Surg.* – 2003; Jun; 21 (3): 165–70.
29. Hać S., Dobosz M., Kaczor J. et al. Neutrophil engagement and septic challenge in acute experimental pancreatitis in rats // *World J. Gastroenterol.* – 2005; Nov 7; 11 (41): 6459–65.
30. Halliwell B., Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Clarendon Press, Oxford. – 1985.
31. Kapiszewska M., Cierniak A. et al. Lifespan of etoposide-treated human neutrophils is affected by antioxidant ability of quercetin // *Toxicol In Vitro.* – 2007; Sep; 21 (6): 1020–30.
32. Khan H. Zymosan-induced luminol-dependent chemiluminescence response of circulating and extravasated leukocytes in experimental sepsis // *Mediators Inflamm.* – 2004; Apr; 13 (2): 123–5.
33. Köhnke A., Maier C. et al. In vitro investigations of the effect of morphine and its metabolites on the phagocytosis of peripheral mononuclear cells // *Schmerz.* – 1999; Apr 14; 13 (2): 121–6.
34. Kuribayashi F., Tsuruta S. et al. Cell adhesion markedly increases lucigenin-enhanced chemiluminescence of the phagocyte NADPH oxidase // *Genes Cells.* – 2008; Dec; 13 (12): 1249–56.
35. Lundqvist H., Kricka L. et al. Influence of different luminols on the characteristics of the chemiluminescence reaction in human neutrophils // *J. Biolumin.* – 1995; 10: 353–359.
36. Machneva T., Buravlev E. et al. Role of endogenous porphyrins in the effects of low-intensity laser radiation of the red region on free radical processes in the blood of rats under experimental endotoxic shock // *Biofizika.* – 2011; Jul–Aug; 56 (4): 705–13.
37. Malinin V., Kazarinov K., Putvinskii A. Mechanism of human blood neutrophil activation by electric field pulses // *Biofizika.* – 1996; Jul–Aug; 41 (4): 876–86.
38. Mokgobu M., Anderson R. et al. Manganese promotes increased formation of hydrogen peroxide by activated human macrophages and neutrophils in vitro // *Inhal Toxicol.* – 2012; Aug; 24 (10): 634–44.
39. Morel F., Doussiere J., Vignais P. The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *Eur. J. Biochem.* – 1991; 201: 523–46.
40. Nosál R., Perecko T., Jantínová V. et al. Naturally appearing N-feruloylserotonin isomers suppress oxidative burst of human neutrophils at the protein kinase C level // *Pharmacol Rep.* – 2011; 63 (3): 790–8.
41. Obratsov I. An Evaluation of Neutrophil Function: a New Approach to the Chemiluminescent Analysis // *Immunology. Vol. 137, Issue Supplement s1, 2012.* – P. 199.
42. Pierce L., Tarnow-Mordt W., Cree I. Antibiotic effects on phagocyte chemiluminescence in vitro // *Int J. Clin. Lab. Res.* – 1995; 25 (2): 93–8.
43. Rodríguez-Orozco A. et al. Recent Applications of Chemiluminescence Assays in Clinical Immunology // *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.* – 2010; 10: 1393–400.
44. Romaschin A., Walker P. Endotoxin activity in whole blood by neutrophils chemiluminescence – a novel analytical paradigm // *Clin. Chem.* – 2000; 46: 1504–6.
45. Shkapova E., Kurtasova L., Savchenko A. Lucigenin- and luminol-dependent chemiluminescence of blood neutrophils in patients with renal cancer // *Bull Exp Biol Med.* – 2010; Aug; 149 (2): 239–41.
46. Sinyakov M., Zhevelev H., Avtalion R. Determinants of pathology in light-irradiated cells // *Photochem Photobiol.* – 2010; Jan–Feb; 86 (1): 123–30.
47. Soeiro-Pereira P., Falcai A. et al. BAY 41-2272, a soluble guanylate cyclase agonist, activates human mononuclear phagocytes // *Br. J. Pharmacol.* – 2012; Jul; 166 (5): 1617–30.
48. De Souza Ferreira C., Araújo T.H. et al. Neutrophil dysfunction induced by hyperglycemia: modulation of myeloperoxidase activity. // *Cell. Biochem. Funct.* – 2012; Oct; 30 (7): 604–10.
49. Spectral Diagnostics Incorporated Endotoxin Activity Assay (EAT™) For In Vitro Diagnostic Use Only.
50. Vargas F., Rivas C., Perdomo H. et al. Clozapine prevents apoptosis and enhances receptor-dependent respiratory burst in human neutrophils // *Pharmazie.* – 2005; May; 60 (5): 364–8.