

## ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ МЕТОДОМ ДВУХСТАДИЙНОЙ СТИМУЛЯЦИИ: НОВЫЙ ПОДХОД К ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОМУ АНАЛИЗУ

© 2015 г. И.В. Образцов\*, М.А. Годков\*\*, А.М. Полимова\*\*\*, Е.М. Дёмин\*\*\*, Е.В. Проскурнина\*\*\*, Ю.А. Владимиров\*\*\*

\*Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачёва, Москва, Россия;

\*\*НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва, Россия;

\*\*\*МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Поступила: 26.11.2015. Принята: 04.12.2015

В работе предложен новый способ анализа функциональной активности нейтрофилов, основанный на последовательной стимуляции двумя стимулами с использованием метода активированной хемилюминесценции. Проанализирован хемилюминесцентный ответ клеток цельной крови человека при различных условиях выполнения эксперимента, а также под воздействием комбинаций двух стимулов (*N*-формил-метионил-лейцил-фенилаланин, фМЛФ и 4β-форбол-12-миристан-13-ацетат, ФМА), определены оптимальные условия проведения анализа. Методика, основанная на двухстадийной стимуляции клеток ФМА и фМЛФ, применена для исследования крови здоровых доноров. В результате предложен новый способ оценки функциональной активности нейтрофилов, адаптированный для применения в клинической практике.

*Ключевые слова:* хемилюминесценция, функциональная активность нейтрофилов, ФМА, фМЛФ, двухстадийная стимуляция

### ВВЕДЕНИЕ

Нейтрофильный гранулоцит является одной из наиболее активных клеток, в числе первых отвечающей на антигенную агрессию и воздействие повреждающих факторов. Кислородзависимая микробицидность фагоцитов реализуется за счёт генерации спектра активных форм кислорода (АФК), при этом многообразные цитотоксичные метаболиты кислорода образуются в цепи превращений, в начале которой стоит супероксидный радикал [1]. Генерация супероксидного радикала происходит благодаря сборке и активации НАДФ-Н оксидазного комплекса в клеточной мембране и мембранах фагосом [2].

Существует ряд методик, позволяющих оценить функциональную активность нейтрофилов в отношении выработки ими АФК [3]. Наиболее распространённым вследствие простоты исполнения и возможности использования недорогого оборудования стал НСТ-тест в различных вариациях. Однако этот тест

**Адрес:** 117997, г. Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, д. 1, Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачёва, Образцов Игорь Владимирович. Телефон/Факс: + 74991998444. **E-mail:** igor\_obraztsov@bk.ru

#### Авторы:

**Образцов И.В.**, аспирант Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачёва, Москва, Россия;

**Годков М.А.**, д.м.н., руководитель отдела лабораторной диагностики НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва, Россия;

**Полимова А.М.**, аспирант факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

**Дёмин Е.М.**, аспирант факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

**Проскурнина Е.В.**, к.х.н., доцент кафедры биофизики факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

**Владимиров Ю.А.**, д.б.н., акад., проф., заведующий кафедрой биофизики факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия.

имеет ряд недостатков: он не позволяет зарегистрировать выработку АФК в динамике, регистрация результатов посредством визуальной микроскопии увеличивает количество субъективных ошибок и не позволяет проводить большое количество исследований [4].

Ряд методов тестирования окислительного метаболизма нейтрофильных гранулоцитов основан на изменении оптической плотности индикаторов под действием ферментов клеток: восстановление цитохрома с [5], окисление фенолового красного [6], фотометрический вариант НСТ-теста [7]. Эти методы относительно просты в исполнении, однако так же, как и классический НСТ-тест, не дают возможности оценки динамики синтеза АФК клетками. Кроме того, указанные фотометрические методы требуют выделения чистой популяции фагоцитов, что приводит к дополнительному воздействию на клетки и ограничивает количество исследований.

Цитометрические методы оценки кислородного метаболизма обладают хорошими показателями чувствительности и специфичности, однако требуют применения дорогостоящего оборудования [8].

Методики оценки окислительного метаболизма клеток, основанные на регистрации хемилюминесценции (ХЛ), широко используются исследователями начиная с 70-х годов XX века. К достоинствам хемилюминесцентного анализа относятся возможность регистрации клеточной активации в процессе её развития и высокая чувствительность. На сегодняшний день разработан ряд методик, основанных на применении различных активаторов ХЛ (люминол, люцигенин, другие более редкие активаторы) и стимулов оксидативного взрыва нейтрофилов (зимозан, латекс, сульфат бария, ФМА, фМЛФ и др.).

Самым простым способом оценки синтеза АФК нейтрофилами является регистрация собственного свечения стимулированных клеток без использования активатора ХЛ. Свечение в данном случае объясняют выделением синглетного кислорода в процессе метаболизма АФК, образуемого при стимулировании фагоцитов [9]. Однако интенсивность собственной ХЛ, обусловленной синтезом АФК клетками, очень мала, поэтому при регистрации собственной ХЛ клеток приходится брать много клеток для анализа.

После работ Р. Аллена и соавторов в начале 1970-х годов широкое распространение получило использование люминола в качестве

химического активатора ХЛ [7] [10]. ХЛ, индуцированная люминолом, обусловлена окислением последнего АФК и взаимодействием окисленных форм люминола с супероксидным радикалом или пероксидом водорода [1].

Проведено большое количество исследований, направленных на оценку окислительного метаболизма различных популяций клеток (полиморфно-ядерные лейкоциты, мононуклеары или тканевые макрофаги), но в последнее время ведётся активная разработка методов регистрации ХЛ разбавленной цельной крови [11]. Работа с цельной кровью имеет ряд преимуществ и недостатков по сравнению с исследованием выделенных популяций фагоцитов. Проведение исследований на чистой клеточной популяции позволяет исключить в ходе анализа влияние микроокружения (гуморальные факторы и межклеточная кооперация) на фагоциты. С другой стороны, процесс выделения клеток может их травмировать и привести к их активации, что затрудняет оценку истинного состояния клеток [12]. Кроме того, выделение определённой популяции клеток требует много времени и труда и, к тому же, сопряжено с большими экономическими затратами.

Этого недостатка лишены методы, основанные на измерении хемилюминесценции цельной крови, разбавленной изотоническим солевым раствором, в котором жизнеспособность клеток сохраняется. Однако в исследованиях, проведенных на этом объекте, разные авторы использовали различные среды, разные активаторы окислительного метаболизма фагоцитов (стимулы) брали разные объёмы тестируемых проб. В итоге к настоящему времени не выработаны ни стандартные протоколы ХЛ-анализов, ни единые критерии оценки их результатов, и потому трудно судить о прогностической и диагностической значимости этих методов при различных видах патологии.

В настоящей работе предлагается новый подход к хемилюминесцентному исследованию функциональной активности нейтрофилов, основанный на последовательной стимуляции нейтрофилов в образце цельной крови двумя стимулами. Такой подход, по мнению авторов, позволит нивелировать различия между клеточным ответом, связанным с выделением и хранением образцов крови, и максимально использовать радикал-продуцирующий ресурс клеток, улучшив, таким образом, чувствительность и воспроизводимость анализа.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах использована кровь 115 практически здоровых доноров. При подборе оптимальных условий эксперимента сформированы 4 группы по 8 человек в каждой (средний возраст — 24, 28, 35 и 36 лет, соответственно) для оценки: (1) формы ХЛ-ответа на фМЛФ; (2) зависимости ХЛ-ответа от временного интервала между взятием крови и анализом; (3) зависимости ХЛ-ответа от концентрации фМЛФ; (4) зависимости ХЛ-ответа от концентрации (разведения) крови. Для оценки ХЛ-ответа при стимуляции сочетаниями активаторов исследована кровь трёх доноров. Во всех опытах взятие 5 мл крови осуществляли из кубитальной вены в вакутейнеры с гепарином (конечная концентрация гепарина — 5 ЕД/мл).

В сформированной контрольной группе из 90 доноров средний возраст обследованных составил 32,4 года при стандартном отклонении 11 лет. Приоритетную часть контрольной группы доноров составляли мужчины (69,6%).

Использовали реагенты: раствор Хенкса с глюкозой (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН), люминол, НЕРЕС, фМЛФ (рабочий раствор концентрацией 100 мкМ), ФМА (рабочий раствор концентрацией 0,5 мкг/мл) (все Sigma-Aldrich).

Регистрация ХЛ выполнена на 12-кюветном хемилюминометре Lum-12 (ДИСофт, Россия) с оригинальным программным обеспечением PowerGraph 3.0. Подсчёт нейтрофилов проводили на гематологическом анализаторе Abacus Junior 30 (Diatron, Австрия).

Во всех экспериментах в кювету хемилюминометра вносили раствор Хенкса с НЕРЕС в качестве среды, раствор люминола (1 мМ) до конечной концентрации 45 мкМ, аликвоту цельной крови (45 мкл, конечное разведение в 22 раза, кроме методики 3) и растворы стимулов в разных концентрациях. Общий объём раствора в кювете составлял 1,000 мл. Кровь до анализа хранили при комнатной температуре. Для каждого образца крови исследовали по три параллельных пробы (средний уровень вариации в параллельных пробах не превышал 15%). Ниже описаны методики:

*1. Исследование зависимости ХЛ ответа от продолжительности хранения крови.* Исследованы восемь образцов крови с увеличением времени хранения образца от момента взятия крови до анализа от 0 до 180 минут с

шагом 20 минут. В системе, содержащей среду, люминол и пробу крови, регистрировали спонтанную ХЛ в течение 20 минут, затем вносили 100 мкМ раствор фМЛФ в конечной концентрации 4 мкМ и регистрировали индуцированный ХЛ ответ в течение не менее 60 минут.

*2. Исследование зависимости ХЛ ответа от концентрации фМЛФ.* Проанализированы восемь образцов крови, хранившихся при комнатной температуре в течение 2 часов  $\pm$  30 минут. В системе, содержащей люминол и пробу крови, регистрировали спонтанную ХЛ в течение 20 минут, затем вносили фМЛФ (конечные концентрации 0, 1, 2, 4, 8, 10, 15 и 20 мкМ) и регистрировали индуцированный ХЛ ответ в течение не менее 60 минут.

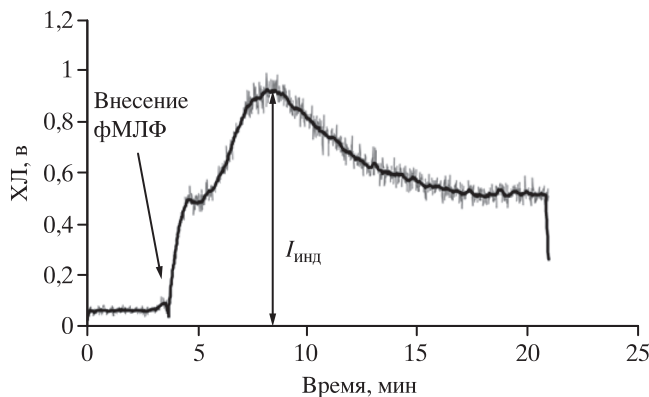
*3. Исследование зависимости ХЛ ответа от концентрации (разведения) крови.* Из образца, хранившегося в течение 2 часов  $\pm$  30 минут, отбирали аликвоты такого объёма, чтобы в кювете достигалось разведение в 2; 5,5; 8; 11; 22; 44 и 88 раз, что соответствовало конечной концентрации крови 50; 18; 12,5; 9,09; 4,55; 2,27 и 1,14%. В системе с люминолом и пробой крови регистрировали спонтанную ХЛ в течение 20 минут, затем вносили фМЛФ (конечная концентрация 10 мкМ) и регистрировали индуцированный ХЛ ответ в течение не менее 60 минут.

*4. Исследование эффекта двойной последовательной стимуляции ФМА + фМЛФ.* Проанализировано три образца крови, хранившихся в течение 2 часов. В системе с люминолом и пробой крови регистрировали спонтанную ХЛ в течение 15 минут, затем вносили ФМА (конечная концентрация 50 нг/мл). После 20 минут инкубации проводили стимуляцию фМЛФ (конечная концентрация 10 мкМ) и регистрировали индуцированный ХЛ ответ в течение не менее 60 минут.

Изучали аналитические показатели — среднюю активность нейтрофила спонтанную и после стимуляции, коэффициент активации и коэффициент затухания. Для статистической обработки данных и графического представления её результатов использованы стандартные программные продукты: пакеты Excel (с приложением StatPad) (Microsoft, США) и STATISTICA (StatSoft, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На **рис. 1** представлена типичная кинетика ХЛ ответа клеточной суспензии на внесение фМЛФ. После внесения стимула наблюдали



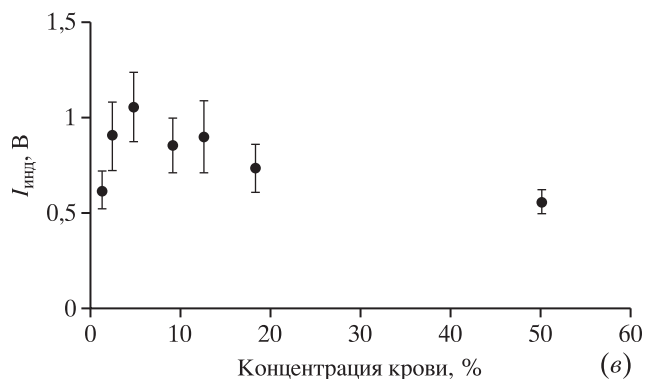
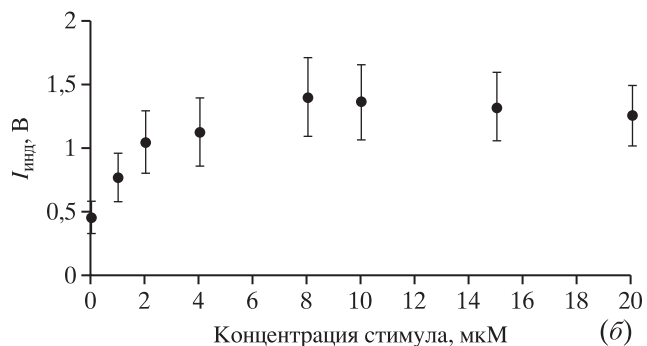
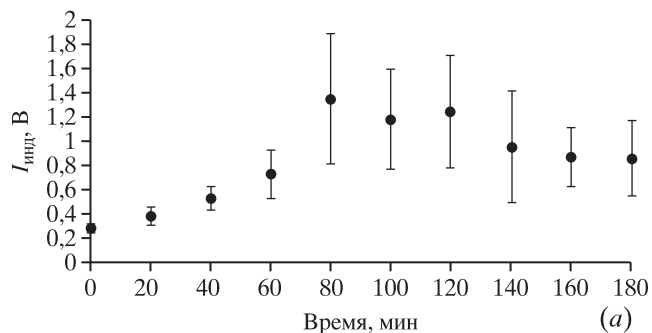
**Рис. 1.** Кинетика ХЛ-ответа клеточной суспензии на введение фМЛФ. Стрелкой показан момент внесения стимула.  $I_{инд}$  – амплитуда пика вспышки хемилюминесценции. Условия эксперимента описаны в методике 1.

резкое нарастание свечения, а затем постепенный спад с выходом на плато или медленным нарастанием. В качестве аналитического сигнала использовали амплитуду пика  $I_{инд}$ . На первом этапе были подобраны оптимальные условия проведения анализа: время хранения крови (методика 1), концентрация основного стимула фМЛФ (методика 2) и концентрация (разведение) крови в кювете (методика 3).

По мере увеличения времени хранения пробы отмечали нарастание интенсивности ХЛ, что может быть обусловлено постепенным праймингом фагоцитов, реагирующих на изменение окружающей среды, а затем ее спад (**рис. 2а**), последнее, вероятно, связано с истощением энергетических запасов клеток. Максимальную интенсивность свечения наблюдали при времени хранения образцов от 80 до 120 минут. Изменение интенсивности ХЛ-ответа по мере удлинения временного интервала между взятием крови и анализом обуславливает необходимость стандартизации указанного параметра при исследовании клеточной ХЛ. Мы рекомендуем использовать двухчасовой временной интервал, так как он характеризуется максимальной интенсивностью респираторного взрыва нейтрофилов и является достаточным для осуществления преаналитического этапа (транспортировка крови в лабораторию, подготовка пробы к анализу).

Из зависимости  $I_{инд}$  от концентрации фМЛФ мы выбрали оптимальную концентрацию стимула 10 мкМ, обеспечивающую максимальную активацию нейтрофилов (**рис. 2б**).

Зависимость интенсивности ХЛ-ответа от концентрации крови в кювете имела вид кривой с максимумом (**рис. 2в**). При небольших

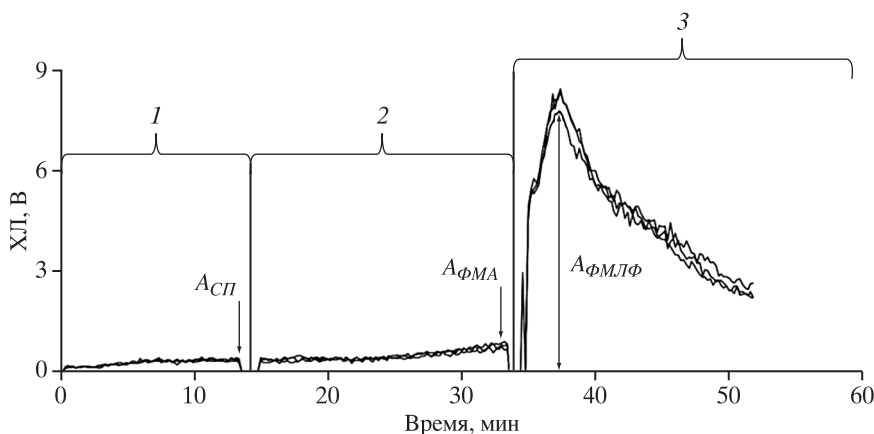


**Рис. 2.** Интенсивность индуцированного ХЛ-ответа ( $I_{инд}$ ) клеточной суспензии при различных экспериментальных условиях: а – при различных временных интервалах между взятием крови и анализом, методика 1; б – при различных концентрациях фМЛФ, методика 2; в – при различных концентрациях крови, методика 3. Точки – средние значения  $I_{инд}$ . Показана ошибка среднего.

концентрациях крови число нейтрофилов невелико, с одной стороны, а при больших концентрациях крови проявляется мешающий эффект самопоглощения ХЛ. Таким образом, для проведения экспериментов было выбрано оптимальное разведение крови в 22 раза (концентрация крови в кювете 4,55%).

Выбранные аналитические условия были использованы для проведения дальнейших исследований.

Для подбора стимулов и порядка их добавления исследовали растворимые стимулы ФМА и фМЛФ. ФМА относится к стимулам



**Рис. 3.** Типичная хемилюминограмма крови здорового человека. Условия эксперимента описаны в методике 4: 1 – спонтанный ответ; 2 – предстимуляция ФМА; 3 – основной стимул фМЛФ.  $A_{СП}$  – амплитуда спонтанного ХЛ ответа;  $A_{ФМА}$  – амплитуда ответа, индуцированного ФМА;  $A_{ФМЛФ}$  – амплитуда ответа, индуцированного фМЛФ.

с внутриклеточным механизмом действия, стимул проникает в клетку путем пассивной диффузии и активирует протеинкиназу С. фМЛФ характеризуется внеклеточным рецепторным механизмом, причем стимуляция фМЛФ обусловлена последовательной сменой внеклеточного и внутриклеточного синтеза АФК [10]. Взаимодействие фМЛФ со специфическими рецепторами приводит к немедленной выработке АФК во внеклеточную среду НАДФ-Н оксидазными комплексами, находящимися на плазматической мембране. Активация рецепторов фМЛФ стимулирует растянутый во времени процесс фагоцитоза и образование фагосом, в которых также происходит синтез АФК [13].

Опыты с последовательным внесением стимулов (методика 4) выявили значительный потенцирующий эффект внесения ФМА перед стимуляцией фМЛФ. После внесения ФМА (предстимуляция) наблюдали относительно слабое нарастающее во времени свечение. Нарастание уровня сигнала при внесении ФМА в клеточную суспензию обусловлено его механизмом поступления в клетку за счёт пассивной диффузии. После добавления

фМЛФ (**рис. 3**) практически сразу наблюдали развитие интенсивной хемилюминесценции (вспышку), интенсивность которой на порядок превышала эффект стимуляции единичным стимулом фМЛФ. Эти наблюдения подтверждают данные об эффекте потенцирования рецепторов фМЛФ за счёт действия ФМА, приведённые в [9].

Разработанный подход был применен для обследования группы здоровых доноров (методика 4). На **рис. 4** показана хемилюминограмма здорового человека и отмечены параметры, использованные для анализа.

Кривая развития ХЛ состоит из трех частей: спонтанная ХЛ нейтрофилов, ФМА-предстимулированная ХЛ, и ФМА + фМЛФ стимулированная ХЛ нейтрофилов. С клинической точки зрения интерес могут представлять следующие показатели: нормированная амплитуда сигнала (максимальная интенсивность, деленная на число нейтрофилов) спонтанной и фМЛФ-стимулированной хемилюминесценции:  $A_{СП}^*$  и  $A_{ФМЛФ}^*$ , а также коэффициент затухания  $K_d$ , равный отношению интенсивностей ХЛ на 23-й минуте после вспышки к амплитуде пика  $A_{ФМЛФ}^{+23} / A_{ФМЛФ}$ . В среднем в

**Таблица 1.** Проверка принадлежности выборок данных к нормальному распределению

	$A_{СП}^*$		$A_{ФМЛФ}^*$		$K_d$	
	W	p	W	p	W	p
Мужчины, n = 57	0,92	0,002	0,93	0,004	0,71	<0,001
Женщины, n = 33	0,73	<0,001	0,81	<0,001	0,90	0,008

**Таблица 2.** Проверка принадлежности выборок мужчин (n = 57) и женщин (n = 33) к одному распределению

	U	z	p
$A_{СП}^*$	860	-1,57	0,12
$A_{ФМЛФ}^*$	989	-0,35	0,73
$K_d$	567	0,99	0,32

**Таблица 3.** Статистическое описание массива аналитических данных,  $n = 90$ 

	Медиана	Интерквартильный размах	2,5–97,5 процентиля (референтный интервал)
$A_{сп}^*$ , В/кл	$0,27 \cdot 10^{-5}$	$0,35 \cdot 10^{-5}$	$0,036 \cdot 10^{-5} - 1,15 \cdot 10^{-5}$
$A_{фМЛФ}^*$ , В/кл	$4,13 \cdot 10^{-5}$	$3,64 \cdot 10^{-5}$	$0,70 \cdot 10^{-5} - 14,20 \cdot 10^{-5}$
$K_d$	0,43	0,29	0,23–1,10

ряде случаев в этот момент наступает замедление спада ХЛ, а при обследовании пациентов с острым воспалительным процессом (ожоговый сепсис) было зарегистрировано развитие дополнительного свечения.

Данные были проверены на нормальность распределения по критерию Шапиро – Уилка (табл. 1).

Распределение данных не является нормальным, поэтому дальнейшие оценки проводили по непараметрическим критериям. По критерию Манна – Уитни для независимых выборок подтверждается гипотеза об отсутствии статистически значимых различий между выборками мужчин и женщин для всех определенных параметров (табл. 2).

Влияние возраста на параметры ХЛ-ответа клеток также оказалось статистически не значимо. В дальнейшем рассматривали объединенную по полу и возрасту группу. Описание массива данных приведено в табл. 3. В качестве референтного принят интервал, в который попадает 95% значений параметров.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан новый подход оценки функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов в образце цельной крови, основанный на последовательной стимуляции клеток двумя стимулами с различным механизмом действия. Регистрация аналитического сигнала осуществляется методом активированной хемилюминесценции. За счет двойной стимуляции реализуется максимальное использование радикал-продуцирующего ресурса нейтрофилов, а хемилюминесцентное детектирование обеспечивает высокую чувствительность определения аналитических параметров. Таким образом, предложенная методика характеризуется высокой точностью и воспроизводимостью.

Методика была апробирована на образцах крови 90 практически здоровых доноров. Предложены аналитические сигналы, имею-

щие клиническую значимость, и определены их референтные интервалы. Разработанный подход оценки функциональной активности нейтрофилов с двойной стимуляцией может быть использован для оценки функционального состояния иммунной системы человека.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-15-00375).

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю признательность проф. С.В. Смирнову и всему коллективу отделения острых термических поражений НИИ СП им. Н.В. Склифосовского; Е.Н. Кобзевой и всему коллективу отделения трансфузиологии НИИ СП им. Н.В. Склифосовского за неоценимую помощь в работе с контрольной группой доноров; А.И. Баженову, В.П. Никулиной и всему коллективу отделения иммунологии отдела лабораторной диагностики НИИ СП им. Н.В. Склифосовского за поддержку в организации и проведении исследования, за участие в обсуждении работы. Также авторы выражают отдельную благодарность медицинским сестрам и лаборантам, выполнявшим взятие клинического материала и дополнительные лабораторные исследования.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Владимирова Ю.А., Проскурнина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция. Успехи биологической химии 2009, 49, 341–388. [Vladimirova Yu.A., Proskurnina E.V. Free radicals and cell chemiluminescence. Successes of biological chemistry, 2009, 49, 341–388].
2. Воробьева Н.В. NADPH оксидаза нейтрофилов и заболевания, связанные с ее дисфункцией. Иммунология 2013, 34(4), 232–238. [Vorobjeva N.V. Neutrophil NADPH-oxidase and the diseases, associated with its dysfunction. Immunology 2013, 34(4), 232–238].
3. Земсков В.М., Барсуков А.А. Кислородный метаболизм и подвижность клеток. В кн.: Изуче-

- ние функционального состояния фагоцитов человека Методические рекомендации МЗ СССР, Москва, 1988, 36–42. [Zemskov V.M., Barsukov A.A. Oxidative metabolism and cellular motility. In: Assessment of the phagocytic function in humans, Guidelines of the USSR Ministry of Health, Moscow, 1988, 36–42].
4. Кулабухов В.В., Рябов Г.А. Современные методы оценки кислородного статуса организма и возможности метаболического мониторинга критических состояний. Кремлевская медицина. Клинический вестник 1996, 2, 43–46. [Kulabukhov V.V., Ryabov G.A. Current methods of the oxidative status evaluation and the capabilities of metabolic monitoring in critical conditions, Cremlin medicine. Clinical bulletin, 1996, 2, 43–46].
  5. Ido I.J., Mueller A.C. Neutrophil NADPH oxidase is reduced at the Anaplasma phagocytophilum phagosome. Infection and immunity 2004, 72(9), 5392–5401.
  6. Guerra B.A., Otton R. Impact of the carotenoid astaxanthin on phagocytic capacity and ROS/RNS production of human neutrophils treated with free fatty acids and high glucose. International immunopharmacology 2011, 11(12), 2220–2226.
  7. Allen R.C., Stjernholm R.L., Steele R.H. Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. Biochemical and biophysical research communications 1972, 47(4), 679–684.
  8. Parment K., Zetterberg A., Ernerudh J., Bakteman K., Steinwall I., Sjoberg F. Long-term immunosuppression in burned patients assessed by in vitro neutrophil oxidative burst (Phagoburst). Burns 2007, 33(7), 865–871.
  9. Edwards S.W. Biochemistry and physiology of the neutrophil. Cambridge University Press, 1994.
  10. Allen R.C. Role of oxygen in phagocyte microbicidal action. Environmental health perspectives, 1994, 102 Suppl 10, 201–208.
  11. Образцов И.В., Годков М.А. Хемилюминесцентный анализ клеток крови в медицине: история, теория, практика. Молекулярная медицина 2013(4), 3–9. *Obraztsov I.V., Godkov M.A. Chemiluminescent Analysis of the Blood Cells in Medicine: History, Theory, Practice (in Russian). Molecular Medicine J. 2013, 4, 3–9.*
  12. Paoliello-Paschoalato A.B., Azzolini A.E., Cruz M.F., Marchi L.F., Kabeya L.M., Donadi E.A., Lucisano-Valim Y.M. Isolation of healthy individuals' and rheumatoid arthritis patients' peripheral blood neutrophils by the gelatin and Ficoll-Hypaque methods: comparative efficiency and impact on the neutrophil oxidative metabolism and Fcγ receptor expression. J. Immunol. Methods. 2014, 412, 70–77.
  13. Briheim G., Stendahl O., Dahlgren C. Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. Infection and immunity 1984, 45(1), 1–5.

## AN EVALUATION OF NEUTROPHIL FUNCTION IN WHOLE BLOOD SAMPLES WITH TWO-STEP STIMULATION: A NEW APPROACH TO THE CHEMILUMINESCENCE ANALYSIS

**I.V. Obraztsov\***, **M.A. Godkov\*\***, **A.M. Polimova\*\*\***, **E.M. Dyomin\*\*\***,  
**E.V. Proskurnina\*\*\***, **Yu.A. Vladimirov\*\*\***

\*Dmitriy Rogachev Federal Scientific and Clinical Centre for Paediatric Oncology, Haematology and Immunology, Moscow, Russia;

\*\* N.V. Sklifosovskiy Research Institute of Emergency Care, Moscow, Russia;

\*\*\* Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

RECEIVED: 26.11.2015. ACCEPTED: 04.12.2015

In this study we propose a new approach to neutrophil function evaluation. It is based on enhanced chemiluminescence with subsequent stimulation by two stimuli. We analyzed CL-response of the whole blood under various experimental conditions using combinations of two stimuli (N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and found the optimal analytical decigh. As a result, a procedure for the evaluation of a neutrophil function based on a double-step stimulation of the cells by PMA and fMLP is proposed. Using our approach we analyzed blood samples from healthy donors. As a result, a new method for the evaluation of a phagocyte function applicable in clinical practice is suggested.

*Key words:* chemiluminescence, neutrophil functional activity, PMA, fMLP, two-step stimulation

**Authors:**

**Obraztsov I.V.**, ✉ Postgraduate Student, Dmitry Rogachev Federal Scientific and Clinical Centre for Paediatric Oncology, Haematology and Immunology, Moscow, Russia;

**E-mail:** igor\_obraztsov@bk.ru;

**Godkov M.A.**, Doctor of Medical Sciences, Head of the Clinical Laboratory division, N.V. Sklifosovskiy Research Institute of Emergency Care, Moscow, Russia;

**Polimova A.M.**, Postgraduate Student, Faculty of Basic Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

**Dyomin E.M.**, Postgraduate Student, Faculty of Basic Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

**Proskurnina E.V.**, Candidate of Chemical Sciences, Assistant Professor, Department of Medical Biophysics, Faculty of Basic Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

**Vladimirov Yu.A.**, Doctor of Biological Sciences, Academician, Professor, Head of Department of Medical Biophysics, Faculty of Basic Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia.